



Rådet for
Den Europæiske Union

Bruxelles, den 25. februar 2019
(OR. en)

6800/19
ADD 1

COMPET 206
ENV 212
CHIMIE 36
MI 195
ENT 53
SAN 104
CONSOM 77
EMPL 121
SOC 153

FØLGESKRIVELSE

fra:	Europa-Kommissionen
modtaget:	22. februar 2019
til:	Generalsekretariatet for Rådet
Vedr.:	Bilag til KOMMISSIONENS FORORDNING (EU) .../... af XXX om ændring med henblik på tilpasning til den tekniske udvikling af bilaget til forordning (EF) nr. 440/2008 om fastlæggelse af forsøgsmetoder i henhold til Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1907/2006 om registrering, vurdering og godkendelse af samt begrænsninger for kemikalier (REACH)

Hermed følger til delegationerne dokument - Annex to D060575/02.

Bilag: Annex to D060575/02

DA

BILAG

I bilaget til forordning (EF) nr. 440/2008 foretages følgende ændringer:

(1) Del B, kapitel B.4, affattes således:

"B.4. AKUT HUDIRRITATION/-ÆTSNING

INDLEDNING

1. Denne forsøgsmetode svarer til OECD-testvejledning (Test Guideline (TG)) 404 (2015). OECD-vejledningerne om testning af kemikalier (Guidelines for Testing of Chemicals) revideres regelmæssigt for at sikre, at de afspejler den bedste tilgængelige viden. Ved revisionen af OECD TG 404 er der lagt særlig vægt på forbedringer i relation til betænkkeligheder omkring dyrenes velfærd og vurdering af alle foreliggende oplysninger om testkemikaliet med henblik på at undgå unødvendige forsøg med laboratoriedyr. Den opdaterede version af OECD TG 404 (der oprindeligt blev vedtaget i 1981 og revideret i 1992, 2002 og 2015) indeholder en henvisning til det vejledende dokument om integrerede tilgange til testning og vurdering (IATA) for hudirritation/-ætsning (1), som foreslår en modulær tilgang til testning for hudirritation og -ætsning. IATA beskriver flere moduler, som grupperer informationskilder og analyseværktøjer, og vejleder i, i) hvordan eksisterende forsøgsdata og ikke-forsøgsdata integreres i og anvendes til vurdering af kemikaliers hudirritations-/hudætsningspotentiale, og ii) foreslår en tilgang, når der er behov for yderligere testning (1). Når det er nødvendigt, anbefales det desuden i vejledningen, at man i den indledende in vivo-test anbringer de tre testlapper successivt i stedet for samtidigt på dyret.
2. Definitionerne af hudirritation og -ætsning findes i tillægget til denne forsøgsmetode.

INDLEDENDE OVERVEJELSER

3. Både den videnskabelige kvalitet og dyrenes velfærd fremmes ved, at in vivo-testning ikke udføres, før alle relevante data om testkemikaliets potentielle hudætsende eller hudirriterende egenskaber er vurderet ved en weight-of-the-evidence-analyse (WoE) som nævnt i det vejledende dokument om integrerede tilgange til testning og vurdering for hudætsning og -irritation, dvs. gennem det vejledende dokumentets tre dele og deres tilsvarende moduler (1). Kort fortalt ses der i del 1 på eksisterende data gennem syv moduler, som omfatter data fra mennesker, in vivo-data, in vitro-data, data om fysisk-

kemiske egenskaber (f.eks. pH, navnlig kemikaliets stærkt sure eller basiske egenskaber) og ikke-forsøgsmetoder. I del 2 udføres WoE-analysen. Hvis denne WoE-analyse stadig er usikker, bør del 3 udføres med yderligere testning startende med in vitro-metoder, og in vivo-testning anvendes som en sidste udvej. Analysen bør derfor mindske behovet for in vivo-testning til bestemmelse af testkemikaliers hudætsende/-irriterende egenskaber, for hvilke der allerede foreligger tilstrækkelig dokumentation fra andre undersøgelser vedrørende disse to endepunkter.

IN VIVO-TESTENS PRINCIP

4. En enkelt dosis af testkemikaliets påføres på huden af et forsøgsdyr. De ubehandlede hudområder på dyret tjener som kontrol. Graden af irritation/ætsning bestemmes og klassificeres med de foreskrevne intervaller og beskrives yderligere med henblik på at give en fuldstændig evaluering af virkningerne. Undersøgelsen skal strække sig over tilstrækkelig lang tid til, at de iagttagne virkninger reversibilitet eller irreversibilitet kan vurderes.
5. Dyr, som viser vedvarende tegn på stærk lidelse og/eller smerte i en hvilken som helst del af forsøget, aflives humanitært, og testkemikaliets vurderes tilsvarende. Kriterierne for beslutningen om human aflivning af døende og stærkt lidende dyr kan findes i et separat vejledende dokument (2).

FORBEREDELSE AF IN VIVO-TESTEN

Valg af dyreart

6. Det foretrukne forsøgsdyr er albinokaninen, og der anvendes raske unge voksne dyr. Anvendes andre arter, skal dette valg begrundes.

Klargøring af dyrene

7. Ca. 24 timer før forsøget fjernes pelsen ved tæt klipning af dyrenes ryg. Der drages omsorg for ikke at beskadige huden, og kun dyr med sund, intakt hud må anvendes.
8. Visse kaninstammer har pletter med tæt hårvækst, som er mere eller mindre fremtrædende, afhængigt af årstiden. Sådanne områder med tæt hårvækst bør ikke anvendes som testområder.

Miljø og fodringsbetingelser

9. Dyrene bør holdes i hvert sit bur. Temperaturen i forsøgslokalet bør være 20 °C (± 3 °C) for kaniner. Den relative luftfugtighed skal være mindst 30 % og helst ikke over 70 %, hvilket dog ikke gælder under rengøring af lokalet, men 50-60 % bør tilstræbes. Belysningen skal være kunstig og bestå af 12 timers lys og 12 timers mørke. Som foder kan anvendes sædvanligt laboratoriefoder og fri adgang til drikkevand.

TESTPROCEDURE

Påføring af testkemikaliet

10. Testkemikaliet påføres på et lille område (ca. 6 cm²) af huden og dækkes med en gazelap, som holdes på plads med en ikke-hudirriterende klæbestrimmel. Hvis der anvendes testkemikalier i væskeform eller pastaform, kan det være nødvendigt at påføre testkemikaliet på gazelappen og derefter placere lappen på huden. I eksponeringsperioden bør testkemikaliet holdes i løs kontakt med huden ved hjælp af en passende semiokklusiv forbindelse. Hvis testkemikaliet påføres på gazelappen, bør denne fastgøres til huden, således at der er god kontakt og ensartet fordeling af testkemikaliet på huden. Dyret må ikke have adgang til gazelappen og skal være forhindret i at kunne indtage eller inhalere testkemikaliet.
11. Testkemikalier i væskeform anvendes sædvanligvis ufortyndet. Ved testning af faste stoffer, som – hvis det er hensigtsmæssigt – kan pulveriseres, skal testkemikaliet fugtes tilstrækkeligt med den mindst mulige mængde vand eller om nødvendigt med et passende bærestof for at sikre god kontakt med huden. Anvendes andre bærestoffer end vand, må dette kun have minimal indflydelse på testkemikaliets hudirriterende virkning.
12. Ved slutningen af eksponeringsperioden, som normalt er 4 timer, fjernes tilbagesiddende testkemikalie så vidt muligt ved hjælp af vand eller et egnet opløsningsmiddel, idet det undgås at påvirke den fremkomne respons eller beskadige epidermis.

Dosisniveau

13. Testarealet påføres 0,5 ml flydende eller 0,5 g fast eller halvflydende testkemikalie.

Indledende test (in vivo-test af hudirritation/-ætsning i ét dyr)

14. Når et testkemikalie er bedømt som ætsende, irriterende eller ikke-klassificeret på grundlag af en weight-of-the-evidence-analyse eller forudgående in vitro-testning, er der sædvanligvis ikke behov for yderligere in vivo-testning. I tilfælde, hvor der menes at være behov for yderligere data, udføres in vivo-testen først i ét dyr efter følgende fremgangsmåde: Der anbringes successivt op til tre testlapper på dyret. Den første lap fjernes efter tre minutter. Ses ingen alvorlig hudreaktion, anbringes en ny testlap på et andet område, som fjernes efter en time. Viser observationerne på dette trin, at eksponeringen humant kan udvides til 4 timer, anbringes en tredje lap, som fjernes efter 4 timer, hvorpå responsen vurderes.
15. Iagttages en ætsende virkning efter en af de tre successive eksponeringer, afsluttes testen straks. Iagttages ingen ætsende virkning, efter at den sidste lap er fjernet, observeres dyret i 14 dage, medmindre der udvikler sig ætsning på et tidligere tidspunkt.

16. I tilfælde, hvor testkemikaliet ikke forventes at frembringe ætsning, men kan være irriterende, anbringes en enkelt lap på ét dyr i 4 timer.

Verifikationstest (in vivo-hudirritationstest i flere dyr)

17. Er der ikke iagttaget ætsende virkning i den indledende test, skal den irriterende eller negative respons verificeres i indtil to yderligere dyr, hver gang med én lap, i en eksponeringsperiode på 4 timer. Iagttages en irriterende virkning i den indledende test, kan verifikationstesten udføres sekventielt eller ved eksponering af yderligere to dyr samtidigt. Er den indledende test undtagelsesvis ikke udført, kan to eller tre dyr behandles med én enkelt lap, som fjernes efter 4 timer. Anvendes to dyr, som begge udviser samme respons, er yderligere testning unødvendig. I modsat fald testes også det tredje dyr. Er responsen usikker, kan det være nødvendigt at evaluere resultaterne ved brug af flere dyr.

Observationsperiode

18. Observationsperioden bør strække sig over tilstrækkelig lang tid til, at de iagttagne virkninger reversibilitet kan vurderes fuldt ud. Forsøget skal imidlertid afsluttes, når som helst dyrene viser vedvarende tegn på stærk smerte eller lidelse. For at bestemme virkningernes reversibilitet skal dyrene observeres i indtil 14 dage efter lappernes fjernelse. Observeres der reversibilitet inden for 14 dage, afsluttes forsøget på dette tidspunkt.

Kliniske observationer og klassificering af hudreaktioner

19. Alle dyr undersøges for tegn på erythem og ødem, og responsen tildeles score-værdi ved 60 minutter og derefter ved 24, 48 og 72 timer efter lappernes fjernelse. I den indledende test i ét dyr undersøges testområdet desuden straks efter lappernes fjernelse. Hudreaktioner klassificeres og registreres efter klassificeringen i nedenstående tabel. Er der hudskade, som ikke kan identificeres som irritation eller ætsning ved 72 timer, kan det være nødvendigt at fortsætte observationen indtil dag 14 for at fastslå virkningernes reversibilitet. Foruden observationen for irritation skal alle lokale toksiske virkninger, såsom tab af hudens fedtindhold, og alle systemiske bivirkninger (f.eks. kliniske symptomer på toksicitet samt kropsvægt) beskrives fuldstændigt og registreres. Til afklaring af en usikker respons bør histopatologisk undersøgelse indgå i vurderingen.
20. Klassificering af hudrespons er nødvendigvis subjektiv. For at give en mere ensartet klassificering af hudresponsen og for at bistå testlaboratorierne og dem, som foretager og fortolker observationerne, skal observationerne foretages af personer, som er tilstrækkeligt fortrolige med det anvendte score-system (se nedenstående tabel). Det kan være nyttigt at anvende en illustreret vejledning i klassificering af hudirritation og andre læsioner (3).

DATA OG RAPPORTERING

21. Undersøgelsens resultater, som sammenfattes i tabelform i den endelige testrapport, skal dække alle de punkter, der er oplistet i punkt 24.

Vurdering af resultater

22. Score-værdierne for hudirritation vurderes sammen med læsionernes art, sværhedsgrad og reversibilitet eller manglende reversibilitet. De enkelte score-værdier repræsenterer ikke en absolut standard for et kemikalies irritationsfremkaldende egenskaber, da andre virkninger af testkemikaliets ligeledes vurderes. I stedet må de enkelte score-værdier betragtes som referenceværdier, som skal evalueres sammen med alle undersøgelsens øvrige observationer.
23. Hudlæsionernes reversibilitet skal tages i betragtning ved evaluering af irritationsrespons. Hvis respons som alopeci (af et begrænset område), hyperkeratose, hyperplasi og skældannelse varer ved frem til afslutningen af den 14-dages observationsperiode, anses testkemikaliets for at være irriterende.

Testrapport

24. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Begrundelse for in vivo-testning:

- weight-of-the-evidence-analyse af allerede foreliggende testdata, herunder resultater af den sekventielle teststrategi:
- beskrivelse af relevante data fra tidligere forsøg
- data fra de enkelte trin i teststrategien
- beskrivelse af udførte in vitro-test med detaljeret beskrivelse af de anvendte procedurer og resultater opnået med test- og referencestof
- weight-of-the-evidence-analyse med henblik på udførelse af in vivo-undersøgelse.

Testkemikalie:

- Stof med kun én bestanddel: kemisk identifikation, f.eks. IUPAC-navn eller CAS-navn, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel, renhed, kemisk identitet af urenheder, i det omfang det er relevant og praktisk muligt, osv.
- Stof med flere bestanddele, blandinger og stoffer med ukendt eller variabel sammensætning, komplekse reaktionsprodukter eller biologiske materialer (UVCB): så vidt muligt kendetegnet ved kemisk identitet (jf. ovenfor), kvantitativ forekomst og bestanddelenes relevante fysisk-kemiske egenskaber
- fysisk udseende, vandopløselighed og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber
- oprindelse, evt. batchnummer

- behandling af testkemikaliets/kontrolstoffet inden testning, hvis det er relevant (f.eks. opvarmning, formalin)
- testkemikaliets stabilitet, sidste anvendelsesdato eller dato for ny analyse, hvis dette er kendt
- opbevaringsforhold.

Bærestof:

- identifikation, koncentration (hvis relevant), anvendt mængde
- begrundelse for valg af bærestof.

Forsøgsdyr:

- anvendt art/stamme, begrundelse for anvendelse af andre dyr end albinokaniner
- antal dyr af hvert køn
- de enkelte dyrs vægt ved testens begyndelse og afslutning
- alder ved undersøgelsens begyndelse
- dyrenes oprindelse, miljøbetingelser, foder osv.

Testbetingelser:

- metode til forberedelse af det sted, hvor lappen skal anbringes
- oplysninger om anvendte lapmaterialer og metode til anbringelse af lapper
- oplysninger om testkemikaliets forberedelse, påføring og fjernelse.

Resultater:

- opstilling i tabelform af score-værdier for irritation/ætsning for hvert dyr på alle måletidspunkter
- beskrivelse af alle iagttagne læsioner
- forklarende beskrivelse af art og grad af den iagttagne irritation eller ætsning samt eventuelle histopatologiske fund
- beskrivelse af andre skadelige lokale (f.eks. tab af hudens fedtindhold) og systemiske virkninger foruden hudirritation eller -ætsning.

Diskussion af resultater

Konklusioner

LITTERATUR

- (1) OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (2) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998.
- (3) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 19), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

TABEL: KLASSIFICERING AF HUDREAKTIONER

Erythem og escharadannelse

Intet erythem.....0

Meget let erythem (knapt synligt).....1

Veldefineret erythem.....2

Moderat til svært erythem.....3

Svært erythem (oksekødsfarvet) til escharadannelse, som umuliggør klassificering af erythemet ... 4

Maksimumsværdi: 4

Ødemdannelse

Intet ødem.....0

Meget let ødem (knapt synligt).....1

Let ødem (tydeligt afgrænset hævet område).....2

Moderat ødem (hævet ca. 1 mm).....3

Svært ødem (hævet mere end 1 mm og udstrækning ud over det eksponerede område)....4

Maksimumsværdi: 4

Til afklaring af en usikker respons kan histopatologisk undersøgelse indgå i vurderingen.

Tillæg

DEFINITIONER

Kemikalie: et stof eller en blanding.

Hudirritation: fremkaldelse af reversibel skade på huden ved påføring af et testkemikalie i indtil 4 timer.

Hudætsning: fremkaldelse af irreversibel skade på huden, dvs. synlig nekrose gennem epidermis og ned i dermis efter påføring af et testkemikalie i indtil 4 timer. Typiske ætsningsreaktioner er sår, blødning og blodige skorper og efter 14 dages observation affarvning som følge af blegning af huden, hele områder med alopeci samt ardannelse. Tvivlsomme læsioner bør overvejes vurderet ved histopatologisk undersøgelse.

Testkemikalie: et stof eller en blanding, der testes med denne forsøgsmetode."

(2) Del B, kapitel B.17, affattes således:

"B.17 IN VITRO-TEST FOR GENMUTATION I PATTEDYRCELLER VED ANVENDELSE AF HPRT- OG XPRT-GENER

INDLEDNING

1. Denne forsøgsmetode (TM) svarer til OECD's testvejledning (Test Guideline) 476 (2016). Forsøgsmetoderne revideres regelmæssigt på baggrund af den videnskabelige udvikling, skiftende reguleringsbehov og dyrevelfærdshensyn. Den aktuelle reviderede version af TM B.17 afspejler næsten 30 års erfaring med denne test og er desuden et resultat af udviklingen af en ny separat metode til in vitro-test for genmutation i pattedyrceller ved anvendelse af thymidin-kinase-genet. TM B.17 er en del af en række forsøgsmetoder vedrørende genetisk toksikologi. OECD har udarbejdet et dokument, som indeholder kortfattede oplysninger om testning for genetisk toksikologi og en oversigt over de seneste ændringer af OECD's testvejledning om genetisk toksicitet (1).
2. Formålet med in vitro-testen for genmutation i pattedyrceller er at påvise genmutationer, som induceres af kemikalier. De cellelinjer, der anvendes i disse test, måler fremadmutation i reportergener, mere specifikt det endogene hypoxanthin-guanin-phosphoribosyl-transferase-gen (Hprt i gnaverceller og HPRT i humane celler, kollektivt benævnt Hprt-gen og HPRT-test i denne forsøgsmetode) og transgenet af xanthin-guanin-phosphoribosyl-transferase (gpt) (benævnt XPRT-testen). I HPRT- og XPRT-mutationstestene påvises forskellige spektre af genetiske hændelser. Ud over de mutationshændelser, der påvises ved HPRT-testen (f.eks. baseparsubstitutioner, frameshifts, små deletioner og insertioner), kan den autosomale placering af gpt-transgenet muliggøre påvisning af mutationer som følge af større deletioner og muligvis mitotisk rekombination, som ikke kan påvises ved HPRT-test, da Hprt-genet er placeret på X-kromosomet (2) (3) (4) (5) (6) (7). XPRT anvendes for øjeblikket ikke så meget som HPRT-testen i lovgivningsøjemed.
3. De anvendte definitioner er forklaret i tillæg 1.

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER

4. Normalt kræver en in vitro-test, at der benyttes en eksogen kilde til metabolismeaktivering. Det eksogene metabolismeaktiveringssystem efterligner ikke helt in vivo-betingelserne.
5. Der bør omhyggeligt undgås betingelser, som kunne føre til et artefakt positivt resultat (dvs. eventuel interaktion med testsystemet), der ikke skyldes direkte interaktion mellem testkemikalierne og cellens genetiske materiale. Disse betingelser omfatter ændringer i pH eller osmolalitet (8) (9) (10), interaktion med mediets komponenter (11) (12) eller for høje

cytotoksicitetsniveauer (13). En cytotoxisk effekt, der er højere end det højst anbefalede cytotoksicitetsniveau, jf. punkt 19, anses for at være for højt til HPRT-testen.

6. Før forsøgsmetoden bruges på en blanding for at generere data i lovgivningsøjemed, bør det overvejes, om den vil give resultater, som er egnede til formålet, og i givet fald hvorfor. Sådanne overvejelser er ikke nødvendige, når der foreligger et myndighedskrav om testning af blandingen.

PRINCIP FOR TESTEN

7. Mutantceller, der mangler Hprt-enzymaktivitet i HPRT-testen eller xprt-enzymaktivitet i XPRT-testen, er resistente over for de cytostatiske virkninger af purinanalogen 6-thioguanin (TG). Celler, som har Hprt (i HPRT-testen) eller gpt (i XPRT-testen), er følsomme over for TG, som inhiberer cellemetabolismen og standser den videre celledeling. Det betyder, at mutantceller kan formere sig under tilstedeværelse af TG, mens normale celler, der indeholder Hprt- (i HPRT-testen) eller gpt-enzymet (i XPRT-testen), ikke kan.
8. Celler i suspensionskultur eller enkeltlagskultur eksponeres for testkemikallet både med og uden eksogen kilde til metabolisk aktivering (jf. punkt 14) i et passende tidsrum (3-6 timer), hvorefter der ved dyrkning i subkultur påvises cytotoxisk effekt og gives mulighed for fænotypeekspression, inden mutanterne udvælges (14) (15) (16) (17). Den cytotoxiske effekt bestemmes ved den relative overlevelse (RS), dvs. kloningseffektiviteten målt umiddelbart efter behandlingsperioden og justeret for ethvert celletab under behandlingen sammenlignet med den negative kontrol (punkt 18 og tillæg 2). Afhængigt af de enkelte celletyper holdes de behandlede kulturer så lang tid i dyrkningsmediet, at fænotypeekspressionen af inducerede mutationer bliver næsten optimal (typisk mindst 7-9 dage). Efter fænotypeekspressionen bestemmes mutantfrekvensen ved udsåning af et kendt antal celler i et medium, der indeholder det selektive stof, til påvisning af mutantkolonier, og i et medium uden selektivt stof til bestemmelse af kloningseffektiviteten (levedygtigheden). Efter en passende inkuberings tid tælles kolonierne. Mutantfrekvensen beregnes ud fra antallet af mutantkolonier korregeret for kloningseffektiviteten på tidspunktet for mutantudvælgelsen.

BESKRIVELSE AF METODEN

Forberedelser

Celler

9. For de celletyper, der benyttes i HPRT- og XPRT-test, bør der være påvist følsomhed over for kemiske mutagener, høj kloningseffektivitet, stabil karyotype og stabil spontan mutationsfrekvens. De celler, der sædvanligvis anvendes i HPRT-test, er cellelinjerne

CHO, CHL og V79 fra kinesisk hamster, L5178Y-muselymfomceller og de humane lymfoblastceller TK6 (18) (19). CHO-afledte AS52-celler, som indeholder gpt-transgenet (og hvor Hprt-genet er deleteret), anvendes til XPRT-testen (20) (21). HPRT-testen kan ikke udføres i AS52-celler, da hprt-genet er deleteret. Anvendelse af andre cellelinjer bør begrundes og valideres.

10. Cellelinjerne bør kontrolleres regelmæssigt for et stabilt normalt kromosomtal og fravær af mykoplasma kontaminering (22) (23), og i tilfælde af kontaminering, eller hvis det normale kromosomtal har ændret sig, bør cellerne ikke anvendes. Den normale cyklustid for celler, der benyttes i testlaboratoriet, fastslås og bør være i overensstemmelse med de offentliggjorte celleegenskaber. Den spontane mutantfrekvens i stamcellekulturen bør også kontrolleres, og kulturen bør ikke anvendes, hvis ikke mutantfrekvensen er acceptabel.
11. Det kan være nødvendigt at rense kulturerne for allerede eksisterende mutantceller, inden de benyttes i denne test, f.eks. ved dyrkning i HAT-medium for HPRT-test og MPA-medium for XPRT-test (5) (24) (jf. tillæg 1). De rensede celler kan kryopræserves og derefter tøs op og benyttes som arbejdsceller. De nyoptøede arbejdsceller kan benyttes til testen, når den normale fordoblingstid er nået. Ved udførelsen af XPRT-testen bør en rutinemæssig dyrkning af AS52-celler ske under betingelser, der sikrer, at gpt-transgenet bevares (20).

Medier og dyrkningsbetingelser

12. Til vedligeholdelse af kulturerne benyttes egnede dyrkningsmedier og inkubationsbetingelser (dyrkningsskåle, fugtig atmosfære på 5 % CO₂ og inkubationstemperatur på 37 °C). Cellekulturer bør altid vedligeholdes under betingelser, der sikrer, at de vokser i log-fase. Det er især vigtigt at vælge medier og dyrkningsbetingelser, som sikrer, at cellerne vokser optimalt i ekspressionsperioden, og at både mutantcellers og ikke-mutantcellers kloningseffektivitet er optimal.

Fremstilling af kulturer

13. Cellelinjer opformerer fra stamkulturer og udsås i dyrkningsmedium med en sådan tæthed, at cellerne i suspension eller i encellede lag vil fortsætte med at vokse eksponentielt under behandlings- og ekspressionsperioden (f.eks. bør konfluens undgås for celler, der vokser i encellede lag).

Metabolismeaktivering

14. Der bør anvendes eksogene metaboliserende systemer, når der benyttes celler med utilstrækkelige endogene metaboliske egenskaber. Det mest almindeligt anvendte system, der som standard anbefales, medmindre der er begrundelse for andet, er en cofaktorsuppleret postmitochondriefraktion (S9), som fremstilles af leveren fra gnavere (normalt rotter), der har været behandlet med enzyminducerende stoffer såsom

Aroclor 1254 (25) (26) (27) (28) eller en blanding af phenobarbiton og β -naphthoflavon (29) (30) (31) (32). Sidstnævnte blanding er ikke i strid med Stockholmkonventionen om persistente organiske miljøgifte (33) og har vist sig at være lige så effektiv som Aroclor 1254 til induktion af oxidaser med blandet funktion (29) (31). S9-fraktionen anvendes normalt i en koncentration på 1-2 % (v/v), men kan øges til 10 % (v/v) i det færdige testmedium. Valget af type og koncentration af det eksogene metabolismeaktiveringssystem eller det anvendte metaboliske inducerende stof kan afhænge af, hvilken kemisk klasse de testede stoffer tilhører (34) (35) (36).

Præparering af testkemikali

15. Testkemikalier i fast form bør præpareres i passende opløsningsmidler og eventuelt fortyndes inden behandling af cellerne (jf. punkt 16). Testkemikalier i væskeform kan enten tilsættes testsystemet direkte og/eller fortyndes inden behandlingen i testsystemet. Gasser og flygtige testkemikalier bør testes ved passende ændring af standardprotokollerne, f.eks. i forseglede dyrkningsskåle (37) (38). Testkemikali

TESTBETINGELSER

Opløsningsmidler

16. Opløsningsmidlet vælges for at optimere testkemikaliet

Måling af cytotoxisk effekt og valg af eksponeringskoncentrationer

17. Ved valg af højeste koncentration af testkemikali

bufring af det endelige behandlingsmedium for at undgå artefakt positive resultater og for at opretholde passende dyrkningsbetingelser.

18. Valget af koncentration baseres på cytotoxisk effekt og andre betragtninger (jf. punkt 20-22). Evaluering af cytotoxisk effekt i en indledende test kan være nyttig for at sikre en bedre definition af de koncentrationer, der skal anvendes i hovedforsøget, men en indledende test er ikke påkrævet. Selv om der foretages en indledende evaluering af den cytotoxiske effekt, skal den cytotoxiske effekt på hver enkelt kultur stadig måles i hovedforsøget. Den cytotoxiske effekt bør evalueres ved anvendelse af RS, dvs. cellernes kloningseffektivitet (CE), når de udplades umiddelbart efter behandling, justeret for ethvert celletab under behandlingen baseret på celletal sammenlignet med den justerede kloningseffektivitet i negative kontroller (med en overlevelsesprocent på 100 %) (jf. formlerne i tillæg 2).
19. Mindst fire testkoncentrationer (bortset fra opløsningsmiddel og positive kontroller), der opfylder acceptkriterierne (egnet cytotoxisk effekt, antal celler mv.), bør vurderes. Selv om det anbefales at benytte duplikate kulturer, kan der ved hver af de testede koncentrationer også anvendes replikate kulturer eller enkeltkulturer. De resultater, der opnås i uafhængige replikate kulturer ved en given koncentration, bør rapporteres separat, men kan samles med henblik på dataanalyse (17). For testkemikalier, der udviser ringe eller ingen cytotoxisk effekt, vil koncentrationsintervaller på ca. to til tre gange normalt være egnede. Hvis der forekommer cytotoxisk effekt, bør de valgte testkoncentrationer dække et interval fra den koncentration, der frembringer cytotoxisk effekt, til de koncentrationer, hvor der er moderat og ringe eller ingen cytotoxisk effekt. Mange testkemikalier udviser kraftige koncentration/respons-kurver, og for at dække hele cytotoxicitetsintervallet eller undersøge koncentration/respons-forholdet nærmere kan det være nødvendigt at bruge koncentrationer, der ligger tættere på hinanden, og mere end fire koncentrationer, navnlig i situationer, hvor der er behov for at gentage forsøget (jf. punkt 43). Det kan være særligt vigtigt at bruge mere end fire koncentrationer, når der anvendes enkeltkulturer.
20. Hvis den højeste koncentration er baseret på cytotoxisk effekt, bør den højeste koncentration sigte mod at opnå mellem 20 og 10 % RS. Der bør udvises forsigtighed ved fortolkning af positive resultater, der kun findes ved 10 % RS eller derunder (punkt 43).
21. For tungtopløselige testkemikalier, der ikke er cytotoxiske ved lavere koncentrationer end den laveste uopløselige koncentration, bør den højeste analyserede koncentration producere uklarheder eller bundfald, som er synligt med det blotte øje eller i et inverteret mikroskop efter afslutningen af behandlingen med testkemikaliets. Selv om der forekommer cytotoxisk effekt over den laveste uopløselige koncentration, tilrådes det at gennemføre testen ved kun én koncentration, der frembringer uklarhed eller synligt bundfald, fordi artefakte virkninger kan skyldes bundfaldet. Ved den koncentration, der frembringer

bundfald, bør det omhyggeligt sikres, at bundfaldet ikke griber forstyrrende ind i testens forløb. Det kan være nyttigt at bestemme opløseligheden i dyrkningsmediet inden forsøget.

22. Hvis ikke der observeres bundfald eller begrænsende cytotoxisk effekt, bør den højeste testkoncentration være 10 mM, 2 mg/ml eller 2 µl/ml (den laveste af de tre) (39) (40). Hvis testkemikaliets sammensætning ikke er defineret, f.eks. et stof af ukendt eller variabel sammensætning, komplekse reaktionsprodukter eller biologiske materialer (dvs. kemiske stoffer af ukendt eller variabel sammensætning (UVCB'er)) (41), miljømæssige udtræk osv., kan det være nødvendigt at øge den højeste koncentration (f.eks. 5 mg/ml) ved manglende tilstrækkelig cytotoxisk effekt for at øge koncentrationen af hver af komponenterne. Det bør dog bemærkes, at disse krav kan variere for humanlægemidler (42).

Kontroller

23. Der bør under alle forsøgsbetingelser indgå sideløbende negative kontroller (jf. punkt 16), hvor behandlingsmediet kun består af opløsningsmiddel, idet prøverne ellers behandles på samme måde som behandlingskulturene.
24. Der skal gennemføres sideløbende positive kontroller for at påvise, at laboratoriet er i stand til at identificere mutagener i henhold til den anvendte testprotokol og effektiviteten af det eksogene metabolismeaktiveringssystem, hvor det er relevant. Eksempler på positive kontroller er anført i tabel 1 nedenfor. Alternative positive kontrolstoffer kan anvendes, hvis der er belæg for det. Fordi in vitro-test af pattedyrceller for genetisk toksicitet er tilstrækkeligt standardiserede, kan der udføres test med behandlinger med eller uden eksogen metabolismeaktivering ved brug af kun én positiv kontrol, som kræver metabolismeaktivering. I dette tilfælde vil denne ene positive kontrolrespons påvise såvel aktiviteten i metabolismeaktiveringssystemet som testsystemets reaktionsevne. Hver positiv kontrol bør anvendes ved en eller flere koncentrationer, der forventes at give reproducerbare og påviselige forøgelser i forhold til baggrundsværdierne, for at påvise testsystemets følsomhed, og responsen bør ikke bringes i fare på grund af cytotoxisk effekt, der overskrider de grænser, som er fastsat i forsøgsmetoden (jf. punkt 20).

Tabel 1: Anbefalede referencestoffer til vurdering af laboratoriets kompetence og udvælgelse af positive kontroller.

Metabolismeaktivering	Locus	Stof og CAS-nr.
Ingen eksogen metabolismeaktivering	<i>Hprt</i>	Ethylmethansulfonat [CAS-nr. 62-50-0] Ethylnitrosourea [CAS-nr. 759-73-9] 4-nitroquinolin-1-oxid [CAS-nr. 56-57-5]
	<i>xprt</i>	Streptonigrin [CAS-nr. 3930-19-6] Mitomycin C [CAS-nr. 50-07-7]
Eksogen	<i>Hprt</i>	3-methylcholanthren [CAS-nr. 56-49-5]

metabolismeaktivering		7,12-dimethylbenzanthracen [CAS-nr. 57-97-6] Benzo[a]pyren [CAS-nr. 50-32-8]
	<i>xprt</i>	Benzo[a]pyren [CAS-nr. 50-32-8]

FREMGANGSMÅDE

Behandling med testkemikalie

25. Celler under formering behandles med testkemikaliets med og uden tilstedeværelse af et metabolismeaktiveringssystem. Eksponeringen skal være et passende stykke tid (normalt er 3-6 timer passende).
26. Det antal celler, der mindst skal anvendes til hver testkultur (kontrol og behandling) i hver enkelt testfase, bør baseres på den spontane mutantfrekvens. En generel retningslinje er at behandle og passere et tilstrækkeligt antal celler til at bevare 10 spontane mutanter i hver kultur i alle testfaser (17). Den spontane mutantfrekvens ligger generelt mellem 5 og 20×10^{-6} . For en spontan mutantfrekvens på 5×10^{-6} og for også at opretholde et tilstrækkeligt antal spontane mutanter (10 eller flere) i de kulturer, der behandles ved koncentrationer, som forårsager 90 % cytotoxisk effekt under behandling (10 % RS), skal der behandles mindst 20×10^6 celler. Derudover skal der dyrkes et tilstrækkeligt antal celler (men aldrig under 2 mio.) i ekspressionsperioden, som udplades til mutantudvælgelse (17).

Fænotypeekspressionsperiode og måling af mutantfrekvens

27. Efter endt behandling dyrkes cellerne med henblik på ekspression af den mutante fænotype. Generelt er et minimum på 7-9 dage tilstrækkeligt til at sikre nær optimal fænotypeekspression af nyligt inducerede Hprt- og xprt-mutanter (43) (44). I denne periode dyrkes cellerne regelmæssigt i subkultur for at opretholde deres eksponentielle vækst. Efter fænotypeekspression udplades cellerne igen i mediet med og uden selektivt stof (6-thioguanin) til bestemmelse af henholdsvis antallet af mutanter og kloningseffektiviteten på udvælgelsestidspunktet. Denne udpladning kan foretages ved anvendelse af skåle til celler i enkeltlagskultur eller mikrotiterplader til celler i suspension. Med henblik på udvælgelse af mutanter bør cellerne udplades med en sådan tæthed, at der sikres optimal mutantrestitution (dvs. at der undgås metabolisk samarbejde) (17). Pladerne inkuberes i et passende tidsrum med henblik på optimal kolonivækst (f.eks. 7-12 dage), og kolonierne tælles. Mutantfrekvensen beregnes ud fra antallet af mutantkolonier korregeret for kloningseffektiviteten på tidspunktet for mutantudvælgelsen (jf. formlerne i tillæg 2).

Laboratoriets kompetence

28. For at påvise tilstrækkelig erfaring med testen, før den bruges rutinemæssigt, bør laboratoriet have udført en række forsøg med positive referencekemikalier, som virker via forskellige mekanismer (mindst et aktivt med og et aktivt uden metabolismeaktivering

udvalgt blandt stofferne i tabel 1), og forskellige negative kontroller (ved anvendelse af forskellige opløsningsmidler/bærestoffer). Disse positive og negative kontrolresponser bør være i overensstemmelse med litteraturen. Dette gælder ikke for laboratorier, der har erfaring, dvs. som har en historisk database til rådighed som defineret i punkt 30-33.

29. Et udvalg af positive kontrolstoffer (jf. tabel 1 i punkt 25) bør undersøges med og uden metabolismeaktivering med henblik på at påvise evnen til at påvise mutagene kemikalier, vurdere effektiviteten af metabolismeaktiveringssystemet og påvise egnetheden af cellevækstbetingelserne under behandling, fænotypeekspression og mutantudvælgelse samt af score-proceduren. Der bør vælges en række koncentrationer af de udvalgte stoffer, som giver en reproducerbar og koncentrationsafhængig stigning i forhold til baggrundsværdierne for at påvise testsystemets følsomhed og dynamiske rækkevidde.

Historiske kontroldata

30. Laboratoriet bør fastlægge:

- et historisk positivt kontrolinterval og en historisk positiv kontrolfordeling
- et historisk negativt (ubehandlet, opløsningsmiddel) kontrolinterval og en historisk negativ kontrolfordeling.

31. Når der første gang indhentes data til en historisk negativ kontrolfordeling, bør de sideløbende negative kontroller stemme overens med offentliggjorte kontroldata (22). Efterhånden som der føjes flere forsøgsdata til kontrolfordelingen, bør de sideløbende negative kontroller ideelt set ligge inden for kontrolgrænsen på 95 % af denne fordeling (17) (45) (46).

32. Laboratoriets database over historiske negative kontroller bør i første omgang opbygges med mindst 10 forsøg, men skal helst bestå af mindst 20 forsøg udført under sammenlignelige forsøgsbetingelser. Laboratorierne bør anvende kvalitetskontrolmetoder som f.eks. kontroldiagrammer (f.eks. C-diagrammer eller X-søjlediagrammer (47)) til at fastslå, hvor variable deres positive og negative kontroldata er, samt vise, at metodologien er "under kontrol" i deres laboratorium (46). Yderligere anbefalinger til, hvordan man opbygger og anvender de historiske data (dvs. kriterier for optagelse og udelukkelse af historiske data og acceptkriterier for et givet forsøg), kan findes i litteraturen (45).

33. Negative kontroldata bør bestå af mutantfrekvenser fra enkeltkulturer, dog fortrinsvis fra replikate kulturer som beskrevet i punkt 23. Sideløbende negative kontroller bør ideelt set ligge inden for kontrolgrænsen på 95 % af fordelingen i laboratoriets historiske negative kontroldatabase (17) (45) (46). Såfremt dataene for sideløbende negative kontroller falder uden for kontrolgrænsen på 95 %, kan de eventuelt optages i den historiske kontrolfordeling, så længe disse data ikke er ekstreme afvigende værdier, og der er

dokumentation for, at testsystemet er "under kontrol" (jf. ovenfor) og for, at der ikke er begået tekniske eller menneskelige fejl.

34. Der bør i forbindelse med eventuelle ændringer af forsøgsprotokollen tages hensyn til, om de stemmer overens med laboratoriets eksisterende historiske kontroldata-baser. Ved større uoverensstemmelser bør der etableres en ny historisk kontroldata-base.

DATA OG RAPPORTERING

Præsentation af resultaterne

35. Præsentationen af resultaterne bør omfatte alle de data, der er nødvendige for at beregne den cytotoxiske effekt (udtrykt som RS). Dataene for såvel behandlede kulturer som kontrolkulturer bør omfatte antallet af celler efter endt behandling, antallet af celler, der blev udpladet umiddelbart efter behandlingen, og antallet af kolonier (eller antallet af brønde uden kolonier ved mikrobrøndmetoden). RS for hver kultur bør udtrykkes som en procentdel i forhold til den sideløbende kontrol med opløsningsmiddel (jf. definitioner i tillæg 1).
36. Præsentationen af resultaterne bør endvidere omfatte alle de data, der er nødvendige for at beregne mutantfrekvensen. Dataene for såvel behandlede kulturer som kontrolkulturer bør omfatte: 1) antallet af celler ved udpladning med og uden selektivt stof (på det tidspunkt, hvor cellerne udplades til mutantudvælgelse) og 2) antallet af optalte kolonier (eller antallet af brønde uden kolonier ved mikrobrøndmetoden) på pladerne med og uden selektivt stof. Mutantfrekvensen beregnes ud fra antallet af mutantkolonier (på pladerne med selektivt stof) korregeret for kloningseffektiviteten (på pladerne uden selektivt stof). Mutantfrekvensen bør udtrykkes som antal mutantceller pr. million levedygtige celler (jf. definitioner i tillæg 1).
37. Der anføres data for hver enkelt kultur. Desuden sammenfattes alle data i tabelform.

Acceptkriterier

38. Accept af en test er baseret på følgende kriterier:
- Den sideløbende negative kontrol anses for at kunne føjes til laboratoriets historiske negative kontroldata-base som beskrevet i punkt 33.
 - Sideløbende positive kontroller (jf. punkt 24) bør fremkalde responser, der er kompatible med responserne i den historiske positive kontroldata-base, og medføre en statistisk signifikant stigning sammenlignet med den sideløbende negative kontrol.
 - Der blev testet under to forsøgsbetingelser (dvs. med og uden metabolismeaktivering), medmindre en af dem gav positive resultater (jf. punkt 25).
 - Antallet af analyserbare celler og koncentrationer er tilstrækkeligt (punkt 25, 26 og 19).

- Kriterierne for valg af højeste koncentration er i overensstemmelse med kriterierne i punkt 20, 21 og 22.

Vurdering og fortolkning af resultater

39. Såfremt alle acceptkriterier er opfyldt, anses et testkemikalie for at være klart positivt, hvis følgende er opfyldt under en af de undersøgte forsøgsbetingelser:

- Mindst en af testkoncentrationerne udviser en statistisk signifikant stigning sammenlignet med den sideløbende negative kontrol.
- Stigningen er koncentrationsafhængig, når den evalueres med en passende trend-test.
- Et eller flere af resultaterne ligger uden for fordelingen af de historiske negative kontrolldata (f.eks. den Poisson-baserede kontrolgrænse på 95 %, jf. punkt 33).

Når alle disse kriterier er opfyldt, anses testkemikallet for at kunne fremkalde genmutationer i de dyrkede pattedyrceller i dette testsystem. Anbefalinger til de mest hensigtsmæssige statistiske metoder kan findes i litteraturen (46) (48).

40. Såfremt alle acceptkriterier er opfyldt, anses et testkemikalie for at være klart negativt, hvis følgende er opfyldt under alle de undersøgte forsøgsbetingelser:

- Ingen af testkoncentrationerne udviser en statistisk signifikant stigning sammenlignet med den sideløbende negative kontrol.
- Der indtræder ikke en koncentrationsafhængig stigning, når der foretages en evaluering med en passende trend-test.
- Alle resultaterne ligger inden for fordelingen af de historiske negative kontrolldata (f.eks. den Poisson-baserede kontrolgrænse på 95 %, jf. punkt 33).

Testkemikallet anses derefter for ikke at kunne fremkalde genmutationer i de dyrkede pattedyrceller i dette testsystem.

41. Der stilles ikke krav om verifikation af en klart positiv eller negativ respons.

42. Hvis responsen hverken er klart negativ eller klart positiv som beskrevet ovenfor, eller for at bidrage til at fastslå den biologiske relevans af et resultat, bør dataene evalueres af eksperter, og/eller der bør foretages yderligere undersøgelser. Det kan være nyttigt at gennemføre et nyt forsøg, eventuelt med ændrede forsøgsbetingelser (f.eks. koncentrationsinterval, andre metabolismeaktiveringsbetingelser (dvs. S9-koncentration eller S9-oprindelse)).

43. I sjældne tilfælde giver dataene selv efter yderligere undersøgelser ikke mulighed for at konkludere, om resultaterne er positive eller negative. Konklusionen er derfor, at

testkemikalieresponsen er usikker (fortolkes på den måde, at der er lige stor sandsynlighed for, at det er positivt og negativt).

Testrapport

44. Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie:

- oprindelse, batchnummer, sidste anvendelsesdato, hvis dette foreligger
- testkemikaliets stabilitet, hvis denne er kendt
- testkemikaliets opløselighed og stabilitet i opløsningsmidlet, hvis dette er kendt
- måling af pH-værdi, osmolalitet og bundfald i det dyrkningsmedium, som testkemikaliet blev tilsat, hvor det er relevant.

Stof med kun én bestanddel:

- fysisk udseende, vandopløselighed og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber
- kemisk identifikation, f.eks. IUPAC-navn eller CAS-navn, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel, renhed, kemisk identitet af urenheder, i det omfang det er relevant og praktisk muligt, osv.

Stof med flere bestanddele, UVCB-stoffer og blandinger:

- kendetegnet så vidt muligt ved kemisk identitet (jf. ovenfor), kvantitativ forekomst og bestanddelenes relevante fysisk-kemiske egenskaber.

Opløsningsmiddel:

- begrundelse for valg af opløsningsmiddel
- procentdel af opløsningsmiddel i det endelige dyrkningsmedium.

Celler:

For laboratoriets stamkulturer:

- celletype, cellelinjernes oprindelse
- eventuelt antal generationer og historien i laboratoriet
- karyotypiske karakteristika og/eller normalt kromosomtal
- metoder til vedligeholdelse af cellekulturer
- fravær af mykoplasma
- cellernes fordoblingstid.

Testbetingelser:

- begrundelse for valg af koncentrationer og antal kulturer, herunder f.eks. cytotoxicitetsdata og opløselighedsbegrænsninger
- mediesammensætning, CO₂-koncentration, fugtighedsniveau
- testkemikaliets koncentration udtrykt som endelig koncentration i dyrkningsmediet (f.eks. µg eller mg/ml eller mM af dyrkningsmediet)
- koncentration (og/eller volumen) af opløsningsmiddel og tilsat testkemikalie i dyrkningsmediet
- inkubationstemperatur
- inkubationstid
- behandlingens varighed
- celletæthed under behandlingen
- metabolismeaktiveringssystemets type og sammensætning (oprindelse for S9, metode til fremstilling af S9-blanding, koncentration eller mængde af S9-blanding og S9 i det endelige dyrkningsmedium, kvalitetskontrol af S9)
- positive og negative kontrolstoffer, endelige koncentrationer for hver behandlingsbetingelse
- ekspressionsperiodens længde (herunder antal udsåede celler, subkulturer og eventuel feeding)
- det selektive stofs identitet og koncentration
- kriterier for accept af test
- metoder til tælling af levedygtige celler og mutantceller
- metoder anvendt til måling af cytotoxisk effekt
- eventuelle supplerende oplysninger vedrørende cytotoxisk effekt og anvendt metode
- inkubationstidens varighed efter udpladning
- kriterier for bedømmelse af undersøgelsen som positiv, negativ eller usikker
- metoder anvendt til bestemmelse af pH, osmolalitet og bundfald.

Resultater:

- antal behandlede celler og antal celler dyrket i subkultur for hver kultur
- cytotoxicitetsmålinger og eventuelt andre observationer
- tegn på bundfald og tidspunkt for bestemmelse
- antal celler udpladet i selektivt og ikke-selektivt medium

- antal kolonier i det ikke-selektive medium og antal resistente kolonier i det selektive medium samt den tilhørende mutantfrekvens
- koncentration/respons-forhold, når det er muligt
- data fra sideløbende negative (opløsningsmiddel) og positive (koncentrationer og opløsningsmidler) kontroller
- historiske negative (opløsningsmiddel) og positive kontroldata med angivelse af intervaller, gennemsnit og standardafvigelser og konfidensinterval (f.eks. 95 %) samt mængden af data
- statistiske analyser (for de enkelte kulturer og eventuelt for samlede replikater) og eventuelle P-værdier.

Diskussion af resultater

Konklusion

LITTERATUR

- (1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Paris.
- (2) Moore M.M., DeMarini D.M., DeSerres F.J. og Tindall, K.R. (Eds.) (1987). Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, New York.
- (3) Chu E.H.Y. og Malling H.V. (1968). Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 61, 1306-1312.
- (4) Moore M.M., Harrington-Brock K., Doerr C.L. og Dearfield K.L. (1989). Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci. *Mutagen. Res.*, 4, 394-403.
- (5) Aaron C.S. og Stankowski Jr. L.F. (1989). Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates. *Mutation Res.*, 223, 121-128.
- (6) Aaron C.S., Bolcsfoldi G., Glatt H.R., Moore M., Nishi Y., Stankowski L., Theiss J. og Thompson E. (1994). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. *Mutation Res.*, 312, 235-239.
- (7) Li A.P., Gupta R.S., Heflich R.H. og Wasson J. S. (1988). A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-tox Program. *Mutation Res.*, 196, 17-36.
- (8) Scott D., Galloway S.M., Marshall R.R., Ishidate M., Brusick D., Ashby J. og Myhr B.C. (1991). Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A Report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Res.*, 257, 147-204.
- (9) Morita T., Nagaki T., Fukuda I. og Okumura K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. *Mutation Res.*, 268, 297-305.
- (10) Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion concentrations, *Environ. Mutagen.*, 8, 789-886.

- (11) Nesslany F., Simar-Meintieres S., Watzinger M., Talahari I. og Marzin D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. *Environ. Mol. Mutation Res.*, 49, 439-452.
- (12) Long L.H., Kirkland D., Whitwell J. og Halliwell B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, *Mutation Res.*, 634, 177-183.
- (13) Kirkland D., Aardema M., Henderson L., og Müller L. (2005). Evaluation of the Ability of a Battery of Three *In Vitro* Genotoxicity Tests to Discriminate Rodent Carcinogens and Non-Carcinogens. I: Sensitivity, Specificity and Relative Predictivity. *Mutation Res.*, 584 1–256.
- (14) Li A.P., Carver J.H., Choy W.N., Hsie A.W., Gupta R.S., Loveday K.S., O'Neill J.P., Riddle J.C., Stankowski L.F. Jr. og Yang L.L. (1987). A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay. *Mutation Res.*, 189, 135-141.
- (15) Liber H.L., Yandell D.W. og Little J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus. *Mutation Res.*, 216, 9-17.
- (16) Stankowski L.F. Jr., Tindall K.R. og Hsie A.W. (1986). Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Mutation in AS52 Cells. *Mutation Res.*, 160, 133-147.
- (17) Arlett C.F., Smith D.M., Clarke G.M., Green M.H.L., Cole J., McGregor D.B. og Asquith J.C. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Eds.), Cambridge University Press, s. 66-101.
- (18) Hsie A.W., Casciano D.A., Couch D.B., Krahn D.F., O'Neill J.P., og Whitfield B.L. (1981). The Use of Chinese Hamster Ovary Cells to Quantify Specific Locus Mutation and to Determine Mutagenicity of Chemicals; a Report of the Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 86, 193-214.
- (19) Li A.P. (1981). Simplification of the CHO/HGPRT Mutation Assay Through the Growth of Chinese Hamster Ovary Cells as Unattached Cultures, *Mutation Res.*, 85, 165-175.
- (20) Tindall K.R., Stankowski Jr., L.F., Machanoff R., og Hsie A.W. (1984). Detection of Deletion Mutations in pSV2gpt-Transformed Cells, *Mol. Cell. Biol.*, 4, 1411-1415.

- (21) Hsie A. W., Recio L., Katz D. S., Lee C. Q., Wagner M., og Schenley R. L. (1986). Evidence for Reactive Oxygen Species Inducing Mutations in Mammalian Cells. *Proc Natl Acad Sci.*, 83(24): 9616–9620.
- (22) Lorge E., Moore M., Clements J., Donovan M. O., Honma M., Kohara A., Van Benthem J., Galloway S., Armstrong M.J., Thybaud V., Gollapudi B., Aardema M., Kim J., Sutter A., Kirkland D.J. (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing (manuskript under udarbejdelse).
- (23) Coecke S., Balls M., Bowe G., Davis J., Gstraunthaler G., Hartung T., Hay R., Merten O.W., Price A., Schechtman L., Stacey G. og Stokes W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, *ATLA*, 33, 261-287.
- (24) Rosen M.P., San R.H.C. og Stich H.F. (1980). Mutagenic Activity of Ascorbate in Mammalian Cell Cultures, *Can. Lett.* 8, 299-305.
- (25) Natarajan A.T., Tate A.D, Van Buul P.P.W., Meijers M. og de Vogel N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. *Mutation Res.*, 37, 83-90.
- (26) Abbondandolo A., Bonatti S., Corti G., Fiorio R., Loprieno N. og Mazzaccaro A. (1977). Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine. *Mutation Res.*, 46, 365-373.
- (27) Ames B.N., McCann J. og Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 31, 347-364.
- (28) Maron D.M. og Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 113, 173, 215.
- (29) Elliott B.M., Combes R.D., Elcombe C.R., Gatehouse D.G., Gibson G.G., Mackay J.M. og Wolf R.C. (1992) Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. *Mutagen.* 7, 175-177.
- (30) Matsushima T., Sawamura M., Hara K. og Sugimura T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres F.J., Fouts J.R., Bend J.R. og Philpot R.M. (Eds), Elsevier, North-Holland, s. 85-88.

- (31) Ong T.-m., Mukhtar M., Wolf C.R. og Zeiger E. (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, 4, 55-65.
- (32) Johnson T.E., Umbenhauer D.R. og Galloway S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, *Environ. Mol. Mutagen.*, 28, 51-59.
- (33) UNEP. (2001). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Tilgjengelig på: [<http://www.pops.int.html>].
- (34) Tan E.-L. og Hsie A.W. (1981). Effect of Calcium Phosphate and Alumina Cy Gels on the Mutagenicity and Cytotoxicity of Dimethylnitrosamine as Studied in the CHO/HGPRT System. *Mutation Res.*, 84, 147-156.
- (35) O'Neill J.P., Machanoff R., San Sebastian J.R., Hsie A.W. (1982). Cytotoxicity and Mutagenicity of Dimethylnitrosamine in Mammalian Cells (CHO/HGPRT system): Enhancement by Calcium Phosphate. *Environ. Mol. Mutation.*, 4, 7-18.
- (36) Li, A.P. (1984). Use of Aroclor 1254-Induced Rat Liver Homogenate in the Assaying of Promutagens in Chinese Hamster Ovary Cells. *Environ. Mol. Mutation*, 4, 7-18.
- (37) Krahn D.F., Barsky F.C. og McCooey K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (eds.) *Genotoxic Effects of Airborne Agents*. New York, Plenum, s. 91-103.
- (38) Zamora P.O., Benson J.M., Li A.P. og Brooks A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. *Environ. Mutagen.*, 5, 795-801.
- (39) OECD (2014). Document Supporting the WNT Decision to Implement Revised Criteria for the Selection of the Top Concentration in the *In Vitro* Mammalian Cell Assays on Genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487). Available upon request from the Organisation for Economic Cooperation and Development.
- (40) Brookmire L., Chen J.J. og Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay, *Environ. Mol. Mutation*, 54, 36-43.

- (41) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention. (2011). Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances.
- (42) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use. Tilgængelig på: [\[https://federalregister.gov/a/2012-13774\]](https://federalregister.gov/a/2012-13774).
- (43) O'Neill J.P. og Hsie A.W. (1979). Phenotypic Expression Time of Mutagen-Induced 6-thioguanine resistance in Chinese hamster ovary cells (CHO/HGPRT system), *Mutation, Res.*, 59, 109-118.
- (44) Chiewchanwit T., Ma H., El Zein R., Hallberg L., og Au W.W. (1995). Induction of Deletion Mutations by Methoxyacetaldehyde in Chinese Hamster Ovary (CHO)-AS52 cells. *Mutation, Res.*, 1335(2):121-8.
- (45) Hayashi M., Dearfield K., Kasper P., Lovell D., Martus H.J., og Thybaud V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, *Mutation, Res.*, 723, 87-90.
- (46) OECD (2014). Statistical Analysis Supporting the Revision of the Genotoxicity Test Guidelines. Environmental, Health and Safety, Series on testing and assessment (No 199), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (47) Richardson C., Williams D.A., Allen J.A., Amphlett G., Chanter D.O., og Phillips B. (1989). Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Kirkland, D.J., (Ed) Cambridge University Press, Cambridge, s. 141-154.
- (48) Fleiss J. L., Levin B., og Paik M. C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

Tillæg 1

DEFINITIONER

Baseparsubstitutionsmutagener: kemikalier, der forårsager substitution af basepar i DNA.

Kemikalie: et stof eller en blanding.

Kloningseffektivitet: procentdel af celler udpladet ved lav tæthed, som er i stand til at vokse til en koloni, der kan tælles.

Koncentrationer: henviser til endelige koncentrationer af testkemikaliets i dyrkningsmediet.

Cytotoksisk effekt: for de assays, der er omfattet af denne forsøgsmetode, identificeres cytotoksisk effekt som en reduktion i de behandlede cellers relative overlevelse sammenlignet med den negative kontrol (jf. det specifikke punkt).

Fremadmutation: en genmutation fra forældretypen til mutantformen, som medfører ændring i eller tab af det kodede proteins enzymaktivitet eller funktion.

Frameshift-mutagener: kemikalier, der fremkalder addition eller deletion af et eller flere basepar i DNA-molekylet.

Genotoksisk: et generelt udtryk, der omfatter alle former for DNA- eller kromosombeskadigelse, herunder DNA-brud, addukter, omlejninger, mutationer, kromosomaberrationer og aneuploidi. Det er ikke alle former for genotoksiske virkninger, der forårsager mutationer eller stabil kromosomskade.

HAT-medium: medium indeholdende hypoxanthin, aminopterin og thymidin, der anvendes til rensning af Hprt-mutanter.

Mitotisk rekombination: under mitosen, rekombination mellem homologe kromatider, der muligvis medfører brud på DNA-dobbeltstrengene eller tab af heterozygoti.

MPA-medium: medium indeholdende xanthin, adenin, thymidin, aminopterin og mycophenolinsyre, der anvendes til rensning af Xprt-mutanter.

Mutagen: forårsager arvelige ændringer af DNA-baseparssekvens(er) i gener eller i kromosomstrukturen (kromosomaberrationer).

Mutantfrekvens (MF): antal observerede mutantkolonier divideret med antal celler, som er udpladet i selektivt medium, korrigeret for kloningseffektiviteten (eller levedygtigheden) på udvælgelsestidspunktet.

Fænotypeekspressionsperiode: det tidsrum efter behandling, hvor den genetiske ændring fikseres i genomet, og alle eksisterende genprodukter forsvinder, således at det fænotypiske karakteristikum ændres.

Relativ overlevelse (RS): RS bruges til at måle behandlingsrelateret cytotoxisk effekt. RS er cellernes kloningseffektivitet (CE), når de udplades umiddelbart efter behandling, justeret for ethvert celletab under behandlingen sammenlignet med kloningseffektiviteten i negative kontroller (med en overlevelsesprocent på 100 %).

S9-leverfraktioner: supernatant fra leverhomogenat efter 9 000 g centrifugering, dvs. ekstrakt fra rå lever.

S9-blanding: blanding af S9-leverfraktionen og andre cofaktorer, som er nødvendige for at skabe metabolisk enzymaktivitet.

Kontrolkultur med opløsningsmiddel: generelt udtryk, der angiver de kontrolkulturer, som kun modtager det opløsningsmiddel, der anvendes til at opløse testkemikaliet.

Testkemikalie: alle stoffer eller blandinger, der testes ved hjælp af denne forsøgsmetode.

Ubehandlet kontrol: kulturer, der ikke modtager behandling (dvs. hverken testkemikalie eller opløsningsmiddel), men behandles sideløbende og på samme måde som de kulturer, der modtager testkemikaliet.

UVCB: kemiske stoffer af ukendt eller variabel sammensætning, komplekse reaktionsprodukter og biologiske materialer.

Tillæg 2

FORMLER FOR VURDERING AF CYTOTOKSISK EFFEKT OG MUTANTFREKVENNS

Cytotoksisk effekt evalueres ved den relative overlevelse, dvs. cellernes kloningseffektivitet (CE), når de udplades umiddelbart efter behandling, justeret for ethvert celletab under behandlingen sammenlignet med den justerede kloningseffektivitet i de negative kontroller (med en overlevelseshundredprocent på 100 %) (jf. RS-formlen nedenfor).

Den justerede CE for en kultur, som er behandlet med et testkemikalie, beregnes som:

$$\text{Justeret CE} = \frac{\text{Antal celler ved behandlingsforløbets afslutning}}{\text{Antal celler ved behandlingsforløbets begyndelse}}$$

RS for en kultur, som er behandlet med et testkemikalie, beregnes som:

$$\text{RS} = \frac{\text{Justeret CE i den behandlede kultur}}{\text{Justeret CE i kontrolkulturen med opløsningsmiddel}} \times 100$$

Mutantfrekvensen er mutantkoloniers kloningseffektivitet i selektivt medium divideret med kloningseffektiviteten i ikke-selektivt medium målt for den samme kultur på udvælgelsestidspunktet.

$$\text{Mutantfrekvens} = \frac{\text{mutantkoloniers kloningseffektivitet i selektivt medium}}{\text{kloningseffektivitet i ikke – selektivt medium}}$$

Når der anvendes plader til kloningseffektivitet:

$$\text{CE} = \text{antal kolonier} / \text{antal celler ved udpladning}.$$

Når der anvendes mikrotiterplader til kloningseffektivitet:

Antallet af kolonier pr. brønd på mikrotiterplader følger en Poisson-fordeling.

$$\text{Kloningseffektivitet} = -\text{Ln}P(0) / \text{antal celler pr. brønd ved udpladning}$$

Hvor $-\text{Ln}P(0)$ er det sandsynlige antal tomme brønde ud af de udsåede brønde og beskrives ved følgende formel:

$$\text{Ln}P(0) = -\text{Ln} (\text{antal tomme brønde} / \text{antal celler ved udpladning})."$$

(3) Del B, kapitel B.22, affattes således:

"B.22 TEST TIL PÅVISNING AF DOMINERENDE DØDELIG MUTATION – GNAVERE

INDLEDNING

1. Denne forsøgsmetode (TM) svarer til OECD's testvejledning (Test Guideline (TG)) 478 (2016). Forsøgsmetoderne revideres regelmæssigt på baggrund af den videnskabelige udvikling, skiftende reguleringsbehov og dyrevelfærdshensyn. Denne ændrede udgave af forsøgsmetoden afspejler mere end 30 års erfaring med denne test og potentialet for testens integration i eller kombination med andre toksicitetstest såsom udviklings-, reproduktionstoksicitets- og genotoksicitetsundersøgelser. Som følge af dets begrænsninger og anvendelsen af et stort antal dyr er assayet dog ikke egnet som primær metode, men snarere som en supplerende forsøgsmetode, der kun anvendes, når der af lovgivningsmæssige hensyn ikke er noget alternativ. Kombinerede toksicitetstest har potentiale til at skåne et stort antal dyr mod at blive anvendt i toksicitetstest. OECD har udarbejdet et dokument, som indeholder kortfattede oplysninger om testning for genetisk toksikologi og en oversigt over de seneste ændringer af OECD's testvejledning om genetisk toksicitet (1).
2. Formålet med metoden til påvisning af dominerende dødelig (DL) mutation er at undersøge, hvorvidt kemikalier forårsager mutationer, der skyldes kromosomaberrationer i kønsceller. Derudover er metoden til påvisning af dominerende dødelig mutation relevant ved vurdering af genotoksicitet, da faktorer for in vivo-metabolisme, farmakokinetik og DNA-reparationsprocesser er aktive og bidrager til responsen, selv om de kan være forskellige fra art til art. Induktion af DL-mutation efter eksponering for et testkemikalie viser, at kemikallet har påvirket forsøgsdyrets kønscellevæv.
3. DL-mutationer forårsager embryon- eller fosterdød. Induktion af DL-mutation efter eksponering for et testkemikalie viser, at kemikallet har påvirket forsøgsdyrets kønsceller.
4. Et DL-assay er nyttigt til bekræftelse af positive resultater fra test ved anvendelse af somatiske in vivo-endepunkter og er et relevant endepunkt til forudsigelse af farligheden for mennesker og risikoen for genetiske sygdomme, som overføres via kønscellelinjen. Dette assay kræver imidlertid et stort antal dyr og er arbejdskraftintensivt og derfor meget dyrt og tidskrævende at udføre. Da den spontane frekvens af dominerende dødelige mutationer er relativt høj, er assayets følsomhed til påvisning af små stigninger i mutationsfrekvensen generelt begrænset.
5. Definitioner af nøgletermer findes i tillæg 1.

INDLEDENDE OVERVEJELSER

6. Denne test udføres oftest i mus (2) (3) (4), men andre arter såsom rotter (5) (6) (7) (8) kan i nogle tilfælde anvendes, hvis dette er sagligt begrundet. DL opstår generelt på grund af store kromosomaberrationer (strukturelle anomalier og antalsaberrationer) (9) (10) (11), men genmutationer kan ikke udelukkes. En DL-mutation er en mutation, der opstår i en kønscelle per se eller efter befrugtning fikseres i det tidlige embryo, som ikke forårsager dysfunktion hos gameten, men er dødelig for det befrugtede æg eller embryoet.
7. Hanner parres individuelt med jomfruelige hunner med passende på hinanden følgende intervaller. Antallet af parringer efter behandlingen afhænger af det ultimative formål med DL-undersøgelsen (punkt 23) og bør sikre, at alle faser af hannernes kønscellemodning evalueres for DL (12).
8. Hvis der er grund til at tro, at testkemikaliet eller dets metabolit(ter) ikke vil nå frem til testiklerne, er denne test ikke egnet.

PRINCIP FOR TESTEN

9. Normalt eksponeres hanner for et testkemikalie ad en egnet eksponeringsvej, hvorefter de parres med ubehandlede jomfruelige hunner. De forskellige typer kønsceller kan testes ved anvendelse af på hinanden følgende parringsintervaller. Hunnerne aflives et passende stykke tid efter parring, hvorefter deres uterus undersøges med henblik på bestemmelse af antallet af implantater og levende og døde embryoner. Et testkemikalies dominerende dødelighed bestemmes ved sammenligning af de levende implantater pr. hun i den behandlede gruppe med de levende implantater pr. hun i gruppen af kontrolkulturer med bærestof/opløsningsmiddel. Forøgelsen af antallet af døde implantater pr. hun i den behandlede gruppe i forhold til antallet af døde implantater pr. hun i kontrolgruppen er udtryk for det tab, som testkemikaliet har forårsaget efter implantation. Tabet efter implantation beregnes ved bestemmelse af forholdet mellem antallet af døde implantater og det samlede antal implantater i den behandlede gruppe sammenlignet med forholdet mellem antallet af døde implantater og det samlede antal implantater i kontrolgruppen. Tabet før implantation kan vurderes ved sammenligning af corpora lutea-antallet minus det samlede antal implantater eller det samlede antal implantater pr. hun i den behandlede gruppe og kontrolgruppen.

KONTROL AF LABORATORIETS KOMPETENCE

10. Laboratoriets kompetence til udførelse af dette assay bør fastslås ved dets påvisning af, at det kan reproducere frekvensen af dominerende dødelige virkninger fra offentliggjorte data (f.eks. (13) (14) (15) (16) (17) (18)) med positive kontrolstoffer (herunder svage responser) som dem, der er anført i tabel 1, og kontroller med bærestof, og opnå negative

kontrollfrekvenser, der er i overensstemmelse med en acceptabel mængde data (jf. referencer ovenfor) eller eventuelt med laboratoriets historiske kontrolfordeling.

BESKRIVELSE AF METODEN

Forberedelser

Valg af dyreart

11. Der bør anvendes sunde kønsmodne dyr af sædvanligt benyttede laboratoriestammer. Der anvendes sædvanligvis mus, men rotter kan også anvendes. En hvilken som helst anden egnet pattedyrsart kan anvendes, hvis dette begrundes sagligt i rapporten.

Miljø og fodringsbetingelser

12. Temperaturen i forsøgslokalet bør for gnavere være 22 °C (± 3 °C). Den relative luftfugtighed bør ideelt set være 50-60 %, dog mindst 40 % og helst ikke over 70 %, hvilket dog ikke gælder under rengøring af lokalet. Belysningen bør være kunstig og bestå af 12 timers lys efterfulgt af 12 timers mørke. For så vidt angår fodring, kan der anvendes konventionelt laboratoriefoder med ubegrænset adgang til vand. Valget af foder kan påvirkes af behovet for at sikre en passende iblanding af et testkemikalie, når dette indgives ad denne vej. Forud for behandling eller parring bør gnavere opbevares i små grupper (højst fem dyr) af samme køn, såfremt der ikke forventes eller observeres aggressiv adfærd, fortrinsvist i solide bure med passende miljøberigelse. Dyr bør kun opbevares individuelt, hvis dette er sagligt begrundet.

Klargøring af dyrene

13. Der udvælges tilfældigt sunde kønsmodne voksne hanner og hunner til kontrol- og behandlingsgrupperne. De enkelte dyr identificeres entydigt ved hjælp af en human og minimalt invasiv metode (f.eks. med ring, mærke, mikrochip eller biometrisk identifikation, men ikke tå- eller øreklipning) og tilvænnes laboratorieforholdene i mindst fem dage. Burene anbringes på en sådan måde, at de mulige følger af burenes placering minimeres. Krydskontaminering mellem den positive kontrol og testkemikallet bør undgås. Ved undersøgelsens start bør variationen i dyrenes vægt være minimal og ikke overstige ± 20 % af gennemsnitsvægten for hvert køn.

Fremstilling af doser

14. Faste testkemikalier opløses eller suspenderes i passende opløsningsmidler eller bærestoffer eller iblandes foder eller drikkevand før indgivelse i dyrene. Flydende testkemikalier kan indgives direkte eller opløses før indgivelse. Til inhalationseksponering kan testkemikalier indgives som gas, damp eller en fast/flydende aerosol, afhængigt af deres fysisk-kemiske egenskaber. Der bør anvendes friske præparater af testkemikallet, medmindre stabilitetsdata påviser, at opbevaring er acceptabelt, og definerer hensigtsmæssige opbevaringsbetingelser.

Testbetingelser

Opløsningsmiddel/bærestof

15. Opløsningsmidlet/bærestoffet må ikke have toksiske virkninger ved de benyttede doser og må ikke mistænkes for at reagere kemisk med testkemikaliet. Hvis der anvendes andre opløsningsmidler/bærestoffer end de velkendte, bør deres anvendelse understøttes af referencedata om deres kompatibilitet. Det anbefales så vidt muligt først at overveje at anvende vandige opløsningsmidler/bærestoffer. Eksempler på almindeligt anvendte kompatible opløsningsmidler/bærestoffer omfatter vand, fysiologisk saltopløsning, methylcelluloseopløsning, saltopløsning af carboxymethylcellulosenatrium, olivenolie og majsolie.

Positive kontroller

16. Der bør altid benyttes dyr til sideløbende positiv kontrol, medmindre laboratoriet har påvist, at det er kompetent til at udføre testen og på det seneste har anvendt testen rutinemæssigt (f.eks. inden for de sidste fem år). Det er imidlertid ikke nødvendigt at behandle dyr til positiv kontrol ad samme vej som de dyr, der modtager testkemikaliet, eller udtage prøver i forbindelse med alle parringsintervaller. De positive kontrolstoffer bør være kendt som stoffer, der frembringer DL under de betingelser, der anvendes i testen. Bortset fra behandlingen bør dyrene i kontrolgrupperne behandles på samme måde som dyrene i behandlingsgrupperne.
17. Doserne af de positive kontrolstoffer bør vælges, således at de frembringer svage eller moderate virkninger med henblik på en kritisk vurdering af assayets ydeevne og følsomhed, men konsekvent frembringer positive dominerende dødelige virkninger. Eksempler på positive kontrolstoffer og hensigtsmæssige doser findes i tabel 1.

Tabel 1: Eksempler på positive kontrolstoffer:

Stof [CAS-nummer] (referencenr.)	Effektivt dosisinterval (mg/kg) (gnaverarter)	Indgivelsestid (dage)
Triethylenmelamin [51-18-3] (15)	0,25 (mus)	1
Cyclophosphamid [50-18-0] (19)	50-150 (mus)	5
Cyclophosphamid [50-18-0] (5)	25-100 (rotter)	1
Ethylmethansulfonat [62-50-0] (13)	100-300 (mus)	5
Monomer acrylamid [79-06-1] (17)	50 (mus)	5
Chlorambucil [305-03-3] (14)	25 (mus)	1

Negative kontroller

18. Der bør ved hver prøvetagning indgå negative kontroldyr, som kun behandles med opløsningsmiddel eller bærestof og ellers behandles på samme måde som behandlingsgrupperne (20). Hvis der ikke foreligger historiske eller offentliggjorte kontrolldata, som viser, at det valgte opløsningsmiddel/bærestof ikke medfører DL eller andre skadelige virkninger, bør der også indgå ubehandlede kontroldyr i hver prøvetagning for at fastslå, at kontrollen med bærestof kan accepteres.

FREMGANGSMÅDE

Antal dyr

19. Hannerne parres individuelt, helst med én jomfruelig hun, med på hinanden følgende og forud fastsatte intervaller af passende længde (f.eks. hver uge, punkt 21 og 23). Antallet af hanner pr. gruppe bør (i kombination med det antal hunner, der parres under hver parringsperiode) være tilstrækkeligt til at sikre den statistiske styrke, der er nødvendig for at påvise mindst en fordobling af DL-frekvensen (punkt 44).
20. Antallet af hunner pr. parringsperiode bør også fastlægges ud fra beregninger af den statistiske styrke, der muliggør påvisning af mindst en fordobling af DL-frekvensen (dvs. tilstrækkeligt mange drægtige hunner til, at der fremkommer mindst 400 implantater i alt) (20) (21) (22) (23), og idet der forventes mindst et dødt implantat pr. analyseenhed (dvs. parringsgruppe pr. dosis) (24).

Indgivelsesperiode og parringsintervaller

21. Antallet af parringsintervaller efter behandlingen bestemmes af behandlingsplanen og bør sikre, at alle faser af hannernes kønscellemodning evalueres for DL-induktion (12) (25). Ved indgivelse af en enkelt dosis og op til 5 daglige doser bør der efter den sidste behandling gennemføres 8 parringer (mus) eller 10 parringer (rotter) med ugentlige intervaller. Ved indgivelse af flere doser kan antallet af parringsintervaller reduceres i forhold til den længere indgivelsesperiode, men det skal fortsat være muligt at evaluere alle faser af spermatogenesis (efter 28 dages eksponering er det f.eks. tilstrækkeligt med kun 4 ugentlige parringer for at evaluere alle faser af spermatogenesis i musen). Alle behandlings- og parringsplaner skal begrundes sagligt.
22. Hunnerne placeres hos hannerne i en periode svarende til mindst en brunstcyklus (en uge dækker f.eks. en brunstcyklus hos både mus og rotter). De hunner, der ikke har parret sig i løbet af en uge, kan benyttes til en efterfølgende parringsperiode, eller de kan blive hos hannerne, indtil parringen har fundet sted, hvilket konstateres ved tilstedeværelse af sperma i vagina eller en vaginalprop.

23. Eksponerings- og parringsbetingelserne afhænger af det ultimative formål med DL-undersøgelsen. Hvis formålet er at bestemme, om et givet kemikalie fremkalder DL-mutationer per se, ville den accepterede metode bestå i at eksponere en hel spermatogeneserunde (f.eks. 7 uger i mus, 5-7 behandlinger om ugen) med en efterfølgende parring. Men hvis formålet er at identificere den kønscelleteype, der er følsom over for DL-induktion, foretrækkes en enkelt eksponering eller eksponering over 5 dage efterfulgt af ugentlig parring.

Dosisniveauer

24. Hvis der gennemføres en forundersøgelse til bestemmelse af dosisinterval, fordi der ikke foreligger egnede data, der kan bruges til at vælge dosis, bør den udføres i samme laboratorium med samme art, stamme, køn og behandlingsmåde, som agtes benyttet i hovedundersøgelsen (26). Formålet med undersøgelsen bør være at identificere den maksimalt tolererede dosis (MTD) defineret som den maksimale dosis, der tolereres uden dokumentation for undersøgelsesbegrænsende toksicitet, i forhold til undersøgelsesperiodens varighed (f.eks. unormal adfærd eller unormale reaktioner, et mindre fald i kropsvægt eller cytotoxisk effekt i det hæmatopoietiske system), men ikke død eller tegn på smerte eller lidelse, der kræver human aflivning (27).
25. MTD må heller ikke have negativ indvirkning på parringsresultatet (21).
26. Testkemikalier med specifik biologisk aktivitet ved lav ikke-toksisk dosis (f.eks. hormoner og mitogener) og kemikalier, der udviser mætning af toksikokinetiske egenskaber, kan være undtagelser fra dosisfastsættelseskriterierne og bør evalueres individuelt.
27. For at opnå dosis/respons-oplysninger bør en fuldstændig undersøgelse omfatte en negativ kontrolgruppe og mindst tre dosisniveauer generelt adskilt af en faktor på 2, men ikke over 4. Hvis testkemikaliets ikke frembringer toksicitet i en forundersøgelse eller baseret på eksisterende data, bør den højeste dosis for en enkelt indgivelse være 2 000 mg/kg kropsvægt. Hvis testkemikaliets frembringer toksicitet, bør MTD imidlertid være den højeste indgivne dosis, og de anvendte dosisniveauer bør fortrinsvis dække et interval fra den højeste dosis til en dosis, der frembringer ringe eller ingen toksicitet. For ikke-toksiske kemikalier er grænsedosis for en indgivelsesperiode på 14 dage eller derover 1 000 mg/kg kropsvægt/dag, og for indgivelsesperioder på under 14 dage er grænsedosis 2 000 mg/kg kropsvægt/dag.

Indgivelse af doser

28. Den forventede indgivelsesmåde for mennesker bør tages i betragtning i forbindelse med udformningen af et assay. Andre indgivelsesmåder såsom foder, drikkevand, subkutan, intravenøs, topisk, inhalation, oralt (med sonde) eller implantation kan vælges, hvis de kan begrundes. Under alle omstændigheder bør der vælges en indgivelsesmåde, som sikrer tilstrækkelig eksponering af målvævet. Intraperitoneal injektion anbefales normalt ikke,

eftersom det ikke er en tilsigtet metode til human eksponering, og bør kun anvendes med en specifik saglig begrundelse. Hvis testkemikaliets blandes foder eller drikkevand, navnlig i forbindelse med enkeltdosering, bør det sikres, at tidsrummet mellem indtagelse af foder og drikkevand og parring er tilstrækkelig stort til, at virkningerne kan påvises (punkt 31). Hvor stor en væskemængde, der kan indgives ad gangen med sonde eller ved injektion, afhænger af forsøgsdyrenes størrelse. Mængden må normalt højst være 1 ml/100 g kropsvægt, bortset fra vandige opløsninger, hvor der højst må anvendes 2 ml/100 g kropsvægt. Anvendelse af større mængder (hvis dette er tilladt ifølge lovgivningen om dyrevelfærd) bør begrundes. Testmængden bør variere så lidt som muligt, idet koncentrationen justeres, så indgivelsen sker ved samme mængde i forhold til kropsvægt ved alle dosisniveauer.

Observationer

29. Der bør foretages generelle kliniske observationer af forsøgsdyrene, og de kliniske tegn bør registreres mindst en gang om dagen, fortrinsvis på samme tidspunkt(er) hver dag og under hensyntagen til det tidspunkt, hvor de forventede virkninger efter dosering toppe. Alle dyr bør observeres mindst to gange dagligt i doseringsperioden for morbiditet og dødelighed. Alle dyr bør vejes ved undersøgelsens start og mindst en gang om ugen i undersøgelser med gentagen dosering samt ved aflivning. Foderindtag bør måles mindst en gang ugentligt. Hvis testkemikaliets indgives via drikkevandet, bør vandindtaget måles ved hvert vandskift og mindst en gang ugentligt. Dyr, der udviser ikke-dødelig indikation for høj toksicitet, bør aflives før testperiodens udløb (27).

Indsamling og behandling af væv

30. Hunnerne aflives i anden halvdel af drægtighedsperioden på drægtighedsdag (GD) 13 for mus og GD 14-15 for rotter. Uterus undersøges for dominerende dødelige virkninger med henblik på bestemmelse af antallet af implantater, levende og døde embryoner og corpora lutea.
31. Livmoderhorn og ovarier blotlægges til bestemmelse af antallet af corpora lutea, og fostre fjernes, tælles og vejes. Uterus bør undersøges omhyggeligt for resorptioner, der er skjult af levende fostre, og det skal sikres, at alle resorptioner bliver optalt. Fosterdødeligheden registreres. Antallet af befrugtede hunner og det samlede antal implantationer samt antallet af tab før implantation og dødeligheden efter implantation (herunder tidlig og sen resorption) registreres tilsvarende. Desuden kan de synlige fostre præserves i Bouins væske i mindst to uger, hvorefter de undersøges for væsentlige eksterne misdannelser (28) for at opnå yderligere oplysninger om testkemikaliets reproduktions- og udviklingsvirkninger.

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

32. Data bør opstilles i tabelform med angivelse af antal parrede hanner samt antal drægtige og ikke-drægtige hunner. Resultaterne af hver enkelt parring, herunder identiteten af hver enkelt han og hun, anføres individuelt. Parringsperioderne og dosisniveauet for de behandlede hanner samt antallet af levende implantater og døde implantater bør anføres for hver enkelt hun.
33. Tabet efter implantation beregnes ved bestemmelse af forholdet mellem antallet af døde implantater og det samlede antal implantater i den behandlede gruppe sammenholdt med forholdet mellem antallet af døde implantater og det samlede antal implantater i gruppen af kontrolkulturer med bærestof/opløsningsmiddel.
34. Tabet før implantation beregnes som forskellen mellem antallet af corpora lutea og antallet af implantater eller som et lavere gennemsnitligt antal implantater pr. hun i forhold til kontrolparringerne. Hvis der foretages vurdering af tabet før implantation, bør dette anføres.
35. Den dominerende dødelige faktor vurderes som: $(\text{antal døde før implantation} / \text{samlet antal implantationer pr. hun}) \times 100$.
36. Data om toksicitet og kliniske tegn bør anføres (jf. punkt 29).

Acceptkriterier

37. Følgende kriterier bestemmer, om en test kan accepteres:
 - Den sideløbende negative kontrol er i overensstemmelse med offentliggjorte normer for historiske negative kontrolldata og laboratoriets historiske kontrolldata, hvis sådanne foreligger (jf. punkt 10 og 18).
 - Sideløbende positive kontroller fremkalder responser, der er i overensstemmelse med offentliggjorte normer for historiske positive kontrolldata eller laboratoriets historiske positive kontrolldatabase, hvis en sådan foreligger, og medfører en statistisk signifikant stigning sammenlignet med den negative kontrol (jf. punkt 17 og 18).
 - Et tilstrækkeligt antal implantater og doser er blevet analyseret (punkt 20).
 - Kriterierne for valg af højeste dosis er i overensstemmelse med kriterierne i punkt 24 og 27.

Vurdering og fortolkning af resultater

38. Mindst tre behandlede doseringsgrupper bør analyseres for at tilvejebringe tilstrækkelige data til dosis/respons-analyse.

39. Såfremt alle acceptkriterier er opfyldt, anses et testkemikalie for at være klart positivt, hvis:

- mindst en af testdoserne udviser en statistisk signifikant stigning sammenlignet med den sideløbende negative kontrol
- stigningen er dosisafhængig ved mindst en forsøgsbetingelse (f.eks. ugentlig parring), når den vurderes med en hensigtsmæssig test, og
- et eller flere af resultaterne ligger uden for det acceptable interval for negative kontrolldata eller fordelingen af laboratoriets historiske negative kontrolldata (f.eks. Poisson-baseret kontrolgrænse på 95 %), hvis disse foreligger.

Testkemikalien anses derefter for at kunne fremkalde dominerende dødelige mutationer i forsøgsdyrenes kønsceller. Anbefalinger til de mest hensigtsmæssige statistiske metoder er beskrevet i punkt 44. Andre anbefalede statistiske metoder findes i litteraturen (20) (21) (22) (24) (29). I de anvendte statistiske test skal dyret betragtes som forsøgsenheden.

40. Såfremt alle acceptkriterier er opfyldt, anses et testkemikalie for at være klart negativt, hvis:

- ingen af testdoserne udviser en statistisk signifikant stigning sammenlignet med den sideløbende negative kontrol
- der ikke indtræder en dosisafhængig stigning ved en af forsøgsbetingelserne, og
- alle resultaterne ligger inden for det acceptable interval for negative kontrolldata eller laboratoriets historiske negative kontrolldata (f.eks. Poisson-baseret kontrolgrænse på 95 %), hvis disse foreligger.

Testkemikalien anses derefter for ikke at kunne fremkalde dominerende dødelige mutationer i forsøgsdyrenes kønsceller.

41. Der stilles ikke krav om verifikation af en klart positiv eller klart negativ respons.

42. Hvis responsen hverken er klart negativ eller positiv, og for at bidrage til at fastslå den biologiske relevans af et resultat (f.eks. en svag eller usikker stigning), bør dataene evalueres af eksperter, og/eller der bør foretages yderligere undersøgelser på baggrund af eksisterende forsøgsdata, herunder undersøgelse af, om det positive resultat ligger uden for det acceptable interval for negative kontrolldata eller laboratoriets historiske negative kontrolldata (30).

43. I sjældne tilfælde giver dataene selv efter yderligere undersøgelser ikke mulighed for at konkludere, om resultaterne er positive eller negative. Konklusionen er derfor, at testkemikalieresponsen er usikker.

44. I de anvendte statistiske test skal hannen betragtes som forsøgsenheden. Selv om det er muligt at fordele optællingsbaserede data (f.eks. antallet af implantater pr. hun) efter Poisson-metoden, og/eller fordele andelene (f.eks. andelen af døde implantater) efter binomialteorien, bliver sådanne data ofte overdispigeret (31). Tilsvarende bør der ved statistiske analyser først foretages en test for over-/underdispersion ved anvendelse af varianstest såsom Cochrans binomiale varianstest (32) eller Tarones $C(\alpha)$ -test for binomial overdispersion (31) (33). Hvis ikke der påvises nogen afvigelse fra den binomiale dispersion, kan andelsrelaterede tendenser på tværs af dosisniveauer testes ved anvendelse af Cochran-Armitage-trend-testen (34), og parvise sammenligninger med kontrolgruppen kan testes ved anvendelse af Fishers eksakte test (35). Hvis ikke der påvises nogen afvigelse fra Poisson-dispersionen, kan optællingsbaserede tendenser tilsvarende testes ved anvendelse af Poisson-regression (36), og parvise sammenligninger med kontrolgruppen kan testes inden for rammerne af Poisson-modellen ved anvendelse af parvise kontraster (36). Hvis der påvises signifikant overdispersion eller underdispersion, anbefales ikke-parametriske metoder (23) (31). Disse omfatter klassificeringsbaserede test, såsom Jonckheere-Terpstra-testen for tendenser (37) og Mann-Whitney-testene (38) for parvise sammenligninger med gruppen af kontrolkulturer med bærestof/opløsningsmiddel samt permutations-, resamplings- eller bootstrap-testene for tendenser og parvise sammenligninger med kontrolgruppen (31) (39).
45. Et positivt DL-assay dokumenterer testkemikaliets genotoksicitet i kønsceller hos den eksponerede han fra den testede dyreart.
46. Det kan være nyttigt at undersøge, om de observerede værdier ligger inden for eller uden for det historiske kontrolinterval, ved vurderingen af responsens biologiske signifikans (40).

Testrapport

47. Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Resumé

Testkemikalie:

- oprindelse, batchnummer, sidste anvendelsesdato, hvis dette foreligger
- testkemikaliets stabilitet, hvis denne er kendt
- testkemikaliets opløselighed og stabilitet i opløsningsmidlet, hvis dette er kendt
- måling af pH-værdi, osmolalitet og bundfald i det dyrkningsmedium, som testkemikaliets blev tilsat, hvor det er relevant.

Stof med kun én bestanddel:

- fysisk udseende, vandopløselighed og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber
- kemisk identifikation, f.eks. IUPAC-navn eller CAS-navn, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel, renhed, kemisk identitet af urenheder, i det omfang det er relevant og praktisk muligt, osv.

Stof med flere bestanddele, UVCB-stoffer og blandinger:

- kendetegnet så vidt muligt ved kemisk identitet (jf. ovenfor), kvantitativ forekomst og bestanddelenes relevante fysisk-kemiske egenskaber.

Præparering af testkemikaliet:

- begrundelse for valg af bærestof
- testkemikaliets opløselighed og stabilitet i opløsningsmidlet/bærestoffet, hvis dette er kendt
- fastlæggelse af sammensætning af foder, drikkevand eller inhalationsformulering
- analytiske bestemmelser af formuleringer (f.eks. stabilitet, homogenitet og nominelle koncentrationer), når disse foretages.

Forsøgsdyr:

- anvendt art/stamme og begrundelse herfor
- dyrenes antal, alder og køn
- oprindelse, miljøbetingelser, foder mv.
- metode til entydig identifikation af dyr
- for kortvarige undersøgelser: de enkelte hanners kropsvægt ved testens start og afslutning. For undersøgelser af mere end en uges varighed: individuel kropsvægt under undersøgelsen og fødeindtagelse. Kropsvægtinterval, gennemsnit og standardafvigelse for hver enkelt gruppe bør medtages.

Testbetingelser:

- positive og negative kontroldata (bærestof/opløsningsmiddel)
- data fra forundersøgelse til bestemmelse af dosisinterval
- begrundelse for valg af dosisniveau
- oplysninger om præparering af testkemikaliet
- oplysninger om indgivelse af testkemikaliet
- begrundelse for indgivelsesvej

- metoder til måling af dyretoksicitet, herunder om muligt histopatologiske eller hæmatologiske analyser samt frekvensen for observationer og vejning af dyrene
- metoder til kontrol af, at testkemikaliets er nået frem til målvævet eller det almindelige kredsløb, hvis der er opnået negative resultater
- faktisk dosis (mg/kg kropsvægt/dag) beregnet på baggrund af testkemikaliets koncentration i foder/drikkevand (ppm) og indtagelse, hvis relevant
- oplysninger om foder- og vandkvalitet
- oplysninger om berigelse af miljøet i burene
- detaljeret beskrivelse af behandlings- og prøvetagningsplaner samt begrundelser for valg
- analgesimetode
- aflivningsmetode
- procedurer til isolering og præservering af væv
- oprindelse og batchnummer for alle kits og reagenser (hvis relevant)
- metoder til kvantitativ bestemmelse af DL
- parringsplan
- metoder til konstatering af, om parring har fundet sted
- aflivningstidspunkt
- kriterier for scoring af DL-virkninger, herunder corpora lutea, implantationer, resorptioner og tab før implantation, levende implantater, døde implantater.

Resultater:

- dyrenes tilstand før og i løbet af testperioden, herunder tegn på toksicitet
- hannernes kropsvægt under behandling og i parringsperioder
- antal parrede hunner
- dosis/respons-forhold, hvor muligt
- data for sideløbende negative kontroller og historiske negative kontrolldata med angivelse af intervaller, gennemsnit og standardafvigelse
- data for sideløbende positive kontroller
- data i tabelform for hvert moderdyr, herunder: antal corpora lutea pr. moderdyr, antal implantationer pr. moderdyr, antal resorptioner og tab før implantation pr. moderdyr, antal levende implantater pr. moderdyr, antal døde implantater pr. moderdyr, fostrenes vægt
- sammenfatning af ovenstående oplysninger for hver parringsperiode og dosis med angivelse af frekvensen for dominerende dødelige virkninger

- anvendte statistiske analyser og metoder.

Diskussion af resultater

Konklusion

LITTERATUR

- (1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Paris.
- (2) Bateman, A.J. (1977). The Dominant Lethal Assay in the Male Mouse, in Handbook of Mutagenicity Test Procedures B.J. Kilbey *et. al.* (Eds.) s. 235-334, Elsevier, Amsterdam.
- (3) Ehling U.H., Ehling, U.H., Machemer, L., Buselmaier, E., Dycka, D., Frohberg, H., Kratochvilova, J., Lang, R., Lorke, D., Muller, D., Pheh, J., Rohrborn, G., Roll, R., Schulze-Schencking, M., og Wiemann, H. (1978). Standard Protocol for the Dominant Lethal Test on Male Mice. Set up by the Work Group Dominant lethal mutations of the ad hoc Committee Chemogenetics, Arch. *Toxicol.*, 39, 173-185.
- (4) Shelby M.D. (1996). Selecting Chemicals and Assays for Assessing Mammalian Germ Cell Mutagenicity. *Mutation Res.*, 352:159-167.
- (5) Knudsen I., Knudsen, I., Hansen, E.V., Meyer, O.A. og Poulsen, E. (1977). A proposed Method for the Simultaneous Detection of Germ-Cell Mutations Leading to Fetal Death (Dominant Lethality) and of Malformations (Male Teratogenicity) in Mammals. *Mutation Res.*, 48:267-270.
- (6) Anderson D., Hughes, J.A., Edwards, A.J. og Brinkworth, M.H. (1998). A Comparison of Male-Mediated Effects in Rats and Mice Exposed to 1,3-Butadiene. *Mutation Res.*, 397:77-74.
- (7) Shively C.A., C.A., White, D.M., Blauch, J.L. og Tarka, S.M. Jr. (1984). Dominant Lethal Testing of Theobromine in Rats. *Toxicol. Lett.* 20:325-329.
- (8) Rao K.S., Cobel-Geard, S.R., Young, J.T., Hanley, T.R. Jr., Hayes, W.C., John, J.A. og Miller, R.R. (1983). Ethyl Glycol Monomethyl Ether II. Reproductive and dominant Lethal Studies in Rats. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 3:80-85.
- (9) Brewen J.G., Payne, H.S., Jones, K.P., og Preston, R.J. (1975). Studies on Chemically Induced Dominant Lethality. I. The Cytogenetic Basis of MMS-Induced Dominant Lethality in Post-Meiotic Male Germ Cells, *Mutation Res.*, 33, 239-249.
- (10) Marchetti F., Bishop, J.B., Cosentino, L., Moore II, D. og Wyrobek, A.J. (2004). Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations in Mouse Zygotes Determine their Embryonic Fate. *Biol. Reprod.*, 70:616-624.

- (11) Marchetti F. og Wyrobek, A.J. (2005). Mechanisms and Consequences of Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations. *Birth Defects Res., C* 75:112-129.
- (12) Adler I.D. (1996). Comparison of the Duration of Spermatogenesis Between Rodents and Humans. *Mutation Res.*, 352:169-172.
- (13) Favor J., og Crenshaw J.W. (1978). EMS-Induced Dominant Lethal Dose Response Curve in DBA/1J Male Mice, *Mutation Res.*, 53: 21–27.
- (14) Generoso W.M., Witt, K.L., Cain, K.T., Hughes, L. Cacheiro, N.L.A, Lockhart, A.M.C. og Shelby, M.D. (1995). Dominant Lethal and Heritable Translocation Test with Chlorambucil and Melphalan. *Mutation Res.*, 345:167-180.
- (15) Hastings S.E., Huffman K.W. og Gallo M.A. (1976). The dominant Lethal Effect of Dietary Triethylenemelamine, *Mutation Res.*, 40:371-378.
- (16) James D.A. og Smith D.M. (1982). Analysis of Results from a Collaborative Study of the Dominant Lethal Assay, *Mutation Res.*, 99:303-314.
- (17) Shelby M.D., Cain, K.T., Hughes, L.A., Braden, P.W. og Generoso, W.M. (1986). Dominant Lethal Effects of Acrylamide in Male Mice. *Mutation Res.*, 173:35-40.
- (18) Sudman P.D., Rutledge, J.C., Bishop, J.B. og Generoso W.M. (1992). Bleomycin: Female-Specific Dominant Lethal Effects in Mice, *Mutation Res.*, 296: 143-156.
- (19) Holstrom L.M., Palmer A.K. og Favor, J. (1993). The Rodent Dominant Lethal Assay. In *Supplementary Mutagenicity Tests*. Kirkland D.J. og Fox M. (Eds.), Cambridge University Press, s. 129-156.
- (20) Adler I-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. og Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, *Mutation Res.*, 417:19–30.
- (21) Adler I.D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. og Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. *Mutation Res.*, 312:313-318.
- (22) Generoso W.M. og Piegorsch W.W. (1993). Dominant Lethal Tests in Male and Female Mice. *Methods, Toxicol.*, 3A:124-141.

- (23) Haseman J.K. og Soares E.R. (1976). The Distribution of Fetal Death in Control Mice and its Implications on Statistical Tests for Dominant Lethal Effects. *Mutation. Res.*, 41: 277-288.
- (24) Whorton E.B. Jr. (1981). Parametric Statistical Methods and Sample Size Considerations for Dominant Lethal Experiments. The Use of Clustering to Achieve Approximate Normality, *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.*, 1:353 – 360.
- (25) Anderson D., Anderson, D., Hodge, M.C.E., Palmer, S., og Purchase, I.F.H. (1981). Comparison of Dominant Lethal and Heritable Translocation Methodologies. *Mutation. Res.*, 85:417-429.
- (26) Fielder R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. og Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. *Mutagen.*, 7:313-319.
- (27) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No.19.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (28) Barrow M.V., Taylor W.J og Morphol J. (1969). A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Fetuses, 127, 291–306.
- (29) Kirkland D.J., (Ed.)(1989). Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Cambridge University Press.
- (30) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper P., Lovell D., Martus H.-J. og Thybaud V. (2011). "Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data", *Mutation. Res.*, 723:87-90.
- (31) Lockhart A.C., Piegorsch W.W. og Bishop J.B. (1992). Assessing Over Dispersion and Dose-Response in the Male Dominant Lethal Assay. *Mutation. Res.*, 272:35-58.
- (32) Cochran W.G. (1954). Some Methods for Strengthening the Common χ^2 Tests. *Biometrics*, 10: 417-451.
- (33) Tarone R.E. (1979). Testing the Goodness of Fit of the Binomial Distribution. *Biometrika*, 66: 585-590.
- (34) Margolin B.H. (1988). Test for Trend in Proportions. In *Encyclopedia of Statistical Sciences*, Volume 9, Kotz S. og Johnson N. L. (Eds.), s. 334-336. John Wiley and Sons, New York.

- (35) Cox D.R., Analysis of Binary Data. Chapman and Hall, London (1970).
- (36) Neter J.M., Kutner, H.C., Nachtsheim, J. og Wasserman, W. (1996). Applied Linear Statistical Models, Fourth Edition, Chapters 14 and 17. McGraw-Hill, Boston.
- (37) Jonckheere R. (1954). A Distribution-Free K-Sample Test Against Ordered Alternatives. *Biometrika*, 41:133-145.
- (38) Conover W.J. (1971). Practical Nonparametric Statistics. John Wiley and Sons, New York.
- (39) Efron, B. (1982). The Jackknife, the Bootstrap and Other Resampling Plans. Society for Industrial and Applied Mathematics, Philadelphia, PA.
- (40) Fleiss J. (1973). Statistical Methods for Rates and Proportions. John Wiley and Sons, New York.

Tillæg 1

DEFINITIONER

Kemikalie: et stof eller en blanding.

Corpora luteum (lutea): den hormonudskillende struktur, der dannes på ovariet på det sted, hvor et follikel har løsnet et æg. Antallet af corpora lutea i ovarierne svarer til antallet af ovulerede æg.

Dominerende dødelig mutation: en mutation, der opstår i en kønscelle, eller som fikseres efter befrugtning, og som medfører embryon- eller fosterdød.

Fertilitetsgrad: antal parrede drægtige hunner divideret med antal parrede hunner.

Parringsinterval/-periode: tiden mellem eksponeringens afslutning og parringen af de behandlede hanner. Ved at styre dette interval/denne periode er det muligt at vurdere de kemiske virkninger på forskellige typer kønsceller. I mus er det ved parring i henholdsvis første, anden, tredje, fjerde, femte, sjette, syvende og ottende uge efter eksponeringens afslutning muligt at måle virkningerne i sperma, kondenserede spermatider, runde spermatider, pakyteniske spermatocytter, tidlige spermatocytter, differentierede spermatogonier, differentierende spermatogonier og stamcellespermatogonier.

Tab før implantation: forskellen mellem antallet af implantater og antallet af corpora lutea. Kan også estimeres ved at sammenligne det samlede antal implantater pr. hun i de behandlede grupper og kontrolgrupperne.

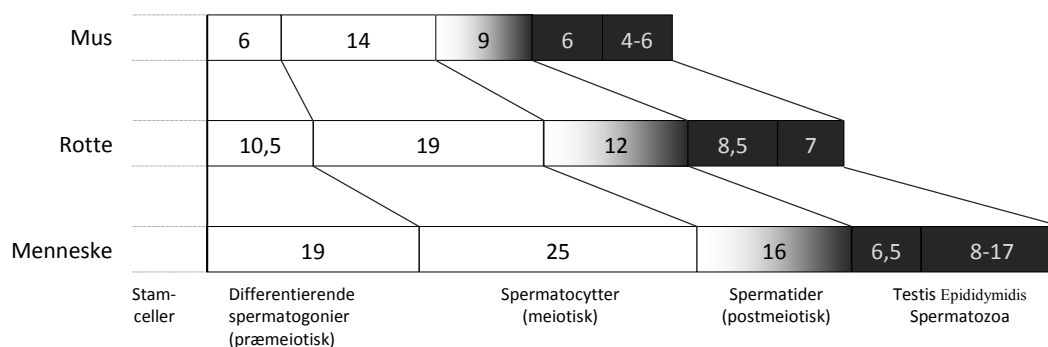
Tab efter implantation: andelen af døde implantater i den behandlede gruppe sammenlignet med andelen af døde implantater i forhold til det samlede antal implantater i kontrolgruppen.

Testkemikalie: alle stoffer eller blandinger, der testes ved hjælp af denne forsøgsmetode.

UVCB: kemiske stoffer af ukendt eller variabel sammensætning, komplekse reaktionsprodukter og biologiske materialer.

Tillæg 2

TIDSPUNKT FOR SPERMATOGENESE I PATTEDYR



Figur 1: Sammenligning af varigheden (i dage) af hanners kønscelleudvikling i mus, rotter og mennesker. Der sker ingen DNA-reparation i de perioder, der er skraveret.

Ovenfor vises et skema over spermatogenese i mus, rotter og mennesker (taget fra Adler, 1996). Udifferentierede spermatogonier omfatter: A-single, A-paired og A-aligned spermatogonier (Hess og de Franca, 2008). A-single anses for at være de ægte stamceller. Derfor skal der gå mindst 49 dage (i mus) mellem den sidste injektion af testkemikalie og parringen, hvis man vil vurdere virkningerne på stamceller.

Referencer

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

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

(4) Del B, kapitel B.23, affattes således:

"B.23 TEST FOR KROMOSOMABERRATIONER I SPERMATOGONIER HOS PATTEDYR

INDLEDNING

1. Denne forsøgsmetode (TM) svarer til OECD's testvejledning (Test Guideline) 483 (2016). Forsøgsmetoderne revideres regelmæssigt på baggrund af den videnskabelige udvikling, skiftende reguleringsbehov og dyrevelfærdshensyn. Denne ændrede udgave af forsøgsmetoden afspejler mange års erfaring med dette assay og potentialet for testens integration i eller kombination med andre toksicitets- eller genotoksicitetsundersøgelser. Kombinerede toksicitetsundersøgelser har potentiale til at mindske det antal dyr, der anvendes i toksicitetstest. Denne forsøgsmetode er en del af en række forsøgsmetoder vedrørende genetisk toksikologi. OECD har udarbejdet et dokument, som indeholder kortfattede oplysninger om testning for genetisk toksikologi og en oversigt over de seneste ændringer af OECD's testvejledning om genetisk toksicitet (1).
2. Formålet med in vivo-testen for kromosomaberrationer i spermatogonier hos pattedyr er at påvise, om et kemikalie forårsager strukturelle kromosomaberrationer i spermatogonier hos pattedyr (2) (3) (4). Derudover er testen relevant ved vurdering af genotoksicitet, da faktorer for in vivo-metabolisme, farmakokinetik og DNA-reparationsprocesser er aktive og bidrager til responsen, selv om de kan være forskellige fra art til art. Denne forsøgsmetode er ikke beregnet til at måle antalsafvigelser. Assayet anvendes ikke rutinemæssigt til dette formål.
3. Ved denne test måles strukturelle kromosomaberrationer (af både kromosom- og kromatidtypen) i spermatogonier, der er ved at dele sig, og den forventes derfor at kunne forudsige induktion af arvelige mutationer i disse kønsceller.
4. Definitioner af nøgletermer findes i tillægget.

INDLEDENDE OVERVEJELSER

5. Der benyttes rutinemæssigt gnavere i denne test, men andre arter kan i nogle tilfælde anvendes, hvis dette er videnskabeligt begrundet. Almindelige cytogenetiske præparater fra gnavertestikler skaber mitotiske (spermatogonier) og meiotiske (spermatocytter) metafaser. Mitotiske og meiotiske metafaser identificeres med udgangspunkt i kromosomernes morfologi (4). Ved denne cytogenetiske in vivo-test påvises strukturelle kromosomaberrationer i spermatogoniens mitose. Forsøgsmetoden omfatter ikke andre målceller.
6. For at påvise aberrationer af kromatidtypen i spermatogonier skal den første mitotiske celledeling efter behandlingen undersøges, inden disse aberrationer omdannes til aberrationer af kromosomtypen ved efterfølgende celledelinger. Der kan indhentes yderligere information fra

behandlede spermatocytter ved meiotisk kromosomanalyse for strukturelle kromosomaberrationer ved diakinese-metafase I og -metafase II.

7. Testiklerne (5) indeholder flere generationer af spermatogonier, og disse forskellige kønscelletyper kan udvise forskellig følsomhed over for kemisk behandling. På denne måde repræsenterer de påviste aberrationer en samlet respons fra behandlede spermatogonpopulationer. Størstedelen af de mitotiske celler i testikelpræparater er B-spermatogonier, som har en cellecyklus på ca. 26 timer (3).
8. Hvis der er grund til at tro, at testkemikallet eller dets metabolit(ter) ikke vil nå frem til testiklerne, er denne test ikke egnet.

PRINCIPPET FOR FORSØGSMETODEN

9. Normalt eksponeres dyrene for testkemikallet ad en passende indgivelsesvej, og de aflives et passende tidsrum efter behandling. Inden aflivning behandles dyrene med et metafasestandsende stof (f.eks. colchicin eller Colcemid®). Der fremstilles derefter kromosompræparater af kønscellerne, som farves, og metafasecellerne analyseres for kromosomaberrationer.

KONTROL AF LABORATORIETS KOMPETENCE

10. Laboratoriets kompetence til udførelse af dette assay bør fastslås ved dets påvisning af, at det kan frembringe de forventede resultater for frekvensen af strukturelle kromosomaberrationer i spermatogonier med positive kontrolstoffer (herunder svage responser) som dem, der er anført i tabel 1, og opnå negative kontrolfrekvenser, der er i overensstemmelse med en acceptabel mængde kontroldata i litteraturen (f.eks. (2) (3) (6) (7) (8) (9) (10)) eller eventuelt med laboratoriets historiske kontrolfordeling.

BESKRIVELSE AF METODEN

Forberedelser

Valg af dyreart

11. Der bør anvendes sunde unge voksne dyr af sædvanligt benyttede laboratoriestammer. Der benyttes sædvanligvis hanmus, men hanner af andre egnede pattedyrsarter kan ligeledes anvendes, når det er sagligt begrundet, og for at gøre det muligt at køre denne test sammen med en anden forsøgsmetode. Den saglige begrundelse for at bruge andre arter end gnavere bør anføres i rapporten.

Miljø og fodringsbetingelser

12. Temperaturen i forsøgslokalet bør være 22 °C (± 3 °C) for gnavere. Den relative luftfugtighed bør ideelt set være 50-60 %, dog mindst 40 % og helst ikke over 70 %, hvilket dog ikke gælder

under rengøring af lokalet. Belysningen skal være kunstig og bestå af 12 timers lys og 12 timers mørke. For så vidt angår fodring, kan der anvendes konventionelt laboratoriefoder med ubegrænset adgang til vand. Valget af foder kan påvirkes af behovet for at sikre en passende iblanding af et testkemikalie, når dette indgives ad denne vej. Gnavere bør opbevares i små grupper (højst fem dyr pr. bur), såfremt der ikke forventes aggressiv adfærd, fortrinsvist i solide gulvbure med passende miljøberigelse. Dyr bør kun opbevares individuelt, hvis dette er sagligt begrundet.

Klargøring af dyrene

13. Der anvendes normalt sunde unge voksne hanner (8-12 uger ved behandlingsstart), som udvælges vilkårligt til kontrol- og behandlingsgrupperne. De enkelte dyr identificeres entydigt ved hjælp af en human og minimalt invasiv metode (f.eks. med ring, mærke, mikrochip eller biometrisk identifikation, men ikke øre- eller tåklipning) og tilvænnenes laboratoriebetingelserne i mindst fem dage. Burene anbringes på en sådan måde, at de mulige følger af burenes placering minimeres. Krydskontaminering mellem den positive kontrol og testkemikallet bør undgås. Ved undersøgelsens start bør vægtvariationen mellem dyrene være mindst mulig og ikke over $\pm 20 \%$.

Fremstilling af doser

14. Faste testkemikalier opløses eller suspenderes i passende opløsningsmidler eller bærestoffer eller iblandes foder eller drikkevand før indgivelse i dyrene. Flydende testkemikalier kan indgives direkte eller opløses før indgivelse. Til inhalationseksponering kan testkemikalier indgives som gas, damp eller en fast/flydende aerosol, afhængigt af deres fysisk-kemiske egenskaber. Der bør anvendes friske præparater af testkemikallet, medmindre stabilitetsdata påviser, at opbevaring er acceptabelt, og definerer hensigtsmæssige opbevaringsbetingelser.

Testbetingelser – opløsningsmiddel/bærestof

15. Opløsningsmidlet/bærestoffet må ikke have toksiske virkninger ved de benyttede doser og må ikke kunne reagere kemisk med testkemikallet. Hvis der anvendes andre opløsningsmidler/bærestoffer end de velkendte, bør deres anvendelse understøttes af referencedata om deres kompatibilitet. Det anbefales så vidt muligt først at overveje at anvende vandige opløsningsmidler/bærestoffer. Eksempler på almindeligt anvendte kompatible opløsningsmidler/bærestoffer omfatter vand, fysiologisk saltopløsning, methylcelluloseopløsning, saltopløsning af carboxymethylcellulosenatrium, olivenolie og majsolie. Hvis ikke der foreligger historiske eller offentliggjorte kontroldata, der viser, at et valgt atypisk opløsningsmiddel/bærestof ikke frembringer strukturelle kromosomaberrationer eller andre skadelige virkninger, bør der foretages en indledende undersøgelse for at fastslå, om kontrollen med opløsningsmiddel/bærestof kan accepteres.

Positive kontroller

16. Der bør altid benyttes dyr til sideløbende positiv kontrol, medmindre laboratoriet har påvist, at det er kompetent til at udføre testen og på det seneste har anvendt testen rutinemæssigt (f.eks.

inden for de sidste fem år). Såfremt der ikke indgår en sideløbende positiv kontrolgruppe, bør hvert enkelt forsøg omfatte scoringskontroller (fikserede og ufarvede objektglas). Disse kan opnås ved i scoringen af undersøgelsen at inkludere passende referenceprøver, som er hentet og opbevaret fra et særskilt positivt og periodisk udført kontrolforsøg (f.eks. hver 6.-18. måned) i det laboratorium, hvor testen udføres, f.eks. under kompetencetest og derefter regelmæssigt, hvor det er nødvendigt.

17. Positive kontrolstoffer bør frembringe en påviselig forøgelse af frekvensen af celler med strukturelle kromosomaberrationer over det spontane niveau. Der bør vælges sådanne doser i de positive kontroller, at virkningerne er tydelige, uden dog at de kodede prøvers identitet umiddelbart afsløres for den, der bedømmer dem. Eksempler på positive kontrolstoffer findes i tabel 1.

Tabel 1: Eksempler på positive kontrolstoffer:

Stoffer [CAS-nr.] (referencenr.)
Cyclophosphamidmonohydrat [CAS-nr. 50-18-0 (CAS-nr. 6055-19-2)] (9)
Cyclohexylamin [CAS-nr. 108-91-8] (7)
Mitomycin C [CAS-nr. 50-07-7] (6)
Monomer acrylamid [CAS 79-06-1] (10)
Triethylenmelamin [CAS 51-18-3] (8)

Negative kontroller

18. Der bør ved hver prøvetagning indgå negative kontroldyr, som kun behandles med opløsningsmiddel eller bærestof og ellers behandles på samme måde som behandlingsgrupperne. Hvis ikke der foreligger historiske eller offentliggjorte kontrolldata, som viser, at det valgte opløsningsmiddel/bærestof ikke medfører kromosomaberrationer eller andre skadelige virkninger, bør der også indgå ubehandlede kontroldyr i hver prøvetagning for at fastslå, at kontrollen med bærestof kan accepteres.

FREMGANGSMÅDE

Antal dyr

19. Gruppernes størrelse ved undersøgelsens start bør fastlægges for at få mindst fem hanner pr. gruppe. Dette antal dyr pr. gruppe anses for at være tilstrækkeligt til at sikre passende statistisk styrke (generelt mulighed for påvisning af mindst en fordobling af frekvensen af kromosomaberrationer, når det negative kontrolniveau er på 1,0 % eller derover med 80 % sandsynlighed ved et signifikansniveau på 0,05) (3) (11). Vejledende vil en undersøgelse med to prøvetagningstidspunkter og tre dosisgrupper og en sideløbende negativ kontrolgruppe samt en positiv kontrolgruppe (som hver består af fem dyr) typisk højst kræve 45 dyr.

Behandlingsplan

20. Testkemikalier indgives normalt som enkeltdosis (dvs. som en enkelt behandling), men kan indgives efter andre doseringsskemaer, forudsat at de er sagligt begrundet.
21. I gruppen med højeste dosis udtages der prøver to gange efter behandling. Da det optimale tidspunkt for påvisning af kromosomaberrationer kan afhænge af, hvor lang tid der er påkrævet for optagelse og metabolisme af testkemikaliets, og af testkemikaliets indvirkning på cellecyklussens kinetik, udtages der en tidlig prøve og en sen prøve ca. 24 og 48 timer efter behandling. For andre doser end den højeste dosis bør der udtages en tidlig prøve 24 timer efter behandling (mindre end eller lig med cyklustiden for B-spermatogonier for at optimere sandsynligheden for at score de første metafaser efter behandling), medmindre et andet prøvetagningstidspunkt er kendt som værende bedre egnet og mere berettiget.
22. Der kan udtages prøver på andre tidspunkter. For kemikalier, der kan have S-uaafhængige virkninger, kan tidligere prøvetagning (dvs. inden 24 timer) f.eks. være hensigtsmæssigt.
23. Der kan benyttes en behandlingsplan med gentagne doser, f.eks. sammen med en test vedrørende et andet endepunkt, hvor der anvendes en 28-dages indgivelsesperiode (f.eks. TM B.58). Der skal dog anvendes yderligere grupper af dyr for at tilgodese de forskellige prøvetagningstidspunkter. Egnetheden af sådanne planer skal tilsvarende begrundes sagligt i hvert enkelt tilfælde.
24. Inden aflivning gives dyrene en intraperitoneal injektion med en passende dosis metafasestandsende stof (f.eks. Colcemid[®] eller colchicin). Der udtages prøver af forsøgsdyrene efter et passende tidsrum. For mus og rotter er dette tidsrum ca. 3-5 timer.

Dosisniveauer

25. Hvis der gennemføres en forundersøgelse til bestemmelse af dosisinterval, fordi der ikke foreligger egnede data, der kan bruges til at vælge dosis, bør den udføres i samme laboratorium med samme art, stamme og behandlingsmåde, som agtes benyttet i hovedundersøgelsen, i henhold til anbefalingerne om gennemførelse af undersøgelser til bestemmelse af dosisinterval (12). Formålet med undersøgelsen bør være at identificere den maksimalt tolererede dosis (MTD) defineret som den dosis, der medfører lette toksiske virkninger i forhold til undersøgelsesperiodens varighed (f.eks. unormal adfærd eller unormale reaktioner, mindre fald i kropsvægt eller cytotoxisk effekt i det hæmatopoietiske system), men ikke død eller tegn på smerte eller lidelse, der kræver, at dyrene aflives (13).
26. Højeste dosis kan også defineres som en dosis, der i nogen grad fremkalder tegn på toksicitet i spermatogonier (f.eks. et lavere forhold mellem spermatogonmitoser og første og anden meiotiske metafase). Dette lavere forhold må ikke overstige 50 %.

27. Testkemikalier med specifik biologisk aktivitet ved lav ikke-toksisk dosis (f.eks. hormoner og mitogener) og kemikalier, der udviser mætning af toksikokinetiske egenskaber, kan være undtagelser fra dosisfastsættelseskriterierne og bør evalueres individuelt.
28. For at opnå dosis/respons-oplysninger bør en fuldstændig undersøgelse omfatte en negativ kontrolgruppe (punkt 18) og mindst tre dosisniveauer generelt adskilt af en faktor på 2, men ikke over 4. Hvis ikke testkemikaliets frembringer toksicitet i en forundersøgelse eller baseret på eksisterende data, bør den højeste dosis for en enkelt indgivelse være 2 000 mg/kg kropsvægt. Hvis testkemikaliets frembringer toksicitet, bør MTD imidlertid være den højeste indgivne dosis, og de anvendte dosisniveauer bør fortrinsvis dække et interval fra den højeste dosis til en dosis, der frembringer ringe eller ingen toksicitet. Når der observeres toksicitet i målvævet (dvs. testiklen) på alle de testede dosisniveauer, tilrådes det at foretage yderligere undersøgelser ved ikke-toksiske doser. Undersøgelser, der skal give en mere fuldstændig karakteristik af de kvantitative dosis/respons-oplysninger, kan kræve yderligere dosisgrupper. For visse typer testkemikalier (f.eks. humanlægemidler), som er omfattet af særlige krav, kan disse grænser variere. Hvis testkemikaliets frembringer toksicitet, bør grænsedosis plus to lavere doser (som beskrevet ovenfor) vælges. Grænsedosis for en indgivelsesperiode på 14 dage eller derover er 1 000 mg/kg kropsvægt/dag, og for indgivelsesperioder på under 14 dage er grænsedosis 2 000 mg/kg kropsvægt/dag.

Indgivelse af doser

29. Den forventede indgivelsesmåde for mennesker bør tages i betragtning i forbindelse med udformningen af et assay. Andre indgivelsesmåder såsom foder, drikkevand, topisk, subkutan, intravenøst, oralt (med sonde), inhalation eller implantation kan vælges, hvis de kan begrundes. Under alle omstændigheder bør der vælges en indgivelsesmåde, som sikrer tilstrækkelig eksponering af målvævet. Intraperitoneal injektion anbefales normalt ikke, medmindre det er sagligt begrundet, da det normalt ikke er en fysiologisk relevant måde for human eksponering. Hvis testkemikaliets iblandes foder eller drikkevand, navnlig i forbindelse med enkeltdosering, bør det sikres, at tidsrummet mellem indtagelse af foder og drikkevand og prøvetagning er tilstrækkelig stort til, at virkningerne kan påvises (jf. punkt 33). Hvor stor en væskemængde, der kan indgives ad gangen med sonde eller ved injektion, afhænger af forsøgsdyrenes størrelse. Denne mængde må normalt højst være 1 ml/100 g kropsvægt, bortset fra vandige opløsninger, hvor der højst må anvendes 2 ml/100 g kropsvægt. Anvendelse af større mængder (hvis dette er tilladt ifølge lovgivningen om dyrevelfærd) bør begrundes. Testmængden bør variere så lidt som muligt, idet koncentrationen justeres, så indgivelsen sker ved samme mængde i forhold til kropsvægt ved alle dosisniveauer.

Observationer

30. Der bør foretages generelle kliniske observationer af forsøgsdyrene, og de kliniske tegn bør registreres mindst en gang om dagen, fortrinsvis på samme tidspunkt(er) hver dag og under hensyntagen til det tidspunkt, hvor de forventede virkninger efter dosering topes. Alle dyr observeres mindst to gange dagligt for morbiditet og dødelighed. Alle dyr bør vejes ved

undersøgelsens start og mindst en gang om ugen i undersøgelser med gentagne doser samt ved aflivning. Ved undersøgelser af mindst en uges varighed bør foderindtag måles mindst en gang ugentligt. Hvis testkemikaliet indgives via drikkevandet, bør vandindtaget måles ved hvert vandskift og mindst en gang ugentligt. Dyr, der udviser ikke-dødelig indikation for høj toksicitet, bør aflives før testperiodens udløb (13).

Præparering af kromosomer

31. Umiddelbart efter aflivning udtages der kønscellesuspensioner fra en eller begge testikler, som eksponeres for hyptonisk væske og fikseres ifølge etablerede protokoller (f.eks. (2) (14) (15)). Derefter stryges cellerne ud på objektglas og farves (16) (17). Alle objektglas bør kodes, så den, der bedømmer dem, ikke kender deres identitet.

Analyse

32. Der bør scores mindst 200 velpræparerede metafaser pr. dyr (3) (11). Hvis den historiske negative kontrolfrekvens er $< 1 \%$, bør der scores over 200 celler/dyr for at øge den statistiske styrke (3). Der bør anvendes farvningsmetoder, som gør det muligt at identificere centromeren.
33. Aberrationer af kromosom- og kromatidtypen bør registreres særskilt og klassificeres i undertyper (brud, udveksling). Gaps bør registreres, men ikke tages i betragtning ved bestemmelsen af, hvorvidt et kemikalie fremkalder væsentlige stigninger i forekomsten af celler med kromosomaberrationer. De procedurer, der anvendes i laboratoriet, bør sikre, at analyser af kromosomaberrationer udføres af veluddannede bedømmere. Da præpareringen af objektglas ofte medfører, at en del af metafasecellerne går i stykker, og kromosomerne dermed går tabt, bør scorede celler indeholde et antal centromerer på mindst $2n \pm 2$, hvor n er haploidtallet for kromosomer af den pågældende art.
34. Selv om testens formål er at påvise ændringer i kromosomstrukturen, er det vigtigt også at notere frekvensen af polyploide celler og celler med endofordoblede kromosomer, hvis dette konstateres (jf. punkt 44).

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

35. Data fra de enkelte dyr præsenteres i tabelform. For hvert dyr registreres antallet af celler med strukturelle kromosomaberrationer, og antallet af kromosomaberrationer pr. celle bedømmes. Aberrationer af kromatid- og kromosomtypen klassificeret efter undertyper (brud, udvekslinger) bør anføres særskilt med antal og frekvens for forsøgs- og kontrolgrupperne. Gaps registreres særskilt. Frekvensen for gaps anføres, men medtages generelt ikke i analysen af den samlede frekvens for strukturel kromosomaberration. Procentdelen af polyploidie og celler med endofordoblede kromosomer rapporteres, når den observeres.
36. Data om toksicitet og kliniske tegn bør anføres (jf. punkt 30).

Acceptkriterier

37. Følgende kriterier bestemmer, om en test kan accepteres:

- Den sideløbende negative kontrol er i overensstemmelse med offentliggjorte normer for historiske negative kontrolldata, som generelt forventes at være $> 0 \%$ og $\leq 1,5 \%$ celler med kromosomaberrationer, og laboratoriets historiske kontrolldata, hvis sådanne foreligger (jf. punkt 10 og 18).
- Sideløbende positive kontroller fremkalder responser, der er i overensstemmelse med offentliggjorte normer for historiske positive kontrolldata eller laboratoriets historiske positive kontrolldatabase, hvis en sådan foreligger, og medfører en statistisk signifikant stigning sammenlignet med den negative kontrol (jf. punkt 17 og 18).
- Et tilstrækkeligt antal celler og doser er blevet analyseret (jf. punkt 28 og 32).
- Kriterierne for valg af højeste dosis er i overensstemmelse med kriterierne i punkt 25 og 26.

38. Hvis der iagttages såvel mitose som meiose, bestemmes forholdet mellem spermatogonmitoser og første og anden meiotiske metafase som et mål for den cytotoxiske effekt på alle behandlede dyr og negative kontroldyr i en samlet prøve på 100 celler under deling for hvert dyr. Hvis der kun iagttages mitose, bestemmes mitoseindekset i mindst 1 000 celler for hvert dyr.

Vurdering og fortolkning af resultater

39. Mindst tre behandlede doseringsgrupper bør analyseres for at tilvejebringe tilstrækkelige data til dosis/respons-analyse.

40. Såfremt alle acceptkriterier er opfyldt, anses et testkemikalie for at være klart positivt, hvis:

- mindst en af testdoserne udviser en statistisk signifikant stigning sammenlignet med den sideløbende negative kontrol
- stigningen er dosisafhængig i mindst en udtaget prøve, og
- et eller flere af resultaterne ligger uden for det acceptable interval for negative kontrolldata eller fordelingen af laboratoriets historiske negative kontrolldata (f.eks. Poisson-baseret kontrolgrænse på 95 %), hvis disse foreligger.

Testkemikaliet anses derefter for at kunne fremkalde kromosomaberrationer i forsøgsdyrenes spermatogonier. Anbefalinger til de mest hensigtsmæssige statistiske metoder kan også findes i litteraturen (11) (18). I de anvendte statistiske test skal dyret betragtes som forsøgsenheden.

41. Såfremt alle acceptkriterier er opfyldt, anses et testkemikalie for at være klart negativt, hvis:

- ingen af testdoserne udviser en statistisk signifikant stigning sammenlignet med den sideløbende negative kontrol

- der ikke indtræder en dosisafhængig stigning ved en af forsøgsbetingelserne, og
- alle resultaterne ligger inden for det acceptable interval for negative kontrolldata eller laboratoriets historiske negative kontrolldata (f.eks. Poisson-baseret kontrolgrænse på 95 %), hvis disse foreligger.

Testkemikaliet anses derefter for ikke at kunne fremkalde kromosomaberrationer i forsøgsdyrenes spermatogonier. Anbefalinger til de mest hensigtsmæssige statistiske metoder kan også findes i litteraturen (11) (18). Et negativt resultat udelukker ikke, at kemikaliet kan fremkalde kromosomaberrationer på senere udviklingsstadier, som ikke indgår i undersøgelsen, eller genmutationer.

42. Der stilles ikke krav om verifikation af en klart positiv eller klart negativ respons.
43. Hvis responsen hverken er klart negativ eller klart positiv, og for at bidrage til at fastslå den biologiske relevans af et resultat (f.eks. en svag eller usikker stigning), bør dataene evalueres af eksperter, og/eller der bør foretages yderligere undersøgelser på baggrund af eksisterende forsøgsdata, herunder undersøgelse af, om det positive resultat ligger uden for det acceptable interval for negative kontrolldata eller laboratoriets historiske negative kontrolldata (19).
44. I sjældne tilfælde giver dataene selv efter yderligere undersøgelser ikke mulighed for at konkludere, om resultaterne er positive eller negative. Konklusionen er derfor, at testkemikalieresponsen er usikker.
45. En forøgelse af antallet af polyploide celler kan være tegn på, at testkemikaliet er i stand til at inhibere mitoseprocesser og fremkalde kromosomantalsaberrationer (20). En forøgelse af antallet af celler med endofordoblede kromosomer kan være tegn på, at testkemikaliet er i stand til at inhibere celleyklussens forløb (21) (22), hvilket er en anden måde at fremkalde kromosomantalsændringer på end ved inhibering af mitoseprocesser (jf. punkt 2). Forekomsten af polyploide celler og celler med endofordoblede kromosomer bør derfor registreres særskilt.

Testrapport

46. Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Resumé

Testkemikalie:

- oprindelse, batchnummer, sidste anvendelsesdato, hvis dette foreligger
- testkemikaliets stabilitet, hvis denne er kendt
- testkemikaliets opløselighed og stabilitet i opløsningsmidlet, hvis dette er kendt
- måling af pH-værdi, osmolalitet og bundfald i det dyrkningsmedium, som testkemikaliet blev tilsat, hvor det er relevant.

Stof med kun én bestanddel:

- fysisk udseende, vandopløselighed og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber
- kemisk identifikation, f.eks. IUPAC-navn eller CAS-navn, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel, renhed, kemisk identitet af urenheder, i det omfang det er relevant og praktisk muligt, osv.

Stof med flere bestanddele, UVCB-stoffer og blandinger:

- kendetegnet så vidt muligt ved kemisk identitet (jf. ovenfor), kvantitativ forekomst og bestanddelenes relevante fysisk-kemiske egenskaber.

Præparering af testkemikaliet:

- begrundelse for valg af bærestof
- testkemikaliets opløselighed og stabilitet i opløsningsmidlet/bærestoffet
- fastlæggelse af sammensætning af foder, drikkevand eller inhalationsformulering
- analytiske bestemmelser af formuleringer (f.eks. stabilitet, homogenitet og nominelle koncentrationer),
- når de foretages.

Forsøgsdyr:

- anvendt art/stamme og begrundelse herfor
- antal dyr og deres alder
- oprindelse, miljøbetingelser, foder mv.
- metode til entydig identifikation af dyr
- for kortvarige undersøgelser: de enkelte dyrs vægt ved testens begyndelse og afslutning. For undersøgelser af mere end en uges varighed: individuel kropsvægt under undersøgelsen og fødeindtagelse. Kropsvægtinterval, gennemsnit og standardafvigelse for hver enkelt gruppe bør medtages.

Testbetingelser:

- positive og negative kontroldata (bærestof/opløsningsmiddel)
- data fra en eventuel forundersøgelse til bestemmelse af dosisinterval
- begrundelse for valg af dosisniveau
- begrundelse for indgivelsesvej
- oplysninger om præparering af testkemikaliet
- oplysninger om indgivelse af testkemikaliet

- begrundelse for aflivningstidspunkter
- metoder til måling af dyretoksicitet, herunder om muligt histopatologiske eller hæmatologiske analyser samt frekvensen for observationer og vejning af dyrene
- metoder til kontrol af, at testkemikaliets er nået frem til målvævet eller det almindelige kredsløb, hvis der er opnået negative resultater
- faktisk dosis (mg/kg kropsvægt/dag) beregnet på baggrund af testkemikaliets koncentration i foder/drikkevand (ppm) og indtagelse, hvis relevant
- oplysninger om foder- og vandkvalitet
- detaljeret beskrivelse af behandlings- og prøvetagningsplaner samt begrundelser for valg
- aflivningsmetode
- analgesimetode (hvis anvendt)
- procedurer for isolering af væv
- det metafasestandsende kemikalies identitet og koncentration og behandlingens varighed
- metoder til præparering af objektglas
- kriterier for scoring af aberrationer
- antal analyserede celler pr. dyr
- kriterier for bedømmelse af undersøgelsen som positiv, negativ eller usikker.

Resultater:

- dyrenes tilstand før og i løbet af testperioden, herunder tegn på toksicitet
- krops- og organvægt ved aflivning (hvis der benyttes flere behandlinger, kropsvægt under behandlingerne)
- tegn på toksicitet
- mitoseindeks
- forhold mellem spermatogonmitoser og første og anden meiotiske metafase eller anden dokumentation for eksponering af målvævet
- antal aberrationer og type, anført særskilt for hvert dyr
- samlet antal aberrationer pr. gruppe med gennemsnit og standardafvigelser
- antal celler med aberrationer pr. gruppe med gennemsnit og standardafvigelser
- dosis/respons-forhold, hvor muligt
- anvendte statistiske analyser og metoder
- data for sideløbende negative kontroller

- historiske negative kontrolldata med intervaller, gennemsnit, standardafvigelser og konfidensinterval på 95 % (hvor det er muligt) eller offentliggjorte historiske negative kontrolldata, der anvendes til at bestemme, om testresultaterne kan accepteres
- data for sideløbende positive kontroller
- eventuelt observerede ploidændringer, herunder frekvensen for polyploide og/eller endofordoblede celler.

Diskussion af resultaterne

Konklusion

LITTERATUR

- (1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Paris.
- (2) Adler, I.-D. (1984). Cytogenetic Tests in Mammals. In: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. Ed. S. Venitt og J. M. Parry. IRL Press, Oxford, Washington DC, s. 275-306.
- (3) Adler I.-D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. og Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312, 313-318.
- (4) Russo, A. (2000). *In Vivo* Cytogenetics: Mammalian Germ Cells. Mutation Res., 455, 167-189.
- (5) Hess, R.A. og de Franca L.R. (2008). Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. In: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, Cheng C.Y. (Ed.) Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, s. 1-15.
- (6) Adler, I.-D. (1974). Comparative Cytogenetic Study after Treatment of Mouse Spermatogonia with Mitomycin C, Mutation. Res., 23(3): 368-379. Adler, I.D. (1986). Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications. In: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel C., Lambert B. og Magnusson J. (Eds.) Liss, New York, s. 477-484.
- (7) Cattanach, B.M., og Pollard C.E. (1971). Mutagenicity Tests with Cyclohexylamine in the Mouse, Mutation Res., 12, 472-474.
- (8) Cattanach, B.M., og Williams, C.E. (1971). A search for Chromosome Aberrations Induced in Mouse Spermatogonia by Chemical Mutagens, Mutation Res., 13, 371-375.
- (9) Rathenburg, R. (1975). Cytogenetic Effects of Cyclophosphamide on Mouse Spermatogonia, Humangenetik 29, 135-140.
- (10) Shiraishi, Y. (1978). Chromosome Aberrations Induced by Monomeric Acrylamide in Bone Marrow and Germ Cells of Mice, Mutation Res., 57(3): 313-324.
- (11) Adler I.-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. og Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, Mutation Res., 417, 19-30.

- (12) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. og Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. *Mutagenesis*, 7, 313-319.
- (13) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment, (No 19.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (14) Yamamoto, K. og Kikuchi, Y. (1978). A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes. *Mutation Res.*, 52, 207-209.
- (15) Hsu, T.C., Elder, F. og Pathak, S. (1979). Method for Improving the Yield of Spermatogonial and Meiotic Metaphases in Mammalian Testicular Preparations. *Environ. Mutagen.*, 1, 291-294.
- (16) Evans, E.P., Breckon, G., og Ford, C.E. (1964). An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 3, 289-294.
- (17) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. og Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetics Assays, In: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, s. 115-141.
- (18) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. og Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays In: D.J. Kirkland (Ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, s. 184-232.
- (19) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H.-J. og Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data. *Mutation Res.*, 723, 87-90.
- (20) Warr T.J., Parry E.M. og Parry J.M. (1993). A Comparison of Two *In Vitro* Mammalian Cell Cytogenetic Assays for the Detection of Mitotic Aneuploidy Using 10 Known or Suspected Aneugens, *Mutation Res.*, 287, 29-46.
- (21) Huang, Y., Change, C. og Trosko, J.E. (1983). Aphidicolin-Induced Endoreduplication in Chinese Hamster Cells. *Cancer Res.*, 43, 1362-1364.
- (22) Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese Hamster Cells during Alpha-Radiation Induced G2 Arrest. *Mutation Res.*, 119, 403-413.

Tillæg

DEFINITIONER

Aneuploidi: enhver afvigelse fra det normale diploide (eller haploide) kromosomtal for et eller flere kromosomer, men ikke for et eller flere komplette kromosomsæt (polyploidi).

Centromer: region(er) af et kromosom, hvortil tentrådene påhæftes under celledeling, således at datterkromosomerne kan bevæge sig korrekt i forhold til dattercellernes poler.

Kemikalie: et stof eller en blanding.

Kromosomdiversitet: kromosomformernes diversitet (f.eks. metacentrisk, akrocentrisk osv.) og størrelse.

Aberration af kromatidtypen: beskadigelse af kromosomstrukturen i form af brud på enkeltkromatider eller brud på og sammenføjning af kromatider.

Aberration af kromosomtypen: beskadigelse af kromosomstrukturen i form af brud på – eller brud på og sammenføjning af – begge kromatider på samme sted.

Klastogen: alle kemikalier, der forårsager strukturelle kromosomaberrationer i populationer af celler eller organismer.

Gap: en akromatisk beskadigelse, som er mindre end bredden af et kromatid, og hvor forskydningen af kromatiderne er minimal.

Genotoksisk: et generelt udtryk, der omfatter alle former for DNA- eller kromosombeskadigelse, herunder brud, deletioner, addukter, ændringer af nukleotider og koblinger, omlejringer, mutationer, kromosomaberrationer og aneuploidi. Det er ikke alle former for genotoksiske virkninger, der forårsager mutationer eller stabil kromosomskade.

Mitoseindeks (MI): forholdet mellem antallet af celler i metafase og det samlede antal celler i en population. Viser populationens formeringsgrad.

Mitose: deling af cellekernen, der normalt inddeles i profase, prometafase, metafase, anafase og telofase.

Mutagen: forårsager arvelige ændringer af DNA-baseparsekvens(er) i gener eller i kromosomstrukturen (kromosomaberrationer).

Antalsafvigelse: ændring af kromosomtallet i forhold til det for de pågældende dyr normale antal.

Polyploidi: et multiplum af det haploide kromosomtal (n), som ikke er det diploide tal (dvs. $3n$, $4n$ osv.).

Strukturel aberration: ændring i kromosomstrukturen, som kan iagttages ved mikroskopisk undersøgelse i celledelingens metafase i form af deletioner og fragmenter, udvekslinger.

Testkemikalie: alle stoffer eller blandinger, der testes ved hjælp af denne forsøgsmetode.

UVCB: kemiske stoffer af ukendt eller variabel sammensætning, komplekse reaktionsprodukter og biologiske materialer."

(5) Del B, kapitel B.40, affattes således:

"B.40 IN VITRO-HUDÆTSNING: FORSØGSMETODE TIL MÅLING AF TRANSKUTAN ELEKTRISK MODSTAND (TER)

INDLEDNING

1. Denne forsøgsmetode svarer til OECD's testvejledning (Test Guideline (TG)) 430 (2015). Hudætsning defineres som fremkomsten af irreversibel ødelæggelse af huden, der viser sig som en synlig nekrose gennem epidermis til dermis efter påføring af et testkemikalie [som defineret i De Forenede Nationers (FN's) globale harmoniserede system for klassificering og mærkning af kemikalier (GHS) (1) og Den Europæiske Unions (EU's) forordning 1272/2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger (CLP)¹]. Den opdaterede forsøgsmetode B.40 indeholder en in vitro-procedure, som gør det muligt at identificere ikke-ætsende og ætsende stoffer og blandinger i overensstemmelse med UN GHS (1) og CLP.
2. Vurderingen af hudætsning har typisk omfattet brug af laboratoriedyr (TM B.4, som svarer til OECD TG 404, der oprindeligt blev vedtaget i 1981 og revideret i 1992, 2002 og 2015) (2). Ud over nærværende TM B.40 er der blevet valideret og vedtaget andre in vitro-forsøgsmetoder til testning af kemikaliers hudætsningspotentiale som TM B.40.A (der svarer til OECD TG 431) (3) og TM B.65 (der svarer til OECD TG 435) (4), der også er i stand til at identificere underkategorier af ætsende kemikalier, når dette er nødvendigt. Der er blevet vedtaget flere validerede in vitro-forsøgsmetoder som TM B.46 (der svarer til OECD TG 439) (5), som kan anvendes til testning af hudirritation. Et vejledende dokument fra OECD om integrerede tilgange til testning og vurdering (IATA) vedrørende hudætsning og -irritation beskriver flere moduler, som grupperer informationskilder og analyseværktøjer, og vejleder i, i) hvordan eksisterende forsøgsdata og ikke-forsøgsdata integreres i og anvendes til vurdering af kemikaliers hudirritations- og hudætsningspotentiale, og ii) foreslår en tilgang, når der er behov for yderligere testning (6).
3. Denne forsøgsmetodes endepunkt for menneskers sundhed er hudætsning. Den er baseret på forsøgsmetoden til måling af den transkutane elektriske modstand (TER) i rottehud, hvor der anvendes hudlapper til identificering af ætsende stoffer ved deres evne til at beskadige stratum corneum og svække dets barrierefunktion. Den tilsvarende OECD-testvejledning blev

¹ Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1272/2008 af 16. december 2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger og om ændring og ophævelse af direktiv 67/548/EØF og 1999/45/EF og om ændring af forordning (EF) nr. 1907/2006 (EUT L 353 af 31.12.2008, s. 1).

oprindeligt vedtaget i 2004 og opdateret i 2015 for at referere til det vejledende IATA-dokument.

4. For at evaluere in vitro-testning af hudætsning i lovgivningsøjemed blev der gennemført prævalideringsundersøgelser (7) efterfulgt af en formel valideringsundersøgelse af TER-forsøgsmetoden med rottehud til vurdering af hudætsning (8) (9) (10) (11). På baggrund af resultatet af disse undersøgelser blev det henstillet, at TER-forsøgsmetoden (betegnet som den validerede referencemetode – VRM) blev anvendt til vurdering af in vivo-hudætsning i lovgivningsøjemed (12) (13) (14).
5. Inden der kan anvendes en foreslået lignende eller ændret in vitro-TER-forsøgsmetode end VRM'en til vurdering af hudætsning i lovgivningsøjemed, skal dens pålidelighed og relevans (nøjagtighed) og grænserne for dens påtænkte anvendelse bestemmes for at sikre, at den er sammenlignelig med VRM'en, i overensstemmelse med kravene om ydeevnestandarder (15). OECD-aftalen om gensidig anerkendelse af data vil først være garanteret, når en foreslået ny eller opdateret forsøgsmetode i henhold til ydeevnestandarderne er blevet gennemgået og medtaget i den tilsvarende OECD-testvejledning.

DEFINITIONER

6. De anvendte definitioner er forklaret i tillægget.

INDLEDENDE OVERVEJELSER

7. I henhold til en valideringsundersøgelse (10) og andre offentliggjorte undersøgelser (16) (17) kan forsøgsmetoden vedrørende måling af TER i rottehud skelne mellem stoffer, der er hudætsende, og stoffer, der ikke er hudætsende, med en overordnet følsomhed på 94 % (51/54) og specificitet på 71 % (48/68) for en database med 122 stoffer.
8. Denne forsøgsmetode vedrører in vitro-test af hudætsning. Den gør det muligt at identificere ikke-ætsende og ætsende testkemikalier i henhold til UN GHS/CLP. Som det fremgår af valideringsundersøgelserne (8) (9) (10) (11), er denne forsøgsmetode begrænset derved, at den ikke gør det muligt at inddele de ætsende stoffer og blandinger i underkategorier i henhold til UN GHS/CLP. Den gældende lovramme afgør, hvordan denne forsøgsmetode anvendes. Forsøgsmetoden giver ikke fyldestgørende oplysninger om hudirritation, men det skal bemærkes, at TM B.46 specifikt vedrører in vitro-test af hudirritation (5). For fuldt ud at kunne vurdere de lokale virkninger på huden efter en enkelt dermal eksponering bør OECD's vejledende dokument om IATA følges (6).
9. Der er blevet testet en lang række forskellige kemikalier, som primært repræsenterer stoffer, i forbindelse med valideringen af denne forsøgsmetode, og den empiriske database for valideringsundersøgelsen omfatter 60 kemikalier i alt, som dækker en lang række kemiske grupper (8) (9). På baggrund af alle tilgængelige data kan forsøgsmetoden anvendes på en lang

række kemiske grupper og fysiske tilstande, herunder væsker, halvfaste stoffer, faste stoffer og voks. Da det ikke altid er muligt at få fat i testemner med egnede referencedata i specifikke fysiske tilstande, skal det bemærkes, at et forholdsvis lille antal vokser og ætsende stoffer i fast form er blevet vurderet under valideringen. Væsker kan være vandige eller ikke-vandige, og faste stoffer kan være opløselige eller uopløselige i vand. I de tilfælde, hvor det kan påvises, at forsøgsmetoden ikke er egnet til en specifik kategori af stoffer, bør forsøgsmetoden ikke anvendes til forsøg med denne specifikke kategori af stoffer. Eftersom forsøgsmetoden kan anvendes på stoffer, forventes den desuden at kunne anvendes på blandinger. Da blandinger imidlertid omfatter et vidt spektrum af kategorier og sammensætninger, og da der for øjeblikket kun foreligger begrænsede oplysninger om testning af blandinger, bør forsøgsmetoden i de tilfælde, hvor det kan påvises, at den ikke er egnet til en specifik kategori af blandinger (f.eks. efter en strategi som fremsat af Eskes et al., 2012) (18), ikke anvendes til forsøg med denne specifikke kategori af blandinger. Før forsøgsmetoden bruges på en blanding for at generere data i lovgivningsøjemed, bør det overvejes, om den vil give resultater, som er egnede til formålet, og i givet fald hvorfor. Sådanne overvejelser er ikke nødvendige, når der foreligger et myndighedskrav om test af blandingen. Gasser og aerosoler er endnu ikke vurderet ved en valideringsundersøgelse (8) (9). Selv om det er tænkeligt, at disse kan testes ved hjælp af TER-forsøgsmetoden, muliggør den nuværende forsøgsmetode ikke test af gasser og aerosoler.

PRINCIP FOR TESTEN

10. Testkemikaliet påføres i op til 24 timer på den epidermale overflade af hudlapper i et testsystem med to rum, hvor hudlapperne fungerer som adskillelse mellem de to rum. Hudlapperne tages fra 28-30 dage gamle rotter, der er aflivet på en human måde. Ætsende kemikalier identificeres ved deres evne til at beskadige stratum corneum og svække dets barrierefunktion, hvilket kan måles som et fald i den naturlige TER under en tærskelværdi (16) (jf. punkt 32). For TER i rottehud er der valgt en tærskelværdi på 5 k Ω på baggrund af omfattende data om en lang række stoffer, hvor langt de fleste værdier var enten langt over (ofte > 10 k Ω) eller langt under (ofte < 3 k Ω) denne værdi (16). Testkemikalier, som ikke er ætsende hos dyr, men som er irriterende eller ikke-irriterende, medfører generelt ikke en TER under denne tærskelværdi. Brugen af andre hudpræparater eller andet udstyr kan endvidere ændre tærskelværdien og nødvendiggøre yderligere validering.
11. Testproceduren omfatter et farvebindingstrin til bekræftende testning af positive resultater i TER-metoden, herunder værdier omkring 5 k Ω . Farvebindingstrinnet viser, om stigningen i gennemtrængeligheden for ioner skyldes fysisk ødelæggelse af stratum corneum. TER-metoden med rottehud har vist sig at kunne forudsige in vivo-ætsningen hos kaniner vurderet i henhold til TM B.4 (2).

PÅVISNING AF KOMPETENCE

12. Inden laboratorierne påbegynder rutinemæssig brug af TER-forsøgsmetoden med rottehud, som er i overensstemmelse med denne forsøgsmetode, bør de påvise deres tekniske kompetence ved korrekt klassificering af de 12 anbefalede kompetencestoffer i tabel 1. I situationer, hvor et stof på listen ikke kan fås, eller hvor det er berettiget, kan et andet stof anvendes, hvis der foreligger tilstrækkelige in vivo- og in vitro-referencedata herfor (f.eks. fra listen over referencekemikalier (16)), forudsat at der benyttes de samme udvælgelseskriterier som beskrevet i tabel 1.

Tabel 1: Liste over kompetencestoffer¹

Stof	CAS RN	Kemisk gruppe ²	UN GHS- /CLP- kat. baseret på in vivo- resultater ³	VRM- kat. baseret på in vitro- resultater	Fysisk tilstand	pH ⁴
In vivo – ætsende stoffer						
N,N'-dimethyl dipropylentriamin	10563-29-8	organisk base	1A	6 x C	Flyd.	8,3
1,2-diaminopropan	78-90-0	organisk base	1A	6 x C	Flyd.	8,3
Svovlsyre (10 %)	7664-93-9	uorganisk syre	(1A/)1B/1C	5 x C 1 x NC	Flyd.	1,2
Kaliumhydroxid (10 % aq.)	1310-58-3	uorganisk base	(1A/)1B/1C	6 x C	Flyd.	13,2
Octansyre (kaprilsyre)	124-07-2	organisk syre	1B/1C	4 x C 2 x NC	Flyd.	3,6
2-tert-butylphenol	88-18-6	phenol	1B/1C	4 x C 2 x NC	Flyd.	3,9
In vivo – ikke-ætsende stoffer						
Isostearinsyre	2724-58-5	organisk syre	NC	6 x NC	Flyd.	3,6
4-amino-1,2,4-triazol	584-13-4	organisk base	NC	6 x NC	Fast	5,5
Phenethylbromid	103-63-9	elektrofil	NC	6 x NC	Flyd.	3,6
4-(methylthio)- benzaldehyd	3446-89-7	elektrofil	NC	6 x NC	Flyd.	6,8
1,9-decadien	1647-16-1	neutralt organisk	NC	6 x NC	Flyd.	3,9
Tetrachlorethylen	127-18-4	neutralt organisk	NC	6 x NC	Flyd.	4,5

Forkortelser: aq. = vandig; CAS RN = registernummer i Chemical Abstracts Service; VRM = valideret referencemetode; ND = ikke fastlagt.

¹Kompetencestofferne, der først er sorteret efter deres ætsende versus ikke-ætsende egenskaber, dernæst efter deres underkategori for ætsende stoffer og endelig efter deres kemiske gruppe, er udvalgt blandt de stoffer, der blev anvendt i ECVAM-valideringsundersøgelsen af TER-forsøgsmetoden med rottehud (8) (9). Medmindre andet er angivet, er stofferne testet ved det renhedsniveau, de havde, da de blev købt (8). De udvalgte stoffer omfatter så vidt muligt stoffer, der: i) er repræsentative for det responsinterval for ætsende virkning (f.eks. ikke-ætsende, svagt til kraftigt ætsende), som VRM'en er i stand til at måle eller forudsige, ii) er repræsentative for de kemiske grupper, der blev

anvendt i valideringsundersøgelsen, iii) afspejler ydeevnekarakteristikaene for VRM'en, iv) har veldefinerede kemiske strukturer, v) giver definitive resultater i in vivo-referenceforsøgsmetoden, vi) findes i handelen og vii) ikke er forbundet med uoverkommelige bortskaffelsesomkostninger.

²Kemisk gruppe, jf. Barratt et al. (8).

³De tilsvarende UN-emballagegrupper er henholdsvis I, II og III for UN GHS-/CLP-kategori 1A, 1B og 1C.

⁴pH-værdierne stammer fra Fentem et al. (9) og Barratt et al. (8).

FREMGANGSMÅDE

13. Der findes standardprocedurer (SOP'er) for TER-forsøgsmetoden til testning for hudætsning med rottehud (19). De TER-forsøgsmetoder med rottehud, der er omfattet af denne forsøgsmetode, bør overholde følgende betingelser:

Dyr

14. Der bør anvendes rotter, fordi deres huds følsomhed over for stoffer med denne forsøgsmetode tidligere er påvist (12), og fordi de er den eneste kilde til hud, der er formelt valideret (8) (9). Rottens alder (når hudprøven tages) og stamme er særligt vigtig for at sikre, at hårfolliklerne er i hvile, inden væksten af voksenhår begynder.
15. Hårene på ryggen og flanken af unge (ca. 22 dage gamle) han- eller hunrotter (af Wistar-stammen eller lignende stamme) fjernes omhyggeligt med en lille dyresaks. Dyrene vaskes dernæst omhyggeligt, idet der gnubbes let, og det pågældende hudområde holdes neddyppet i en opløsning af antibiotika, som f.eks. indeholder streptomycin, penicillin, chloramphenicol og amphotericin i koncentrationer, der er høje nok til at inhibere bakterievækst. Dyrene vaskes igen med antibiotika på tredje- eller fjerdedagen efter den første vask og skal anvendes senest tre dage efter den anden vask, når stratum corneum har regenereret sig efter fjernelsen af hår.

Fremstilling af hudlapper

16. Dyrene aflives på human måde, når de er 28-30 dage gamle. Alderen er kritisk. Ryghuden fjernes fra hvert dyr, og overflødigt fedtvæv fjernes omhyggeligt, idet det skrælles af huden. Hudlapper med en diameter på ca. 20 mm udtages. Huden kan gemmes, indtil lapperne skal anvendes, hvis det er påvist, at positive og negative kontroldata svarer til de data, der opnås med frisk hud.
17. Hver hudlap anbringes for enden af et rør af PTFE (polytetrafluorethylen), idet det sikres, at den epidermale overflade er i kontakt med røret. En O-ring af gummi sættes tætsluttende omkring rørets ende for at holde huden på plads, og overflødigt væv klippes af. O-ringen af gummi forsegles derefter omhyggeligt til enden af PTFE-røret med vaseline. Røret fastholdes ved hjælp af fjederklemmer i et receptorkammer, som indeholder en MgSO_4 -opløsning (154 mM) (figur 1). Hudlappen skal være fuldstændigt dækket af MgSO_4 -opløsningen. Der kan fremstilles op til 10-15 hudlapper af huden fra en enkelt rotte. Rørets og O-ringens dimensioner fremgår af figur 2.

18. Inden testen indledes, måles TER i to hudlapper for at kontrollere den enkelte dyrehuds kvalitet. For begge hudlapper skal den elektriske modstand være større end 10 k Ω , hvis resten af lapperne skal kunne anvendes i forsøgsmetoden. Hvis modstanden er mindre end 10 k Ω , kasseres resten af lapperne fra den pågældende hud.

Påføring af testkemikalier og kontrolstoffer

19. Der bør anvendes sideløbende positive og negative kontroller i hver analyseserie (hvert forsøg) for at sikre, at forsøgsmodellen fungerer korrekt. Der skal anvendes hudlapper fra et enkelt dyr i hver analyseserie (hvert forsøg). Som testkemikalier til de positive og negative kontroller foreslås henholdsvis 10 M saltsyre og destilleret vand.
20. Flydende testkemikalier (150 μ l) påføres på den epidermale overflade inde i røret. Ved faste teststoffer skal en tilstrækkelig mængde stof påføres hudlappen, så hele epidermisoverfladen er dækket af stoffet. Der tilsættes deioniseret vand (150 μ l) oven på det faste stof, og røret rystes forsigtigt. For at sikre maksimal kontakt med huden kan det være nødvendigt at opvarme visse faste stoffer til 30 °C, så de smelter eller blødgøres, eller formale dem til granulat eller pulver.
21. Der bruges tre hudlapper til hvert test- og kontrolkemikalie i hver analyseserie (hvert forsøg). Testkemikalierne skal sidde på huden i 24 timer ved 20-23 °C. Testkemikaliets fjernes under rindende ledningsvand, der højst må have stuetemperatur, indtil der ikke kan fjernes mere af stoffet.

TER-målinger

22. Hudens impedans måles som TER ved hjælp af en wheatstone-lavvoltagevekselstrømsmålebro (18). De generelle specifikationer for broen er en driftsspænding på 1-3 V, en sinusformet eller rektangulært formet vekselstrøm på 50-1 000 Hz og et måleområde på mindst 0,1-30 k Ω . Den målebro, der anvendes i valideringsundersøgelsen, målte induktans, kapacitet og modstand op til værdier på henholdsvis 2 000 H, 2 000 μ F og 2 M Ω ved frekvenser på 100 Hz eller 1 kHz ved hjælp af serieværdier eller parallelle værdier. I forbindelse med TER-ætsningsassayet registreres målingerne af modstand ved en frekvens på 100 Hz og ved hjælp af serieværdier. Før den elektriske modstand måles, reduceres hudens overfladespænding ved tilsætning af 70 % ethanol i så tilstrækkelig mængde, at hele epidermis dækkes. Efter nogle få sekunder fjernes ethanol fra røret, og vævet fugtes ved tilsætning af 3 ml MgSO₄-opløsning (154 mM). Elektroderne fra målebroen anbringes på hver sin side af hudlappen for at måle modstanden i k Ω /hudlap (figur 1). Elektrodedimensioner og længden af elektroderne under krokodillenæbbene ses i figur 2. Krokodillenæbbet på den indre elektrode hviler på toppen af PTFE-røret under modstandsmålingen, hvorved det sikres, at et konstant stykke af elektroden er nede i MgSO₄-opløsningen. Den ydre elektrode er anbragt inde i receptorkammeret, så den rører ved kammerbunden. Afstanden mellem fjederklemmen og bunden af PTFE-røret skal holdes konstant (figur 2), da den har indflydelse på den målte modstand. Det betyder, at

afstanden mellem den indre elektrode og hudlappen skal være konstant og så lille som mulig (1-2 mm).

23. Hvis den målte modstand er større end 20 k Ω , kan det skyldes, at rester af testkemikaliet ligger som en belægning på hudlappens epidermale overflade. Man kan forsøge at fjerne denne belægning ved at holde en tommelfinger iført en gummitut for PTFE-røret og ryste røret i ca. 10 sekunder. Derefter kasseres MgSO₄-opløsningen, og målingen gentages med en ny MgSO₄-opløsning.
24. Testapparaturets egenskaber og dimensioner og den anvendte forsøgsprocedure kan have indflydelse på de opnåede TER-værdier. Tærskelværdien for ætsning, 5 k Ω , blev bestemt med det apparatur og den procedure, der er beskrevet i denne forsøgsmetode. Hvis testbetingelserne ændres, eller der anvendes andet apparatur, kan der blive tale om andre tærskel- og kontrolværdier. Det anbefales derfor, at metoden og tærskelværdierne for modstand kalibreres ved at teste en række kompetencestoffer, der vælges blandt de stoffer, som blev anvendt i valideringsundersøgelsen (8) (9), eller blandt kemiske grupper, der svarer til de undersøgte stoffer. Tabel 1 viser et sæt relevante kompetencestoffer.

Farvebindingsmetoder

25. Eksponering for visse ikke-ætsende stoffer kan bevirke, at modstanden falder til under tærskelværdien på 5 k Ω , hvorved ioner kan passere gennem stratum corneum, hvilket sænker den elektriske modstand (9). Neutrale organiske stoffer og stoffer med overfladeaktive egenskaber (herunder rengøringsmidler, emulgatorer og andre overfladeaktive stoffer) kan fjerne hudfedt og gøre barrieren gennemtrængelig for ioner. Hvis TER-værdierne for disse kemikalier er mindre end eller omkring 5 k Ω , og der ikke forekommer synlige ødelæggelser af hudlapperne, skal farvestoffets evne til at trænge ned i kontrolvævet og det behandlede væv vurderes med henblik på at afgøre, om de opnåede TER-værdier skyldes øget hudgennemtrængelighed eller hudætsning (7) (9). I sidstnævnte tilfælde, hvor stratum corneum er ødelagt, trænger farvestoffet sulforhodamin B efter påføring på hudoverfladen hurtigt ned og farver det underliggende væv. Netop dette farvestof er stabilt i forbindelse med en lang række stoffer og påvirkes ikke af den ekstraktionsprocedure, der er beskrevet i det følgende.

Påføring og fjernelse af farvestoffet sulforhodamin B

26. Efter TER-undersøgelsen fjernes magnesiumsulphatopløsningen fra røret, og huden undersøges omhyggeligt for synlige ødelæggelser. Hvis ikke der forekommer større synlig ødelæggelse (f.eks. perforation), påføres 150 μ l af en 10 % (w/v)-opløsning af sulforhodamin B (Acid Red 52; C.I. 45100; CAS-nummer 3520-42-1) i destilleret vand på den epidermale overflade af hver hudlap i to timer. Disse hudlapper vaskes derefter i ca. 10 sekunder med ledningsvand, der ikke er varmere end stuetemperatur, for at fjerne overskydende/ikke-bundet farvestof. Hver hudlap fjernes omhyggeligt fra PTFE-røret og anbringes i et glas (f.eks. et 20 ml-glas til scintillationsmålinger) indeholdende deioniseret vand (8 ml). Glasset rystes forsigtigt i fem minutter for at fjerne yderligere ikke-bundet farvestof. Denne skylning gentages, hvorefter

hudlapperne fjernes og anbringes i glas, der indeholder 5 ml af en 30 % (w/v)-opløsning af natriumdodecylsulphat (SDS) i destilleret vand. Glassene inkuberes ved 60 °C til næste dag.

27. Efter inkubationen fjernes og kasseres hudlapperne, og den tilbageværende opløsning centrifugeres i otte minutter ved 21 °C (relativ centrifugalkraft $\sim 175 \times g$). 1 ml af supernatanten fortyndes 5 gange (v/v) [dvs. 1 ml + 4 ml] med en 30 % (w/v) SDS-opløsning i destilleret vand. Opløsningens optiske tæthed (OD) måles ved 565 nm.

Beregning af farveindhold

28. Mængden af sulforhodamin B pr. hudlap beregnes ud fra OD-værdierne (9) (sulforhodamin B's molære ekstinktionskoefficient ved 565 nm = $8,7 \times 10^4$; molekylvægten = 580). Farveindholdet bestemmes for hver hudlap ved hjælp af en passende kalibreringskurve, hvorefter et gennemsnitligt farveindhold beregnes for replikaterne.

Acceptkriterier

29. De gennemsnitlige TER-resultater godkendes, hvis værdierne for de sideløbende positive og negative kontroller falder inden for de acceptable intervaller for metoden i testlaboratoriet. De acceptable modstandsintervaller for den metode og det apparatur, der er beskrevet ovenfor, er anført i nedenstående tabel:

Kontrol	Stof	Modstandsinterval (k Ω)
Positiv	10 M saltsyre	0,5-1,0
Negativ	Destilleret vand	10-25

30. De gennemsnitlige resultater for farvebinding godkendes, hvis værdierne for de sideløbende kontroller falder inden for de acceptable intervaller for metoden. De foreslåede acceptable intervaller for farveindhold for de kontrolstoffer, den metode og det apparatur, der er beskrevet ovenfor, er anført i nedenstående tabel:

Kontrol	Stof	Interval af farveindhold ($\mu\text{g/hudlap}$)
Positiv	10 M saltsyre	40-100
Negativ	Destilleret vand	15-35

Fortolkning af resultater

31. Den TER-tærskelværdi, hvorved der skelnes mellem ætsende og ikke-ætsende testkemikalier, blev opstillet under forsøgsmetodeoptimeringen, testet forud for validering og bekræftet i en formel valideringsundersøgelse.
32. Forudsigelsesmodellen for TER-forsøgsmetoden til testning for hudætsning med rottehud (9) (19), der hidrører fra UN GHS-/CLP-klassificeringssystemet, vises nedenfor:

Testkemikaliets betragtes ikke som værende hudætsende:

- i) hvis den gennemsnitlige TER-værdi for testkemikaliet er større end ($>$) 5 k Ω , eller
- ii) hvis den gennemsnitlige TER-værdi for testkemikaliet er mindre end eller lig med ($\leq$) 5 k Ω , og
- hudlappen ikke udviser synlig ødelæggelse (f.eks. perforation), og
- det gennemsnitlige farveindhold er mindre end ($<$) det gennemsnitlige farveindhold, der samtidig er målt i den positive kontrol på 10 M HCl (jf. punkt 30 vedrørende positive kontrolværdier).

Testkemikaliet betragtes som værende hudætsende:

- i) hvis den gennemsnitlige TER-værdi for testkemikaliet er mindre end eller lig med ($\leq$) 5 k Ω , og hudlappen er synligt beskadiget (f.eks. perforation), eller
 - ii) hvis den gennemsnitlige TER-værdi for testkemikaliet er mindre end eller lig med ($\leq$) 5 k Ω , og
 - hudlappen ikke udviser synlig ødelæggelse (f.eks. perforation), men
 - det gennemsnitlige farveindhold er større end eller lig med ($\geq$) det gennemsnitlige farveindhold, der samtidig er målt i den positive kontrol på 10 M HCl (jf. punkt 30 vedrørende positive kontrolværdier).
33. En analyseserie (et forsøg) bestående af mindst tre hudlapsreplikater bør være tilstrækkelig for et testkemikalie, når klassificeringen er entydig. I tilfælde af tvetydige resultater, såsom diskordante replikatmålinger og/eller en gennemsnitlig TER på $5 \pm 0,5$ k Ω , bør det overvejes at gennemføre en anden uafhængig analyseserie (et andet forsøg) samt en tredje, hvis resultaterne af de første to analyseserier (forsøg) er diskordante.

DATA OG RAPPORTERING

Data

34. De målte resultater for modstand (k Ω) og eventuelt farveindhold (μ g/hudlap) i testkemikaliet og i positive og negative kontroller bør fremlægges i tabelform, herunder også data fra de enkelte hudlapsreplikater i hver analyseserie (hvert forsøg) og gennemsnitsværdier $\pm$ standardafvigelser. Alle gentagne forsøg bør rapporteres. Iagttagne ødelæggelser af hudlapperne bør rapporteres for hvert testkemikalie.

Testrapport

35. Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie og kontrolstoffer:

- Stof med kun én bestanddel: kemisk identifikation, f.eks. IUPAC-navn eller CAS-navn, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel, renhed, kemisk identitet af urenheder, i det omfang det er relevant og praktisk muligt, osv.

- Stof med flere bestanddele, UVCB-stoffer og blandinger: så vidt muligt kendetegnet ved kemisk identitet (jf. ovenfor), kvantitativ forekomst og bestanddelenes relevante fysisk-kemiske egenskaber
- fysisk udseende, vandopløselighed og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber
- oprindelse, evt. batchnummer
- behandling af testkemikaliets/kontrolstoffet inden testning, hvis det er relevant (f.eks. opvarmning, formaling)
- testkemikaliets stabilitet, sidste anvendelsesdato eller dato for ny analyse, hvis dette er kendt
- opbevaringsforhold.

Forsøgsdyr:

- anvendt stamme og køn
- alder på dyr anvendt som donordyr
- oprindelse, miljøbetingelser, foder osv.
- oplysninger om fremstillingen af hudlapper.

Testbetingelser:

- kalibreringskurver for testapparat
- kalibreringskurver for farvebindingstestens ydeevne, båndpas anvendt til måling af OD-værdier og måleudstyrets OD-lineraritetsinterval (f.eks. spektrofotometer), hvis relevant
- detaljer om den testprocedure, der blev anvendt til TER-målinger
- detaljer om den testprocedure, der eventuelt blev anvendt til måling af farvebinding
- anvendte testdoser, eksponeringsperiodens/-periodernes varighed og eksponeringstemperatur(er)
- detaljer om den vaskeprocedure, der blev anvendt efter eksponeringsperioden
- antal anvendte hudlapsreplikater pr. testkemikalie og kontrol (positiv og negativ kontrol)
- beskrivelse af eventuelle ændringer i testproceduren
- reference til historiske data for modellen. Der bør bl.a. gives oplysninger om:
 - i) hvorvidt positive og negative TER-kontrolværdier (i $k\Omega$) kan accepteres, sammenlignet med modstandsintervaller for positive og negative kontroller
 - ii) hvorvidt positive og negative farveindholdskontrolværdier (i $\mu g/hudlap$) kan accepteres, sammenlignet med farveindholdsintervaller for positive og negative kontroller
 - iii) hvorvidt testresultaterne kan accepteres, sammenlignet med den historiske variabilitet mellem hudlapsreplikater
- beskrivelse af beslutningskriterier/forudsigelsesmodel.

Resultater:

- angivelse i tabelform af data fra TER- og eventuelt farvebindingsassay for hvert enkelt testkemikalie og hver enkelt kontrol, for hver analyseserie (hvert forsøg) og hvert hudlapsreplikat (de enkelte dyr og hudlapper), gennemsnit, standardafvigelser og variationskoefficienter
- beskrivelse af andre observerede virkninger
- den afledte klassificering med henvisning til den anvendte forudsigelsesmodel og/eller de anvendte beslutningskriterier.

Diskussion af resultaterne

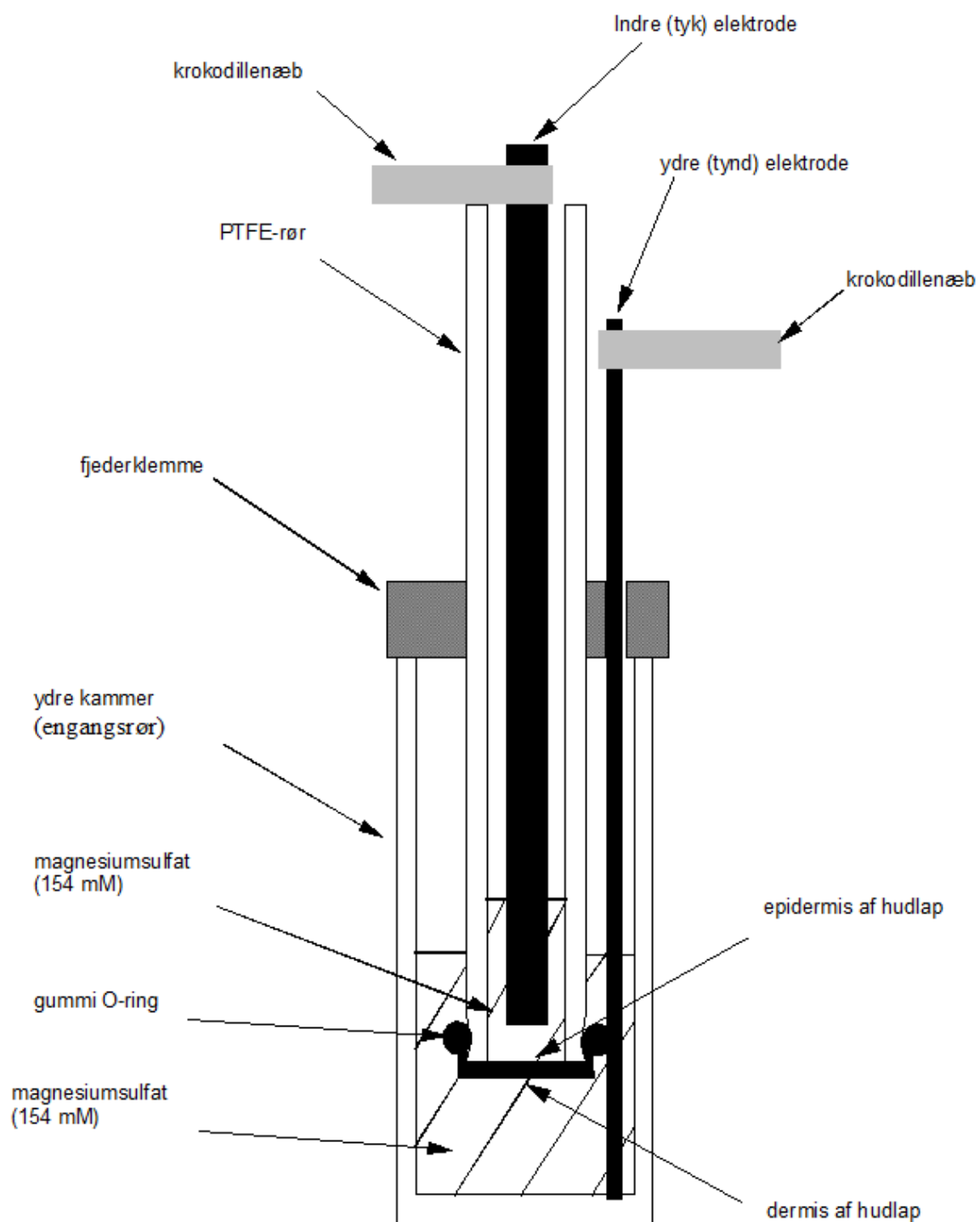
Konklusioner

LITTERATUR

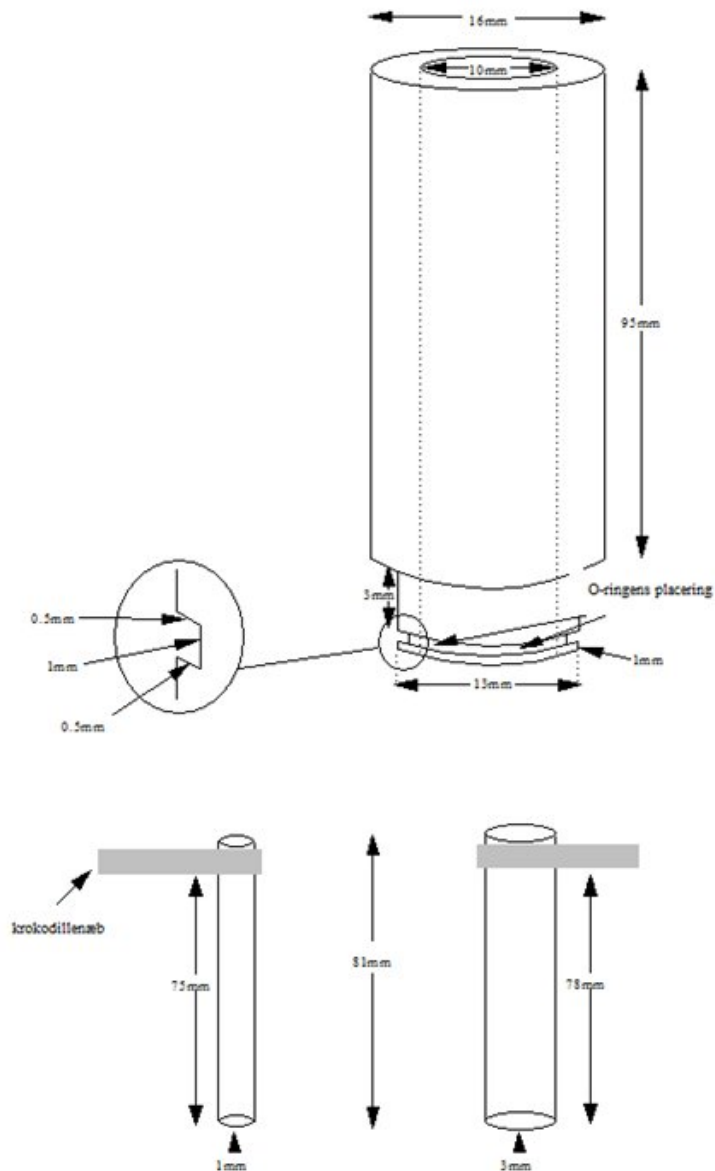
- (1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Tilgængelig på: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html].
- (2) Kapitel B.4 i dette bilag, Akut hudirritation/-ætsning.
- (3) Kapitel B.40.A i dette bilag, In vitro-hudmodel.
- (4) Kapitel B.65 i dette bilag, In vitro-membranbarriereforsøgsmetode.
- (5) Kapitel B.46 i dette bilag, In vitro-hudirritation: forsøgsmetode med rekonstrueret human epidermis.
- (6) OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (7) Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile D.J., Gardner J.R., Gordon V.C., Hildebrand B., Lewis R.W., Liebsch M., Logemann P., Osborne R., Ponc M., Regnier J.F., Steiling W., Walker A.P., og Balls M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 6. *ATLA* 23, 219-255.
- (8) Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., og Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and Distribution of the Test Chemicals. *Toxic. In Vitro* 12, 471-482.
- (9) Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Holzhütter H.-G., og Liebsch M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests For Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxic. In Vitro* 12, 483-524.
- (10) Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., Bruner L., Combes R.D., Ekwall B., Fielder R.J., Guillouzo A., Lewis R.W., Lovell D.P., Reinhardt C.A., Repetto G., Sladowski D., Spielmann H., og Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops. *ATLA* 23, 129-147.
- (11) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

- (12) EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3 April 1998.
- (13) ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275-280.
- (14) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (2002). ICCVAM Evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication No. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.
- (15) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 430. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 218. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (16) Oliver G.J.A., Pemberton M.A., og Rhodes C. (1986). An *In Vitro* Skin Corrosivity Test -Modifications and Validation. *Fd. Chem. Toxicol.* 24, 507-512.
- (17) Botham P.A., Hall T.J., Dennett R., McCall J.C., Basketter D.A., Whittle E., Cheeseman M., Esdaile D.J., og Gardner J. (1992). The Skin Corrosivity Test *In Vitro*: Results of an Interlaboratory Trial. *Toxicol. In Vitro* 6,191-194.
- (18) Eskes C., Detappe V., Koëter H., Kreysa J., Liebsch M., Zuang V., Amcoff P., Barroso J., Cotovio J., Guest R., Hermann M., Hoffmann S., Masson P., Alépée N., Arce L.A., Brüscheweiler B., Catone T., Cihak R., Clouzeau J., D'Abrosca F., Delveaux C., Derouette J.P., Engelking O., Facchini D., Fröhlicher M., Hofmann M., Hopf N., Molinari J., Oberli A., Ott M., Peter R., Sá-Rocha V.M., Schenk D., Tomicic C., Vanparys P., Verdon B., Wallenhorst T., Winkler G.C. og Depallens O. (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 62, 393-403.
- (19) TER SOP (December 2008). *INVITTOX* Protocol (No 115) Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test.
- (20) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

FIGUR 1: APPARATUR TIL TER-ASSAY MED ROTTEHUD



FIGUR 2: DIMENSIONER PÅ ANVENDTE POLYTETRAFLUORETHYLEN-RØR (PTFE), RECEPTORRØR OG ELEKTRODER



Kritiske faktorer for det ovenfor viste apparatur:

- PTFE-rørets indvendige diameter
- længden af elektroderne i forhold til PTFE-røret og receptorrøret, så hudlappen ikke berøres af elektroderne, og så en konstant længde af elektroden er i kontakt med MgSO_4 -opløsningen
- mængden af MgSO_4 -opløsning i receptorrøret bør sikre en væskedybde i forhold til niveauet i PTFE-røret som vist i figur 1

- hudlappen bør være tilstrækkeligt fastgjort til PTFE-røret, så den elektriske modstand er et sandt mål for hudens egenskaber.

Tillæg

DEFINITIONER

Nøjagtighed: overensstemmelsen mellem forsøgsmetodens resultater og accepterede referenceværdier. Den er et mål for forsøgsmetodens ydeevne og et af aspekterne af relevans. Udtrykket benyttes ofte som synonym for "konkordans", forstået som den andel af korrekte udfald, forsøgsmetoden fører til (20).

C: ætsende.

Kemikalie: et stof eller en blanding.

Konkordans: et mål for ydeevnen af en forsøgsmetode, der fører til kategoriske resultater, og et af aspekterne af relevans. Udtrykket benyttes af og til som synonym for nøjagtighed og defineres som andelen af alle kemikalier, der klassificeres korrekt som positive eller negative. Konkordansen afhænger i høj grad af forekomsten af positiver i de undersøgte typer testkemikalier (20).

GHS (det globale harmoniserede system for klassificering og mærkning af kemikalier (UN)): et system til klassificering af kemikalier (stoffer og blandinger) efter standardiserede typer og niveauer af fysisk fare, sundhedsfare og miljøfare med tilhørende kommunikationselementer såsom piktogrammer, signalord, faresætninger, sikkerhedssætninger og sikkerhedsdatablade, således at oplysninger om kemikaliernes skadelige virkninger kan videreformidles med henblik på at beskytte mennesker (f.eks. arbejdsgivere, arbejdstagere, transportører, forbrugere og redningspersonel) og miljøet (1).

IATA: integreret tilgang til testning og vurdering.

Blanding: blanding eller opløsning, der er sammensat af to eller flere stoffer.

Stof med kun én bestanddel: et stof, der defineres af sin mængdemæssige sammensætning, hvori en hovedbestanddel udgør mindst 80 % (w/w).

Stof med flere bestanddele: et stof, der defineres af sin mængdemæssige sammensætning, hvori flere end én hovedbestanddel er til stede i en koncentration på ≥ 10 % (w/w) og < 80 % (w/w). Et stof, der består af flere forskellige bestanddele, er resultatet af en fremstillingsproces. Forskellen mellem en blanding og et stof med flere bestanddele er, at blandingen er fremstillet ved blanding af to eller flere stoffer uden kemisk reaktion. Et stof, der består af flere forskellige bestanddele, er resultatet af en kemisk reaktion.

NC: Ikke-ætsende.

OD: optisk tæthed.

PC: positiv kontrol, et replikat, som indeholder alle komponenterne fra et testsystem og er behandlet med et stof, som vides at inducere en positiv respons. For at sikre, at det er muligt at vurdere variabiliteten i den positive kontrolrespons over tid, bør den positive respons ikke være overdrevent stor.

Ydeevnestandarder (PS): standarder, der med udgangspunkt i en valideret forsøgsmetode danner grundlag for at vurdere, om en foreslået forsøgsmetode, som er mekanistisk og funktionelt tilsvarende, er sammenlignelig. De omfatter bl.a. i) de centrale dele af forsøgsmetoden, ii) en minimumsliste med referencekemikalier, som er udvalgt blandt de kemikalier, der er benyttet til at påvise, at den validerede forsøgsmetodes ydeevne er acceptabel, og iii) de tilsvarende niveauer af pålidelighed og nøjagtighed, som er fastsat efter, hvad der er opnået med den validerede forsøgsmetode, og som det skal påvises, at den foreslåede forsøgsmetode kan yde, ved vurdering ud fra minimumslisten med referencekemikalier.

Relevans: beskrivelse af sammenhængen mellem forsøgsmetoden og den pågældende virkning og dens meningsfuldhed og brugbarhed til et bestemt formål. Det angives, i hvilket omfang forsøgsmetoden måler eller forudsiger den pågældende biologiske virkning korrekt. Forsøgsmetodens nøjagtighed (konkordans) indgår i vurderingen af dens relevans (20).

Pålidelighed: mål for, i hvilken grad en forsøgsmetode kan reproduceres i og mellem laboratorier over en længere periode, når den udføres efter samme protokol. Den bedømmes ved beregning af reproducerbarhed inden for og mellem laboratorier (20).

Følsomhed: andelen af alle positive/aktive kemikalier, der klassificeres korrekt ved forsøgsmetoden. Den er et mål for nøjagtigheden af en forsøgsmetode, som giver kategoriske resultater, og er et vigtigt kriterium ved vurderingen af en forsøgsmetodes relevans (20).

In vivo-hudætsning: fremkaldelse af irreversibel skade på huden, dvs. synlig nekrose gennem epidermis og ned i dermis efter påføring af et testkemikalie i indtil 4 timer. Typiske ætsningsreaktioner er sår, blødning, blodige skorper, efter 14 dages observation affarvning som følge af blegning af huden, hele områder med alopeci samt ardannelse. Tvivlsomme læsioner bør overvejes vurderet ved histopatologisk undersøgelse.

Specificitet: andelen af alle negative/inaktive kemikalier, der klassificeres korrekt ved forsøgsmetoden. Den er et mål for nøjagtigheden af en forsøgsmetode, som giver kategoriske resultater, og er et vigtigt kriterium ved vurderingen af en forsøgsmetodes relevans (20).

Stof: et grundstof og forbindelser heraf, naturlige eller industrielt fremstillede, indeholdende sådanne tilsætningsstoffer, som er nødvendige til bevarelse af stoffets stabilitet, og sådanne urenheder, som følger af fremstillingsprocessen, bortset fra opløsningsmidler, som kan udskilles, uden at det påvirker stoffets stabilitet eller ændrer dets sammensætning.

Analyseserie: Et enkelt testkemikalie, der på samme tid testes i mindst tre hudlapsreplikater.

Testkemikalie: alle stoffer eller blandinger, der testes ved hjælp af denne forsøgsmetode.

Transkutan elektrisk modstand (TER): et mål for hudens elektriske impedans som en modstand i kilohm. En simpel og robust metode til vurdering af barrierefunktion, hvor ionernes passage gennem huden registreres ved hjælp af en wheatstone-bro.

UVCB: stoffer med ukendt eller variabel sammensætning, komplekse reaktionsprodukter eller biologiske materialer. "

(6) Del B, kapitel B.40.A, affattes således:

"B.40.A IN VITRO-HUDÆTSNING: FORSØGSMETODE MED REKONSTRUERET HUMAN EPIDERMIS (RhE)

INDLEDNING

1. Denne forsøgsmetode svarer til OECD's testvejledning (Test Guideline (TG)) 431 (2016). Hudætsning defineres som fremkomsten af irreversibel ødelæggelse af huden, der viser sig som en synlig nekrose gennem epidermis til dermis efter påføring af et testkemikalie [som defineret i De Forenede Nationers (FN's) globale harmoniserede system for klassificering og mærkning af kemikalier (GHS) (1) og Den Europæiske Unions (EU's) forordning 1272/2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger (CLP)¹]. Den opdaterede forsøgsmetode B.40.A indeholder en in vitro-procedure, som gør det muligt at identificere ikke-ætsende og ætsende stoffer og blandinger i overensstemmelse med UN GHS og CLP. Den muliggør endvidere delvis underkategorisering af ætsende stoffer.
2. Vurderingen af kemikaliers hudætsningspotentiale har typisk omfattet brug af laboratoriedyr (TM B.4, som svarer til OECD TG 404, der oprindeligt blev vedtaget i 1981 og revideret i 1992, 2002 og 2015) (2). Ud over nærværende forsøgsmetode B.40.A er der blevet valideret og vedtaget to andre in vitro-forsøgsmetoder til testning af kemikaliers hudætsningspotentiale som TM B.40 (der svarer til OECD TG 430) (3) og TM B.65 (der svarer til OECD TG 435) (4). Derudover er in vitro-forsøgsmetoden B.46 (der svarer til OECD TG 439) (5) blevet vedtaget til testning af hudirritationspotentiale. Et vejledende dokument fra OECD om integrerede tilgange til testning og vurdering (IATA) vedrørende hudætsning og -irritation beskriver flere moduler, som grupperer informationskilder og analyseværktøjer, og vejleder i, i) hvordan eksisterende forsøgsdata og ikke-forsøgsdata integreres i og anvendes til vurdering af kemikaliers hudirritations- og hudætsningspotentiale, og ii) foreslår en tilgang, når der er behov for yderligere testning (6).
3. Denne forsøgsmetodes endepunkt for menneskers sundhed er hudætsning. Den gør brug af rekonstrueret human epidermis (RhE) (fremstillet af humant afledte ikke-transformerede epidermiskeratinocytter), som ret nøje efterligner de histologiske, morfologiske, biokemiske og fysiologiske egenskaber af menneskehudens øverste lag, dvs. epidermis. Den tilsvarende OECD-testvejledning blev oprindeligt vedtaget i 2004 og opdateret i 2013 for at medtage

¹ Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1272/2008 af 16. december 2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger og om ændring og ophævelse af direktiv 67/548/EØF og 1999/45/EF og om ændring af forordning (EF) nr. 1907/2006 (EUT L 353 af 31.12.2008, s. 1).

yderligere forsøgsmetoder, der bruger RhE-modeller, og muligheden for at benytte metoderne til at understøtte underkategorisering af ætsende kemikalier. Endelig blev den opdateret i 2015 for at referere til det vejledende IATA-dokument og medtage anvendelsen af en alternativ procedure til måling af levedygtighed.

4. Fire validerede RhE-modeller, der kan fås i handelen, er inkluderet i denne forsøgsmetode. En række prævalideringsundersøgelser (7) efterfulgt af en formel valideringsundersøgelse til vurdering af hudætsning (8) (9) (10) er blevet gennemført (11) (12) for to af disse testmodeller, der kan fås i handelen, nemlig EpiSkin™ Standard Model (SM) og EpiDerm™ Skin Corrosivity Test (SCT) (EPI-200) (er i det følgende betegnet som de validerede referencemetoder – VRM). På baggrund af resultatet af disse undersøgelser henstilles det, at de to ovenfor nævnte VRM'er anvendes i lovgivningsøjemed til skelnen mellem ætsende (C) og ikke-ætsende (NC) stoffer, og at EpiSkin™ desuden anvendes til at understøtte underkategoriseringen af ætsende stoffer (13) (14) (15). To andre in vitro-RhE-testmodeller til vurdering af hudætsning, der også findes i handelen, har udvist resultater, som svarer til den validerede referencemetode (VRM) EpiDerm™ ifølge en PS-baseret validering (16) (17) (18). Det drejer sig om SkinEthic™ RHE¹ og epiCS® (tidligere benævnt EST-1000), der også kan benyttes i lovgivningsøjemed til skelnen mellem ætsende og ikke-ætsende stoffer (19) (20). Undersøgelser, som producenterne af RhE-modeller udførte efter validering i perioden 2012-2014 med en mere detaljeret protokol, der korrigerer for interferens som følge af testkemikaliernes uspecificerede MTT-reduktion, forbedrede ydeevnen både med hensyn til skelnen mellem C og NC og understøtning af underkategoriseringen af ætsende stoffer (21) (22). Der er foretaget yderligere statistiske analyser af de data, der blev genereret efter validering med EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE og EpiCS®, for at identificere alternative forudsigelsesmodeller, som har forbedret forudsigelsesevnen i forbindelse med underkategorisering (23).
5. Inden der kan anvendes en foreslået lignende eller ændret in vitro-RhE-forsøgsmetode end VRM'erne til vurdering af hudætsning i lovgivningsøjemed, bør dens pålidelighed og relevans (nøjagtighed) og begrænsningerne for dens påtænkte anvendelse bestemmes for at sikre, at den er sammenlignelig med VRM'erne, i overensstemmelse med ydeevnestandarderne (PS) (24), der opstilles i henhold til principperne i OECD's vejledende dokument nr. 34 (25). Den gensidige anerkendelse af data vil først være garanteret, når en foreslået ny eller opdateret forsøgsmetode i henhold til ydeevnestandarderne er blevet gennemgået og medtaget i den

¹ Forkortelsen RhE (= Reconstructed human Epidermis) anvendes for alle modeller, der er baseret på RhE-teknologi. Forkortelsen RHE, som den bruges sammen med SkinEthic™-modellen, har den samme betydning, men skrives med store bogstaver, da den indgår i handelsnavnet for denne specifikke forsøgsmetode.

tilsvarende testvejledning. De testmodeller, der er medtaget i testvejledningen, kan anvendes til at opfylde forskellige landes krav til testresultater for in vitro-forsøgsmetoder til vurdering af hudætsning og drager samtidig fordel af den gensidige anerkendelse af data.

DEFINITIONER

6. De anvendte definitioner er forklaret i tillæg 1.

INDLEDENDE OVERVEJELSER

7. Denne forsøgsmetode gør det muligt at identificere ikke-ætsende og ætsende stoffer og blandinger i henhold til UN GHS og CLP. Denne forsøgsmetode understøtter endvidere underkategoriseringen af ætsende stoffer og blandinger i den valgfrie underkategori 1A, jf. UN GHS (1), samt en kombination af underkategoriene 1B og 1C (21) (22) (23). Forsøgsmetoden er begrænset derved, at den ikke gør det muligt at skelne mellem underkategoriene for hudætsende stoffer 1B og 1C, jf. UN GHS og CLP, på grund af det begrænsede antal velkendte kemikalier, der tilhører underkategorien 1C for in vivo-ætsende stoffer. Testmodellerne EpiSkin™, EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE og epiCS® gør det muligt at foretage denne underkategorisering (dvs. 1A versus 1B/1C versus NC).
8. En lang række kemikalier, der primært repræsenterer enkeltstoffer, er blevet testet under den validering, der understøtter de testmodeller, som er medtaget i denne forsøgsmetode, når de anvendes til identifikation af ikke-ætsende og ætsende stoffer. Valideringsundersøgelsens empiriske database indeholdt 60 kemikalier fra en bred vifte af kemiske grupper (8) (9) (10). Forsøgsmetodens udviklere gennemførte forsøg til påvisning af følsomhed, specificitet, nøjagtighed og assayets reproducerbarhed internt i laboratoriet med henblik på underkategorisering, og resultaterne blev gennemgået af OECD (21) (22) (23). På baggrund af alle tilgængelige data kan forsøgsmetoden anvendes på en lang række kemiske grupper og fysiske tilstande, herunder væsker, halvfaste stoffer, faste stoffer og voks. Væsker kan være vandige eller ikke-vandige, og faste stoffer kan være opløselige eller uopløselige i vand. Faste stoffer skal males til et fint pulver, før de påføres, når det overhovedet er muligt. Der kræves ingen anden forbehandling af teststoffet. I de tilfælde, hvor det kan påvises, at de testmodeller, der er medtaget i denne forsøgsmetode, ikke er egnede til en specifik kategori af testkemikalier, bør de ikke anvendes til forsøg med denne specifikke kategori af testkemikalier. Eftersom forsøgsmetoden kan anvendes på stoffer, forventes den desuden at kunne anvendes på blandinger. Da blandinger imidlertid omfatter et vidt spektrum af kategorier og sammensætninger, og da der for øjeblikket kun foreligger begrænsede oplysninger om testning af blandinger, bør forsøgsmetoden i de tilfælde, hvor det kan påvises, at den ikke er egnet til en specifik kategori af blandinger (f.eks. efter en strategi som foreslået i (26)), ikke anvendes til forsøg med denne specifikke kategori af blandinger. Før forsøgsmetoden bruges på en blanding for at generere data i lovgivningsøjemed, bør det overvejes, om den vil give resultater, som er egnede til formålet, og i givet fald hvorfor. Sådanne overvejelser er ikke nødvendige, når der

foreligger et myndighedskrav om test af blandingen. Gasser og aerosoler er endnu ikke vurderet ved en valideringsundersøgelse (8) (9) (10). Selv om det er tænkeligt, at gasser og aerosoler kan undersøges ved hjælp af RhE-teknologi, muliggør den nuværende forsøgsmetode det ikke.

9. Testkemikalier, der absorberer lys i det samme område som MTT-formazan, og testkemikalier, som direkte kan reducere vitalfarvestoffet MTT (til MTT-formazan), kan interferere med målinger af vævets levedygtighed og kræve anvendelse af tilpassede kontroller med henblik på korrektioner. Hvilken type af tilpassede kontroller, der kan være nødvendig, vil variere alt efter den type interferens, testkemikaliets fremkalder, og den procedure, der benyttes til at måle MTT-formazan (jf. punkt 25-31).
10. Denne forsøgsmetode giver ikke fyldestgørende oplysninger om hudirritation, men det skal bemærkes, at TM B.46 specifikt vedrører in vitro-test af hudirritationer og er baseret på det samme RhE-testsystem, dog med en anden protokol (5). For fuldt ud at kunne vurdere de lokale virkninger på huden efter en enkelt dermal eksponering bør OECD's vejledende dokument om integrerede tilgange til testning og vurdering (IATA) følges (6). Denne IATA-strategi omfatter gennemførelse af in vitro-test for hudætsning (som beskrevet i forbindelse med denne forsøgsmetode) og hudirritation, inden test i levende dyr overvejes. Det anerkendes, at brugen af human hud er underlagt nationale og internationale etiske hensyn og betingelser.

PRINCIP FOR TESTEN

11. Testkemikaliets påføres på en tredimensional RhE-model, som består af ikke-transformerede humant afledte epidermiskeratinocytter, som ved dyrkning har dannet en stærkt differentieret flerlagsmodel af den humane epidermis. Den består af velordnede basallag, stratum spinosum og stratum granulosum og et flerlaget stratum corneum med intercellulære lamellære lipidlag fra samme lipidklasser som dem, man finder in vivo.
12. RhE-forsøgsmetoden er baseret på den præmis, at kemikalier er ætsende, når de er i stand til at trænge gennem stratum corneum ved diffusion eller erosion og er cytotoxiske for cellerne i de underliggende lag. Cellernes levedygtighed måles ved, at enzym omdanner vitalfarvestoffet MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, thiazolylblåt tetrazoliumbromid; CAS-nummer 298-93-1] til et blåt formazansalt, der måles kvantitativt efter ekstraktion fra vævene (27). Ætsende kemikalier identificeres ved deres evne til at nedsætte cellernes levedygtighed til under en bestemt tærskelværdi (jf. punkt 35 og 36). Den RhE-baserede forsøgsmetode til vurdering af hudætsning har vist sig at kunne forudsige in vivo-hudætsning hos kaniner vurderet i henhold til TM B.4 (2).

PÅVISNING AF KOMPETENCE

13. Inden laboratorierne påbegynder rutinemæssig brug af en eller flere af de fire validerede RhE-testmodeller, som er i overensstemmelse med denne forsøgsmetode, bør de påvise deres tekniske kompetence ved korrekt identifikation af de 12 kompetencestoffer, der står opført i

tabel 1. Såfremt der anvendes en metode til underklassificering, bør også den korrekte underkategorisering påvises. I situationer, hvor et stof på listen ikke kan fås, eller hvor det er berettiget, kan et andet stof anvendes, hvis der foreligger tilstrækkelige in vivo- og in vitro-referencedata herfor (f.eks. fra listen over referencekemikalier (24)), forudsat at der benyttes de samme udvælgelseskriterier som beskrevet i tabel 1.

Tabel 1: Liste over kompetencestoffer¹

Stof	CAS RN	Kemisk gruppe ²	UN GHS-/CLP-kat. baseret på in vivo-resultater ³	VRM-kat. baseret på in vitro-resultater ⁴	MTT-reduktionsmiddel ⁵	Fysisk tilstand
Underkategori 1A in vivo – ætsende stoffer						
Bromeddikesyre	79-08-3	Organisk syre	1A	(3) 1A	--	Fast
Bortrifluoridihydrat	13319-75-0	Uorganisk syre	1A	(3) 1A	--	Flyd.
Phenol	108-95-2	Phenol	1A	(3) 1A	--	Fast
Dichloracetylchlorid	79-36-7	Elektrofil	1A	(3) 1A	--	Flyd.
Kombination af underkategorierne 1B og 1C in vivo – ætsende stoffer						
Glyoxylsyremonohydrat	563-96-2	Organisk syre	1B/1C	(3) 1B/1C	--	Fast
Mælkesyre	598-82-3	Organisk syre	1B/1C	(3) 1B/1C	--	Flyd.
Ethanolamin	141-43-5	Organisk base	1B	(3) 1B/1C	Y	Viskøs
Saltsyre (14,4 %)	7647-01-0	Uorganisk syre	1B/1C	(3) 1B/1C	--	Flyd.
In vivo – ikke-ætsende stoffer						
Phenethylbromid	103-63-9	Elektrofil	NC	(3) NC	Y	Flyd.
4-amino-1,2,4-triazol	584-13-4	Organisk base	NC	(3) NC	--	Fast
4-(methylthio)-benzaldehyd	3446-89-7	Elektrofil	NC	(3) NC	Y	Flyd.
Laurinsyre	143-07-7	Organisk syre	NC	(3) NC	--	Fast

Forkortelser: CAS RN = Registernummer i Chemical Abstracts Service; VRM = valideret referencemetode; NC = Ikke ætsende.

¹ Kompetencestofferne, der først er sorteret efter deres ætsende versus ikke-ætsende egenskaber, dernæst efter deres underkategori for ætsende stoffer og endelig efter deres kemiske gruppe, er udvalgt blandt de stoffer, der blev anvendt i ECVAM-valideringsundersøgelserne af EpiSkin™ og EpiDerm™ (8) (9) (10) og efter undersøgelser efter validering baseret på data fra udviklerne af EpiSkin™ (22), EpiDerm™, SkinEthic™ og epiCS® (23). Medmindre andet er angivet, er stofferne testet ved det renhedsniveau, de havde, da de blev købt (8) (10). De udvalgte stoffer omfatter så vidt muligt stoffer, der: i) er repræsentative for det responsinterval for ætsende virkning (f.eks. ikke-ætsende, svagt til kraftigt ætsende), som VRM'erne er i stand til at måle eller forudsige, ii) er repræsentative for de kemiske grupper, der blev anvendt i valideringsundersøgelserne, iii) har veldefinerede kemiske strukturer, iv) giver reproducerbare resultater i VRM'erne, v) giver definitive resultater i in vivo-referencetestmetoden, vi) findes i handelen og vii) ikke er forbundet med uoverkommelige bortskaffelsesomkostninger.

² Kemisk gruppe, jf. Barratt et al. (8).

³ De tilsvarende UN-emballagegrupper er henholdsvis I, II og III for UN GHS/CLP 1A, 1B og 1C.

⁴ VRM-in vitro-forudsigelserne i denne tabel blev opnået med EpiSkin™- og EpiDerm™-testmodellerne (VRM'erne) ved testning efter validering foretaget af forsøgsmetodens udviklere.

⁵ De værdier for levedygtighed, der blev opnået i ECVAM-valideringsundersøgelserne for hudætsning, blev ikke korigeret for direkte MTT-reduktion (der blev ikke foretaget døde kontroller under valideringsundersøgelserne). De data, der blev genereret efter validering af forsøgsmetodens udviklere, og som fremgår af denne tabel, er dog opnået med tilpassede kontroller (23).

14. Som led i påvisningen af kompetence anbefales det, at brugeren kontrollerer vævenes barriereegenskaber efter modtagelse som beskrevet af RhE-modellens fabrikant. Det er navnlig vigtigt, hvis vævene sendes over lang afstand/lange perioder. Når en forsøgsmetode er blevet helt fastlagt, og kompetencen er blevet påvist, er det ikke nødvendigt at kontrollere disse egenskaber rutinemæssigt. Ved rutinemæssig brug af en forsøgsmetode anbefales det imidlertid at kontrollere barriereegenskaberne med jævne mellemrum.

FREM GANGSMÅDE

15. Følgende er en generisk beskrivelse af komponenter og procedurer i RhE-testmodellerne til vurdering af hudætsning, som er omfattet af denne forsøgsmetode. De RhE-modeller, der er godkendt som videnskabeligt egnede til brug inden for denne forsøgsmetode, dvs. modellerne EpiSkin™ (SM), EpiDerm™ (EPI-200), SkinEthic™ RHE og epiCS® (16) (17) (19) (28) (29) (30) (31) (32) (33), kan købes i handelen. Der findes standardprocedurer (SOP'er) for disse fire RhE-modeller (34) (35) (36) (37), og de vigtigste komponenter i forsøgsmetoden er opsummeret i tillæg 2. Det anbefales at følge de relevante standardprocedurer, når en af disse modeller implementeres og anvendes i laboratoriet. Testning med de fire RhE-testmodeller, der er omfattet af denne forsøgsmetode, bør overholde følgende betingelser:

KOMPONENTER I RHE-FORSØGSMETODEN

Almindelige betingelser

16. Der skal anvendes ikke-transformerede humane keratinocytter til at rekonstruere epitel. Der skal være flere lag af levedygtige epithelceller (basallag, stratum spinosum, stratum granulosum) til stede under et fungerende stratum corneum. Stratum corneum skal være flerlaget og have den lipidprofil, der gør den til en effektiv barriere, som kan modstå hurtig gennemtrængning af cytotoxiske referencekemikalier, f.eks. natriumdodecylsulphat (SDS) eller Triton X-100. Barrierefunktionen bør påvises og kan vurderes enten ved at bestemme den koncentration, ved hvilken et referencekemikalie nedsætter vævets levedygtighed med 50 % (IC₅₀) efter en fast eksponeringstid, eller ved at bestemme den eksponeringstid, der er nødvendig for at reducere cellernes levedygtighed med 50 % (ET₅₀), når referencekemikaliets påføres i en nærmere angivet fast koncentration (jf. punkt 18). RhE-modellens fysiske udformning skal forhindre, at stof passerer uden om stratum corneum til det levedygtige væv,

hvilket ville forringe modelleringen af hudens eksponering. RhE-modellen skal være fri for kontamination med bakterier, virus, mykoplasma og svampe.

Funktionsmæssige betingelser

Levedygtighed

17. MTT-assayet foretrækkes til kvantificering af vævslevedygtigheden (27). Levedygtige celler i RhE-modellen reducerer vitalfarvestoffet MTT til blå MTT-formazanbundfald, som herefter ekstraheres fra vævet ved anvendelse af isopropanol (eller et lignende opløsningsmiddel). OD af ekstraktionsmidlet alene bør være tilstrækkeligt lille, dvs. $OD < 0,1$. Det ekstraherede MTT-formazan kan kvantificeres enten ved måling af standardabsorbans (OD) eller en HPLC-/UPLC-spektrofotometriprocedure (38). Brugere af RhE-modellen bør sikre, at hver batch af den anvendte RhE-model overholder de fastlagte kriterier for den negative kontrol. Udvikleren/leverandøren af RhE-modellen bør fastsætte et interval (øvre og nedre grænse) for acceptable OD-værdier for negativ kontrol. Intervallerne for de acceptable OD-værdier for negativ kontrol for de fire validerede RhE-testmodeller, der er omfattet af denne forsøgsmetode, er anført i tabel 2. En bruger af HPLC-/UPLC-spektrofotometri bør anvende de OD-intervaller for negativ kontrol, der er anført i tabel 2, som acceptkriterier for den negative kontrol. Det skal godtgøres, at det væv, der er behandlet med det negative kontrolstof, har stabil kultur (giver enslydende OD-målinger) i hele eksponeringsperioden.

Tabel 2: Intervaller for acceptable OD-værdier for negativ kontrol ved kontrol af batchkvalitet

	Nedre acceptgrænse	Øvre acceptgrænse
EpiSkin™ (SM)	> 0,6	< 1,5
EpiDerm™ SCT (EPI-200)	> 0,8	< 2,8
SkinEthic™ RHE	> 0,8	< 3,0
epiCS®	> 0,8	< 2,8

Barrierefunktion

18. Stratum corneum og dets lipidsammensætning bør være tilstrækkelig til at modstå hurtig gennemtrængning af visse cytotoxiske referencekemikalier (f.eks. SDS eller Triton X-100), bestemt ved IC_{50} eller ET_{50} (tabel 3). Udvikleren/leverandøren af den anvendte RhE-model bør påvise barrierefunktionen for hver batch af RhE-modellen ved levering af vævene til slutbrugeren (jf. punkt 21).

Morfologi

19. Der foretages en histologisk undersøgelse af RhE-modellen, som påviser en flerlaget human epidermis-lignende struktur indeholdende stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum og stratum corneum og udviser en lipidprofil som den, man finder i human epidermis. Udvikleren/leverandøren af RhE-modellen bør ved levering af vævene til

slutbrugeren forelægge en histologisk undersøgelse af hver batch af den anvendte RhE-model, som påviser vævenes egnede morfologi (jf. punkt 21).

Reproducerbarhed

20. Brugerne af forsøgsmetoderne skal påvise forsøgsmetodernes reproducerbarhed over tid med positive og negative kontroller. Derudover bør en forsøgsmetode kun anvendes, hvis udvikleren/leverandøren af RhE-modellen forelægger data, som påviser reproducerbarheden over tid med ætsende og ikke-ætsende kemikalier fra f.eks. listen over kompetencestoffer (tabel 1). Hvis en forsøgsmetode anvendes til underkategorisering, skal reproducerbarheden med hensyn til underkategorisering også påvises.

Kvalitetskontrol (QC)

21. RhE-modellen bør kun anvendes, hvis udvikleren/leverandøren påviser, at hver batch af den anvendte RhE-model overholder veldefinerede produktionsgodkendelseskriterier, hvoraf levedygtighed (punkt 17), barrierefunktion (punkt 18) og morfologi (punkt 19) er de vigtigste. Brugerne af forsøgsmetoden gives adgang til disse data, således at de kan medtage disse oplysninger i testrapporten. Kun resultater, der er fremkommet med QC-accepterede batcher af væv, kan accepteres til at forudsige de ætsende stoffers klassificering på pålidelig vis. Udvikleren/leverandøren af RhE-modellen fastsætter et acceptinterval (øvre og nedre grænse) for IC₅₀ eller ET₅₀. Acceptintervallerne for de fire validerede testmodeller er angivet i tabel 3.

Tabel 3: QC-batchgodkendelseskriterier

	Nedre acceptgrænse	Øvre acceptgrænse
EpiSkin™ (SM) (behandling i 18 timer med SDS) (33)	IC ₅₀ = 1,0 mg/ml	IC ₅₀ = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SCT (EPI-200) (1 % Triton X-100) (34)	ET ₅₀ = 4,0 timer	ET ₅₀ = 8,7 timer
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (35)	ET ₅₀ = 4,0 timer	ET ₅₀ = 10,0 timer
epiCS® (1 % Triton X-100) (36)	ET ₅₀ = 2,0 timer	ET ₅₀ = 7,0 timer

Påføring af testkemikaliet og kontrollkemikalier

22. Der anvendes mindst to vævsprøver for hvert testkemikalie og hver kontrol i hver eksponeringsperiode. For både flydende og faste kemikalier gælder det, at der bør påføres tilstrækkelig meget testkemikalie til, at epidermisoverfladen dækkes med et jævnt lag, samtidig med at ubegrænsede doser undgås, dvs. mindst 70 µl/cm² eller 30 mg/cm². Alt efter modellerne fugtes epidermisoverfladen med deioniseret eller destilleret vand inden påføring af faste

kemikalier for at forbedre kontakten mellem testkemikallet og epidermisoverfladen (34) (35) (36) (37). Faste stoffer bør testes som fint pulver, når det overhovedet er muligt. Påføringsmetoden skal være egnet til det pågældende testkemikalie (se f.eks. henvisning (34-37)). Efter eksponeringsperioden skal testkemikallet omhyggeligt vaskes af epidermis med en vandig buffer eller 0,9 % NaCl. Alt efter hvilken af de fire validerede RhE-testmodeller der benyttes, anvendes to eller tre eksponeringsperioder pr. testkemikalie (for alle fire gyldige RhE-modeller: 3 min. og 1 time; for EpiSkin™ en yderligere eksponeringstid på fire timer). Alt efter den anvendte RhE-testmodel og den vurderede eksponeringsperiode kan inkubationstemperaturen under eksponering variere mellem stuetemperatur og 37 °C.

23. Der bør i hver analyseserie anvendes sideløbende negative og positive kontroller (PC), så det påvises, at levedygtigheden (med negative kontroller), barrierefunktionen og vævets deraf følgende følsomhed (med PC) ligger inden for et forud fastsat acceptinterval. De foreslåede PC-kemikalier er iseddikesyre og 8N KOH, alt afhængigt af den anvendte RhE-model. Det skal bemærkes, at 8N KOH er et direkte MTT-reduktionsmiddel, der kan kræve tilpassede kontroller som beskrevet i punkt 25 og 26. Som negativt kontrolstof foreslås 0,9 % (w/v) NaCl eller vand.

Måling af cellelevedygtighed

24. MTT-assayet, som er et kvantitativt assay, skal benyttes til måling af cellelevedygtigheden i forbindelse med denne forsøgsmetode (27). Vævsprøven anbringes i en MTT-opløsning af passende koncentration (0,3 eller 1 mg/ml) i tre timer. Det udfældede blå formazan ekstraheres fra vævet med et opløsningsmiddel (f.eks. isopropanol eller sur isopropanol), og formazankoncentrationen måles ved bestemmelse af OD ved 570 nm i et højst ± 30 nm bredt filterbånd eller ved en HPLC-/UPLC-spektrofotometriprocedure (jf. punkt 30 og 31) (38).
25. Testkemikalier kan interferere med MTT-assayet enten ved direkte reduktion af MTT til blå formazan og/eller ved farveinterferens, hvis testkemikallet naturligt eller på grund af behandlingsprocedurer absorberer i det samme OD-interval som formazan (570 ± 30 nm, primært blå og violette kemikalier). Der bør anvendes yderligere kontroller til at påvise og korrigere for testkemikaliernes potentielle interferens, såsom kontrol af ikke-specifik MTT-reduktion (NSMTT) og kontrol af ikke-specifik farve (NSC) (jf. punkt 26-30). Dette er især vigtigt, når et bestemt testkemikalie ikke fjernes helt fra vævet ved skylning, eller når det trænger igennem epidermis og derfor er til stede i vævet, når MTT-levedygtighedstesten udføres. Det er nærmere beskrevet, hvordan der korrigeres for direkte MTT-reduktion og farvestoffernes interferens, i SOP'erne for testmodellerne (34) (35) (36) (37).
26. For at identificere direkte MTT-reduktionsmidler bør hvert testkemikalie tilsættes til et frisklavet MTT-medium (34) (35) (36) (37). Hvis MTT-blandingen, når den indeholder testkemikallet, bliver blå/violet, formodes testkemikallet at reducere MTT direkte, og der bør udføres yderligere funktionsmæssig kontrol på ikke-levedygtig epidermis, uanset om der anvendes måling af standardabsorbans (OD) eller en HPLC-/UPLC-spektrofotometriprocedure. Ved denne yderligere funktionsmæssige kontrol anvendes dødt væv, der kun har metabolisk

residualaktivitet, men absorberer testkemikaliet på samme måde som levedygtigt væv. Hvert MTT-reducerende kemikalie påføres på mindst to døde vævsprøver pr. eksponeringsperiode, som gennemgår hele hudætsningstesten. Derefter beregnes den faktiske vævslevedygtighed som procenten for vævslevedygtighed opnået med levende væv eksponeret for MTT-reduktionsmiddel minus procenten for ikke-specifik MTT-reduktion opnået med dødt væv eksponeret for det samme MTT-reduktionsmiddel, set i forhold til den negative kontrol, som køres sideløbende med den test, der korrigeres (% NSMTT).

27. For at identificere potentiel interferens fra farvede testkemikalier eller testkemikalier, der bliver farvet, når de kommer i kontakt med vand eller isopropanol, og afgøre, om der skal iværksættes yderligere kontrol, bør der foretages spektralanalyse af testkemikaliet i vand (miljø under eksponering) og/eller isopropanol (ekstraktionsopløsning). Hvis testkemikaliet i vand og/eller isopropanol absorberer lys i intervallet 570 ± 30 nm, bør der foretages yderligere kontroller med farvestof, eller der kan anvendes en HPLC-/UPLC-spektrofotometriprocedure, i hvilket tilfælde disse kontroller ikke er nødvendige (jf. punkt 30 og 31). Når der foretages en måling af standardabsorbansen (OD), påføres hvert interfererende farvet testkemikalie på mindst to levedygtige vævsprøver pr. eksponeringsperiode, som gennemgår hele hudætsningstesten, men inkuberes med medium i stedet for MTT-opløsning under MTT-inkubationstrinnet for at generere en kontrol af en ikke-specifik farve (NSC_{living}). NSC_{living}-kontrollen skal udføres sideløbende pr. eksponeringsperiode pr. farvet testkemikalie (i hver analyseserie) som følge af det levende vævs iboende biologiske variabilitet. Derefter beregnes den faktiske vævslevedygtighed som procenten for vævslevedygtighed opnået med levende væv eksponeret for det interfererende testkemikalie og inkuberet med MTT-opløsning minus procenten for ikke-specifik farve opnået med levende væv eksponeret for det interfererende testkemikalie og inkuberet med medium uden MTT foretaget sideløbende med den test, der korrigeres (%NSC_{living}).
28. Når der foretages en måling af standardabsorbansen (OD), vil testkemikalier, der identificeres som fremkaldende både direkte MTT-reduktion (jf. punkt 26) og farveinterferens (jf. punkt 27), også kræve en tredje kontrol ud over NSMTT- og NSC_{living}-kontrollerne, der er beskrevet ovenfor. Dette er sædvanligvis tilfældet med mørke testkemikalier, der interfererer med MTT-assayet (f.eks. blå, violette, sorte), fordi deres egen farve forstyrrer vurderingen af deres evne til direkte at reducere MTT, som beskrevet i punkt 26. Disse testkemikalier kan binde sig til både levende og dødt væv, og derfor kan NSMTT-kontrollen ikke blot korrigere for testkemikaliets potentielle direkte MTT-reduktion, men også for den farveinterferens, der opstår, når testkemikaliet binder sig til dødt væv. Dette kan medføre dobbeltkorrektion for farveinterferens, da NSC_{living}-kontrollen allerede korrigerer for farveinterferens, som opstår, når testkemikaliet binder sig til levende væv. For at undgå eventuel dobbeltkorrektion for farveinterferens skal der gennemføres en tredje kontrol for ikke-specifik farve i dødt væv (NSC_{killed}). I denne yderligere kontrol påføres testkemikaliet på mindst to døde vævsprøver pr. eksponeringsperiode, som gennemgår hele testproceduren, men inkuberes med medium i stedet for MTT-opløsning under MTT-inkubationstrinnet. En enkelt NSC_{killed}-kontrol er tilstrækkelig

pr. testkemikalie, uanset hvor mange uafhængige test/analyserier der er udført, men bør udføres sideløbende med NSMTT-kontrollen og om muligt med den samme vævsbatch. Derefter beregnes den faktiske vævslevedygtighed som procenten for vævslevedygtighed opnået med levende væv eksponeret for testkemikaliets minus % NSMTT minus % NSC_{living} plus procenten for ikke-specifik farve opnået med dødt væv eksponeret for det interfererende testkemikalie og inkuberet med medium uden MTT, set i forhold til den negative kontrol, som køres sideløbende med den test, der korrigeres (% NSC_{killed}).

29. Det er vigtigt at bemærke, at ikke-specifik MTT-reduktion og ikke-specifik farveinterferens kan øge de aflæste værdier for vævsekstraktet til over spektrofotometrets linearitetsinterval. På denne baggrund bør laboratorierne fastlægge linearitetsintervallet for deres spektrofotometer med MTT-formazan (CAS-nr. 57360-69-7), der er købt i handelen, inden de begynder at undersøge testkemikalier i lovgivningsøjemed. Måling af standardabsorbans (OD) ved hjælp af et spektrofotometer er især egnet til at vurdere direkte MTT-reduktionsmidler og farveinterfererende testkemikalier, når OD-værdierne af vævsekstrakter opnået med testkemikaliets uden nogen korrektion for direkte MTT-reduktion og/eller farveinterferens ligger inden for spektrofotometrets lineære interval, eller når den ikke-korrigerede levedygtighedsprocent opnået med testkemikaliets allerede definerer det som ætsende (jf. punkt 35 og 36). Ikke desto mindre bør resultaterne for testkemikalier, der fremkalder %NSMTT og/eller %NSC_{living} på $> 50\%$ af den negative kontrol, tages med forsigtighed.
30. For farvede testkemikalier, som ikke er kompatible med måling af standardabsorbans (OD) som følge af deres kraftige interferens i MTT-assayet, kan den alternative HPLC-/UPLC-spektrofotometriprocedure til måling af MTT-formazan anvendes (jf. punkt 31) (37). HPLC-/UPLC-spektrofotometrisystemet giver mulighed for at separere MTT-formazan fra testkemikaliets før kvantificering (38). Af denne grund kræves NSC_{living}- eller NSC_{killed}-kontroller aldrig, når der anvendes HPLC-/UPLC-spektrofotometri, uafhængigt af det testede kemikalie. NSMTT-kontroller bør dog benyttes, hvis testkemikaliets mistænkes for at være direkte MTT-reducerende eller har en farve, som forhindrer vurderingen af dets evne til direkte at reducere MTT (som beskrevet i punkt 26). Ved benyttelse af HPLC-/UPLC-spektrofotometri til at måle MTT-formazan beregnes procenten for vævslevedygtighed som procentdelen af toparealet for MTT-formazan opnået med levende væv, som eksponeres for testkemikaliets, set i forhold til toparealet for MTT-formazan opnået med den sideløbende negative kontrol. For testkemikalier, der er direkte MTT-reducerende, beregnes den faktiske vævslevedygtighed som procenten for vævslevedygtighed opnået med levende væv eksponeret for testkemikaliets minus %NSMTT. Endelig bør det bemærkes, at direkte MTT-reduktionsmidler, der også kan være farveinterfererende, og som tilbageholdes i vævet efter behandling og reducerer MTT så kraftigt, at de fører til OD-værdier (ved måling af standard-OD) eller toparealer (ved UPLC/HPLC-spektrofotometri) for de testede vævsekstrakter, der falder uden for spektrofotometrets linearitetsinterval, ikke kan vurderes, skønt dette kun forventes at forekomme i meget sjældne situationer.

31. HPLC-/UPLC-spektrofotometri kan også anvendes med alle typer af testkemikalier (farvede, ikke-farvede, MTT-reducerende og ikke-MTT-reducerende) til måling af MTT-formazan (38). Da der findes mange forskellige HPLC-/UPLC-spektrofotometrisystemer, bør HPLC-/UPLC-spektrofotometrisystemets kvalificering påvises før anvendelsen heraf til at kvantificere MTT-formazan fra vævsekstrakter ved at opfylde acceptkriterierne for en række parametre for standardkvalificering baseret på dem, der er beskrevet i retningslinjerne for industrien for bioanalytisk metodevalidering fra den amerikanske Food and Drug Administration (FDA) (38) (39). Disse centrale parametre og deres acceptkriterier er vist i tillæg 4. Når acceptkriterierne i tillæg 4 er opfyldt, anses HPLC-/UPLC-spektrofotometrisystemet for at være kvalificeret og klar til at måle MTT-formazan under de forsøgsbetingelser, som er beskrevet i denne forsøgsmetode.

Acceptkriterier

32. For hver forsøgsmetode med egnede RhE-modeller bør væv behandlet med den negative kontrol udvise OD-værdier, der afspejler vævets kvalitet som beskrevet i tabel 2 og ikke er lavere end de forud fastsatte grænser. Væv behandlet med PC, dvs. iseddikesyre eller 8N KOH, bør afspejle vævets evne til at reagere på et ætsende kemikalie under de betingelser, der gælder for testmodellen (jf. tillæg 2). Variabiliteten mellem vævsprøver til testkemikalie og/eller kontrolkemikalier bør ligge inden for de accepterede grænser for hver egnet RhE-model (jf. tillæg 2) (f.eks. bør forskellen i levedygtighed mellem de to vævsprøver ikke overstige 30 %). Hvis enten den negative kontrol eller PC i en analyseserie falder uden for de accepterede intervaller, anses analyseserien for ikke at være kvalificeret, og den bør gentages. Hvis testkemikaliernes variabilitet falder uden for det opstillede interval, bør de testes på ny.

Fortolkning af resultater og forudsigelsesmodel

33. De OD-værdier, der opnås for hvert testkemikalie, anvendes til beregning af den procentvise levedygtighed i forhold til den negative kontrol, som sættes til 100 %. Hvis der benyttes HPLC-/UPLC-spektrofotometri, beregnes procenten for vævslevedygtighed som procenten af toparealet for MTT-formazan opnået med levende væv, som eksponeres for testkemikaliets, i forhold til toparealet for MTT-formazan opnået med den sideløbende negative kontrol. De procentvise tærskelværdier for cellelevedygtighed, som adskiller ætsende fra ikke-ætsende testkemikalier (eller som skelner mellem forskellige underkategorier for ætseevne), defineres nedenfor i punkt 35 og 36 for hver af de testmodeller, der er omfattet af denne forsøgsmetode, og bør anvendes til at fortolke resultaterne.
34. En analyseserie bestående af mindst to vævsprøver bør være tilstrækkelig for et testkemikalie, når klassificeringsresultatet er entydigt. I tilfælde af tvetydige resultater såsom diskordante gentagne målinger kan det overvejes at gennemføre en anden analyseserie samt en tredje, hvis resultaterne af de første to analyseserier er diskordante.
35. Forudsigelsesmodellen for EpiSkin™-testmodellen til vurdering af hudætsning (9) (34) (22), der hidrører fra UN GHS-/CLP-klassificeringssystemet, vises i tabel 4:

Tabel 4: EpiSkin™-forudsigelsesmodel

Levedygtighed målt efter eksponeringstid (t=3, 60 og 240 minutter)	Forudsigelse, der skal tages i betragtning
< 35 % efter 3 min. eksponering	Ætsende: • Valgfri underkategori 1A*
≥ 35 % efter 3 min. eksponering OG < 35 % efter 60 min. eksponering ELLER ≥ 35 % efter 60 min. eksponering OG < 35 % efter 240 min. eksponering	Ætsende: • En kombination af de valgfrie underkategorier 1B/ 1C
≥ 35 % efter 240 min. eksponering	Ikke-ætsende

*) Ifølge data genereret med henblik på at vurdere RhE-testmodellernes egnethed til at understøtte underkategorisering blev det påvist, at omkring 22 % af underkategori 1A-resultaterne for EpiSkin™-testmodellen måske rent faktisk består af underkategori 1B- eller 1C-stoffer/-blandinger (dvs. at de er overklassificeret) (jf. tillæg 3).

36. Forudsigelsesmodellerne for testmodellerne til vurdering af hudætsning EpiDerm™ SCT (10) (23) (35), SkinEthic™ RHE (17) (18) (23) (36) og epiCS® (16) (23) (37), der hidrører fra UN GHS-/CLP-klassificeringssystemet, vises i tabel 5:

Tabel 5: EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE og epiCS®

Levedygtighed målt efter eksponeringstid (t=3 og 60 minutter)	Forudsigelse, der skal tages i betragtning
TRIN 1 for EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE og epiCS®	
< 50 % efter 3 min. eksponering	Ætsende
≥ 50 % efter 3 min. eksponering OG < 15 % efter 60 min. eksponering	Ætsende
≥ 50 % efter 3 min. eksponering OG ≥ 15 % efter 60 min. eksponering	Ikke-ætsende
TRIN 2 for EpiDerm™ SCT – for stoffer/blandinger, der blev identificeret som ætsende i trin 1	
< 25 % efter 3 min. eksponering	Valgfri underkategori 1A*
≥ 25 % efter 3 min. eksponering	En kombination af de valgfrie underkategorier 1B
TRIN 2 for SkinEthic™ RHE – for stoffer/blandinger, der blev identificeret som ætsende i trin 1	
< 18 % efter 3 min. eksponering	Valgfri underkategori 1A*
≥ 18 % efter 3 min eksponering	En kombination af de valgfrie underkategorier 1B
TRIN 2 for epiCS® – for stoffer/blandinger, der blev identificeret som ætsende i trin 1	

< 15 % efter 3 min. eksponering	Valgfri underkategori 1A*
≥ 15 % efter 3 min. eksponering	En kombination af de valgfrie underkategorier 1B

DATA OG RAPPORTERING

Data

37. For hver test bør data fra de enkelte vævsprøver (f.eks. OD-værdier og beregnet cellelevedygtighedsprocent for hvert testkemikalie samt klassificeringen) fremlægges i tabelform, herunder data fra eventuelle gentagelser af forsøget. Derudover bør gennemsnitsværdier og intervaller for levedygtighed og variationskoefficienter mellem vævsprøverne for hver enkelt test fremlægges. For hvert testet kemikalie fremlægges de direkte MTT-reduktionsmidlers eller farvede testkemikaliers iagttagne interaktioner med MTT-reagenset.

Testrapport

38. Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie og kontrolkemikalier:

- Stof med kun én bestanddel: kemisk identifikation, f.eks. IUPAC-navn eller CAS-navn, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel, renhed, kemisk identitet af urenheder, i det omfang det er relevant og praktisk muligt, osv.
- Stof med flere bestanddele, UVCB-stoffer og blandinger: kendetegnet så vidt muligt ved kemisk identitet (jf. ovenfor), kvantitativ forekomst og bestanddelenes relevante fysisk-kemiske egenskaber
- fysisk udseende, vandopløselighed og eventuelle yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber
- oprindelse, evt. batchnummer
- behandling af testkemikaliets/kontrolstoffet inden testning, hvis det er relevant (f.eks. opvarmning, formaling)
- testkemikaliets stabilitet, sidste anvendelsesdato eller dato for ny analyse, hvis dette er kendt
- opbevaringsforhold.

Anvendt RhE-model og protokol og begrundelse herfor (hvis relevant)

Testbetingelser:

- anvendt RhE-model (herunder batchnummer)

- kalibreringsoplysninger for måleudstyr (f.eks. spektrofotometer), bølglængde og båndpas (hvis relevant) anvendt til kvantificering af MTT-formazan og måleudstyrets linearitetsinterval
- beskrivelse af den metode, der blev anvendt til kvantificering af MTT-formazan
- eventuelt beskrivelse af kvalificeringen af HPLC-/UPLC-spektrofotometrisystemet
- komplet dokumentation for den anvendte RhE-model, herunder om dens ydeevne. Der bør bl.a. gives oplysninger om:
 - i) levedygtighed
 - ii)barrierefunktion
 - iii) morfologi
 - iv) reproducerbarhed og forudsigelsesevne
 - v)kvalitetskontroller (QC) af modellen
- reference til historiske data for modellen. Der bør bl.a. gives oplysning om:
- hvorvidt QC-dataene kan accepteres, sammenlignet med historiske batchdata
- påvisning af kompetence til at anvende forsøgsmetoden inden rutinemæssig brug ved at teste kompetencestofferne.

Testprocedure:

- detaljer om den anvendte testprocedure (herunder anvendte vaskeprocedurer efter eksponering)
- anvendte doser af testkemikalie og kontrolkemikalier
- eksponeringsperiodens/-periodernes varighed og eksponeringstemperatur(er)
- eventuel angivelse af kontroller anvendt til direkte MTT-reduktionsmidler og/eller farvede testkemikalier
- antal vævsprøver anvendt pr. testkemikalie og kontrol (PC, negativ kontrol og NSMTT, NSCliving og NSCKilled, hvis relevant) pr. eksponeringsperiode
- beskrivelse af beslutningskriterier/forudsigelsesmodel baseret på den anvendte RhE-model
- beskrivelse af eventuelle ændringer i forsøgsmetoden (herunder vaskeprocedurer).

Acceptkriterier for analyseserier og test:

- middelværdier for positive og negative kontroller og acceptintervaller på grundlag af historiske data
- acceptabel variabilitet mellem vævsprøver til positiv og negativ kontrol
- acceptabel variabilitet mellem vævsprøver til testkemikaliet.

Resultater:

- angivelse i tabelform af data for hvert enkelt testkemikalie og hver enkelt kontrol, for hver eksponeringsperiode, hver analyseserie og hver gentagen måling, herunder OD-værdier eller topareal for MTT-formazan, vævslevedygtighedsprocent, gennemsnitlig vævslevedygtighedsprocent, vævsprøveforskelle, eventuelle standardafvigelser og/eller variationskoefficienter
- eventuelle resultater af kontroller anvendt til direkte MTT-reduktionsmidler og/eller farvende testkemikalier, herunder OD-værdier eller topareal for MTT-formazan, %NSMTT, %NSCliving, %NSCKilled, vævsprøveforskelle, eventuelle standardafvigelser og/eller CV'er og endelig korrekt vævslevedygtighedsprocent
- resultater opnået med testkemikaliets/-kemikalierne og kontrolkemikalierne i forhold til de fastlagte acceptkriterier for analyseserier og test
- beskrivelse af andre observerede virkninger
- den afledte klassificering med henvisning til den anvendte forudsigelsesmodel og/eller de anvendte beslutningskriterier.

Diskussion af resultaterne

Konklusioner

LITTERATUR

- (1) UN (2013). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth Revised Edition, UN New York og Geneva. Tilgængelig på:
http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html
- (2) Kapitel B.4 i dette bilag, Akut hudirritation/-ætsning.
- (3) Kapitel B.40 i dette bilag, In vitro-hudætsning.
- (4) Kapitel B.65 i dette bilag, In vitro-membranbarriereforsøgsmetode.
- (5) Kapitel B.46 i dette bilag, In vitro-hudirritation: forsøgsmetode med rekonstrueret human epidermis.
- (6) OECD (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (7) Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile D.J., Gardner J.R., Gordon V.C., Hildebrand B., Lewis R.W., Liebsch M., Logemann P., Osborne R., Ponc M., Regnier J.F., Steiling W., Walker A.P., og Balls M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The report and Recommendations of ECVAM Workshop 6. *ATLA* 23:219-255.
- (8) Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., og Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and distribution of the Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 12:471-482.
- (9) Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Holzhutter H.-G., og Liebsch M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxicol. in Vitro* 12:483-524.
- (10) Liebsch M., Traue D., Barrabas C., Spielmann H., Uphill, P., Wilkins S., Wiemann C., Kaufmann T., Remmele M. og Holzhütter H. G. (2000). The ECVAM Prevalidation Study on the Use of EpiDerm for Skin Corrosivity Testing, *ATLA* 28: 371-401.
- (11) Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., Bruner L., Combes R.D., Ekwall B., Fielder R.J., Guillouzo A., Lewis R.W., Lovell D.P., Reinhardt C.A., Repetto G., Sladowski D., Spielmann H. og Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops, *ATLA* 23:129-147.

- (12) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.
- (13) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (2002). ICCVAM evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication No. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.
- (14) EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the EpiSkin™ Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3 April 1998.
- (15) EC-ECVAM (2000). Statement on the Application of the EpiDerm™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC14), 21 March 2000.
- (16) Hoffmann J., Heisler E., Karpinski S., Losse J., Thomas D., Siefken W., Ahr H.J., Vohr H.W. og Fuchs H.W. (2005). Epidermal-Skin-Test 1000 (EST-1000)-A New Reconstructed Epidermis for *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. *Toxicol. In Vitro* 19: 925-929.
- (17) Kandárová H., Liebsch M., Spielmann, H., Genschow E., Schmidt E., Traue D., Guest R., Whittingham A., Warren N., Gamer A.O., Remmele M., Kaufmann T., Wittmer E., De Wever B., og Rosdy M. (2006). Assessment of the Human Epidermis Model SkinEthic RHE for *In Vitro* Skin Corrosion Testing of Chemicals According to New OECD TG 431. *Toxicol. In Vitro* 20: 547-559.
- (18) Tornier C., Roquet M. og Fraissinette A.B. (2010). Adaptation of the Validated SkinEthic™ Reconstructed Human Epidermis (RHE) Skin Corrosion Test Method to 0.5 cm² Tissue Sample. *Toxicol. In Vitro* 24: 1379-1385.
- (19) EC-ECVAM (2006). Statement on the Application of the SkinEthic™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC25), 17 November 2006.
- (20) EC-ECVAM (2009). ESAC Statement on the Scientific Validity of an *In-Vitro* Test Method for Skin Corrosivity Testing: the EST-1000, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30), 12 June 2009.
- (21) OECD (2013). Summary Document on the Statistical Performance of Methods in OECD Test Guideline 431 for Sub-categorisation. Environment, Health, and

Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 190). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

- (22) Alépée N., Grandidier M.H., og Cotovio J. (2014). Sub-Categorisation of Skin Corrosive Chemicals by the EpiSkin™ Reconstructed Human Epidermis Skin Corrosion Test Method According to UN GHS: Revision of OECD Test Guideline 431. *Toxicol. In Vitro* 28:131-145.
- (23) Desprez B., Barroso J., Griesinger C., Kandárová H., Alépée N., og Fuchs, H. (2015). Two Novel Prediction Models Improve Predictions of Skin Corrosive Sub-categories by Test Methods of OECD Test Guideline No 431. *Toxicol. In Vitro* 29:2055-2080.
- (24) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Epidermis (RHE) Test Methods For Skin Corrosion in Relation to OECD TG 431. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 219). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris
- (25) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (26) Eskes C. *et al.* (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul.Toxicol.Pharmacol.* 62:393-403.
- (27) Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65:55-63.
- (28) Tinois E., *et al.* (1994). The Episkin Model: Successful Reconstruction of Human *Epidermis In Vitro*. In: *In Vitro* Skin Toxicology. Rougier A., Goldberg A.M og Maibach H.I. (Eds): 133-140.
- (29) Cannon C. L., Neal P.J., Southee J.A., Kubilus J. og Klausner M. (1994), New Epidermal Model for Dermal Irritancy Testing. *Toxicol. in Vitro* 8:889-891.
- (30) Ponec M., Boelsma E, Weerheim A, Mulder A, Bouwstra J og Mommaas M. (2000). Lipid and Ultrastructural Characterization of Reconstructed Skin Models. *Inter. J. Pharmaceu.* 203:211-225.
- (31) Tinois E., Tillier, J., Gaucherand, M., Dumas, H., Tardy, M. og Thivolet J. (1991). *In Vitro* and Post - Transplantation Differentiation of Human Keratinocytes Grown on the Human Type IV Collagen Film of a Bilayered Dermal Substitute. *Exp. Cell Res.* 193:310-319.

- (32) Parenteau N.L., Bilbo P, Nolte CJ, Mason VS og Rosenberg M. (1992). The Organotypic Culture of Human Skin Keratinocytes and Fibroblasts to Achieve Form and Function. *Cytotech.* 9:163-171.
- (33) Wilkins L.M., Watson SR, Prosky SJ, Meunier SF og Parenteau N.L. (1994). Development of a Bilayered Living Skin Construct for Clinical Applications. *Biotech. Bioeng.* 43/8:747-756.
- (34) EpiSkin™ SOP (December 2011). *INVITTOX* Protocol (No 118). EpiSkin™ Skin Corrosivity Test.
- (35) EpiDerm™ SOP (February 2012). Version MK-24-007-0024 Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ Skin Corrosion Test (EPI-200-SCT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm.
- (36) SkinEthic™ RHE SOP (January 2012). *INVITTOX* Protocol SkinEthic™ Skin Corrosivity Test.
- (37) EpiCS® SOP (January 2012). Version 4.1 *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test Epidermal Skin Test 1000 (epiCS®) CellSystems.
- (38) Alépée N., Barroso J., De Smedt A., De Wever B., Hibatallah J., Klaric M., Mewes K.R., Millet M., Pfannenbecker U., Tailhardat M., Templier M., og McNamee P. Use of HPLC/UPLC-spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29: 741-761.
- (39) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. (May 2001).
Tilgængelig på:
[\[http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf\]](http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf).

Tillæg 1

DEFINITIONER

Nøjagtighed: overensstemmelsen mellem forsøgsmetodens resultater og accepterede referenceværdier. Den er et mål for forsøgsmetodens ydeevne og et af aspekterne af relevans. Udtrykket benyttes ofte som synonym for "konkordans", forstået som den andel af korrekte udfald, forsøgsmetoden fører til (25).

Cellelevedygtighed: en parameter, der måler den samlede aktivitet i en cellepopulation, f.eks. udtrykt ved de cellulære mitochondriedehydrogenasers evne til at reducere vitalfarvestoffet MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, thiazolylblåt], og som, afhængigt af det valgte endepunkt og testens udformning, korrelerer med det totale antal levende celler og/eller deres levedygtighed.

Kemikalie: et stof eller en blanding.

Konkordans: et mål for ydeevnen af en forsøgsmetode, der fører til kategoriske resultater, og et af aspekterne af relevans. Udtrykket benyttes af og til som synonym for nøjagtighed og defineres som andelen af alle kemikalier, der klassificeres korrekt som positive eller negative. Konkordansen afhænger i høj grad af forekomsten af positiver i de undersøgte typer testkemikalier (25).

ET₅₀: kan bedømmes ved at bestemme den eksponeringstid, der er nødvendig for at nedsætte cellernes levedygtighed med 50 % ved påføring af referencekemikaliets i en nærmere angivet fast koncentration, se også IC₅₀.

GHS (det globale harmoniserede system for klassificering og mærkning af kemikalier): et system til klassificering af kemikalier (stoffer og blandinger) efter standardiserede typer og niveauer af fysisk fare, sundhedsfare og miljøfare med tilhørende kommunikationselementer såsom piktogrammer, signalord, faresætninger, sikkerhedssætninger og sikkerhedsdatablade, således at oplysninger om kemikaliernes skadelige virkninger kan videreformidles med henblik på at beskytte mennesker (f.eks. arbejdsgivere, arbejdstagere, transportører, forbrugere og redningspersonel) og miljøet (1).

HPLC: High Performance Liquid Chromatography (højtrykssvækekromatografi)

IATA: integreret tilgang til testning og vurdering.

IC₅₀: kan bedømmes ved at bestemme den koncentration, ved hvilken et referencekemikalie nedsætter vævets levedygtighed med 50 % (IC₅₀) efter en fast eksponeringstid, se også ET₅₀.

Ubegrænset dosis: den mængde testkemikalie, som er påført på epidermis ud over den mængde, der er nødvendig for helt at dække epidermisoverfladen på ensartet måde. **Blanding:** en blanding eller opløsning, der er sammensat af to eller flere stoffer, hvori de ikke reagerer.

Stof med kun én bestanddel: et stof, der defineres af sin mængdemæssige sammensætning, hvori en hovedbestanddel udgør mindst 80 % (w/w).

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, thiazolylblåt tetrazoliumbromid.

Stof med flere bestanddele: et stof, der defineres ved dets mængdemæssige sammensætning, hvori flere end én hovedbestanddel er til stede i en koncentration på $> 10\%$ (w/w) og $< 80\%$ (w/w). Et stof, der består af flere forskellige bestanddele, er resultatet af en fremstillingsproces. Forskellen mellem en blanding og et stof med flere bestanddele er, at blandingen er fremstillet ved blanding af to eller flere stoffer uden kemisk reaktion. Et stof, der består af flere forskellige bestanddele, er resultatet af en kemisk reaktion.

NC: Ikke-ætsende.

NSC_{killed}-kontrol: kontrol af ikke-specifik farve i dødt væv.

NSC_{living}-kontrol: kontrol af ikke-specifik farve i levende væv.

NSMTT: ikke-specifik MTT-reduktion.

OD: optisk tæthed.

PC: positiv kontrol, et replikat, som indeholder alle komponenterne fra et testsystem og er behandlet med et kemikalie, som vides at inducere en positiv respons. For at sikre, at det er muligt at vurdere variabiliteten i den positive kontrolrespons over tid, bør den positive respons ikke være overdrevent stor.

Ydeevnestandarder (PS): standarder, der med udgangspunkt i en valideret forsøgsmetode danner grundlag for at vurdere, om en foreslået forsøgsmetode, som er mekanistisk og funktionelt tilsvarende, er sammenlignelig. De omfatter bl.a. i) de centrale dele af forsøgsmetoden, ii) en minimumsliste med referencekemikalier, som er udvalgt blandt de kemikalier, der er benyttet til at påvise, at den validerede forsøgsmetodes ydeevne er acceptabel, og iii) de tilsvarende niveauer af pålidelighed og nøjagtighed, som er fastsat efter, hvad der er opnået med den validerede forsøgsmetode, og som det bør påvises, at den foreslåede forsøgsmetode kan yde, ved vurdering ud fra minimumslisten med referencekemikalier (25).

Relevans: beskrivelse af sammenhængen mellem forsøgsmetoden og den pågældende virkning og dens meningsfuldhed og brugbarhed til et bestemt formål. Det angives, i hvilket omfang forsøgsmetoden måler eller forudsiger den pågældende biologiske virkning korrekt. Forsøgsmetodens nøjagtighed (konkordans) indgår i vurderingen af dens relevans (25).

Pålidelighed: mål for, i hvilken grad en forsøgsmetode kan reproduceres i og mellem laboratorier over en længere periode, når den udføres efter samme protokol. Den bedømmes ved beregning af reproducerbarhed inden for og mellem laboratorier (25).

Analyseserie: en analyseserie består af et eller flere testkemikalier, der testes samtidig med en negativ kontrol og en PC.

Følsomhed: andelen af alle positive/aktive kemikalier, der klassificeres korrekt ved forsøgsmetoden. Den er et mål for nøjagtigheden af en forsøgsmetode, som giver kategoriske resultater, og er et vigtigt kriterium ved vurderingen af en forsøgsmetodes relevans (25).

Hudætsning – in vivo: fremkaldelse af irreversibel skade på huden, dvs. synlig nekrose gennem epidermis og ned i dermis efter påføring af et testkemikalie i indtil fire timer. Typiske ætsningsreaktioner er sår, blødning, blodige skorper, efter 14 dages observation affarvning som følge af blegning af huden, hele områder med alopeci samt ardannelse. Tvivlsomme læsioner bør overvejes vurderet ved histopatologisk undersøgelse.

Specificitet: andelen af alle negative/inaktive kemikalier, der klassificeres korrekt ved forsøgsmetoden. Den er et mål for nøjagtigheden af en forsøgsmetode, som giver kategoriske resultater, og er et vigtigt kriterium ved vurderingen af en forsøgsmetodes relevans (25).

Stof: et grundstof og forbindelser heraf, naturlige eller industrielt fremstillede, indeholdende sådanne tilsætningsstoffer, som er nødvendige til bevarelse af stoffets stabilitet, og sådanne urenheder, som følger af fremstillingsprocessen, bortset fra opløsningsmidler, som kan udskilles, uden at det påvirker stoffets stabilitet eller ændrer dets sammensætning. **Testkemikalie:** alle stoffer eller blandinger, der testes ved hjælp af denne forsøgsmetode.

UPLC: Ultra-High Performance Liquid Chromatography (ultra-højtryksvæskechromatografi).

UVCB: stoffer med ukendt eller variabel sammensætning, komplekse reaktionsprodukter eller biologiske materialer.

Tillæg 2

VIGTIGSTE KOMPONENTER I RHE-TESTMODELLER, SOM ER VALIDERET TIL VURDERING AF HUDÆTSNING

Testmodellernes komponenter	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Modelareal	0,38 cm ²	0,63 cm ²	0,5 cm ²	0,6 cm ²
Antal vævsprøver	Mindst to pr. eksponeringsperiode	To-tre pr. eksponeringsperiode	Mindst to pr. eksponeringsperiode	Mindst to pr. eksponeringsperiode

Testmodellernes komponenter	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Behandlingsdoser og påføring	<u>Væsker og viskøse stoffer:</u> 50 µl ± 3 µl (131,6 µl/cm²) <u>Faste stoffer:</u> 20 ± 2 mg (52,6 mg/cm²) + 100 µl ± 5 µl NaCl-opløsning (9 g/l) <u>Voks/klæbrige stoffer:</u> 50 ± 2 mg (131,6 mg/cm²) med et nylonnet	<u>Væsker:</u> 50 µl (79,4 µl/cm²) med eller uden et nylonnet <i>Forudgående test af testkemikaliets kompatibilitet med nylonnet</i> <u>Halvfaste stoffer:</u> 50 µl (79,4 µl/cm²) <u>Faste stoffer:</u> 25 µl H₂O (eller mere om nødvendigt) + 25 mg (39,7 mg/cm²) <u>Voks:</u> flad "småcake" med en diameter på ca. 8 mm anbragt oven på vævet og befugtet med 15 µl H₂O.	<u>Væsker og viskøse stoffer:</u> 40 µl ± 3 µl (80 µl/cm²) ved anvendelse af nylonnet <i>Forudgående test af testkemikaliets kompatibilitet med nylonnet</i> <u>Faste stoffer:</u> 20 µl ± 2 µl H₂O + 20 ± 3 mg (40 mg/cm²) <u>Voks/klæbrige stoffer:</u> 20 ± 3 mg (40 mg/cm²) ved anvendelse af nylonnet	<u>Væsker:</u> 50 µl (83,3 µl/cm²) ved anvendelse af nylonnet <i>Forudgående test af testkemikaliets kompatibilitet med nylonnet</i> <u>Halvfaste stoffer:</u> 50 µl (83,3 µl/cm²) <u>Faste stoffer:</u> 25 mg (41,7 mg/cm²) + 25 µl H₂O (eller mere om nødvendigt) <u>Voks:</u> flad "småcake" med en diameter på ca. 8 mm anbragt oven på vævet og befugtet med 15 µl H₂O.
Forhåndskontrol for direkte MTT-reduktion	50 µl (væske) eller 20 mg (fast stof) + 2 ml MTT 0,3 mg/ml opløsning i 180 ± 5 min. ved 37 °C, 5 % CO₂, 95 % RH → Hvis opløsningen bliver blå/violet, bør der gennemføres tilpassede "water-killed"-kontroller.	50 µl (væske) eller 25 mg (fast stof) + 1 ml MTT 1 mg/ml opløsning i 60 min. ved 37 °C, 5 % CO₂, 95 % RH → Hvis opløsningen bliver blå/violet, bør der gennemføres tilpassede "freeze-killed"-kontroller.	40 µl (væske) eller 20 mg (fast stof) + 1 ml MTT 1 mg/ml opløsning i 180 ± 15 min ved 37 °C, 5 % CO₂, 95 % RH → Hvis opløsningen bliver blå/violet, bør der gennemføres tilpassede "freeze-killed"-kontroller.	50 µl (væske) eller 25 mg (fast stof) + 1 ml MTT 1 mg/ml opløsning i 60 min. ved 37 °C, 5 % CO₂, 95 % RH → Hvis opløsningen bliver blå/violet, bør der gennemføres tilpassede "freeze-killed"-kontroller.

Testmodellernes komponenter	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Forhåndskontrol for farveinterferens	10 µl (væske) eller 10 mg (fast stof) + 90 µl H ₂ O blandet i 15 min. ved stuetemperatur → Hvis opløsningen bliver farvet, bør der gennemføres tilpassede "living"-kontroller.	50 µl (væske) eller 25 mg (fast stof) + 300 µl H ₂ O i 60 min. ved 37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % RH → Hvis opløsningen bliver farvet, bør der gennemføres tilpassede "living"-kontroller.	40 µl (væske) eller 20 mg (fast stof) + 300 µl H ₂ O blandet i 60 min. ved stuetemperatur → Hvis testkemikaliet er farvet, bør der gennemføres tilpassede "living"-kontroller.	50 µl (væske) eller 25 mg (fast stof) + 300 µl H ₂ O i 60 min. ved 37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % RH → Hvis opløsningen bliver farvet, bør der gennemføres tilpassede "living"-kontroller.
Eksponering – tid og temperatur	3 min, 60 min (± 5 min) og 240 min (± 10 min) i et ventileret kammer stuetemperatur (RT, 18-28 °C)	3 min ved RT og 60 min ved 37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % RH	3 min ved RT og 60 min ved 37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % RH	3 min ved RT og 60 min ved 37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % RH
Skylning	25 ml 1x PBS (2 ml/ad gangen)	20 gange med en jævn blid stråle af 1x PBS	20 gange med en jævn blid stråle af 1x PBS	20 gange med en jævn blid stråle af 1x PBS
Negativ kontrol	50 µl NaCl-opløsning (9 g/l) Testet med hver eksponeringstid	50 µl H ₂ O Testet med hver eksponeringstid	40 µl H ₂ O Testet med hver eksponeringstid	50 µl H ₂ O Testet med hver eksponeringstid
Positiv kontrol	50 µl iseddikesyre Kun testet i fire timer	50 µl 8N KOH Testet med hver eksponeringstid	40 µl 8N KOH Kun testet i en time	50 µl 8N KOH Testet med hver eksponeringstid
MTT-opløsning	2 ml 0,3 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml

Testmodellernes komponenter	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
MTT-inkubation tid og temperatur	180 min (± 15 min) ved 37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % RH	180 min ved 37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % RH	180 min (± 15 min) ved 37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % RH	180 min ved 37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % RH
Ekstraktionsopløsningsmiddel	500 µl sur isopropanol (0,04 N HCl i isopropanol) (det isolerede væv er helt nedsænket)	2 ml isopropanol (ekstraktion fra top og bund af indsatsen)	1,5 ml isopropanol (ekstraktion fra top og bund af indsatsen)	2 ml isopropanol (ekstraktion fra top og bund af indsatsen)
Ekstraktion tid og temperatur	Natten over ved RT, beskyttet mod lys	Natten over uden rystning ved RT eller i 120 min med rystning (~ 120 o/min.) ved RT	Natten over uden rystning ved RT eller i 120 min med rystning (~ 120 o/min.) ved RT	Natten over uden rystning ved RT eller i 120 min med rystning (~ 120 o/min.) ved RT
OD-aflæsning	570 nm (545 - 595 nm) uden referencefilter	570 nm (eller 540 nm) uden referencefilter	570 nm (540 - 600 nm) uden referencefilter	540 - 570 nm uden referencefilter
Kvalitetskontrol af væv	behandling i 18 timer med SDS 1,0 mg/ml ≤ IC ₅₀ ≤ 3,0 mg/ml	behandling med 1 % Triton X-100 4,08 timer ≤ ET ₅₀ ≤ 8,7 timer	behandling med 1 % Triton X-100 4,0 timer ≤ ET ₅₀ ≤ 10,0 timer	behandling med 1 % Triton X-100 2,0 timer ≤ ET ₅₀ ≤ 7,0 timer

Testmodellernes komponenter	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Acceptkriterier	1. Den gennemsnitlige OD for vævsprøver behandlet med negativt kontrolstof (NaCl) bør være $\geq 0,6$ og $\leq 1,5$ for hver eksponeringstid. 2. Den gennemsnitlige levedygtighed for vævsprøver eksponeret i fire timer for positivt kontrolstof (iseddikesyre), udtrykt som % af den negative kontrol, bør være ≤ 20 %. 3. I intervallet 20-100 % levedygtighed og ved OD $\geq 0,3$ bør forskellen i levedygtighed mellem de to vævsprøver ikke overstige 30 %.	1. Den gennemsnitlige OD for vævsprøver behandlet med negativt kontrolstof (H₂O) bør være $\geq 0,8$ og $\leq 2,8$ for hver eksponeringstid. 2. Den gennemsnitlige levedygtighed for vævsprøver eksponeret i en time for positivt kontrolstof (8N KOH), udtrykt som % af den negative kontrol, bør være < 15 %. 3. I intervallet 20-100 % levedygtighed bør variationskoefficienten (CV) mellem vævsprøverne være ≤ 30 %.	1. Den gennemsnitlige OD for vævsprøver behandlet med negativt kontrolstof (H₂O) bør være $\geq 0,8$ og $\leq 3,0$ for hver eksponeringstid. 2. Den gennemsnitlige levedygtighed for vævsprøver eksponeret i en time (og eventuelt fire timer) for positivt kontrolstof (8N KOH), udtrykt som % af den negative kontrol, bør være < 15 %. 3. I intervallet 20-100 % levedygtighed og ved OD $\geq 0,3$ bør forskellen i levedygtighed mellem de to vævsprøver ikke overstige 30 %.	1. Den gennemsnitlige OD for vævsprøver behandlet med negativt kontrolstof (H₂O) bør være $\geq 0,8$ og $\leq 2,8$ for hver eksponeringstid. 2. Den gennemsnitlige levedygtighed for vævsprøver eksponeret i en time for positivt kontrolstof (8N KOH), udtrykt som % af den negative kontrol, bør være < 20 %. 3. I intervallet 20-100 % levedygtighed og ved OD $\geq 0,3$ bør forskellen i levedygtighed mellem de to vævsprøver ikke overstige 30 %.

Tillæg 3

TESTMODELRESULTATER VED UNDERKATEGORISERING

Nedenstående tabel viser resultaterne for de fire testmodeller beregnet ud fra et sæt med 80 kemikalier, som er testet af de fire testudviklere. Beregningerne blev foretaget af OECD's sekretariat og gennemgået og godkendt af en ekspertundergruppe (21) (23).

Testmodellerne EpiSkin™, EpiDerm™, SkinEthic™ og epiCS® er i stand til at foretage denne underkategorisering (dvs. 1A versus 1B/1C versus NC).

Resultater, overklassificeringsprocenter, underklassificeringsprocenter og nøjagtighed (forudsigelsesevne) for de fire testmodeller baseret på et sæt med 80 kemikalier, som alle blev testet i to eller tre analyseserier i hver testmodel:

STATISTIKKER OVER FORUDSIGELIGHED OPNÅET I HELE KEMIKALIESÆTTET				
(n= 80 kemikalier testet i to uafhængige analyseserier for epiCS® eller tre uafhængige analyseserier for EpiDerm™ SCT, EpiSkin™ og SkinEthic™ RHE, dvs. henholdsvis 159* eller 240 klassificeringer)				
*et kemikalie blev testet en gang i epiCS® på grund af manglende tilgængelighed (23)				
	EpiSkin™	EpiDerm™	SkinEthic™	epiCS®
Overklassificeringer:				
1B/1C overklassificeret 1A	21,50 %	29,0 %	31,2 %	32,8 %
NC overklassificeret 1B/1C	20,7 %	23,4 %	27,0 %	28,4 %
NC overklassificeret 1A	0,00 %	2,7 %	0,0 %	0,00 %
Overklassificeret korr.	20,7 %	26,1 %	27,0 %	28,4 %
Samlet overklassificeringsprocent (alle	17,9 %	23,3 %	24,5 %	25,8 %
Underklassificeringer:				
1A underklassificeret 1B/1C	16,7 %	16,7 %	16,7 %	12,5 %
1A underklassificeret NC	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
1B/1C underklassificeret NC	2,2 %	0,00 %	7,5 %	6,6 %
Samlet underklassificeringsprocent (alle	3,3 %	2,5 %	5,4 %	4,4 %
Korrekte klassificeringer:				
1A korrekt klassificeret	83,3 %	83,3 %	83,3 %	87,5 %
1B/1C korrekt klassificeret	76,3 %	71,0 %	61,3 %	60,7 %

NC korrekt klassificeret	79,3 %	73,9 %	73,0 %	71,62 %
Generel nøjagtighed	78,8 %	74,2 %	70 %	69,8 %

NC: Ikke-ætsende

Tillæg 4

Nøgleparametre og acceptkriterier for kvalificering af et HPLC-/UPLC-spektrofotometrisystem til måling af MTT-formazan ekstraheret fra RhE-væv

Parameter	Protokol fra FDA-vejledning (37) (38)	Acceptkriterier
Selektivitet	Analyse af isopropanol, "living blank" (isopropanolekstrakt fra levende RhE-væv uden behandling), "dead blank" (isopropanolekstrakt fra dødt RhE-væv uden behandling)	$A_{\text{areal, interferens}} \leq 20 \% \text{ af } A_{\text{areal, LLOQ}}^1$
Præcision	Kvalitetskontroller (dvs. MTT-formazan ved 1,6 µg/ml, 16 µg/ml og 160 µg/ml) i isopropanol (n=5)	$CV \leq 15 \% \text{ eller } \leq 20 \% \text{ for LLOQ}$
Nøjagtighed	Kvalitetskontroller i isopropanol (n=5)	$\%Dev \leq 15 \% \text{ eller } \leq 20 \% \text{ for LLOQ}$
Matrixvirkning	Kvalitetskontroller i "living blank" (n=5)	$85 \% \leq \text{matrixvirkning i } \% \leq 115 \%$
Overførsel	Analyse af isopropanol efter en ULOQ ² -standard	$A_{\text{areal, interferens}} \leq 20 \% \text{ af } A_{\text{areal, LLOQ}}$
Reproducerbarhed (inden for en dag)	Tre uafhængige kalibreringskurver (baseret på seks på hinanden følgende 1/3-opløsninger af MTT-formazan i isopropanol begyndende ved ULOQ, dvs. 200 µg/ml). Kvalitetskontroller i isopropanol (n=5)	Kalibreringskurver: $\%Dev \leq 15 \% \text{ eller } \leq 20 \% \text{ for LLOQ}$ Kvalitetskontroller: $\%Dev \leq 15 \% \text{ og } CV \leq 15 \%$
Reproducerbarhed (over flere dage)	Dag 1: En kalibreringskurve og kvalitetskontroller i isopropanol (n=3)	
	Dag 2: En kalibreringskurve og kvalitetskontroller i isopropanol (n=3)	
	Dag 3: En kalibreringskurve og kvalitetskontroller i isopropanol (n=3)	
MTT-formazans kortsigtede stabilitet i RhE-vævsekstrakt	Kvalitetskontroller i "living blank" (n=3) analyseret på præpareringsdagen og efter 24 timers opbevaring ved stuetemperatur	$\%Dev \leq 15 \%$
MTT-formazans langsigtede stabilitet i RhE-vævsekstrakt (hvis påkrævet)	Kvalitetskontroller i "living blank" (n=3) analyseret på præpareringsdagen og efter flere dages opbevaring ved en bestemt temperatur (f.eks. 4 °C, -20 °C, -80 °C)	$\%Dev \leq 15 \%$

1LLOQ: nedre grænse for kvantitativ bestemmelse, defineret så den dækker 1-2 % vævslevedygtighed, dvs. 0,8 µg/ml.

2ULOQ: øvre grænse for kvantitativ bestemmelse, defineret så den er mindst to gange så høj som den højeste forventede MTT-formazankoncentration i isopropanolekstrakter fra negative kontroller, dvs. 200 µg/ml."

(7) Del B, kapitel B.46, affattes således:

"B.46 IN VITRO-HUDIRRITATION: FORSØGSMETODE MED REKONSTRUERET HUMAN EPIDERMIS

INDLEDNING

1. Denne forsøgsmetode svarer til OECD's testvejledning (Test Guideline (TG)) 439 (2015). Hudirritation defineres som fremkomsten af reversible hudskader efter påføring af et testkemikalie i op til fire timer [som defineret i De Forenede Nationers (FN's) globale harmoniserede system for klassificering og mærkning af kemikalier (GHS)] (1) og Den Europæiske Unions (EU's) forordning 1272/2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger (CLP)¹. Denne forsøgsmetode omfatter en in vitro-procedure, som kan anvendes til fareidentifikation af irriterende kemikalier (stoffer og blandinger) i UN GHS-/CLP-kategori 2 (2). I områder, der ikke arbejder med den valgfrie UN GHS-kategori 3 (mildt irriterende stoffer), kan denne forsøgsmetode også anvendes til at identificere ikke-klassificerede kemikalier. Derfor kan denne forsøgsmetode alt efter lovrammen og det anvendte klassificeringssystem benyttes til at bestemme kemikaliers irriterende virkning enten som en enkeltstående erstatningstest for in vivo-testning for hudirritation eller som en delvis erstatningstest inden for en teststrategi (3).
2. Vurderingen af hudirritation har typisk omfattet brug af laboratoriedyr (TM B.4, som svarer til OECD TG 404, der oprindeligt blev vedtaget i 1981 og revideret i 1992, 2002 og 2015) (4). Til testning af kemikaliers ætsende virkning er tre validerede in vitro-forsøgsmetoder blevet vedtaget som TM B.40 (der svarer til OECD TG 430), TM B.40.A (der svarer til OECD TG 431) og TM B.65 (der svarer til OECD TG 435) (5) (6) (7). Et vejledende dokument fra OECD om integrerede tilgange til testning og vurdering (IATA) vedrørende hudætsning og -irritation beskriver flere moduler, som grupperer informationskilder og analyseværktøjer, og vejleder i, i) hvordan eksisterende forsøgsdata og ikke-forsøgsdata integreres i og anvendes til vurdering af kemikaliers hudirritations- og hudætsningspotentiale, og ii) foreslår en tilgang, når der er behov for yderligere testning (3).
3. Denne forsøgsmetodes endepunkt for menneskers sundhed er hudirritation. Den er baseret på in vitro-testsystemet med rekonstrueret human epidermis (RhE), som ret nøje efterligner

¹ Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1272/2008 af 16. december 2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger og om ændring og ophævelse af direktiv 67/548/EØF og 1999/45/EF og om ændring af forordning (EF) nr. 1907/2006 (EUT L 353 af 31.12.2008, s. 1).

de biokemiske og fysiologiske egenskaber i de øvre dele af menneskehud, dvs. epidermis. I RhE-testsystemet benyttes humant afledte ikke-transformerede keratinocytter som cellekilde til rekonstruktion af en epidermal model med repræsentativ histologi og cytoarkitektur. Der findes ydeevnestandarder (PS), som letter validering og vurdering af lignende og ændrede RhE-baserede forsøgsmetoder i overensstemmelse med principperne i OECD's vejledende dokument nr. 34 (8) (9). Den tilsvarende testvejledning blev oprindeligt vedtaget i 2010, opdateret i 2013 for at medtage yderligere RhE-modeller og igen opdateret i 2015 for at referere til det vejledende IATA-dokument og indføre anvendelsen af en alternativ procedure til måling af levedygtighed.

4. Der er gennemført prævaliderings-, optimerings- og valideringsundersøgelser for fire in vitro-testmodeller, der findes i handelen (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28), og som er baseret på RhE-testsystemet (følsomhed 80 %, specificitet 70 % og nøjagtighed 75 %). Disse fire testmodeller er medtaget i denne TG og står opført i tillæg 2, hvor der også findes oplysninger om den type valideringsundersøgelse, der blev anvendt til at validere de forskellige forsøgsmetoder. Som nævnt i tillæg 2 er den validerede referencemetode (VRM) blevet anvendt til at udvikle denne forsøgsmetode og ydeevnestandarderne (8).
5. OECD-aftalen om gensidig anerkendelse af data vil først være garanteret for testmodeller valideret i henhold til ydeevnestandarderne (8), hvis disse testmodeller er blevet gennemgået og vedtaget af OECD. De testmodeller, der er medtaget i denne forsøgsmetode og den tilhørende OECD-testvejledning, kan anvendes vilkårligt til at opfylde forskellige landes krav til testresultater for in vitro-forsøgsmetoder til vurdering af hudirritation og drager samtidig fordel af aftalen om gensidig anerkendelse af data.
6. Definitioner for de udtryk, der er anvendt i dette dokument, findes i tillæg 1.

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER

7. Forsøgsmetoden er som påvist ved den fulde prospektive valideringsundersøgelse til vurdering og karakterisering af RhE-forsøgsmetoder (16) begrænset derved, at den ikke giver mulighed for klassificering af kemikalier i den valgfrie UN GHS-kategori 3 (mildt irriterende stoffer) (1). Det er således lovrammen i medlemsstaterne, der afgør, hvordan denne forsøgsmetode anvendes. For EU er kategori 3 ikke taget op i CLP. For fuldt ud at kunne vurdere de lokale virkninger på huden efter en enkelt dermal eksponering bør OECD's vejledende dokument om integrerede tilgange til testning og vurdering (IATA) følges (3). Det anerkendes, at brugen af human hud er underlagt nationale og internationale etiske hensyn og betingelser.
8. Denne forsøgsmetodes endepunkt for menneskers sundhed er hudirritation. Forsøgsmetoden giver ikke fyldestgørende oplysninger om hudætsning, men det skal

bemærkes, at TM B.40.A (som svarer til OECD TG 431) om hudætsning er baseret på det samme RhE-testsystem, dog med en anden protokol (6). Denne forsøgsmetode er baseret på RhE-modeller, hvor der anvendes humane keratinocytter, som derfor in vitro repræsenterer de pågældende arters målorgan. Den omfatter endvidere direkte det indledende trin i den inflammatoriske kaskade/aktionsmekanisme (celle- og vævsbeskadigelse, der forårsager lokalt traume), som forekommer i forbindelse med in vivo-irritation. Der er blevet testet en lang række forskellige kemikalier i forbindelse med valideringen af denne forsøgsmetode, og databasen for valideringsundersøgelsen omfattede 58 kemikalier i alt (16) (18) (23). Forsøgsmetoden kan benyttes til test af faste stoffer, væsker, halvfaste stoffer og voks. Væsker kan være vandige eller ikke-vandige, og faste stoffer kan være opløselige eller uopløselige i vand. Faste stoffer skal males til et fint pulver, før de påføres, når det overhovedet er muligt. Der kræves ingen anden forbehandling af teststoffet. Gasser og aerosoler er endnu ikke vurderet ved en valideringsundersøgelse (29). Selv om det er tænkeligt, at gasser og aerosoler kan undersøges ved hjælp af RhE-teknologi, muliggør den nuværende forsøgsmetode det ikke.

9. Før forsøgsmetoden bruges på en blanding for at generere data i lovgivningsøjemed, bør det overvejes, om den vil give resultater, som er egnede til formålet, og i givet fald hvorfor. Sådanne overvejelser er ikke nødvendige, når der foreligger et myndighedskrav om test af blandingen. Da blandinger imidlertid omfatter et vidt spektrum af kategorier og sammensætninger, og da der for øjeblikket kun foreligger begrænsede oplysninger om testning af blandinger, bør forsøgsmetoden i de tilfælde, hvor det kan påvises, at den ikke er egnet til en specifik kategori af blandinger (f.eks. efter en strategi som fremsat i Eskes et al., 2012) (30), ikke anvendes til forsøg med denne specifikke kategori af blandinger. Der skal udvises tilsvarende omhu, såfremt specifikke kemiske grupper eller fysisk-kemiske egenskaber viser sig ikke at være kompatible med forsøgsmetoden.
10. Testkemikalier, der absorberer lys i det samme område som MTT-formazan, og testkemikalier, som direkte kan reducere vitalfarvestoffet MTT (til MTT-formazan), kan interferere med målinger af cellelevedygtighed og kræve anvendelse af tilpassede kontroller med henblik på korrektioner (jf. punkt 28-34).
11. En analyseserie bestående af tre vævsprøver bør være tilstrækkelig for et testkemikalie, når klassificeringen er entydig. I tilfælde af tvetydige resultater såsom diskordante gentagne målinger, og/eller hvis den gennemsnitlige levedygtighed er $50 \pm 5 \%$, bør det overvejes at gennemføre en anden analyseserie samt en tredje, hvis resultaterne af de første to analyseserier er diskordante.

PRINCIP FOR TESTEN

12. Testkemikalien påføres på en tredimensional RhE-model, som består af ikke-transformerede humant afledte epidermiskeratinocytter, som ved dyrkning har dannet en

stærkt differentieret flerlagsmodel af den humane epidermis. Den består af velordnede basallag, stratum spinosum og stratum granulosum og et flerlaget stratum corneum med intercellulære lamellære lipidlag fra samme lipidklasser som dem, man finder in vivo.

13. Kemikalieinduceret hudirritation, primært i form af erythem og ødem, er resultatet af en kaskade af begivenheder, der indledes med kemikaliernes gennemtrængning af stratum corneum, hvor de kan beskadige de underliggende keratinocyttag og andre hudceller. De beskadigede celler kan enten frigive inflammatoriske mediatorer eller inducere en inflammatorisk kaskade, som også påvirker cellerne i dermis, navnlig de stromale og endotele celler i blodkarrene. Det er dilatationen og den øgede permeabilitet i de endotele celler, der skaber det observerede erythem og ødem (29). Da der ikke er nogen vaskularisering i in vitro-testsystemet, måler de RhE-baserede forsøgsmetoder de indledende begivenheder i kaskaden, f.eks. celle-/vævsbeskadigelsen (16) (17), og bruger cellelevedygtigheden som indikator.
14. Cellernes levedygtighed i RhE-modeller måles ved, at enzym omdanner vitalfarvestoffet MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, thiazolylblåt; CAS-nummer 298-93-1] til et blåt formazansalt, der måles kvantitativt efter ekstraktion fra vævene (31). Irriterende stoffer identificeres ved deres evne til at nedsætte cellernes levedygtighed til under en bestemt tærskelværdi (dvs. ≤ 50 % for UN GHS-/CLP-kategori 2). Afhængigt af lovgivningsrammen og forsøgsmetodens anvendelighed kan testkemikalier, der fører til en cellelevedygtighed, som ligger over den fastlagte tærskelværdi, betragtes som ikke-irriterende stoffer (dvs. > 50 %, "ingen kategori").

PÅVISNING AF KOMPETENCE

15. Inden laboratorierne påbegynder rutinemæssig brug af en eller flere af de fire validerede testmodeller, som er i overensstemmelse med denne forsøgsmetode (tillæg 2), bør de påvise deres tekniske kompetence ved hjælp af de 10 kompetencestoffer, der står opført i tabel 1. I situationer, hvor et stof på listen f.eks. ikke kan fås, kan et andet stof anvendes, hvis der foreligger tilstrækkelige in vivo- og in vitro-referencedata herfor (f.eks. fra listen over referencekemikalier (8)), forudsat at der benyttes de samme udvælgelseskriterier som beskrevet i tabel 1. Anvendelse af alternative kompetencestoffer skal begrundes.
16. Som led i påvisningen af kompetence anbefales det, at brugerne kontrollerer vævenes barriereegenskaber efter modtagelse som beskrevet af fabrikanten af RhE-modellen. Det er navnlig vigtigt, hvis vævene sendes over lang afstand/lange perioder. Når en forsøgsmetode er blevet helt fastlagt, og kompetencen med hensyn til brugen heraf er erhvervet og påvist, er det ikke nødvendigt at kontrollere disse egenskaber rutinemæssigt. Ved rutinemæssig brug af en forsøgsmetode anbefales det imidlertid at kontrollere barriereegenskaberne med jævne mellemrum.

Tabel 1: Kompetencestoffer¹

Stof	CAS-nr.	In vivo-score ²	Fysisk tilstand	UN GHS-kategori
IKKE-KLASSIFICEREDE STOFFER (UN GHS "ingen kategori")				
naphthalenedikkesyre	86-87-3	0	Fast	Ingen kat.
isopropanol	67-63-0	0,3	Flydende	Ingen kat.
methylnstearat	112-61-8	1	Fast	Ingen kat.
heptylbutyrat	5870-93-9	1,7	Flydende	Ingen kat. (valgfri kat. 3) ³
hexylsalicylat	6259-76-3	2	Flydende	Ingen kat. (valgfri kat. 3) ³
KLASSIFICEREDE STOFFER (UN GHS-kategori 2)				
cyclamenaldehyd	103-95-7	2,3	Flydende	Kat. 2
1-bromhexan	111-25-1	2,7	Flydende	Kat. 2
kaliumhydroxid (5 % aq.)	1310-58-3	3	Flydende	Kat. 2
1-methyl-3-phenyl-1-piperazin	5271-27-2	3,3	Fast	Kat. 2
heptanal	111-71-7	3,4	Flydende	Kat. 2

1 Kompetencestofferne er en undergruppe af de stoffer, der anvendes i valideringsundersøgelsen, og udvælgelsen er baseret på følgende kriterier: i) De kemiske stoffer findes i handelen, ii) de er repræsentative for det fulde interval af Draize-irritationsscorer (fra ikke-irriterende til stærkt irriterende), iii) de har en veldefineret kemisk struktur, iv) de er repræsentative for den kemiske funktionalitet, der blev anvendt i valideringsprocessen, v) de gav reproducerbare in vitro-resultater i flere forsøg og flere laboratorier, vi) deres forudsigelighed in vitro var korrekt, og vii) de er ikke forbundet med nogen ekstremt toksisk profil (f.eks. carcinogene eller toksiske for reproduktionssystemet) og heller ikke med uoverkommelige bortskaffelsesomkostninger.

2 In vivo-score i overensstemmelse med TM B.4 (4).

3. I denne forsøgsmetode betragtes kemikalier i den valgfrie UN GHS-kategori 3 (mildt irriterende stoffer) (1) som tilhørende "ingen kategori".

FREMGANGSMÅDE

17. Nedenfor følger en beskrivelse af komponenter og procedurer i en RhE-forsøgsmetode til vurdering af hudirritation (se også tillæg 3 for parametre vedrørende de forskellige testmodeller). Der findes standardprocedurer (SOP'er) for de fire modeller, der er i overensstemmelse med denne forsøgsmetode (32) (33) (34) (35).

KOMPONENTER I RHE-FORSØGSMETODEN

Almindelige betingelser

18. Der skal anvendes ikke-transformerede humane keratinocytter til at rekonstruere epitel. Der bør være flere lag af levedygtige epithelceller (basallag, stratum spinosum, stratum granulosum) til stede under et fungerende stratum corneum. Stratum corneum bør være flerlaget og have den lipidprofil, der gør den til en effektiv barriere, som kan modstå hurtig gennemtrængning af cytotoxiske referencekemikalier, f.eks. natriumdodecylsulphat (SDS) eller Triton X-100. Barrierefunktionen bør påvises og kan vurderes enten ved at bestemme

den koncentration, ved hvilken et referencekemikalie nedsætter vævets levedygtighed med 50 % (IC₅₀) efter en fast eksponeringstid, eller ved at bestemme den eksponeringstid, der er nødvendig for at reducere cellernes levedygtighed med 50 % (ET₅₀), når referencekemikaliets påføres i en nærmere angivet fast koncentration. RhE-modellens fysiske udformning bør forhindre, at stof passerer uden om stratum corneum til det levedygtige væv, hvilket ville forringe modelleringen af hudens eksponering. RhE-modellen skal være fri for kontamination med bakterier, virus, mykoplasma og svampe.

Funktionsmæssige betingelser

Levedygtighed

19. MTT-assayet foretrækkes til kvantificering af levedygtigheden (31). Levedygtige celler i RhE-modellen kan reducere vitalfarvestoffet MTT til blåt MTT-formazanbundfald, som herefter ekstraheres fra vævet ved anvendelse af isopropanol (eller et lignende opløsningsmiddel). Det rene ekstraktionsmiddels optiske tæthed (OD) skal være tilstrækkelig lav, dvs. OD < 0,1. Det ekstraherede MTT-formazan kan kvantificeres enten ved måling af standardabsorbans (OD) eller en HPLC-/UPLC-spektrofotometriprocedure (36). Brugere af RhE-modellen bør sikre, at hver batch af den anvendte RhE-model overholder de fastlagte kriterier for den negative kontrol. Udvikleren/leverandøren af RhE-modellen fastsætter et interval (øvre og nedre grænse) for acceptable OD-værdier for negativ kontrol (i betingelserne for forsøgsmetoden til vurdering af hudirritation). Intervallerne for de fire validerede RhE-modeller, der er omfattet af denne forsøgsmetode, er anført i tabel 2. En bruger af HPLC-/UPLC-spektrofotometri bør anvende de OD-intervaller for negativ kontrol, der er anført i tabel 2, som acceptkriterier for den negative kontrol. Det skal godtgøres, at det væv, der er behandlet med det negative kontrolstof, har stabil kultur (giver enslydende levedygtighedsmålinger) i hele testeksponeringsperioden.

Tabel 2: Intervaller for acceptable OD-værdier for negativ kontrol for de testmodeller, der er omfattet af denne TM

	Nedre acceptgrænse	Øvre acceptgrænse
EpiSkin™ (SM)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	≥ 0,8	≤ 2,8
SkinEthic™ RHE	≥ 0,8	≤ 3,0
LabCyte EPI-MODEL24 SIT	≥ 0,7	≤ 2,5

Barrierefunktion

20. Stratum corneum og dets lipidsammensætning bør være tilstrækkelig til at modstå hurtig gennemtrængning af cytotoxiske referencekemikalier (f.eks. SDS eller Triton X-100), bestemt ved IC₅₀ eller ET₅₀ (tabel 3).

Morfologi

21. Der bør forelægges en histologisk undersøgelse af RhE-modellen, som dokumenterer dens human epidermis-lignende struktur (herunder flerlaget stratum corneum).

Reproducerbarhed

22. Resultaterne af forsøgsmetodens positive og negative kontroller skal udvise reproducerbarhed over tid.

Kvalitetskontrol (QC)

23. RhE-modellen bør kun anvendes, hvis udvikleren/leverandøren påviser, at hver batch af den anvendte RhE-model overholder veldefinerede produktionsgodkendelseskriterier, hvoraf levedygtighed (punkt 19), barrierefunktion (punkt 20) og morfologi (punkt 21) er de vigtigste. Brugere af forsøgsmetoden bør have adgang til disse data, således at de kan medtage disse oplysninger i testrapporten. Udvikleren/leverandøren af RhE-modellen bør fastsætte et acceptinterval (øvre og nedre grænse) for IC₅₀ eller ET₅₀. Kun resultater, der er fremkommet med kvalificerede væv, kan accepteres til at forudsige irriterende stoffers klassificering på pålidelig vis. Acceptintervallerne for de fire testmodeller, der er omfattet af denne TG, er anført i tabel 3.

Tabel 3: QC-batchgodkendelseskriterier for de testmodeller, der er omfattet af denne TM

	Nedre acceptgrænse	Øvre acceptgrænse
EpiSkin™ (SM) (behandling i 18 timer med SDS) (32)	IC ₅₀ = 1,0 mg/ml	IC ₅₀ = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1 % Triton X-100) (33)	ET ₅₀ = 4,0 t	ET ₅₀ = 8,7 t
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (34)	ET ₅₀ = 4,0 t	ET ₅₀ = 10,0 t
LabCyte EPI-MODEL24 SIT (behandling i 18 timer med SDS) (35)	IC ₅₀ = 1,4 mg/ml	IC ₅₀ = 4,0 mg/ml

Påføring af testkemikaliet og kontrolkemikalier

24. Der anvendes mindst tre vævsprøver for hvert testkemikalie og hver kontrol pr. analyseserie. For både flydende og faste kemikalier gælder det, at der skal påføres tilstrækkelig meget testkemikalie til, at epidermisoverfladen dækkes med et jævnt lag, samtidig med at ubegrænsede doser undgås, dvs. mellem 26 og 83 µl/cm² eller mg/cm² (jf. tillæg 3). I tilfælde af faste kemikalier fugtes epidermisoverfladen med deioniseret eller destilleret vand inden påføringen for at forbedre kontakten mellem testkemikaliet og epidermisoverfladen. Faste stoffer bør testes som fint pulver, når det overhovedet er muligt. I nogle tilfælde kan der anvendes et nylonnet til at hjælpe med at sprede kemikaliet (jf. tillæg 3). Efter eksponeringsperioden vaskes testkemikaliet omhyggeligt af epidermisoverfladen med en vandig buffer eller 0,9 % NaCl. Alt efter de anvendte RhE-

testmodeller er eksponeringstiden på mellem 15 og 60 minutter, og inkubationstemperaturen mellem 20 og 37 °C. Disse eksponeringsperioder og -temperaturer optimeres for hver enkelt RhE-forsøgsmetode og repræsenterer testmodellernes forskellige iboende egenskaber (f.eks. barrierefunktion) (jf. tillæg 3).

25. Der skal i hver analyseserie anvendes sideløbende negative (NC) og positive (PC) kontroller, så det påvises, at levedygtigheden (med NC), barrierefunktionen og vævets deraf følgende følsomhed (med PC) ligger inden for et forud fastsat acceptinterval. Som positivt kontrolstof foreslås 5 % vandig SDS. Som negativt kontrolstof foreslås enten vand eller phosphatbufferet saltopløsning (PBS).

Måling af cellelevedygtighed

26. Ifølge testproceduren er det vigtigt, at levedygtigheden ikke måles umiddelbart efter eksponeringen for testkemikaliets, men først efter en tilstrækkelig lang inkubationsperiode efter behandlingen, hvor det renskyllede væv inkuberes i frisk medium. En sådan periode betyder, dels at vævet kan komme sig over svagt cytotoxiske virkninger, dels at eventuelle cytotoxiske virkninger træder tydeligt frem. En inkubationsperiode efter behandling på 42 timer blev fundet optimal under testoptimeringen for to af de RhE-baserede testmodeller, der ligger til grund for denne forsøgsmetode (11) (12) (13) (14) (15).
27. MTT-assayet er en valideret kvantitativ metode, som skal benyttes til måling af cellelevedygtigheden i forbindelse med denne forsøgsmetode. Den er forenelig med brug i en tredimensional vævsmodel. Vævsprøven anbringes i en MTT-opløsning af passende koncentration (f.eks. 0,3-1 mg/ml) i tre timer. MTT omdannes til blå formazan af de levedygtige celler. Det udfældede blå formazan ekstraheres fra vævet med et opløsningsmiddel (f.eks. isopropanol eller sur isopropanol), og formazankoncentrationen måles ved bestemmelse af OD ved 570 nm i et højst ± 30 nm bredt filterbånd eller ved en HPLC-/UPLC-spektrofotometriprocedure (jf. punkt 34) (36).
28. Testkemikaliets optiske egenskaber eller dets kemiske reaktion med MTT (kemikalierne kan f.eks. standse, mindske eller forårsage farvedannelsen) kan interferere med målingen og føre til et forkert skøn over levedygtigheden. Det kan forekomme, hvis et specifikt testkemikalie ikke bliver fjernet fuldstændigt fra vævet ved skylning, eller hvis det er trængt ned i epidermis. Hvis et testkemikalie reagerer direkte med MTT (f.eks. MTT-reduktionsmidler), hvis det selv er farvet, eller hvis det bliver farvet under behandlingen af vævet, bør der anvendes yderligere kontroller til at påvise og korrigere for testkemikaliets interferens med levedygtighedsmålingen (jf. punkt 29 og 33). Det er nærmere beskrevet, hvordan der korrigeres for direkte MTT-reduktion og farvestoffernes interferens, i SOP'erne for de fire validerede modeller, der er omfattet af denne forsøgsmetode (32) (33) (34) (35).

29. For at identificere direkte MTT-reduktionsmidler bør hvert testkemikalie tilsættes til en frisklavet MTT-opløsning. Hvis MTT-blandingen, når den indeholder testkemikalien, bliver blå/violet, formodes testkemikalien at reducere MTT direkte, og der bør udføres yderligere funktionsmæssig kontrol på ikke-levedygtigt RhE-væv, uanset om der anvendes måling af standardabsorbans (OD) eller en HPLC-/UPLC-spektrofotometriprocedure. Ved denne yderligere funktionsmæssige kontrol anvendes dødt væv, som kun har metabolisk residualaktivitet, men absorberer testkemikalien på samme måde som levedygtigt væv. Hvert MTT-reducerende testkemikalie påføres på mindst to døde vævsprøver, som gennemgår hele testproceduren for at generere en ikke-specifik MTT-reduktion (NSMTT) (32) (33) (34) (35). En enkelt NSMTT-kontrol er tilstrækkelig pr. testkemikalie, uanset hvor mange uafhængige test/analyserier der udføres. Derefter beregnes den faktiske vævslevedygtighed som procenten for vævslevedygtighed opnået med levende væv eksponeret for MTT-reduktionsmiddel minus procenten for ikke-specifik MTT-reduktion opnået med dødt væv eksponeret for det samme MTT-reduktionsmiddel, set i forhold til den negative kontrol, som køres sideløbende med den test, der korrigeres (% NSMTT).
30. For at identificere potentiel interferens fra farvede testkemikalier eller testkemikalier, der bliver farvet, når de kommer i kontakt med vand eller isopropanol, og afgøre, om der skal iværksættes yderligere kontrol, bør der foretages spektralanalyse af testkemikalien i vand (miljø under eksponering) og/eller isopropanol (ekstraktionsopløsning). Hvis testkemikalien i vand og/eller isopropanol absorberer lys i intervallet 570 ± 30 nm, bør der foretages yderligere kontroller med farvestof, eller der kan anvendes en HPLC-/UPLC-spektrofotometriprocedure, i hvilket tilfælde disse kontroller ikke er nødvendige (jf. punkt 33 og 34). Når der foretages en måling af standardabsorbansen (OD), påføres hvert interfererende farvet testkemikalie på mindst to levedygtige vævsprøver, som gennemgår hele testproceduren, men inkuberes med medium i stedet for MTT-opløsning under MTT-inkubationstrinnet for at generere en kontrol af en ikke-specifik farve (NSC_{living}). NSC_{living}-kontrollen bør udføres sideløbende med testningen af det farvede testkemikalie, og i tilfælde af flere test bør der foretages en uafhængig NSC_{living}-kontrol for hver test, der udføres (i hver analyserie) på grund af den iboende biologiske variabilitet i levende væv. Derefter beregnes den faktiske vævslevedygtighed som procenten for vævslevedygtighed opnået med levende væv eksponeret for det interfererende testkemikalie og inkuberet med MTT-opløsning minus procenten for ikke-specifik farve opnået med levende væv eksponeret for det interfererende testkemikalie og inkuberet med medium uden MTT foretaget sideløbende med den test, der korrigeres (%NSC_{living}).
31. Testkemikalier, der identificeres som fremkaldende både direkte MTT-reduktion (jf. punkt 29) og farveinterferens (jf. punkt 30), vil også kræve en tredje kontrol ud over NSMTT- og NSC_{living}-kontrollerne, der er beskrevet ovenfor, når der foretages en måling af standardabsorbansen (OD). Dette er sædvanligvis tilfældet med mørke testkemikalier, der interfererer med MTT-assayet (f.eks. blå, violette, sorte), fordi deres egen farve

forstyrrer vurderingen af deres evne til direkte at reducere MTT, som beskrevet i punkt 29. Disse testkemikalier kan binde sig til både levende og dødt væv, og derfor kan NSMTT-kontrollen ikke blot korrigere for testkemikaliets potentielle direkte MTT-reduktion, men også for den farveinterferens, der opstår, når testkemikaliyet binder sig til dødt væv. Dette kan medføre dobbeltkorrektion for farveinterferens, da NSC_{living}-kontrollen allerede korrigerer for farveinterferens, som opstår, når testkemikaliyet binder sig til levende væv. For at undgå eventuel dobbeltkorrektion for farveinterferens skal der gennemføres en tredje kontrol for ikke-specifik farve i dødt væv (NSC_{killed}). I denne yderligere kontrol påføres testkemikaliyet på mindst to døde vævsprøver, som gennemgår hele testproceduren, men inkuberes med medium i stedet for MTT-opløsning under MTT-inkubationstrinnet. En enkelt NSC_{killed}-kontrol er tilstrækkelig pr. testkemikalie, uanset hvor mange uafhængige test/analyserier der er udført, men bør udføres sideløbende med NSMTT-kontrollen og om muligt med den samme vævsbatch. Derefter beregnes den faktiske vævslevedygtighed som procenten for vævslevedygtighed opnået med levende væv eksponeret for testkemikaliyet minus % NSMTT minus % NSC_{living} plus procenten for ikke-specifik farve opnået med dødt væv eksponeret for det interfererende testkemikalie og inkuberet med medium uden MTT, set i forhold til den negative kontrol, som køres sideløbende med den test, der korrigeres (% NSC_{killed}).

32. Det er vigtigt at bemærke, at ikke-specifik MTT-reduktion og ikke-specifik farveinterferens kan øge de aflæste værdier for vævsekstraktet til over spektrofotometrets linearitetsinterval. På denne baggrund bør laboratorierne fastlægge linearitetsintervallet for deres spektrofotometer med MTT-formazan (CAS-nr. 57360-69-7), der er købt i handelen, inden de begynder at undersøge testkemikalier i lovgivningsøjemed. Måling af standardabsorbans (OD) ved hjælp af et spektrofotometer er egnet til at vurdere direkte MTT-reduktionsmidler og farveinterfererende testkemikalier, når OD-værdierne af vævsekstrakter opnået med testkemikaliyet uden nogen korrektion for direkte MTT-reduktion og/eller farveinterferens ligger inden for spektrofotometrets lineære interval, eller når den ikke-korrigerede levedygtighedsprocent opnået med testkemikaliyet allerede er $\leq 50\%$. Ikke desto mindre bør resultaterne for testkemikalier, som fremkalder %NSMTT og/eller %NSC_{living} $\geq 50\%$ af den negative kontrol, tages med forsigtighed, da dette er den tærskelværdi, der anvendes til at skelne mellem klassificerede og ikke-klassificerede kemikalier (jf. punkt 36).
33. For farvede testkemikalier, som ikke er kompatible med måling af standardabsorbans (OD) som følge af deres for kraftige interferens i MTT-assayet, kan den alternative HPLC-/UPLC-spektrofotometriprocedure til måling af MTT-formazan anvendes (jf. punkt 34) (36). HPLC-/UPLC-spektrofotometrisystemet giver mulighed for at separere MTT-formazan fra testkemikaliyet før kvantificering (36). Af denne grund kræves NSC_{living}- eller NSC_{killed}-kontroller aldrig, når der anvendes HPLC-/UPLC-spektrofotometri, uafhængigt af det testede kemikalie. NSMTT-kontroller bør dog benyttes, hvis testkemikaliyet mistænkes

for at være direkte MTT-reducerende eller har en farve, som forhindrer vurderingen af dets evne til direkte at reducere MTT (som beskrevet i punkt 29). Ved benyttelse af HPLC-/UPLC-spektrofotometri til at måle MTT-formazan beregnes procenten for vævslevedygtighed som procentdelen af toparealet for MTT-formazan opnået med levende væv, som eksponeres for testkemikalien, set i forhold til toparealet for MTT-formazan opnået med den sideløbende negative kontrol. For testkemikalier, der er direkte MTT-reducerende, beregnes den faktiske vævslevedygtighed som procenten for vævslevedygtighed opnået med levende væv eksponeret for testkemikalien minus %NSMTT. Endelig bør det bemærkes, at direkte MTT-reduktionsmidler, der også kan være farveinterfererende, og som tilbageholdes i vævet efter behandling og reducerer MTT så kraftigt, at de fører til OD-værdier (ved måling af standard-OD) eller toparealer (ved UPLC/HPLC-spektrofotometri) for de testede vævsekstrakter, der falder uden for spektrofotometrets linearitetsinterval, ikke kan vurderes, skønt dette kun forventes at forekomme i meget sjældne situationer.

34. HPLC-/UPLC-spektrofotometri kan også anvendes med alle typer af testkemikalier (farvede, ikke-farvede, MTT-reducerende og ikke-MTT-reducerende) til måling af MTT-formazan (36). Da der findes mange forskellige HPLC-/UPLC-spektrofotometrisystemer, bør HPLC-/UPLC-spektrofotometrisystemets kvalificering påvises før anvendelsen heraf til at kvantificere MTT-formazan fra vævsekstrakter ved at opfylde acceptkriterierne for en række parametre for standardkvalificering baseret på dem, der er beskrevet i retningslinjerne for industrien for bioanalytisk metodevalidering fra den amerikanske Food and Drug Administration (FDA) (36) (37). Disse centrale parametre og deres acceptkriterier er vist i tillæg 4. Når acceptkriterierne i tillæg 4 er opfyldt, anses HPLC-/UPLC-spektrofotometrisystemet for at være kvalificeret og klar til at måle MTT-formazan under de forsøgsbetingelser, som er beskrevet i denne forsøgsmetode.

Acceptkriterier

35. For hver forsøgsmetode med gyldige RhE-modelbatcher (jf. punkt 23) bør væv, der er behandlet med negativt kontrolstof, give OD-resultater, der afspejler kvaliteten af de væv, der har været underkastet alle forsendelses- og modtagelsestrin og alle protokolprocesser. OD-værdierne af kontrollerne bør ikke være lavere end forud fastsatte nedre grænser. Tilsvarende bør væv, der er behandlet med PC, dvs. 5 % vandig SDS, afspejle vævenes evne til at reagere på et irriterende kemikalie under betingelserne for forsøgsmetoden (se tillæg 3 og for yderligere oplysninger SOP'erne for de fire testmodeller, der er omfattet af denne TG (32) (33) (34) (35)). Tilknyttede og egnede målinger af variabiliteten mellem vævsprøver, dvs. standardafvigelse (SD), bør ligge inden for de acceptgrænser, der er fastsat for den anvendte testmodel (jf. tillæg 3).

Fortolkning af resultater og forudsigelsesmodel

36. De OD-værdier, der opnås med hvert testkemikalie, kan anvendes til beregning af den procentvise levedygtighed normaliseret efter den negative kontrol, som sættes til 100 %. Hvis der benyttes HPLC-/UPLC-spektrofotometri, beregnes procenten for vævslevedygtighed som procenten af toparealet for MTT-formazan opnået med levende væv, som eksponeres for testkemikalien, i forhold til toparealet for MTT-formazan opnået med den sideløbende negative kontrol. Den tærskelværdi for cellelevedygtighedsprocent, som adskiller irriterende testkemikalier fra ikke-klassificerede testkemikalier, og de statistiske procedurer, der benyttes til at vurdere resultaterne og udpege irriterende kemikalier, bør være klart defineret og dokumenteret, og det bør være bevist, at de er hensigtsmæssige (se SOP'erne for testmodellerne for oplysninger). Tærskelværdierne for forudsigelse af den irriterende virkning er vist nedenfor:

- Et testkemikalie identificeres som krævende klassificering og mærkning i overensstemmelse med UN GHS/CLP (kategori 2 eller kategori 1), hvis den gennemsnitlige vævslevedygtighedsprocent efter eksponering og inkubation efter behandling er mindre end eller lig med ($\leq$) 50 %. Eftersom de RhE-testmodeller, der er omfattet af denne forsøgsmetode, ikke kan skelne mellem UN GHS-/CLP-kategori 1 og 2, skal der fremskaffes yderligere oplysninger om hudætsning, inden testkemikalierne kan klassificeres definitivt [se også OECD's vejledende dokument om IATA (3)]. Såfremt testkemikalien betragtes som værende ikke-ætsende (baseret på TM B.40, B.40.A eller B.65) og udviser en vævslevedygtighed efter eksponering og inkubation efter behandling på mindre end eller lig med ($\leq$) 50 %, anses testkemikalien for at være hudirriterende i overensstemmelse med UN GHS-/CLP-kategori 2.
- Afhængigt af medlemsstaternes lovgivningsrammer kan testkemikalien betragtes som værende ikke-hudirriterende i overensstemmelse med UN GHS/CLP "ingen kategori", hvis vævslevedygtigheden efter eksponering og inkubation efter behandling er større end ($>$) 50 %.

DATA OG RAPPORTERING

Data

37. For hver analyseserie skal data fra de enkelte vævsprøver (f.eks. OD-værdier og beregnet cellelevedygtighedsprocent for hvert testkemikalie samt klassificeringen) fremlægges i tabelform, herunder data fra eventuelle gentagelser af forsøget. Desuden skal gennemsnit og eventuel standardafvigelse angives for hver analyseserie. For hvert testkemikalie fremlægges de iagttagne interaktioner med MTT-reagenset og farvede testkemikalier.

Testrapport

38. Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie og kontrolkemikalier:

- Stof med kun én bestanddel: kemisk identifikation, f.eks. IUPAC-navn eller CAS-navn, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel, renhed, kemisk identitet af urenheder, i det omfang det er relevant og praktisk muligt, osv.
- Stof med flere bestanddele, UVCB-stoffer og blandinger: kendetegnet så vidt muligt ved kemisk identitet (jf. ovenfor), kvantitativ forekomst og bestanddelenes relevante fysisk-kemiske egenskaber
- fysisk udseende, vandopløselighed og eventuelle yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber
- oprindelse, evt. batchnummer
- eventuel behandling af testkemikaliets/kontrolkemikalier inden testen (f.eks. opvarmning, formalin)
- testkemikaliets stabilitet, sidste anvendelsesdato eller dato for ny analyse, hvis dette er kendt
- opbevaringsforhold.

Anvendt RhE-model og protokol (og eventuelt begrundelse herfor)

Testbetingelser:

- anvendt RhE-model (herunder batchnummer)
- kalibreringsoplysninger for måleudstyr (f.eks. spektrofotometer), bølgelængde og båndpas (hvis relevant) anvendt til kvantificering af MTT-formazan og måleudstyrets linearitetsinterval - beskrivelse af den metode, der blev anvendt til kvantificering af MTT-formazan
- eventuelt beskrivelse af kvalificeringen af HPLC-/UPLC-spektrofotometrisystemet - komplet dokumentation for den anvendte RhE-model, herunder om dens ydeevne. Der bør bl.a. gives oplysning om:
 - i) levedygtighed
 - ii) barrierefunktion
 - iii) morfologi
 - iv) reproducerbarhed og forudsigelsesevne
 - v) kvalitetskontroller (QC) af modellen
- reference til historiske data for modellen. Der bør bl.a. gives oplysning om, hvorvidt QC-dataene kan accepteres, sammenlignet med historiske batchdata

- påvisning af kompetence til at anvende forsøgsmetoden inden rutinemæssig brug ved at teste kompetencestofferne.

Testprocedure:

- detaljer om den anvendte testprocedure (herunder anvendte vaskeprocedurer efter eksponering) - anvendt dosis af testkemikalie og kontrolkemikalier
- eksponeringsvarighed og -temperatur og inkubationsperiode efter eksponering
- eventuel angivelse af kontroller anvendt til direkte MTT-reduktionsmidler og/eller farvede testkemikalier
- antal vævsprøver anvendt pr. testkemikalie og kontrol (PC, negativ kontrol, NSMTT, NSC_{living} og NSC_{killed}, hvis relevant)
- beskrivelse af beslutningskriterier/forudsigelsesmodel baseret på den anvendte RhE-model
- beskrivelse af eventuelle ændringer i forsøgsmetoden (herunder vaskeprocedurer).

Acceptkriterier for analyseserier og test:

- middelværdier for positive og negative kontroller og acceptintervaller på grundlag af historiske data - acceptabel variabilitet mellem vævsprøver til positiv og negativ kontrol
- acceptabel variabilitet mellem vævsprøver til testkemikaliets.

Resultater:

- angivelse i tabelform af data for hvert enkelt testkemikalie, hver analyseserie og hver gentagen måling, herunder OD-værdier eller topareal for MTT-formazan, vævslevedygtighedsprocent, gennemsnitlig vævslevedygtighedsprocent og standardafvigelse
- eventuelle resultater af kontroller anvendt til direkte MTT-reduktionsmidler og/eller farvede testkemikalier, herunder OD-værdier eller topareal for MTT-formazan, %NSMTT, %NSC_{living}, %NSC_{killed}, standardafvigelse, endelig korrekt vævslevedygtighedsprocent
- resultater opnået med testkemikaliets/-kemikalierne og kontrolkemikalierne i forhold til de fastlagte acceptkriterier for analyseserier og test
- beskrivelse af andre observerede virkninger
- den afledte klassificering med henvisning til den anvendte forudsigelsesmodel og/eller de anvendte beslutningskriterier.

Diskussion af resultaterne

Konklusioner

LITTERATUR

- (1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Tilgængelig på: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.
- (2) EURL-ECVAM (2009). Statement on the "Performance Under UN GHS of Three *In Vitro* Assays for Skin Irritation Testing and the Adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM Skin Irritation Performance Standards", Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 9 April 2009. Tilgængelig på: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC31_skin-irritation-statement_20090922.pdf.
- (3) OECD (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 203), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (4) Kapitel B.4 i dette bilag, Akut hudirritation/-ætsning.
- (5) Kapitel B.40 i dette bilag, In vitro-hudætsning: Transkutan elektrisk modstand (TER).
- (6) Kapitel B.40.A i dette bilag, In vitro-hudætsning: forsøgsmetode med rekonstrueret human epidermis (RhE).
- (7) Kapitel B.65 i dette bilag, In vitro-membranbarriereforsøgsmetode.
- (8) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human *Epidermis* (RhE) Test Methods for Skin Irritation in Relation to TG 439. Environment, health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 220). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (9) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (10) Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J. M. og 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. og 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. og 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. og 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. og 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. og Worth, A. (2002). Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation, The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2, *ATLA* 30, 109-129.
- (16) Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. og Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test, *ATLA* 35, 559-601.
- (17) Hoffmann S. (2006). ECVAM Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the Primary Endpoint MTT and the Secondary Endpoint IL1- α .
- (18) Eskes C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. og 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. og Leclaire, J. (2007). *In Vitro* Acute Skin Irritancy of Chemicals Using the Validated EPISKIN Model in a Tiered Strategy - Results and Performances with 184 Cosmetic Ingredients, *ALTEX*, 14, 351-358.

- (20) EURL-ECVAM (2007). Statement on the Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27 April 2007. Tilgængelig på: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC26_statement_SkinIrritation_20070525_C.pdf.
- (21) EURL-ECVAM. (2007). Performance Standards for Applying Human Skin Models to *In Vitro* Skin Irritation Testing. *N.B. Disse er de oprindelige PS'er, der blev anvendt til validering af to forsøgsmetoder. Disse PS'er bør ikke længere anvendes, da der nu foreligger en opdateret version (8).*
- (22) EURL-ECVAM. (2008). Statement on the Scientific Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC29), 5 November 2008. https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication/ESAC_Statement_SkinEthic-EpiDerm-FINAL-0812-01.pdf.
- (23) OECD (2010). Explanatory Background Document to the OECD Draft Test Guideline on *In Vitro* Skin Irritation Testing. Environment, Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, (No 137), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (24) Katoh, M., Hamajima, F., Ogasawara, T. og Hata K. (2009). Assessment of Human Epidermal Model LabCyte EPI-MODEL for *In Vitro* Skin Irritation Testing According to European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)-Validated Protocol, *J Toxicol Sci*, 34, 327-334.
- (25) Katoh, M. og Hata K. (2011). Refinement of LabCyte EPI-MODEL24 Skin Irritation Test Method for Adaptation to the Requirements of OECD Test Guideline 439, *AATEX*, 16, 111-122.
- (26) OECD (2011). Validation Report for the Skin Irritation Test Method Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 159), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (27) OECD (2011). Peer Review Report of Validation of the Skin Irritation Test Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 155), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (28) Kojima, H., Ando, Y., Idehara, K., Katoh, M., Kosaka, T., Miyaoka, E., Shinoda, S., Suzuki, T., Yamaguchi, Y., Yoshimura, I., Yuasa, A., Watanabe, Y. og Omori, T. (2012). Validation Study of the *In Vitro* Skin Irritation Test with the LabCyte EPI-MODEL24, *Altern Lab Anim*, 40, 33-50.

- (29) Welss, T., Basketter, D.A. og Schröder, K.R. (2004). *In Vitro* Skin Irritation: Fact and Future. State of the Art Review of Mechanisms and Models, *Toxicol. In Vitro* 18, 231-243.
- (30) Eskes, C. *et al.* (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 62, 393-403.
- (31) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
- (32) EpiSkin™ (February 2009). SOP, Version 1.8 ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ Test Method 15 min - 42 hours for the Prediction of acute Skin Irritation of Chemicals.
- (33) EpiDerm™ (Revised March 2009). SOP, Version 7.0, Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ Skin Irritation Test (EPI-200-SIT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm (EPI-200).
- (34) SkinEthic™ RHE (February 2009) SOP, Version 2.0, SkinEthic Skin Irritation Test-42bis Test Method for the Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals: 42 Minutes Application + 42 Hours Post-Incubation.
- (35) LabCyte (June 2011). EPI-MODEL24 SIT SOP, Version 8.3, Skin Irritation Test Using the Reconstructed Human Model "LabCyte EPI-MODEL24".
- (36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., og McNamee, P. Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. Manuskript under udarbejdelse.
- (37) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. May 2001. Tilgængelig på: [<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>].
- (38) Harvell, J.D., Lamminstausta, K., og Maibach, H.I. (1995). Irritant Contact Dermatitis, in: Practical Contact Dermatitis, s. 7-18, (Ed. Guin J. D.). McGraw-Hill, New York.
- (39) EURL-ECVAM (2009). Performance Standards for *In Vitro* Skin Irritation Test Methods Based on Reconstructed Human Epidermis (RhE). *N.B. Dette er den aktuelle version af ECVAM's PS'er, opdateret i 2009 med henblik på gennemførelsen af UN GHS. Disse PS'er bør ikke længere anvendes, da der nu foreligger en opdateret version (8) for denne TG.*

- (40) EURL-ECVAM. (2009). ESAC Statement on the Performance Standards (PS) for *In Vitro* Skin Irritation Testing Using Reconstructed Human Epidermis, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 8 July 2009.
- (41) EC (2001). Commission Directive 2001/59/EC of 6 August 2001 Adapting to Technical Progress for the 28th Time Council Directive 67/548/EEC on the Approximation of Laws, Regulations and Administrative Provisions Relating to the Classification, Packaging and Labelling of Dangerous Substances, Official Journal of the European Union L225, 1-333.

Tillæg 1

DEFINITIONER

Nøjagtighed: overensstemmelsen mellem forsøgsmetodens resultater og accepterede referenceværdier. Den er et mål for forsøgsmetodens ydeevne og et af aspekterne af relevans. Udtrykket benyttes ofte som synonym for "konkordans", forstået som den andel af korrekte udfald, forsøgsmetoden fører til (9).

Cellelevedygtighed: en parameter, der måler den samlede aktivitet i en cellepopulation, f.eks. udtrykt ved de cellulære mitochondriedehydrogenasers evne til at reducere vitalfarvestoffet MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, thiazolylblåt], og som, afhængigt af det valgte endepunkt og testens udformning, korrelerer med det totale antal levende celler og/eller deres levedygtighed.

Kemikalie: et stof eller en blanding.

Konkordans: et mål for ydeevnen af testmodeller, der fører til kategoriske resultater, og et af aspekterne af relevans. Udtrykket benyttes af og til som synonym for nøjagtighed og defineres som andelen af alle kemikalier, der klassificeres korrekt som positive eller negative. Konkordansen afhænger i høj grad af forekomsten af positiver i de undersøgte typer testkemikalier (9).

ET₅₀: kan bedømmes ved at bestemme den eksponeringstid, der er nødvendig for at nedsætte cellernes levedygtighed med 50 % ved påføring af referencekemikaliets i en nærmere angivet fast koncentration, se også IC₅₀.

GHS (De Forenede Nationers (FN's) globale harmoniserede system for klassificering og mærkning af kemikalier): et system til klassificering af kemikalier (stoffer og blandinger) efter standardiserede typer og niveauer af fysisk fare, sundhedsfare og miljøfare med tilhørende kommunikationselementer såsom piktogrammer, signalord, faresætninger, sikkerhedssætninger og sikkerhedsdatablade, således at oplysninger om kemikaliernes skadelige virkninger kan videreformidles med henblik på at beskytte mennesker (f.eks. arbejdsgivere, arbejdstagere, transportører, forbrugere og redningspersonel) og miljøet (1).

HPLC: High Performance Liquid Chromatography (højtryksvæskechromatografi)

IATA: integreret tilgang til testning og vurdering.

IC₅₀: kan bedømmes ved at bestemme den koncentration, ved hvilken et referencekemikalie nedsætter vævets levedygtighed med 50 % (IC₅₀) efter en fast eksponeringstid, se også ET₅₀.

Ubegrænset dosis: den mængde testkemikalie, som er påført på epidermis ud over den mængde, der er nødvendig for helt at dække epidermisoverfladen på ensartet måde.

Blanding: blanding eller opløsning, der er sammensat af to eller flere stoffer.

Stof med kun én bestanddel: et stof, der defineres af sin mængdemæssige sammensætning, hvori en hovedbestanddel udgør mindst 80 % (w/w).

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, thiazolylblåt tetrazoliumbromid.

Stof med flere bestanddele: et stof, der defineres af sin mængdemæssige sammensætning, hvori flere end én hovedbestanddel er til stede i en koncentration på ≥ 10 % (w/w) og < 80 % (w/w). Et stof, der består af flere forskellige bestanddele, er resultatet af en fremstillingsproces. Forskellen mellem en blanding og et stof med flere bestanddele er, at blandingen er fremstillet ved blanding af to eller flere stoffer uden kemisk reaktion. Et stof, der består af flere forskellige bestanddele, er resultatet af en kemisk reaktion.

NSC_{killed}: ikke-specifik farve i dødt væv.

NSC: ikke-specifik farve i levende væv.

NSMTT: ikke-specifik MTT-reduktion.

Ydeevnestandarder (PS): standarder, der med udgangspunkt i en valideret forsøgsmetode danner grundlag for at vurdere, om en foreslået forsøgsmetode, som er mekanistisk og funktionelt tilsvarende, er sammenlignelig. De omfatter bl.a. i) de centrale dele af forsøgsmetoden, ii) en minimumsliste med referencekemikalier, som er udvalgt blandt de kemikalier, der er benyttet til at påvise, at den validerede forsøgsmetodes ydeevne er acceptabel, og iii) de sammenlignelige niveauer af nøjagtighed og pålidelighed, som er fastsat efter, hvad der er opnået med den validerede forsøgsmetode, og som det bør påvises, at den foreslåede forsøgsmetode kan yde, ved vurdering ud fra minimumslisten med referencekemikalier (9).

PC: positiv kontrol, et replikat, som indeholder alle komponenterne fra et testsystem og er behandlet med et kemikalie, som vides at inducere en positiv respons. For at sikre, at det er muligt at vurdere variabiliteten i den positive kontrolrespons over tid, bør den positive respons ikke være overdrevent stor.

Relevans: beskrivelse af sammenhængen mellem testen og den pågældende virkning og dens meningsfuldhed og brugbarhed til et bestemt formål. Det angives, i hvilket omfang testen måler eller forudsiger den pågældende biologiske virkning korrekt. Forsøgsmetodens nøjagtighed (konkordans) indgår i vurderingen af dens relevans (9).

Pålidelighed: mål for, i hvilken grad en forsøgsmetode kan reproduceres i og mellem laboratorier over en længere periode, når den udføres efter samme protokol. Den bedømmes ved beregning af reproducerbarhed inden for og mellem laboratorier (9).

Erstatningstest: en test, der erstatter en test, som bruges rutinemæssigt og er godkendt til fareidentifikation og/eller risikovurdering, og som vurderes at sikre en tilsvarende eller bedre beskyttelse af menneskers og dyrs sundhed eller miljøet alt afhængigt af situationen i forhold til den godkendte test, i alle testsituationer og for alle kemikalier (9).

Analyseserie: en analyseserie består af et eller flere testkemikalier, der testes samtidig med en negativ kontrol og en PC.

Følsomhed: andelen af alle positive/aktive testkemikalier, der klassificeres korrekt ved testen. Den er et mål for nøjagtigheden af en forsøgsmetode, som giver kategoriske resultater, og er et vigtigt kriterium ved vurderingen af en forsøgsmetodes relevans (9).

In vivo-hudirritation: fremkaldelse af reversibel skade på huden ved påføring af et testkemikalie i indtil 4 timer. Hudirritation er en lokalt fremkaldt reaktion i det berørte hudvæv og indtræder kort tid efter stimuleringen (38). Den fremkaldes som følge af en lokal inflammatorisk reaktion, der involverer hudvævs medfødte (ikke-specifikke) immunsystem. Den karakteriseres især ved, at den reversible proces indebærer inflammatoriske reaktioner og de fleste af de karakteristiske kliniske tegn på irritation (erythem, ødem, kløe og smerte), der er knyttet til en inflammatorisk proces.

Specificitet: andelen af alle negative/inaktive testkemikalier, der klassificeres korrekt ved testen. Den er et mål for nøjagtigheden af en forsøgsmetode, som giver kategoriske resultater, og er et vigtigt kriterium ved vurderingen af en forsøgsmetodes relevans (9).

Stof: et grundstof og forbindelser heraf, naturlige eller industrielt fremstillede, indeholdende sådanne tilsætningsstoffer, som er nødvendige til bevarelse af stoffets stabilitet, og sådanne urenheder, som følger af fremstillingsprocessen, bortset fra opløsningsmidler, som kan udskilles, uden at det påvirker stoffets stabilitet eller ændrer dets sammensætning.

Testkemikalie: et stof eller en blanding, der testes ved hjælp af denne forsøgsmetode.

UPLC: Ultra-High Performance Liquid Chromatography (ultra-højtryksvæskeskromatografi).

UVCB: stoffer med ukendt eller variabel sammensætning, komplekse reaktionsprodukter eller biologiske materialer.

Tillæg 2

TESTMODELLER, DER ER OMFATTET AF DENNE FORSØGSMETODE

Nr.	Testmodellens betegnelse	Type valideringsundersøgelse	Henvisninger
1	EpiSkin™	Fuld prospektiv valideringsundersøgelse (2003-2007). Denne models komponenter blev brugt til at fastlægge de centrale komponenter i forsøgsmetoden i de oprindelige og opdaterede PS'er fra ECVAM (39) (40) (21)*. Derudover dannede metodens data vedrørende identificering af ikke-klassificerede og klassificerede stoffer det primære grundlag for fastlæggelsen af specificitets- og følsomhedsværdierne i de oprindelige PS'er*.	(2) (10) (11) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (23) (32) (39) (40)
2	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	EpiDerm™ (<i>original</i>): Oprindeligt var denne testmodel omfattet af den fulde prospektive valideringsundersøgelse sammen med nr. 1 fra 2003-2007. Denne models komponenter blev brugt til at fastlægge de centrale komponenter i forsøgsmetoden i de oprindelige og opdaterede PS'er fra ECVAM (39) (40) (21)*. EpiDerm™ SIT (EPI-200) : En ændring af den originale EpiDerm™ blev valideret ved anvendelse af de oprindelige PS'er fra ECVAM (21) i 2008*.	(2) (10) (12) (13) (15) (16) (17) (18) (20) (21) (23) (33) (39) (40) (2) (21) (22) (23) (33)
3	SkinEthic™ RHE	Valideringsundersøgelse baseret på de oprindelige ECVAM-ydeevnestandarder (21) i 2008*.	(2) (21) (22) (23) (31)
4	LabCyte EPI-MODEL24 SIT	Valideringsundersøgelse (2011-2012) baseret på ydeevnestandarderne (PS) i OECD TG 439 (8), som er baseret på de opdaterede PS'er fra ECVAM* (39) (40).	(24) (25) (26) (27) (28) (35) (39) (40) og PS'erne i denne TG (8)*.

*) De oprindelige ECVAM-ydeevnestandarder (PS) (21) blev fastlagt i 2007 efter afslutning af den prospektive valideringsundersøgelse (16), som vurderede ydeevnen af testmodel nr. 1 og 2 ud fra klassificeringssystemet som beskrevet i den 28. tilpasning af EU's direktiv om farlige stoffer (41). I 2008 blev UN GHS (1) og EU CLP indført, hvorved tærskelværdien for skelnen mellem ikke-klassificerede og klassificerede stoffer effektivt blev ændret fra en in vivo-score på 2,0 til 2,3. Som følge af dette ændrede lovkrav blev nøjagtighedsværdierne og ECVAM's PS-liste over referencekemikalier opdateret i 2009 (2) (39) (40). Som de oprindelige PS'er var også de opdaterede PS'er i vid udstrækning baseret på data fra model nr. 1 og 2 (16), men derudover blev der anvendt data om referencekemikalier fra model nr. 3. I 2010 blev ECVAM's opdaterede PS'er anvendt til at fastlægge PS'erne til denne testvejledning (8). I forbindelse med denne forsøgsmetode opfattes EpiSkin™-modellen som VRM, da den blev brugt til at opstille samtlige kriterier i PS'erne. Der findes nærmere oplysninger om valideringsundersøgelserne, en samling af de genererede data samt baggrunden for de nødvendige PS-tilpasninger som følge af gennemførelsen af UN GHS/CLP i ECVAM/BfR's forklarende baggrundsdokument til den tilsvarende OECD TG 439 (23).

SIT: Hudirritationstest.

RHE: Rekonstrueret human epidermis.

Tillæg 3

SPECIFIKKE PROTOKOLPARAMETRE FOR HVER ENKELT TESTMODEL, DER ER OMFATTET AF DENNE FORSØGSMETODE

Der er store ligheder mellem RhE-modellernes protokoller, og de bruger bl.a. alle en postinkubationsperiode på 42 timer (32) (33) (34) (35). Forskellene vedrører primært tre parametre vedrørende testmodellernes forskellige barrierefunktioner og er anført nedenfor: A) tid og volumen inden inkubation, B) påføring af testkemikalier og C) volumen efter inkubation.

	EpiSkin™ (SM)	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	SkinEthic RHE™	LabCyte EPI-MODEL24 SIT
A) Inden inkubation				
Inkubationstid	18-24 timer	18-24 timer	< 2 timer	15-30 timer
Mediumvolumen	2 ml	0,9 ml	0,3 eller 1 ml	0,5 ml
B) Påføring af testkemikaliet				
For væsker	10 µl (26 µl/cm²)	30 µl (47 µl/cm²)	16 µl (32 µl/cm²)	25 µl (83 µl/cm²)
For faste stoffer	10 mg (26 mg/cm²) + DW (5 µl)	25 mg (39 mg/cm²) + DPBS (25 µl)	16 mg (32 mg/cm²) + DW (10 µl)	25 mg (83 mg/cm²) + DW (25 µl)
Brug af nylonnet	Ikke anvendt	Hvis nødvendigt	Anvendt	Ikke anvendt
Påføringstid i alt	15 minutter	60 minutter	42 minutter	15 minutter
Påføringstemperatur	RT	a) ved RT i 25 minutter b) ved 37 °C i 35 minutter	RT	RT
C) Volumen efter inkubation				
Mediumvolumen	2 ml	0,9 ml x 2	2 ml	1 ml
D) Maksimal acceptabel forskel				
Standardafvigelse mellem vævsprøver	SD18	SD18	SD18	SD18

RT: stuetemperatur.

DW: destilleret vand.

DPBS: Dulbeccos phosphatbufferede saltopløsning.

Tillæg 4

NØGLEPARAMETRE OG ACCEPTKRITERIER FOR KVALIFICERING AF ET HPLC-/UPLC-SPEKTROFOTOMETRISYSTEM TIL MÅLING AF MTT-FORMAZAN EKSTRAHERET FRA RHE-VÆV

Parameter	Protokol fra FDA-vejledning (36) (37)	Acceptkriterier
Selektivitet	Analyse af isopropanol, "living blank" (isopropanolekstrakt fra levende RhE-væv uden behandling), "dead blank" (isopropanolekstrakt fra dødt RhE-væv uden behandling)	$\text{Areal}_{\text{interferens}} \leq 20 \% \text{ af } \text{Areal}_{\text{LLOQ}}^1$
Præcision	Kvalitetskontroller (dvs. MTT-formazan ved 1,6 µg/ml, 16 µg/ml og 160 µg/ml) i isopropanol (n=5)	$\text{CV} \leq 15 \% \text{ eller } \leq 20 \% \text{ for LLOQ}$
Nøjagtighed	Kvalitetskontroller i isopropanol (n=5)	$\% \text{Dev} \leq 15 \% \text{ eller } \leq 20 \% \text{ for LLOQ}$
Matrixvirkning	Kvalitetskontroller i "living blank" (n=5)	85 % $\leq \text{matrixvirkning i } \% \leq 115 \%$
Overførsel	Analyse af isopropanol efter en ULOQ ² -standard	$\text{Areal}_{\text{interferens}} \leq 20 \% \text{ af } \text{Areal}_{\text{LLOQ}}$
Reproducerbarhed (inden for en dag)	Tre uafhængige kalibreringskurver (baseret på seks på hinanden følgende 1/3-opløsninger af MTT-formazan i isopropanol begyndende ved ULOQ, dvs. 200 µg/ml). Kvalitetskontroller i isopropanol (n=5)	Kalibreringskurver: $\% \text{Dev} \leq 15 \% \text{ eller } \leq 20 \% \text{ for LLOQ}$ Kvalitetskontroller: $\% \text{Dev} \leq 15 \% \text{ og } \text{CV} \leq 15 \%$
Reproducerbarhed (over flere dage)	Dag 1: En kalibreringskurve og kvalitetskontroller i isopropanol (n=3) Dag 2: En kalibreringskurve og kvalitetskontroller i isopropanol (n=3) Dag 3: En kalibreringskurve og kvalitetskontroller i isopropanol (n=3)	
MTT-formazans kortsigtede stabilitet i RhE-vævsekstrakt	Kvalitetskontroller i "living blank" (n=3) analyseret på præpareringsdagen og efter 24 timers opbevaring ved stuetemperatur	$\% \text{Dev} \leq 15 \%$
MTT-formazans langsigtede stabilitet i RhE-vævsekstrakt (hvis påkrævet)	Kvalitetskontroller i "living blank" (n=3) analyseret på præpareringsdagen og efter flere dages opbevaring ved en bestemt temperatur (f.eks. 4 °C, -20 °C, -80 °C)	$\% \text{Dev} \leq 15 \%$

¹LLOQ: nedre grænse for kvantitativ bestemmelse, defineret så den dækker 1-2 % vævslevedygtighed, dvs. 0,8 µg/ml.

²ULOQ: øvre grænse for kvantitativ bestemmelse, defineret så den er mindst to gange så høj som den højeste forventede MTT-formazankoncentration i isopropanolekstrakter fra negative kontroller, dvs. 200 µg/ml."

(8) I del B indsættes følgende kapitler:

"B.63 SCREENINGSTEST FOR REPRODUKTIONS-/UDVIKLINGSTOKSICITET

INDLEDNING

1. Denne forsøgsmetode svarer til OECD-testvejledning (Test Guideline (TG)) 421 (2016). OECD-vejledningerne om testning af kemikalier bliver revideret regelmæssigt på baggrund af den videnskabelige udvikling. Den oprindelige screeningstestvejledning 421 blev vedtaget i 1995 med udgangspunkt i en protokol for en indledende screeningstest for reproduktionstoksicitet ("Preliminary Reproduction Toxicity Screening Test"), der blev drøftet på to ekspertmøder i henholdsvis London i 1990 (1) og Tokyo i 1992 (2).
2. Denne forsøgsmetode er blevet opdateret med endepunkter for hormonforstyrrende stoffer som en opfølgning på de højt prioriterede aktiviteter, som OECD indledte i 1998 for at revidere eksisterende testvejledninger og udvikle nye testvejledninger for screening og testning af potentielt hormonforstyrrende stoffer (3). OECD TG 407 (undersøgelse af toksicitet ved gentagen dosering (28 dage, oral) i gnavere, kapitel B.7 i dette bilag) blev f.eks. i 2008 forbedret med parametre, der kan påvise testkemikaliers endokrine virkemåde. Formålet med at opdatere testvejledning 421 var at indlemme endepunkter for hormonforstyrrende stoffer i testvejledningerne om screening, hvor eksponeringsperioderne omfatter følsomme udviklingsmæssige perioder (prænatale eller tidligt postnatale perioder).
3. De valgte supplerende endepunkter for hormonforstyrrende stoffer, som også er at finde i testvejledning 443 (udvidet reproduktionstoksicitetsundersøgelse i én generation, kapitel B.56 i dette bilag), blev indlemmet i testvejledning 421 på baggrund af en feasibilityundersøgelse, hvor der blev set på de videnskabelige og tekniske spørgsmål i forbindelse med deres indlemmelse samt eventuelle tilpasninger af testens udformning som følge heraf (4).
4. Denne forsøgsmetode er beregnet til at generere begrænsede oplysninger om et testkemikalies virkninger på han- og hundyrers reproduktionsevne, herunder kønskirtlernes funktion, parringsadfærd, befrugtning, conceptus' udvikling og fødsel. Den er ikke et alternativ til og erstatter ikke de eksisterende forsøgsmetoder B.31, B.34, B.35 og B.56.

INDLEDENDE OVERVEJELSER

5. Denne screeningsforsøgsmetode kan anvendes til at indsamle indledende oplysninger om eventuelle virkninger på reproduktion og/eller udvikling, enten tidligt i vurderingen af kemikaliers toksikologiske egenskaber eller i forbindelse med problematiske kemikalier. Den kan også anvendes som led i en række indledende screeningstest af eksisterende

kemikalier, om hvilke der kun foreligger få eller ingen toksikologiske oplysninger, som en forundersøgelse til bestemmelse af dosisinterval ved mere omfattende reproduktions-/udviklingsrelaterede undersøgelser, eller når det ellers er relevant. Ved gennemførelse af undersøgelsen følges de vejledende principper og overvejelser, der er anført i OECD's vejledende dokument nr. 19 om anerkendelse, vurdering og anvendelse af kliniske tegn som humane endepunkter for forsøgsdyr, der bruges i sikkerhedsevalueringer (5).

6. Denne forsøgsmetode giver ikke udtømmende oplysninger om alle aspekter af reproduktion og udvikling. Den giver navnlig kun begrænsede muligheder for at påvise postnatale tegn på prænatal eksponering eller virkninger, der induceres under postnatal eksponering. Bl.a. som følge af det relativt lave antal dyr i doseringsgrupperne, endepunkternes selektivitet og undersøgelsens korte varighed kan denne metode ikke bruges som endelig dokumentation for, at kemikalier ikke har nogen virkning. Når der ikke foreligger data fra andre reproduktions-/udviklingstoksicitetstest, kan positive resultater desuden anvendes til indledende farevurdering og som udgangspunkt for beslutninger om nødvendigheden af og tidsplanen for yderligere testning.
7. De resultater, der opnås ved hjælp af de endokrinrelaterede parametre, bør ses i sammenhæng med "OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals" (6). Inden for denne begrebsramme er den forbedrede OECD TG 421 omfattet af niveau 4 som et in vivo-assay, der giver data om skadelige virkninger på endokrinrelevante endepunkter. Et endokrint signal alene vil dog ikke nødvendigvis blive opfattet som tilstrækkelig dokumentation for, at testkemikaliet er et hormonforstyrrende stof.
8. I forsøgsmetoden indgives testkemikaliet oralt. Det kan være nødvendigt at ændre forsøgsmetoden, hvis der anvendes andre eksponeringsveje.
9. Før forsøgsmetoden bruges på en blanding for at generere data i lovgivningsøjemed, bør det overvejes, om den vil give resultater, som er egnede til formålet, og i givet fald hvorfor. Sådanne overvejelser er ikke nødvendige, når der foreligger et myndighedskrav om test af blandingen.
10. De anvendte definitioner findes i tillæg 1.

PRINCIP FOR TESTEN

11. Testkemikaliet indgives i graduerede doser til flere grupper hanner og hunner. Hannerne doseres i mindst fire uger og frem til og med dagen før planlagt aflivning (dette omfatter mindst to uger før parring, under parringsperioden og ca. to uger efter parring). I lyset af hannernes begrænsede doseringsperiode inden parring er deres fertilitet ikke nødvendigvis nogen særlig følsom indikator for testikeltoksicitet. Derfor er det særdeles vigtigt, at der foretages en detaljeret histologisk undersøgelse af testiklerne. Kombinationen af en

doseringsperiode på to uger inden parring og efterfølgende parrings-/fertilitebsobservationer og en samlet doseringsperiode på mindst fire uger efterfulgt af en detaljeret histopatologisk undersøgelse af hannernes kønskirtler anses for at være tilstrækkeligt til at påvise størstedelen af virkningerne på hannernes fertilitet og spermatogenese.

12. Hunnerne doseres gennem hele undersøgelsen. Dette omfatter to uger inden parring (med det formål at dække mindst to hele brunstcyklusser), det variable tidsrum frem til befrugtning, drægtighedsperioden og mindst 13 dage efter fødslen frem til og med dagen før planlagt aflivning.
13. Undersøgelsens varighed efter tilvænning til forholdene og vurdering af brunstcyklusen før dosering afhænger af de enkelte hunner og er på ca. 63 dage [mindst 14 dage før parring, (op til) 14 dages parring, 22 dages drægtighed og 13 dages laktation].
14. I eksponeringsperioden observeres dyrene hver dag omhyggeligt for tegn på toksicitet. Dyr, der dør eller aflives i løbet af forsøgsperioden, obduces, og de overlevende dyr aflives og obduces ved forsøgets afslutning.

BESKRIVELSE AF METODEN

Valg af dyreart

15. Denne forsøgsmetode er beregnet til rotter. Hvis de parametre, der er anført i denne forsøgsmetode, undersøges hos andre gnaverarter, gives en detaljeret begrundelse herfor. I det internationale valideringsprogram for påvisning af hormonforstyrrende stoffer i OECD TG 407 (som svarer til kapitel B.7 i dette bilag) blev der kun anvendt rotter. Der bør ikke anvendes stammer med ringe frugtbarhed eller kendt høj forekomst af udviklingsdefekter. Der bør anvendes sunde jomfruelige dyr, som ikke tidligere har været brugt i forsøg. Forsøgsdyrene beskrives med hensyn til art, stamme, køn, vægt og alder. Ved undersøgelsens begyndelse bør vægtvariationen mellem de anvendte dyr være mindst mulig og ikke over 20 % af gennemsnitsvægten for hvert køn. Hvis undersøgelsen gennemføres som en forundersøgelse til en længerevarende undersøgelse eller en undersøgelse af en hel generation, bør der så vidt muligt anvendes dyr fra samme stamme og af samme oprindelse i begge undersøgelser.

Miljø og fodring

16. Alle procedurer skal overholde lokale standarder for pasning af forsøgsdyr. Temperaturen i forsøgslokalet skal være 22 °C ($\pm$ 3 °C). Den relative luftfugtighed skal være mindst 30 % og helst ikke over 70 %, hvilket dog ikke gælder under rengøring af lokalet, men 50-60 % bør tilstræbes. Belysningen skal være kunstig og bestå af 12 timers lys og 12 timers mørke. For så vidt angår fodring, kan der anvendes konventionelt laboratoriefoder med ubegrænset

adgang til vand. Valget af foder kan påvirkes af behovet for at sikre en passende iblanding af et testkemikalie, når dette indgives ad denne vej.

17. Dyrene bør anbringes i bure med små grupper af samme køn. Dyrene kan anbringes enkeltvis, hvis dette er sagligt begrundet. Hvis flere dyr anbringes i samme bur, bør der højst være fem dyr pr. bur. Parring bør finde sted i bure, der er egnede til formålet. Drægtige hunner bør anbringes alene i et bur og have adgang til redemateriale. Lakterende hunner anbringes alene i et bur sammen med deres afkom.
18. Foderet bør analyseres regelmæssigt for forurenende stoffer. En prøve af foderet bør opbevares, indtil rapporten er udarbejdet.

Klargøring af dyrene

19. Sunde unge voksne dyr udvælges tilfældigt til kontrol- og behandlingsgrupperne. Burene anbringes på en sådan måde, at de mulige følger af burenes placering minimeres. Dyrene identificeres entydigt og holdes i deres bure i mindst fem dage, inden undersøgelsen påbegyndes, så de kan vænne sig til laboratorieforholdene.

Fremstilling af doser

20. Det anbefales, at testkemikaliets indgives oralt, medmindre andre indgivelsesveje er bedre egnede. Ved oral indgivelse indgives testkemikaliets normalt med sonde. Alternativt kan testkemikalier indgives via foder eller drikkevand.
21. Hvor det er nødvendigt, opløses eller suspenderes kemikaliets i et egnet bærestof. Det anbefales, at man først vurderer muligheden for at benytte en vandig opløsning/suspension, derefter en opløsning/emulsion i olie (f.eks. majsolie) og først derefter eventuel opløsning i andre bærestoffer. For andre bærestoffer end vand skal bærestoffets toksiske egenskaber være kendt. Testkemikaliets stabilitet og homogenitet i bærestoffet skal bestemmes.

FREMGANGSMÅDE

Dyrenes antal og køn

22. Det anbefales, at hver gruppe startes op med mindst 10 hanner og 12-13 hunner. Hunnernes brunstcyklus vurderes før eksponering, og dyr, der ikke udviser typiske fire-fem-dages cyklusser, medtages ikke i undersøgelsen. Derfor anbefales det at starte ud med ekstra hunner for at nå op på 10 hunner pr. gruppe. Medmindre der er tale om markante toksiske virkninger, forventes det, at dette vil give mindst otte drægtige hunner pr. gruppe, hvilket normalt er det lavest accepterede antal drægtige hunner pr. gruppe. Formålet hermed er at sikre, at der produceres tilstrækkelig meget afkom til, at der kan foretages en meningsfuld vurdering af testkemikaliets potentielle virkning på fertilitet, drægtighed, moderdyrenes adfærd og dieadfærd samt vækst og udvikling i F₁-generationen fra befrugtning og frem til dag 13 efter fødslen.

Dosering

23. Der bør anvendes generelt mindst tre testgrupper og en kontrolgruppe. Dosisniveauerne kan baseres på oplysninger fra test af akut toksicitet eller på resultater fra undersøgelser med gentagen dosering. Bortset fra behandlingen med testkemikaliet bør dyr i kontrolgruppen behandles på samme måde som testgruppens dyr. Hvis der anvendes et bærestof til indgivelse af testkemikaliet, bør kontrolgruppen have den samme mængde bærestof som den gruppe, der modtager den største mængde bærestof.
24. Dosisniveauerne bør udvælges under hensyntagen til eventuelle foreliggende data om toksicitet og (toksiko)kinetik. Der bør endvidere tages hensyn til, at der kan være forskel på følsomheden hos drægtige og ikke-drægtige dyr. Det højeste dosisniveau bør vælges med henblik på at fremkalde toksiske virkninger, men ikke død eller alvorlig lidelse. Derefter bør en aftagende række dosisniveauer vælges, som giver mulighed for at påvise et eventuelt dosis/effekt-forhold, og som laveste dosis et niveau, hvor ingen skadelige virkninger observeres (NOAEL). Ved fastlæggelse af den aftagende række dosisniveauer svarer de optimale intervaller ofte til en faktor på to til fire, og i mange tilfælde må tilføjelse af en fjerde behandlingsgruppe foretrækkes frem for meget store intervaller (f.eks. større end en faktor 10) mellem doseringerne.
25. Hvis der observeres generel toksicitet (f.eks. reduceret kropsvægt, virkninger på lever, hjerte, lunger eller nyrer osv.) eller andre forandringer, der eventuelt ikke er toksiske virkninger (f.eks. reduceret indtagelse af føde eller forstørret lever), bør de observerede virkninger på de endokrinfølsomme endepunkter fortolkes med forsigtighed.

Grænsetest

26. Såfremt et oralt enkeltdosisniveau på mindst 1 000 mg/kg kropsvægt/dag eller en ækvivalent procentdel tilsat foderet eller drikkevandet med de til dette forsøg beskrevne metoder ikke frembringer observerbare toksiske virkninger, og hvis der ikke på grundlag af data fra strukturelt beslægtede stoffer kan ventes toksiske virkninger, kan en fuldstændig undersøgelse med anvendelse af flere dosisniveauer betragtes som unødvendig. Grænsetesten gælder, medmindre data om human eksponering viser, at der er behov for anvendelse af et højere oralt dosisniveau. For andre indgivelsesmåder – f.eks. inhalation eller påføring på huden – kan testkemikaliet's fysiske-kemiske egenskaber ofte være bestemmende for den maksimalt opnåelige koncentration.

Indgivelse af doser

27. Dyrene modtager testkemikaliet hver dag syv dage om ugen. Hvis testkemikaliet indgives med sonde, bør det gøres i en enkelt dosis med anvendelse af en gastrisk sonde eller et passende intubationsrør. Hvor stor en væskemængde, der kan indgives på én gang, afhænger af forsøgsdyrets størrelse. Denne mængde må højst være 1 ml/100 g kropsvægt, bortset fra vandige opløsninger, hvor der kan anvendes 2 ml/100 g kropsvægt. Hvis der

ikke er tale om irriterende eller ætsende testkemikalier, hvis virkninger sædvanligvis forstærkes ved højere koncentrationer, bør variabiliteten af testmængden minimeres ved justering af koncentrationen, således at der sikres en konstant mængde ved alle dosisniveauer.

28. Når testkemikalier indgives via foder eller drikkevand, er det vigtigt at sikre, at de pågældende mængder af testkemikaliets ikke griber forstyrrende ind i den normale ernærings- eller vandbalance. Når testkemikaliets indgives via foderet, kan det enten gives ved konstant koncentration i foderet (ppm) eller ved et konstant dosisniveau i forhold til dyrenes kropsvægt. Det anvendte alternativ bør anføres. Ved indgivelse med sonde bør dosis gives på nogenlunde samme tidspunkt hver dag og justeres mindst en gang om ugen, så dosisniveauet holdes konstant i forhold til kropsvægten.

Forsøgsplan

29. Doseringen af begge køn påbegyndes senest to uger før parring, efter at dyrene har haft mindst fem dage til at vænne sig til laboratorieforholdene, og hunnerne er blevet screenet for en normal brunstcyklus (i en tougersperiode forud for behandling). Undersøgelsen planlægges således, at vurderingen af brunstcyklus påbegyndes hurtigt efter, at dyrene er blevet fuldt kønsmodne. Dette kan variere en smule for de forskellige rottestammer i forskellige laboratorier og er f.eks. for Sprague Dawley-rotter, når dyrene er 10 uger gamle, og for Wistar-rotter, når de er omkring 12 uger gamle. Moderdyr og deres afkom aflives dag 13 efter fødslen eller umiddelbart derefter. Dagen for fødslen (dvs. hvor fødslen afsluttes) defineres som dag 0 efter fødslen. Hunner, der ikke udviser nogen tegn på kopulation, aflives 24-26 dage efter den sidste dag i parringsperioden. Doseringen fortsættes hos begge køn i parringsperioden. Hannerne bør stadig doseres efter parringsperioden, og mindst indtil den samlede doseringsperiode på mindst 28 dage er afsluttet. Derefter aflives de, eller doseringen fortsættes med henblik på eventuel fornyet parring, hvis dette findes hensigtsmæssigt.
30. Moderdyrene doseres hver dag gennem hele drægtighedsperioden og mindst frem til og med dag 13 efter fødslen eller dagen før aflivning. I undersøgelser, hvor testkemikaliets indgives ved inhalation eller påføring på huden, bør doseringen fortsættes mindst frem til og med dag 19 i drægtighedsperioden, og doseringen bør genoptages hurtigst muligt og senest PND 4.
31. Der findes et diagram over forsøgsplanen i tillæg 2.

Parringsmetode

32. I denne undersøgelse bør der normalt anvendes 1:1-parring (én han og én hun). Dette princip kan fraviges, hvis hannen skulle dø. Hunnen bør anbringes sammen med den samme han, indtil der observeres tegn på kopulation, eller indtil der er gået to uger. Hunnerne undersøges hver morgen for tilstedeværelse af sperma eller vaginalprop. Dag 0 i

drægtighedsperioden defineres som den dag, hvor tegn på parring bekræftes (der observeres vaginalprop eller sperma). Lykkes parring ikke, kan fornyet parring af hunnerne med afprøvede hanner fra samme gruppe overvejes.

Kuldstørrelse

33. På dag 4 efter fødslen standardiseres hvert kuld, ved at overskydende unger fjernes ved vilkårlig udvælgelse, så hvert kuld i videst muligt omfang kommer til at bestå af fire eller fem unger pr. køn, alt efter den normale kuldstørrelse i den anvendte rottestamme. Der bør tages blodprøver fra to af de overskydende unger, som samles og bruges til bestemmelse af T4-niveauer i serum. Selektiv fjernelse af unger, f.eks. baseret på kropsvægt eller anogenital afstand (AGD), er ikke hensigtsmæssig. Når antallet af han- eller hununger gør det umuligt at få fire eller fem af hvert køn i hvert kuld, er en delvis standardisering (f.eks. seks hanner og fire hunner) acceptabel. Ingen unger fjernes, når et kuld er på mindre end målet for fjernelse (otte eller 10 unger/kuld). Hvis der kun er én unge over målet for fjernelse, vil der kun blive fjernet én unge, som vil blive brugt til indsamling af blod til eventuel vurdering af T4 i serum.
34. Hvis ikke kuldstørrelsen standardiseres, aflives to unger pr. kuld dag 4 efter fødslen, og der tages blodprøver til måling af thyreoideahormonkoncentrationer i serum. Hvis det er muligt, skal disse to unger pr. kuld være hununger, så hanungerne bevares til vurdering af bibeholdelsen af brystvorter, medmindre fjernelsen af disse to unger betyder, at der ikke er flere hunner tilbage til afsluttende vurdering. Der fjernes ingen unger, når kullet er på mindre end otte eller 10 unger/kuld (alt efter den normale kuldstørrelse i den anvendte rottestamme). Hvis der kun er én overskydende unge i forhold til den normale kuldstørrelse, vil der kun blive fjernet én unge, som vil blive brugt til indsamling af blod til eventuel vurdering af T4 i serum.

Observationer i levende dyr

Kliniske observationer

35. Gennem hele testperioden bør der foretages generelle kliniske observationer mindst én gang om dagen og hyppigere, hvis der observeres tegn på toksicitet. Observationerne bør fortrinsvis finde sted på samme tidspunkt(er) hver dag og under hensyntagen til det tidspunkt, hvor de forventede virkninger efter dosering topper. Relevante adfærdssændringer, tegn på vanskelig eller forlænget fødsel og alle toksicitetstegn, herunder mortalitet, bør registreres. Disse registreringer bør omfatte tidspunktet for toksicitetstegnenes indtræden, grad og varighed.

Kropsvægt og foder-/vandindtagelse

36. Han- og hundyr bør vejes den dag, doseringen indledes, og derefter mindst en gang om ugen og ved forsøgets afslutning. I drægtighedsperioden bør hunnerne vejes på dag 0, 7, 14

og 20 og senest 24 timer efter fødslen (dag 0 eller 1 efter fødslen) samt mindst på dag 4 og 13 efter fødslen. Disse observationer bør rapporteres individuelt for hvert voksent dyr.

37. Før parring og i drægtigheds- og laktationsperioden bør foderindtaget måles mindst en gang om ugen. Måling af foderindtaget i parringsperioden er valgfrit. Hvis testkemikaliet indgives via drikkevandet, bør vandindtagelsen i disse perioder også måles.

Brunstcyklusser

38. Brunstcyklusserne bør overvåges, inden behandlingen indledes, for at udvælge de hunner til undersøgelsen, der har en regelmæssig cyklus (jf. punkt 22). Vaginalt smear bør også overvåges dagligt fra behandlingens indledning, og indtil der findes tegn på parring. Hvis der er problemer med akutte stressvirkninger, der kan ændre brunstcyklussen, når doseringen indledes, kan laboratorierne eksponere forsøgsdyrene i to uger og derefter indsamle vaginalt smear hver dag i mindst to uger før parring for at overvåge brunstcyklussen og fortsætte overvågningen i parringsperioden, indtil der findes tegn på parring. Udtagning af celleprøver fra vagina/cervix skal ske forsigtigt for at undgå at forstyrre slimhinden, hvilket ellers kunne inducere pseudodrægtighed (7) (8).

Parametre for afkom

39. Drægtighedsperioden bør registreres og beregnes fra drægtighedsdag 0. Hvert kuld undersøges hurtigst muligt efter fødslen til bestemmelse af ungeres antal og køn, dødfødte, levendefødte, små uudviklede unger (unger, der er signifikant mindre end ungerne i kontrolgruppen) og tilstedeværelse af alvorlige abnormiteter.
40. De levende unger tælles, og deres køn bestemmes, og kullet vejes senest 24 timer efter fødslen (dag 0 eller 1 efter fødslen) samt mindst på dag 4 og 13 efter fødslen. Ud over observationerne i punkt 35 bør al unormal adfærd hos afkommet registreres.
41. Ungernes AGD bør måles den samme dag efter fødslen mellem PND 0 og PND 4. Ungernes kropsvægt bør registreres den dag, AGD måles, og AGD bør normaliseres til et mål for ungeres størrelse, helst kubikroden af kropsvægten (9). Antallet af brystvorter/areolae hos hanungerne tælles på PND 12 eller 13 som anbefalet i OECD GD 151 (10).

Klinisk biokemi

42. Der tages blodprøver fra et bestemt sted i henhold til nedenstående:

- fra mindst to unger pr. kuld på dag 4 efter fødslen, hvis antallet af unger gør det muligt (jf. punkt 33-34)
- fra alle moderdyr og mindst to unger pr. kuld ved forsøgets afslutning på dag 13 og
- fra alle voksne hanner ved forsøgets afslutning.

Alle blodprøver opbevares under egnede forhold. Blodprøver fra dag 13-unger og voksne hanner undersøges for niveauet af thyreoideahormoner (T4) i serum. Der kan eventuelt foretages yderligere vurdering af T4 i blodprøver fra moderdyr og dag 4-unger. Andre hormoner kan eventuelt også måles. Blod fra unger til thyreoideahormonanalyse kan samles pr. kuld. Thyreoideahormoner (T4 og TSH) bør fortrinsvis måles som en samlet værdi.

43. Følgende faktorer kan påvirke variabiliteten og de absolutte koncentrationer i hormonanalyserne:
- aflivningstidspunkt på grund af de forskellige hormonkoncentrationer i løbet af døgnet
 - aflivningsmetode, der har til formål at undgå unødigt stress af dyrene, som kan påvirke hormonkoncentrationerne
 - analysesæt til hormonanalyser, der kan have forskellige standardkurver.
44. Plasmaprøver, der specifikt er beregnet til hormonanalyse, tages på nogenlunde samme tidspunkt på dagen. De numeriske værdier, der fås ved analyse af hormonkoncentrationer, varierer ved anvendelse af forskellige analysesæt på markedet.

Patologi

Makroskopisk undersøgelse

45. På aflivningstidspunktet eller ved død under forsøget undersøges de voksne dyr makroskopisk for eventuelle abnormiteter eller patologiske forandringer. Særlig opmærksomhed bør rettes mod kønsorganerne. Antallet af implantationssteder bør registreres. Det vaginale smear bør undersøges om morgenen på obduktionsdagen for at bestemme stadiet i brunstcyklussen og muliggøre korrelation med den histopatologiske undersøgelse af ovarierne.
46. På alle voksne handyr renses testikler og bitestikler samt prostata og vesiculae seminales og prostata anterior som én samlet enhed for alt vedhængende væv, og de vejes hurtigst muligt (våd vægt) efter dissektion, så udtørring undgås. Derudover kan eventuelle organvejninger omfatte levator ani plus bulbocavernosus-muskelkomplekset, Cowpers kirtler og glans penis i hanner samt parrede ovarier (våd vægt) og uterus (herunder cervix) i hunner. Disse valgfrie vejninger bør foretages hurtigst muligt efter dissektion.
47. Døde unger og unger, der aflives på dag 13 efter fødslen eller hurtigt derefter, bør som minimum undersøges omhyggeligt på kroppens ydre for større abnormiteter. Særlig opmærksomhed bør udvises over for de eksterne kønsorganer, som bør undersøges for tegn på forandringer i udviklingen. På dag 13 præserves skjoldbruskkirtlen fra en han- og en hununge pr. kuld.
48. Ovarier, testikler, sekundære kønsorganer (uterus og cervix, bitestikler, prostata, vesiculae seminales og prostata anterior), skjoldbruskkirtel og alle organer, der udviser makroskopiske læsioner, fra alle voksne dyr præserves. Fiksering med formalin

anbefales ikke til rutinemæssig undersøgelse af testikler og bitestikler. Anvendelse af Bouins væske eller modificeret Davidson-fikseringsmiddel er en acceptabel metode til præservering af dette væv (11). Tunica albuginea kan punkteres forsigtigt og overfladisk i begge ender af organet med en kanyler, der muliggør hurtig penetration af fikseringsmidlet.

Histopatologisk undersøgelse

49. Der bør foretages en detaljeret histologisk undersøgelse af ovarier, testikler og bitestikler (hvor der lægges særlig vægt på spermatogenesens faser og histopatologien af den interstitielle cellestruktur i testiklerne) fra dyrene i højdosisgruppen og kontrolgruppen. De øvrige præserverede organer, herunder skjoldbruskkirtler fra unger og voksne dyr, kan undersøges om nødvendigt. Skjoldbruskkirtlens vægt kan bestemmes efter fiksering. Rensningen for vedhængende væv bør også foretages meget omhyggeligt og først efter fiksering for at undgå beskadigelse af vævet. Beskadiget væv kan kompromittere den histopatologiske analyse. Undersøgelserne skal udvides til dyrene i de andre doseringsgrupper, hvis der observeres ændringer i højdosisgruppen. I vejledningen om histopatologi (11) findes der flere oplysninger om dissektion, fiksering, udtagning af snit og histopatologisk undersøgelse af endokrine væv.

DATA OG RAPPORTERING

Data

50. Der bør fremlægges data om hvert enkelt dyr. Derudover bør alle data sammenfattes i tabelform med angivelse for hver forsøgsgruppe af antal dyr ved forsøgets begyndelse, antal dyr, som er fundet døde under forsøget eller aflivet af humane grunde, tidspunkt for eventuel død eller human aflivning, antal fertile dyr, antal drægtige hundyr, antal dyr, som viser tegn på toksisk virkning, beskrivelse af iagttagne toksicitetstegn, herunder begyndelsestidspunkt, varighed og sværhed af alle de toksiske virkninger, arten af de histopatologiske forandringer og alle relevante data om kuldene. Tillæg 3 indeholder en sammenfattende rapport i tabelform, der har vist sig at være særdeles velegnet til vurdering af reproduktions-/udviklingsmæssige virkninger.
51. Som følge af undersøgelsens begrænsede omfang er de statistiske analyser i form af test for "signifikans" af begrænset værdi for mange endepunkter, især de reproduktionsrelaterede endepunkter. Hvis der anvendes statistiske analyser, bør den valgte metode være egnet til fordeling af de undersøgte variabler og vælges, inden undersøgelsen indledes. Statistiske analyser af AGD og bibeholdelse af brystvorter ("nipple retention") bør baseres på data fra de enkelte unger under hensyntagen til virkninger på de enkelte kuld. Når det er hensigtsmæssigt, er det kuldene, der er analyseenheden. Statistiske analyser af ungernes kropsvægt bør baseres på data fra de enkelte unger under hensyntagen til kuldstørrelsen. På grund af den lille gruppestørrelse kan anvendelsen af historiske

kontroldata (om f.eks. kuldstørrelse), når sådanne foreligger, også være en hjælp i forbindelse med fortolkningen af undersøgelsesresultaterne.

Vurdering af resultater

52. Resultaterne af denne toksicitetsundersøgelse bør vurderes med hensyn til de observerede virkninger samt obduktionsfund og mikroskopiske fund. Vurderingen skal omfatte sammenhæng mellem dyrenes eksponering for testkemikaliet og tilstedeværelse eller fravær, forekomst og sværhedsgrad af abnormiteter, herunder makroskopiske læsioner, identificerede målorganer, manglende fertilitet, unormale kliniske fund, påvirkning af reproduktions- og ynglepræstationer, ændringer af kropsvægt, indvirkning på mortaliteten og eventuelle andre toksiske virkninger.
53. På grund af hannernes korte behandlingsperiode bør histopatologien for testikler og bitestikler ses i sammenhæng med fertilitetsdataene ved vurdering af den reproduktionsmæssige virkning på hannerne. Anvendelsen af historiske kontroldata om reproduktion/udvikling (f.eks. med hensyn til kuldstørrelse, AGD, bibeholdelse af brystvorter ("nipple retention"), T4-niveauer i serum) kan også, når sådanne foreligger, være en hjælp i forbindelse med fortolkningen af undersøgelsesresultaterne.
54. Med henblik på kvalitetskontrol foreslås det, at historiske kontroldata indsamles, og at der beregnes variationskoefficienter for numeriske data, især for parametre med relation til påvisning af hormonforstyrrende virkninger. Disse data kan bruges i forbindelse med sammenligninger, når de faktiske undersøgelser evalueres.

Testrapport

55. Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie:

- oprindelse, batchnummer, sidste anvendelsesdato, hvis dette foreligger
- testkemikaliets stabilitet, hvis kendt.

Stof med kun én bestanddel:

- fysisk udseende, vandopløselighed og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber
- kemisk identifikation, f.eks. IUPAC-navn eller CAS-navn, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel, renhed, kemisk identitet af urenheder, i det omfang det er relevant og praktisk muligt, osv.

Stof med flere bestanddele, UVCB-stoffer og blandinger:

- kendetegnet så vidt muligt ved kemisk identitet (jf. ovenfor), kvantitativ forekomst og bestanddelenes relevante fysisk-kemiske egenskaber.

Eventuelt bærestof:

- begrundelse for valg af bærestof, hvis dette ikke er vand.

Forsøgsdyr:

- den anvendte art/stamme
- dyrenes antal, alder og køn
- oprindelse, miljøbetingelser, foder mv.
- de enkelte dyrs vægt ved testens begyndelse
- begrundelse for andre arter end rotte.

Testbetingelser:

- begrundelse for valg af dosisniveau
- oplysninger om formulering af testkemikalie eller iblanding heraf i foderet, opnået koncentration, foderblandingsens stabilitet og homogenitet
- oplysninger om indgivelse af testkemikaliets
- eventuel omregning af testkemikaliets koncentration (ppm) i foder/drikkevand til faktisk dosis (mg pr. kg kropsvægt pr. dag)
- oplysninger om foder- og vandkvalitet
- detaljeret beskrivelse af randomiseringsproceduren til eventuel udvælgelse af unger til fjernelse.

Resultater:

- kropsvægt og ændringer i kropsvægt
- foderindtagelse og indtagelse af vand, hvis disse data foreligger
- oplysninger om toksisk reaktion inddelt efter køn og dosis, herunder fertilitet, drægtighed og andre tegn på toksicitet
- drægtighedsperiodens længde
- toksiske eller andre virkninger på reproduktion, afkom, postnatal vækst osv.
- art, sværhedsgrad og varighed af kliniske symptomer (hvad enten disse er reversible eller ej)
- antal voksne hunner med normal eller anormal brunstcyklus og cyklusvarighed
- antal levendefødte og postimplantationstab
- data om ungernes kropsvægt
- AGD for alle unger (og kropsvægt på dagen for AGD-måling)

- bibeholdelse af brystvorter ("Nipple retention") hos hanunger
- thyreoideahormonniveauer, dag 13-unger og voksne hanner (og eventuelt moderdyr og dag 4-unger)
- antal unger med makroskopisk synlige abnormiteter, makroskopisk vurdering af eksterne genitalia, antal små uudviklede unger
- dødstidspunkt under undersøgelsen, eller hvorvidt dyrene overlevede til undersøgelsens afslutning
- antal implantationer, kuldstørrelse og kuldenes vægt på registreringstidspunktet
- kropsvægt ved aflivning og organvægt for forældredyrene
- obduktionsfund
- detaljeret beskrivelse af alle histopatologiske fund
- absorptionsdata (hvis de foreligger)
- når det er hensigtsmæssigt, statistisk behandling af resultaterne.

Diskussion af resultater

Konklusioner

Fortolkning af resultater

56. Ved denne undersøgelse vurderes den reproduktions-/udviklingsmæssige toksicitet i forbindelse med gentagen dosering (jf. punkt 5 og 6). Den kan vise, om det er nødvendigt at foretage yderligere undersøgelser, og udstikker retningslinjer for udformningen af efterfølgende undersøgelser. Med hensyn til fortolkningen af de reproduktions- og udviklingsrelaterede resultater henvises til OECD's vejledende dokument 43 (12). OECD's vejledende dokument nr. 106 om histologisk vurdering af endokrine og reproduktionsrelaterede test i gnavere (11) indeholder oplysninger om præpareringen og vurderingen af (endokrine) organer og vaginalt smear, der kan være nyttige i forbindelse med denne testvejledning.

LITTERATUR

- (1) OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Available upon request at Organisation for Economic and Cooperation and Development, Paris.
- (2) OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. Available Upon Request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (3) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998. Available Upon Request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (4) OECD (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 217), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (5) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations. Series on Testing and Assessment, (No 19), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (6) OECD (2011). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (7) Goldman, J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M. og Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, Birth Defects Research, Part B, 80 (2), 84-97.
- (8) Sadleir R.M.F.S (1979). Cycles and Seasons, in Auston C.R. og Short R.V. (eds.), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.
- (9) Gallavan R.H. Jr , Holson J.F., Stump D.G., Knapp J.F. og Reynolds V.L. (1999). Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights, Reproductive Toxicology, 13: 383-390.
- (10) OECD (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment,

Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 151), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

- (11) OECD (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No106), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (12) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 43), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

Tillæg 1

DEFINITIONER (SE OGSÅ OECD GD 150 (6))

Androgenicitet: et kemikalies evne til at fungere som et naturligt androgent hormon (f.eks. testosteron) i en pattedyrsorganisme.

Antiandrogenicitet: et kemikalies evne til at undertrykke virkemåden for et naturligt androgent hormon (f.eks. testosteron) i en pattedyrsorganisme.

Antiøstrogenericitet: et kemikalies evne til at undertrykke virkemåden for et naturligt østrogent hormon (f.eks. østradiol 17 β) i en pattedyrsorganisme.

Antithyreoid aktivitet: et kemikalies evne til at undertrykke virkemåden for et naturligt thyreoideahormon (f.eks. T₃) i en pattedyrsorganisme.

Kemikalie: et stof eller en blanding.

Udviklingstoksicitet: manifestering af reproduktionstoksicitet, som repræsenterer prænatale, perinatale, postnatale, strukturelle eller funktionsmæssige forstyrrelser i afkommet.

Dosering: et generelt udtryk, som omfatter dosis samt doseringsfrekvens og -varighed.

Dosis: mængden af indgivet testkemikalie. Dosis angives som vægt af testkemikalie pr. enhed af forsøgsdyrets vægt pr. dag (f.eks. mg/kg kropsvægt/dag) eller som en konstant koncentration i foderet.

Synlig toksicitet: et generelt udtryk, som angiver klare tegn på toksicitet efter indgivelse af testkemikaliets. Disse tegn bør være tilstrækkelige til farevurdering og bør være af en sådan karakter, at en forøgelse af den indgivne dosis må forventes at resultere i udvikling af svære toksiske virkninger og sandsynligvis død.

Fertilitetsforringelse: forstyrrelse af hanners eller hunners reproduktionsfunktioner eller -evne.

Toksisk virkning på moderdyret: skadelig virkning på drægtige hunner, der opstår enten specifikt (direkte virkning) eller ikke-specifikt (indirekte virkning).

NOAEL: forkortelse for "no-observed-adverse-effect level" (niveau, hvor ingen skadelige virkninger observeres). Dette er det højeste dosisniveau, hvor der ikke observeres behandlingsrelaterede skadelige virkninger.

Østrogenericitet: et kemikalies evne til at fungere som et naturligt østrogent hormon (f.eks. østradiol 17 β) i en pattedyrsorganisme.

Reproduktionstoksicitet: fremkaldelse af skadelige virkninger på afkommet og/eller forringelse af hanners og hunners reproduktionsfunktioner eller -evne.

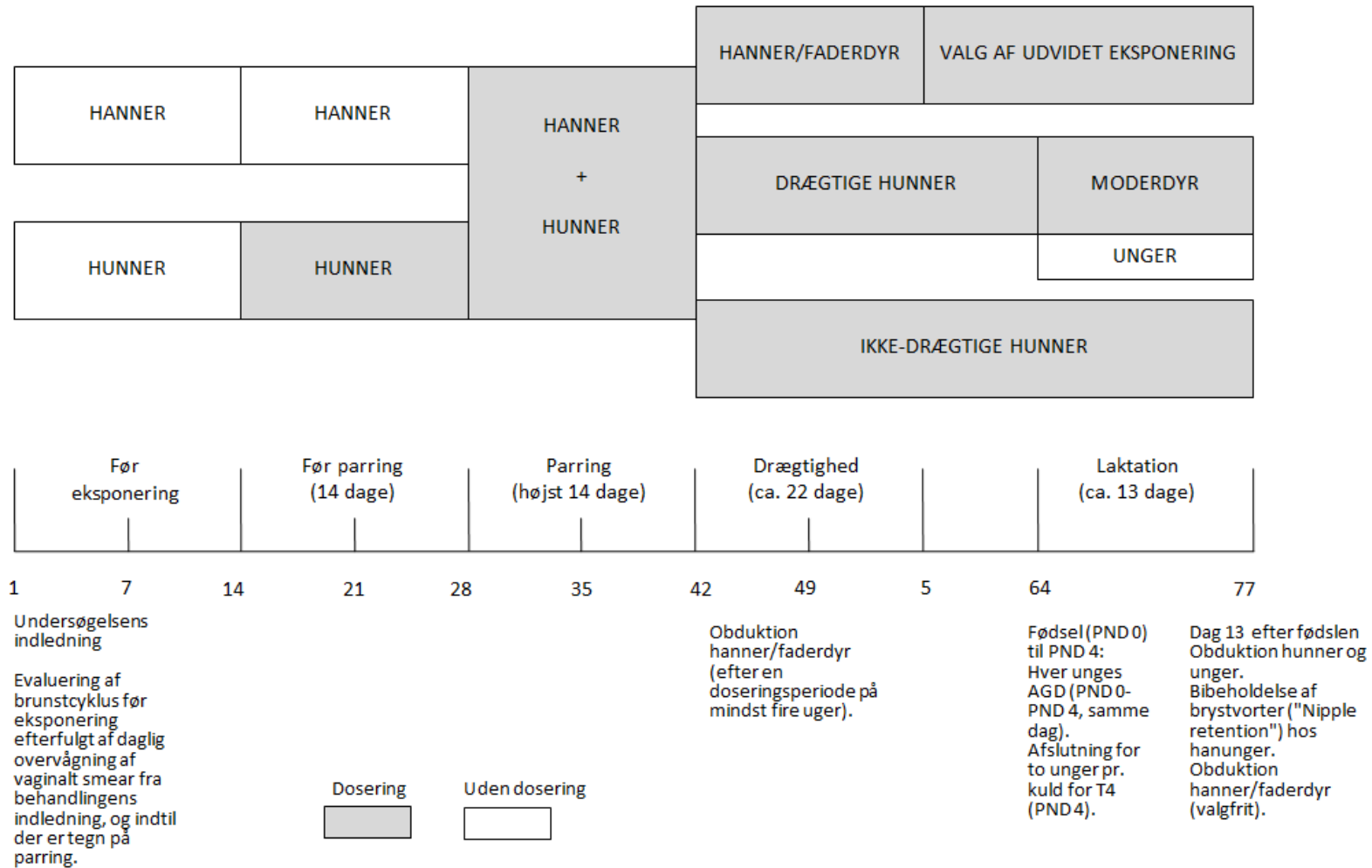
Testkemikalie: et stof eller en blanding, der testes med denne forsøgsmetode.

Thyreoid aktivitet: et kemikalies evne til at fungere som et naturligt thyreoideahormon (f.eks. T₃) i en pattedyrsorganisme.

Validering: en videnskabelig proces til karakterisering af en forsøgsmetodes operationelle krav og begrænsninger og påvisning af dens pålidelighed og relevans til et bestemt formål.

Tillæg 2

DIAGRAM OVER FORSØGSPLANEN, SOM VISER DEN MAKSIMALE VARIGHED AF UNDERSØGELSEN BASERET PÅ EN FULD 14-DAGES PARRINGSPERIODE



Tillæg 3

SAMMENFATTENDE RAPPORT I TABELFORM OVER REPRODUKTIONS- /UDVIKLINGSMÆSSIGE VIRKNINGER

OBSERVATIONER	VÆRDIER				
Dosering (enheder)	0 (kontrol)	.. .	.. .	.. .	.. .
Startede par (N)					
Brunstcyklus (som minimum gennemsnitlig varighed og frekvens for uregelmæssige cyklusser)					
Hunner, som viser tegn på kopulation (N)					
Hunner, som bliver drægtige (N)					
Undfangelse, dag 1-5 (N)					
Undfangelse, dag 6- . . . ⁽¹⁾ (N)					
Drægtighed ≤ 21 dage (N)					
Drægtighed = 22 dage (N)					
Drægtighed ≥ 23 dage (N)					
Moderdyr med levende nyfødte unger (N)					
Moderdyr med levende unger på dag 4 efter fødslen (N)					
Implantater/moderdyr (gennemsnit)					
Levende unger/moderdyr ved fødslen (gennemsnit)					
Levende unger/moderdyr på dag 4 (gennemsnit)					
Kønsfordeling (han/hun) ved fødslen (gennemsnit)					
Kønsfordeling (han/hun) på dag 4 (gennemsnit)					
Kuldenes vægt ved fødslen (gennemsnit)					

⁽¹⁾ sidste dag i parringsperioden

Kuldenes vægt på dag 4 (gennemsnit)					
Ugernes vægt ved fødslen (gennemsnit)					
Ugernes vægt på tidspunktet for AGD-måling (gennemsnit hanner, gennemsnit hunner)					
Ugernes AGD på den samme dag efter fødslen, fødsel – dag 4 (gennemsnit hanner, gennemsnit hunner, PND-angivelse)					
Ugernes vægt på dag 4 (gennemsnit)					
Hanugernes bibeholdelse af brystvorter ("nipple retention") på dag 13 (gennemsnit)					
Ugernes vægt på dag 13 (gennemsnit)					
UNGER MED ABNORMITETER					
Moderdyr med 0					
Moderdyr med 1					
Moderdyr med ≥ 2					
TAB AF AFKOM					
Prænatalet/efter implantation (implantationer minus levendefødte)					
Hunner med 0					
Hunner med 1					
Hunner med 2					
Hunner med ≥ 3					
Postnatalet (levendefødte minus levende på dag 13 efter fødslen)					
Hunner med 0					
Hunner med 1					
Hunner med 2					
Hunner med ≥ 3					

B.64 KOMBINERET SCREENINGSTEST FOR TOKSICITET VED GENTAGEN DOSERING OG REPRODUKTIONS-/UDVIKLINGSTOKSICITET

INDLEDNING

1. Denne forsøgsmetode svarer til OECD-testvejledning (Test Guideline (TG)) 422 (2016). OECD-vejledningerne om testning af kemikalier bliver revideret regelmæssigt på baggrund af den videnskabelige udvikling. Den oprindelige screeningstestvejledning 422 blev vedtaget i 1996 med udgangspunkt i en protokol for en kombineret screeningstest for gentagen dosering og reproduktion/udvikling ("Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Screening Test"), der blev drøftet på to ekspertmøder i henholdsvis London i 1990 (1) og Tokyo i 1992 (2).
2. Denne forsøgsmetode kombinerer screening for reproduktions-/udviklingstoksicitet, som er baseret på de erfaringer, medlemsstaterne har gjort ved anvendelse af den oprindelige metode på eksisterende kemikalier, der fremstilles i store mængder, i forsøg med positive kontrolstoffer (3) (4) med screening for toksicitet ved gentagen dosering i overensstemmelse med OECD-testvejledning 407 (toksicitet ved gentagen dosering (28 dage, oral) hos gnavere, der svarer til kapitel B.7 i dette bilag).
3. Denne forsøgsmetode er blevet opdateret med endepunkter for hormonforstyrrende stoffer som en opfølgning på de højt prioriterede aktiviteter, som OECD indledte i 1998 for at revidere eksisterende testvejledninger og udvikle nye testvejledninger for screening og testning af potentielt hormonforstyrrende stoffer (5). I denne forbindelse blev testvejledning 407 (der svarer til kapitel B.7 i dette bilag) i 2008 forbedret med parametre, der er egnede til påvisning af testkemikaliers endokrine virkemåde. Formålet med at opdatere testvejledning 422 var at indlemme endepunkter for hormonforstyrrende stoffer i testvejledningerne om screening, hvor eksponeringsperioderne omfatter følsomme udviklingsmæssige perioder (prænatale eller tidligt postnatale perioder).
4. De valgte supplerende endepunkter for hormonforstyrrende stoffer, som også er at finde i testvejledning 443 (udvidet reproduktionstoksicitetsundersøgelse i én generation, som svarer til kapitel B.56 i dette bilag), blev indlemmet i testvejledning 422 på baggrund af en feasibilityundersøgelse, hvor der blev set på de videnskabelige og tekniske spørgsmål i forbindelse med deres indlemmelse samt eventuelle tilpasninger af testens udformning som følge heraf (6).
5. Denne forsøgsmetode er beregnet til at generere begrænsede oplysninger om et testkemikalies virkninger på han- og hundyrers reproduktionsevne, herunder kønskirtlernes funktion, parringsadfærd, befrugtning, conceptus' udvikling og fødsel. Den er ikke et alternativ til og erstatter ikke de eksisterende forsøgsmetoder B.31, B.34, B.35 og B.56.

INDLEDENDE OVERVEJELSER

6. Efter udførelse af en akut test med henblik på indledende vurdering af et testkemikalies toksicitet, kan der udføres en oral toksicitetstest ved anvendelse af gentagen dosering til bestemmelse og vurdering af testkemikaliets toksiske egenskaber. Denne undersøgelse skaffer viden om mulige sundhedsfarer, som kan opstå ved gentagen eksponering i en relativt begrænset periode. Metoden omfatter den grundlæggende undersøgelse for toksicitet ved gentagen dosering, der kan bruges til kemikalier, for hvilke en 90-dages undersøgelse ikke er berettiget (f.eks. når produktionsmængden ikke overstiger visse grænser), eller som en forundersøgelse forud for en langtidsundersøgelse. Ved gennemførelse af undersøgelsen følges de vejledende principper og overvejelser, der er anført i OECD's vejledende dokument nr. 19 om anerkendelse, vurdering og anvendelse af kliniske tegn som humane endepunkter for forsøgsdyr, der bruges i sikkerhedsevalueringer (7).
7. Forsøgsmetoden omfatter desuden en screeningstest for reproduktions-/udviklingstoksicitet og kan derfor også anvendes til indhentning af indledende oplysninger om eventuelle virkninger på han- og hundyrers reproduktionsevne, herunder kønskirtlernes funktion, parringsadfærd, befrugtning, conceptus' udvikling og fødsel, enten tidligt i vurderingen af testkemikaliers toksikologiske egenskaber eller i forbindelse med problematiske kemikalier. Denne forsøgsmetode giver ikke udtømmende oplysninger om alle aspekter af reproduktion og udvikling. Den giver navnlig kun begrænsede muligheder for at påvise postnatale tegn på prænatal eksponering eller virkninger, der induceres under postnatal eksponering. Bl.a. som følge af endepunkternes selektivitet og undersøgelsens korte varighed kan denne metode ikke bruges som endelig dokumentation for, at kemikalier ikke har nogen reproduktions-/udviklingsmæssig virkning. Når der ikke foreligger data fra andre reproduktions-/udviklingstoksicitetstest, kan positive resultater desuden anvendes til indledende farevurdering og som udgangspunkt for beslutninger om nødvendigheden af og tidsplanen for yderligere testning.
8. De resultater, der opnås ved hjælp af de endokrinrelaterede parametre, bør ses i sammenhæng med "OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals" (8). Inden for denne begrebsramme er den forbedrede OECD TG 422 omfattet af niveau 4 som et in vivo-assay, der giver data om skadelige virkninger på endokrinrelevante endepunkter. Et endokrint signal alene vil dog ikke nødvendigvis blive opfattet som tilstrækkelig dokumentation for, at testkemikaliets er et hormonforstyrrende stof.
9. Med denne metode lægges der også vægt på neurologiske virkninger som et specifikt endepunkt, og dyrene skal underkastes omhyggelige kliniske observationer med henblik på indhentning af flest mulige oplysninger. Metoden tager sigte på at identificere kemikalier med neurotoksisk potentiale, som i givet fald bør undersøges nærmere. Herudover kan metoden også vise, om der er grundlæggende tegn på immunologiske virkninger.

10. Når der ikke foreligger data fra andre systemiske toksicitetstest, reproduktions-/udviklingstoksicitetstest, neurotoksicitetstest og/eller immunotoksicitetstest, kan positive resultater anvendes til indledende farevurdering og som udgangspunkt for beslutninger om nødvendigheden af og tidsplanen for yderligere testning. Testen kan være særdeles egnet i forbindelse med OECD's Screening Information Data Set (SIDS) ved vurdering af eksisterende kemikalier, for hvilke der kun foreligger få eller ingen toksikologiske oplysninger, og kan bruges som et alternativ til at udføre to separate test for henholdsvis toksicitet ved gentagen dosering (OCD TG 407, der svarer til kapitel B.7 i dette bilag) og reproduktions-/udviklingstoksicitet (OECD TG 421, der svarer til kapitel B.63 i dette bilag). Den kan endvidere anvendes som en forundersøgelse til bestemmelse af dosisinterval ved mere omfattende reproduktions-/udviklingsrelaterede undersøgelser, eller når det ellers findes relevant.
11. Generelt formodes det, at der er forskel på følsomheden hos drægtige og ikke-drægtige dyr. Det kan derfor være mere kompliceret at bestemme dosisniveauer i denne kombinerede test, som er egnede til både at evaluere generel systemisk toksicitet og specifik reproduktions-/udviklingstoksicitet, end når testene foretages enkeltvis. Derudover kan det være vanskeligere at fortolke testresultaterne med hensyn til generel systemisk toksicitet, end når der foretages en separat undersøgelse med gentagen dosering, især når serum- og histopatologiparametrene ikke samtidig vurderes i undersøgelsen. På grund af disse tekniske vanskeligheder kræver det omfattende erfaring med toksicitetstestning at foretage denne kombinerede screeningstest. Ud over det mindre antal anvendte dyr kan den kombinerede test på den anden side også være bedre til at skelne mellem de direkte reproduktions-/udviklingsmæssige virkninger og dem, der er sekundære i forhold til andre (systemiske) virkninger.
12. I denne test er doseringsperioden længere end de sædvanlige 28 dage for en undersøgelse med gentagen dosering. Til gengæld bruges der færre dyr af hvert køn pr. gruppe i forhold til, når der gennemføres en undersøgelse med gentagen dosering på de sædvanlige 28 dage ud over en screeningstest for reproduktions-/udviklingstoksicitet.
13. I forsøgsmetoden indgives testkemikaliets oralt. Det kan være nødvendigt at ændre forsøgsmetoden, hvis der anvendes andre eksponeringsveje.
14. Før forsøgsmetoden bruges på en blanding for at generere data i lovgivningsøjemed, bør det overvejes, om den vil give resultater, som er egnede til formålet, og i givet fald hvorfor. Sådanne overvejelser er ikke nødvendige, når der foreligger et myndighedskrav om test af blandingen.
15. De anvendte definitioner findes i tillæg 1.

PRINCIP FOR TESTEN

16. Testkemikaliet indgives i graduerede doser til flere grupper hanner og hunner. Hannerne doseres i mindst fire uger frem til og med dagen før planlagt aflivning (dette omfatter mindst to uger før parring, under parringsperioden og ca. to uger efter parring). I lyset af hannernes begrænsede doseringsperiode inden parring er deres fertilitet ikke nødvendigvis nogen særlig følsom indikator for testikeltoksicitet. Derfor er det særdeles vigtigt, at der foretages en detaljeret histologisk undersøgelse af testiklerne. Kombinationen af en doseringsperiode på to uger inden parring og efterfølgende parrings-/fertilitetsobservationer og en samlet doseringsperiode på mindst fire uger efterfulgt af en detaljeret histopatologisk undersøgelse af hannernes kønskirtler anses for at være tilstrækkeligt til at påvise størstedelen af virkningerne på hannernes fertilitet og spermatogenese.
17. Hunnerne doseres gennem hele undersøgelsen. Dette omfatter to uger inden parring (med det formål at dække mindst to hele brunstcyklusser), det variable tidsrum frem til befrugtning, drægtighedsperioden og mindst 13 dage efter fødslen frem til og med dagen før planlagt aflivning.
18. Undersøgelsens varighed efter tilvænning til forholdene og vurdering af brunstcyklussen før dosering afhænger af de enkelte hunner og er på ca. 63 dage [mindst 14 dage før parring, (op til) 14 dages parring, 22 dages drægtighed og 13 dages laktation].
19. I eksponeringsperioden observeres dyrene hver dag omhyggeligt for tegn på toksicitet. Dyr, der dør eller aflives under forsøget, obduces, og de overlevende dyr aflives og obduces ved forsøgets afslutning.

BESKRIVELSE AF METODEN

Valg af dyreart

20. Denne forsøgsmetode er beregnet til rotter. Hvis de parametre, der er anført i denne TG 422, undersøges hos andre gnaverarter, gives en detaljeret begrundelse herfor. I det internationale valideringsprogram for påvisning af hormonforstyrrende stoffer vedrørende TG 407 blev der kun anvendt rotter. Der bør ikke anvendes stammer med ringe frugtbarhed eller kendt høj forekomst af udviklingsdefekter. Der bør anvendes sunde jomfruelige dyr, som ikke tidligere har været brugt i forsøg. Forsøgsdyrene beskrives med hensyn til art, stamme, køn, vægt og alder. Ved undersøgelsens start bør variationen i dyrenes vægt være minimal og ikke overstige $\pm 20\%$ af gennemsnitsvægten for hvert køn. Hvis undersøgelsen gennemføres som en forundersøgelse til en længerevarende undersøgelse eller en undersøgelse af en hel generation, bør der så vidt muligt anvendes dyr fra samme stamme og af samme oprindelse i begge undersøgelser.

Miljø og fodring

21. Alle procedurer skal overholde lokale standarder for pasning af forsøgsdyr. Temperaturen i forsøgslokalet skal være 22 °C (± 3 °C). Den relative luftfugtighed skal være mindst 30 % og helst ikke over 70 %, hvilket dog ikke gælder under rengøring af lokalet. Belysningen skal være kunstig og bestå af 12 timers lys og 12 timers mørke. For så vidt angår fodring, kan der anvendes konventionelt laboratoriefoder med ubegrænset adgang til vand. Valget af foder kan påvirkes af behovet for at sikre en passende iblanding af et testkemikalie, når dette indgives ad denne vej.
22. Dyrene bør anbringes i bure med små grupper af samme køn. Dyrene kan anbringes enkeltvis, hvis dette er sagligt begrundet. Hvis flere dyr anbringes i samme bur, bør der højst være fem dyr pr. bur. Parring bør finde sted i bure, der er egnede til formålet. Drægtige hunner bør anbringes alene i et bur og have adgang til redemateriale. Lakterende hunner anbringes alene i et bur sammen med deres afkom.
23. Foderet bør analyseres regelmæssigt for forurenende stoffer. En prøve af foderet bør opbevares, indtil rapporten er udarbejdet.

Klargøring af dyrene

24. Sunde unge voksne dyr fordeles vilkårligt i forsøgsgrupper og bure. Burene anbringes på en sådan måde, at de mulige følger af burenes placering minimeres. Dyrene identificeres entydigt og holdes i deres bure i mindst fem dage, inden undersøgelsen påbegyndes, så de kan vænne sig til laboratorieforholdene.

Fremstilling af doser

25. Det anbefales, at testkemikallet indgives oralt, medmindre andre indgivelsesveje er bedre egnede. Ved oral indgivelse indgives testkemikallet normalt med sonde. Alternativt kan testkemikalier dog også indgives via foder eller drikkevand.
26. Hvor det er nødvendigt, opløses eller suspenderes kemikallet i et egnet bærestof. Det anbefales, at man først vurderer muligheden for at benytte en vandig opløsning/suspension, derefter en opløsning/suspension i olie (f.eks. majsolie), og først derefter eventuel opløsning i andre bærestoffer. For ikke-vandige bærestoffer skal bærestoffets toksiske egenskaber være kendt. Testkemikaliets stabilitet og homogenitet i bærestoffet skal bestemmes.

FREMGANGSMÅDE

Dyrenes antal og køn

27. Det anbefales, at hver gruppe startes op med mindst 10 hanner og 12-13 hunner. Hunnernes brunstcyklus vurderes før eksponering, og dyr, der ikke udviser typiske fire-fem-dages cyklusser, medtages ikke i undersøgelsen. Derfor anbefales det at starte ud med ekstra hunner for at nå op på 10 hunner pr. gruppe. Medmindre der er tale om markante

toksiske virkninger, forventes det, at dette vil give mindst otte drægtige hunner pr. gruppe, hvilket normalt er det lavest accepterede antal drægtige hunner pr. gruppe. Formålet hermed er at sikre, at der produceres tilstrækkelig meget afkom til, at der kan foretages en meningsfuld vurdering af testkemikaliets potentielle virkning på fertilitet, drægtighed, moderdyrenes adfærd og dieadfærd samt vækst og udvikling i F₁-generationen fra befrugtning og frem til dag 13 efter fødslen. Hvis der påregnes aflivning af dyr under undersøgelsen, bør det oprindelige antal dyr forøges med det antal dyr, der påregnes aflivet i løbet af undersøgelsen. Det kan overvejes at udsætte en yderligere satellitgruppe på fem dyr af hvert køn i kontrolgruppen og i gruppen med den højeste dosis, således at man kan observere evt. reversibilitet, persistens eller forsinket indtræden af systemisk toksicitet i mindst 14 dage efter behandlingen. Dyrene i satellitgruppen parres ikke og vil derfor ikke blive anvendt til vurdering af reproduktions-/udviklingstoksicitet.

Dosering

28. Der bør anvendes generelt mindst tre testgrupper og en kontrolgruppe. Foreligger der ikke egnede data om generel toksicitet, kan der udføres en forundersøgelse til bestemmelse af dosisinterval (dyr af samme stamme og herkomst) til bestemmelse af de doser, der skal anvendes. Bortset fra behandlingen med testkemikaliets bør dyr i kontrolgruppen behandles på samme måde som testgruppens dyr. Hvis der anvendes et bærestof til indgivelse af testkemikaliets, bør kontrolgruppen have den samme mængde bærestof som den gruppe, der modtager den største mængde bærestof.
29. Dosisniveauerne bør udvælges under hensyntagen til eventuelle foreliggende data om toksicitet og (toksiko)kinetik. Der bør endvidere tages hensyn til, at der kan være forskel på følsomheden hos drægtige og ikke-drægtige dyr. Det højeste dosisniveau bør vælges med henblik på at fremkalde toksiske virkninger, men ikke død eller åbenlys lidelse. Derefter vælges en aftagende række dosisniveauer, som giver mulighed for at påvise et eventuelt dosis/effekt-forhold og ingen skadelige virkninger ved det laveste dosisniveau. De optimale intervaller svarer ofte til en faktor på to til fire, og i mange tilfælde må tilføjelse af en fjerde behandlingsgruppe foretrækkes frem for meget store intervaller (f.eks. større end en faktor 10) mellem dosisniveauerne.
30. Hvis der observeres generel toksicitet (f.eks. reduceret kropsvægt, virkninger på lever, hjerte, lunger eller nyrer osv.) eller andre forandringer, der eventuelt ikke er toksiske virkninger (f.eks. reduceret indtagelse af føde eller forstørret lever), bør de observerede virkninger på de endokrinfølsomme endepunkter fortolkes med forsigtighed.

Grænsetest

31. Såfremt et oralt enkeltdosisniveau på mindst 1 000 mg/kg kropsvægt/dag eller en ækvivalent procentdel tilsat foderet eller drikkevandet (baseret på kropsvægten) med de til dette forsøg beskrevne metoder ikke frembringer observerbare toksiske virkninger, og hvis

der ikke på grundlag af data fra strukturelt beslægtede stoffer kan ventes toksiske virkninger, kan en fuldstændig undersøgelse med anvendelse af flere dosisniveauer betragtes som unødvendig. Grænsetesten gælder, medmindre data om human eksponering viser, at der er behov for anvendelse af et højere dosisniveau. For andre indgivelsesmåder – f.eks. inhalation eller påføring på huden – kan testkemikaliets fysisk-kemiske egenskaber ofte være bestemmende for den maksimalt opnåelige eksponering.

Indgivelse af doser

32. Dyrene modtager testkemikaliets hver dag syv dage om ugen. Hvis testkemikaliets indgives med sonde, bør det gøres i en enkelt dosis med anvendelse af en gastrisk sonde eller et passende intubationsrør. Hvor stor en væskemængde, der kan indgives på én gang, afhænger af forsøgsdyrets størrelse. Denne mængde må højst være 1 ml/100 g kropsvægt, bortset fra vandige opløsninger, hvor der kan anvendes 2 ml/100 g kropsvægt. Hvis der ikke er tale om irriterende eller ætsende testkemikalier, hvis virkninger sædvanligvis forstærkes ved højere koncentrationer, bør variabiliteten af testmængden minimeres ved justering af koncentrationen, således at der sikres en konstant mængde ved alle dosisniveauer.
33. Når testkemikaliets indgives via foder eller drikkevand, er det vigtigt at sikre, at de pågældende mængder af testkemikaliets ikke griber forstyrrende ind i den normale ernærings- eller vandbalance. Når testkemikaliets indgives via foderet, kan det enten gives ved konstant koncentration i foderet (ppm) eller ved et konstant dosisniveau i forhold til dyrenes kropsvægt. Det anvendte alternativ bør anføres. Ved indgivelse med sonde bør dosis gives på nogenlunde samme tidspunkt hver dag og justeres mindst en gang om ugen, så dosisniveauet holdes konstant i forhold til kropsvægten. Hvis den kombinerede undersøgelse anvendes som forløber for en længerevarende eller fuldstændig reproduktionstoksicitetsundersøgelse, skal der i begge undersøgelser gives samme fodersammensætning.

Forsøgsplan

34. Doseringen af begge køn påbegyndes to uger før parring, efter at dyrene har haft mindst fem dage til at vænne sig til laboratorieforholdene, og hunnerne er blevet screenet for en normal brunstcyklus (i en tougersperiode forud for behandling). Undersøgelsen planlægges således, at vurderingen af brunstcyklus påbegyndes hurtigt efter, at dyrene er blevet fuldt kønsmodne. Dette kan variere en smule for de forskellige rottestammer i forskellige laboratorier og er f.eks. for Sprague Dawley-rotter, når dyrene er 10 uger gamle, og for Wistar-rotter, når de er omkring 12 uger gamle. Moderdyr og deres afkom aflives dag 13 efter fødslen eller umiddelbart derefter. For at moderdyrene skal kunne faste natten over forud for blodprøvetagning (hvis dette foretrækkes), skal moderdyrene og deres afkom ikke nødvendigvis aflives samme dag. Dagen for fødslen (dvs. hvor fødslen afsluttes) defineres som dag 0 efter fødslen. Hunner, der ikke udviser nogen tegn på kopulation,

aflives 24-26 dage efter den sidste dag i parringsperioden. Doseringen fortsættes hos begge køn i parringsperioden. Hannerne bør stadig doseres efter parringsperioden, og mindst indtil den samlede doseringsperiode på mindst 28 dage er afsluttet. Derefter aflives de, eller doseringen fortsættes med henblik på eventuel fornyet parring, hvis dette findes hensigtsmæssigt.

35. Moderdyrene doseres hver dag gennem hele drægtighedsperioden og mindst frem til og med dag 13 efter fødslen eller dagen før aflivning. I undersøgelser, hvor testkemikaliets indgives ved inhalation eller påføring på huden, bør doseringen fortsættes mindst frem til og med dag 19 i drægtighedsperioden, og doseringen bør genoptages hurtigst muligt og senest den fjerde dag efter fødslen (PND 4).
36. Eventuelle dyr i en satellitgruppe, der anvendes til opfølgingsobservationer, parres ikke. De holdes mindst i yderligere 14 dage efter den planlagte aflivning af moderdyrene uden indgivelse af testkemikalie, således at det kan registreres, om der er forsinkede, vedvarende eller reversible toksiske virkninger.
37. Der findes et diagram over forsøgsplanen i tillæg 2.

Brunstcyklusser

38. Brunstcyklusserne bør overvåges, inden behandlingen indledes, for at udvælge de hunner til undersøgelsen, der har en regelmæssig cyklus (jf. punkt 27). Vaginalt smear bør også overvåges dagligt fra behandlingens indledning, og indtil der findes tegn på parring. Hvis der er problemer med akutte stressvirkninger, der kan ændre brunstcyklussen, når doseringen indledes, kan laboratorierne eksponere forsøgsdyrene i to uger og derefter indsamle vaginalt smear hver dag for at overvåge brunstcyklussen i mindst to uger før parring og fortsætte overvågningen i parringsperioden, indtil der findes tegn på parring. Udtagning af celleprøver fra vagina/cervix skal ske forsigtigt for at undgå at forstyrre slimhinden, hvilket ellers kunne inducere pseudodrægtighed (8) (9).

Parringsmetode

39. I denne undersøgelse bør der normalt anvendes 1:1-parring (én han og én hun). Dette princip kan fraviges, hvis hannen skulle dø. Hunnen bør anbringes sammen med den samme han, indtil der observeres tegn på kopulation, eller indtil der er gået to uger. Hunnerne undersøges hver morgen for tilstedeværelse af sperma eller vaginalprop. Dag 0 i drægtighedsperioden defineres som den dag, hvor tegn på parring bekræftes (der observeres vaginalprop eller sperma). Lykkes parring ikke, kan fornyet parring af hunnerne med afprøvede hanner fra samme gruppe overvejes.

Kuldstørrelse

40. På dag 4 efter fødslen standardiseres hvert kuld, ved at overskydende unger fjernes ved vilkårlig udvælgelse, så hvert kuld i videst muligt omfang kommer til at bestå af fire eller

fem unger pr. køn, alt efter den normale kuldstørrelse i den anvendte rottestamme. Der tages blodprøver fra to af de overskydende unger, som samles og bruges til bestemmelse af T4-niveauer i serum. Selektiv fjernelse af unger, f.eks. baseret på kropsvægt eller anogenital afstand (AGD), er ikke hensigtsmæssig. Når antallet af han- eller hununger gør det umuligt at få fire eller fem af hvert køn i hvert kuld, er en delvis standardisering (f.eks. seks hanner og fire hunner) acceptabel. Ingen unger fjernes, når et kuld er på mindre end målet for fjernelse (otte eller 10 unger/kuld). Hvis der kun er én unge over målet for fjernelse, vil der kun blive fjernet én unge, som vil blive brugt til indsamling af blod til eventuel vurdering af T4 i serum.

41. Hvis ikke kuldstørrelsen standardiseres, aflives to unger pr. kuld dag 4 efter fødslen, og der tages blodprøver til måling af thyreoideahormonkoncentrationer i serum. Hvis det er muligt, skal disse to unger pr. kuld være hununger, så hanungerne bevares til vurdering af bibeholdelsen af brystvorter, medmindre fjernelsen af disse to unger betyder, at der ikke er flere hunner tilbage til afsluttende vurdering. Der fjernes ingen unger, når kullet er på mindre end otte eller 10 unger/kuld (alt efter den normale kuldstørrelse i den anvendte rottestamme). Hvis der kun er én overskydende unge i forhold til den normale kuldstørrelse, vil der kun blive fjernet én unge, som vil blive brugt til indsamling af blod til eventuel vurdering af T4 i serum.

Observationer

42. Der bør foretages generelle kliniske observationer mindst én gang om dagen, fortrinsvis på samme tidspunkt(er) hver dag og under hensyntagen til det tidspunkt, hvor de forventede virkninger efter dosering topes. Dyrenes helbredstilstand bør registreres. Dyrene observeres for morbiditet og mortalitet mindst to gange om dagen.
43. Én gang før den første eksponering (med henblik på individbaserede sammenligninger) og mindst én gang om ugen derefter foretages der indgående kliniske observationer af alle forældredyr. Med henblik på disse observationer tages dyrene ud af deres egne bure og anbringes i et standardindelukke. Observationerne udføres om muligt på samme tidspunkt hver dag. De bør registreres omhyggeligt, fortrinsvis ved anvendelse af et scoringssystem, der udtrykkeligt er defineret af testlaboratoriet. Det er vigtigt at sikre, at testbetingelserne varierer minimalt, og at observationerne om muligt foretages af observatører, der ikke har kendskab til behandlingen. Observationerne bør bl.a. rettes mod ændringer i hud, pels, øjne, slimhinder, forekomst af sekretion og ekskretion samt autonom aktivitet (f.eks. tåreflåd, piloerektion, pupilstørrelse, usædvanligt respirationsmønster). Derudover registreres forandringer i gang, holdning og respons på håndtering såvel som forekomst af kloniske eller toniske bevægelser, stereotypi (f.eks. overdreven soignering, repetitive cirkelbevægelser), vanskelig eller langvarig fødsel eller mærkelig adfærd (f.eks. selvmutilation, baglæns gang) (10).

44. Én gang i løbet af undersøgelsen vurderes reaktiviteten over for sensoriske stimuli af forskellig art (f.eks. auditive, visuelle og proprioceptive stimuli) (8) (9) (11), gribestyrke (12) og motorisk aktivitet (13) hos fem hanner og fem hunner, der udvælges vilkårligt fra hver gruppe. Nærmere oplysninger om de fremgangsmåder, der kan benyttes, findes i de respektive referencer. Andre alternative fremgangsmåder end de refererede kan imidlertid også anvendes. Hos hannerne bør disse funktionelle observationer foretages i slutningen af doseringsperioden, kort tid inden den planlagte aflivning, men inden der tages blodprøve til hæmatologi eller klinisk kemi (jf. punkt 53-56, også fodnote 1). Hunnerne bør være i fysiologisk samme tilstand under disse funktionelle test og skal helst testes én gang i løbet af den sidste laktationsuge (f.eks. LD 6-13), kort tid inden den planlagte aflivning. Moderdyr og unger holdes adskilt i så kort tid som muligt.
45. Funktionelle observationer, der foretages én gang i slutningen af undersøgelsen, kan udelades, hvis undersøgelsen gennemføres som en forundersøgelse til en efterfølgende undersøgelse af subkronisk toksicitet (90 dage) eller en længerevarende undersøgelse. I så fald bør de funktionelle observationer medtages i den opfølgende undersøgelse. På den anden side kan data vedrørende funktionelle observationer fra denne undersøgelse med gentagen dosering lette valget af dosisniveauer for en efterfølgende undersøgelse af subkronisk toksicitet eller en længerevarende undersøgelse.
46. I undtagelsestilfælde kan funktionelle observationer ligeledes udelades for grupper, der viser så tydelige tegn på toksicitet, at det i signifikant grad ville indvirke på resultaterne af den funktionelle test.
47. Drægtighedsperioden bør registreres og beregnes fra drægtighedsdag 0. Hvert kuld undersøges hurtigst muligt efter fødslen til bestemmelse af ungerne antal og køn, dødfødte, levendefødte, små uudviklede unger (unger, der er signifikant mindre end ungerne i kontrolgruppen) og tilstedeværelse af alvorlige abnormiteter.
48. De levende unger tælles, og deres køn bestemmes, og kullet vejes senest 24 timer efter fødslen (dag 0 eller 1 efter fødslen) samt mindst på dag 4 og dag 13 efter fødslen. Ud over observationerne på forældredyr (jf. punkt 43 og 44) skal al unormal adfærd hos afkommet også registreres.
49. Ungernes AGD bør måles den samme dag efter fødslen mellem PND 0 og PND 4. Ungernes kropsvægt registreres den dag, AGD måles, og AGD normaliseres til et mål for ungens størrelse, helst kubikroden af kropsvægten (14). Antallet af brystvorter/areolae hos hanungerne tælles på PND 12 eller 13 som anbefalet i OECD GD 151 (15).

Kropsvægt og foder-/vandindtagelse

50. Han- og hundyr bør vejes den dag, doseringen indledes, og derefter mindst en gang om ugen og ved forsøgets afslutning. I drægtighedsperioden vejes hunnerne på dag 0, 7, 14

og 20 og senest 24 timer efter fødslen (dag 0 eller 1 efter fødslen) samt mindst på dag 4 og dag 13 efter fødslen. Disse observationer bør rapporteres individuelt for hvert voksent dyr.

51. Før parring og i drægtigheds- og laktationsperioden bør foderindtaget måles mindst en gang om ugen. Måling af foderindtaget i parringsperioden er valgfrit. Hvis testkemikaliet indgives via drikkevandet, skal vandindtagelsen i disse perioder også måles.

Hæmatologi

52. Én gang i løbet af undersøgelsen foretages følgende hæmatologiske undersøgelser på fem hanner og fem hunner, der udvælges vilkårligt fra hver gruppe: hæmatokrit, hæmoglobinkoncentration, erythrocyttælling, retikulocyttælling, total og differential leucocyttælling, blodpladetælling og måling af blodets koaguleringssevne/-tid. Andre analyser, som bør udføres, hvis testkemikaliet eller dets putative metabolitter har eller mistænkes for at have oxiderende egenskaber, omfatter methæmoglobinkoncentration og Heinz-legemer.
53. Der bør tages blodprøver fra et bestemt, angivet sted. Hunnerne bør være i fysiologisk samme tilstand ved blodprøvetagning. For at undgå praktiske problemer som følge af de forskellige tidspunkter for drægtighedsperiodernes indledning kan blodprøver fra hunnerne tages ved udløbet af perioden før parring i stedet for umiddelbart inden eller i forbindelse med dyrenes aflivning. Blodprøver fra hannerne bør fortrinsvis tages umiddelbart inden eller i forbindelse med dyrenes aflivning. Som et alternativ er det også muligt at tage blodprøver fra hannerne ved udløbet af perioden før parring, hvis der tages blodprøver fra hunnerne på dette tidspunkt.
54. Alle blodprøver opbevares under egnede forhold.

Klinisk biokemi

55. Klinisk-biokemiske bestemmelser med henblik på undersøgelse af vigtige toksiske virkninger i væv, og navnlig i nyrer og lever, foretages med blodprøver, der udtages fra de udvalgte fem hanner og fem hunner fra hver gruppe. Det anbefales, at dyrene faster natten over forud for blodprøvetagning¹. Undersøgelser af plasma eller serum bør omfatte

¹ Til en del analyser på serum og plasma, mest udtalt for glukose, foretrækkes fastende blodprøver. Hovedårsagen er den øgede variation, som uundgåeligt følger ikke-faste, og som vil kunne maskere små effekter og derved gøre fortolkningen vanskelig. På den anden side vil faste natten over kunne influere på (drægtige) dyrs almindelige stofskifte, forstyrre laktations- og plejeadfærden og – specielt i undersøgelser, hvor foderindtagelse står centralt – forstyrre den daglige eksponering for testkemikaliet. Hvis der fastes natten over, bør de klinisk-biokemiske bestemmelser for hanner foretages efter de funktionelle observationer i undersøgelsens fjerde uge. Moderdyrene bør holdes tilbage i yderligere én dag, efter at ungerne er blevet fjernet på f.eks. PND 13. Moderdyrene bør faste natten over fra laktationsdag 13-14, og blodet fra

natrium, kalium, glukose, total kolesterol, urinstof, kreatinin, total protein og albumin, mindst to enzymer, hvis forekomst kan være tegn på hepatocellulære effekter (f.eks. alanin aminotransferase, aspartat aminotransferase og sorbitol dehydrogenase) og galdesyrer. Målinger af yderligere enzymer (fra lever eller andre organer) og bilirubin kan under visse omstændigheder give nyttige oplysninger.

56. Der tages blodprøver fra et bestemt sted i henhold til nedenstående:

- fra mindst to unger pr. kuld på dag 4 efter fødslen, hvis antallet af unger gør det muligt (jf. punkt 40-41)
- fra alle moderdyr og mindst to unger pr. kuld ved forsøgets afslutning på dag 13 og
- fra alle voksne hanner ved forsøgets afslutning.

Alle blodprøver opbevares under egnede forhold. Blodprøver fra dag 13-unger og voksne hanner undersøges for niveauet af thyreoideahormoner (T4) i serum. Der kan eventuelt foretages yderligere vurdering af T4 i blodprøver fra moderdyr og dag 4-unger. Andre hormoner kan eventuelt også måles. Blod fra unger til thyreoideahormonanalyse kan samles pr. kuld. Thyreoideahormoner (T4 og TSH) bør fortrinsvis måles som en samlet værdi.

57. Følgende urinalyser kan eventuelt udføres på fem vilkårligt udvalgte hanner fra hver gruppe i undersøgelsens sidste uge til bestemmelse af udseende, volumen, osmolalitet eller relativ densitet, pH, protein, glukose og blod eller blodceller.

58. Endvidere kan det overvejes at gennemføre undersøgelser af serummarkører for generelle vævsskader. Andre bestemmelser, der bør foretages, hvis testkemikaliets kendte egenskaber kan eller forventes at kunne indvirke på tilsvarende metaboliske funktioner, omfatter kalcium, fosfat, triglycerider og glukose ved faste, visse hormoner, methæmoglobin og cholinesterase. Disse forhold undersøges individuelt.

59. Følgende faktorer kan påvirke variabiliteten og de absolutte koncentrationer i hormonanalyserne:

- aflivningstidspunkt på grund af de forskellige hormonkoncentrationer i løbet af døgnet
- aflivningsmetode, der har til formål at undgå unødigt stress af dyrene, som kan påvirke hormonkoncentrationerne
- analysesæt til hormonanalyser, der kan have forskellige standardkurver.

undersøgelsens afslutning anvendes til klinisk-kemiske parametre.

60. Plasmaprøver, der specifikt er beregnet til hormonanalyse, tages på nogenlunde samme tidspunkt på dagen. De numeriske værdier, der fås ved analyse af hormonkoncentrationer, varierer ved anvendelse af forskellige analysesæt på markedet.
61. Hvis ikke der foreligger passende historiske data, bør det overvejes at bestemme hæmatologiske og klinisk-biokemiske variabler, inden eksponering påbegyndes, eller så vidt muligt hos en gruppe dyr, der ikke er med i forsøgsgrupperne. Dataene for hunner skal komme fra lakterende dyr.

PATOLOGI

Makroskopisk undersøgelse

62. Alle voksne forsøgsdyr underkastes en fuldstændig og tilbundsående makroskopisk undersøgelse, der omfatter omhyggelig undersøgelse af kroppens ydre, alle åbninger samt af kraniehule, brysthule og bughule og indholdet heraf. Særlig opmærksomhed bør rettes mod kønsorganerne. Antallet af implantationssteder bør registreres. Det vaginale smear bør undersøges på obduktionsdagen for at bestemme stadiet i brunstcyklussen og muliggøre korrelation med den histopatologiske undersøgelse af hunnernes kønsorganer.
63. På alle voksne handyr renses testikler og bitestikler samt prostata og vesiculæ seminales og prostata anterior som én samlet enhed for alt vedhængende væv, og de vejes hurtigst muligt (våd vægt) efter dissektion, så udtørring undgås. Derudover kan eventuelle organvejninger omfatte levator ani plus bulbocavernosus-muskelkomplekset, Cowpers kirtler og glans penis i hanner samt parrede ovarier (våd vægt) og uterus (herunder cervix) i hunner. Disse valgfrie vejninger bør foretages hurtigst muligt efter dissektion. Alle de voksne dyrs ovarier, testikler, bitestikler og sekundære kønsorganer samt alle organer, der udviser makroskopiske læsioner, præserveres.
64. Skjoldbruskkirtlerne fra alle voksne hanner og hunner samt fra én dag 13-hanunge og én dag 13-hununge fra hvert kuld præserveres i det bedst egnede fikseringsmiddel med henblik på den påtænkte efterfølgende histopatologiske undersøgelse. Skjoldbruskkirtlens vægt kan bestemmes efter fiksering. Rensningen for vedhængende væv bør også foretages meget omhyggeligt og først efter fiksering for at undgå beskadigelse af vævet. Beskadiget væv kan kompromittere den histopatologiske analyse. Der tages blodprøver fra et bestemt angivet sted umiddelbart inden eller i forbindelse med dyrenes aflivning. Prøverne opbevares under egnede forhold (jf. punkt 56).
65. Derudover befries lever, nyrer, binyrer, thymus, milt, hjerne og hjerte fra mindst fem voksne hanner og hunner, som udvælges vilkårligt fra hver gruppe (undtaget er de dyr, der er døende og/eller aflives, inden undersøgelsen er afsluttet), for alt vedhængende væv, og de vejes hurtigst muligt (våd vægt) efter dissektion, så udtørring undgås. Følgende væv bør præserveres i det bedst egnede fikseringsmiddel både med hensyn til vævstype og den

påtænkte efterfølgende histopatologiske undersøgelse: alle makroskopiske læsioner, hjerne (repræsentative regioner, herunder cerebrum, cerebellum og pons), rygmarg, øjne, mavesæk, tyktarm og tyndtarm (herunder Peyerpletter), lever, nyrer, binyrer, milt, hjerte, thymus, luftrør og lunger (præserved ved oppumpning med fikseringsmiddel og efterfølgende immersion), kønskirtler (testikler og ovarier), sekundære kønsorganer (uterus og cervix, bitestikler, prostata og vesiculæ seminales plus prostata anterior), vagina, urinblære, lymfeknuder (ud over den nærmeste drænende lymfeknude bør en anden lymfeknude udtages på baggrund af laboratoriets erfaring (16)), perifer nerve (ischias- eller tibianerven), om muligt tæt på musklen, skeletmuskel og knogle med knoglemarv (knoglemarvssnit eller som alternativ et nyligt præpareret knoglemarvsaspirat). Det anbefales, at testikler fikseres ved immersion i Bouins væske eller modificeret Davidsons fikseringsmiddel (16) (17) (18). Fiksering med formalin anbefales ikke til disse væv. Tunica albuginea kan punkteres forsigtigt og overfladisk i begge ender af organet med en kanyler, der muliggør hurtig penetration af fikseringsmidlet. Kliniske og andre fund kan foranledige undersøgelse af andet væv. Også særlige organer, der sandsynligvis kan være mål for testkemikaliets kendte virkninger, bør præserveres.

66. Følgende væv kan give værdifulde indikationer på endokrinrelaterede virkninger: kønskirtler (testikler og ovarier), sekundære kønsorganer (uterus med cervix, bitestikler, vesiculæ seminales med prostata anterior, dorsolateral og ventral prostata), vagina, hypofyse, brystkirtler fra handyr og binyrer. Forandringer i brystkirtler fra handyr er ikke tilstrækkeligt dokumenteret, men denne parameter kan være meget følsom over for stoffer med østrogen virkemåde. Observation af organer/væv, der ikke er anført i punkt 65, er valgfrit.
67. Døde unger og unger, der aflives på dag 13 efter fødslen eller hurtigt derefter, bør som minimum undersøges omhyggeligt på kroppens ydre for større abnormiteter. Særlig opmærksomhed bør udvises over for de eksterne kønsorganer, som bør undersøges for tegn på forandringer i udviklingen.

Histopatologisk undersøgelse

68. Der bør foretages en fuldstændig histopatologisk undersøgelse af de præserverede organer og væv fra de udvalgte dyr i kontrolgruppen og højdosisgruppen (idet der lægges særlig vægt på spermatogenesens faser i hannernes kønskirtler og histopatologien i testiklernes interstitielle celledstruktur). Skjoldbruskkirtlerne fra ungerne og de resterende voksne dyr kan undersøges om nødvendigt. Disse undersøgelser bør omfatte dyr fra andre dosisgrupper, hvis der i højdosisgruppen observeres eksponeringsrelaterede ændringer. I vejledningen om histopatologi (10) findes der flere oplysninger om dissektion, fiksering, udtagning af snit og histopatologisk undersøgelse af endokrine væv.

69. Alle makroskopiske læsioner skal undersøges. Til fastsættelse af NOAEL'er bør målorganer fra andre dosisgrupper undersøges, navnlig fra grupper, der menes at udvise et NOAEL.
70. Hvis der anvendes en satellitgruppe, bør der udføres en histopatologisk undersøgelse af væv og organer, der udviser toksisk virkning i behandlingsgrupperne.

DATA OG RAPPORTERING

Data

71. Der bør fremlægges data om hvert enkelt dyr. Derudover bør alle data sammenfattes i tabelform med angivelse for hver forsøgsgruppe af antal dyr ved forsøgets begyndelse, antal dyr, som er fundet døde under testen eller aflivet af humane grunde, tidspunkt for eventuel død eller aflivning, antal fertile dyr, antal drægtige hundyr, antal dyr, som viser tegn på toksisk virkning, beskrivelse af iagttagne toksicitetstegn, herunder begyndelsestidspunkt, varighed og sværhed af alle de toksiske virkninger, arten af de histopatologiske forandringer og alle relevante data om kuldene. Tillæg 3 indeholder en sammenfattende rapport i tabelform, der har vist sig at være særdeles velegnet til vurdering af reproduktions-/udviklingsmæssige virkninger.
72. Når det er muligt, bedømmes resultaterne ved en egnet og almindeligt anerkendt statistisk metode. Sammenligninger af virkningen i et dosisinterval gør det muligt at undgå at bruge flere t-test. De statistiske metoder udvælges i forbindelse med undersøgelsens tilrettelæggelse. Statistiske analyser af AGD og bibeholdelse af brystvorter ("nipple retention") bør baseres på data fra de enkelte unger under hensyntagen til virkninger på de enkelte kuld. Når det er hensigtsmæssigt, er det kuldene, der er analyseenheden. Statistiske analyser af ungernes kropsvægt bør baseres på data fra de enkelte unger under hensyntagen til kuldstørrelsen. Som følge af undersøgelsens begrænsede omfang er de statistiske analyser i form af test for "signifikans" af begrænset værdi for mange endepunkter, især de reproduktionsrelaterede endepunkter. Nogle af de hyppigst anvendte metoder, især de parameterbaserede test for central tendens, er uegnede. Hvis der anvendes statistiske analyser, bør den valgte metode være egnet til fordeling af de undersøgte variabler og vælges, inden undersøgelsen indledes.

Vurdering af resultater

73. Resultaterne af denne toksicitetsundersøgelse bør vurderes med hensyn til de observerede virkninger samt obduktionsfund og mikroskopiske fund. Vurderingen skal omfatte sammenhæng mellem dyrenes eksponering for testkemikaliets og tilstedeværelse eller fravær, forekomst og sværhedsgrad af abnormiteter, herunder makroskopiske læsioner, identificerede målorganer, manglende fertilitet, unormale kliniske fund, påvirkning af

reproduktions- og ynglepræstationer, ændringer af kropsvægt, indvirkning på mortaliteten og eventuelle andre toksiske virkninger.

74. På grund af hannernes korte behandlingsperiode bør histopatologien for testikler og bitestikler ses i sammenhæng med fertilitetsdataene ved vurdering af reproduktionsvirkningen på hannerne. Anvendelsen af historiske kontroldata om reproduktion/udvikling (f.eks. med hensyn til kuldstørrelse, AGD, bibeholdelse af brystvorter ("nipple retention"), T4-niveauer i serum) kan også, når sådanne foreligger, være en hjælp i forbindelse med fortolkningen af undersøgelsesresultaterne.
75. Med henblik på kvalitetskontrol foreslås det, at historiske kontroldata indsamles, og at der beregnes variationskoefficienter for numeriske data, især for parametre med relation til påvisning af hormonforstyrrende virkninger. Disse data kan bruges i forbindelse med sammenligninger, når de faktiske undersøgelser evalueres.

Testrapport

76. Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie:

- oprindelse, batchnummer, sidste anvendelsesdato, hvis dette foreligger
- testkemikaliets stabilitet, hvis kendt.

Stof med kun én bestanddel:

- fysisk udseende, vandopløselighed og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber
- kemisk identifikation, f.eks. IUPAC-navn eller CAS-navn, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel, renhed, kemisk identitet af urenheder, i det omfang det er relevant og praktisk muligt, osv.

Stof med flere bestanddele, UVCB-stoffer og blandinger:

- kendetegnet så vidt muligt ved kemisk identitet (jf. ovenfor), kvantitativ forekomst og bestanddelenes relevante fysisk-kemiske egenskaber.

Eventuelt bærestof:

- begrundelse for valg af bærestof, hvis dette ikke er vand.

Forsøgsdyr:

- den anvendte art/stamme
- dyrenes antal, alder og køn
- oprindelse, miljøbetingelser, foder mv.

- de enkelte dyrs vægt ved testens begyndelse
- begrundelse for andre arter end rotte.

Testbetingelser:

- begrundelse for valg af dosisniveau
- oplysninger om formulering af testkemikalie eller iblanding heraf i foderet, opnået koncentration, foderblandingsens stabilitet og homogenitet
- oplysninger om indgivelse af testkemikaliets
- eventuel omregning af testkemikaliets koncentration (ppm) i foder/drikkevand til faktisk dosis (mg pr. kg kropsvægt pr. dag)
- oplysninger om foder- og vandkvalitet
- detaljeret beskrivelse af randomiseringsproceduren til eventuel udvælgelse af unger til fjernelse.

Resultater:

- kropsvægt og ændringer i kropsvægt
- foderindtagelse og indtagelse af vand, om muligt
- oplysninger om toksisk reaktion inddelt efter køn og dosis, herunder fertilitet, drægtighed og andre tegn på toksicitet
- drægtighedsperiodens længde
- toksisk virkning eller andre virkninger på reproduktion, afkom, postnatal vækst osv.
- art, sværhedsgrad og varighed af kliniske symptomer (hvad enten disse er reversible eller ej)
- vurdering af sanseevne, gribestyrke og motorisk aktivitet
- hæmatologiske målinger med relevante udgangsværdier
- klinisk-biokemiske målinger med relevante udgangsværdier
- antal voksne hunner med normal eller anormal brunstcyklus og cyklusvarighed
- antal levendefødte og postimplantationstab
- antal unger med makroskopisk synlige abnormiteter - makroskopisk vurdering af eksterne genitalia, antal små udviklede unger
- dødstidspunkt under undersøgelsen, eller hvorvidt dyrene overlevede til undersøgelsens afslutning
- antal implantationer, kuldstørrelse og kuldenes vægt på registreringstidspunktet

- data om ungernes kropsvægt
- AGD for alle unger (og kropsvægt på dagen for AGD-måling)
- bibeholdelse af brystvorter ("Nipple retention") hos hanunger
- thyreoideahormonniveauer, dag 13-unger og voksne hanner (og eventuelt moderdyr og dag 4-unger)
- kropsvægt ved aflivning og organvægt for forældredyrene
- obduktionsfund
- detaljeret beskrivelse af alle histopatologiske fund
- absorptionsdata (hvis de foreligger)
- når det er hensigtsmæssigt, statistisk behandling af resultaterne.

Diskussion af resultater

Konklusioner

Fortolkning af resultater

77. Ved denne undersøgelse vurderes den reproduktions-/udviklingsmæssige toksicitet i forbindelse med gentagen dosering. Da der lægges vægt på endepunkter for både generel toksicitet og reproduktions-/udviklingstoksicitet, vil resultaterne af undersøgelsen gøre det muligt at skelne mellem reproduktions-/udviklingsmæssige virkninger, som opstår uden generel toksicitet, og dem, der kun kommer til udtryk på niveauer, som også er toksiske for forældredyrene (jf. punkt 7-11). Den kan vise, om det er nødvendigt at foretage yderligere undersøgelser, og udstikke retningslinjer for udformningen af efterfølgende undersøgelser. Med hensyn til fortolkningen af de reproduktions- og udviklingsrelaterede resultater henvises til OECD's vejledende dokument 43 (19). OECD's vejledende dokument 106 om histologisk vurdering af endokrine og reproduktionsrelaterede test i gnavere (16) indeholder oplysninger om præpareringen og vurderingen af (endokrine) organer og vaginalt smear, der kan være nyttige i forbindelse med denne forsøgsmetode.

LITTERATUR

- (1) OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Available upon request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (2) OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. Available upon request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (3) Mitsumori K., Kodama Y., Uchida O., Takada K., Saito M. Naito K., Tanaka S., Kurokawa Y., Usami M., Kawashima K., Yasuhara K., Toyoda K., Onodera H., Furukawa F., Takahashi M. og Hayashi Y. (1994). Confirmation Study, Using Nitro-Benzene, of the Combined Repeat Dose and Reproductive/ Developmental Toxicity Test Protocol Proposed by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). *J. Toxicol, Sci.*, 19, 141-149.
- (4) Tanaka S., Kawashima K., Naito K., Usami M., Nakadate M., Imaida K., Takahashi M., Hayashi Y., Kurokawa Y. og Tobe M. (1992). Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test (OECD): Familiarization Using Cyclophosphamide. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 18, 89-95.
- (5) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, Available upon request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (6) OECD (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 217), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (7) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 19), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (8) Goldman J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M. og Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, *Birth Defects Research*, Part B, 80 (2), 84-97.

- (9) Sadleir R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, in Auston C.R. og Short R.V. (Eds.), *Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization*, Cambridge, New York.
- (10) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document (No 60).
- (11) Moser V.C., McDaniel K.M. og Phillips P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 108, 267-283.
- (12) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C. og Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.*, 1, 233-236.
- (13) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.* 13, 599-609.
- (14) Gallavan R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp og V.L. Reynolds. (1999). "Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights", *Reproductive Toxicology*, 13: 383-390.
- (15) OECD (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 151). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (16) OECD (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 106) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (17) Hess RA og Moore BJ. (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. In: *Methods in Reproductive Toxicology*, Chapin RE og Heindel JJ (Eds.). Academic Press: San Diego, CA, s. 52-85.
- (18) Latendresse JR, Warbritton AR, Jonassen H, Creasy DM. (2002). Fixation of Testes and Eyes Using a Modified Davidson's Fluid: Comparison with Bouin's Fluid and Conventional Davidson's fluid. *Toxicol. Pathol.* 30, 524-533.
- (19) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications,

Series on Testing and Assessment (No 43), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

- (20) OECD (2011), Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (No 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

Tillæg 1

DEFINITIONER (SE OGSÅ (20) OECD GD 150)

Androgenicitet: et kemikalies evne til at fungere som et naturligt androgent hormon (f.eks. testosteron) i en pattedyrsorganisme.

Antiandrogenicitet: et kemikalies evne til at undertrykke virkemåden for et naturligt androgent hormon (f.eks. testosteron) i en pattedyrsorganisme.

Antiøstrogenicitet: et kemikalies evne til at undertrykke virkemåden for et naturligt østrogen hormon (f.eks. østradiol 17 β) i en pattedyrsorganisme.

Antithyreoid aktivitet: et kemikalies evne til at undertrykke virkemåden for et naturligt thyreoideahormon (f.eks. T₃) i en pattedyrsorganisme.

Kemikalie: et stof eller en blanding.

Udviklingstoksicitet: manifestering af reproduktionstoksicitet, som repræsenterer prænatale, perinatale, postnatale, strukturelle eller funktionsmæssige forstyrrelser i afkommet.

Dosis: mængden af indgivet testkemikalie. Dosis angives som vægt af testkemikalie pr. enhed af forsøgsdyrets vægt pr. dag (f.eks. mg/kg kropsvægt/dag) eller som en konstant koncentration i foderet.

Dosering: et generelt udtryk, som omfatter dosis samt doseringsfrekvens og -varighed.

Synlig toksicitet: et generelt udtryk, som angiver klare tegn på toksicitet efter indgivelse af testkemikaliets. Disse tegn bør være tilstrækkelige til farevurdering og bør være af en sådan karakter, at en forøgelse af den indgivne dosis må forventes at resultere i udvikling af svære toksiske virkninger og sandsynligvis død.

Fertilitetsforringelse: forstyrrelse af hanners eller hunners reproduktionsfunktioner eller -evne.

Toksisk virkning på moderdyret: skadelig virkning på drægtige hunner, der opstår enten specifikt (direkte virkning) eller ikke-specifikt (indirekte virkning), og som skyldes deres drægtighed.

NOAEL: forkortelse for "no-observed-adverse-effect level" (niveau, hvor ingen skadelige virkninger observeres). Dette er det højeste dosisniveau, hvor der ikke observeres behandlingsrelaterede skadelige virkninger.

Østrogenicitet: et kemikalies evne til at fungere som et naturligt østrogen hormon (f.eks. østradiol 17 β) i en pattedyrsorganisme.

Reproduktionstoksicitet: fremkaldelse af skadelige virkninger på afkommet og/eller forringelse af hanners og hunners reproduktionsfunktioner eller -evne.

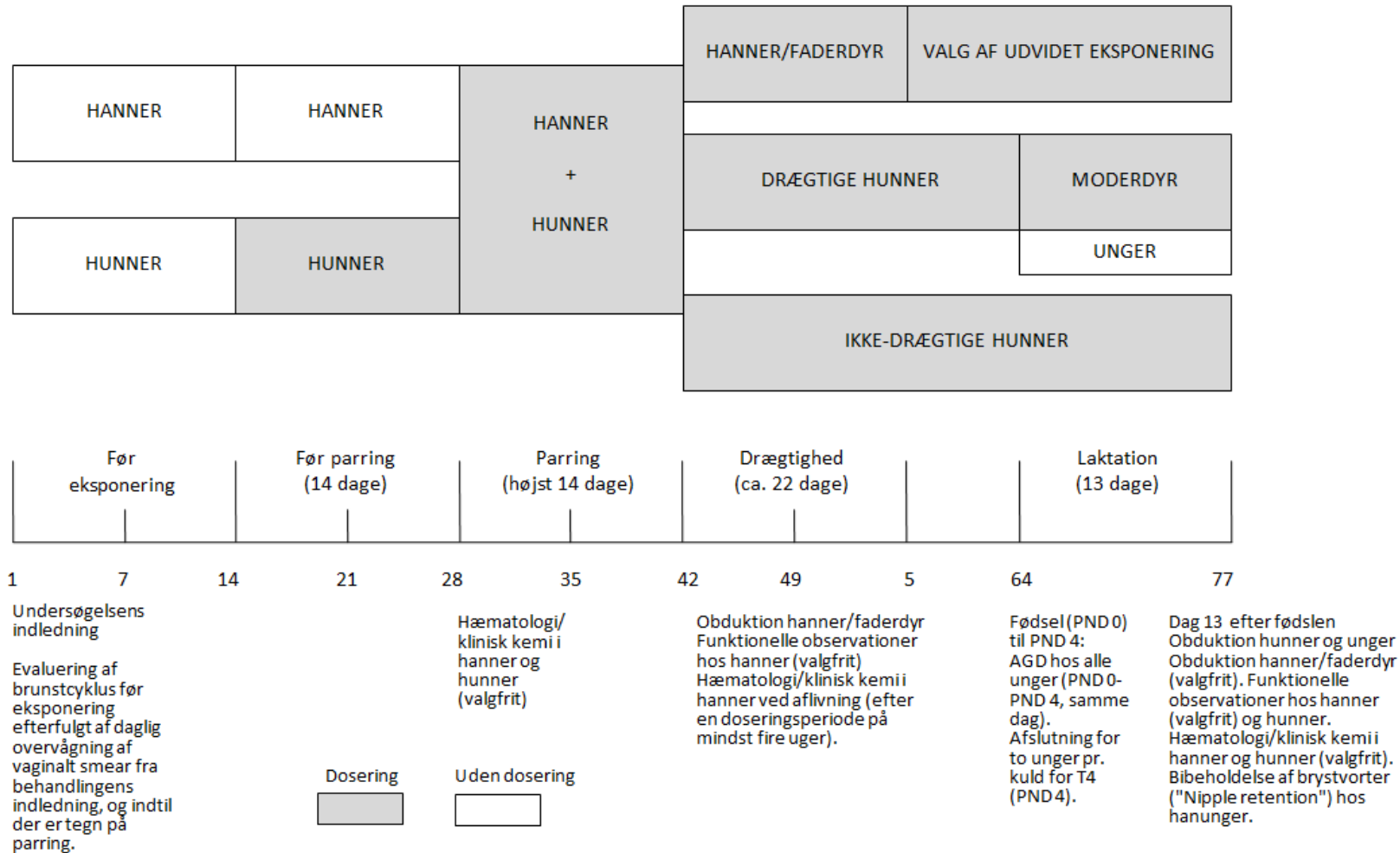
Testkemikalie: et stof eller en blanding, der testes med denne forsøgsmetode.

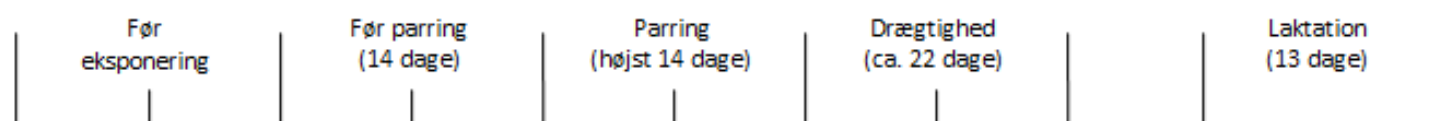
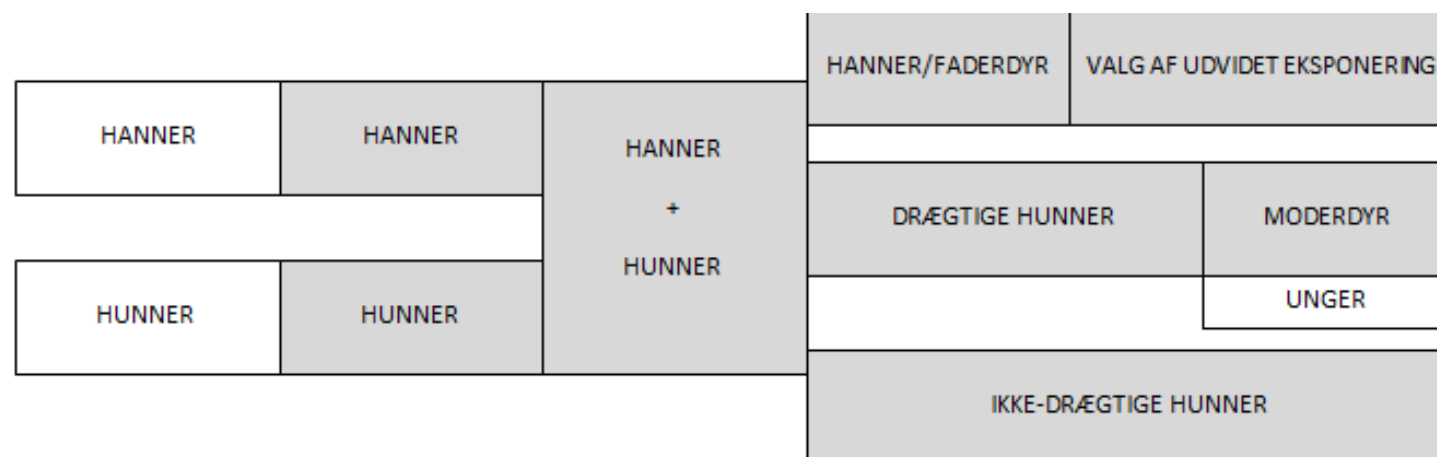
Thyreoid aktivitet: et kemikalies evne til at fungere som et naturligt thyreoideahormon (f.eks. T₃) i en pattedyrsorganisme.

Validering: en videnskabelig proces til karakterisering af en forsøgsmetodes operationelle krav og begrænsninger og påvisning af dens pålidelighed og relevans til et bestemt formål.

Tillæg 2

DIAGRAM OVER FORSØGSPLANEN, SOM VISER DEN MAKSIMALE VARIGHED AF UNDERSØGELSEN BASERET PÅ EN FULD 14-DAGES PARRINGSPERIODE





1 7 14 21 28 35 42 49 5 64 77

Undersøgelsens indledning

Evaluering af brunstcyklus før eksponering efterfulgt af daglig overvågning af vaginalt smear fra behandlingens indledning, og indtil der er tegn på parring.

Hæmatologi/ klinisk kemi i hanner og hunner (valgfrit)

Dosering



Uden dosering



Obduktion hanner/faderdyr
Funktionelle observationer hos hanner (valgfrit)
Hæmatologi/klinisk kemi i hanner ved aflivning (efter en doseringsperiode på mindst fire uger).

Fødsel (PND 0) til PND 4:
AGD hos alle unger (PND 0-PND 4, samme dag).
Afslutning for to unger pr. kuld for T4 (PND 4).

Dag 13 efter fødslen
Obduktion hunner og unger
Obduktion hanner/faderdyr (valgfrit). Funktionelle observationer hos hanner (valgfrit) og hunner.
Hæmatologi/klinisk kemi i hanner og hunner (valgfrit).
Bibeholdelse af brystvorter ("Nipple retention") hos hanunger.

Tillæg 3

SAMMENFATTENDE RAPPORT I TABELFORM OVER REPRODUKTIONS- /UDVIKLINGSMÆSSIGE VIRKNINGER

OBSERVATIONER	VÆRDIER				
Dosering (enheder)	0 (kontrol)	...	...	...	...
Startede par (N)					
Brunstcyklus (som minimum gennemsnitlig varighed og frekvens for uregelmæssige cyklusser)					
Hunner, som viser tegn på kopulation (N)					
Hunner, som bliver drægtige (N)					
Undfangelse, dag 1-5 (N)					
Undfangelse, dag 6-... ⁽¹⁾ (N)					
Drægtighed ≤ 21 dage (N)					
Drægtighed = 22 dage (N)					
Drægtighed ≥ 23 dage (N)					
Moderdyr med levende nyfødte unger (N)					
Moderdyr med levende unger på dag 4 efter fødslen (N)					
Implantater/moderdyr (gennemsnit)					
Levende unger/moderdyr ved fødslen (gennemsnit)					
Levende unger/moderdyr på dag 4 (gennemsnit)					
Kønsfordeling (han/hun) ved fødslen (gennemsnit)					
Kønsfordeling (han/hun) på dag 4 (gennemsnit)					
Kuldenes vægt ved fødslen (gennemsnit)					
Kuldenes vægt på dag 4 (gennemsnit)					
Ungernes vægt ved fødslen (gennemsnit)					
Ungernes vægt på tidspunktet for AGD-måling (gennemsnit hanner, gennemsnit hunner)					
Ungernes AGD på den samme dag efter fødslen, fødsel - dag 4 (gennemsnit hanner, gennemsnit hunner, PND-angivelse)					
Ungernes vægt på dag 4 (gennemsnit)					
Ungernes vægt på dag 13 (gennemsnit)					
Hanungernes bibeholdelse af brystvorter ("nipple retention") på dag 13 (gennemsnit)					

⁽¹⁾ sidste dag i parringsperioden

UNGER MED ABNORMITETER					
Moderdyr med 0					
Moderdyr med 1					
Moderdyr med ≥ 2					
TAB AF AFKOM					
Prænatalt (implantationer minus levendefødte)					
Hunner med 0					
Hunner med 1					
Hunner med 2					
Hunner med ≥ 3					
Postnatalt (levendefødte minus levende på dag 13 efter fødslen)					
Hunner med 0					
Hunner med 1					
Hunner med 2					
Hunner med ≥ 3					

B.65 IN VITRO-MEMBRANBARRIEREFORSØGSMETODE FOR HUDÆTSNING

INDLEDNING

1. Denne forsøgsmetode svarer til OECD-testvejledning (Test Guideline (TG)) 435 (2015). Hudætsning defineres som fremkomsten af irreversibel ødelæggelse af huden, der viser sig som en synlig nekrose gennem epidermis til dermis efter påføring af et testkemikalie som defineret i De Forenede Nationers (FN's) globale harmoniserede system for klassificering og mærkning af kemikalier (GHS) (1) og Den Europæiske Unions (EU's) forordning 1272/2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger (CLP)¹. Denne forsøgsmetode, som svarer til den opdaterede OECD-testvejledning 435, er en in vitro-membranbarriereforsøgsmetode, der kan anvendes til identifikation af ætsende kemikalier. I denne forsøgsmetode anvendes en kunstig membran, der reagerer på ætsende kemikalier på samme måde som dyrehud in situ.
2. Hudætsning er traditionelt blevet vurderet ved påføring af et testkemikalie på huden på levende dyr og vurdering af omfanget af vævsbeskadigelsen efter et bestemt tidsrum (2). Ud over denne forsøgsmetode er der blevet vedtaget flere andre in vitro-forsøgsmetoder som alternativer (3) (4) til den traditionelle in vivo-procedure med kaninhud (kapitel B.4 i dette bilag, som svarer til OECD TG 404), der anvendes til identifikation af ætsende kemikalier (2). Den trindelte UN GHS-test- og evalueringsstrategi for vurdering og klassificering af hudætsning og OECD's vejledende dokument om integrerede tilgange til testning og vurdering (IATA) vedrørende hudirritation/-ætsning anbefaler, at der anvendes validerede og accepterede in vitro-forsøgsmetoder under modul 3 og 4 (1) (5). IATA beskriver flere moduler, som grupperer informationskilder og analyseværktøjer, og vejleder i, i) hvordan eksisterende forsøgsdata og ikke-forsøgsdata integreres i og anvendes til vurdering af kemikaliers hudirritations-/hudætsningspotentiale, og ii) foreslår en tilgang, når der er behov for yderligere testning, herunder når der findes negative resultater (5). I denne modulopdelte tilgang kan positive resultater fra in vitro-forsøgsmetoder anvendes til at klassificere et kemikalie som ætsende uden dyreforsøg, hvorved anvendelsen af dyr reduceres, og det undgås at påføre dyrene de smerter og lidelser, de kan blive udsat for, når de anvendes til dette formål.

¹ Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1272/2008 af 16. december 2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger og om ændring og ophævelse af direktiv 67/548/EØF og 1999/45/EF og om ændring af forordning (EF) nr. 1907/2006 (EUT L 353 af 31.12.2008, s. 1).

3. Der er foretaget valideringsundersøgelser af den in vitro-membranbarrieremodel, der findes i handelen under betegnelsen Corrositex® (6) (7) (8), som påviser en overordnet nøjagtighed for forudsigelse af hudætsning på 79 % (128/163), en følsomhed på 85 % (76/89) og en specificitet på 70 % (52/74) for en database med 163 stoffer og blandinger (7). På baggrund af denne anerkendte validitet er den validerede referencemetode (VRM) blevet anbefalet til at indgå som en del af en trindelt teststrategi til vurdering af kemikaliers potentielle hudætsningsfare (5) (7). Inden en in vitro-membranbarrieremodel til vurdering af hudætsning kan benyttes i lovgivningsøjemed, skal dens pålidelighed og relevans (nøjagtighed) og grænserne for dens påtænkte anvendelse bestemmes for at sikre, at den er sammenlignelig med VRM'erne (9), i overensstemmelse med de foruddefinerede ydeevnestandarder (PS) (10). OECD-aftalen om gensidig anerkendelse af data vil først være garanteret, når en foreslået ny eller opdateret metode i henhold til ydeevnestandarderne er blevet gennemgået og medtaget i den tilsvarende OECD-testvejledning. For øjeblikket er kun en in vitro-metode omfattet af OECD-testvejledning 435 og denne forsøgsmetode, nemlig den Corrositex®-model, der findes i handelen.
4. Andre forsøgsmetoder til vurdering af hudætsning er baseret på anvendelse af rekonstitueret human hud (OECD TG 431) (3) og isoleret rottehud (OECD TG 430) (4). Denne testvejledning muliggør endvidere underopdeling af ætsende kemikalier i de tre UN GHS-underkategorier for ætsende virkning og de tre UN-transportemballagegrupper for ætsningsfare. Denne testvejledning blev oprindeligt vedtaget i 2006 og opdateret i 2015 for at referere til det vejledende IATA-dokument og opdatere listen over kompetencestoffer.

DEFINITIONER

5. De anvendte definitioner er forklaret i tillægget.

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER

6. Den test, der beskrives i denne forsøgsmetode, muliggør identifikation af ætsende testkemikalier og underopdeling af ætsende testkemikalier i henhold til UN GHS/CLP (tabel 1). Derudover kan forsøgsmetoden anvendes til at træffe beslutninger om specifikke kemikalieklassers ætsende og ikke-ætsende virkning, f.eks. organiske og uorganiske syrer, syrederivater¹ og baser til visse transportrelaterede formål (7) (11) (12). Denne

¹ "Syrederivater" er en ikke-specifik betegnelse for en kemikaliegruppe og defineres bredt som en syre produceret af et kemikalie enten direkte eller ved modifikation eller delvis substitution. Denne gruppe omfatter anhydrider, halogensyrer, salte og andre kemikalietyper.

forsøgsmetode beskriver en generisk procedure, der svarer til den validerede referencemetode (7). Forsøgsmetoden giver ikke fyldestgørende oplysninger om hudirritation, men det skal bemærkes, at TM B.46 (der svarer til OECD TG 439) specifikt vedrører in vitro-test af hudirritation (13). For fuldt ud at kunne vurdere de lokale virkninger på huden efter en enkelt dermal eksponering bør OECD's vejledende dokument om integrerede tilgange til testning og vurdering (IATA) følges (5).

Tabel 1: UN GHS-kategori og -underkategorier for hudætsning (1)

Kategori for hudætsning (kategori 1) (for myndigheder, der ikke anvender underkategorier)	Underkategorier for hudætsning¹ (for myndigheder, der anvender underkategorier, herunder CLP-forordningen)	Ætsende i ≥ 1 af 3 dyr	
		Eksponering	Observation
Ætsende	Underkategori for ætsning 1A	≤ 3 minutter	≤ 1 time
	Underkategori for ætsning 1B	> 3 minutter/ ≤ 1 time	≤ 14 dage
	Underkategori for ætsning 1C	> 1 time/ ≤ 4 timer	≤ 14 dage

7. En af den validerede referencemetodes begrænsninger (7) er, at mange ikke-ætsende kemikalier og nogle ætsende kemikalier muligvis ikke er kvalificeret til testning ud fra resultaterne af den indledende kompatibilitetstest (jf. punkt 13). Vandige kemikalier med en pH på mellem 4,5 og 8,5 er ofte ikke kvalificeret til testning. Ikke desto mindre var 85 % af de kemikalier, der blev testet i dette pH-interval, ikke ætsende ved dyreforsøg (7). In vitro-membranbarrieremetoden kan anvendes til testning af faste stoffer (vandopløselige eller uopløselige i vand), væsker (vandige eller ikke-vandige) og emulsioner. Testkemikalier, der ikke forårsager en påviselig ændring under kompatibilitetstesten (dvs. farveændring i kemikalidetektionssystemet (CDS) i den validerede referenceforsøgsmetode), kan imidlertid ikke testes med membranbarrieremetoden og bør testes ved hjælp af andre forsøgsmetoder.

PRINCIP FOR TESTEN

8. Testsystemet består af to dele: en syntetisk makromolekylær biobarriere og et kemikalidetektionssystem (CDS). Ved hjælp af CDS-membranbarrieren påviser denne forsøgsmetode skader forårsaget af ætsende testkemikalier efter påføring af et

¹ For EU anvendes i CLP-forordningen de tre underkategorier for hudætsning 1A, 1B og 1C.

testkemikalie på overfladen af den syntetiske makromolekylære membranbarriere (7), idet disse skader formodes forårsaget af de samme ætsende mekanismer som dem, der opererer på levende hud.

9. Membranbarrierens penetration (eller gennembrud) kan måles ved en række procedurer eller CDS, herunder ændring af farven på en pH-indikatorfarve eller af en anden af indikatoropløsningens egenskaber under barrieren.
10. Det bør bestemmes, at membranbarrieren er gyldig, dvs. relevant og pålidelig, til det påtænkte formål. Dette indebærer sikring af, at forskellige kemiske produkter er homogene med hensyn til deres barriereegenskaber, f.eks. at de er i stand til at opretholde en barriere mod ikke-ætsende kemikalier, og at de kan kategorisere kemikaliernes ætsende egenskaber i henhold til de forskellige UN GHS-underkategorier for ætsning (1). Den tildelte klassificering baseres på den tid, det tager for et kemikalie at trænge igennem membranbarrieren og ind til indikatoropløsningen.

PÅVISNING AF KOMPETENCE

11. Inden laboratorierne påbegynder rutinemæssig brug af in vitro-membranbarrieremetoden, som er i overensstemmelse med denne forsøgsmetode, bør de påvise deres tekniske kompetence ved korrekt identifikation af de 12 anbefalede kompetencestoffer i tabel 2. I situationer, hvor et stof på listen ikke kan fås, eller hvor det er berettiget, kan et andet stof anvendes, hvis der foreligger tilstrækkelige in vivo- og in vitro-referencedata herfor (f.eks. fra listen over referencekemikalier (10)), forudsat at der benyttes de samme udvælgelseskriterier som beskrevet i tabel 1.

Tabel 2: Kompetencestoffer¹

Stof ²	CAS RN	Kemisk gruppe	UN GHS-underkategori in vivo ³	UN GHS-underkategori in vitro ³
Bortrifluoriddihydrat	13319-75-0	Uorganiske syrer	1A	1A
Salpetersyre	7697-37-2	Uorganiske syrer	1A	1A
Phosphorpentachlorid	10026-13-8	Prækursorer for uorganiske syrer	1A	1A
Valerylchlorid	638-29-9	Syrechlorider	1B	1B
Natriumhydroxid	1310-73-2	Uorganiske baser	1B	1B
1-(2-aminoethyl)piperazin	140-31-8	Alifatiske aminer	1B	1B
Benzensulfonylchlorid	98-09-9	Syrechlorider	1C	1C

N,N-dimethylbenzylamin	103-83-3	Aniliner	1C	1C
Tetraethylenpentamin	112-57-2	Alifatiske aminer	1C	1C
Eugenol	97-53-0	Phenoler	NC	NC
Nonylacrylat	2664-55-3	Acrylater/methacrylater	NC	NC
Natriumbicarbonat	144-55-8	Uorganiske salte	NC	NC

¹De 12 ovennævnte stoffer indeholder tre stoffer fra hver af de tre UN GHS-underkategorier for ætsende stoffer og tre ikke-ætsende stoffer, og de kan købes på markedet. UN GHS-underkategorien er baseret på resultaterne af in vivo-testning af høj kvalitet. Stofferne er taget fra listen over 40 referencestoffer, der står opført på minimumslisten over kemikalier, som er identificeret med henblik på påvisning af nøjagtigheden og pålideligheden af forsøgsmetoder, der strukturelt og funktionelt ligner den validerede referenceforsøgsmetode, og som blev udvalgt blandt de 163 referencekemikalier, der oprindeligt blev anvendt til at validere referenceforsøgsmetoden (Corrositex[®]) (7) (10) (14). Formålet med denne udvælgelsesproces var i videst muligt omfang at medtage kemikalier, der var repræsentative for det responsinterval for ætsende virkning (f.eks. ikke-ætsende, ætsende i henhold til UN-emballagegruppe I, II og III), som den validerede referenceforsøgsmetode er i stand til at måle eller forudsige, var repræsentative for de kemiske grupper, der blev anvendt i valideringsprocessen, havde veldefinerede kemiske strukturer, gav reproducerbare resultater i den validerede referenceforsøgsmetode, gav definitive resultater i in vivo-referencetesten, fandtes i handelen og ikke var forbundet med uoverkommelige bortskaffelsesomkostninger (14).

²Stoffer testet rene eller med en renhed på ≥ 90 %.

³De tilsvarende UN-emballagegrupper er henholdsvis I, II og III for UN GHS-underkategori 1A, 1B og 1C. NC: ikke-ætsende.

FREMGANGSMÅDE

12. Nedenstående punkter beskriver de komponenter og procedurer, som en forsøgsmetode til vurdering af ætsende virkning med en kunstig membranbarriere består af (7) (15), baseret på den aktuelle VRM, dvs. Corrositex[®], som findes i handelen. Membranbarrieren og kompatibilitets-/indikatoropløsningen og kategoriseringsopløsningen kan konstrueres, fremstilles eller købes i handelen, som det er tilfældet med VRM'en Corrositex[®]. Der findes et eksempel på en forsøgsmetodeprotokol for den validerede referenceforsøgsmetode (7). Testen bør foretages ved stuetemperatur (17-25 °C), og komponenterne skal opfylde nedenstående betingelser.

Testkemikalie-kompatibilitetstest

13. Inden membranbarrieretesten foretages, udføres en kompatibilitetstest for at fastslå, om CDS kan detektere testkemikalien. Hvis ikke CDS kan detektere testkemikalien, er membranbarrieretesten ikke egnet til at vurdere det pågældende testkemikalies potentielle ætsende virkning, og der anvendes en anden forsøgsmetode. CDS og eksponeringsforholdene i kompatibilitetstesten bør afspejle eksponeringen i den efterfølgende membranbarrieretest.

Tidsbestemt kategoritest for testkemikalien

14. Hvis det passer til forsøgsmetoden, underkastes et testkemikalie, der er kvalificeret i henhold til kompatibilitetstesten, en tidsbestemt kategoritest, dvs. en screeningstest, for at skelne mellem svage og stærke syrer eller baser. I den validerede referenceforsøgsmetode anvendes f.eks. en tidsbestemt kategoriseringstest til at vise, hvilken af to tidsrammer der bør anvendes, alt efter om der påvises en signifikant sur eller basisk reserve. Der bør anvendes to forskellige tidsrammer for gennembrud til bestemmelse af den ætsende virkning og UN GHS-underkategorien for hudætsning på baggrund af testkemikaliets sure eller basiske reserve.

MEMBRANBARRIEREFORSØGSMETODENS KOMPONENTER

Membranbarriere

15. Membranbarrieren består af to komponenter: en proteinholdig makromolekylær vandig gel og en permeabel støttemembran. Den proteinholdige gel bør være uigennemtrængelig for væsker og faste stoffer, men kan ætzes og gøres permeabel. Den fuldt konstruerede membranbarriere bør opbevares under forud fastsatte betingelser, som har vist sig at forhindre, at gelen ødelægges, f.eks. ved udtørring, bakterievækst, flytning, revnedannelse, der ville forringe dens ydeevne. Den acceptable opbevaringsperiode skal fastsættes, og membranbarrierepræparaterne må ikke anvendes efter udløbet af denne periode.
16. Den permeable støttemembran yder den proteinholdige gel mekanisk støtte under gelatineringsprocessen, og mens den eksponeres for testkemikaliets. Støttemembranen skal forhindre, at gelen synker sammen eller flytter sig, og alle testkemikalier skal kunne trænge igennem den.
17. Den proteinholdige gel, der består af protein, f.eks. keratin, collagen eller blandinger af proteiner, som danner en gelmatrice, er målet for testkemikaliets. Det proteinholdige materiale anbringes på støttemembranens overflade og gelatinerer, inden membranbarrieren placeres over indikatoropløsningen. Den proteinholdige gel skal have samme tykkelse og tæthed overalt og være uden luftbobler eller andre defekter, der risikerer at påvirke dens funktionelle integritet.

Kemikalidetektionssystem (CDS)

18. Indikatoropløsningen, der er den samme opløsning som den, der bruges i kompatibilitetstesten, skal reagere på testkemikaliets tilstedeværelse. Der skal bruges en pH-indikatorfarve eller -farvekombination, f.eks. cresolrød og methylorange, der skifter farve som reaktion på testkemikaliets tilstedeværelse. Målesystemet kan være visuelt eller elektronisk.
19. Relevansen og pålideligheden af de detektionssystemer, der udvikles til detektion af testkemikaliets passering gennem barrieremembranen, skal vurderes for at påvise den række kemikalier, der kan detekteres, og de kvantitative begrænsninger for detektionen.

TESTENS YDEEVNE

Samling af forsøgsmetodens komponenter

20. Membranbarrieren anbringes i et hætteglas (eller rør), som indeholder indikatoropløsningen, således at hele støttemembranen er i kontakt med indikatoropløsningen, og der ikke er luftbobler til stede. Der bør udvises forsigtighed for at bevare barrierens integritet.

Påføring af testkemikaliet

21. En passende mængde testkemikalie, f.eks. 500 µl, hvis der er tale om en væske, eller 500 mg fint pulver, hvis der er tale om et fast stof (7), påføres forsigtigt membranbarrierens opadvendte overflade og fordeles jævnt. Der forberedes et passende antal replikater, f.eks. fire (7), for hvert testkemikalie og deres tilhørende kontroller (jf. punkt 23-25). Tidspunktet for testkemikaliets påføring på membranbarrieren registreres. For at sikre, at korte ætsningstider bliver registreret nøjagtigt, anføres tidspunkterne for testkemikaliets indføring i de forskellige hætteglas separat.

Måling af membranbarrierepenetration

22. Hvert hætteglas overvåges nøje, og tidspunktet for den første ændring af indikatoropløsningen, dvs. barrierepenetration, registreres, og tiden mellem påføring på og penetration af membranbarrieren bestemmes.

Kontroller

23. I test, hvor der bruges et bærestof eller opløsningsmiddel sammen med testkemikaliet, bør bærestoffet eller opløsningsmidlet være kompatibelt med membranbarrieresystemet, dvs. det må ikke ændre membranbarrieresystemets integritet, og det må ikke ændre testkemikaliets ætsende virkning. Når det er relevant, bør der testes kontroller med opløsningsmiddel (eller bærestof) sideløbende med testkemikaliet for at påvise opløsningsmidlets kompatibilitet med membranbarrieresystemet.
24. En positiv (ætsende) kontrol med mellemhøj ætsende aktivitet, f.eks. 110 ± 15 mg natriumhydroxid (UN GHS-underkategori 1B) (7), bør testes sideløbende med testkemikaliet for at vurdere, om testsystemet fungerer, som det skal. Det kan være hensigtsmæssigt at teste en anden positiv kontrol fra samme kemiske gruppe som testkemikaliet med henblik på at evaluere et ætsende testkemikalies relative ætsende potentiale. Der bør vælges positive kontroller med mellemkraftig ætsende virkning (f.eks. UN GHS-underkategori 1B) med henblik på at påvise ændringer i penetrationstiden, der kan være uacceptabelt meget længere eller kortere end den fastsatte referenceværdi og dermed viser, at testsystemet ikke fungerer korrekt. I denne forbindelse er stærkt ætsende (UN GHS-underkategori 1A) og ikke-ætsende kemikalier af begrænset relevans. Et ætsende kemikalie fra UN GHS-underkategori 1B ville påvise en for kort eller lang

gennembrudstid. Et svagt ætsende kemikalie (UN GHS-underkategori 1C) kan eventuelt benyttes som positiv kontrol til at måle forsøgsmetodens evne til konsekvent at skelne mellem svagt ætsende og ikke-ætsende kemikalier. Uanset den anvendte tilgang skal der opstilles et acceptabelt responsinterval for positive kontroller med udgangspunkt i det historiske interval for de anvendte positive kontrollers gennembrudstider, som f.eks. gennemsnit $\pm$ 2-3 standardafvigelser. I hver undersøgelse skal den præcise gennembrudstid for den positive kontrol bestemmes, så afvigelser, der ligger uden for det acceptable interval, kan påvises.

25. Der bør endvidere testes en negativ (ikke-ætsende) kontrol, f.eks. 10 % citronsyre, 6 % propionsyre (7), sideløbende med testkemikaliets som en anden kvalitetskontrolforanstaltning til påvisning af membranbarrierens funktionelle integritet.

Acceptkriterier for undersøgelsen

26. I henhold til de opstillede tidsparametre for de enkelte UN GHS-underkategorier for ætsende virkning anvendes den tid (i minutter), der går mellem et testkemikalies påføring på membranbarrieren og barrierepenetrationen, til at forudsige testkemikalies ætsende virkning. For at en undersøgelse kan opfattes som acceptabel, skal den sideløbende positive kontrol give den forventede penetrationsresponsstid (f.eks. 8-16 minutters gennembrudstid for natriumhydroxid, hvis dette stof anvendes som positiv kontrol), den sideløbende negative kontrol skal være ikke-ætsende, og en eventuel kontrol med opløsningsmiddel skal hverken være ætsende eller ændre testkemikalies ætsende potentiale. Inden laboratorierne påbegynder rutinemæssig brug af en metode, som er i overensstemmelse med denne forsøgsmetode, skal de påvise deres tekniske kompetence ved hjælp af de 12 anbefalede stoffer i tabel 2. Inden nye analoge metoder, der udvikles under denne forsøgsmetode, og som strukturelt og funktionelt ligner den validerede referencemetode (14), tages i brug til testning i lovgivningsøjemed, bør de foruddefinerede ydeevnestandarder bruges til at påvise den nye metodes pålidelighed og nøjagtighed.

Fortolkning af resultater og testkemikaliers klassificering efter ætsende virkning

27. Den tid (i minutter), der går mellem testkemikalies påføring på membranbarrieren og barrierepenetrationen, bruges til at klassificere testkemikaliets i UN GHS-underkategorierne for ætsende virkning (1) og eventuelt i UN-emballagegrupperne (16). De tidsmæssige afskæringsværdier for de tre underkategorier for ætsende virkning opstilles for hver enkelt foreslået forsøgsmetode. De endelige beslutninger om afskæringstider bør tage hensyn til behovet for at minimere underklassificering af ætsningsfare (dvs. falske negative). I denne testvejledning bør afskæringstiderne for Corrositex® som beskrevet i tabel 3, anvendes, da denne er den eneste forsøgsmetode, der for øjeblikket er omfattet af denne testvejledning (7).

Tabel 3: Corrositex®-forudsigelsesmodel

Gennemsnitlig gennembrudstid (min.)		UN GHS-forudsigelse ³
Kategori 1-testkemikalier ¹ (bestemt ved metodens kategoriseringstest)	Kategori 2-testkemikalier ² (bestemt ved metodens kategoriseringstest)	
0-3 min.	0-3 min.	Ætsende valgfri underkategori 1A
> 3 til 60 min.	> 3 til 30 min.	Ætsende valgfri underkategori 1B
> 60 til 240 min.	> 30 til 60 min.	Ætsende valgfri underkategori 1C
> 240 min.	> 60 min.	Ikke-ætsende

¹ Testkemikalier med høj sur/basisk reserve (6).

² Testkemikalier med lav sur/basisk reserve (6).

³ UN GHS-underkategori 1A, 1B og 1C svarer til henholdsvis UN-emballagegruppe I, II og III.

DATA OG RAPPORTERING

Data

28. Den tid (i minutter), der går mellem påføring og barrierepenetration for henholdsvis testkemikaliyet og den eller de positive kontroller, rapporteres i tabelform som individuelle replikatdata sammen med gennemsnit $\pm$ standardafvigelsen for hvert forsøg.

Testrapport

29. Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie og kontrolstoffer:

- Stof med kun én bestanddel: kemisk identifikation, f.eks. IUPAC-navn eller CAS-navn, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel, renhed, kemisk identitet af urenheder, i det omfang det er relevant og praktisk muligt, osv.
- Stof med flere bestanddele, UVCB-stoffer og blandinger: kendetegnet så vidt muligt ved kemisk identitet (jf. ovenfor), kvantitativ forekomst og bestanddelenes relevante fysisk-kemiske egenskaber
- fysisk udseende, vandopløselighed og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber
- oprindelse, evt. batchnummer

- behandling af testkemikaliet/kontrolstoffet inden testning, hvis det er relevant (f.eks. opvarmning, formaling)
- testkemikaliets stabilitet, sidste anvendelsesdato eller dato for ny analyse, hvis dette er kendt
- opbevaringsforhold.

Bærestof:

- identifikation, koncentration (hvis relevant), anvendt mængde
- begrundelse for valg af bærestof.

Anvendt in vitro-membranbarrieremodel og -protokol, herunder påvist nøjagtighed og pålidelighed

Testbetingelser:

- beskrivelse af anvendt apparatur og anvendte præpareringsprocedurer
- den anvendte in vitro-membranbarrieres oprindelse og sammensætning
- indikatoropløsningens sammensætning og egenskaber
- detektionsmetode
- testkemikalie- og kontrolstofmængde
- antal replikater
- beskrivelse af og begrundelse for den tidsbestemte kategoriseringstest
- påføringsmetode
- observationstidspunkter
- beskrivelse af de benyttede vurderings- og klassificeringskriterier
- påvisning af kompetence til at anvende forsøgsmetoden inden rutinemæssig brug ved at teste kompetencekemikalierne.

Resultater:

- opstilling i tabelform af individuelle rådata fra individuelle test og kontroller for hvert replikat
- beskrivelse af andre observerede virkninger
- den afledte klassificering med henvisning til den anvendte forudsigelsesmodel og/eller de anvendte beslutningskriterier.

Diskussion af resultaterne

Konklusioner

LITTERATUR

- (1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), First Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Tilgængelig på: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.
- (2) Kapitel B.4 i dette bilag, Akut hudirritation/-ætsning.
- (3) Kapitel B.40.A i dette bilag, In vitro-hudætsning: forsøgsmetode med rekonstrueret human epidermis (RhE).
- (4) Kapitel B.40 i dette bilag, In vitro-hudætsning: Transkutan elektrisk modstand (TER).
- (5) OECD (2015). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.-G. og Liebsch, M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. Toxicology *In Vitro* 12, 483-524.
- (7) ICCVAM (1999). Corrositex®. An *In Vitro* Test Method for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by ICCVAM, NTP and NICEATM. NIEHS, NIH Publication (No 99-4495).
- (8) Gordon V.C., Harvell J.D. og Maibach H.I. (1994). Dermal Corrosion, the Corrositex® System: A DOT Accepted Method to Predict Corrosivity Potential of Test Materials. *In vitro* Skin Toxicology-Irritation, Phototoxicity, Sensitization. Alternative Methods in Toxicology 10, 37-45.
- (9) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications. Series on testing and Assessment (No 34).
- (10) OECD (2014). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 435. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Tilgængelig på: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/PerfStand-TG430-June14.pdf>.

- (11) ECVAM (2001). Statement on the Application of the CORROSITEX® Assay for Skin Corrosivity Testing. 15th Meeting of ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC), Ispra, Italy. ATLA 29, 96-97.
- (12) U.S. DOT (2002). Exemption DOT-E-10904 (Fifth Revision). (September 20, 2002). Washington, D.C., U.S. DOT.
- (13) Kapitel B.46 i dette bilag, In vitro-hudirritation: forsøgsmetode med rekonstrueret human epidermis. ICCVAM (2004). ICCVAM Recommended Performance Standards for *In Vitro* Test Methods for Skin Corrosion. NIEHS, NIH Publication No 04-4510. Tilgængelig på: http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/dermal_docs/ps/ps044510.pdf.
- (14) U.S. EPA (1996). Method 1120, Dermal Corrosion. Tilgængelig på: <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/1120.pdf>.
- (15) United Nations (UN) (2013). UN Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Model Regulations, 18th Revised Edition (Part, Chapter 2.8), UN, 2013. Tilgængelig på: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/unrec/rev18/English/Rev18_Volume1_Part2.pdf.

Tillæg

DEFINITIONER

Nøjagtighed: overensstemmelsen mellem forsøgsmetodens resultater og accepterede referenceværdier. Den er et mål for forsøgsmetodens ydeevne og et af aspekterne af relevans. Udtrykket benyttes ofte som synonym for "konkordans", forstået som den andel af korrekte udfald, forsøgsmetoden fører til (9).

Kemikalie: et stof eller en blanding.

Kemikalidetektionssystem (CDS): et visuelt eller elektronisk målesystem med en indikatoropløsning, der reagerer på et testkemikalies tilstedeværelse, f.eks. ved ændring af en pH-indikatorfarve eller -farvekombination. Systemet reagerer på testkemikaliets tilstedeværelse med en farveændring eller med en anden form for kemisk eller elektrokemisk reaktion.

Konkordans: et mål for ydeevnen af en forsøgsmetode, der fører til kategoriske resultater, og et af aspekterne af relevans. Udtrykket benyttes af og til som synonym for nøjagtighed og defineres som andelen af alle kemikalier, der klassificeres korrekt som positive eller negative. Konkordansen afhænger i høj grad af forekomsten af positiver i de undersøgte typer testkemikalier (9).

GHS (det globale harmoniserede system for klassificering og mærkning af kemikalier): et system til klassificering af kemikalier (stoffer og blandinger) efter standardiserede typer og niveauer af fysisk fare, sundhedsfare og miljøfare med tilhørende kommunikationselementer såsom piktogrammer, signalord, faresætninger, sikkerhedssætninger og sikkerhedsdatablade, således at oplysninger om kemikaliernes skadelige virkninger kan videreformidles med henblik på at beskytte mennesker (f.eks. arbejdsgivere, arbejdstagere, transportører, forbrugere og redningspersonel) og miljøet (1).

IATA: integreret tilgang til testning og vurdering.

Blanding: blanding eller opløsning, der er sammensat af to eller flere stoffer.

Stof med kun én bestanddel: et stof, der defineres af sin mængdemæssige sammensætning, hvori en hovedbestanddel udgør mindst 80 % (w/w).

Stof med flere bestanddele: et stof, der defineres af sin mængdemæssige sammensætning, hvori flere end én hovedbestanddel er til stede i en koncentration på ≥ 10 % (w/w) og < 80 % (w/w). Et stof, der består af flere forskellige bestanddele, er resultatet af en fremstillingsproces. Forskellen mellem en blanding og et stof med flere bestanddele er, at blandingen er fremstillet ved blanding af to eller flere stoffer uden kemisk reaktion. Et stof, der består af flere forskellige bestanddele, er resultatet af en kemisk reaktion.

NC: Ikke-ætsende.

Ydeevnestandarder: standarder, der med udgangspunkt i en valideret forsøgsmetode

danner grundlag for at vurdere, om en foreslået forsøgsmetode, som er mekanistisk og funktionelt tilsvarende, er sammenlignelig. Disse standarder omfatter i) de centrale dele af forsøgsmetoden, ii) en minimumsliste med referencekemikalier, som er udvalgt blandt de kemikalier, der er benyttet til at påvise, at den validerede forsøgsmetodes ydeevne er acceptabel, og iii) de tilsvarende niveauer af pålidelighed og nøjagtighed, som er fastsat efter, hvad der er opnået med den validerede forsøgsmetode, og som det skal påvises, at den foreslåede forsøgsmetode kan yde ved vurdering ud fra minimumslisten med referencekemikalier (9).

Relevans: beskrivelse af sammenhængen mellem forsøgsmetoden og den pågældende virkning og dens meningsfuldhed og brugbarhed til et bestemt formål. Det angives, i hvilket omfang forsøgsmetoden måler eller forudsiger den pågældende biologiske virkning korrekt. Forsøgsmetodens nøjagtighed (konkordans) indgår i vurderingen af dens relevans (9).

Pålidelighed: mål for, i hvilken grad en forsøgsmetode kan reproduceres i og mellem laboratorier over en længere periode, når den udføres efter samme protokol. Den bedømmes ved beregning af reproducerbarhed inden for og mellem laboratorier (9).

Følsomhed: andelen af alle positive/aktive kemikalier, der klassificeres korrekt ved forsøgsmetoden. Den er et mål for nøjagtigheden af en forsøgsmetode, som giver kategoriske resultater, og er et vigtigt kriterium ved vurderingen af en forsøgsmetodes relevans (9).

In vivo-hudætsning: fremkaldelse af irreversibel skade på huden, dvs. synlig nekrose gennem epidermis og ned i dermis efter påføring af et testkemikalie i indtil fire timer. Typiske ætsningsreaktioner er sår, blødning, blodige skorper, efter 14 dages observation affarvning som følge af blegning af huden, hele områder med alopeci samt ardannelse. Tvivlsomme læsioner bør overvejes vurderet ved histopatologisk undersøgelse.

Specificitet: andelen af alle negative/inaktive kemikalier, der klassificeres korrekt ved forsøgsmetoden. Den er et mål for nøjagtigheden af en forsøgsmetode, som giver kategoriske resultater, og er et vigtigt kriterium ved vurderingen af en forsøgsmetodes relevans (9).

Stof: et grundstof og forbindelser heraf, naturlige eller industrielt fremstillede, indeholdende sådanne tilsætningsstoffer, som er nødvendige til bevarelse af stoffets stabilitet, og sådanne urenheder, som følger af fremstillingsprocessen, bortset fra opløsningsmidler, som kan udskilles, uden at det påvirker stoffets stabilitet eller ændrer dets sammensætning.

Testkemikalie: alle stoffer eller blandinger, der testes ved hjælp af denne forsøgsmetode.

UVCB: stoffer med ukendt eller variabel sammensætning, komplekse reaktionsprodukter eller biologiske materialer.

B.66 STABILT TRANSFEKTEREDE IN VITRO-TRANSAKTIVERINGSASSAYS TIL PÅVISNING AF ØSTROGENRECEPTORAGONISTER OG -ANTAGONISTER

GENEREL INDLEDNING

OECD's ydeevnebaserede testvejledning

1. Denne forsøgsmetode svarer til OECD-testvejledning (Test Guideline (TG)) 455 (2016). TG 455 er en ydeevnebaseret testvejledning (PBTG), der beskriver metoden for stabilt transfekterede in vitro-transaktiveringsassays til påvisning af østrogenreceptoragonister og -antagonister (ER TA-assays). Den omfatter flere mekanistisk og funktionelt tilsvarende forsøgsmetoder til identifikation af østrogenreceptoragonister og -antagonister (dvs. ER α og/eller ER β) og ventes at lette udviklingen af nye lignende eller modificerede forsøgsmetoder i overensstemmelse med de principper for validering, som er fastsat i OECD's vejledende dokument om validering og international accept af nye eller opdaterede forsøgsmetoder til farevurdering (1). De fuldt validerede referenceforsøgsmetoder (tillæg 2 og tillæg 3), som danner grundlag for denne PBTG, er:
 - det stabilt transfekterede TA-assay (STTA) (2), som bruger (h) ER α -HeLa-9903-cellelinjen, og
 - VM7Luc ER TA-assayet (3), som anvender VM7Luc4E2-cellelinjen¹, der overvejende angiver hER α med en vis medvirken fra hER β (4) (5).

Der findes ydeevnestandarder (PS) (6) (7), som bør anvendes til udvikling og validering af lignende assays vedrørende den samme fareegenskab. De gør det muligt rettidigt at ændre PBTG 455, så nye lignende assays kan blive tilføjet den opdaterede PBTG. Lignende assays vil dog først blive tilføjet efter OECD's kontrol og validering af, at ydeevnestandarderne er opfyldt. De assays, der er omfattet af TG 455, kan uden forskel anvendes til at opfylde OECD-medlemslandenes krav til testresultaterne om østrogenreceptortransaktivering, samtidig med at de drager fordel af OECD-aftalen om gensidig anerkendelse af data.

¹ Frem til juni 2016 blev denne cellelinje betegnet som BG1Luc-cellelinjen. BG-1-celler blev oprindeligt beskrevet af Geisinger m.fl. (1998) (35) og blev senere karakteriseret af forskere ved National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) (36). For relativt kort tid siden opdagede man, at der findes to varianter af BG-1-celler, som anvendes af forskere, BG-1 Fr og BG-1 NIEHS. Tilbunds gående analyser, herunder DNA-test, af disse to BG-1-variantcellelinjer udført af Li og medarbejdere (2014) (37), viste, at BG-1 Fr var unik, og at BG-1 NIEHS, dvs. den oprindelige cellelinje, der blev anvendt til at udvikle assayet, ikke var den humane BG1-ovariale carcinomcellelinje, men i stedet var en variant af den humane MCF7-brystcancercellelinje. Den cellelinje, som anvendes i assayet, og som oprindeligt blev kaldt BG1Luc4E2 (38), vil nu blive betegnet VM7Luc4E2 ("V" = variant, "M7" = MCF7-celler). På samme måde vil assayet nu blive betegnet VM7Luc ER TA. Selv om dette ændrer oprindelsen af den cellelinje, assayet bygger på, påvirker det ikke offentliggjorte valideringsundersøgelser eller nytteværdien og anvendelsen af dette assay til screening af østrogene/antiøstrogene kemikalier.

Baggrund og principper for de assays, der er omfattet af denne forsøgsmetode

2. OECD iværksatte i 1998 en højt prioriteret aktivitet med henblik på revision af eksisterende og udvikling af nye testvejledninger vedrørende screening og testning af potentielle hormonforstyrrende kemikalier. OECD's begrebsramme for testning og vurdering af potentielle hormonforstyrrende kemikalier blev revideret i 2012. Den oprindelige og reviderede begrebsramme er vedlagt som bilag til OECD's vejledende dokument om standardiserede testvejledninger til vurdering af kemikaliers hormonforstyrrende virkning (8). Begrebsrammen omfatter fem niveauer, idet hvert niveau svarer til et niveau for biologisk kompleksitet. De ER-transaktiveringsassays (ER TA-assays), som beskrives i denne forsøgsmetode, tilhører niveau 2, der omfatter "*in vitro*-assays, der giver data om en eller flere udvalgte endokrine mekanismer/veje". Denne forsøgsmetode er til *in vitro*-transaktiveringsassays (TA-assays), som er beregnet til at påvise østrogenreceptoragonister og -antagonister.
3. Østrogeners interaktion med ER'er kan påvirke transkriptionen af østrogenkontrollerede gener, hvilket kan føre til induktion eller inhibering af cellulære processer, herunder processer, som er nødvendige for celleproliferation, normal fosterudvikling og reproduktiv funktion (9) (10) (11). Forstyrrelse af normale østrogensystemer kan potentielt udløse skadelige virkninger på normal udvikling (ontogenese), reproduktiv sundhed og det reproduktive systems integritet.
4. *In vitro*-transaktiveringsassays er baseret på stoffernes direkte eller indirekte interaktion med en specifik receptor, som regulerer transkriptionen af et reporter-genprodukt. Sådanne assays er i stor udstrækning blevet anvendt til at vurdere genekspression, der reguleres af specifikke kernereceptorer som f.eks. ER'er (12) (13) (14) (15) (16). De er blevet foreslået til påvisning af østrogen-transaktivering, som reguleres af ER'en (17) (18) (19). Der findes mindst to større undertyper af kerne-ER'er, α og β , som er kodet af forskellige gener. De respektive proteiner har forskellige biologiske funktioner og forskellig vævsfordeling og ligandaffinitet (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26). Kerne-ER α medierer den klassiske østrogenrespons (27) (28) (29) (30), og derfor er de fleste af de modeller, der for øjeblikket udvikles til at måle ER-aktivering eller -inhibering, ER α -specifikke. Disse assays anvendes til påvisning af kemikalier, der aktiverer (eller inhiberer) ER'en efter ligandbinding, hvorefter receptor-ligand-komplekset binder sig til specifikke DNA-responselementer og transaktiverer et reporter-gen, hvilket resulterer i et markørproteins øgede celleekspression. Der kan anvendes forskellige reporterresponser i disse assays. I luciferasebaserede systemer omdanner luciferaseenzymet luciferinmediet til et bioluminescensprodukt, som måles kvantitativt med et luminometer. Andre eksempler på almindelige reportere er fluorescerende protein og *LacZ*-genet, som koder β -galactosidase, et enzym, der kan omdanne det farveløse medium X-gal (5-brom-4-chlor-indolyl-galactopyranosid) til et blåt produkt, der kan kvantificeres med et spektrofotometer. Disse reportere kan vurderes hurtigt og billigt med analysesæt, der kan fås i handelen.

5. Valideringsundersøgelser af STTA- og VM7Luc TA-assays har påvist deres relevans og pålidelighed i overensstemmelse med deres formål (3) (4) (5) (30). Ydeevnestandarder for luminescensbaserede ER TA-assays ved anvendelse af brystcellelinjer er omfattet af ICCVAM-evalueringsrapporten Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals (3). Disse ydeevnestandarder er blevet ændret, så de kan anvendes på både STTA- og VM7Luc TA-assays (2).
6. Definitioner og forkortelser brugt i denne forsøgsmetode er beskrevet i tillæg 1.

Anvendelsesområde og begrænsninger i forbindelse med TA-assays

7. Disse assays foreslås til screenings- og prioriteringsformål, men kan også give mekanistiske oplysninger, som kan anvendes i en weight-of-the-evidence-analyse. De analyserer den TA, som kemikaliet binding til ER'ene inducerer i et in vitro-system. Resultaterne bør således ikke direkte ekstrapoleres til den komplekse signalering og regulering af det intakte hormonsystem in vivo.
8. TA'en, som medieres af ER'ene, betragtes som en af de centrale mekanismer ved hormonforstyrrelse (ED), skønt der findes andre mekanismer, gennem hvilke ED kan forekomme, bl.a. i) interaktioner med andre receptorer og enzymsystemer i hormonsystemet, ii) hormonsyntese, iii) metabolisk aktivering og/eller inaktivering af hormoner, iv) fordeling af hormoner til målvæv og v) clearance af hormoner fra kroppen. Ingen af de assays, der er omfattet af denne forsøgsmetode, behandler disse virkemåder.
9. Denne forsøgsmetode ser på kemikaliers evne til at aktivere (dvs. handle som agonister) og undertrykke (dvs. handle som antagonist) ER-afhængig transkription. Nogle kemikalier kan udvise både celletypeafhængig agonist- og antagonistaktivitet og er kendt som selektive østrogenreceptormodulatorer (SERM'er). Kemikalier, der er negative i disse assays, kan vurderes i en ER-bindingsassay, før det konkluderes, at kemikallet ikke binder sig til receptoren. Desuden vil disse assays formentlig kun oplyse om forældremolekylets aktivitet, da in vitro-cellesystemerne har begrænset metaboliserende kapacitet. I betragtning af at der kun blev anvendt enkeltstoffer under valideringen, er anvendeligheden på forsøgsblandinger ikke blevet behandlet. Forsøgsmetoden kan ikke desto mindre teoretisk set benyttes til testning af stoffer med flere bestanddele, UVCB'er og blandinger. Før forsøgsmetoden anvendes på et stof med flere bestanddele, et UVCB eller en blanding til generering af data i lovgivningsøjemed, bør det overvejes, om den vil give resultater, som er egnede til formålet, og i givet fald hvorfor. Sådanne overvejelser er ikke nødvendige, når der foreligger et myndighedskrav om test af blandingen.
10. Til orientering viser tabel 1 agonist-testresultaterne for de 34 stoffer, som blev testet i de to fuldt validerede referenceforsøgsmetoder, der beskrives i denne

forsøgsmetode. Af disse stoffer er 26 klassificeret som definitive ER-agonister og otte som negative baseret på offentliggjorte rapporter, herunder in vitro-assays for ER-binding og TA og/eller det uterotrofiske assay (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34). Tabel 2 viser antagonist-testresultaterne for de 15 stoffer, som blev testet i de to fuldt validerede referenceforsøgsmetoder, der beskrives i denne forsøgsmetode. Af disse stoffer er fire klassificeret som definitive/formodede ER-antagonister og 10 som negative baseret på offentliggjorte rapporter, herunder in vitro-assays for ER-binding og TA (2) (3) (18) (31). Med henvisning til dataene i tabel 1 og 2 var der 100 % overensstemmelse mellem de to referenceforsøgsmetoder med hensyn til klassificeringen af samtlige stoffer med undtagelse af ét stof (mifepriston) i antagonistassayet, og samtlige stoffer blev klassificeret korrekt som ER-agonister/-antagonister eller negative. Der findes yderligere oplysninger om denne kemikaliegruppe samt om supplerende kemikalier, som er testet i STTA- og VM7Luc ER TA-assays i løbet af valideringsundersøgelserne, i ydeevnestandarderne for ER TA (6) (7), tillæg 2 (tabel 1, 2 og 3).

Tabel 1: Oversigt over resultaterne af STTA- og VM7Luc ER TA-assays for stoffer testet i begge agonistassays og klassificeret som ER-agonister (POS) eller negative (NEG)

	Stof	CAS RN	STTA-assay1			VM7Luc ER TA-assay2		Datakilde til klassificering 4		
			ER TA-aktivitet	PC10-værdi (M)	PC50-værdi ^b (M)	ER TA-aktivitet	EC50-værdi b,3 (M)	Andre ER TA'er ^c	ER-binding	Uterotrofisk
1	17β-østradiola	50-28-2	POS	< 1,00 × 10-11	< 1,00 × 10-11	POS	5,63 × 10-12	POS(227/227)	POS	POS
2	17α-østradiola	57-91-0	POS	7,24 × 10-11	6,44 × 10-10	POS	1,40 × 10-9	POS(11/11)	POS	POS
3	17α-ethinylostradiola	57-63-6	POS	< 1,00 × 10-11	< 1,00 × 10-11	POS	7,31 × 10-12	POS(22/22)	POS	POS
4	17β-trenbolon	10161-33-8	POS	1,78 × 10-8	2,73 × 10-7	POS	4,20 × 10-8	POS(2/2)	NT	NT
5	19-nortestosterona	434-22-0	POS	9,64 × 10-9	2,71 × 10-7	POS	1,80 × 10-6	POS(4/4)	POS	POS
6	4-cumylphenola	599-64-4	POS	1,49 × 10-7	1,60 × 10-6	POS	3,20 × 10-7	POS(5/5)	POS	NT
7	4-tert-octylphenola	140-66-9	POS	1,85 × 10-9	7,37 × 10-8	POS	3,19 × 10-8	POS(21/24)	POS	POS
8	Apigenina	520-36-5	POS	1,31 × 10-7	5,71 × 10-7	POS	1,60 × 10-6	POS(26/26)	POS	NT
9	Atrazina	1912-24-9	NEG	-	-	NEG	-	NEG(30/30)	NEG	NT
10	Bisphenol Aa	80-05-7	POS	2,02 × 10-8	2,94 × 10-7	POS	5,33 × 10-7	POS(65/65)	POS	POS
11	Bisphenol Ba	77-40-7	POS	2,36 × 10-8	2,11 × 10-7	POS	1,95 × 10-7	POS(6/6)	POS	POS
12	Butylbenzylphthalata	85-68-7	POS	1,14 × 10-6	4,11 × 10-6	POS	1,98 × 10-6	POS(12/14)	POS	NEG
13	Corticosterona	50-22-6	NEG	-	-	NEG	-	NEG(6/6)	NEG	NT
14	Coumestrola	479-13-0	POS	1,23 × 10-9	2,00 × 10-8	POS	1,32 × 10-7	POS(30/30)	POS	NT
15	Daidzeina	486-66-8	POS	1,76 × 10-8	1,51 × 10-7	POS	7,95 × 10-7	POS(39/39)	POS	POS
16	Diethylstilbestrola	56-53-1	POS	< 1,00 × 10-11	2,04 × 10-11	POS	3,34 × 10-11	POS(42/42)	POS	NT
17	Di-n-butylphthalat	84-74-2	POS	4,09 × 10-6		POS	4,09 × 10-6	POS(6/11)	POS	NEG
18	Ethylparaben	120-47-8	POS	5,00 × 10-6	(ingen PC50)	POS	2,48 × 10-5	POS		NT
19	Østrona	53-16-7	POS	3,02 × 10-11	5,88 × 10-10	POS	2,34 × 10-10	POS(26/28)	POS	POS
20	Genisteina	446-72-0	POS	2,24 × 10-9	2,45 × 10-8	POS	2,71 × 10-7	POS(100/102)	POS	POS
21	Haloperidol	52-86-8	NEG	-	-	NEG	-	NEG(2/2)	NEG	NT
22	Kaempferola	520-18-3	POS	1,36 × 10-7	1,21 × 10-6	POS	3,99 × 10-6	POS(23/23)	POS	NT
23	Chlordecona	143-50-0	POS	7,11 × 10-7	7,68 × 10-6	POS	4,91 × 10-7	POS(14/18)	POS	NT
24	Ketoconazol	65277-42-1	NEG	-	-	NEG	-	NEG(2/2)	NEG	NT

25	Linurona	330-55-2	NEG	-	-	NEG	-	NEG(8/8)	NEG	NT
26	<i>meso</i> -hexestrola	84-16-2	POS	$< 1,00 \times 10^{-11}$	$2,75 \times 10^{-11}$	POS	$1,65 \times 10^{-11}$	POS(4/4)	POS	NT
27	Methyltestosterona	58-18-4	POS	$1,73 \times 10^{-7}$	$4,11 \times 10^{-6}$	POS	$2,68 \times 10^{-6}$	POS(5/6)	POS	NT
28	Morin	480-16-0	POS	$5,43 \times 10^{-7}$	$4,16 \times 10^{-6}$	POS	$2,37 \times 10^{-6}$	POS(2/2)	POS	NT
29	Norethynodrela	68-23-5	POS	$1,11 \times 10^{-11}$	$1,50 \times 10^{-9}$	POS	$9,39 \times 10^{-10}$	POS(5/5)	POS	NT
30	<i>p,p'</i> -Methoxychlora	72-43-5	POS	$1,23 \times 10^{-6}$	(ingen PC50) ^b	POS	$1,92 \times 10^{-6}$	POS(24/27)	POS	POS
31	Phenobarbitala	57-30-7	NEG	-	-	NEG	-	NEG(2/2)	NEG	NT
32	Reserpin	50-55-5	NEG	-	-	NEG	-	NEG(4/4)	NEG	NT
33	Spironolactona	52-01-7	NEG	-	-	NEG	-	NEG(4/4)	NEG	NT
34	Testosteron	58-22-0	POS	$2,82 \times 10^{-8}$	$9,78 \times 10^{-6}$	POS	$1,75 \times 10^{-5}$	POS(5/10)	POS	NT

Forkortelser: CAS RN = Registernummer i Chemical Abstracts Service; M = molær; EC50 = halvdelen af den maksimale effektive koncentration af et testkemikalie; NEG = negativ; POS = positiv; NT = ikke testet; PC10 (og PC50) = koncentrationen af et teststof, ved hvilken responsen er 10 % (eller 50 % for PC50) af den respons, der fremkaldes af den positive kontrol (E2, 1nM), på hver plade.

^a Almindelige stoffer testet i STTA- og VM7Luc ER TA-assays, som blev kategoriseret som ER-agonister eller negative og brugt til at vurdere nøjagtigheden i VM7Luc ER TA-valideringsundersøgelsen (ICCVAM VM7Luc ER TA Evaluation Report, Table 4-1) (3).

^b Den maksimale koncentration, der blev testet uden begrænsninger som følge af cytotoxisk effekt eller uopløselighed, var 1×10^{-5} M (STTA-assay) og 1×10^{-3} M (VM7Luc ER TA-assay).

^c Tallet i parentes viser de testresultater, der blev klassificeret som positive (POS) eller negative (NEG), divideret med det samlede antal registrerede undersøgelser.

¹ Værdier oplyst i Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line (2).

² ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An In Vitro Method for Identifying ER Agonists and Antagonists (3).

³ De gennemsnitlige EC50-værdier er beregnet ud fra værdier indberettet af laboratorierne i VM7Luc ER TA-valideringsundersøgelsen (XDS, ECVAM og Hiyoshi) (3).

⁴ Klassificeringen som ER-agonister eller negative er baseret på oplysninger i ICCVAM Background Review Documents (BRD) for ER Binding and TA test methods (31) samt oplysninger fundet i publikationer udgivet og revideret efter færdiggørelsen af ICCVAM's BRD'er (2) (3) (18) (31) (33) (34).

Noter: Ikke alle assays inden for denne forsøgsmetode har de samme målinger. I nogle situationer er det ikke muligt at beregne EC₅₀, da der ikke genereres en fuldstændig dosis/respons-kurve. I STTA-assayet er PC10-værdien den centrale måling, men der kan også være andre eksempler, hvor en PC_x vil give nyttige oplysninger.

Tabel 2: Sammenligning af resultater af STTA- og VM7Luc ER TA-assays for stoffer testet i begge antagonistassays og klassificeret som ER-antagonister (POS) eller negative (NEG)

	Stof ^a	CAS RN	ER STTA-assay ¹		VM7Luc ER TA-assay ²		ER STTA-kandidat-virkninger ⁴	ICCVAM ⁵ konsensusklassifikation	MeSH ⁶ kemisk gruppe	Produktgruppe ⁷
			ER TA-aktivitet	IC ₅₀ -værdi ^b (M)	ER TA-aktivitet	IC ₅₀ -værdi ^{b,3} (M)				
1	4-hydroxytamoxifen	68047-06-3	POS	$3,97 \times 10^{-9}$	POS	$2,08 \times 10^{-7}$	moderat POS	POS	Kulbrinte (cyklisk)	Farmaceutisk produkt
2	Dibenzo[a,h]anthracen	53-70-3	POS	Ingen IC ₅₀	POS	Ingen IC ₅₀	POS	PP	Polycyklisk forbindelse	Laboratoriekemikalie, naturprodukt
3	Mifepriston	84371-65-3	POS	$5,61 \times 10^{-6}$	NEG	-	let POS	NEG	Steroid	Farmaceutisk produkt
4	Raloxifen HCl	82640-04-8	POS	$7,86 \times 10^{-10}$	POS	$1,19 \times 10^{-9}$	moderat POS	POS	Kulbrinte (cyklisk)	Farmaceutisk produkt
5	Tamoxifen	10540-29-1	POS	$4,91 \times 10^{-7}$	POS	$8,17 \times 10^{-7}$	POS	POS	Kulbrinte (cyklisk)	Farmaceutisk produkt
6	17β-østradiol	50-28-2	NEG	-	NEG	-	PN	PN	Steroid	Farmaceutisk produkt, veterinær
7	Apigenin	520-36-5	NEG	-	NEG	-	NEG	NEG	Heterocyklisk forbindelse	Farvestof, naturprodukt, farmaceutisk mellemprodukt
8	Atrazin	1912-24-9	NEG	-	NEG	-	NEG	PN	Heterocyklisk forbindelse	Herbicide
9	Di-n-butylphthalat	84-74-2	NEG	-	NEG	-	NEG	NEG	Ester, phthalsyre	Kosmetisk ingrediens, industrikemikalie, blødgøringsmiddel
10	Fenarimol	60168-88-9	NEG	-	NEG	-	ikke testet	PN	Heterocyklisk forbindelse, pyrimidin	Fungicide
11	Flavon	525-82-6	NEG	-	NEG	-	PN	PN	Flavonoid, heterocyklisk forbindelse	Naturprodukt, farmaceutisk produkt
12	Flutamid	13311-84-7	NEG	-	NEG	-	NEG	PN	Amid	Farmaceutisk produkt, veterinær
13	Genistein	446-72-0	NEG	-	NEG	-	PN	NEG	Flavonoid, heterocyklisk forbindelse	Naturprodukt, farmaceutisk produkt
14	p-n-nonylphenol	104-40-5	NEG	-	NEG	-	ikke testet	NEG	Phenol	Kemisk mellemprodukt
15	Resveratrol	501-36-0	NEG	-	NEG	-	PN	NEG	Kulbrinte (cyklisk)	Naturprodukt

Forkortelser: CAS RN = Registernummer i Chemical Abstracts Service; M = molær; IC₅₀ = halvdelen af den maksimale inhiberende koncentration af et testkemikalie; NEG = negativ; PN = formodet negativ; POS = positiv; PP = formodet positiv.

^a Almindelige stoffer testet i STTA- og VM7Luc ER TA-assays, som blev kategoriseret som ER-antagonister eller negative og brugt til at vurdere nøjagtigheden i VM7Luc ER TA-

valideringsundersøgelsen (2) (3).

^b Den maksimale koncentration, der blev testet uden begrænsninger som følge af cytotoxisk effekt eller uopløselighed, var 1×10^{-3} M (STTA-assay) og 1×10^{-5} M (VM7Luc ER TA-assay).

¹ The Validation Report of the Stably transfected Transcriptional Activation Assay to Detect ER mediated activity, Part B (2).

² ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists (3).

³ De gennemsnitlige IC_{50} -værdier er beregnet ud fra værdier indberettet af laboratorierne i VM7Luc ER TA-valideringsundersøgelsen (XDS, ECVAM og Hiyoshi) (3).

⁴ ER STTA-aktivitet antaget ud fra deres indberettede virkninger kendt fra de historiske data om ER-receptorbinding i CERI-assayet, det uterotrofiske assay og oplysninger fra åben litteratur (2).

⁵ Klassificeringen som ER-antagonister eller negative er baseret på oplysninger i ICCVAM Background Review Documents (BRD) for ER Binding and TA assays (31) samt oplysninger fundet i publikationer udgivet og revideret efter færdiggørelsen af ICCVAM's BRD'er (2) (3) (18) (31).

⁶ Stofferne blev fordelt på en eller flere kemiske grupper ved hjælp af det amerikanske National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH), en internationalt anerkendt standardiseret klassificeringsordning (tilgængelig på: <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁷ Stofferne blev fordelt på en eller flere produktgrupper ved hjælp af det amerikanske National Library of Medicine's Hazardous Substances Data Bank (tilgængelig på: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).

ER TA-ASSAYETS KOMPONENTER

De centrale dele af assayets komponenter

11. Denne forsøgsmetode gælder for assays, hvor der anvendes en stabilt transfekteret eller endogen ER α -receptor og en stabilt transfekteret reportergenkonstruktion ved kontrol af et eller flere østrogenresponselementer. Andre receptorer såsom ER β kan dog være til stede. Dette er de centrale dele af assayets komponenter.

Kontroller

12. Grundlaget for de foreslåede sideløbende referencestandarder for de forskellige agonist- og antagonistassays beskrives. Eventuelle sideløbende kontroller (negative, opløsningsmiddel og positive) er et tegn på, at assayet virker under testbetingelserne og danner grundlag for sammenligninger mellem forsøgene. De indgår normalt i acceptkriterierne for et givet forsøg (1).

Standardprocedurer for kvalitetskontrol

13. Standardprocedurer for kvalitetskontrol udføres som beskrevet for hvert assay for at sikre, at cellelinjen forbliver stabil gennem mange passeringer, forbliver mykoplasmafri (dvs. fri for kontaminering med bakterier) og bevarer evnen til at give de forventede ER-medierede responser over tid. Cellelinjerne kontrolleres desuden for korrekt identitet samt for andre kontaminanter (f.eks. svamp, gær og vira).

Påvisning af laboratoriets kompetence

14. Inden laboratorierne tester ukendte kemikalier med et assay under denne forsøgsmetode, skal de påvise deres kompetence med anvendelsen af det pågældende assay. Til påvisning af denne kompetence skal laboratorierne teste de 14 kompetencestoffer, der er anført i tabel 3 (agonistassayet), og de 10 kompetencestoffer, der er anført i tabel 4 (antagonistassayet). Denne kompetencetest vil endvidere bekræfte testsystemets responsivitet. Listen over kompetencestoffer indeholder en del af de referencestoffer, der er anført i ydeevnestandarderne for ER TA-assays (6). Disse stoffer findes i handelen, repræsenterer kemiske grupper, der sædvanligvis er forbundet med ER-agonist- eller -antagonistaktivitet, udviser et passende styrkeinterval, som forventes for ER-agonister/-antagonister (dvs. stærk til svag) og omfatter negative. Testen af kompetencestofferne bør gentages mindst to gange på forskellige dage. Kompetence påvises ved korrekt klassificering (positiv/negativ) af hvert kompetencestof. Kompetencetesten gentages af de enkelte teknikere, når de lærer et nyt assay. Alt efter celletype kan nogle af disse kompetencestoffer opføre sig som SERM'er og udvise aktivitet som både agonister og antagonister. Kompetencestofferne klassificeres imidlertid i tabel 3 og 4 efter deres kendte primære aktivitet, som skal anvendes til kompetencevurdering.

15. Til påvisning af laboratorienes ydeevne og med henblik på kvalitetskontrol udarbejder de historiske databaser over agonister og antagonist med oplysninger om referencestandarder (f.eks. 17β -østradiol og tamoxifen), positive og negative kontrolkemikalier og kontrol med opløsningsmiddel (f.eks. DMSO). Indledningsvis genereres databasen ud fra mindst 10 uafhængige agonistanalyseserier (f.eks. 17β -østradiol) og 10 uafhængige antagonistanalyseserier (f.eks. tamoxifen). Laboratoriet tilføjer resultaterne fra fremtidige analyser af disse referencestandarder og kontroller med opløsningsmiddel for at øge databasen og sikre bioassayets konsekvens og ydeevne over tid.

Tabel 3: Liste over (14) kompetencestoffer til agonistassay⁸

Nr. ⁷	Stof	CAS RN	Forventet respons ¹	STTA-assay			VM7Luc ER TA-assay		MeSH-kemikaliegruppe ⁵	Produktgruppe ⁶
				PC ₁₀ -værdi (M) ²	PC ₅₀ -værdi (M) ²	Testkoncentrationsinterval (M)	VM7Luc EC ₅₀ -værdi (M) ³	Højeste konc. ved bestemmelse af dosisinterval (M) ⁴		
14	Diethylstilbestrol	56-53-1	POS	$< 1,00 \times 10^{-11}$	$2,04 \times 10^{-11}$	10-14 – 10-8	$3,34 \times 10^{-11}$	$3,73 \times 10^{-4}$	Kulbrinte (cyklisk)	Farmaceutisk produkt, veterinær
12	17 α -østradiol	57-91-0	POS	$4,27 \times 10^{-11}$	$6,44 \times 10^{-10}$	10-11 – 10-5	$1,40 \times 10^{-9}$	$3,67 \times 10^{-3}$	Steroid	Farmaceutisk produkt, veterinær
15	meso-hexestrol	84-16-2	POS	$< 1,00 \times 10^{-11}$	$2,75 \times 10^{-11}$	10-11 – 10-5	$1,65 \times 10^{-11}$	$3,70 \times 10^{-3}$	Kulbrinte (cyklisk), phenol	Farmaceutisk produkt, veterinær
11	4-tert-octylphenol	140-66-9	POS	$1,85 \times 10^{-9}$	$7,37 \times 10^{-8}$	10-11 – 10-5	$3,19 \times 10^{-8}$	$4,85 \times 10^{-3}$	Phenol	Kemisk mellemprodukt
9	Genistein	446-72-0	POS	$2,24 \times 10^{-9}$	$2,45 \times 10^{-8}$	10-11 – 10-5	$2,71 \times 10^{-7}$	$3,70 \times 10^{-4}$	Flavonoid, heterocyklisk forbindelse	Naturprodukt, farmaceutisk produkt
6	Bisphenol A	80-05-7	POS	$2,02 \times 10^{-8}$	$2,94 \times 10^{-7}$	10-11 – 10-5	$5,33 \times 10^{-7}$	$4,38 \times 10^{-3}$	Phenol	Kemisk mellemprodukt
2	Kaempferol	520-18-3	POS	$1,36 \times 10^{-7}$	$1,21 \times 10^{-6}$	10-11 – 10-5	$3,99 \times 10^{-6}$	$3,49 \times 10^{-3}$	Flavonoid, heterocyklisk forbindelse	Naturprodukt
3	Butylbenzylphthalat	85-68-7	POS	$1,14 \times 10^{-6}$	$4,11 \times 10^{-6}$	10-11 – 10-5	$1,98 \times 10^{-6}$	$3,20 \times 10^{-4}$	Carboxylsyre, ester, phthalsyre	Blødgøringsmiddel, industrikemikalie
4	p,p'-methoxychlor	72-43-5	POS	$1,23 \times 10^{-6}$	-	10-11 – 10-5	$1,92 \times 10^{-6}$	$2,89 \times 10^{-3}$	Kulbrinte (halogeneret)	Pesticid, veterinær
1	Ethylparaben	120-47-8	POS	$5,00 \times 10^{-6}$	-	10-11 – 10-5	$2,48 \times 10^{-5}$	$6,02 \times 10^{-3}$	Carboxylsyre, phenol	Farmaceutisk produkt, konserveringsmiddel
17	Atrazin	1912-24-9	NEG	-	-	10-10 – 10-4	-	$4,64 \times 10^{-4}$	Heterocyklisk forbindelse	Herbicid
20	Spironolacton	52-01-7	NEG	-	-	10-11 – 10-5	-	$2,40 \times 10^{-3}$	Lacton, steroid	Farmaceutisk produkt
21	Ketoconazol	65277-42-1	NEG	-	-	10-11 – 10-5	-	$9,41 \times 10^{-5}$	Heterocyklisk forbindelse	Farmaceutisk produkt
22	Reserpin	50-55-5	NEG	-	-	10-11 – 10-5	-	$1,64 \times 10^{-3}$	Heterocyklisk forbindelse, indol	Farmaceutisk produkt, veterinær

Forkortelser: CAS RN = Registernummer i Chemical Abstracts Service; EC50 = halvdelen af den maksimale effektive koncentration af et testkemikalie; NEG = negativ; POS = positiv; PC10 (og PC50) = koncentrationen af et teststof, ved hvilken responsen er 10 % (eller 50 % for PC50) af den respons, der fremkaldes af den positive kontrol (E2, 1nM), på hver plade.

- 1 Klassificeringen som positiv eller negativ for ER-agonistaktivitet er baseret på ICCVAM's Background Review Documents (BRD) om ER-bindings- og TA-assays (31) samt empiriske data og andre oplysninger fra registrerede undersøgelser, der er offentliggjort og revideret efter færdiggørelsen af ICCVAM's BRD'er (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34).
- 2 Værdier oplyst i Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line (30).
- 3 De gennemsnitlige EC50-værdier er beregnet ud fra værdier indberettet af laboratorierne i VM7Luc ER TA-valideringsundersøgelsen (XDS, ECVAM og Hiyoshi) (3).
- 4 De indberettede koncentrationer var de højeste testede koncentrationer (bestemmelse af dosisinterval) under valideringen af VM7Luc ER TA-assayet. Hvis laboratoriernes koncentrationer var forskellige, er den højeste koncentration angivet. Se tabel 4-10 i ICCVAM Test Method Evaluation Report; The LUMI-Cell®ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals (3).
- 5 Stofferne blev fordelt på en eller flere kemiske grupper ved hjælp af det amerikanske National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH), en internationalt anerkendt standardiseret klassificeringsordning (tilgængelig på: <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).
- 6 Stofferne blev fordelt på en eller flere produktgrupper ved hjælp af det amerikanske National Library of Medicine's Hazardous Substances Database (tilgængelig på: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).
- 7 Fra tabel 1 (liste over referencekemikalier (22) til vurdering af ER-agonistnøjagtighed) i ydeevnestandarderne (6).
- 8 Hvis et kompetencestof ikke længere findes i handelen, kan der anvendes et stof med den samme klassificering og sammenlignelig styrke, virkemåde og kemisk sammensætning.

Tabel 4: Liste over (10) kompetencestoffer til antagonistassay

	Stof ^a	CAS RN	ER STTA-assay ¹			VM7Luc ER TA-assay ²			ER STTA ¹ - kandidatvirkninger	ICCVAM ⁵ konsensusklassifikation	MeSH ⁶ kemisk gruppe	Produktgruppe ⁷
			ER TA- aktivitet	IC ₅₀ (M)	Testkoncentrationsinterval (M)	ER TA- aktivitet	IC ₅₀ ³ (M)	Højeste konc. ved bestemmelse af dosisinterval (M) ⁴				
1	4-hydroxytamoxifen	68047-06-3	POS	$3,97 \times 10^{-9}$	$10^{-12} - 10^{-7}$	POS	$2,08 \times 10^{-7}$	$2,58 \times 10^{-4}$	moderat POS	POS	Kulbrinte (cyklisk)	Farmaceutisk produkt
2	Raloxifen HCl	82640-04-8	POS	$7,86 \times 10^{-10}$	$10^{-12} - 10^{-7}$	POS	$1,19 \times 10^{-9}$	$1,96 \times 10^{-4}$	moderat POS	POS	Kulbrinte (cyklisk)	Farmaceutisk produkt
3	Tamoxifen	10540-29-1	POS	$4,91 \times 10^{-7}$	$10^{-10} - 10^{-5}$	POS	$8,17 \times 10^{-7}$	$2,69 \times 10^{-4}$	POS	POS	Kulbrinte (cyklisk)	Farmaceutisk produkt
4	17β-østradiol	50-28-2	NEG	-	$10^{-9} - 10^{-4}$	NEG	-	$3,67 \times 10^{-3}$	skal være negativ*	PN	Steroid	Farmaceutisk produkt, veterinær
5	Apigenin	520-36-5	NEG	-	$10^{-9} - 10^{-4}$	NEG	-	$3,70 \times 10^{-4}$	NEG	NEG	Heterocyklisk forbindelse	Farvestof, naturprodukt, farmaceutisk mellemprodukt
6	Di-n-butylphthalat	84-74-2	NEG	-	$10^{-8} - 10^{-3}$	NEG	-	$3,59 \times 10^{-3}$	NEG	NEG	Ester, phthalsyre	Kosmetisk ingrediens, industrikemikalie, blødgøringsmiddel
7	Flavon	525-82-6	NEG	-	$10^{-8} - 10^{-3}$	NEG	-	$4,50 \times 10^{-4}$	skal være negativ*	PN	Flavonoid, heterocyklisk forbindelse	Naturprodukt, farmaceutisk produkt
8	Genistein	446-72-0	NEG	-	$10^{-9} - 10^{-4}$	NEG	-	$3,70 \times 10^{-4}$	skal være negativ*	NEG	Flavonoid, heterocyklisk forbindelse	Naturprodukt, farmaceutisk produkt
9	p-n-nonylphenol	104-40-5	NEG	-	$10^{-9} - 10^{-4}$	NEG	-	$4,54 \times 10^{-4}$	ikke testet	NEG	Phenol	Kemisk mellemprodukt
10	Resveratrol	501-36-0	NEG	-	$10^{-8} - 10^{-3}$	NEG	-	$4,38 \times 10^{-4}$	skal være negativ*	NEG	Kulbrinte (cyklisk)	Naturprodukt

Forkortelser: CAS RN = Registernummer i Chemical Abstracts Service; M = molær; IC₅₀ = halvdelen af den maksimale inhiberende koncentration af et testkemikalie; NEG = negativ; PN = formodet negativ; POS = positiv.

*Klassificeret som negativ i henhold til litteraturen (2).

^a Almindelige stoffer testet i STTA- og VM7Luc ER TA-assays, der blev kategoriseret som ER-antagonister eller negative og brugt til at vurdere nøjagtigheden i VM7Luc ER TA-valideringsundersøgelsen (2) (3).

¹ The Validation Report of the Stably transfected Transcriptional Activation Assay to Detect ER mediated activity, Part B (2).

² ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists (3).

³ De gennemsnitlige IC₅₀-værdier er beregnet ud fra værdier indberettet af laboratorierne i VM7Luc ER TA-valideringsundersøgelsen (XDS, ECVAM og Hiyoshi) (3).

4 De indberettede koncentrationer var de højeste testede koncentrationer (bestemmelse af dosisinterval) under valideringen af VM7Luc ER TA-assayet. Hvis laboratoriernes koncentrationer var forskellige, er den højeste koncentration angivet. Se tabel 4-11 i ICCVAM Test Method Evaluation Report; The LUMI-Cell®ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals (3).

⁵ Klassificeringen som ER-antagonister eller negative er baseret på oplysninger i ICCVAM's Background Review Documents (BRD) om ER-bindings- og TA-forsøgsmetoder (31) samt oplysninger fundet i publikationer udgivet og revideret efter færdiggørelsen af ICCVAM's BRD'er (2) (3) (18) (31).

⁶ Stofferne blev fordelt på en eller flere kemiske grupper ved hjælp af det amerikanske National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH), en internationalt anerkendt standardiseret klassificeringsordning (tilgængelig på: <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁷ Stofferne blev fordelt på en eller flere produktgrupper ved hjælp af det amerikanske National Library of Medicine's Hazardous Substances Data Bank (tilgængelig på: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).

Acceptkriterier for analyseserien

16. Accept eller forkastelse af en analyseserie er baseret på vurdering af de resultater, som er opnået for de referencestandarder og kontroller, der er anvendt til hvert enkelt forsøg. Referencestandardernes værdier for PC₅₀ (EC₅₀) eller IC₅₀ skal opfylde acceptkriterierne som fastsat i det valgte assay (jf. tillæg 2 for STTA, jf. tillæg 3 for VM7Luc ER TA), og alle positive/negative kontroller skal klassificeres korrekt for hvert accepteret forsøg. Evnen til at gennemføre assayet konsekvent skal påvises ved udvikling og vedligeholdelse af en historisk database for referencestandarderne og kontrollerne (jf. punkt 15). Standardafvigelse (SD) eller variationskoefficienter (CV) for gennemsnit af referencestandardernes kurvefittingsparametre fra flere forsøg kan anvendes som et mål for reproducerbarhed inden for laboratoriet. Endvidere skal følgende principper for acceptkriterier overholdes:
- Dataene skal være tilstrækkelige til kvantitativ vurdering af ER-aktivering (ved agonistassay) eller -undertrykkelse (ved antagonistassay) (dvs. effektivitet og styrke).
 - Den gennemsnitlige reporteraktivitet for referencekoncentrationen af referenceøstrogen skal mindst være det minimum, der er fastsat i assayet, i forhold til aktiviteten i kontrollen med bærestof (opløsningsmiddel) for at sikre en passende følsomhed. For STTA- og VM7Luc ER TA-assays er dette fire gange aktiviteten i den gennemsnitlige kontrol med bærestof på hver plade.
 - De testede koncentrationer skal forblive inden for testkemikaliernes opløselighedsinterval og må ikke påvise cytotoxisk effekt.

Analyse af data

17. Den fastlagte procedure for datafortolkning for hvert assay skal anvendes til klassificering af en positiv og negativ respons.
18. Hvis acceptkriterierne opfyldes (punkt 16), er det tegn på, at assayet fungerer korrekt, men det er ingen garanti for, at alle analyseserier vil producere nøjagtige data. Kan resultaterne af den første analyseserie gentages, er det den bedste garanti for, at der blev produceret nøjagtige data. Hvis to analyseserier giver reproducerbare resultater (hvis f.eks. resultaterne af begge analyseserier viser, at et testkemikalie er positivt), er det ikke nødvendigt at gennemføre en tredje analyseserie.
19. Hvis to analyseserier ikke giver reproducerbare resultater (hvis f.eks. et testkemikalie er positivt i én analyseserie og negativt i den anden analyseserie), eller hvis der stilles krav om større sikkerhed omkring resultatet af assayet, bør der gennemføres mindst tre uafhængige analyseserier. I dette tilfælde baseres klassificeringen på de to overensstemmende resultater af de tre.

Generelle kriterier for datafortolkning

20. Der findes for øjeblikket ikke nogen almindeligt anerkendt metode til fortolkning af ER TA-data. Både kvalitative (f.eks. positiv/negativ) og/eller kvantitative (f.eks. EC₅₀, PC₅₀, IC₅₀) vurderinger af ER-medieret aktivitet bør være baseret på empiriske data og solid videnskabelig vurdering. Når det er muligt, skal de positive resultater karakteriseres ved både virkningens omfang sammenlignet med kontrollen med bærestof (opløsningsmiddel) eller referenceøstroget og den koncentration, hvorved virkningen opstår (f.eks. EC₅₀, PC₅₀, RPC_{Max}, IC₅₀ osv.).

Testrapport

21. Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Assay:

- det anvendte assay
- kontrol/referencestandard/testkemikalie
- oprindelse, batchnummer, sidste anvendelsesdato, hvis dette foreligger
- testkemikaliets stabilitet, hvis denne er kendt
- testkemikaliets opløselighed og stabilitet i opløsningsmidlet, hvis dette er kendt
- måling af pH-værdi, osmolalitet og bundfald i det dyrkningsmedium, som testkemikaliets blev tilsat, hvor det er relevant.

Stof med kun én bestanddel:

- fysisk udseende, vandopløselighed og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber
- kemisk identifikation, f.eks. IUPAC-navn eller CAS-navn, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel, renhed, kemisk identitet af urenheder, i det omfang det er relevant og praktisk muligt, osv.

Stof med flere bestanddele, UVCB-stoffer og blandinger:

- kendetegnet så vidt muligt ved kemisk identitet (jf. ovenfor), kvantitativ forekomst og bestanddelenes relevante fysisk-kemiske egenskaber.

Opløsningsmiddel/bærestof:

- karakterisering (art, leverandør og batch)
- begrundelse for valg af opløsningsmiddel/bærestof
- testkemikaliets opløselighed og stabilitet i opløsningsmidlet/bærestoffet, hvis dette er kendt.

Celler:

- celletype og -oprindelse:

- udtrykkes ER endogent? Hvis nej, hvilke(n) receptor(er) blev transfekteret?
 - anvendt(e) reporterkonstruktion(er) (herunder oprindelsesarter)
 - transfektionsmetode
 - eventuel udvælgelsesmetode til vedligeholdelse af stabil transfektion
 - er transfektionsmetoden relevant for stabile linjer?
- antal cellegenerationer (fra optøning)
 - cellernes generationsantal ved optøning
 - metoder til vedligeholdelse af cellekulturer.

Testbetingelser:

- opløselighedsbegrænsninger
- beskrivelse af de anvendte metoder til vurdering af levedygtighed
- mediesammensætning og CO₂-koncentration
- testkemikaliekoncentrationer
- mængde tilsat bærestof og testkemikalie
- inkubationstemperatur og -fugtighed
- behandlingens varighed
- celletæthed ved behandlingsstart og undervejs i behandlingen
- positive og negative referencestandarder
- reporterreagenser (produkt navn, leverandør og batch)
- kriterier for bedømmelse af analyseserier som positive, negative eller usikre.

Testgodkendelse:

- foldinduktioner for hver assayplade og angivelse af, hvorvidt de opfylder assayets minimumskrav baseret på historiske kontroller
- faktiske værdier for acceptkriterier, f.eks. log₁₀EC₅₀, log₁₀PC₅₀, logIC₅₀ og Hills kurveværdier, for sideløbende positive kontroller/referencestandarder.

Resultater:

- rådata og normaliserede data
- maksimalt foldinduktionsniveau
- cytotoxicitetsdata

- den laveste effektive koncentration (LEC), hvis den foreligger
- RPC_{Max} -, PC_{Max} -, PC_{50} -, IC_{50} - og/eller EC_{50} -værdier, hvis disse er relevante
- koncentration/respons-forhold, når det er muligt
- eventuelle statistiske analyser sammen med en måling af fejl og konfidens (f.eks. middelfejlen på middeltallet (SEM), standardafvigelse, variationskoefficient eller 95 % CI) og en beskrivelse af, hvordan disse værdier er opnået.

Diskussion af resultaterne

Konklusion

LITTERATUR

- (1) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (2) OECD (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 225), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (3) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method, an *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.
- (4) Pujol P. *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, *Cancer. Res.*, 58(23): s. 5367-73.
- (5) Rogers J.M. og Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In Vitro and Molecular Toxicology: Journal of Basic and Applied Research*, 13(1): s. 67-82.
- (6) OECD (2012). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Agonists (for TG 455). Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 173.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (7) OECD (2015). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Antagonists. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 174.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (8) OECD (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

- (9) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept. *Climacteric*, 5 Suppl 2: s. 20- 6.
- (10) Welboren W.J. *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and how are they Regulated? *Endocr. Relat. Cancer*, 16(4): s. 1073-89.
- (11) Younes M. og Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 135(1): s. 63- 6.
- (12) Jefferson W.N., *et al.* (2002). Assessing Estrogenic Activity of Phytochemicals Using Transcriptional Activation and Immature Mouse Uterotrophic Responses, *Journal of Chromatography B*, 777(1-2): s. 179-189.
- (13) Sonneveld E. *et al.* (2006). Comparison of *In Vitro* and *In Vivo* Screening Models for Androgenic and Estrogenic Activities, *Toxicol. Sci.*, 89(1): s. 173-187.
- (14) Takeyoshi M. *et al.* (2002). The Efficacy of Endocrine Disruptor Screening Tests in Detecting Anti-Estrogenic Effects Downstream of Receptor-Ligand Interactions, *Toxicology Letters*, 126(2): s. 91-98.
- (15) Combes R.D. (2000). Endocrine Disruptors: a Critical Review of *In Vitro* and *In Vivo* Testing Strategies for Assessing their Toxic Hazard to Humans, *ATLA Alternatives to Laboratory Animals*, 28(1): s. 81-118.
- (16) Escande A. *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol.*, 71(10): s. 1459-69.
- (17) Gray L.E. Jr. (1998). Tiered Screening and Testing Strategy for Xenoestrogens and Antiandrogens, *Toxicol. Lett.*, 102-103, 677-680.
- (18) EDSTAC (1998). Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final Report.
- (19) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.
- (20) Gustafsson J.Ö. (1999). Estrogen Receptor β - A New Dimension in Estrogen Mechanism of Action, *Journal of Endocrinology*, 163(3): s. 379-383.
- (21) Ogawa S. *et al.* (1998). The Complete Primary Structure of Human Estrogen Receptor β (hER β) and its Heterodimerization with ER α *In Vivo* and *In Vitro*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 243(1): s. 122-126.

- (22) Enmark E. *et al.* (1997). Human Estrogen Receptor β -Gene Structure, Chromosomal Localization, and Expression Pattern, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82(12): s. 4258-4265.
- (23) Ball L.J. *et al.* (2009). Cell Type- and Estrogen Receptor-Subtype Specific Regulation of Selective Estrogen Receptor Modulator Regulatory Elements, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 299(2): s. 204-211.
- (24) Barkhem T. *et al.* (1998). Differential Response of Estrogen Receptor Alpha and Estrogen Receptor Beta to Partial Estrogen Agonists/Antagonists, *Mol. Pharmacol*, 54(1): s. 105-12.
- (25) Deroo B.J. og Buensuceso A.V. (2010). Minireview: Estrogen Receptor- β : Mechanistic Insights from Recent Studies, *Molecular Endocrinology*, 24(9): s. 1703-1714.
- (26) Harris D.M. *et al.* (2005). Phytoestrogens Induce Differential Estrogen Receptor Alpha- or Beta- Mediated Responses in Transfected Breast Cancer Cells, *Experimental Biology and Medicine*, 230(8): s. 558-568.
- (27) Anderson J.N. Clark J.H. og Peck E.J.Jr. (1972). The Relationship Between Nuclear Receptor-Estrogen Binding and Uterotrophic Responses, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 48(6): s. 1460-1468.
- (28) Toft D. (1972). The Interaction of Uterine Estrogen Receptors with DNA, *Journal of Steroid Biochemistry*, 3(3): s. 515-522.
- (29) Gorski J. *et al.* (1968), Hormone Receptors: Studies on the Interaction of Estrogen with the Uterus, *Recent Progress in Hormone Research*, 24: s. 45-80.
- (30) Jensen E.V. *et al.* (1967), Estrogen-Receptor Interactions in Target Tissues, *Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale*, 56(3): s. 547-569.
- (31) ICCVAM (2002). Background Review Document: Estrogen Receptor Transcriptional Activation (TA) Assay. Appendix D, Substances Tested in the ER TA Assay, NIH Publication Report (No 03-4505.).
- (32) Kanno J. *et al.* (2001). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay to Screen Compounds for *In Vivo* Estrogenic Responses: Phase 1, *Environ. Health Persp.*, 109:785-94.
- (33) Kanno J. *et al.* (2003). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two Dose-Response Studies, *Environ. Health Persp.*, 111:1530-1549.

- (34) Kanno J. *et al.* (2003), The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two – Coded Single-Dose Studies, *Environ. Health Persp.*, 111:1550-1558.
- (35) Geisinger *et al.* (1989) Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, *Cancer* 63, 280-288.
- (36) Baldwin *et al.* (1998) BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Animal*, 34, 649-654.
- (37) Li, Y. *et al.* (2014) Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, *Mol. Endo.* 28, 2072-2081.
- (38) Rogers, J.M. og Denison, M.S. (2000) Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals, *In Vitro & Molec. Toxicol.* 13, 67-82.

Tillæg 1

DEFINITIONER OG FORKORTELSER

Acceptkriterier: minimumsstandarder for udførelse af forsøgskontroller og referencestandarder. Alle acceptkriterier skal være opfyldt, for at et forsøg kan betragtes som gyldigt.

Nøjagtighed (konkordans): overensstemmelsen mellem forsøgsmetodens resultater og accepterede referenceværdier. Den er et mål for forsøgsmetodens ydeevne og et af aspekterne af relevans. Udtrykket benyttes ofte som synonym for "konkordans" forstået som den andel af korrekte udfald, forsøgsmetoden fører til (1).

Agonist: et stof, der giver en respons, f.eks. transkription, når det binder til en bestemt receptor.

Antagonist: en type receptorigand eller kemikalie, som ikke selv fremkalder en biologisk respons ved binding til en receptor, men blokerer eller dæmper agonist-medierede responser.

Antiøstrogenaktivitet: et kemikalies evne til at undertrykke virkningen af 17 β -østradiol medieret gennem østrogenreceptorer.

Cellemorfologi: form og udseende af celler, der dyrkes i encellede lag på en vævsdyrkningsplade med én brønd. Døende celler udviser ofte en abnorm cellemorfologi.

CF: OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters (OECD's konceptuelle ramme for test og vurdering af hormonforstyrrende kemikalier).

Trækul-/dextranbehandling: behandling af serum, der benyttes i cellekultur. Behandling med trækul/dextran (ofte omtalt som "stripping") fjerner endogene hormoner og hormonbindende proteiner.

Kemikalie: et stof eller en blanding

Cytotoksisk effekt: skadelige virkninger i cellestruktur eller -funktion, som i sidste ende forårsager celledød og kan afspejles i en reduktion i antallet af celler i brønden ved afslutningen af eksponeringsperioden eller en reduktion i kapaciteten til måling af cellefunktionen ved sammenligning med den sideløbende bærestofkontrol.

CV: Coefficient of variation (variationskoefficient)

DCC-FBS: Dextran-coated charcoal treated fetal bovine serum (føtalt kalveserum behandlet med dextranovertrukket trækul).

DMEM: Dulbecco's Modification of Eagle's Medium

DMSO Dimethylsulfoxid

E2: 17 β -østradiol

EC₅₀: halvdelen af den maksimale effektive koncentration af et testkemikalie

ED: hormonforstyrrende virkning

hER α : human østrogenreceptor alfa

hER β : human østrogenreceptor beta

EFM: østrogenfrit medium. Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM) suppleret med 4,5 % aktivt kul-/dextranbehandlet FBS, 1.9 % L-glutamin og 0,9 % pen-Strep.

ER: østrogenreceptor

ERE: østrogenresponselement

Østrogenaktivitet: et kemikalies evne til at efterligne 17 β -østradiol i dets evne til at binde sig til og aktivere østrogenreceptorer. hER α -medieret østrogenaktivitet kan spores med denne forsøgsmetode.

ERTA: transaktivering af østrogenreceptorer

FBS: føtalt kalveserum

HeLa: en udødelig human cervikal cellelinje

HeLa9903: en underklon af en HeLa-celle, hvori hER α og et luciferasereporter gen er blevet stabilt transfekteret

IC₅₀: halvdelen af den maksimale effektive koncentration af et inhiberende testkemikalie

ICCVAM: US Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods.

Reproducerbarhed mellem laboratorier: mål for, i hvilken grad forskellige kvalificerede laboratorier kan opnå de samme resultater kvalitativt og kvantitativt, når de anvender samme protokol og tester de samme stoffer. Reproducerbarheden mellem laboratorier bestemmes forud for og under valideringsprocessen og angiver, i hvilken grad et assay kan overføres mellem laboratorier med et vellykket resultat. Kaldes også ekstern reproducerbarhed (1).

Reproducerbarhed inden for laboratorier: bestemmelse af, i hvilken grad kvalificeret personale på det samme laboratorium kan reproducere resultater ved at anvende en specifik protokol på forskellige tidspunkter. Kaldes også "intern reproducerbarhed" (1).

LEC: den laveste effektive koncentration er testkemikaliets laveste koncentration, som fremkalder en respons (dvs. den laveste testkemikaliekoncentration, ved hvilken foldinduktionen er statistisk forskellig fra den sideløbende bærestofkontrol)

Me-too test: populært udtryk for et assay, som strukturelt og funktionelt ligner en valideret og anerkendt referenceforsøgsmetode. Benyttes som synonym for tilsvarende forsøgsmetode

MT: metallothionein

MMTV: mamatumorvirus hos mus

OHT: 4-hydroxytamoxifen

PBTG: ydeevnebaseret forsøgsretningslinje

PC (positiv kontrol): et stærkt aktivt stof, fortrinsvis 17 β -østradiol, der er inkluderet i alle test for at bidrage til, at assayet fungerer tilfredsstillende

PC₁₀: den koncentration af et testkemikalie, hvor den målte aktivitet i et agonist-assay er 10 % af den maksimale aktivitet, der er fremkaldt af PC (E2 ved 1 nM for STTA-assayet) i hver plade.

PC₅₀: den koncentration af et testkemikalie, hvor den målte aktivitet i et agonist-assay er 50 % af den maksimale aktivitet, der er fremkaldt af PC (E2 ved den referencekoncentration, der er specificeret i forsøgsmetoden) i hver plade.

PC_{Max}: den koncentration af et testkemikalie, som fremkalder RPC_{Max}

Ydeevnestandarder: standarder, der med udgangspunkt i et valideret assay danner grundlag for at vurdere, om et foreslået assay, som er mekanistisk og funktionelt tilsvarende, er sammenligneligt. De indeholder (1) de centrale dele af assayet, (2) en minimumsliste over referencekemikalier, som er udvalgt blandt de kemikalier, der anvendes til at påvise, at den validerede forsøgsmetodes ydeevne er acceptabel, og (3) de sammenlignelige niveauer af nøjagtighed og pålidelighed, som er fastsat efter, hvad der er opnået med den validerede forsøgsmetode, og som det skal påvises, at det foreslåede assay kan yde ved vurdering ud fra minimumslisten over referencekemikalier (1).

Kompetencestoffer: en delmængde af referencestoffer, der indgår i ydeevnestandarderne, og som kan anvendes af laboratorier til at påvise teknisk kompetence med en standardiseret forsøgsmetode. Udvalgelseskriterier for disse stoffer omfatter typisk, at de repræsenterer responsområdet, fås i handelen, og at der foreligger referencedata af høj kvalitet.

Kompetence: dokumenteret evne til at gennemføre et assay korrekt, før ukendte stoffer testes.

Referenceøstrogen (positiv kontrol, PC): 17 β -østradiol (E2, CAS 50-28-2).

Referencestandard: et referencestof, der anvendes til at påvise tilstrækkeligheden af et assay. 17 β -østradiol er referencestandarden for STTA og VM7Luc ER TA-assays.

Referenceforsøgsmetoder: de assays, hvorpå PBTG 455 er baseret.

Relevans: beskrivelse af sammenhængen mellem et assay og den pågældende virkning og dens

meningsfuldhed og brugbarhed til et bestemt formål. Det angives, i hvilket omfang assayet måler eller forudsiger den relevante biologiske virkning korrekt. Assayets nøjagtighed (konkordans) indgår i vurderingen af dets relevans (1).

Pålidelighed: mål for, i hvilken grad et assay kan reproduceres i og mellem laboratorier over en længere periode, når det udføres efter samme protokol. Det bedømmes ved beregning af reproducerbarhed inden for og mellem laboratorier.

RLU: relative lysenheder

RNA: ribonukleinsyre

RPC_{Max}: maksimalt responsniveau fremkaldt af et testkemikalie, udtrykt som en procentdel af den respons, der fremkaldes af 1 nM E2 på den samme plade

RPMI: RPMI 1640-medium suppleret med 0,9 % Pen-Strep og 8,0 % føtalt kalveserum (FBS)

Analyseserie: et individuelt forsøg, der vurderer den kemiske påvirkning af assayets biologiske udfald. Hver enkelt analyseserie er et fuldstændigt forsøg udført på replikatbrønde med celler udpladet fra en fælles cellepool på samme tid.

Uafhængig analyseserie: et særskilt uafhængigt forsøg, der vurderer den kemiske påvirkning af assayets biologiske udfald ved hjælp af celler fra en anden pool og frisk fortyndede kemikalier, udført på forskellige dage eller på den samme dag af andet personale.

Standardafvigelse: standardafvigelse

Følsomhed: andelen af alle positive/aktive stoffer, der klassificeres korrekt ved assayet. Den er et mål for nøjagtigheden af et assay, der fører til kategoriske resultater, og har stor betydning for vurdering af et assays relevans (1).

Specificitet: andelen af alle negative/inaktive stoffer, som klassificeres korrekt ved testen. Den er et mål for nøjagtigheden af et assay, der fører til kategoriske resultater, og har stor betydning for vurdering af et assays relevans (1).

Stabil transfektion: når DNA transfekteres ind i dyrkede celler på en sådan måde, at det integreres stabilt i cellernes genom og resulterer i en stabil ekspression af transfekterede gener. Kloner af stabilt transfekterede celler udvælges af stabile markører (f.eks. modstand mod G418)

STTA-assay: stabilt transfekteret transaktiveringsassay, ER α -transkriptionsaktiveringsassay, der anvender HeLa 9903-cellelinje

Undersøgelse: hele rækken af forsøgsarbejdsopgaver, der udføres for at vurdere et enkelt specifikt stof ved hjælp af et bestemt assay. En undersøgelse omfatter alle skridt, herunder opløsningstest af teststoffet i testmediet, forprøve til bestemmelse af dosisintervaller, alle nødvendige omfattende analyseserier, dataanalyser, kvalitetssikring, vurderinger af den cytotoxiske effekt osv. Gennemførelse af en undersøgelse gør det muligt at klassificere

testkemikaliets aktivitet på det toksicitetsmål (dvs. aktiv, inaktiv eller usikker), der vurderes med det anvendte assay, og foretage et skøn over styrke i forhold til det positive referencekemikalie.

Stof: i henhold til REACH¹² defineres et stof som et grundstof og forbindelser heraf, naturligt eller industrielt fremstillet, indeholdende sådanne tilsætningsstoffer, som er nødvendige til bevarelse af stoffets stabilitet, og sådanne urenheder, som følger af fremstillingsprocessen, bortset fra opløsningsmidler, der kan udskilles, uden at det påvirker stoffets stabilitet eller ændrer dets sammensætning. Der benyttes en lignende definition i forbindelse med UN GHS (1).

TA (Transaktivering): igangsættelse af mRNA-syntese som reaktion på et bestemt kemisk signal såsom binding af et østrogen til østrogenreceptoren

Assay: i forbindelse med denne forsøgsmetode er et assay en af de metoder, der accepteres som gyldig med hensyn til opfyldelse af de skitserede ydeevnekriterier. Assayets komponenter omfatter f.eks. den specifikke cellelinje med tilhørende vækstbetingelser, særlige medier, hvori testen udføres, pladeopstillingsbetingelser, opstilling og opløsninger af testkemikalier sammen med alle andre nødvendige kvalitetskontrolforanstaltninger og tilhørende dataevalueringskridt.

Testkemikalie: alle stoffer eller blandinger, der testes ved hjælp af denne forsøgsmetode

Transskription: mRNA-syntese

UVCB: kemiske stoffer med ukendt eller variabel sammensætning, komplekse reaktionsprodukter eller biologiske materialer

Valideret forsøgsmetode: et assay, for hvilket der er gennemført valideringsundersøgelser for at fastslå relevansen (herunder nøjagtigheden) og pålideligheden til et bestemt formål. Det er vigtigt at være opmærksom på, at en valideret forsøgsmetode måske ikke har en tilstrækkelig ydeevne med hensyn til nøjagtighed og pålidelighed til at være acceptabel til det planlagte formål (1).

Validering: den proces, hvorved pålideligheden og relevansen af en bestemt tilgang, metode, proces eller vurdering eller et bestemt assay fastslås til et defineret formål (1).

VC (bærestofkontrol): Det opløsningsmiddel, der anvendes til at opløse test- og

¹² Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1907/2006 af 18. december 2006 om registrering, vurdering og godkendelse af samt begrænsninger for kemikalier (REACH), om oprettelse af et europæisk kemikalieagentur og om ændring af direktiv 1999/45/EF og ophævelse af Rådets forordning (EØF) nr. 793/93 og Kommissionens forordning (EF) nr. 1488/94 samt Rådets direktiv 76/769/EØF og Kommissionens direktiv 91/155/EØF, 93/67/EØF, 93/105/EF og 2000/21/EF (EUT L 304 af 22.11.2007, s. 1).

kontrollkemikalier, testes alene som bærestof uden opløst kemikalie.

VM7: en udødeliggjort adenocarcinomcelle, som endogent udtrykker østrogenreceptoren

VM7Luc4E2: VM7Luc4E2-cellelinjen blev afledt af VM7 udødeliggjorte humant afledte adenocarcinomceller, som endogent udtrykker begge former for østrogenreceptorer (ER α og ER β) og er blevet stabilt transfekteret med plasmidet pGudLuc7.ERE. Dette plasmid indeholder fire kopier af et syntetisk oligonukleotid, som indeholder østrogenresponselementet umiddelbart før promotoren for brysttumorbivirus hos mus (MMTV) og luciferasegenet fra ildfluer.

Svagt positiv kontrol: et svagt aktivt stof, der vælges fra listen over referencekemikalier, og som indgår i alle forsøg for at bidrage til, at assayet fungerer tilfredsstillende.

Tillæg 2

TRANSAKTIVERINGSASSAY MED STABILT TRANSFEKTERET HUMAN ØSTROGENRECEPTOR- α TIL PÅVISNING AF ØSTROGENAGONIST- OG ØSTROGENANTAGONISTAKTIVITET I KEMIKALIER, DER ANVENDER HER α -HELA-9903-CELLELINJEN

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER (JF. OGSÅ GENEREL INDLEDNING)

1. Dette transaktiveringsassay (TA) anvender hER α -HeLa-9903-cellelinjen til at påvise østrogenagonistaktivitet medieret gennem human østrogenreceptor alfa (hER α). Den valideringsundersøgelse af det stabilt transfekterede transaktiveringsassay (STTA), som blev foretaget af det japanske Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI), der anvender hER α -HeLa-9903-cellelinjen til at påvise østrogenagonist- og østrogenantagonistaktivitet medieret gennem human østrogenreceptor alfa (hER α), viste assayets relevans og pålidelighed i overensstemmelse med dets formål (1).
2. Dette assay er specifikt udformet til at påvise hER α -medieret TA ved at måle kemiluminescens som effektparameter. Der findes imidlertid rapporter om ikke-receptormedierede luminescenssignaler ved højere koncentrationer af fytoøstrogen end 1 μ M på grund af overaktivering af luciferasereporter-genet (2) (3). Mens dosis/respons-kurven tyder på, at der sker en egentlig aktivering af ER-systemet ved lavere koncentrationer, skal den luciferaseekspression, som opnås ved høje koncentrationer af fytoøstrogener eller lignende kemiske stoffer, der mistænkes for at forårsage fytoøstrogenlignende overaktivering af luciferasereporter-genet, undersøges nøje i stabilt transfekterede ER TA-assaysystemer (tillæg 1).
3. Afsnittene "GENEREL INDLEDNING" og "ER TA-ASSAYETS KOMPONENTER" bør læses, før dette assay benyttes til lovmæssige formål. Definitioner og forkortelser, der benyttes i denne testvejledning, er beskrevet i tillæg 2.1.

PRINCIP FOR ASSAYET (SE OGSÅ GENEREL INDLEDNING)

4. Assayet bruges til at signalere binding af østrogenreceptoren til en ligand. Efter ligandbindingen forflytter receptorligandkomplekset sig til kernen, hvor det binder specifikke DNA-responselementer og transaktiverer et ildflue-luciferasereporter-gen, hvilket resulterer i øget cellulær ekspression af luciferasenzym. Luciferin er et medium, der omdannes af luciferasenzymet til et bioluminescensprodukt, som måles kvantitativt med et luminometer. Luciferaseaktivitet kan vurderes hurtigt og billigt med forskellige typer testkit, der kan fås i handelen.

5. Testsystemet anvender hER α -HeLa-9903-cellelinjen, der er afledt af en human cervikal tumor med to stabilt indsatte konstruktioner: (i) hER α -ekspressionskonstruktion (med indkodning af den humane receptor i fuld længde) og (ii) en ildflueluciferasereporter-konstruktion med fem tandem-gentagelser af et vitellogenint østrogenresponselement (ERE) drevet af et metallothioneinpromotor (MT) TATA-element fra mus. MT TATA-genkonstruktionen i mus har vist sig at have den bedste ydeevne og anvendes derfor normalt. Denne hER α -HeLa-9903-cellelinje kan derfor måle et testkemikalies evne til at fremkalde hER α -medieret transaktivering af luciferasegenekspression.
6. Ved anvendelse af ER-agonistassays er datafortolkningen baseret på, om det maksimale responsniveau fremkaldt af et testkemikalie er lig med eller overstiger en agonistrespons, der svarer til 10 % af det, der fremkaldes af en maksimalt inducerende (1 nM) koncentration af den positive kontrol (PC) 17 β -østradiol (E2) (dvs. PC₁₀). Ved anvendelse af et ER-antagonistassay er datafortolkningen baseret på, om responsen viser en mindst 30 % aktivitetsreduktion fra den respons, der induceres af spike-in-kontrollen (25 pM af E2) uden cytotoxisk effekt. Dataanalyse og -fortolkning diskuteres nærmere i punkt 34-48.

FREM GANGSMÅDE

Cellelinjer

7. Den stabilt transfekterede hER α -HeLa-9903-cellelinje bør anvendes til assayet. Cellelinjen kan fås fra den japanske Collection of Research Bioresources (JCRB) Cell Bank¹³ ved underskrivelse af en materialeoverførselsaftale (MTA).
8. Der bør kun anvendes mykoplasmafrie celler i test. RT-PCR (realtidspolymerasekædereaktion) er den foretrukne metode til en sensitiv påvisning af mykoplasmainfektion (4) (5) (6).

Cellelinjens stabilitet

9. For at overvåge cellelinjens stabilitet bør E2, 17 α -østradiol, 17 α -methyltestosteron og corticosteron anvendes som referencestandarder for agonistassayet, og der bør mindst én gang, hver gang assayet udføres, måles en fuldstændig koncentration/respons-kurve i testkoncentrationsområdet, som er angivet i tabel 1, og resultaterne bør være i overensstemmelse med resultaterne i tabel 1.

¹³ JCRB Cell Bank: National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Asagi Saito, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Japan, Fax: +81-72-641-9812.

10. Ved anvendelse af et antagonistassay bør der samtidig med hver analyseserie måles fuldstændige koncentrationskurver for to referencestandarder, tamoxifen og flutamid. En korrekt kvalitativ klassificering som positiv eller negativ for de to kemikalier bør overvåges.

Celledyrknings- og udpladningsbetingelser

11. Celler bør opbevares i Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) uden fenolrød, suppleret med 60 mg/l antibiotisk kanamycin og 10 % dextranovertrukket trækulsbehandlet føtalt kalveserum (DCC-FBS), i en CO₂-inkubator (5 % CO₂) ved 37 ± 1 °C. Ved en konfluens på 75-90 % kan celler dyrkes i subkultur ved 10 ml 0,4 x 10⁵ – 1 x 10⁵ celler/ml pr. 100 mm celledyrkningsskål. Celler bør suspenderes med 10 % FBS-EMEM (der er det samme som EMEM med DCC-FBS) og dernæst udplades i brønde på en mikropode med en tæthed på 1 x 10⁴ celler/(100 µl pr. brønd). Herefter bør cellerne præinkuberes i en 5 % CO₂-inkubator ved 37 ± 1 °C i 3 timer før den kemiske eksponering. Plastudstyr bør være fri for østrogenaktivitet.
12. For at opretholde responsens integritet bør cellerne dyrkes til mere end én generation fra den nedfrosne beholdning i det konditionerede dyrkningsmedium og bør ikke dyrkes til mere end 40 generationer. For hER α -HeLa-9903-cellelinjen vil dette være under tre måneder. Cellernes ydeevne kan dog reduceres, hvis de dyrkes under uhensigtsmæssige dyrkningsbetingelser.
13. DCC-FBS kan fremstilles som beskrevet i tillæg 2.2 eller fås i handelen.

Acceptkriterier

Positive og negative referencestandarder for ER-agonistassay

14. Før og i løbet af undersøgelsen kontrolleres testsystemets responsivitet ved hjælp af passende koncentrationer af et stærkt østrogen: E2, et svagt østrogen (17 α -østradiol), en meget svag agonist (17 α -methyltestosteron) og et negativt stof (corticosteron). Acceptable områdeværdier fra valideringsundersøgelsen (1) er anført i tabel 1. Disse fire sammenfaldende referencestandarder bør inkluderes i hvert forsøg, og resultaterne bør falde inden for de angivne acceptable grænser. Hvis dette ikke er tilfældet, bør årsagen til, at acceptkriterierne ikke er opfyldt, bestemmes (f.eks. celledyrkning samt kvalitet og koncentration af serum og antibiotika), og assayet gentages. Når acceptkriterierne er opfyldt, er det væsentligt at sikre en minimumsvariation mellem EC₅₀-, PC₅₀- og PC₁₀-værdier og en konsekvent anvendelse af materialer til celledyrkning. De fire sideløbende referencestandarder, som bør inkluderes i hvert forsøg (der udføres under samme betingelser, herunder materialer, cellegenerationsniveau og teknikere), kan sikre assayets følsomhed, fordi PC₁₀-værdier af de tre positive referencestandarder bør ligge inden for det acceptable område, og det samme bør PC₅₀- og EC₅₀-værdier, hvor de kan beregnes (se tabel 1).

Tabel 1: Acceptable områdeværdier for de fire referencestandarder for ER-agonistassays

Navn	logPC ₅₀	logPC ₁₀	logEC ₅₀	Hills kurve	Måleområde

17 β -østradiol (E2) CAS-nr.: 50-28-2	-11,4~-10,1	< -11	-11,3~-10,1	0,7~1,5	10 ⁻¹⁴ ~10 ⁻⁸ M
17 α -østradiol CAS-nr.: 57-91-0	-9,6~-8,1	-10,7~-9,3	-9,6~-8,4	0,9~2,0	10 ⁻¹² ~10 ⁻⁶ M
Corticosteron CAS-nr.: 50-22-6	—	—	—	—	10 ⁻¹⁰ ~10 ⁻⁴ M
17 α -methyltestosteron CAS-nr.: 58-18-4	-6,0~-5,1	-8,0~-6,2	—	—	10 ⁻¹¹ ~10 ⁻⁵ M

Positive og negative referencestandarder for ER-antagonistassay

15. Før og i løbet af undersøgelsen bør testsystemets responsivitet kontrolleres ved hjælp af passende koncentrationer af et positivt stof (tamoxifen) og et negativt stof (flutamid). Acceptable områdeverdier fra valideringsundersøgelsen (1) er anført i tabel 2. Disse to sideløbende referencestandarder inkluderes i hvert forsøg, og resultaterne bedømmes korrekt som vist i kriterierne. Hvis dette ikke er tilfældet, bestemmes årsagerne til, at kriterierne ikke er opfyldt (f.eks. cellehåndtering samt kvalitet og koncentration af serum og antibiotika), og assayet gentages. Endvidere bør IC₅₀-værdier for et positivt stof (tamoxifen) beregnes, og resultaterne bør falde inden for de givne acceptable grænser. Når acceptkriterierne er opfyldt, er det væsentligt at sikre minimumsvariation mellem IC₅₀-værdier og konsekvent anvendelse af materialer til celledyrkning. De to sammenfaldende referencestandarder, som bør inkluderes i hvert forsøg (der udføres under samme betingelser, herunder materialer, cellegenerationsniveau og teknikere), kan sikre assayets følsomhed (se tabel 2).

Tabel 2: Kriterier og acceptable områdeverdier for de to referencestandarder for ER-antagonistassay

Navn	Kriterier	LogIC ₅₀	Måleområde
Tamoxifen CAS-nr.: 10540-29-1	Positiv: IC ₅₀ bør beregnes	-5,942~-7,596	10 ⁻¹⁰ ~10 ⁻⁵ M
Flutamid CAS-nr.: 13311-84-7	Negativ: IC ₃₀ bør ikke beregnes	-	10 ⁻¹⁰ ~10 ⁻⁵ M

Positiv kontrol og bærestofkontrol

16. Den positive kontrol (PC) for ER-agonistassay (1 nM af E2) og for ER-antagonistassay (10 μ M TAM) bør testes mindst in triplo på hver plade. Det bærestof, som anvendes til at opløse et testkemikalie, bør testes som en bærestofkontrol (VC) mindst in triplo på hver plade. Hvis der ved den positive kontrol (PC) anvendes et andet bærestof end testkemikaliets, bør der ud over denne bærestofkontrol (VC) testes en anden VC mindst in triplo på den samme plade med PC.

Kvalitetskriterier for ER-agonistassay

17. Den gennemsnitlige luciferaseaktivitet for den positive kontrol (1 nM E2) bør være mindst 4 fold den gennemsnitlige VC på hver plade. Dette kriterium fastlægges på grundlag af

pålideligheden af værdierne for effektparametrene fra valideringsundersøgelsen (historisk mellem 4 og 30 fold).

18. Med hensyn til kvalitetskontrollen af assayet bør foldinduktionen svarende til PC_{10} -værdien af den sideløbende PC (1 nM E2) være større end 1+2 standardafvigelser af foldinduktionsværdien (=1) af den sideløbende VC. Med henblik på prioritering kan PC_{10} -værdien være nyttig til at forenkle den nødvendige dataanalyse sammenlignet med en statistisk analyse. Selv om en statistisk analyse giver oplysninger om signifikans, er en sådan analyse ikke en kvantitativ parameter med hensyn til koncentrationsbaseret potentiale og er således mindre nyttig til prioriteringsformål.

Kvalitetskriterier for ER-antagonistassay

19. Den gennemsnitlige luciferaseaktivitet af spike-in-kontrollen (25 nM E2) bør være mindst 4 fold den gennemsnitlige VC på hver plade. Dette kriterium fastlægges på grundlag af pålideligheden af værdierne for effektparametrene fra valideringsundersøgelsen.
20. Med hensyn til kvalitetskontrollen af assayet bør den relative transkriptionsaktivering (RTA) af 1 nM E2 være større end 100 %, RTA af 1 μ M 4-hydroxytamoxifen (OHT) bør ligge under 40,6 %, og RTA af 100 μ M digitonin (Dig) bør være under 0 %.

Påvisning af laboratoriets kompetence (jf. punkt 14 og tabel 3 og 4 i "ER TA-ASSAYETS KOMPONENTER" under denne forsøgsmetode).

Bærestof

21. Dimethylsulfoxid (DMSO) eller et passende opløsningsmiddel med samme koncentration, som anvendes til de forskellige positive og negative kontroller og testkemikalier, bør anvendes som den sideløbende VC. Testkemikalier bør opløses i et opløsningsmiddel, som opløser det pågældende testkemikalie og kan blandes med cellemidiet. Vand, ethanol (95-100 % renhed) og DMSO er egnede bærestoffer. Hvis der anvendes DMSO, bør niveauet ikke overstige 0,1 % (v/v). For ethvert bærestof bør det påvises, at den maksimalt anvendte mængde ikke er cytotoxisk og ikke indvirker på assayets ydeevne.

Præparering af testkemikalier

22. Generelt bør testkemikalier opløses i DMSO eller et andet egnet opløsningsmiddel og fortyndes serielt med det samme opløsningsmiddel i et fælles forhold på 1:10 for at fremstille opløsninger til fortynding med mediet.

Opløselighed og cytotoxisk effekt: Overvejelser vedrørende bestemmelse af dosisinterval

23. Der bør udføres en forprøve for at bestemme et passende koncentrationsområde for det kemikalie, der skal testes, og fastslå, om der kan være nogen problemer forbundet med testkemikaliets opløselighed og cytotoxiske effekt. Indledningsvis testes kemikalier op til den maksimale koncentration på 1 μ l/ml, 1 mg/ml eller 1 mM, (den laveste af de tre). Baseret på

omfanget af den cytotoxiske effekt eller manglende opløselighed observeret i forprøven bør den første endelige analyseserie teste kemikaliet ved log-seriefortyndinger med start ved den maksimale acceptable koncentration (f.eks. 1 mM, 100 µM, 10 µM osv.), og idet der noteres tilstedeværelse af uklarheder eller cytotoxisk effekt. Koncentrationer i den anden og, om nødvendigt, i den tredje analyseserie bør justeres, hvis det er relevant, for bedre at karakterisere koncentration/respons-kurven og undgå koncentrationer, der er uopløselige eller fremkalder for høj cytotoxisk effekt.

24. For ER-agonister og -antagonister kan tilstedeværelsen af stigende cytotoxicitetsniveauer i væsentlig grad ændre eller fjerne den typiske sigmoidale respons og bør tages i betragtning ved fortolkningen af data. Der bør anvendes forsøgsmetoder vedrørende cytotoxisk effekt, som kan give oplysninger om 80 % levedygtighed i celler, idet der benyttes et passende assay baseret på laboratoriets erfaringer.
25. Skulle resultaterne af cytotoxicitetstesten vise, at koncentrationen af testkemikaliet har reduceret antallet af celler med 20 % eller derover, bør denne koncentration betragtes som cytotoxisk, og der bør i vurderingen ses bort fra koncentrationer på eller over den cytotoxiske koncentration.

Eksposering for kemikaliet og organisering af assaypladen

26. Proceduren for kemiske fortyndinger (trin 1 og 2) og celleeksponering (trin 3) kan gennemføres på følgende måde:

Trin 1: Hvert testkemikalie fortyndes serielt i DMSO eller et passende opløsningsmiddel og tilsættes til brøndene på en mikrotiterplade for at opnå endelige seriekoncentrationer som fastlagt ved forprøven til bestemmelse af dosisinterval (typisk i en serie på f.eks. 1 mM, 100 µM, 10 µM, 1 µM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM og 10 pM (10^{-3} - 10^{-11} M)) til test in triplo.

Trin 2: Kemikaliefortynding: Fortynd først 1,5 µl af testkemikaliet i opløsningsmidlet til en koncentration på 500 µl medium.

Trin 3: Eksposering af cellerne for kemikaliet: Tilsæt 50 µl af fortyndingen med mediet (præpareret under trin 2) til en assaybrønd indeholdende 10^4 celler/100 µl/brønd.

Den anbefalede endelige mængde medium, der kræves til hver brønd, er 150 µl. Testprøver og referencestandarder kan tilordnes som vist i tabel 3 og tabel 4.

Tabel 3: Eksempel på pladekoncentrationsfordeling af referencestandarderne på assaypladen i ER-agonistassayet

Række	17α-methyltestosteron			Corticosteron			17α-østradiol			E2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 µM)	→	→	100 µM	→	→	1 µM	→	→	10 nM	→	→

B	konc. 2 (1 µM)	→	→	10 µM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	1 µM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	konc. 7 (10 pM)	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Bærestofkontrol (0,1 % DMSO), PC: Positiv kontrol (1 nM E2)

27. Referencestandarderne (E2, 17 α -østradiol, 17 α -methyltestosteron og corticosteron) testes i hver analyseserie (tabel 3). PC-brønde behandlet med 1 nM af E2, som kan frembringe en E2-induktion, og VC-brønde behandlet med DMSO (eller et passende opløsningsmiddel) alene bør inkluderes på hver testassayplade (tabel 4). Hvis der anvendes celler fra forskellige kilder (f.eks. forskelligt generationsnummer, forskellig batch osv.) i det samme forsøg, bør referencestandarderne testes for hver cellekilde.

Tabel 4: Eksempel på pladekoncentrationsfordeling for test- og pladekontrollkemikalier på assaypladen i ER-agonistassayet

Række	Testkemikalie 1			Testkemikalie 2			Testkemikalie 3			Testkemikalie 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 µM)	→	→	1 nM	→	→	1 µM	→	→	10 nM	→	→
B	konc. 2 (1 µM)	→	→	100 µM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	10 µM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	1 µM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	10 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	konc. 7 (10 pM)	→	→	1 nM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Bærestofkontrol (0,1 % DMSO), PC: Positiv kontrol (1 nM E2)

Tabel 5: Eksempel på pladekoncentrationsfordeling af referencestandarder på assaypladen i ER-antagonistassayet

Række	Tamoxifen			Flutamid			Testkemikalie 1			Testkemikalie 2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 µM)	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→
B	konc. 2 (1 µM)	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1 % DMSO	→	→	→	→	→	1 µM OHT	→	→	100 µM Dig	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Bærestofkontrol (0,1 % DMSO), PC: Positiv kontrol (1 nM E2), OHT: 4-hydroxytamoxifen, Dig: digitonin.

 = spiket med 25 pM E2.

28. For at vurdere kemikaliers antagonistaktivitet bør assaybrønde placeret i rækker fra A til G spikes med 25 pM E2. Referencestandarderne (tamoxifen og flutamid) testes i hver analyseserie. I hver testassayplade bør der inkluderes PC-brønde behandlet med 1 nM E2, der kan være kontrolkvalitet af hER α -HeLa-9903-cellelinje, VC-brønde behandlet med DMSO (eller et egnet opløsningsmiddel), 0,1 % DMSO-brønde behandlet med DMSO-tilsætning til den spikede E2 svarende til "spike-in-kontrol", brønde behandlet med den endelige koncentration 1 μ M OHT og brønde behandlet med 100 μ M Dig (tabel 5). Den efterfølgende assayplade bør følge det samme pladelayout uden referencestandardbrønde (tabel 6). Hvis der anvendes celler fra forskellige kilder (f.eks. forskelligt generationsnummer, forskellig batch osv.) i det samme forsøg, bør referencestandarderne testes for hver cellekilde.

Tabel 6: Eksempel på pladekoncentrationsfordeling for test- og pladekontrollkemikalier på assaypladen i ER-antagonistassayet

Række	Testkemikalie 1			Testkemikalie 2			Testkemikalie 3			Testkemikalie 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 μ M)	→	→	10 μ M	→	→	10 μ M	→	→	10 μ M	→	→
B	konc. 2 (1 μ M)	→	→	1 μ M	→	→	1 μ M	→	→	1 μ M	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1 % DMSO	→	→	→	→	→	1 μ M OHT	→	→	100 μ M Dig	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Bærestofkontrol (0,1 % DMSO), PC: Positiv kontrol (1 nM E2), OHT: 4-hydroxytamoxifen, Dig: digitonin.

 : Spiket med 25 pM E2.

29. De manglende randeffekter bør bekræftes, hvis det er relevant, og hvis der er mistanke om randeffekter, bør pladelayoutet ændres for at undgå sådanne effekter. F.eks. kan der anvendes et pladelayout, hvor der ses bort fra randbrønde.
30. Efter tilsætning af kemikalierne bør assaypladerne inkuberes i en 5 % CO₂-inkubator ved 37 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C i 20-24 timer for at fremkalde reporterproduktet.
31. Der skal tages særlige hensyn ved meget flygtige forbindelser. I sådanne tilfælde kan de tilstødende kontrolbrønde generere falsk positive resultater, og dette bør tages i betragtning i lyset af forventede og historiske kontrolværdier. I de få tilfælde, hvor der kan være bekymring for flygtighed, anbefales det at anvende pladeforseglere, som kan bidrage til effektivt at isolere individuelle brønde under testningen.

32. Der bør udføres gentagne endelige test for det samme kemikalie på forskellige dage for at sikre uafhængighed.

Luciferaseassay

33. Til assayet kan der anvendes et kommercielt luciferaseassayreagens [f.eks. Steady-Glo® Luciferase Assay System (Promega, E2510 eller tilsvarende)] eller et standard luciferaseassaysystem (f.eks. Promega, E1500 eller tilsvarende), så længe acceptkriterierne opfyldes. Assayreagenser bør vælges på grundlag af det anvendte luminometers følsomhed. Når der bruges et standardsystem til luciferaseassays, bør der anvendes et cellekulturlysisreagens (f.eks. Promega, E1531 eller tilsvarende), før mediet tilsættes. Luciferasereagenset bør anvendes efter producentens vejledning.

ANALYSE AF DATA

ER-agonistassay

34. For ved anvendelse af et ER-agonistassay at opnå den relative transkriptionsaktivitet for PC (1 nM af E2) kan luminescenssignalerne fra den samme plade analyseres i overensstemmelse med følgende trin (andre tilsvarende matematiske processer kan også accepteres):

Trin 1. Beregn middelværdien for VC.

Trin 2. Træk middelværdien af VC fra hver brøndværdi for at normalisere dataene.

Trin 3. Beregn gennemsnittet for den normaliserede PC.

Trin 4. Divider den normaliserede værdi af hver brønd på pladen med middelværdien af den normaliserede PC (PC=100 %).

Den endelige værdi for hver brønd er den relative transkriptionsaktivitet for den pågældende brønd sammenlignet med PC-responsen.

Trin 5. Beregn middelværdien af den relative transaktionsaktivitet for hver af testkemikaliets koncentrationsgrupper. Der er to dimensioner for responsen: den gennemsnitlige transkriptionsaktivitet (respons) og den koncentration, hvorved responsen opstår (se næste afsnit).

Overvejelser vedrørende EC₅₀-, PC₅₀ - og PC₁₀-induktion

35. Den fuldstændige koncentration/respons-kurve er nødvendig til beregning af EC₅₀, men dette er måske ikke altid muligt eller praktisk gennemførligt på grund af begrænsninger i testkoncentrationsområdet (f.eks. på grund af cytotoxicitets- eller opløselighedsproblemer). Da EC₅₀ og det maksimale induktionsniveau (svarende til den højeste værdi af Hill-ligningen) er informative parametre, bør disse parametre angives, hvor det er muligt. Til beregning af EC₅₀ og det maksimale induktionsniveau bør der anvendes egnet statistisk software (f. eks. det

statistiske software Graphpad Prism). Hvis Hills logistiske ligning skal anvendes på dataene om koncentrationsrespons, bør EC_{50} beregnes efter følgende ligning (7):

$$Y = \text{bund} + (\text{top} - \text{bund}) / (1 + 10^{\exp((\log EC_{50} - X) \times \text{Hills kurve}))}, \text{ hvor:}$$

X er logaritmen af koncentration, og

Y er responsen, og Y starter ved bunden og går til toppen i en sigmoidal kurve. Bunden er fastsat til nul i Hills logistiske ligning.

36. For hvert testkemikalie angives følgende:

RPC_{Max} , som er det maksimale responsniveau fremkaldt af et testkemikalie, udtrykt som en procentdel af den respons, som fremkaldes af 1 nM E2 på den samme plade, samt PC_{Max} (koncentration, der er forbundet med RPC_{Max}), og

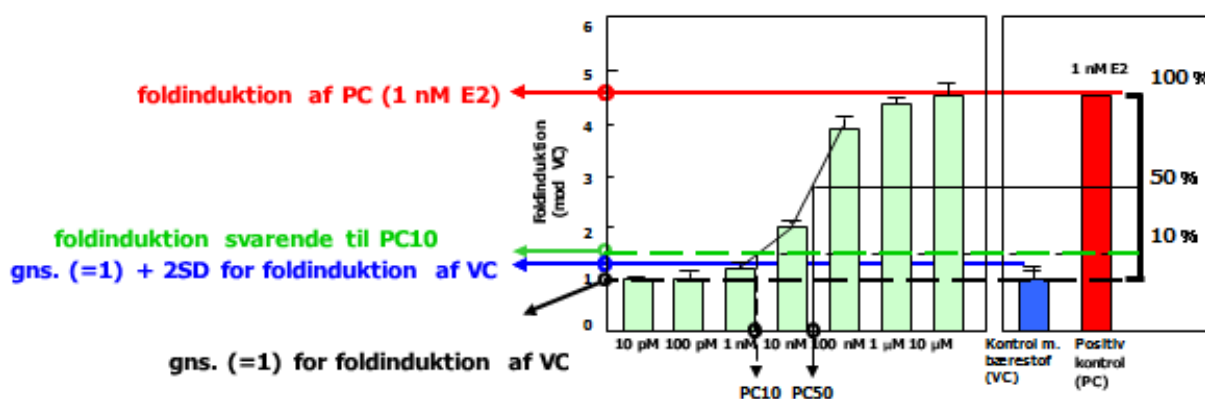
for positive kemikalier, de koncentrationer, der fremkalder PC_{10} og, hvis det er relevant, PC_{50} .

37. PCx -værdien kan beregnes ved at interpolere mellem to punkter i X-Y-koordinatsystemet, ét umiddelbart over og ét umiddelbart under en PCx -værdi. Når de datapunkter, der ligger umiddelbart over og under PCx -værdien, har koordinaterne henholdsvis (a,b) og (c,d), kan PCx -værdien beregnes ved hjælp af følgende ligning:

$$\log[PCx] = \log[c] + (x - d) / (d - b)$$

38. Beskrivelser af PC -værdierne er anført i figur 1 nedenfor.

Figur 1: Eksempel på, hvordan man udleder PC -værdier. PC (1 nM E2) tilføres på hver assayplade.



ER-antagonistassay

39. For ved anvendelse af et ER-antagonistassay at opnå den relative transkriptionsaktivitet (RTA) i forhold til den spikede kontrol (25 pM E2) kan luminescenssignalerne fra den samme plade analyseres i overensstemmelse med følgende trin (andre tilsvarende matematiske processer kan også accepteres):

Trin 1. Beregn middelværdien for VC.

Trin 2. Træk middelværdien af VC fra hver brøndværdi for at normalisere dataene. Trin 3. Beregn middelværdien for den normaliserede spikede kontrol.

Trin 4. Divider den normaliserede værdi af hver brønd på pladen med middelværdien af den normaliserede spikede kontrol (spiket kontrol=100 %).

Den endelige værdi af hver brønd er den relative transkriptionsaktivitet for den pågældende brønd sammenlignet med responsen i den spikede kontrol.

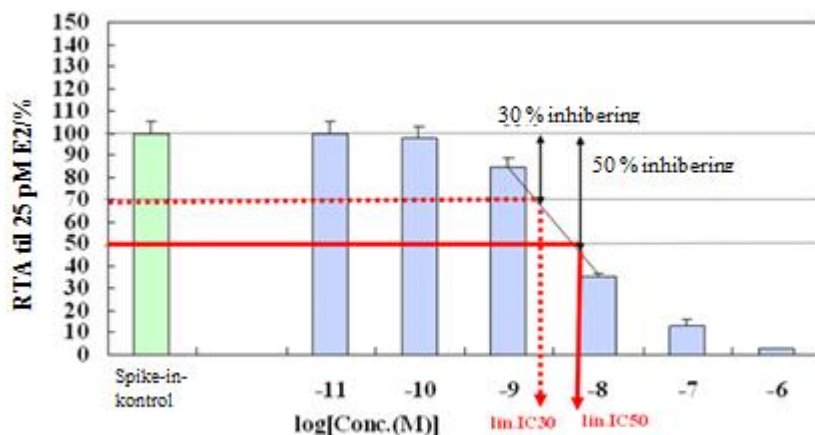
Trin 5. Beregn middelværdien af den relative transaktionsaktivitet for hver behandling.

Overvejelser vedrørende IC₃₀- og IC₅₀-induktion

40. For positive kemikalier angives de koncentrationer, der fremkalder IC₃₀ og, hvis det er relevant, IC₅₀.
41. IC_x-værdien kan beregnes ved at interpolere mellem to punkter i X-Y-koordinatsystemet, ét umiddelbart over og ét umiddelbart under en IC_x-værdi. Når de datapunkter, der ligger umiddelbart over og under IC_x-værdien, har koordinaterne henholdsvis (c,d) og (a,b), kan IC_x-værdien beregnes ved hjælp af følgende ligning:

$$\ln IC_x = a - (b - (100 - x)) (a - c) / (b - d)$$

Figur 2: Eksempel på udledning af IC-værdier. Den spikede kontrol (25 pM E2) tilføres på hver assayplade.



RTA: relativ transkriptionsaktivitet

42. Resultaterne bør baseres på to (eller tre) uafhængige analyseserier. Hvis to analyseserier giver sammenlignelige og derfor reproducerbare resultater, er det ikke nødvendigt at gennemføre en tredje analyseserie. For at resultaterne kan godkendes, skal de:

- opfylde acceptkriterierne (se Acceptkriterier, punkt 14-20)
- kunne reproducere.

Kriterier for datafortolkning

Tabel 7: Positive og negative beslutningskriterier i et ER-agonistassay

Positive	Hvis den opnåede RPC_{Max} er lig med eller overstiger 10 % af responsen for den positive kontrol i mindst af to eller to af tre analyseserier.
Negative	Hvis den opnåede RPC_{Max} ikke kommer op på mindst 10 % af responsen for den positive kontrol i to af to eller to af tre analyseserier.

Tabel 8: Positive og negative beslutningskriterier i et ER-antagonistassay

Positive	Hvis IC_{30} beregnes i mindst to af to eller to af tre analyseserier.
Negative	Hvis IC_{30} ikke beregnes i to af to eller to af tre analyseserier.

43. Kriterierne for datafortolkning fremgår af tabel 7 og 8. Positive resultater vil blive karakteriseret ved både effektens størrelsesorden og den koncentration, hvor effekten opstår. Når resultater udtrykkes som en koncentration, hvor 50 % (PC_{50}) eller 10 % (PC_{10}) af PC -værdierne nås for agonistassayet, og 50 % (IC_{50}) eller 30 % (IC_{30}) af den spikede kontrolværdi hæmmes for antagonistassayet, opfyldes begge disse mål. Et testkemikalie

bestemmes til at være positivt, hvis den maksimale respons, der fremkaldes af testkemikaliets (RPCMax), er lig med eller overstiger 10 % af responsen fra PC i mindst to af to eller to af tre analyseserier, mens et testkemikalie betragtes som negativt, hvis RPCMax ikke kommer op på mindst 10 % af responsen fra den positive kontrol i to af to eller to af tre analyseserier.

44. Beregningerne af PC₁₀, PC₅₀ og PC_{Max} i et ER-agonistassay og IC₃₀ og IC₅₀ i et ER-antagonistassay kan foretages ved hjælp af et regneark, der er tilgængeligt sammen med testvejledningen på OECD's offentlige websted¹.
45. Det bør være tilstrækkeligt at opnå PC₁₀- eller PC₅₀- og IC₃₀- eller IC₅₀-værdier mindst to gange. Skulle den deraf følgende basislinje for data i det samme koncentrationsområde udvise en variation med en uacceptabelt høj variationskoefficient (CV; %), kan dataene dog ikke anses for pålidelige, og årsagen til den høje variation bør afdækkes. CV af rådata fra tre forsøg (dvs. data om luminescensintensitet) for de datapunkter, som anvendes til beregning af PC₁₀, bør ligge under 20 %.
46. Hvis acceptkriterierne opfyldes, er det tegn på, at assaysystemet fungerer korrekt, men det er ingen garanti for, at en given analyseserie vil producere nøjagtige data. Kan resultaterne af den første analyseserie gentages, er det den bedste garanti for, at der blev produceret nøjagtige data.
47. Ved et ER-agonistassay, hvor der er behov for flere oplysninger end dem, der skal bruges til screening og prioritering til denne testvejledning for positive testkemikalier, især for PC10-PC49-kemikalier samt kemikalier, der er mistænkt for at overstimulere luciferase, kan det bekræftes, at den observerede luciferaseaktivitet udelukkende er en ER α -specifik respons, der anvender en ER α -antagonist (se tillæg 2.1).

TESTRAPPORT

48. Jf. punkt 20 i "ER TA-ASSAYETS KOMPONENTER".

¹ <http://www.oecd.org/env/testguidelines>

LITTERATUR

- (1) OECD (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 225), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (2) Escande A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol.*, 71, 1459-1469.
- (3) Kuiper G.G., *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, *Endocrinol.*, 139, 4252-4263.
- (4) Spaepen M., *et al.* (1992). Detection of Bacterial and Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Polymerase Chain Reaction, *FEMS Microbiol. Lett.*, 78(1), 89-94.
- (5) Kobayashi H., *et al.* (1995). Rapid Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Enzymatic Detection of Polymerase Chain Reaction (PCR) Products, *J. Vet. Med. Sci.*, 57(4), 769-71.
- (6) Dussurget O. og Roulland-Dussoix D. (1994). Rapid, Sensitive PCR-Based Detection of Mycoplasmas in Simulated Samples of Animal Sera, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(3), 953-9.
- (7) De Lean A., Munson P.J. og Rodbard D. (1978). Simultaneous Analysis of Families of Sigmoidal Curves: Application to Bioassay, Radioligand Assay, and Physiological Dose-Response Curves, *Am. J. Physiol.*, 235, E97-E102.

Tillæg 2.1

FALSK POSITIVE RESULTATER: VURDERING AF IKKE-RECEPTORMEDIEREDE LUMINESCENSSIGNALER

1. Falsk positive fund i ER-agonistassayet kan være genereret af ikke-ER-medieret aktivering af luciferasegenet eller direkte aktivering af genproduktet eller urelateret fluorescens. Sådanne virkninger angives ved en ufuldstændig eller usædvanlig dosis/respons-kurve. Hvis der er mistanke om sådanne virkninger, bør det undersøges, hvordan en ER-antagonist (f.eks. 4-hydroxytamoxifen (OHT) ved en ikke-toksisk koncentration) påvirker responsen. Den rene antagonist ICI 182780 er måske ikke egnet til dette formål, da en tilstrækkelig koncentration af ICI 182780 kan sænke VC-værdien, og dette vil påvirke dataanalysen.
2. For at sikre validiteten af denne tilgang skal følgende testes på den samme plade:
 - det ukendte kemikalies agonistiske aktivitet med/uden 10 μ M OHT
 - VC (in triplo)
 - OHT (in triplo)
 - 1 nM E2 (in triplo) som agonist-PC
 - 1 nM E2 + OHT (in triplo)

Kriterier for datafortolkning

Bemærk: Alle brønde bør behandles med den samme koncentration af bærestoffet.

- Såfremt det ukendte kemikalies agonistaktivitet IKKE påvirkes af behandlingen med ER-antagonist, klassificeres det som "negativt".
- Såfremt det ukendte kemikalies agonistaktivitet hæmmes fuldstændigt, anvendes beslutningskriterierne.
- Såfremt agonistaktiviteten ved den laveste koncentration svarer til eller overstiger PC₁₀-responsen, er det ukendte kemikalie hæmmet i en grad, der svarer til eller overstiger PC₁₀-responsen. Forskellen i respons mellem de brønde, der er behandlet, og de brønde, der ikke er behandlet med ER-antagonist, beregnes, og denne forskel anses for at være den korrekte respons og bør anvendes til beregning af de rette parametre, som gør det muligt at træffe en klassificeringsafgørelse.

Dataanalyse

Kontrollér standarden for ydeevne.

Kontrollér CV mellem brønde, som er behandlet under de samme betingelser.

1. Beregn gennemsnittet af VC.
2. Fratræk gennemsnittet af VC fra værdien af hver brønd, som **ikke** er behandlet med OHT.
3. Beregn gennemsnittet af OHT.
4. Fratræk gennemsnittet af VC fra værdien af hver brønd, som er behandlet med OHT.
5. Beregn gennemsnittet af PC.
6. Beregn den relative transkriptionsaktivitet for alle øvrige brønde i forhold til PC.

Tillæg 2.2

FREMSTILLING AF SERUM BEHANDLET MED DEXTRANOVERTRUKKET TRÆKUL (DCC)

1. Behandlingen af serum med dextranovertrukket trækul (DCC) er en almindelig metode til at fjerne østrogenforbindelser fra serum, som tilsættes cellemedium for at udelukke den afvigende respons, som er knyttet til resterende østrogen i serum. 500 ml føtalt kalveserum (FBS) kan behandles efter denne fremgangsmåde.

Komponenter

2. Der kræves følgende materialer og udstyr:

Materialer

aktivt kul

dextran

magnesiumchloridhexahydrat ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)

saccharose

1 M HEPES-bufferopløsning (pH 7,4)

ultrarent vand filtreret gennem et filtersystem

Udstyr

autoklaveret glasbeholder (størrelsen bør eventuelt tilpasses)
almindelig laboratoriecentrifuge (hvor temperaturen kan sættes til 4 °C)

Fremgangsmåde

3. Den følgende fremgangsmåde er tilpasset til anvendelse af 50 ml centrifugerør:

[Dag 1] Fremstil dextranovertrukket kulsuspension med 1 l ultrarent vand indeholdende 1,5 mM MgCl_2 , 0,25 M saccharose, 2,5 g trækul, 0,25 g dextran og 5 mM HEPES, og omrør ved 4 °C natten over.

[Dag 2] Dispensér suspensionen i 50 ml centrifugerør, og centrifuger ved 10 000 o/min. ved 4 °C i 10 minutter. Fjern supernatanten, og opbevar halvdelen af kulsedimentet ved 4 °C til anvendelse på dag 3. Suspendér den anden halvdel af kullet med FBS, der er blevet optøet forsigtigt for at undgå bundfald og varmeinaktiveret ved 56 °C i 30 minutter, og overfør herefter til en autoklaveret glasbeholder som f.eks. en Erlenmeyerkolbe. Omrør denne suspension forsigtigt ved 4 °C natten over.

[Dag 3] Dispensér suspensionen med FBS i centrifugerør, og centrifuger med 10 000 o/min. ved 4 °C i 10 minutter. Indsaml FBS, og overfør til det nye kulsediment, der blev fremstillet og opbevaret på dag 2. Suspendér kulsedimentet, og omrør denne suspension forsigtigt i en autoklaveret glasbeholder ved 4 °C natten over.

[Dag 4] Dispensér suspensionen til centrifugering ved 10 000 o/min. ved 4 °C i 10 minutter, og sterilisér supernatanten ved filtrering gennem et 0,2 µm sterilt filter. Denne DCC-behandlede FBS bør opbevares ved -20 °C og kan bruges i op til et år.

TILLÆG 3

VM7LUC-ØSTROGENRECEPTOR-TRANSAKTIVERINGSASSAY TIL PÅVISNING AF ØSTROGENRECEPTORAGONISTER OG -ANTAGONISTER.

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER (JF. OGSÅ GENEREL INDLEDNING)

1. Dette assay anvender VM7Luc4E2-cellelinjen¹. Det er blevet valideret af National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM) og Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) (1). VM7Luc-cellelinjer angiver overvejende endogen ER α og en mindre mængde endogen ER β (2) (3) (4).
2. Dette assay kan finde anvendelse på en lang række stoffer, forudsat at de kan opløses i dimethylsulfoxid (DMSO, CASRN 67-68-5), ikke reagerer med DMSO eller celledyrkningsmediet og ikke er cytotoxiske ved de testede koncentrationer. Hvis anvendelse af DMSO ikke er mulig, kan der anvendes et andet bærestof som ethanol eller vand (jf. punkt 12). Den påviste ydeevne for VM7Luc ER TA-(ant)agonistassayet tyder på, at de data, der genereres med dette assay, kan give oplysninger om ER-medierede virkningsmekanismer og kan tages i betragtning til prioritering af stoffer til yderligere test.
3. Dette assay er specifikt udformet til at påvise hER- og hER β -medieret TA ved at måle kemiluminescens som effektparameter. Anvendelsen af kemiluminescens i bioassays er udbredt, fordi luminescens har et højt forhold mellem signal og baggrund (10). Aktiviteten som følge af ildflueluciferase i cellebaserede assays kan imidlertid forveksles med stoffer, der hæmmer luciferaseenzymet og forårsage både tilsyneladende hæmning og øget luminescens på grund af proteinstabilisering (10). I nogle luciferasebaserede ER-reportergenassays er der endvidere rapporteret om ikke-receptormedierede

¹ Før juni 2016 blev denne cellelinje betegnet som BG1Luc-cellelinje. BG-1-celler blev oprindeligt beskrevet af Geisinger m.fl. (1998) (12) og blev senere karakteriseret af forskere ved National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) (13). For relativt kort tid siden opdagede man, at der findes to varianter af BG-1-celler, som anvendes af forskere, BG-1 Fr og BG-1 NIEHS. Tilbundsående analyser, herunder DNA-test af disse to BG-1-variantcellelinjer udført af Li og medarbejdere (2014) (14), viste, at BG-1 Fr var unik, og at BG-1 NIEHS, dvs. den oprindelige cellelinje, der blev anvendt til at udvikle assayet, ikke var den humane BG1-ovariecarcinomcellelinje, men i stedet var en variant af den humane MCF7-brystcancercellelinje. Den cellelinje, som anvendes i assayet, og som oprindeligt blev kaldt BG1Luc4E2 (15), vil nu blive betegnet VM7Luc4E2 ("V" = variant, "M7" = MCF7-celler). På samme måde vil assayet nu blive betegnet VM7Luc ER TA. Selv om dette ændrer oprindelsen af den cellelinje, assayet bygger på, påvirker det ikke offentliggjorte valideringsundersøgelser eller nytteværdien og anvendeligheden af dette assay til screening af østrogene/antiøstrogene kemikalier.

luminescenssignaler ved højere phytoøstrogenkoncentrationer end 1 µM på grund af overaktivering af luciferasereportergenet (9) (11). Mens dosis/respons-kurven tyder på, at der sker en egentlig aktivering af ER-systemet ved lavere koncentrationer, skal den luciferaseekspression, som er opnået ved høje koncentrationer af phytoøstrogener eller lignende kemiske forbindelser, der mistænkes for at forårsage phytoøstrogenlignende overaktivering af luciferasereportergenet, undersøges nøje i stabilt transfekterede ER TA-assayssystemer (see Appendix 2).

4. Afsnittene "GENEREL INDLEDNING" og "ER TA-ASSAYETS KOMPONENTER" bør læses, før dette assay benyttes til lovmæssige formål. Definitioner og forkortelser brugt i denne forsøgsmetode er beskrevet i tillæg 1.

PRINCIP FOR ASSAYET (SE OGSÅ GENEREL INDLEDNING)

5. Assayet benyttes til at angive ER-ligandbinding efterfulgt af kromosomtranslokation af receptorligandkomplekset til kernen. I kernen binder receptorligandkomplekset til specifikke DNA-responselementer og transaktiverer reportergenet (*luc*), hvorved der fremkommer luciferase og den efterfølgende udsendelse af lys, som kan kvantificeres ved hjælp af et luminometer. Luciferaseaktivitet kan vurderes hurtigt og billigt med forskellige typer testkit, der kan fås i handelen. VM7Luc ER TA anvender en ER-responsiv human brystadenocarcinomcellelinje, VM7, som er blevet stabilt transfekteret med en ildflue-*luc*-reporterkonstruktion under kontrol af fire østrogenresponselementer anbragt oven for mamatumorviruspromoterens i mus (MMTV) for at opspore stoffer med in vitro-ER-agonistaktivitet eller -antagonistaktivitet. Denne MMTV-promoter udviser kun mindre krydsreaktivitet med andre steroide og ikke-steroide hormoner (8). Kriterier for datafortolkning er nærmere beskrevet i punkt 41. Kort beskrevet identificeres en positiv respons ved en koncentration/respons-kurve, som indeholder mindst tre punkter med ikke-overlappende fejltærskler (gennemsnit ± standardafvigelse) samt en ændring i amplitude (normaliseret relativ lysenhed [RLU]) på mindst 20 % af den maksimale værdi for referencestandardens (17β-østradiol [E2, CASRN 50-28-2] for agonistassayet, raloxifen HCl [Ral, CASRN 84449-90-1]/E2 for antagonistassayet).

FREMGANGSMÅDE

Cellelinje

6. Den stabilt transfekterede VM7Luc4E2-cellelinje bør anvendes til assayet. Cellelinjen er i øjeblikket kun tilgængelig med en teknisk licensaftale fra University of California, Davis, Californien, USA¹, og fra Xenobiotic Detection Systems Inc., Durham, North Carolina, USA².

Cellelinjens stabilitet

7. For at opretholde cellelinjens stabilitet og integritet bør cellerne dyrkes i mere end én generation fra den nedfrosne beholdning i celleopbevaringsmedium (jf. punkt 9). Celler bør ikke dyrkes i mere end 30 generationer. For VM7Luc4E2-cellelinjen vil 30 generationer være ca. tre måneder.

Celledyrknings- og udpladningsbetingelser

8. De procedurer, der er anført i Guidance on Good Cell Culture Practice (5) (6), bør følges for at sikre kvaliteten af alle materialer og metoder med henblik på at bevare integriteten, validiteten og reproducerbarheden af det arbejde, der udføres.
9. VM7Luc4E2-celler opbevares i RPMI 1640-medium suppleret med 0,9 % Pen-Strep og 8,0 % føtalt kalveserum (FBS) i en dedikeret vævsvyrkningsinkubator ved 37 ± 1 °C, $90 \% \pm 5 \%$ fugtighed og $5,0 \% \pm 1 \%$ CO₂/luft.
10. Når VM7Luc4E2-cellerne når op på ~80 % konfluens, bliver de dyrket i subkultur og konditioneres til et østrogenfrit miljø i 48 timer, før cellerne udplades i plader med 96 brønde til eksponering for testkemikalier og analyse af østrogenafhængig induktion af luciferaseaktivitet. Det østrogenfrie medium (EFM) Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM) uden fenolrød suppleret med 4,5 % kul-/dextranbehandlet FBS, 1,9 % L-glutamin og 0,9 % Pen-Strep. Alt plastikudstyr skal være fri for østrogenaktivitet [se detaljeret protokol (7)].

Acceptkriterier

11. Godkendelse eller forkastelse af en test er baseret på vurdering af referencestandard og kontrolresultater fra hvert enkelt forsøg, der udføres på en plade med 96 brønde. Hver referencestandard testes i mange koncentrationer, og der er mange prøver af hver reference-

¹ Michael S. Denison, Ph.D. Professor, Dept. of Environmental Toxicology, 4241 Meyer Hall, One Shields Ave, University of California, Davis, CA 95616, E: msdenison@ucdavis.edu, (530) 754-8649.

² Xenobiotic Detection Systems Inc. 1601 East Geer Street, Suite S, Durham NC, 27704 USA, e-mail: info@dioxins.com, telefon: +1 919-688-4804, fax: +1 919-688-4404.

og kontrolkoncentration. Resultaterne sammenlignes med kvalitetskontroller for de parametre, der er udledt af historiske agonist- og antagonistdatabaser, og som hvert laboratorium har genereret under påvisningen af laboratoriets kompetence. De historiske databaser ajourføres løbende med referencestandard og kontrolværdier. Ændringer i udstyr eller laboratoriebetingelser kan gøre det nødvendigt at generere ajourførte historiske databaser.

Agonisttest

Test til bestemmelse af dosisinterval

- Induktion: Pladeinduktion bør måles ved at dividere den gennemsnitligt højeste E2-referencestandard for relativ lysenhedsværdi (RLU) med den gennemsnitlige RLU-værdi for DMSO-kontrollen. Der opnås normalt fem fold induktion, men med henblik på godkendelse bør induktionen være større end eller lig med fire fold.
- DMSO-kontrolresultater: RLU-værdierne for kontrolkulturen med opløsningsmiddel bør ligge inden for 2,5 gange standardafvigelsen for den historiske kontrolkultur med opløsningsmiddel for den gennemsnitlige RLU-værdi.
- Forsøg, der ikke opfylder nogen af acceptkriterierne, bør kasseres og gentages.

Omfattende test

Den omfatter acceptkriterier fra testen til bestemmelse af agonist-dosisinterval og følgende:

- Referencestandardresultater: Referencestandarden for koncentration/respons-kurven for ER2 bør være sigmoidal i form og have mindst tre værdier inden for den lineære del af koncentration/respons-kurven.
- Positive kontrolresultater: RLU-værdierne for methoxychlorkontrollen bør være større end gennemsnittet for DMSO plus tre gange standardafvigelsen fra gennemsnittet for DMSO.
- Forsøg, der ikke opfylder et eneste acceptkriterium, bør kasseres og gentages.

Antagonisttest

Test til bestemmelse af dosisinterval

- Reduktion: Pladereduktion måles ved at dividere den gennemsnitligt højeste RLU-værdi for Ral/E2-referencestandard med den gennemsnitlige RLU-værdi for DMSO-kontrollen. Der opnås normalt fem fold reduktion, men med henblik på godkendelse bør reduktionen være større end eller lig med tre fold.
- E2-kontrolresultater: RLU-værdierne for E2-kontrollen bør ligge inden for 2,5 gange standardafvigelsen for den historiske gennemsnitlige RLU-værdi for E2-kontrollen.
- DMSO-kontrolresultater: RLU-værdierne for DMSO-kontrollen bør ligge inden for 2,5 gange standardafvigelsen for den historiske gennemsnitlige RLU-værdi for kontrolkulturen med opløsningsmiddel.
- Forsøg, der ikke opfylder et eneste acceptkriterium, kasseres og gentages.

Omfattende test

Den omfatter acceptkriterier fra testen til bestemmelse af antagonist-dosisinterval og følgende:

- Referencestandardresultater: Koncentration/respons-kurven for referencestandarden for Ral/E2 bør være sigmoidal i form og have mindst tre værdier inden for den lineære del af koncentration/respons-kurven.
- Positive kontrolresultater: RLU-værdier for tamoxifen/E2-kontrollen bør ligge under den gennemsnitlige E2-kontrol minus tre gange standardafvigelsen fra gennemsnittet for E2-kontrollen.
- Forsøg, der ikke opfylder et eneste acceptkriterium, kasseres og gentages.

Referencestandarder, positive kontroller og bærestofkontroller

Bærestofkontrol (agonist- og antagonistassays)

12. Det bærestof, der anvendes til at opløse testkemikalierne, bør testes som en bærestofkontrol. Det bærestof, der blev anvendt under valideringen af VM7Luc ER TA-assayet, var 1 % (v/v) dimethylsulfoxid (DMSO, CASRN 67-68-5) (jf. punkt 24). Hvis der anvendes et andet bærestof end DMSO, testes alle referencestandarder, kontroller og testkemikalier i det samme bærestof, hvis det er relevant.

Referencestandard (bestemmelse af agonist-dosisinterval)

13. Referencestandarden er E2 (CASRN 50-28-2). Til testen til bestemmelse af dosisinterval består referencestandarden af en seriel fortynding af fire koncentrationer af E2 ($1,84 \times 10^{-10}$, $4,59 \times 10^{-11}$, $1,15 \times 10^{-11}$ og $2,87 \times 10^{-12}$ M), idet hver koncentration testes i to brønde.

Referencestandard (agonist omfattende)

14. E2 til omfattende testning består af en seriel 1:2-fortynding bestående af 11 koncentrationer (fra $3,67 \times 10^{-10}$ til $3,59 \times 10^{-13}$ M) E2 i to brønde.

Referencestandard (bestemmelse af antagonist-dosisinterval)

15. Referencestandarden er en kombination af Ral (CASRN 84449-90-1) og E2 (CASRN 50-28-2). Ral/E2 til testen til bestemmelse af dosisinterval består af en seriel fortynding af tre koncentrationer af Ral ($3,06 \times 10^{-9}$, $7,67 \times 10^{-10}$ og $1,92 \times 10^{-10}$ M) plus en fast koncentration ($9,18 \times 10^{-11}$ M) af E2 i to brønde.

Referencestandard (antagonist omfattende)

16. Ral/E2 til omfattende testning består af en seriel 1:2-fortynding af Ral (fra $2,45 \times 10^{-8}$ til $9,57 \times 10^{-11}$ M) plus en fast koncentration ($9,18 \times 10^{-11}$ M) E2 bestående af ni koncentrationer af Ral/E2 i to brønde.

Svagt positiv kontrol (agonist)

17. Den svagt positive kontrol er $9,06 \times 10^{-6}$ M *p,p'*-methoxychlor (methoxychlor; CASRN 72-43-5) i EFM.

Svagt positiv kontrol (antagonist)

18. Den svagt positive kontrol består af tamoxifen (CASRN 10540-29-1) $3,36 \times 10^{-6}$ M med $9,18 \times 10^{-11}$ M E2 i EFM.

E2-kontrol (antagonistassay alene)

19. E2-kontrol er $9,18 \times 10^{-11}$ M E2 i EFM og anvendt som en negativ grundkontrol.

Foldinduktion (agonist)

20. Induktionen af luciferaseaktivitet i referencestandarden (E2) måles ved at dividere den gennemsnitlige højeste E2-referencestandardværdi for RLU med den gennemsnitlige DMSO-kontrolværdi for RLU, og resultatet bør være større end fire fold.

Foldreduktion (antagonist)

21. Den gennemsnitlige luciferaseaktivitet for referencestandarden (Ral/E2) måles ved at dividere den gennemsnitlige højeste RLU-værdi for Ral/E2-referencestandarden med den gennemsnitlige RLU-værdi for DMSO-kontrollen, som bør være større end tre fold.

Påvisning af laboratoriets kompetence (jf. punkt 14 og tabel 3 og 4 i "ER TA-ASSAYETS KOMPONENTER" for denne forsøgsmetode)

Bærestof

22. Testkemikalier bør opløses i et opløsningsmiddel, som opløser testkemikaliets og kan blandes med cellemidiet. Vand, ethanol (95-100 % renhed) og DMSO er egnede bærestoffer. Hvis der anvendes DMSO, bør niveauet ikke overstige 1 % (v/v). For ethvert bærestof bør det påvises, at den maksimalt anvendte mængde ikke er cytotoxisk og ikke indvirker på assayets ydeevne. Referencestandarde og kontroller opløses i 100 % opløsningsmiddel og fortyndes herefter ned til passende koncentrationer i EFM.

Præparering af testkemikalier

23. Testkemikalier opløses i 100 % DMSO (eller et passende opløsningsmiddel) og fortyndes herefter ned til passende koncentrationer i EFM. Lad alle testkemikalier ækvilibrere til stuetemperatur, før de opløses og fortyndes. Testkemikalieopløsninger fremstilles frisk til hvert forsøg. Opløsningerne bør ikke have udtalt bundfald eller uklarhed. Lagre af referencestandarde og kontroller kan fremstilles i større mængder; dog bør den endelige referencestandard, kontrolfortyndinger og testkemikalier fremstilles frisk til hvert forsøg og anvendes inden for 24 timer efter fremstillingen.

Oploselighed og cytotoxisk effekt: Overvejelser vedrørende bestemmelse af dosisinterval

24. Test til bestemmelse af dosisinterval består af syv seriefortyndinger i forholdet 1:10 (dobbelbestemmelse). Indledningsvis testes testkemikalierne op til højeste koncentration på 1 mg/ml (~1 mM) til agonisttest og 20 µg/ml (~10 µM) til antagonisttest. Forsøg til bestemmelse af dosisinterval benyttes til at fastlægge følgende:
- testkemikaliet's startkoncentrationer, der anvendes under omfattende testning
 - testkemikaliefortyndinger (1:2 eller 1:5), der anvendes under omfattende testning
25. En vurdering af cellernes levedygtighed/cytotoksiske effekt er inkluderet i protokollerne for agonist- og antagonistassays (7) og er indarbejdet i test til bestemmelse af dosisinterval og omfattende test. Den cytotoxicitetsmetode, som blev benyttet til at vurdere cellernes levedygtighed under valideringen af VM7Luc ER TA (1), var en skaleret kvalitativ, visuel observationsmetode; der kan dog benyttes en kvantitativ metode til bestemmelse af den cytotoksiske effekt (jf. protokollen (7)). Data fra testkemikaliekoncentrationer, der forårsager over 20 % reduktion i levedygtighed, kan ikke anvendes.

Eksponering for testkemikaliet og organisering af assaypladen

26. Celler tælles og udplades i vævsdykningsplader med 96 brønde (2 x 10⁵ celler pr. brønd) i EFM og inkuberes i 24 timer, så cellerne kan binde sig til pladen. EFM fjernes og erstattes med test- og referencekemikalier i EFM og inkuberes i 19-24 timer. Der skal tages særlige hensyn til meget flygtige stoffer, da tilstødende kontrolbrønde kan generere falsk positive resultater. I sådanne tilfælde anbefales "pladeforseglere", der kan bidrage til effektivt at isolere individuelle brønde under testningen.

Test til bestemmelse af dosisinterval

27. Ved bestemmelse af dosisinterval benyttes alle brønde i en plade med 96 brønde til at teste op til seks testkemikalier som syv seriefortyndinger i forholdet 1:10 (dobbelbestemmelse) (jf. figur 1 og 2).
- Ved test til bestemmelse af *agonist*-dosisinterval anvendes fire koncentrationer af E2 (dobbelbestemmelse) som referencestandard og fire replikatbrønde til DMSO-kontrollen.
 - Ved test til bestemmelse af *antagonist*-dosisinterval anvendes tre koncentrationer af Ral/E2 med $9,18 \times 10^{-11}$ M E2 (dobbelbestemmelse) som referencestandard med tre replikatbrønde til E2- og DMSO-kontrollen.

Figur 1: Layout for en testplade med 96 brønde til bestemmelse af agonist-dosisinterval

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	VC	VC	VC	VC	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4

Forkortelser: E2-1 til E2-4 = koncentrationer af E2-referencestandard (fra høj til lav); TC1-1 til TC1-7 = koncentrationer (fra høj til lav) af testkemikalie 1 (TC1); TC2-1 til TC2-7 = koncentrationer (fra høj til lav) af testkemikalie 2 (TC2); TC3-1 til TC3-7 = koncentrationer (fra høj til lav) af testkemikalie 3 (TC3); TC4-1 til TC4-7 = koncentrationer (fra høj til lav) af testkemikalie 4 (TC4); TC5-1 til TC5-7 = koncentrationer (fra høj til lav) af testkemikalie 5 (TC5); TC6-1 til TC6-7 = koncentrationer (fra høj til lav) af testkemikalie 6 (TC6); VC = bærestofkontrol (DMSO [1 % (v/v) EFM.]).

Figur 2: Layout for en testplade med 96 brønde til bestemmelse af antagonist-dosisinterval

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	VC	VC	VC	E2	E2	E2	Ral-1	Ral-2	Ral-3

Forkortelser: E2 = E2-kontrol; Ral-1 til Ral-3 = koncentrationer af Raloxifen/E2-referencestandard (fra høj til lav); TC1-1 til TC1-7 = koncentrationer (fra høj til lav) af testkemikalie 1 (TC1); TC2-1 til TC2-7 = koncentrationer (fra høj til lav) af testkemikalie 2 (TC2); TC3-1 til TC3-7 = koncentrationer (fra høj til lav) af testkemikalie 3 (TC3); TC4-1 til TC4-7 = koncentrationer (fra høj til lav) af testkemikalie 4 (TC4); TC5-1 til TC5-7 = koncentrationer (fra høj til lav) af testkemikalie 5 (TC5); TC6-1 til TC6-7 = koncentrationer (fra høj til lav) af testkemikalie 6 (TC6); VC = bærestofkontrol (DMSO [1 % (v/v) EFM.]).

Bemærk: Alle testkemikalier testes med $9,18 \times 10^{-11}$ M E2.

28. Den anbefalede endelige mængde medium, der kræves til hver brønd, er 200 µl. Brug kun testplader, hvor cellerne i alle brønde giver en levedygtighed på 80 % og derover.

29. Bestemmelse af startkoncentrationer til omfattende **agonist**-testning er indgående beskrevet i agonistprotokollen (7). Kort forklaret anvendes følgende kriterier:

- Hvis ingen punkter på testkemikaliets koncentrationskurve ligger over middel plus tre gange DMSO-kontrollens standardafvigelse, udføres der omfattende testning under anvendelse af 11 seriefortyndinger i forholdet 1:2 begyndende ved den maksimale opløselige koncentration.
- Hvis ingen punkter på testkemikaliets koncentrationskurve ligger over middel plus tre gange DMSO-kontrollens standardafvigelse, bør den startkoncentration, der skal anvendes i 11-punktsplanen for fortynding ved omfattende testning, være en log højere end den koncentration, som giver den højeste justerede RLU-værdi i bestemmelsen af dosisinterval. 11-punktsplanen for fortynding er baseret på fortyndinger i forholdet 1:2 eller 1:5 efter følgende kriterier:

Der bør anvendes 11 seriefortyndinger i forholdet 1:2, hvis det deraf følgende koncentrationsområde vil omfatte hele responsområdet baseret på den koncentration/respons-kurve, der genereres i testen til bestemmelse af dosisinterval. Ellers bruges en 1:5-fortynding.

- Hvis et testkemikalie udviser en bifasisk koncentration/respons-kurve i testen til bestemmelse af dosisinterval, opløses begge faser også i omfattende testning.

30. Bestemmelse af startkoncentrationer til omfattende **antagonist**-testning er indgående beskrevet i antagonistprotokollen (7). Kort forklaret anvendes følgende kriterier:

- Hvis ingen punkter på testkemikaliets koncentrationskurve ligger under middel minus tre gange standardafvigelsen for E2, udføres der som kontrol en omfattende testning under anvendelse af 11 seriefortyndinger i forholdet 1:2 begyndende ved den maksimale opløselige koncentration.
- Hvis ingen punkter på testkemikaliets koncentrationskurve ligger under middel minus tre gange E2-kontrollens standardafvigelse, bør den startkoncentration, der skal anvendes i 11-punktsplanen for fortynding ved omfattende testning, være en af følgende:
 - den koncentration, der giver den laveste justerede RLU-værdi ved bestemmelsen af dosisinterval
 - den maksimale opløselige koncentration (jf. antagonistprotokollen (7), figur 14-2)
 - den laveste cytotoksiske koncentration (jf. antagonistprotokollen (7), figur 14-3 for et beslægtet eksempel).
- 11-punktsplanen for fortynding er baseret på enten en seriefortynding i forholdet 1:2 eller 1:5 efter følgende kriterier:

Der bør anvendes 11 seriefortyndinger i forholdet 1:2, hvis det deraf følgende koncentrationsområde vil omfatte hele responsområdet baseret på den koncentration/responskurve, der genereres i testen til bestemmelse af dosisinterval. Ellers anvendes en 1:5-fortynding.

Omfattende test

31. Omfattende testning består af 11 seriefortyndinger (seriefortyndinger i forholdet 1:2 eller 1:5 baseret på startkoncentrationer for omfattende testkriterier), idet hver koncentration testes i tredobbelte brønde på pladen med 96 brønde (jf. figur 3 og 4).
- Ved omfattende *agonist*-testning anvendes 11 koncentrationer af E2 (dobbelbestemmelse) som referencestandard. Fire replikatbrønde til DMSO-kontrol og fire replikatbrønde til methoxychlor-kontrol ($9,06 \times 10^{-6}$ M) medtages på hver plade.
 - Ved omfattende *antagonist*-testning anvendes ni koncentrationer af Ral/E2 med $9,18 \times 10^{-11}$ M E2 (dobbelbestemmelse) som referencestandard med fire replikatbrønde til E2 $9,18 \times 10^{-11}$ M kontrol, fire replikatbrønde til DMSO-kontrol og fire replikatbrønde til tamoxifen $3,36 \times 10^{-6}$ M.

Figur 3: Layout for en testplade med 96 brønde til omfattende agonisttest

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Meth
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Meth
G	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Meth
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Meth

Forkortelser: TC1-1 til TC1-11 = koncentrationer (fra høj til lav) af testkemikalie 1; TC2-1 til TC2-11 = koncentrationer (fra høj til lav) af testkemikalie 2; E2-1 til E2-11 = koncentrationer af E2-referencestandard (fra høj til lav); Meth = p,p'-methoxychlor svagt positiv kontrol; VC = bærestofkontrol (DMSO, 1 % (v/v) EFM).

Figur 4: Layout for en plade med 96 brønde til omfattende agonisttest

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
G	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam

Forkortelser: E2 = E2-kontrol; Ral-1 til Ral-9 = koncentrationer af raloxifen/E2-referencestandard (fra høj til lav); Tam = tamoxifen/E2 svagt positiv kontrol; TC1-1 til TC1-11 = koncentrationer (fra høj til lav) af testkemikalie 1 (TC1); TC2-1 til TC2-11 = koncentrationer (fra høj til lav) af testkemikalie 2 (TC2); VC = bærestofkontrol (DMSO [1 % (v/v) EFM.]).

Bemærk: Som anført indeholder alle reference- og testbrønde en fast koncentration af E2 ($9,18 \times 10^{-11}$ M)

32. Gentagne omfattende test for det samme kemikalie udføres på forskellige dage for at sikre uafhængighed. Der bør foretages mindst to omfattende test. Hvis testresultaterne modsiger hinanden (f.eks. én test er positiv, den anden er negativ), eller hvis én af testene er utilstrækkelig, udføres der en tredje supplerende test.

Måling af luminescens

33. Luminescens måles i området 300-650 nm ved hjælp af et injektionsluminometer og med software, som kontrollerer injektionsvolumen og måleinterval (7). Lysemission fra hver brønd angives som RLU pr. brønd.

ANALYSE AF DATA

Bestemmelse af EC₅₀ /IC₅₀

34. EC₅₀-værdien (halvdelen af den maksimale effektive koncentration af et testkemikalie [agonister]) og IC₅₀-værdien (halvdelen af den maksimale inhiberende koncentration af et testkemikalie [antagonister]) bestemmes ud fra koncentration/respons-data. For testkemikalier, der er positive ved en eller flere koncentrationer, beregnes den koncentration af testkemikaliets, som forårsager en respons på halvdelen af det maksimale (IC₅₀ eller EC₅₀) ved hjælp af en Hill-funktionsanalyse eller et passende alternativ. Hill-funktionen er en logistisk matematisk model med fire parametre, som knytter testkemikaliekoncentrationen til responsen (typisk efter en sigmoidal kurve) ved hjælp af nedenstående ligning:

$$Y = Bund + \frac{(Top - Bund)}{1 + 10^{(logEC_{50} - X)Hills\ kurve}}$$

hvor:

Y = respons (dvs RLU'er)

X = logaritmen af koncentrationen

Bund = minimumrespons

Top = maksimumrespons

lg EC₅₀ (eller lg IC₅₀) = logaritmen af X som responsen midtvejs mellem top og bund

Hills kurve = kurvens stejlhed.

Modellen beregner den bedste tilpasning for parametrene top, bund, Hills kurve samt IC₅₀ og EC₅₀. Til beregning af EC₅₀ og IC₅₀-værdier bør der anvendes passende statistisk software (f.eks. Graphpad Prism^R).

Bestemmelse af afvigende værdier (outliers)

35. En god statistisk bedømmelse kan lettes ved at medtage (men ikke nøjes med) Q-testen (jf. agonist- og antagonistprotokollerne (7) til bestemmelse af "ubrugelige" brønde, som vil blive udelukket fra dataanalysen.
36. For E2-referencestandardreplikater (prøvestørrelse på to) betragtes enhver justeret RLU-værdi til et replikat ved en given koncentration af E2 som en afvigende værdi, hvis dens værdi ligger mere end 20 % over eller under den justerede RLU-værdi for den pågældende koncentration i den historiske database.

Indsamling og justering af luminometerdata til testen til bestemmelse af dosisinterval

37. Rådata fra luminometeret overføres til en regnearkskabelon designet til assayet. Det bestemmes, om der er afvigende datapunkter, som skal fjernes. (Jf. Kriterier for accept af testen med hensyn til parametre, der bestemmes i analyserne.) Følgende beregninger bør foretages:

Agonist

- Trin 1 Beregn middelværdien for DMSO-bærestofkontrollen (VC).
- Trin 2 Træk middelværdien af DMSO VC fra hver brøndværdi for at normalisere dataene.
- Trin 3 Beregn den gennemsnitlige foldinduktion for referencestandarden (E2).
- Trin 4 Beregn den gennemsnitlige EC₅₀-værdi for testkemikalierne.

Antagonist

- Trin 1 Beregn middelværdien for DMSO VC.
- Trin 2 Træk middelværdien af DMSO VC fra hver brøndværdi for at normalisere dataene.
- Trin 3 Beregn den gennemsnitlige foldreduktion for referencestandarden (Ral/E2).
- Trin 4 Beregn middelværdien for E2-referencestandarden.
- Trin 5 Beregn den gennemsnitlige IC₅₀-værdi for testkemikalierne.

Indsamling og justering af luminometerdata til omfattende test

38. Rådata fra luminometeret overføres til en regnearkskabelon designet til assayet. Det bestemmes, om der er afvigende datapunkter, som skal fjernes. (Jf. Kriterier for accept af testen med hensyn til parametre, der bestemmes i analyserne.) Følgende beregninger foretages:

Agonist

- Trin 1 Beregn middelværdien for DMSO VC.
- Trin 2 Træk middelværdien af DMSO VC fra hver brøndværdi for at normalisere dataene.
- Trin 3 Beregn den gennemsnitlige foldinduktion for referencestandarden (E2).
- Trin 4 Beregn den gennemsnitlige EC₅₀-værdi for E2 og testkemikalierne.
- Trin 5 Beregn den gennemsnitlige justerede RLU-værdi for methoxychlor.

Antagonist

- Trin 1 Beregn middelværdien for DMSO VC.
- Trin 2 Træk middelværdien af DMSO VC fra hver brøndværdi for at normalisere dataene.
- Trin 3 Beregn den gennemsnitlige foldinduktion for referencestandarden (Ral/E2).
- Trin 4 Beregn den gennemsnitlige IC₅₀-værdi for Ral/E2 og testkemikalierne.
- Trin 5 Beregn den gennemsnitlige justerede RLU-værdi for tamoxifen.

Trin 6 Beregn middelværdien for E2-referencestandarden.

Kriterier for datafortolkning

39. VM7Luc ER TA er tænkt som en del af en "weight of evidence"-analyse, der skal bidrage til at prioritere stoffer til ED-testning in vivo. En del af denne prioriteringsprocedure er klassificeringen af testkemikaliet som positivt eller negativt i forbindelse med enten ER-agonist- eller ER-antagonistaktivitet. De positive og negative beslutningskriterier, der anvendes i VM7Luc ER TA-valideringsundersøgelsen, er beskrevet i tabel 1.

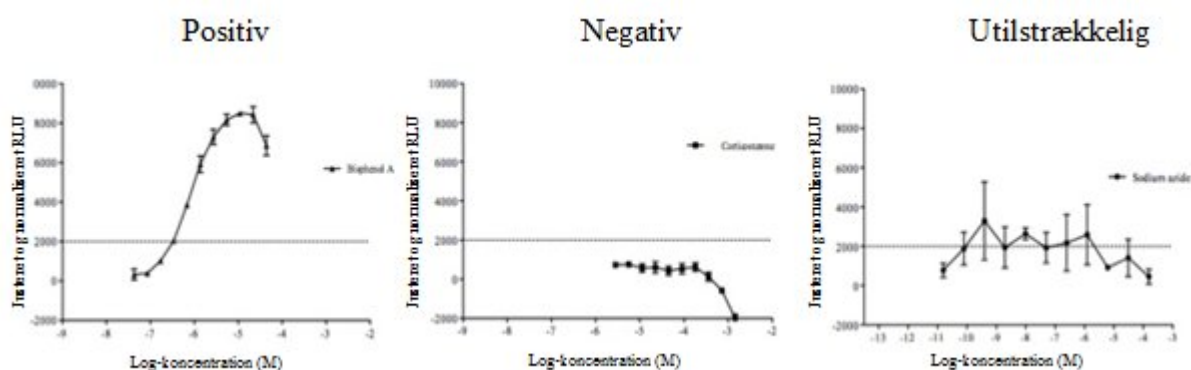
Tabel 1: Positive og negative beslutningskriterier

AGONISTAKTIVITET	
Positive	- Alle testkemikalier, der klassificeres som <i>positive for</i> ER-agonistaktivitet, bør have en koncentration/respons-kurve bestående af en basislinje efterfulgt af en positiv hældning, inden den ender i et plateau eller en top. I nogle tilfælde kan der kun defineres to af disse karakteristika (basislinje-hældning eller hældning-top). - Den linje, der definerer den positive hældning bør indeholde mindst tre punkter med ikke-overlappende fejlsøjler (gennemsnit $\pm$ standardafvigelse). Der ses bort fra de punkter, der danner basislinjen, men den lineære del af kurven kan omfatte toppen eller første punkt i plateauet. - En positiv klassificering kræver en responsamplitude, forskellen mellem basislinje og top, på mindst 20 % af den maksimale værdi for referencestandarden E2 (dvs. 2 000 RLU'er eller derover, når den maksimale responsværdi for referencestandarderne [E2] er justeret til 10 000 RLU'er). - Om muligt bør der beregnes en EC₅₀-værdi for hvert positivt testkemikalie.
Negative	Den gennemsnitlige justerede RLU for en given koncentration ligger på eller under den gennemsnitlige RLU-værdi for DMSO-kontrollen plus tre gange standardafvigelsen for DMSO RLU.
Utilstrækkelige	Data, der ikke kan fortolkes som valide til at vise enten tilstedeværelse eller fravær af aktivitet på grund af større kvalitative eller kvantitative begrænsninger, anses for at være utilstrækkelige og kan ikke bruges til at bestemme, om testkemikaliet er positivt eller negativt. Kemikalierne bør testes igen.
ANTAGONISTAKTIVITET	

Positive	- Ud fra testkemikaliedata genereres en koncentration/respons-kurve bestående af en basislinje, som efterfølges af en negativ hældning. - Den linje, der definerer den negative hældning, bør indeholde mindst tre punkter med ikke-overlappende fejlsøjler. Der ses bort fra de punkter, der danner basislinjen, men den lineære del af kurven kan omfatte det første punkt i plateauet. - Der bør mindst være en 20 % reduktion i aktiviteten i forhold til den maksimale værdi for referencestandarden Ral/E2 (dvs. 8 000 RLU eller derunder, når den maksimale responsværdi for referencestandarden [Ral/E2] justeres til 10 000 RLU'er). - De højeste ikke-cytotoksiske koncentrationer af testkemikaliet bør være under eller lig med 1×10^{-5} M. - Om muligt bør der beregnes en IC_{50}-værdi for hvert positivt testkemikalie.
Negative	Alle datapunkter ligger over ED_{80} -værdi (80 % af E2-responsen eller 8 000 RLU'er) ved koncentrationer under $1,0 \times 10^{-5}$ M.
Utilstrækkelige	Data, der ikke kan fortolkes som valide til at vise enten tilstedeværelse eller fravær af aktivitet på grund af større kvalitative eller kvantitative begrænsninger, anses for at være utilstrækkelige og kan ikke bruges til at bestemme, om testkemikaliet er positivt eller negativt. Kemikaliet bør testes igen.

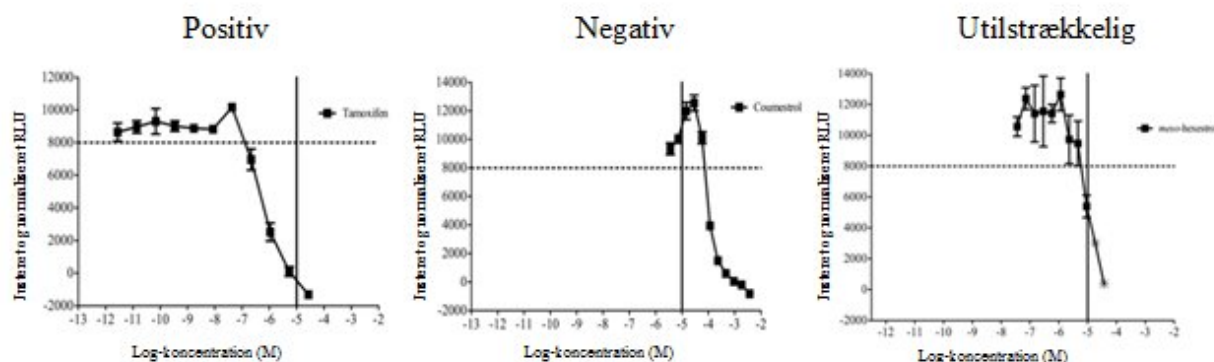
40. Positive resultater vil om muligt blive karakteriseret ved både effektens størrelsesorden og den koncentration, hvor effekten opstår. Eksempler på positive, negative og utilstrækkelige data er vist i [figur 5](#) og [6](#).

Figur 5: Agonisteksempler: positive, negative og utilstrækkelige data



Den stiplede linje viser 20 % af E2-responsen, 2 000 justerede og normaliserede RLU'er.

Figur 6: Antagonisteksempler: positive, negative og utilstrækkelige data



Den stiplede linje viser 80 % af Ral/E2-responsen, 8 000 justerede og normaliserede RLU'er.

Den ubrudte linje viser $1,00 \times 10^{-5}$ M. For at blive anset for positiv bør en respons ligge under 8 000 RLU-linjen og ved koncentrationer under $1,00 \times 10^{-5}$ M.

De koncentrationer, der er markeret med asterisk (*) på meso-hexestrol-grafen, viser levedygtighedsscorer på "2" eller derover.

Testresultater for meso-hexestrol anses for at være utilstrækkelige data, fordi den eneste respons under 8 000 RLU opstår ved $1,00 \times 10^{-5}$ M.

41. Beregningerne af EC_{50} og IC_{50} kan foretages ved hjælp af en Hill-funktion med fire parametre (se agonistprotokollen og antagonistprotokollen for yderligere oplysninger (7)). Hvis acceptkriterierne opfyldes, viser det, at systemet fungerer korrekt, men det sikrer ikke, at enhver analyseserie vil producere nøjagtige data. Kan resultaterne af den første analyseserie gentages, er det den bedste garanti for, at der blev produceret nøjagtige data (jf. punkt 19 i "ER TA-ASSAYETS KOMPONENTER").

TESTRAPPORT

42. Jf. punkt 20 i "ER TA-ASSAYETS KOMPONENTER".

LITTERATUR

- (1) ICCVAM. (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.
- (2) Monje P., Boland R. (2001). Subcellular Distribution of Native Estrogen Receptor α and β Isoforms in Rabbit Uterus and Ovary, *J. Cell Biochem.*, 82(3): 467-479.
- (3) Pujol P., *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, *Cancer Res.*, 58(23): 5367-5373.
- (4) Weihua Z., *et al.* (2000). Estrogen Receptor (ER) β , a Modulator of ER α in the Uterus, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(11): 936-5941.
- (5) Balls M., *et al.* (2006). The Importance of Good Cell Culture Practice (GCCP), *ALTEX*, 23(Suppl): s. 270-273.
- (6) Coecke S., *et al.* (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice: a Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, *Alternatives to Laboratory Animals*, 33: s. 261-287.
- (7) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report, The LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals, NIH Publication No 11-7850.
- (8) Rogers J.M., Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In Vitro Mol. Toxicol.*, 13(1):67-82.
- (9) Escande A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol.*, 71(10):1459-69.
- (10) Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, *Chemistry and Biology*, 17(6):646-57.

- (11) Kuiper G.G, *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, *Endocrinology*, 139(10):4252-63.
- (12) Geisinger, *et al.* (1989). Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, *Cancer* 63, 280-288.
- (13) Baldwin, *et al.* (1998). BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Animal*, 34, 649-654.
- (14) Li, Y., *et al.* (2014). Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, *Mol. Endo.* 28, 2072-2081.
- (15) Rogers, J.M. og Denison, M.S. (2000). Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals, *In Vitro & Molec. Toxicol.* 13, 67-82.

TILLÆG 4

TRANSAKTIVERINGSASSAY MED STABILT TRANSFEKTERET HUMAN ØSTROGENRECEPTOR-A TIL PÅVISNING AF ØSTROGENAGONIST- OG ØSTROGENANTAGONISTAKTIVITET I KEMIKALIER, DER ANVENDER ERA CALUX-CELLELINJEN

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER (JF. OGSÅ GENEREL INDLEDNING)

1. ER α CALUX-transaktiveringsassayet anvender den humane U2OS-cellelinje til at påvise østrogenagonist- og østrogenantagonistaktivitet medieret gennem human østrogenreceptor alfa (hER α). Valideringsundersøgelsen af bioassayet af det stabilt transfekterede ER α CALUX udført af BioDetection Systems BV (Amsterdam, Nederlandene) påviste relevansen og pålideligheden af assayet i overensstemmelse med dets formål (1). ER α CALUX-cellelinjen udtrykker stabilt transfekteret human ER α alene (2) (3).
2. Dette assay er specifikt udformet til at påvise hER α -medieret transaktivering ved at måle bioluminescens som effektparameter. Anvendelsen af bioluminescens benyttes almindeligvis i bioassays på grund af det høje forhold mellem signal og støj (4).
3. Det er rapporteret, at højere koncentrationer af fytoøstrogen end 1 μ M har overaktiveret luciferasereportergen, hvilket har medført ikke-receptormedieret luminescens (5) (6) (7). Derfor skal højere koncentrationer af fytoøstrogen eller andre lignende forbindelser, som kan overaktivere luciferaseekspression, undersøges nøje i stabilt transfekterede ER-transaktiveringsassays (jf. tillæg 2).
4. Afsnittene "GENEREL INDLEDNING" og "ER TA-ASSAYETS KOMPONENTER" bør læses, før dette assay benyttes til lovmæssige formål. Definitioner og forkortelser brugt i denne forsøgsmetode er beskrevet i tillæg 1.

PRINCIP FOR ASSAYET (SE OGSÅ GENEREL INDLEDNING)

5. Bioassayet benyttes til at vurdere ER-ligandbinding og efterfølgende kromosomtranslokation af receptorligandkomplekset til kernen. I kernen binder receptorligandkomplekset specifikke DNA-responselementer og transaktiverer et ildflue-luciferasereportergen, hvilket resulterer i øget cellulær ekspression af luciferaseenzymet. Efter tilsætningen af luciferasesubstratet luciferin omdannes luciferin til et bioluminescerende produkt. Det frembragte lys kan let påvises og kvantificeres ved hjælp af et luminometer.
6. Testsystemet anvender stabilt transfekterede ER α CALUX-celler. ER α CALUX-celler stammer fra den humane osteoblastiske osteosarkom-U2OS-cellelinje. Humane U2OS-celler blev stabilt transfekteret med 3xHRE-TATA-Luc og pSG5-neo-hER α under anvendelse af

metoden til samtidig udfældning af calciumfosfat. U2OS-cellelinjen blev valgt som den cellelinje med den største modtagelighed for østrogen (og andre steroide hormoner) baseret på den observation, at U2OS-cellelinjen kun udviste ringe eller ingen endogen receptoraktivitet. Manglen på endogene receptorer blev alene vurderet ved hjælp af luciferase-reporterplasmider, som ikke viste nogen aktivitet ved tilsætning af receptorligander. Endvidere støttede denne cellelinje stærke hormonmedierede reaktioner, når der flygtigt indførtes beslægtede receptorer (2) (3) (8).

7. Test af kemikalier for østrogen- eller antiøstrogenaktivitet ved hjælp af ER α CALUX-cellelinjen omfatter en prescreening-analyseserie og omfattende analyseserier. Under prescreening-analysen bestemmes opløselighed, cytotoxisk effekt og et justeret koncentrationsområde for testkemikalier med henblik på omfattende testning. Under de omfattende analyseserier testes de justerede koncentrationsområder for testkemikalier i ER α CALUX-bioassays efterfulgt af klassificering af testkemikalierne for agonisme eller antagonisme.
8. Kriterier for datafortolkning er nærmere beskrevet i punkt 59. Kort fortalt anses et testkemikalie for at være positivt for agonisme, såfremt mindst to på hinanden følgende koncentrationer af testkemikaliets viser en respons, som er lig med eller højere end 10 % af den maksimale respons for referencestandard 17 β -østradiol (PC₁₀). Et testkemikalie anses for at være positivt for antagonisme, såfremt mindst to på hinanden følgende koncentrationer af testkemikaliets viser en respons, som er lig med eller lavere end 80 % af den maksimale respons for referencestandard tamoxifen (PC₈₀).

FREMGANGSMÅDE

Cellelinjer

9. Den stabilt transfekterede U2OS ER α CALUX-cellelinje bør anvendes til assayet. Cellelinjen kan fås fra BioDetection Systems BV, Amsterdam, Nederlandene med en teknisk licensaftale.
10. Der bør kun anvendes mykoplasmafrie cellekulturer. De cellebatcher, der anvendes, bør enten være certificeret negative for mykoplasma kontaminering, eller der bør foretages en mykoplasma test før brug. RT-PCR (realtidspolymerasekædereaktion) bør anvendes til sensitiv påvisning af mykoplasma infektion (9).

Cellelinjens stabilitet

11. For at bevare CALUX-cellerne stabilitet og integritet bør cellerne opbevares i flydende nitrogen (-80 °C). Efter optøning af cellerne med henblik på start af en ny kultur bør cellerne dyrkes i subkultur mindst to gange, før de anvendes til at vurdere kemikalierne østrogene agonist- og antagonistaktivitet. Celler bør ikke dyrkes i subkultur i mere end 30 generationer.

12. For at overvåge cellelinjens stabilitet over tid bør det agonistiske og antagonistiske testsystems reaktionsevne kontrolleres ved at vurdere EC₅₀- eller IC₅₀-referencestandarden. Endvidere bør den relative induktion af den positive (PC) og negative kontrol (NC) overvåges. Resultaterne bør være i overensstemmelse med acceptkriterierne for det agonistiske (tabel 3C) eller antagonistiske ER α CALUX-bioassay (tabel 4C). Referencestandarder, positive og negative kontroller er anført i tabel 1 og tabel 2 for den henholdsvis agonistiske og antagonistiske måde.

Celledyrknings- og udpladningsbetingelser

13. U2OS-celler dyrkes i dyrkningsmedium (DMEM/F12 (1:1) med fenolrød som pH-indikator suppleret med føtalt kalveserum (7,5 %), ikke-essentielle aminosyrer (1 %), 10 enheder/ml penicillin, streptomycin og geneticin (G-418) som selektionsmarkør). Cellerne anbringes i en CO₂-inkubator (5 % CO₂) ved 37 °C og 100 % fugtighed. Når cellerne når en konfluens på 85-95 %, bør de enten dyrkes i subkultur eller forberedes til udsåning på mikrotiterplader med 96 brønde. I sidstnævnte tilfælde bør cellerne resuspenderes med 1x10⁵ celler/ml i østrogenfrit assaymedium (DMEM/F12 (1:1) medium uden fenolrød, suppleret med føtalt kalveserum behandlet med dextranovertrukket trækul (5 % (v/v)), ikke-essentielle aminosyrer (1 % (v/v)), 10 enheder/ml penicillin og streptomycin) og udplades i mikrotiterplader med 96 brønde (100 μ l homogeniseret celleduspension). Celler bør præinkuberes i en CO₂-inkubator (5 % CO₂, 37°C, 100 % fugtighed) i 24 timer forud for eksponeringen. Plastudstyr skal være østrogenfrit.

Acceptkriterier

14. Agonist- og antagonistaktiviteter i testkemikaliets/-kemikalierne testes i testserier. En testserie består af maksimalt seks mikrotiterplader. Hver testserie indeholder mindst én fuld serie af opløsninger af en referencestandard, en positiv kontrol, en negativ kontrol og kontrolkulturer med opløsningsmiddel. Figur 1 og 2 viser pladeopstillingen for agonist- og antagonist-testserier.
15. Der bør foretages tredobbelt analyse af hver fortynding af referencestandarder, testkemikalier, alle kontrolkulturer med opløsningsmiddel samt positive og negative kontroller. Hver af de tredobbelte analyser skal opfylde kravene i tabel 3A og tabel 4A.
16. En fuldstændig serie af fortyndinger af referencestandard (17 β -østradiol for agonisme, tamoxifen for antagonisme) måles på den første plade i hver testserie. For at kunne sammenligne analyseresultaterne for de resterende fem mikrotiterplader med den første mikrotiterplade, som indeholder den fuldstændige koncentration/respons-kurve for referencestandard, skal alle plader indeholde tre kontroller: kontrolkultur med opløsningsmiddel, den højeste koncentration af den testede referencestandard og referencestandardens omtrentlige EC₅₀- (agonisme) eller IC₅₀- (antagonisme) koncentration.

Forholdet mellem de gennemsnitlige kontroller på den første plade og de resterende fem plader bør opfylde kravene i tabel 3C (agonisme) eller tabel 4C (antagonisme).

17. For hver af mikrotiterpladerne inden for en testserie beregnes z-faktoren (10). z-faktoren beregnes ved hjælp af reaktionerne ved den højeste og den laveste koncentration af referencestandard. En mikrotiterplade anses for gyldig, såfremt den opfylder kravene i tabel 3C (agonisme) eller tabel 4C (antagonisme).
18. Referencestandarden bør påvise en sigmoidal dosis/respons-kurve. EC₅₀ eller IC₅₀ udledt af responsen fra serien af fortyndinger af referencestandard skal opfylde kravene i tabel 3C (agonisme) eller tabel 4C (antagonisme).
19. Hver testserie bør indeholde en positiv og en negativ kontrol. Den beregnede relative induktion af både den positive og negative kontrol bør opfylde kravene i tabel 3C (agonisme) eller tabel 4C (antagonisme).
20. Under alle målinger bør induktionsfaktoren for den højeste koncentration af referencestandard måles ved at dividere den gennemsnitlige højeste relative lysenhedsrespons (RLU) for referencestandard 17β-østradiol med den gennemsnitlige RLU-respons for referencekontrollkulturen med opløsningsmiddel. Denne induktionsfaktor skal opfylde mindstekravene til foldinduktionen som anført i tabel 3C (agonisme) eller tabel 4C (antagonisme).
21. Kun mikrotiterplader, der opfylder alle de ovennævnte acceptkriterier, betragtes som gyldige og kan anvendes til at vurdere responsen af testkemikalierne.
22. Acceptkriterierne finder anvendelse på både prescreening-analyseserie og omfattende analyseserier.

Tabel 1: Koncentrationer af referencestandard, positiv kontrol (PC) og negativ kontrol (NC) for det agonistiske CALUX-bioassay

	Stof	CAS RN	Måleområde (M)
Referencestandard	17β-østradiol	50-28-2	1,0*10 ⁻¹³ - 1,0*10 ⁻¹⁰
Positiv kontrol (PC)	17α-methyltestosteron	58-18-4	3,0*10 ⁻⁰⁶
Negativ kontrol (NC)	corticosteron	50-22-6	1,0*10 ⁻⁰⁸

Tabel 2: Koncentrationer af referencestandard, positiv kontrol (PC) og negativ kontrol (NC) for det antagonistiske CALUX-bioassay

	Stof	CAS RN	Måleområde (M)

Referencestandard	tamoxifen	10540-29-1	3,0*10-09 - 1,0*10-05
Positiv kontrol (PC)	4-hydroxytamoxifen	68047-06-3	1,0*10-09
Negativ kontrol (NC)	resveratrol	501-36-0	1,0*10-05

Tabel 3: Acceptkriterier for det agonistiske ER α CALUX-bioassay

A – individuelle prøver på en plade		Kriterium
1	Maksimal procentvis standardafvigelse for tredobbelte brønde (til NC, PC, hver fortynding af testkemikallet og referencestandarden, undtagen C0)	< 15 %
2	Maksimal procentvis standardafvigelse for tredobbelte brønde (til kontrolkultur med opløsningsmiddel for referencestandard og testkemikalie (C0, SC))	< 30 %
3	Maksimal LDH-udsivning som et mål for cytotoxisk effekt.	< 120 %
B - inden for en enkelt mikrotiterplade		
4	Forholdet mellem kontrolkulturen med opløsningsmiddel for referencestandarden (C0, plade 1) og kontrolkulturen med opløsningsmiddel for testkemikallet (SC, plade 2 til x)	0,5 til 2,0
5	Forholdet mellem den omtrentlige EC50 og højeste referencestandardkoncentrationer på plade 1 og den omtrentlige EC50 og højeste referencestandardkoncentrationer på plade 2 til x (C4, C8)	0,70 til 1,30
6	Z-faktor for hver plade	> 0,6
C - inden for en enkelt analyseserie (alle plader inden for én serie)		
7	Sigmoidal kurve for referencestandarden	Ja (17β-østradiol)
8	EC50-niveau for referencestandard 17β-østradiol	4*10-12 – 4*10-11 M
9	Minimumsfoldinduktion for den højeste koncentration af 17β-østradiol i forhold til kontrolkulturen med opløsningsmiddel for referencestandarden.	5
10	Relativ induktion (%) PC	> 30 %
11	Relativ induktion (%) NC	< 10 %

Omr.: omtrentlig, PC: positiv kontrol, NC: negativ kontrol, SC: kontrolkultur med opløsningsmiddel for testkemikalie, C0: kontrolkultur med opløsningsmiddel for referencestandard, Standardafvigelse: standardafvigelse, LDH: laktatdehydrogenase.

Tabel 4: Acceptkriterier for det antagonistiske ER α CALUX-bioassay

A – individuelle prøver på en plade		Kriterium
1	Maksimal procentvis standardafvigelse for tredobbelte brønde (til NC, PC, hver fortynding af testkemikallet og referencestandarden, kontrolkultur med opløsningsmiddel (C0))	< 15 %
2	Maximal procentvis standardafvigelse for tredobbelte brønde (til bærestofkontrol (VC) og højeste referencestandardkoncentration (C8))	< 30 %
3	Maksimal LDH-udsivning som et mål for cytotoxisk effekt.	< 120 %
B - inden for en enkelt mikrotiterplade		
4	Forholdet mellem kontrolkulturen med opløsningsmiddel for referencestandarden (C0, plade 1) og kontrolkulturen med opløsningsmiddel for testkemikallet (SC, plade 2 til x)	0,70 til 1,30
5	Forholdet mellem den omtrentlige IC50-referencestandardkoncentrationer på plade 1 og de omtr. IC50-referencestandardkoncentrationer på plade 2 til x (C4)	0,70 til 1,30
6	Forholdet mellem de højeste referencestandardkoncentrationer på plade 1 og de højeste referencestandardkoncentrationer på plade 2 til x (C8)	0,50 til 2,0
7	Z-faktor for hver plade	> 0,6
C - inden for en enkelt analyseserie (alle plader inden for én serie)		
8	Sigmoidal kurve for referencestandarden	Ja (tamoxifen)
9	IC50-niveau for referencestandard (tamoxifen)	$1 \cdot 10^{-8}$ - $1 \cdot 10^{-7}$ M
10	Minimumsfoldinduktion for kontrolkultur med opløsningsmiddel for referencestandarden i forhold til den højeste koncentration af tamoxifen	2,5
11	Relativ induktion (%) PC	< 70 %
12	Relativ induktion (%) NC	> 85 %

Omtr.: omtrentlig, PC: positiv kontrol, NC: negativ kontrol, VC: bærestofkontrol (kontrolkultur med opløsningsmiddel uden fast koncentration af agonistreferencestandard), SC: kontrolkultur med opløsningsmiddel for testkemikallet, C0: kontrolkultur med opløsningsmiddel for referencestandard, Standardafvigelse: standardafvigelse, LDH: laktatdehydrogenase.

Kontrolkultur med opløsningsmiddel/bærestof, referencestandarder, positive kontroller, negative kontroller

23. For både prescreening-analyseserien og de omfattende analyseserier bør der anvendes den samme kontrolkultur med opløsningsmiddel/bærestof og de samme referencestandarder, positive kontroller og negative kontroller. Endvidere bør koncentrationen for referencestandarder, positive kontroller og negative kontroller være de samme.

Kontrolkultur med opløsningsmiddel

24. Det opløsningsmiddel, der anvendes til at opløse testkemikalierne, bør testes som en kontrolkultur med opløsningsmiddel. Dimethylsulfoxid (DMSO, 1 % (v/v), CASRN 67-68-5) blev anvendt som bærestof under valideringen af ER α CALUX-bioassayet. Hvis der anvendes et andet opløsningsmiddel end DMSO, testes alle referencestandarder, kontroller og testkemikalier i det samme bærestof. Bemærk, at kontrolkulturen med opløsningsmiddel til antagonistiske undersøgelser indeholder en fast koncentration af agonistreferencestandard 17 β -østradiol (omtrentlig EC₅₀-koncentration). Til test af det opløsningsmiddel, der skal anvendes til antagonistiske undersøgelser, fremstilles og testes en bærestofkontrol.

Bærestofkontrol (antagonisme)

25. Til test for antagonisme suppleres assaymediet med en fast koncentration af agonistreferencestandard 17 β -østradiol (omtrentlig EC₅₀-koncentration). Til test af det opløsningsmiddel, som anvendes til at opløse testkemikalierne for antagonisme, fremstilles et assaymedium uden en fast koncentration af agonistreferencestandard 17 β -østradiol. Denne kontrol anføres som bærestofkontrol. Dimethylsulfoxid (DMSO, 1 % (v/v), CASRN 67-68-5) blev anvendt som bærestof under valideringen af ER α CALUX-bioassayet. Hvis der anvendes et andet opløsningsmiddel end DMSO, testes alle referencestandarder, kontroller og testkemikalier i det samme bærestof.

Referencestandarder

26. Den agonistiske referencestandard er 17 β -østradiol (tabel 1). Referencestandarderne omfatter en række fortyndinger med otte koncentrationer af 17 β -østradiol ($1,0 \cdot 10^{-13}$, $3,0 \cdot 10^{-13}$, $1,0 \cdot 10^{-12}$, $3,0 \cdot 10^{-12}$, $6,0 \cdot 10^{-12}$, $1,0 \cdot 10^{-11}$, $3,0 \cdot 10^{-11}$, $1,0 \cdot 10^{-10}$ M).
27. Den antagonistiske referencestandard er tamoxifen (tabel 2). Referencestandarderne omfatter en række fortyndinger med otte koncentrationer af tamoxifen ($3,0 \cdot 10^{-9}$, $1,0 \cdot 10^{-8}$, $3,0 \cdot 10^{-8}$, $1,0 \cdot 10^{-7}$, $3,0 \cdot 10^{-7}$, $1,0 \cdot 10^{-6}$, $3,0 \cdot 10^{-6}$, $1,0 \cdot 10^{-5}$ M). Hver af koncentrationerne af den antagonistiske referencestandard inkuberes sammen med en fast koncentration af den agonistiske referencestandard 17 β -østradiol ($3,0 \cdot 10^{-12}$ M).

Positiv kontrol

28. Den positive kontrol for agonistiske undersøgelser er 17 α -methyltestosteron (tabel 1).

29. Den positive kontrol for antagonistiske undersøgelser er 4-hydroxytamoxifen (tabel 2). Den antagonistiske positive kontrol inkuberes sammen med en fast koncentration af den agonistiske referencestandard 17β -østradiol ($3,0 \cdot 10^{-12}$ M).

Negativ kontrol

30. Den negative kontrol for agonistiske undersøgelser er corticosteron (tabel 1).
31. Den negative kontrol for antagonistiske undersøgelser er resveratrol (tabel 2). Den negative kontrol inkuberes sammen med en fast koncentration af den agonistiske referencestandard 17β -østradiol ($3,0 \cdot 10^{-12}$ M).

Påvisning af laboratoriets kompetence (jf. punkt 14 og tabel 3 og 4 i "ER TA-ASSAYETS KOMPONENTER" for denne forsøgsmetode)

Bærestof

32. Det opløsningsmiddel, der anvendes til at opløse testkemikalier, skal opløse testkemikaliets fuldstændigt og skal kunne blandes med cellemediet. DMSO, vand og ethanol (95-100 % renhed) er egnede opløsningsmidler. Såfremt DMSO anvendes som opløsningsmiddel bør den maksimale koncentration af DMSO under inkubationen ikke overstige 1 % (v/v). Før brug testes opløsningsmidlet for manglende cytotoxisk effekt og interferens med assayets ydeevne.

Fremstilling af referencestandarder, positive kontroller, negative kontroller og testkemikalier

33. Referencestandarder, positive kontroller, negative kontroller og testkemikalier opløses i 100 % DMSO (eller et egnet opløsningsmiddel). Egnede (serie-) fortyndinger fremstilles herefter i det samme opløsningsmiddel. Lad alle stoffer ækvilibrere til stuetemperatur, før de opløses. Frisk fremstillede stamopløsninger af referencestandarder, positive kontroller, negative kontroller og testkemikalier bør ikke have udtalt bundfald eller uklarhed. Referencestandard- og kontrollagre kan fremstilles i større mængder. Stamopløsninger af testkemikalier fremstilles frisk før hvert forsøg. Endelige fortyndinger af referencestandarder, positive kontroller, negative kontroller og testkemikalier fremstilles frisk til hvert forsøg og anvendes inden for 24 timer efter fremstillingen.

Opløselighed, cytotoxisk effekt og bestemmelse af dosisinterval

34. Under prescreening-analyseserien bestemmes testkemikaliernes opløselighed i det valgte opløsningsmiddel. Der fremstilles en maksimum-stamkoncentration på 0,1 M. Såfremt denne koncentration giver opløselighedsproblemer, fremstilles der lavere stamopløsninger, indtil testkemikalierne er fuldt opløst. Under prescreening-analyseserien testes seriefortyndinger af testkemikaliets i forholdet 1:10. Den maksimale assaykoncentration til agonist- og antagonisttestning er 1 mM. Efter prescreeningen udledes et passende justeret koncentrationsområde til testkemikalier, som testes under de omfattende analyseserier. De

opløsninger, der anvendes til omfattende testning, bør være 1x, 3x, 10x, 30x, 100x, 300x, 1 000x og 3 000x.

35. Testning for cytotoxisk effekt er inkluderet i protokollen for agonist- og antagonistassays (11). Testning for cytotoxisk effekt er indarbejdet i både prescreening-analyseserien og i omfattende analyseserier. Den metode, som blev benyttet til at vurdere cytotoxisk effekt under valideringen af ER α CALUX-bioassayet, var udsivningstesten for laktatdehydrogenase (LDH) kombineret med kvalitativ visuel cellekontrol (jf. tillæg 4.1) efter eksponering for testkemikalier. Andre kvantitative metoder kan dog benyttes til bestemmelse af cytotoxisk effekt (f.eks. tetrazolium-baseret kolorimetrisk (MTT) assay eller cytotoxicitets-CALUX bioassay). Generelt betragtes testkemikaliekoncentrationer, der udviser mere end 20 % reduktion i cellernes levedygtighed, som cytotoxiske og kan derfor ikke anvendes til datavurdering. Med hensyn til LDH-udsivningsassayet betragtes koncentrationen af testkemikaliets som cytotoxisk, når den procentvise LDH-udsivning er højere end 120 %.

Eksponering for testkemikalie og organisering af assaypladen

36. Efter trypsinering af en konfluerende kolbe med dyrkede celler genopslættes cellerne med 1×10^5 celler/ml i østrogenfrit assaymedium. 100 μ l genopslæmmede celler udplades i de inderste brønde på en mikrotiterplade med 96 brønde. De yderste brønde fyldes med 200 μ l fosfatbufret fysiologisk saltopløsning (PBS) (jf. figur 1 og 2). De udpladede celler præinkuberes i 24 timer i en CO₂-inkubator (5 % CO₂, 37°C, 100 % fugtighed).
37. Efter præinkubation kontrolleres pladerne for visuel cytotoxisk effekt (jf. tillæg 4.1), kontaminering og konfluens. Kun plader, som ikke udviser visuel cytotoxisk effekt og kontaminering og har en konfluens på minimum 85 %, anvendes til test. Mediet fra de inderste brønde fjernes omhyggeligt og erstattes af 200 μ l østrogenfrit assaymedium, som indeholder egnede fortyndingsserier af referencestandarde, testkemikalier, positive kontroller, negative kontroller og kontrolkulturer med opløsningsmiddel (tabel 5: agonistundersøgelser, Tabel 6: antagonistundersøgelser). Alle referencestandarde, testkemikalier, positive kontroller, negative kontroller og kontrolkulturer med opløsningsmiddel testes in triplo. I figur 1 angives pladelayoutet til agonisttestning. I figur 2 angives pladelayoutet til antagonisttestning. Pladelayoutet til prescreening-testning og omfattende testning er identisk. Til antagonisttestning indeholder alle inderste brønde undtagen brøndene til bærestofkontrol (VC) også en fast koncentration af agonistreferencestandard 17 β -østradiol ($3,0 \times 10^{-12}$ M). Bemærk, at referencestandarde C8 og C4 tilsættes til hver TC-plade.
38. Efter eksponering af cellerne for alle kemikalier inkuberes mikrotiterpladerne med 96 brønde i endnu 24 timer i en CO₂-inkubator (5 % CO₂, 37°C, 100 % fugtighed).

Figur 1: Pladelayout for mikrotiterplader med 96 brønde til prescreening og vurdering af agonisteffekt.

Plade 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
E		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
F		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
G		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
H												

Efterfølgende plader

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8	
E		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
F		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
G		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
H												

C0 = referencestandard-opløsningsmiddel

C(1-8) = fortyndingsserier (1-8, lave til høje koncentrationer) af referencestandard

PC = positiv kontrol

NC = negativ kontrol

TCx-(1-8) = fortyndinger (1-8, lave til høje koncentrationer) af testkemikalie til prescreening-analyseserie og vurdering af agonistisk effekt af testkemikalie x

SC = kontrolkultur med opløsningsmiddel for testkemikaliets (optimalt det samme opløsningsmiddel som i C0, men eventuelt fra en anden batch).

Grå felter: = Yderste brønde fyldt op med 200 µl PBS.

Figur 2: Pladelayout for mikrotiterplader med 96 brønde til antagonistisk prescreening og vurdering af antagonistisk effekt.

Plade 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
E		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
F		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
G		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
H												

Efterfølgende plader

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (maks.)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (maks.)	

D	SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (maks.)	
E	C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (maks.)	
F	C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (maks.)	
G	C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (maks.)	
H											

C0 = referencestandard-opløsningsmiddel

C(1-8) = fortyndingsserier (1-8, lave til høje koncentrationer) af referencestandard

NC = negativ kontrol

PC = positiv kontrol

TCx-(1-8) = fortyndinger (1-8, lave til høje koncentrationer) af testkemikalie til prescreening-analyseserie og vurdering af agonistisk effekt af testkemikalie x

SC = kontrolkultur med opløsningsmiddel for testkemikaliets (optimalt det samme opløsningsmiddel som i C0, men eventuelt fra en anden batch).

VC = bærestofkontrol (kontrolkultur med opløsningsmiddel uden fast koncentration af agonistreferencestandard 17β-østradiol).

Grå felter: = Yderste brønde fyldt op med 200 µl PBS.

Bemærk: Alle inderste brønde undtagen brøndene til bærestofkontrol (VC) indeholder også en fast koncentration af agonistreferencestandard 17β-østradiol (3,0*10⁻¹² M).

Måling af luminescens

39. Måling af luminescens er nærmere beskrevet i agonist- og antagonistassayprotokollen (10).

Dyrkningsmediet fra brøndene bør fjernes, og cellerne lyseres efterfulgt af 24 timers inkubation for at åbne cellemembranen, så luciferaseaktiviteten kan måles.

40. Til måling af luminiscensen kræves et luminometer udstyret med to injektorer.

Luciferasereaktionen startes med injektion af substratet luciferin. Reaktionen standes ved tilsætning af 0,2 M NaOH. Reaktionen standes for at forhindre, at der overføres luminescens fra én brønd til en anden.

41. Lys, der udsendes fra hver brønd, angives som relative lysenheder (RLU'er) pr. brønd.

Prescreening-analyseserie

42. Resultaterne af prescreening-analysen bruges til at bestemme et justeret koncentrationsområde for testkemikalier med henblik på omfattende testning. Vurderingen af resultaterne af prescreening-analysen og bestemmelsen af det justerede koncentrationsområde for testkemikalier med henblik på omfattende testning beskrives indgående i agonist- og antagonistassayprotokollen (10). Her anføres et kort resumé af procedurerne for bestemmelse af koncentrationsområdet for testkemikalier til agonist- og antagonisttestning. Jf. retningslinjer for udformning af seriefortynding i tabel 5 og 6.

Valg af koncentrationer til vurdering af agonistiske virkninger

43. Under prescreening-analyseserien testes testkemikalierne ved hjælp af serier af fortyndinger som anført i tabel 5 (agonisme) og 6 (antagonisme). Alle koncentrationer testes i tredobbelte brønde i overensstemmelse med pladelayoutet i figur 1 (agonisme) eller 2 (antagonisme).
44. Kun analyseresultater, der opfylder acceptkriterierne (tabel 3), betragtes som gyldige og kan anvendes til at vurdere responsen af testkemikalierne. Såfremt en eller flere mikrotiterplader i analyseserien ikke opfylder acceptkriterierne, analyseres de pågældende mikrotiterplader igen. I tilfælde af at den første plade med den fuldstændige serie af fortyndinger af referencestandarden ikke opfylder acceptkriterierne, skal hele testserien (seks plader) analyseres igen.
45. De indledende koncentrationsområder for testkemikalier bør justeres, og prescreening-analyseserien gentages, såfremt:
- der observeres cytotoxisk effekt. Prescreening-proceduren gentages med lavere ikke-cytotoxiske koncentrationer af testkemikali
 - prescreeningen af testkemikali
46. Når der observeres et gyldigt dosis/effekt-forhold, vælges den (laveste) koncentration, hvor der observeres maksimal induktion uden cytotoxisk effekt. Den højeste koncentration af det testkemikalie, som skal testes i omfattende analyseserier, bør være tre gange denne valgte koncentration.
47. En fuldstændig justeret fortyndingsserie med testkemikali
48. Et testkemikalie, som ikke fremkalder nogen agonistisk virkning, testes i omfattende analyseserier, der starter med den højeste ikke-cytotoxiske koncentration, som identificeres under prescreeningen.

Valg af koncentrationer til vurdering af antagonistiske virkninger

49. Kun analyseresultater, der opfylder acceptkriterierne (tabel 4), betragtes som gyldige og kan anvendes til at vurdere testkemikalierne respons. Såfremt en eller flere mikrotiterplader i analyseserien ikke opfylder acceptkriterierne, analyseres de pågældende mikrotiterplader igen. I tilfælde af at den første plade med den fuldstændige serie af fortyndinger af referencestandarden ikke opfylder acceptkriterierne, skal hele testserien (seks plader) analyseres igen.
50. De indledende koncentrationsområder for testkemikalier bør justeres, og prescreening-analyseserien gentages, såfremt:

- der observeres cytotoksisk effekt. Prescreening-proceduren gentages med lavere ikke-cytotoksiske koncentrationer af testkemikaliet
 - prescreeningen af testkemikaliet ikke udviser en fuld dosis/respons-kurve, fordi de testede koncentrationer genererer maksimal inhibering. Prescreeningen gentages under anvendelse af lavere koncentrationer af testkemikaliet.
51. Når der konstateres et gyldigt dosis/effekt-forhold, vælges den (laveste) koncentration, hvor der observeres maksimal inhibering uden cytotoksisk effekt. Den højeste koncentration af det testkemikalie, som skal testes i omfattende analyseserier, bør være tre gange denne valgte koncentration.
52. En fuldstændig justeret fortyndingsserie af testkemikaliet fremstilles med fortyndingstrin som anført i tabel 6, idet der startes med den højeste koncentration som bestemt ovenfor.
53. Testkemikalier, som ikke fremkalder nogen antagonistiske virkninger, testes i omfattende analyseserier, der starter med den højeste ikke-cytotoksiske koncentration, som er testet under prescreeningen.

Omfattende analyseserier

54. Efter valg af de justerede koncentrationsområder testes testkemikalierne grundigt ved hjælp af fortyndingsserierne i tabel 5 (agonisme) og 6 (antagonisme). Alle koncentrationer testes i tredobbelte brønde i overensstemmelse med pladelayoutet i figur 1 (agonisme) eller 2 (antagonisme).
55. Kun analyseresultater, der opfylder acceptkriterierne (tabel 3 og 4), betragtes som gyldige og kan anvendes til at vurdere testkemikaliernes respons. Såfremt en eller flere mikrotiterplader i analyseserien ikke opfylder acceptkriterierne, analyseres de pågældende mikrotiterplader igen. I tilfælde af at den første plade med den fuldstændige serie af fortyndinger af referencestandarderne ikke opfylder acceptkriterierne, skal hele testserien (seks plader) analyseres igen.

Tabel 5: Koncentration og fortyndinger af referencestandarder, kontroller og testkemikalier, som anvendes til agonisttestning

Reference-17β- østradiol konc. (M)		TCx – prescreening- analyseserie fortynding		TCx – omfattende analyseserie fortynding		Kontroller konc. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	PC	3,0*10 ⁻⁰⁶
C1	1,0*10 ⁻¹³	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	NC	1,0*10 ⁻⁰⁸
C2	3,0*10 ⁻¹³	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	1,0*10 ⁻¹²	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	3,0*10 ⁻¹²	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x		
C5	6,0*10 ⁻¹²	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x		
C6	1,0*10 ⁻¹¹	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x		

C7	$3,0 \cdot 10^{-11}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x		
C8	$1,0 \cdot 10^{-10}$						

TCx - testkemikalie x

PC - positiv kontrol (17 α -methyltestosteron)

NC - negativ kontrol (corticosteron)

C0 - kontrolkultur med opløsningsmiddel efter referencestandard

SC - kontrolkultur med opløsningsmiddel for testkemikalie

Tabel 6: Koncentration og fortyndinger af referencestandards, kontroller og testkemikalier, som anvendes til antagonisttestning

Referencetamoxifen konc. (M)		TCx – prescreening- analyserie fortynding		TCx – omfattende analyserie fortynding		Kontroller konc. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	PC	$1,0 \cdot 10^{-9}$
C1	$3,0 \cdot 10^{-9}$	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	NC	$1,0 \cdot 10^{-5}$
C2	$1,0 \cdot 10^{-8}$	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	$3,0 \cdot 10^{-8}$	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	$1,0 \cdot 10^{-7}$	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x	Suppleret agonist konc. (M)	
C5	$3,0 \cdot 10^{-7}$	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x		
C6	$1,0 \cdot 10^{-6}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x		
C7	$3,0 \cdot 10^{-6}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x	17 β - østradiol	$3,0 \cdot 10^{-12}$
C8	$1,0 \cdot 10^{-5}$						

TCx - testkemikalie x

PC - positiv kontrol (4-hydroxytamoxifen)

NC - negativ kontrol (resveratrol)

C0 - kontrolkultur med opløsningsmiddel efter referencestandard

SC - kontrolkultur med opløsningsmiddel for testkemikalie

VC - bærestofkontrol (indeholder ikke fast koncentration af agonistreferencestandard 17 β -østradiol ($3,0 \cdot 10^{-12}$ M)).

Indsamling af data og dataanalyse

56. Efter prescreening og omfattende analyserier bestemmes EC₁₀, EC₅₀, PC₁₀, PC₅₀ og maksimal induktion (TCx_{maks.}) for et testkemikalie til agonistisk testning. Til antagonistisk testning beregnes IC₂₀, IC₅₀, PC₈₀, PC₅₀ og minimumsinduktion (TCx_{min.}). I figur 3 (agonisme) og 4 (antagonisme) er disse parametre gengivet grafisk. De nødvendige parametre beregnes på grundlag af den relative induktion for hvert testkemikalie (i forhold til referencestandardens maksimale induktion (=100 %)). Ikke-lineær regression (variabel hældning, 4 parametre) anvendes til vurdering af data i overensstemmelse med følgende ligning:

$$Y = Bund + \frac{(Top - Bund)}{(1 + 10^{((\log EC_{50} - X) * Hills\ kurve)})}$$

hvor:

X = Logaritmen af dosis eller koncentration

Y = Respons (relativ induktion (%))

Top = Maksimumsinduktion (%)

Bund = minimumsinduktion (%)

LogEC₅₀ = Logaritmen af koncentrationen, hvor der observeres 50 % af den maksimale respons.

Hills kurve = hældningsfaktor for Hills kurve

57. Rådata fra luminometeret angivet som relative lysenheder (RLU'er) overføres til det regneark til dataanalyse, som er udformet til prescreening og omfattende analyseserier. Rådata bør opfylde acceptkriterierne i tabel 3A og 3B (agonisme) eller 4A og 4B (antagonisme). Såfremt rådataene opfylder acceptkriterierne, udføres følgende beregningstrin for at bestemme de nødvendige parametre:

Agonisme

- Træk den gennemsnitlige RLU for kontrollen af referencestandard med opløsningsmiddel fra hver af referencestandardernes råanalysedata.
- Træk den gennemsnitlige RLU for kontrolkulturen med opløsningsmiddel for testkemikaliet fra hver af testkemikaliernes råanalysedata.
- Beregn den relative induktion for hver koncentration af referencestandard. Sæt induktionen for den højeste koncentration af referencestandard til 100 %.
- Beregn den relative induktion for hver koncentration af testkemikaliet sammenlignet med den højeste koncentration af referencestandard til 100 %.
- Vurder analyseresultaterne efter ikke-lineær regression (variabel hældning, 4 parametre).
- Bestem EC₅₀ og EC₁₀ for referencestandard.
- Bestem EC₅₀ og EC₁₀ for testkemikalierne.
- Bestem den relative maksimumsinduktion for testkemikaliet (TC_{maks.}).
- Bestem PC₁₀ og PC₅₀ for testkemikalierne.

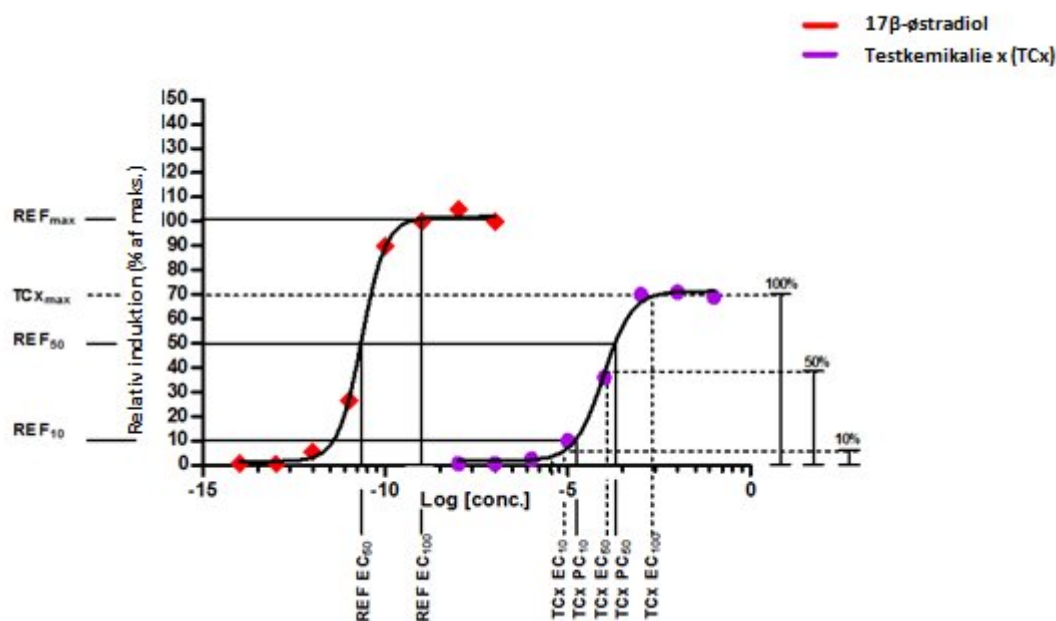
For testkemikalier kan der ikke altid opnås en fuld dosis/respons-kurve, f.eks. på grund af cytotoxicitets- eller opløselighedsproblemer. Derfor kan EC₅₀, EC₁₀ og PC₅₀ ikke bestemmes. I så fald kan kun PC₁₀ og TC_{maks.} bestemmes.

Antagonisme

- Træk den gennemsnitlige RLU for den højeste referencestandardkoncentration fra hver af referencestandardernes råanalysedata.

- Træk den gennemsnitlige RLU for den højeste referencestandardkoncentration fra hver af testkemikaliernes råanalysedata.
- Beregn den relative induktion for hver koncentration af referencestandarden. Sæt induktionen for den laveste koncentration af referencestandarden til 100 %.
- Beregn den relative induktion for hver koncentration af testkemikaliet sammenlignet med den laveste koncentration af referencestandarden til 100 %.
- Vurder analyseresultaterne efter ikke-lineær regression (variabel hældning, 4 parametre).
- Bestem IC_{50} og IC_{20} for referencestandarden.
- Bestem IC_{50} og IC_{20} for testkemikalierne.
- Bestem den relative minimumsinduktion for testkemikaliet (TC_{min}).
- Bestem PC_{80} og PC_{50} for testkemikalierne.

Figur 3: Oversigt over parametre bestemt i agonistassayet



EC_{10} = koncentration af et stof, hvor der observeres 10 % af dets maksimale respons

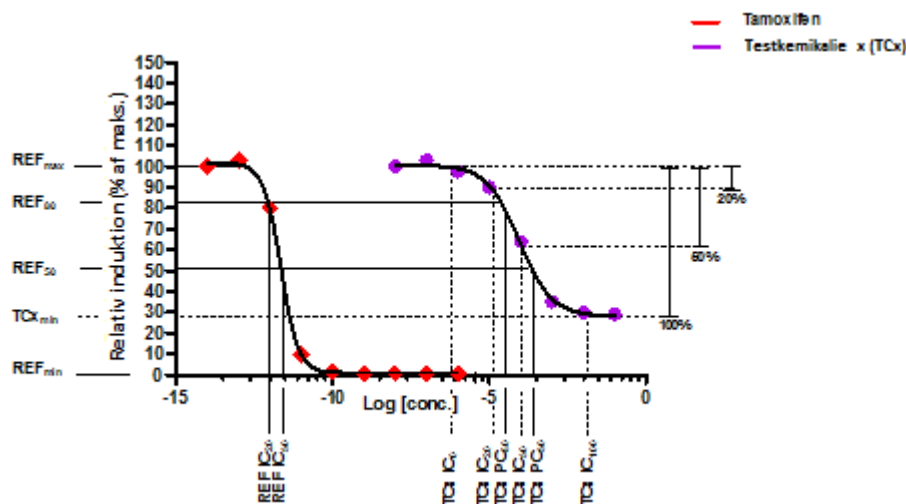
EC_{50} = koncentration af et stof, hvor der observeres 50 % af dets maksimale respons

PC_{10} = koncentration af et testkemikalie, hvis respons er lig med EC_{10} af referencestandarden

PC_{50} = koncentration af et testkemikalie, hvis respons er lig med EC_{50} af referencestandarden.

$TC_{x\text{maks.}}$ = maksimal relativ induktion af testkemikalie.

Figur 4: Oversigt over parametre bestemt i antagonistassayet



IC₂₀ = koncentration af et stof, hvor der observeres 80 % af dets maksimale respons (20 % inhibering).

IC₅₀ = koncentration af et stof, hvor der observeres 50 % af dets maksimale respons (50 % inhibering).

PC₈₀ = koncentration af et testkemikalie, hvis respons er lig med IC₂₀ af referencestandardens

PC₅₀ = koncentration af et testkemikalie, hvis respons er lig med IC₅₀ af referencestandardens

TCx_{min}. = relativ minimumsinduktion af testkemikalie.

For testkemikalier kan der ikke altid opnås en fuld dosis/respons-kurve, f.eks. på grund af cytotoxicitets- eller opløselighedsproblemer. Derfor kan IC₅₀, IC₂₀ og PC₅₀ ikke bestemmes. I så fald kan kun PC₂₀ og TC_{min} bestemmes.

58. Resultaterne bør baseres på to (eller tre) uafhængige analyseserier. Hvis to analyseserier giver sammenlignelige og derfor reproducerbare resultater, er det ikke nødvendigt at gennemføre en tredje analyseserie. For at resultaterne kan godkendes, skal de:

- opfylde acceptkriterierne (se Acceptkriterier, punkt 14-22)
- kunne reproducere.

Kriterier for datafortolkning

59. For at fortolke data og afgøre, om et testkemikalie anses for positivt eller negativt, anvendes følgende kriterier:

Agonisme

For hver omfattende analyseserie anses et testkemikalie for **positivt**, såfremt:

- 1 TC_{maks.} er lig med eller overstiger 10 % af referencestandardens maksimale respons

(REF₁₀).

- 2 Mindst to på hinanden følgende koncentrationer af testkemikaliet er lig med eller overstiger REF₁₀.

For hver omfattende analyseserie anses et testkemikalie for **negativt**, såfremt:

- 1 TC_{maks} ikke overstiger 10 % af referencestandardens maksimale respons (REF₁₀).
- 2 Under to koncentrationer af testkemikaliet er lig med eller overstiger REF₁₀.

Antagonisme

For hver omfattende analyseserie anses et testkemikalie for **positivt**, såfremt:

- 1 TC_{min.} er lig med eller lavere end 80 % af referencestandardens maksimale respons (REF₈₀ = 20 % inhibering).
- 2 Mindst to på hinanden følgende koncentrationer af testkemikaliet er lig med eller lavere end REF₈₀

For hver omfattende analyseserie anses et testkemikalie for **negativt**, såfremt:

- 1 TC_{min.} overstiger 80 % af referencestandardens maksimale respons (REF₈₀ = 20 % inhibering).
- 2 Under to koncentrationer af testkemikaliet er lig med eller lavere end REF₈₀.

60. For at karakterisere styrken af et testkemikalies positive respons rapporteres virkningens omfang (agonisme: TC_{maks.}, antagonisme: TC_{min.}) og den koncentration, hvor virkningen opstår (agonisme: EC₁₀, EC₅₀, PC₁₀, PC₅₀, antagonisme: IC₂₀, IC₅₀, PC₈₀, PC₅₀).

TESTRAPPORT

61. Jf. punkt 20 i "ER TA-ASSAYETS KOMPONENTER".

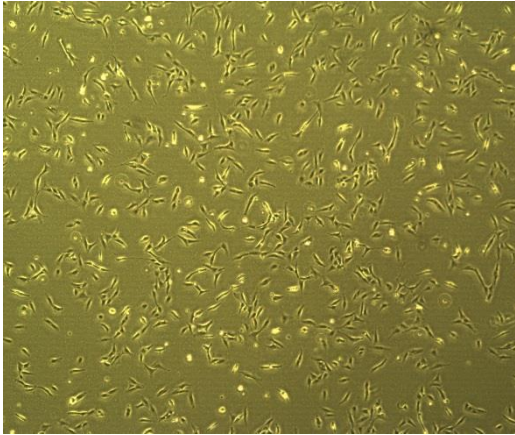
LITTERATUR

- (1) OECD (2016). Draft Validation report of the (anti-) ER α CALUX bioassay - transactivation bioassay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 240). Organisationen for Økonomisk Samarbejde og Udvikling, Paris.
- (2) Sonneveld E, Jansen HJ, Riteco JA, Brouwer A, van der Burg B. (2005). Development of androgen- and estrogen-responsive bioassays, members of a panel of human cell line-based highly selective steroid-responsive bioassays. *Toxicol Sci.* 83(1), 136-148.
- (3) Quaedackers ME, van den Brink CE, Wissink S, Schreurs RHMM, Gustafsson JA, van der Saag PT, og van der Burg B. (2001). 4-Hydroxytamoxifen trans-represses nuclear factor-kB Activity in human osteoblastic U2OS cells through estrogen receptor (ER) α and not through ER β . *Endocrinology* 142(3), 1156-1166.
- (4) Thorne N, Inglese J og Auld DS. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, Chemistry and Biology 17(6):646-57.
- (5) Escande A, Pillon A, Servant N, Cravedi JP, Larrea F, Muhn P, Nicolas JC, Cavaillès V og Balaguer P. (2006). Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta. *Biochem. Pharmacol.*, 71, 1459-1469.
- (6) Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B og Gustafsson JA. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinol.*, 139, 4252-4263.
- (7) Sotoca AM, Bovee TFH, Brand W, Velikova N, Boeren S, Murk AJ, Vervoort J, Rietjens IMCM. (2010). Superinduction of estrogen receptor mediated gene expression in luciferase based reporter gene assays is mediated by a post-transcriptional mechanism. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 122, 204-211.
- (8) Sonneveld E, Riteco JAC, Jansen HJ, Pieterse B, Brouwer A, Schoonen WG, og van der Burg B. (2006). Comparison of in vitro and in vivo screening models for androgenic and estrogenic activities. *Toxicol. Sci.*, 89(1), 173-187.
- (9) Kobayashi H, Yamamoto K, Eguchi M, Kubo M, Nakagami S, Wakisaka S, Kaizuka M og Ishii H. (1995). Rapid detection of mycoplasma

contamination in cell cultures by enzymatic detection of polymerase chain reaction (PCR) products. *J. Vet. Med. Sci.*, 57(4), 769-771.

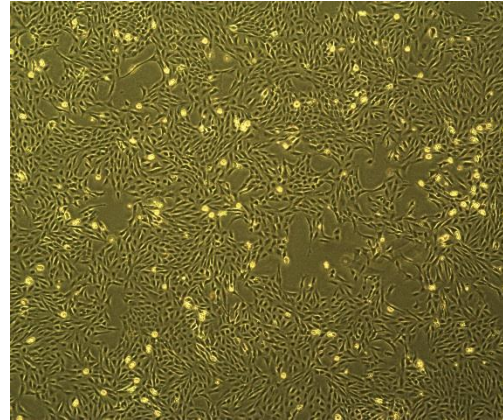
- (10) Zhang J-H, Chung TDY, og Oldenburg KR. (1999). A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J. Biomol. Scr.*, 4, 67-73.
- (11) Besselink H, Middelhof I, og Felzel, E. (2014). Transactivation assay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential using ER α CALUX cells. BioDetection Systems BV (BDS). Amsterdam, Nederlandene.

Tillæg 4.1: Visuel kontrol af cellelevedygtighed



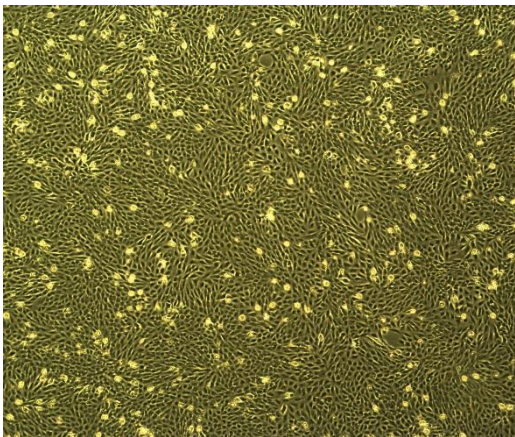
< 5 % konfluens. Celler er lige blevet podet. 100 % cellelevedygtighed.

Klassificering: "ingen cytotoxisk effekt".



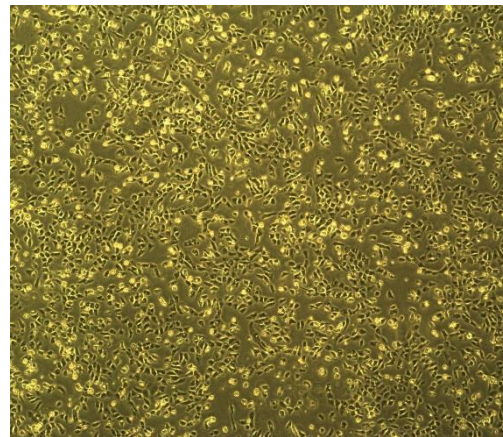
> 85 % konfluens. På dette stadium eksponeres celler for testkemikalier. > 95 % cellelevedygtighed.

Klassificering: "ingen cytotoxisk effekt".

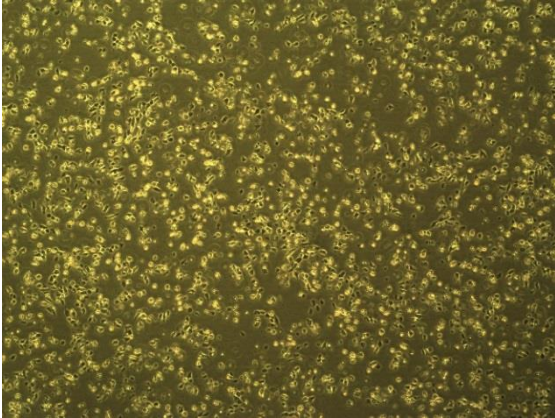


> 95 % konfluens. Cellerne er tæt pakket og begynder at vokse abnormt. > 95 % cellelevedygtighed.

Klassificering: "ingen cytotoxisk effekt".



< 25 % cellelevedygtighed. Cellerne frigør sig, og kontakten mellem cellerne mindskes. Cellerne rundes. Klassificering: "cytotoxisk effekt".



< 5 % cellelevedygtighed. Cellerne frigør sig helt, og kontakten mellem cellerne brydes. Cellerne rundes. Klassificering: "cytotoksisk effekt".

B.67 IN VITRO-TEST FOR GENMUTATION I PATTEDYRCELLER VED ANVENDELSE AF THYMIDIN-KINASEGENET

INDLEDNING

1. Denne forsøgsmetode svarer til OECD's testvejledning (Test Guideline) 490 (2016). Forsøgsmetoderne gennemgås regelmæssigt og revideres på baggrund af den videnskabelige udvikling, myndighedskrav og hensyn til dyrevelfærd. Muselymfomassayet (MLA) og TK6-testen ved anvendelse af thymidin-kinase-locus (TK) var oprindeligt indeholdt i forsøgsmetode B.17. Efterfølgende har MLA-ekspertarbejdsgruppen under den internationale workshop for genotoksicitetstest (IWGT) udviklet internationalt harmoniserede anbefalinger vedrørende assayacceptkriterier og datafortolkning for MLA (1)(2)(3)(4)(5), og disse anbefalinger er indarbejdet i denne nye forsøgsmetode, B.67. Denne forsøgsmetode er skrevet til MLA, og fordi den også anvender TK locus, til TK6-testen. Mens MLA har fundet udbredt anvendelse til lovmæssige formål, anvendes TK6 langt mindre hyppigt. Det skal bemærkes, at de to cellelinjer til trods for ligheden mellem effektparametrene ikke er substituerbare, og at der i lovmæssige programmer kan være angivet en præference for den ene i forhold til den anden med henblik på en særlig lovmæssig anvendelse. F.eks. påviste valideringen af MLA, at den er hensigtsmæssig til påvisning ikke blot af genmutation, men også et testkemikalies evne til at fremkalde strukturel kromosombeskadigelse. Denne forsøgsmetode er en del af en række forsøgsmetoder vedrørende genetisk toksikologi. OECD har udarbejdet et dokument, som indeholder kortfattede oplysninger om testning for genetisk toksikologi, og en oversigt over de seneste ændringer af OECD's testvejledning om genetisk toksicitet (6).
2. Formålet med in vitro-testen for genmutation i pattedyrceller er at påvise genmutationer, som induceres af kemikalier. De cellelinjer, der anvendes i disse test, måler fremadmutationer i reportergener, specifikt det endogene thymidin-kinasegen (*TK* for humane celler og *TK* for gnaverceller, under ét benævnt *TK* i denne forsøgsmetode). Denne forsøgsmetode er beregnet til brug med to cellelinjer: L5178Y $TK^{+/-}$ -3.7.2C muselymfomcellelinje (generelt benævnt L5178Y) og TK6 human lymphoblastoid cellelinje (generelt benævnt TK6). Skønt de to cellelinjer varierer på grund af deres oprindelse, cellevækst, p53-status, osv., kan der foretages *TK*-genmutationstest på samme måde i begge celletyper som beskrevet i denne forsøgsmetode.
3. Thymidin-kinasegenets autosomale og heterozygotiske karakter gør det muligt at påvise levedygtige kolonier, hvis celler mangler i enzymet thymidin-kinase efter mutation fra $TK^{+/-}$ til $TK^{-/-}$. Denne mangel kan skyldes genetiske hændelser, der

påvirker *TK*-genet, herunder både genmutationer (punktmutationer, frameshift-mutationer, små deletioner osv.) og kromosomale hændelser (store deletioner, genomlejringer og mitotisk rekombination). Sidstnævnte hændelser angives som tab af heterozygoti, som er en almindelig genetisk forandring af anti-onkogener i human tumordannelse. Teoretisk kan tab af hele det *TK*-genbærende kromosom som følge af tensvækkelse og/eller mitotisk non-disjunction påvises i MLA. En kombination af cytogenetisk og molekylær analyse viser nemlig klart, at nogle MLA *TK*-mutanter er resultatet af non-disjunction. "Weight of evidence"-analysen viser imidlertid, at *TK*-genmutationstest ikke pålideligt kan påvise aneugener ved anvendelse af standardcytotoksicitetskriterier (som beskrevet i denne forsøgsmetode), og derfor er det ikke hensigtsmæssigt at anvende disse test til at påvise aneugener (7)(8)(9).

4. I *TK*-genmutationstest genereres der to tydelige fænotypiske klasser af *TK*-mutanter: de normalt voksende mutanter, som vokser med samme hastighed som heterozygotiske *TK*-celler, og langsomt voksende mutanter, der vokser med længere fordoblingstider. De normalt voksende og langsomt voksende mutanter anerkendes som mutanter i både store og små kolonier i MLA og som mutanter i en tidligt fremkommen koloni og mutanter i en sent fremkommen koloni i TK6. Den molekylære og cytogenetiske karakter af MLA-mutanter i både store og små kolonier er blevet udforsket i detaljer (8)(10)(11)(12)(13). Den molekylære og cytogenetiske karakter af tidligt fremkomne og sent fremkomne TK6-mutanter er også blevet grundigt undersøgt (14)(15)(16)(17). Langsomt voksende mutanter for begge celletyper har lidt genetiske skader, der formentlig indebærer vækstregulerende gen(er) i nærheden af *TK*-locus, hvilket resulterer i længere fordoblingstider og dannelse af sent fremkomne eller små kolonier (18). Induktion af langsomt voksende mutanter er sat i forbindelse med kemikalier, som fremkalder større strukturelle ændringer på kromosomniveau. Celler, hvis skade ikke indebærer formodede vækstregulerende gener i nærheden af *TK*-locus, vokser med omtrent samme hastighed som modercellerne og bliver normalt voksende mutanter. Induktion af primært normalt voksende mutanter er sat i forbindelse med kemikalier, der primært fungerer som punktmutagener. Det er derfor væsentligt at tælle både langsomt voksende og normalt voksende mutanter med henblik på at genvinde alle mutanterne og skabe indsigt i, hvilke(n) type(r) skade (mutagener mod klastogener), testkemikaliets fremkalder (10)(12)(18)(19).
5. Forsøgsmetoden i testvejledningen er organiseret, så den giver generelle oplysninger, som gælder for både MLA og TK6 samt specialiseret vejledning til individuelle test.
6. De anvendte definitioner er forklaret i tillæg 1.

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER

7. Normalt kræver en *in vitro*-test anvendelse af en kilde til eksogen metabolisk aktivering. Det eksogene metaboliske aktiveringssystem efterligner ikke *in vivo*-betingelserne fuldstændig.
8. Man bør omhyggeligt undgå betingelser, der kan føre til et artefakt positivt resultat (dvs. eventuel interaktion med testsystemet), der ikke skyldes interaktion mellem testkemikaliet og cellens genetiske materiale, men omfatter ændringer i pH eller osmolalitet, interaktion med mediets komponenter (20) (21) eller for højt cytotoxicitetsniveau (22)(23)(24). Et cytotoxicitetsniveau, der er højere end det højest anbefalede cytotoxicitetsniveau, jf. punkt 28, anses for at være for højt til MLA og TK6. Endvidere skal det bemærkes, at testkemikalier, som er thymidinanaloge eller har en adfærd som thymidinanaloge kan øge mutantfrekvensen gennem selektiv vækst af de spontane baggrundsmutanter under cellebehandling og kræver supplerende forsøgsmetoder for at sikre en tilstrækkelig vurdering (25).
9. For fremstillede nanomaterialer kan der være behov for særlige tilpasninger af denne forsøgsmetode, men disse er ikke beskrevet i forsøgsmetoden.
10. Før forsøgsmetoden anvendes til at teste en blanding for at generere data til lovmæssige formål, bør det overvejes, om den vil give resultater, som er egnede til formålet, og i givet fald hvorfor. Sådanne overvejelser er ikke nødvendige, når der foreligger et myndighedskrav om test af blandingen.
11. Mutantceller, som mangler i thymidin-kinase-enzymaktiviteten på grund af en $TK^{+/-}$ til $TK^{-/-}$ -mutation, er resistente over for de cytostatiske virkninger af den pyrimidinanaloge trifluorthymidin (TFT). Celler, som indeholder TK , er følsomme over for TFT, som inhiberer cellemetabolismen og standser den videre celledeling. Det betyder, at mutantceller kan formere sig under tilstedeværelse af TFT og danne synlige kolonier, mens celler, der indeholder TK -enzym, ikke kan.

PRINCIP FOR TESTEN

12. Celler i suspensionskultur eksponeres for testkemikaliet både med og uden eksogen metabolisk aktivering (se punkt 19) i et passende tidsrum (jf. punkt 33), hvorefter der ved dyrkning i subkultur bestemmes cytotoxisk effekt og gives mulighed for fænotypeekspression, inden mutanterne udvælges. Cytotoxisk effekt bestemmes ved relativ total vækst (RTG – jf. punkt 25) for MLA og ved relativ overlevelse (RS – jf. punkt 26) for TK6. De behandlede kulturer bibeholdes så lang tid i dyrkningsmediet, afhængigt af hver celletype (jf. punkt 37), at fænotypeekspressionen af inducerede mutationer bliver næsten optimal. Efter fænotypeekspressionen bestemmes mutantfrekvensen ved udsåning af et kendt antal celler i et dyrkningsmedium med

det selektive stof til påvisning af mutantkolonier og i et medium uden selektivt stof til bestemmelse af kloningseffektivitet (levedygtigheden). Efter en passende inkuberingstid tælles kolonierne. Mutantfrekvensen beregnes ud fra antallet af mutantkolonier korregeret for kloningseffektiviteten på tidspunktet for mutantudvælgelsen.

BESKRIVELSE AF METODEN

Forberedelser

Celler

13. For MLA: Da MLA blev udviklet og karakteriseret ved hjælp af underlinje $TK^{+/-}$ - 3.7.2C af L5178Y-celler, skal denne specifikke underlinje anvendes til MLA. L5178Y-cellelinjen blev udledt af et methylcholanthren-induceret thymisk lymfom fra en DBA-2-mus (26). Clive behandlede sammen med sine medarbejdere L5178Y-celler (af Clive betegnet som $TK^{+/-}$ -3) med ethylmethansulfonat og isolerede en $TK^{-/-}$ -klon (betegnet som $TK^{-/-}$ -3,7) ved hjælp af bromdeoxyuridin som det selektive stof. Fra $TK^{-/-}$ klonen blev der isoleret og karakteriseret en spontan $TK^{+/-}$ -klon (benævnt $TK^{+/-}$ -3.7.2.) og en underklon (benævnt $TK^{+/-}$ -3.7.2C) til brug i MLA (27). Karyotypen for cellelinjen er blevet offentliggjort (28)(29)(30)(31). Det normale kromosomtal er 40. Der er et metacentrisk kromosom (t12,13), som bør tælles som ét kromosom. Musens *TK*-locus ligger i blomsterenden af kromosom 11. L5178Y $TK^{+/-}$ - 3.7.2C-cellelinjen har mutationer i begge p53-alleler og producerer mutant-p53 protein (32) (33). Testens evne til at påvise omfattende skade skyldes formentlig $TK^{+/-}$ -3.7.2C-cellelinjens p53-status (17).
14. For TK6: TK6 er en human lymfoblastcellelinje. Modercellelinjen er en Epstein-Barr-virustransformeret cellelinje, WI-L2, som oprindeligt blev udledt af en femårig dreng med arvelig spherocytose. Den første isolerede klon, HH4, blev mutageniseret med ICR191, og der blev genereret en *TK* heterozygotisk cellelinje, TK6, (34). TK6-celler er næsten diploide, og den repræsentative karyotype er 47, XY, 13+, t(14, 20), t(3, 21) (35). Det humane *TK*-locus ligger på den lange arm af kromosom 17. TK6 er en p53-kompetent cellelinje, fordi den har en vildtype p53-sekvens i begge alleler og kun udtrykker p53-protein af vildtypen (36).
15. For både MLA og TK6 anbefales det, at forsøgslaboratoriet – når det første gang etablerer eller erstatter en stamkultur – sikrer sig, at der ikke er nogen *mykoplasma*-kontaminering, karyotyperer cellerne eller maler de kromosomer, som huser *TK*-locus, og kontrollerer populationens fordoblingstider. Den normale celledelingstid for celler, der anvendes i laboratoriet, fastslås og bør være i overensstemmelse med de offentliggjorte celleegenskaber (16)(19)(37). Denne stamkultur opbevares ved -150 °C eller derunder og anvendes til at fremstille alle arbejdscellekulturer.

16. Enten forud for etablering af en lang række kryopræservede arbejdskulturer eller lige før anvendelsen i et forsøg kan det være nødvendigt at rense kulturen for allerede eksisterende mutantceller [med mindre mutantfrekvensen (MF) i kontrolkulturen med opløsningsmiddel allerede ligger inden for det acceptable område – jf. tabel 2 med hensyn til MLA]. Dette opnås ved hjælp af methotrexat (aminopterin) til at fravælge celler, der mangler TK, og tilsætte thymidin, hypoxanthin og glycin (L5178Y) eller 2'-deoxycytidin (TK6) til kulturen for at sikre optimal vækst af de TK-kompetente celler (19)(38)(39), og (40) for TK6. Der kan findes generel rådgivning om god praksis for vedligeholdelse af cellekulturer samt specifik rådgivning for L5178Y- og TK6-celler i (19)(31)(37)(39)(41). For laboratorier, som har brug for stamcellekulturer til indledning af enten MLA eller TK6 eller ønsker nye stamcellekulturer, findes der et register over velkarakteriserede celler (37).

Medier og dyrkningsbetingelser

17. Til vedligeholdelse af kulturene bør der til begge test anvendes egnede dyrkningsmedier og inkubationsbetingelser (f.eks. dyrkningsskåle, fugtig atmosfære på 5 % CO₂, inkubationstemperatur på 37 °C). Cellekulturer bør altid vedligeholdes under betingelser, der sikrer, at de vokser i logfase. Det er især vigtigt at vælge medier og dyrkningsbetingelser, som sikrer optimal cellevækst i ekspressionsperioden og under kloning for både mutantceller og ikke-mutantceller. For MLA og TK6 er det også vigtigt, at dyrkningsbetingelserne sikrer optimal vækst af både den store koloni/tidlige fremkomst og den lille koloni/sene fremkomst af TK-mutanter. Nærmere oplysninger om dyrkning, bl.a. behovet for at opvarme inaktivt hesteserum korrekt, hvis der anvendes RPMI-medium under mutantudvælgelsen, kan findes i (19)(31)(38)(39)(40)(42).

Fremstilling af kulturer

18. Celler opformeres fra stamkulturer, udsås i dyrkningsmedium med en sådan tæthed, at suspensionskulturer vil fortsætte med at vokse eksponentielt i behandlings- og ekspressionsperioderne.

Metabolisk aktivering

19. Der bør anvendes eksogene metaboliserende systemer, når der gøres brug af L5178Y- og TK6-celler, fordi de har utilstrækkelige endogene metaboliske egenskaber. Det mest almindeligt anvendte system, der anbefales som standard, medmindre der er begrundelse for andet, er en cofaktorsuppleret postmitochondriefraktion (S9), som fremstilles af leveren fra gnavere (normalt rotter), der er behandlet med enzyminducerende stoffer såsom Aroclor 1254 (43)(44)(45) eller en blanding af phenobarbital og β -naphthoflavon (46)(47)(48)(49)(50)(51). Sidstnævnte blanding er ikke i strid med Stockholmkonventionen om persistente organiske miljøgifte (52) og har vist sig at være lige så effektiv som Aroclor 1254 til induktion af oxidaser med

blandet funktion (45)(46)(47)(48)(49). S9-fraktionen anvendes normalt i en koncentration på 1-2 %, men kan øges til 10 % (v/v) i det færdige testmedium. Valget af type og koncentration af eksogent metabolisk aktiveringssystem eller anvendte metaboliske inducerende stoffer kan påvirkes af gruppen af testkemikalier.

Præparering af testkemikaliet

20. Testkemikalier i fast form bør præpareres i passende opløsningsmidler og eventuelt fortyndes inden behandling af cellerne (jf. punkt 21). Testkemikalier i væskeform kan enten tilsættes direkte til testsystemet og/eller fortyndes inden behandlingen af testsystemet. Gasser og flygtige testkemikalier bør testes ved passende modifikation af standardprotokollerne, f.eks. behandling i forseglede dyrkningsskåle (53)(54)(55). Testkemikaliet bør fremstilles lige inden behandlingen, medmindre det via stabilitetsdata påvises, at opbevaring er acceptabelt.

TESTBETINGELSER

Opløsningsmidler

21. Der vælges et opløsningsmiddel, der optimerer testkemikaliets opløselighed uden at påvirke testforløbet negativt, f.eks. i form af en ændring af cellevækst, påvirkning af testkemikaliets integritet, reaktion med dyrkningsskåle eller blokering af metabolismeaktiveringssystemet. Det anbefales så vidt muligt først at overveje at anvende et vandigt opløsningsmiddel (eller dyrkningsmedium). Veletablerede opløsningsmidler er vand eller dimethylsulfoxid. Organiske opløsningsmidler bør generelt ikke overstige 1 % (v/v), og vandige opløsningsmidler (fysiologisk saltopløsning eller vand) bør ikke overstige 10 % (v/v) i det færdige behandlingsmedium. Hvis der anvendes andet end ikke-veletablerede opløsningsmidler (f.eks. ethanol eller acetone), bør disse underbygges af data om deres kompatibilitet med testkemikalierne, testsystemet og fraværet af genetisk toksicitet ved den anvendte koncentration. Uden disse understøttende data er det vigtigt at medtage ubehandlede kontroller (jf. tillæg 1, Definitioner) for at påvise, at det valgte opløsningsmiddel ikke forårsager skadevirkninger eller mutagene virkninger.

MÅLING AF CYTOTOKSISK EFFEKT OG VALG AF DOSISKONCENTRATIONER

22. Ved valg af højeste koncentration af testkemikaliet bør koncentrationer, der kan frembringe artefakt positiv respons, undgås, f.eks. koncentrationer, der frembringer for høj cytotoksisk effekt (jf. punkt 28), udfældning i dyrkningsmediet (jf. punkt 29) eller væsentlige ændringer i pH eller osmolalitet (jf. punkt 8). Hvis testkemikaliet frembringer en væsentlig ændring i mediets pH på tilsætningstidspunktet, kan pH-

værdien justeres ved buffering af det endelige behandlingsmedium for at undgå artefakt positive resultater og for at opretholde passende dyrkningsbetingelser.

23. Valget af koncentration baseres på cytotoxisk effekt og andre overvejelser (jf. punkt 27-30). Evaluering af cytotoxisk effekt i en indledende test kan være nyttig for at sikre en bedre definition af de koncentrationer, der skal anvendes i hovedforsøget, men en indledende test er ikke påkrævet. Selv om der foretages en indledende vurdering af den cytotoxiske effekt, skal denne stadig måles i hovedforsøget for hver enkelt kultur. Hvis der udføres et forsøg til bestemmelse af dosisinterval, bør det dække en bred vifte af koncentrationer og kan enten afsluttes på dag 1 efter behandling eller gennemføres under den to dage lange ekspression og til mutantudvælgelsen (hvis det skulle vise sig, at de anvendte koncentrationer er egnede).
24. Cytotoxisk effekt bør bestemmes for hver enkelt testkultur og kontrolkultur, idet metoder for MLA (2) og TK6 (15) defineres ved internationalt aftalt praksis.
25. For både agar- og mikrobørndversionerne af MLA: Cytotoxisk effekt vurderes ved hjælp af relativ total vækst (RTG), som oprindeligt blev defineret af Clive og Spector i 1975 (2). Dette mål omfatter den relative suspensionsvækst (RSG: testkultur over for kontrolkultur med opløsningsmiddel) under cellebehandlingen, ekspressionstiden og den relative kloningseffektivitet (RCE: testkultur over for kontrolkultur med opløsningsmiddel) på det tidspunkt, hvor der vælges mutanter (2). Det skal bemærkes, at RSG omfatter ethvert celletab, som opstår i testkulturen under behandling (jf. formelen i tillæg 2).
26. For TK6: Cytotoxisk effekt bør evalueres ved anvendelse af relativ overlevelse (RS), dvs. cellernes kloningseffektivitet, når de udplades umiddelbart efter behandling, justeret for ethvert celletab under behandlingen baseret på celletal sammenholdt med den negative kontrol (med en overlevelseshundredprocent på 100) (jf. formelen i tillæg 2).
27. Mindst fire testkoncentrationer (bortset fra opløsningsmiddel og positive kontroller), der opfylder acceptkriterierne (egnet cytotoxisk effekt, antal celler mv.), bør vurderes. Selv om det anbefales at benytte dobbeltbestemmelse, kan der ved hver af de testede koncentrationer også anvendes replikater eller enkelte behandlede kulturer. De resultater, der opnås for replikater kulturer ved en given koncentration, bør rapporteres separat, men kan samles med henblik på dataanalyse (55). For testkemikalier, der udviser ringe eller ingen cytotoxisk effekt, vil koncentrationsintervaller på ca. 2 til 3 fold normalt være egnede. Hvis der forekommer cytotoxisk effekt, bør de valgte koncentrationer dække et cytotoxicitetsområde fra det, der frembringer cytotoxisk effekt som beskrevet i punkt 28, til koncentrationer, hvor der er moderat og ringe eller ingen cytotoxisk effekt. Mange testkemikalier udviser kraftige koncentration/respons-kurver, og for at

dække hele cytotoxicitetsområdet eller undersøge koncentration/respons-forholdet nærmere kan det være nødvendigt at bruge mere samlede koncentrationer og mere end fire koncentrationer, navnlig i situationer, hvor der er behov for at gentage forsøget (jf. punkt 70). Det kan være særligt vigtigt at bruge mere end fire koncentrationer, når der anvendes enkeltkulturer.

28. Hvis den maksimale koncentration er baseret på cytotoxisk effekt, bør den højeste koncentration sigte mod at nå mellem 20 og 10 % RTG for MLA og mellem 20 og 10 % RS for TK6 (punkt 67).
29. For tungtopløselige testkemikalier, der ikke er cytotoxiske ved lavere koncentrationer end den laveste uopløselige koncentration, bør den højeste analyserede koncentration producere uklarheder eller bundfald, som er synligt med det blotte øje eller i et inverteret mikroskop efter afslutningen af behandlingen med testkemikaliets. Selv om der forekommer cytotoxisk effekt over den laveste uopløselige koncentration, tilrådes det at gennemføre testen ved kun én koncentration, der frembringer uklarhed eller synligt bundfald, fordi artefakte virkninger kan skyldes bundfaldet. Da der ved MLA og TK6 anvendes suspensionskulturer, bør det omhyggeligt sikres, at bundfaldet ikke griber forstyrrende ind i udførelsen af testen. Det kan også være nyttigt at bestemme opløseligheden i dyrkningsmediet inden forsøget.
30. Hvis der ikke observeres bundfald eller begrænsende cytotoxisk effekt, bør testkoncentrationen højst være 10 mM, 2 mg/ml eller 2 µl/ml (den laveste af de tre) (57) (58). Hvis testkemikaliets sammensætning ikke er defineret, f.eks. et stof af ukendt eller variabel sammensætning, komplekse reaktionsprodukter eller biologiske materialer (dvs. kemiske stoffer af ukendt eller variabel sammensætning (UVCB'er)), miljømæssige udtræk mv., kan der være behov for at øge den højeste koncentration (f.eks. 5 mg/ml) ved manglende tilstrækkelig cytotoxisk effekt for at øge koncentrationen af hver af komponenterne. Det bør dog bemærkes, at disse krav kan variere for humanlægemidler (59).

Kontroller

31. Der bør under alle forsøgsbetingelser indgå samtidige negative kontroller (jf. punkt 21), hvor behandlingsmediet kun består af opløsningsmiddel, og som behandles på samme måde som de øvrige kulturer.
32. Der skal foretages samtidige positive kontroller for at påvise laboratoriets evne til at identificere mutagener i henhold til testprotokollen, påvise effektiviteten af det eksogene metabolismeaktiveringssystem, hvor det er relevant, og i tilstrækkelig grad påvise både små/sent fremkomne og store/tidligt fremkomne *TK*-mutanter. Eksempler på positive kontroller er anført i tabel 1 nedenfor. Alternative positive kontrolstoffer

kan anvendes, hvis der er belæg for det. Eftersom in vitro-test af pattedyrceller for genetisk toksicitet er tilstrækkeligt standardiserede til kortvarige behandlinger (3-4 timer), der udføres samtidig med og uden metabolisk aktivering af samme behandlingsvarighed, kan brugen af positive kontroller begrænses til en mutagenkrævende metabolisk aktivering. I dette tilfælde vil denne ene positive kontrolrespons påvise såvel aktiviteten i metabolismeaktiveringssystemet som testsystemets reaktionsevne. Anvendes der langtidsbehandling (dvs. 24 timer uden postmitochondrisk fraktion), bør den dog have sin egen positive kontrol, da behandlingens varighed er forskellig fra testen med metabolisk aktivering. Hver positiv kontrol bør anvendes ved en eller flere koncentrationer, der forventes at give reproducerbare og påviselige forøgelser i forhold til baggrundsværdierne, for at påvise testsystemets følsomhed, og responsen bør ikke bringes i fare på grund af en cytotoxisk effekt, der overstiger grænserne i denne TM (jf. punkt 28).

Tabel 1: Anbefalede referencestoffer til vurdering af laboratoriets kompetence og udvælgelse af positive kontroller.

Kategori	Stof	CAS RN
1. Aktive mutagener uden metabolisk aktivering		
Methylmethansulfonat	66-27-3	
Mitomycin C	50-07-7	
4-nitroquinolin-N-oxid	56-57-5	
2. Mutagener, som kræver metabolisk aktivering		
Benzo(a)pyren	50-32-8	
Cyclophosphamidmonohydrat	50-18-0 (6055-19-2)	
7,12-dimethylbenzanthracen	57-97-6	
3-methylcholanthren	56-49-5	

FREM GANGSMÅDE

Behandling med testkemikalie

33. Celler under formering behandles med testkemikali et med og uden tilstedeværelse af et metabolismeaktiveringssystem. Eksponeringen skal være et passende stykke tid (normalt er 3-4 timer passende). Det bør dog bemærkes, at disse krav kan variere for humanlægemidler (59). I tilfælde, hvor kortvarig behandling med MLA giver negative resultater, og der foreligger oplysninger, som tyder på, at der er behov for længere behandling (f.eks. nukleosidanaloger, tungt opløselige kemikalier (5)(59)), bør det overvejes at udføre testen med længere behandling, dvs. 24 timer uden postmitochondrisk fraktion.

34. Det antal celler, der mindst skal anvendes til hver testkultur (kontrol og behandling) i hver enkelt testfase, bør baseres på den spontane mutantfrekvens. En generel vejledning er at behandle og opformere et tilstrækkeligt antal celler i hver forsøgskultur for at bevare mindst 10, men ideelt set 100, spontane mutanter i alle faser af testen (behandling, fænotypeekspression og mutantudvælgelse (56).
35. For MLA ligger den anbefalede acceptable spontane mutantfrekvens mellem $35-140 \times 10^{-6}$ (agarversion) og $50-170 \times 10^{-6}$ (mikrobrøndversion) (jf. tabel 2). For at have mindst 10 og ideelt set 100 spontane mutanter, der overlever behandling for hver testkultur, er det nødvendigt at behandle mindst 6×10^6 celler. Behandling af dette antal celler og bibeholdelse af et tilstrækkeligt antal celler under ekspression og kloning til mutantudvælgelse sikrer et tilstrækkeligt antal spontane mutanter (10 eller derover) i alle faser af forsøget, selv for kulturer, som behandles ved koncentrationer, der resulterer i 90 % cytotoxisk effekt (som målt ved en RTG på 10 %) (19)(38)(39).
36. For TK6 ligger den spontane mutantfrekvens generelt mellem 2 og 10×10^{-6} . For at have mindst 10 spontane mutanter, der overlever behandling for hver kultur, er det nødvendigt at behandle mindst 20×10^6 celler. Behandling af dette antal celler giver et tilstrækkeligt antal spontane mutanter (10 eller derover), selv for kulturer behandlet ved koncentrationer, der forårsager 90 % cytotoxisk effekt under behandling (10 % RS). Endvidere skal der dyrkes et tilstrækkeligt antal celler i ekspressionsperioden, som udplades til mutantudvælgelse (60).

Fænotypeekspressionsperiode og måling af cytotoxisk effekt og mutantfrekvens

37. Ved afslutningen af behandlingsperioden dyrkes celler i en fastsat periode for at give mulighed for en næsten optimal fænotypeekspression af nyligt inducerede mutanter, som er specifikke for hver enkelt cellelinje. For MLA varer fænotypeekspressionsperioden 2 dage. For TK6 varer fænotypeekspressionsperioden 3-4 dage. Hvis der anvendes en 24-timers behandling, begynder ekspressionsperioden efter behandlingens afslutning.
38. I fænotypeekspressionsperioden optælles cellerne dagligt. For MLA benyttes de daglige celletællinger til at beregne den daglige suspensionsvækst (SG). Efter den to dage lange ekspressionsperiode suspenderes cellerne i dyrkningsmedium med og uden selektivt stof med henblik på henholdsvis bestemmelse af antallet af mutanter (selektionsplader) og kloningseffektivitet (levedygtighedsplader). For MLA findes der to lige acceptable metoder til udvælgelse af mutanter til kloning: ved den ene anvendes agar, og ved den anden flydende vækstmedium på plader med 96 brønde (19)(38)(39). Kloning i TK6 udføres ved hjælp af flydende medier og plader med 96 brønde (16).

39. Trifluorthymidin (TFT) er det eneste selektive stof, der anbefales til *TK*-mutanter (61).
40. For MLA tælles agarplader og mikrobørndplader efter 10-12 dages inkubation. For TK6 registreres kolonier på mikrobørndplader efter 10-14 dage for tidligt fremkomne mutanter. For at nyttiggøre de langsomt voksende (sent fremkomne) TK6-mutanter er det nødvendigt at fodre cellerne igen med dyrkningsmedium og TFT efter optælling af de tidligt fremkomne mutanter og herefter inkubere pladerne i yderligere 7-10 dage (62). Se punkt 42 og 44 for en diskussion af optællingen af langsomt og normalt voksende *TK*-mutanter.
41. De korrekte beregninger for de to test, herunder de to metoder (agar og mikrobørnd) til MLA, findes i tillæg 2. Til agarmetoden for MLA tælles kolonier, og antallet af mutantkolonier justeres ved kloningseffektiviteten for at beregne en MF. Til mikrobørndversionen af MLA og TK6 bestemmes kloningseffektiviteten både for selektions- og kloningseffektivitetspladerne i overensstemmelse med Poissonfordelingen (63). MF beregnes på grundlag af disse to kloningseffektiviteter.

Karakterisering af mutantkolonier

42. Hvis testkemikaliet for MLA er positivt (jf. punkt 62-63), udføres kolonikarakterisering ved bestemmelse af kolonistørrelse eller vækst i mindst én af testkulturene (normalt den højeste acceptable positive koncentration) og i de negative og positive kontrolkulturer. Er testkemikaliet negativt (jf. punkt 64) udføres karakteriseringen af mutantkolonien i de negative og positive kontrolkulturer. Ved mikrobørndmetoden for MLA defineres mutanter fra små kolonier som dem, der dækker under 25 % af brøndens diameter, og mutanter fra store kolonier som dem, der dækker over 25 % af brøndens diameter. Ved agarmetoden benyttes en automatisk kolonitæller til at optælle mutantkolonier og bestemme kolonistørrelse. Metoder til bestemmelse af kolonistørrelse er nærmere beskrevet i litteraturen (19)(38)(40). Karakterisering af kolonier på den negative og positive kontrol er nødvendig for at påvise, at undersøgelserne er foretaget korrekt.
43. Testkemikaliet kan ikke bestemmes til at være negativt, hvis mutanterne fra både de store og små kolonier ikke er tilstrækkeligt påvist i den positive kontrol. Karakterisering af kolonier kan give generelle oplysninger om testkemikaliets evne til at forårsage punktmutationer og/eller kromosomale hændelser (punkt 4).
44. TK6: Normalt voksende og langsomt voksende mutanter differentieres ved en forskel i inkubationstid (jf. punkt 40). For TK6 registreres både de tidligt og sent fremkomne mutanter for alle kulturerne, herunder de negative og positive kontroller. Kolonikarakterisering af den negative og positive kontrol er nødvendig for at påvise, at undersøgelserne foretages korrekt. Testkemikaliet kan ikke bestemmes til at være

negativt, hvis både de tidligt fremkomne og sent fremkomne mutanter ikke er tilstrækkeligt påvist i den positive kontrolkultur. Karakterisering af kolonier kan give generelle oplysninger om testkemikaliets evne til at forårsage punktmutationer og/eller kromosomale hændelser (punkt 4).

Laboratoriets kompetencer

45. For at påvise tilstrækkelig erfaring med testen, før den tages i brug til rutinetest, bør laboratoriet have udført en række forsøg med positive referencekemikalier, som virker via forskellige mekanismer (mindst et aktivt med og et aktivt uden metabolisk aktivering udvalgt blandt kemikalierne i tabel 1), og forskellige negative kontroller (herunder ubehandlede kulturer og forskellige opløsningsmidler/bærestoffer). Disse positive og negative kontrolresponsen bør være i overensstemmelse med litteraturen. Dette krav gælder ikke for laboratorier, der har erfaring, dvs. som har en historisk database til rådighed som defineret i punkt 47-50. For MLA bør de værdier, som er opnået for både positive og negative kontroller, være i overensstemmelse med IWGT's anbefalinger (jf. tabel 2).
46. Et udvalg af positive kontrolstoffer (jf. tabel 1) bør undersøges med korte og lange behandlinger (hvis der benyttes lange behandlinger) uden metabolisk aktivering og også med kort behandling med metabolisk aktivering med henblik på at påvise evnen til at spore mutagene kemikalier, bestemme effektiviteten af metabolismeaktiveringssystemet og påvise cellevækstbetingelsernes egnethed under behandling, fænotypeekspression og mutantudvælgelse samt bedømmelsesprocedurernes egnethed. Der bør vælges en række koncentrationer af de udvalgte stoffer, som giver en reproducerbar og koncentrationsafhængig stigning over baggrunden for at påvise testsystemets følsomhed og dynamiske rækkevidde.

Historiske kontroldata

47. Laboratoriet bør fastlægge:
 - et historisk positivt kontrolområde og en historisk positiv kontrolfordeling
 - et historisk negativt (ubehandlet, opløsningsmiddel) kontrolområde og en historisk negativ kontrolfordeling.
48. Når der første gang indhentes data til en historisk negativ kontrolfordeling, bør de samtidige negative kontroller stemme overens med offentliggjorte negative kontroldata. Efterhånden som der tilføjes flere forsøgsdata til kontrolfordelingen, bør de samtidige negative kontroller ideelt set ligge inden for kontrolgrænsen på 95 % af denne fordeling (64)(65).
49. Laboratoriets database over historiske negative kontroller bør i første omgang opbygges med mindst 10 forsøg, men fortrinsvis bestå af mindst 20 forsøg udført

under sammenlignelige forsøgsbetingelser. Laboratorierne bør anvende kvalitetskontrolmetoder som f.eks. kontrolkort (f.eks. C-diagrammer eller X-søjlediagrammer (65)) til at fastslå, hvor variable deres positive og negative kontroldata er, samt vise, at metodologien er "under kontrol" i deres laboratorium (66). Yderligere oplysninger og anbefalinger om, hvordan de historiske data kan opbygges og bruges, kan findes i litteraturen (64).

50. Negative kontroldata bør bestå af mutantfrekvenser fra enkeltkulturer eller fortrinsvis fra replikate kulturer som beskrevet i punkt 27. Sideløbende negative kontroller bør ideelt set ligge inden for kontrolgrænsen på 95 % af fordelingen af laboratoriets historiske negative kontroldatabase. Såfremt data fra negative kontroller falder uden for kontrolgrænsen på 95 %, kan de eventuelt optages i den historiske kontrolfordeling, så længe disse data ikke er ekstreme afvigende værdier, der er dokumentation for, at testsystemet er "under kontrol" (jf. punkt 49), og for, at der ikke er begået tekniske eller menneskelige fejl.
51. Der bør tages hensyn til eventuelle ændringer af forsøgsprotokollen med hensyn til, om dataene stemmer overens med laboratoriets eksisterende historiske kontroldata. Ved større uoverensstemmelser bør der etableres en ny historisk kontroldatabase.

DATA OG RAPPORTERING

Præsentation af resultaterne

52. Præsentation af data for både MLA og TK6 bør for både behandlede kulturer og kontrolkulturer omfatte de nødvendige data til beregning af cytotoxisk effekt (henholdsvis RTG og RS) og mutantfrekvenser, som beskrevet nedenfor.
53. For MLA bør der anføres data for hver enkelt kultur for RSG, RTG, kloningseffektivitet på tidspunktet for mutantudvælgelsen og antallet af mutantkolonier (for agarversionen) eller antal tomme brønde (for mikrobøndversionen). MF opgives som antallet af mutantceller pr. én million overlevende celler. Hvis reaktionen er positiv, bør MF'er i små og store kolonier (og eller procentdelen af den samlede MF) angives for mindst én koncentration af testkemikaliet (normalt den højeste positive koncentration) og de negative og positive kontroller. I tilfælde af en negativ reaktion bør MF'er i små og store kolonier angives for den negative og den positive kontrol.
54. For TK6 anføres data for hver enkelt kultur for RS, kloningseffektivitet på tidspunktet for mutantudvælgelse og antallet af tomme brønde for tidligt fremkomne og sent fremkomne mutanter. MF udtrykkes som antal mutantceller pr. antal overlevende

celler og bør omfatte den samlede MF samt MF (og/eller procentdel af den samlede MF) af de tidligt og sent fremkomne mutanter.

Acceptkriterier

55. For både MLA og TK6 bør følgende kriterier opfyldes, før de samlede resultater for et specifikt testkemikalie bestemmes:

- To forsøgsbetingelser (kort behandling med og uden metabolisk aktivering – jf. punkt 33) blev gennemført, medmindre en af dem gav positive resultater.
- Antallet af analyserbare celler og koncentrationer er tilstrækkeligt (jf. punkt 27, 34-36).
- Kriterierne for valg af højeste koncentration er i overensstemmelse med kriterierne i punkt 28-30.

Acceptkriterier for negative og positive kontroller

56. Expert MLA Workgroup's analyse af en omfattende mængde MLA-data førte til international enighed om specifikke acceptkriterier for MLA (1)(2)(3)(4)(5). Derfor giver denne forsøgsmetode specifikke anbefalinger om bestemmelse af, om negative og positive kontroller kan accepteres, og om vurdering af resultater for individuelle stoffer i MLA. TK6 har en langt mindre database og er ikke blevet vurderet af en arbejdsgruppe.

57. For MLA bør hvert forsøg vurderes med hensyn til, om den ubehandlede kontrolkultur/kontrolkultur med opløsningsmiddel opfylder IWGT MLA Workgroup's acceptkriterier ((4) og tabel 2, nedenfor) for: (1) MF (bemærk, at IWGT's acceptable MF'er er forskellige for agar- og mikrobrøndversionerne af MLA), (2) kloningseffektivitet (CE) på tidspunktet for mutantudvælgelse og (3) suspensionsvækst (SG) for kontrolkulturen med opløsningsmiddel (jf. formlen i tillæg 2).

Tabel 2: Acceptkriterier for MLA

Parameter	Metode med blød agar	Mikrobrøndmetode
Mutantfrekvens	35-140 x 10 ⁻⁶	50-170 x 10 ⁻⁶
Kloningseffektivitet	65-120 %	65-120 %
Suspensionsvækst:	8-32 fold (3-4 timers behandling) 32-180 fold (24 timers behandling, hvis den gennemføres)	8-32 fold (3-4 timers behandling) 32-180 fold (24 timers behandling, hvis den gennemføres)

58. Ved MLA bør hver test også vurderes med hensyn til, om de positive kontroller opfylder mindst ét af følgende to acceptkriterier, der er udviklet af IWGT-arbejdsgruppen:
- Den positive kontrol bør påvise en absolut stigning i den samlede MF, dvs. en stigning over den spontane baggrunds-MF (en induceret MF (IMF)) på mindst 300×10^{-6} . Mindst 40 % af IMF bør afspejles i MF for den lille koloni.
 - Den positive kontrol har en stigning i den lille MF-koloni på mindst 150×10^{-6} over det, der observeres i den samtidige ubehandlede kontrolkultur/kontrolkulturen med opløsningsmiddel (en lille IMF-kultur på 150×10^{-6}).
59. Ved TK6 vil en test kunne godtages, hvis den samtidige negative kontrol betragtes som acceptabel som supplement til laboratoriets historiske negative kontrolldatabase som beskrevet i punkt 48-49. Endvidere bør de sideløbende positive kontroller (jf. punkt 32) fremkalde responser, der er forenelige med responserne i den historiske positive kontrolldatabase, og medføre en statistisk signifikant stigning sammenlignet med den sideløbende negative kontrol.
60. For begge test bør den øvre cytotoxicitetsgrænse, som er observeret i den positive kontrolkultur, være den samme som for forsøgskulturene. Dvs. at RTG/RS ikke bør ligge under 10 %. Det er tilstrækkeligt at anvende en enkelt koncentration (eller en af koncentrationerne fra de positive kontrolkulturer, hvis der anvendes mere end én koncentration) til at påvise, at acceptkriterierne for den positive kontrol er blevet opfyldt. Yderligere skal MF for den positive kontrol ligge inden for det acceptable område, der er fastsat for laboratoriet.

Vurdering og fortolkning af resultater

61. For MLA er der udført et betydeligt arbejde om biologisk relevans og kriterier for en positiv respons af Mouse Lymphoma Expert Workgroup under IWGT (4). Derfor giver denne forsøgsmetode specifikke anbefalinger til fortolkning af testkemikalieresultaterne fra MLA (jf. punkt 62-64). TK6 har en langt mindre database og er ikke blevet vurderet af en arbejdsgruppe. Derfor formuleres anbefalingerne til fortolkning af data for TK6 i mere generelle vendinger (jf. punkt 65-66). Supplerende anbefalinger gælder for begge test (jf. punkt 67-71).

MLA

62. En metode til at definere positive og negative responser anbefales for at sikre, at den øgede MF er biologisk relevant. I stedet for statistisk analyse, som normalt benyttes til andre test, bygger den på anvendelse af forud induceret mutantfrekvens (dvs. øget MF over sideløbende kontrol), der betegnes den samlede vurderingsfaktor (GEF), som er baseret på analyse af data om fordelingen af den negative kontrol-MF fra deltagende

laboratorier (4). For agarversionen af MLA er $GEF = 90 \times 10^{-6}$, og for mikrobrøndversionen af MLA er $GEF = 126 \times 10^{-6}$.

63. Forudsat at alle acceptkriterier er opfyldt, anses et testkemikalie for at være klart positivt, hvis stigningen i MF over den sideløbende baggrund under en af de undersøgte forsøgsbetingelser (jf. punkt 33) overstiger GEF, og stigningen er koncentrationsafhængig (f.eks. under anvendelse af en trendtest). Testkemikalien anses herefter for at kunne fremkalde mutation i dette testsystem.
64. Forudsat at alle acceptkriterier er opfyldt, anses et testkemikalie for at være klart negativt, hvis der under alle de undersøgte forsøgsbetingelser (jf. punkt 33) ikke er nogen koncentrationsafhængig respons, eller, hvis der er en stigning i MF, den ikke overstiger GEF. Testkemikalien anses herefter for ikke at kunne fremkalde mutationer i dette testsystem.

TK6

65. Såfremt alle acceptkriterier er opfyldt, anses et testkemikalie for at være klart positivt, hvis følgende er opfyldt under en af de undersøgte forsøgsbetingelser (jf. punkt 33):
- mindst én af testkoncentrationerne udviser en statistisk signifikant stigning sammenlignet med den sideløbende negative kontrol
 - stigningen er koncentrationsafhængig, når den evalueres med en egnet trendtest (jf. punkt 33)
 - et eller flere af resultaterne ligger uden for fordelingen af de historiske negative kontrolldata (f.eks. den Poisson-baserede kontrolgrænse på 95 %, jf. punkt 48).

Når alle disse kriterier er opfyldt, anses testkemikalien for at kunne fremkalde mutation i dette testsystem. Anbefalinger til de mest hensigtsmæssige statistiske metoder kan findes i litteraturen (66)(67).

66. Såfremt alle acceptkriterier er opfyldt, anses et testkemikalie for at være klart negativt, hvis følgende er opfyldt under alle de undersøgte forsøgsbetingelser (jf. punkt 33):
- ingen af testkoncentrationerne udviser en statistisk signifikant stigning sammenlignet med den sideløbende negative kontrol
 - der ikke indtræder en koncentrationsafhængig stigning ved evaluering med en egnet trendtest
 - alle resultaterne ligger inden for fordelingen af de historiske negative kontrolldata (f.eks. den Poisson-baserede kontrolgrænse på 95 %). jf. punkt 48).

Testkemikalien anses herefter for ikke at kunne fremkalde mutationer i dette testsystem.

For både MLA og TK6:

67. Hvis den maksimale koncentration er baseret på cytotoxisk effekt, bør den højeste koncentration sigte mod at nå mellem 20 og 10 % RTG/RS. Der er enighed om, at der bør udvises omhu ved fortolkning af positive resultater, hvor der kun er fundet mellem 20 og 10 % RTG/RS, og et resultat vil ikke blive anset for at være positivt, såfremt stigningen i MF først opstod ved eller under 10 % RTG/RS (hvis det vurderes) (2)(59).
68. Der er nogle omstændigheder, hvor supplerende oplysninger kan være en hjælp til bestemmelsen af, at et testkemikalie ikke er et mutagen stof, når der ikke er nogen kultur, som viser en RTG-værdi mellem 10 og 20 % RTG/RS. Disse situationer er beskrevet i det følgende: (1) Der er ingen evidens for mutagenicitet (f.eks. ingen dosisrespons, ingen muantfrekevener over dem, der ses i den sideløbende negative kontrol eller historiske baggrundsområder osv.) i en række datapunkter inden for 100 % til 20 % RTG/RS, og der er mindst ét datapunkt mellem 20 og 25 % RTG/RS. (2) Der er ingen mutagenicitet (f.eks. ingen dosisrespons, ingen mutantfrekevener over dem, der ses i den sideløbende negative kontrol eller historiske baggrundsområder osv.) i en række datapunkter mellem 100 % til 25 % RTG/RS, og der er også et negativt datapunkt lidt over 10 % RTG/RS. I begge disse situationer kan det konkluderes, at testkemikaliets er negativt.
69. Der er ikke krav om verifikation af en klart positiv eller negativ respons.
70. Hvis responsen hverken er klart negativ eller klart positiv som beskrevet ovenfor og/eller for at bidrage til at fastslå den biologiske relevans af et resultat, bør dataene vurderes af eksperter, og/eller der bør foretages yderligere undersøgelser. Det kan være nyttigt at gennemføre et nyt forsøg, eventuelt med ændrede forsøgsbetingelser (f.eks. koncentrationsinterval for at øge sandsynligheden for at nå datapunkter inden for 10-20 % RTG/RS-området, ved hjælp af andre metabolismeaktiveringsbetingelser (dvs. S9-koncentration eller S9-oprindelse) og behandlingens varighed).
71. I sjældne tilfælde giver dataene selv efter yderligere undersøgelser ikke mulighed for at konkludere, om resultaterne er positive eller negative. Konklusionen er derfor, at testkemikalieresponsen er usikker (fortolkes på den måde, at der er lige stor sandsynlighed for, at den er positiv eller negativ).

TESTRAPPORT

72. Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie:

- oprindelse, batchnummer, sidste anvendelsesdato, hvis dette foreligger

- testkemikaliets stabilitet, hvis denne er kendt
- testkemikaliets opløselighed og stabilitet i opløsningsmidlet, hvis dette er kendt
- måling af pH-værdi, osmolalitet og bundfald i det dyrkningsmedium, som testkemikaliets blev tilsat, hvor det er relevant.

Stof med kun én bestanddel:

- fysisk udseende, vandopløselighed og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber
- kemisk identifikation, f.eks. IUPAC-navn eller CAS-navn, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel, renhed, kemisk identitet af urenheder, i det omfang det er relevant og praktisk muligt, osv.

Stof med flere bestanddele, UVCB-stoffer og blandinger:

- kendetegnet så vidt muligt ved kemisk identitet (jf. ovenfor), kvantitativ forekomst og bestanddelenes relevante fysisk-kemiske egenskaber.

Opløsningsmiddel:

- begrundelse for valg af opløsningsmiddel
- procentdel af opløsningsmiddel i det endelige dyrkningsmedium.

Celler:

For laboratoriets stamkulturer:

- celletype og oprindelse samt historie i testlaboratoriet
- karyotypiske karakteristika og/eller normalt kromosomtall
- metoder til opretholdelse af cellekulturer
- fravær af mykoplasma
- cellernes fordoblingstid.

Testbetingelser:

- begrundelse for valg af koncentrationer og antal cellekulturer, herunder f.eks. data om cytotoxisk effekt og opløselighedsbegrænsninger
- mediesammensætning, CO₂-koncentration, fugtighedsniveau
- testkemikaliets koncentration udtrykt som endelig koncentration i dyrkningsmediet (f.eks. µg eller mg/ml eller mM af dyrkningsmediet)
- koncentration (og/eller volumen) af opløsningsmiddel og tilsat testkemikalie i dyrkningsmediet

- inkubationstemperatur
- inkubationstid
- behandlingens varighed
- celletæthed under behandlingen
- metabolismeaktiveringssystemets type og sammensætning (kilde til S9, metode til fremstilling af den postmitochondriske fraktionsblanding (S9), koncentration eller rumfang af S9-blandingen og S9 i det endelige dyrkningsmedium, kvalitetskontrol af S9)
- positive og negative kontrolstoffer, endelige koncentrationer for hver behandlingsbetingelse
- ekspressionsperiodens længde (herunder antal udsåede celler, subkulturer og eventuel feeding)
- det selektive stofs identitet og koncentration
- for MLA anføres den anvendte version (agar eller mikrobørnd)
- kriterier for accept af testene
- metoder til tælling af levedygtige celler og mutantceller
- metoder til måling af cytotoxisk effekt
- eventuelle supplerende oplysninger vedrørende cytotoxisk effekt og anvendt metode
- inkubationstidens varighed efter udpladning
- definition af kolonier, hvor størrelse og type lægges til grund (herunder kriterier for, hvilke kolonier der er "små" og "store")
- kriterier for bedømmelse af undersøgelsen som positiv, negativ eller usikker
- anvendte metoder til bestemmelse af pH, osmolalitet, hvis den udføres, og bundfald, hvis det er relevant.

Resultater:

- antal behandlede celler og antal celler dyrket i subkultur for hver kultur
- toksicitetsparametre (RTG for MLA og RS for TK6)
- tegn på bundfald og tidspunkt for bestemmelse
- antal celler udpladet i selektivt og ikke-selektivt dyrkningsmedium
- antal kolonier i det ikke-selektive dyrkningsmedium og antal resistente kolonier i det selektive medium samt den tilhørende mutantfrekvens

- bestemmelse af størrelse for de negative og positive kontroller, og hvis testkemikaliet er positivt, mindst én koncentration og deraf afhængig mutantfrekvens
- koncentration/respons-sammenhængen, når det er muligt
- sideløbende negative (opløsningsmiddel) og positive kontroller (koncentrationer og opløsningsmidler)
- data for tidligere negative (opløsningsmiddel) og positive kontroller (koncentrationer og opløsningsmidler) med angivelse af intervaller, gennemsnit og standardafvigelser antal test, der danner grundlag for de historiske kontroller
- statistiske analyser (for de enkelte kulturer og eventuelt for samlede replikater) og eventuelle P-værdier og for MLA, GEF-vurderingen.

Diskussion af resultaterne

Konklusion

LITTERATUR

- (1) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J. (Rapporteur), Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cole, J., Gollapudi, B., Harrington-Brock, K., Mitchell, A., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., San, R., Shimada, H. og Stankowski, L.F. Jr. (2000). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus (TK) Gene Mutation Assay: International Workshop on Genotoxicity Test Procedures (IWGTP) Workgroup Report, *Environ. Mol. Mutagen.*, 35 (3): 185-190.
- (2) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Harrington-Brock, K., Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Collard, D., Fellows, M., Flanders, K., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Kraycer, J., McEnaney, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Oliver, Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Shimada, H. og Stankowski, L.F. Jr. (2002). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: Follow-Up International Workshop on Genotoxicity Test Procedures, New Orleans, Louisiana, (April 2000), *Environ. Mol. Mutagen.*, 40 (4): 292-299.
- (3) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Delongchamp, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A., Wakuri, S. og Yoshimura, I. (2003). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: International Workshop (Plymouth, UK) on Genotoxicity Test Procedures Workgroup Report, *Mutation Res.*, 540: 127-140.
- (4) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Delongchamp, R., Durward, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Lloyd, M., Majeska, J., Myhr, B., O'Donovan, M., Omori, T., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A.K., Van Goethem, F., Wakuri, S. og Yoshimura, I. (2006). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Gene Mutation Assay: Follow-Up Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Tests – Aberdeen, Scotland, 2003 – Assay Acceptance Criteria, Positive Controls, and Data Evaluation, *Environ. Mol. Mutagen.*, 47 (1): 1-5.
- (5) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Clay, P., Doppalapudi, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Muster, W., Pant, K., Kidd, D.A., Lorge, E., Lloyd, M., Myhr, B., O'Donovan, M., Riach, C., Stankowski, L.F. Jr., Thakur A.K. og Van Goethem, F. (2007). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Mutation Assay: Meeting of the International

Workshop on Genotoxicity Testing, San Francisco, 2005, Recommendations for 24-h Treatment, *Mutation Res.*, 627 (1): 36-40.

- (6) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Paris.
- (7) Fellows M.D., Luker, T., Cooper, A. og O'Donovan, M.R. (2012). Unusual Structure-Genotoxicity Relationship in Mouse Lymphoma Cells Observed with a Series of Kinase Inhibitors. *Mutation Res.*, 746 (1): 21-28.
- (8) Honma, M., Momose, M., Sakamoto, H., Sofuni, T. og Hayashi, M. (2001). Spindol Poisons Induce Allelic Loss in Mouse Lymphoma Cells Through Mitotic Non-Disjunction. *Mutation Res.*, 493 (1-2): 101-114.
- (9) Wang, J., Sawyer, J.R., Chen, L., Chen, T., Honma, M., Mei, N. og Moore, M.M. (2009). The Mouse Lymphoma Assay Detects Recombination, Deletion, and Aneuploidy, *Toxicol. Sci.*, 109 (1): 96-105.
- (10) Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A., og Hozier, J.C. (1990). Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. *Proc. National. Academy. Sci. USA*, 87 (1): 51-55.
- (11) Hozier, J., Sawyer, J., Moore, M., Howard, B. og Clive, D. (1981). Cytogenetic Analysis of the L5178Y/TK^{+/-} Leads to TK^{-/-} Mouse Lymphoma Mutagenesis Assay System, *Mutation Res.*, 84 (1): 169-181.
- (12) Hozier, J., Sawyer, J., Clive, D. og Moore, M.M. (1985). Chromosome 11 Aberrations in Small Colony L5178Y TK^{-/-} Mutants Early in their Clonal History, *Mutation Res.*, 147 (5): 237-242.
- (13) Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. og Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFTr) Mutants of L5178Y/TK^{+/-} Mouse Lymphoma Cells. *Mutation Res.*, 151 (1): 161-174.
- (14) Liber H.L., Call K.M. og Little J.B. (1987). Molecular and Biochemical Analyses of Spontaneous and X-Ray-Induced Mutants in Human Lymphoblastoid Cells. *Mutation Res.*, 178 (1): 143-153.
- (15) Li C.Y., Yandell D.W. og Little J.B. (1992). Molecular Mechanisms of Spontaneous and Induced Loss of Heterozygosity in Human Cells *In Vitro*. *Somat. Cell Mol. Genet.*, 18 (1): 77-87.

- (16) Honma M., Hayashi M. og Sofuni T. (1997). Cytotoxic and Mutagenic Responses to X-Rays and Chemical Mutagens in Normal and P53-Mutated Human Lymphoblastoid Cells. *Mutation. Res.*, 374 (1): 89-98.
- (17) Honma, M., Momose, M., Tanabe, H., Sakamoto, H., Yu, Y., Little, J.B., Sofuni, T. og Hayashi, M. (2000). Requirement of Wild-Type P53 Protein for Maintenance of Chromosomal Integrity. *Mol. Carcinogen.*, 28 (4): 203-14.
- (18) Amundson S.A. og Liber H.L. (1992). A Comparison of Induced Mutation at Homologous Alleles of the TK Locus in Human Cells. II. Molecular Analysis of Mutants. *Mutation Res.*, 267 (1): 89-95.
- (19) Schisler M.R., Moore M.M. og Gollapudi B.B. (2013). *In Vitro* Mouse Lymphoma (L5178Y TK^{+/+}-3.7.2C) Forward Mutation Assay. In *Protocols in Genotoxicity Assessment* A. Dhawan og M. Bajpayee (Eds.), Springer Protocols, Humana Press: 27-50.
- (20) Long, L.H., Kirkland, D., Whitwell, J. og Halliwell, B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, *Mutation Res.*, 634 (1-2): 177-183.
- (21) Nesslany, F., Simar-Meintieres, S., Watzinger, M., Talahari, I. og Marzin, D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. *Environ. Mol. Mutagen.*, 49 (6): 439-452.
- (22) Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion Concentrations. *Environ. Mutagen.*, 8 (6): 879-886.
- (23) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. og Okumura, K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. *Mutation Res.*, 268 (2): 297-305.
- (24) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M.Jr, Brusick, D., Ashby, J. og Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Res.*, 257: 147-204.
- (25) Wang J., Heflich R.H. og Moore M.M. (2007). A Method to Distinguish Between the *De Novo* Induction of Thymidine Kinase Mutants and the Selection of Pre-Existing Thymidine Kinase Mutants in the Mouse Lymphoma Assay. *Mutation Res.*, 626 (1-2): 185-190.
- (26) Fischer, G.A. (1958). Studies on the Culture of Leukemic Cells *In Vitro*. *Ann. N.Y. Academy Sci.*, 76: 673-680.

- (27) Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson, A.G. og Brown, M.M.M. (1979). Validation and Characterization of the L5178Y/TK^{+/-} - Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. *Mutation Res.*, 59(1): 61-108.
- (28) Sawyer, J., Moore, M.M., Clive, D. og Hozier, J. (1985). Cytogenetic Characterization of the L5178Y TK^{+/-} 3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, *Mutation Res.*, 147 (5): 243-253.
- (29) Sawyer J.R., Moore M.M. og Hozier J.C. (1989). High-Resolution Cytogenetic Characterization of the L5178Y TK^{+/-} Mouse Lymphoma Cell Line, *Mutation Res.*, 214 (2): 181-193.
- (30) Sawyer, J.R., Binz, R.L., Wang, J. og Moore, M.M. (2006). Multicolor Spectral Karyotyping of the L5178Y TK^{+/-}-3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, *Environ. Mol. Mutagen.*, 47 (2): 127-131.
- (31) Fellows, M.D., McDermott, A., Clare, K.R., Doherty, A. og Aardema, M.J. (2014). The Spectral Karyotype of L5178Y TK^{+/-} Mouse Lymphoma Cells Clone 3.7.2C and Factors Affecting Mutant Frequency at the Thymidine Kinase (TK) Locus in the Microtitre Mouse Lymphoma Assay, *Environ. Mol. Mutagen.*, 55 (1): 35-42.
- (32) Storer, R.D., Jraynak, A.R., McKelvey, T.W., Elia, M.C., Goodrow, T.L. og DeLuca, J.G. (1997). The Mouse Lymphoma L5178Y TK^{+/-} Cell Line is Heterozygous for a Codon 170 Mutation in the P53 Tumor Suppressor Gene. *Mutation. Res.*, 373 (2): 157-165.
- (33) Clark L.S., Harrington-Brock, K., Wang, J., Sargent, L., Lowry, D., Reynolds, S.H. og Moore, M.M. (2004). Loss of P53 Heterozygosity is not Responsible for the Small Colony Thymidine Kinase Mutant Phenotype in L5178Y Mouse Lymphoma Cells. *Mutagen.*, 19 (4): 263-268.
- (34) Skopek T.R., Liber, H.L., Penman, B.W. og Thilly, W.G. (1978). Isolation of a Human Lymphoblastoid Line Heterozygous at the Thymidine Kinase Locus: Possibility for a Rapid Human Cell Mutation Assay. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 84 (2): 411-416.
- (35) Honma M. (2005). Generation of Loss of Heterozygosity and its Dependency on P53 Status in Human Lymphoblastoid Cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, 45 (2-3): 162-176.
- (36) Xia, F., Wang, X., Wang, Y.H., Tsang, N.M., Yandell, D.W., Kelsey, K.T. og Liber, H.L. (1995). Altered P53 Status Correlates with Differences in Sensitivity to Radiation-Induced Mutation and Apoptosis in Two Closely Related Human Lymphoblast Lines. *Cancer. Res.*, 55 (1): 12-15.

- (37) Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, A. Sutter, D.J. Kirkland (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Manuskript under udarbejdelse).
- (38) Lloyd M. og Kidd D. (2012). The Mouse Lymphoma Assay. Springer Protocols: Methods in Molecular Biology 817, Genetic Toxicology Principles and Methods, ed. Parry and Parry, Humana Press. ISBN, 978-1-61779-420-9, 35-54.
- (39) Mei N., Guo X. og Moore M.M. (2014). Methods for Using the Mouse Lymphoma Assay to Screen for Chemical Mutagenicity and Photo-Mutagenicity. In: Optimization in Drug Discover: *In Vitro* Methods: Yan Z og Caldwell(Eds) , 2nd Edition, GW; Humana Press, Totowa, NJ.
- (40) Liber H.L. og Thilly W.G. (1982). Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploidhuman Lymphoblasts. Mutation Res., 94 (2): 467-485.
- (41) Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Hay, R., Merten, OW., Price, A., Schechtman, L., Stacey, G. og Stokes, W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. ATLA, 33 (3): 261-287.
- (42) Moore M.M. og Howard B.E. (1982). Quantitation of Small Colony Trifluorothymidine-Resistant Mutants of L5178Y/TK+/- Mouse Lymphoma Cells in RPMI-1640 Medium, Mutation Res., 104 (4-5): 287-294.
- (43) Ames B.N., McCann J. og Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31 (6): 347-364.
- (44) Maron D.M. og Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113 (3-4): 173-215.
- (45) Natarajan, A.T., Tate, A.D, Van Buul, P.P.W., Meijers, M. og De Vogel, N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens After Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. Mutation Res., 37 (1): 83-90.

- (46) Matsuoka A., Hayashi M. og Ishidate M. Jr. (1979). Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*. *Mutation Res.*, 66 (3): 277-290.
- (47) Ong T.M., *et al.* (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, 4 (1): 55-65
- (48) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. og Wolf, R.C. (1992). Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. *Mutagen.*, 7 (3): 175-177.
- (49) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. og Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. de Serres F.J., *et al.* (Eds, Elsevier, North-Holland, s. 85-88.
- (50) Galloway S.M., *et al.* (1994). Report from Working Group on *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations. *Mutation Res.*, 312 (3): 241-261.
- (51) Johnson T.E., Umbenhauer D.R. og Galloway S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/Beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, *Environ. Mol. Mutagen.*, 28 (1): 51-59.
- (52) UNEP (2001). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP).
- (53) Krahn D.F., Barsky F.C. og McCooey K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: *Genotoxic Effects of Airborne Agents* Tice R.R., Costa D.L. and Schaich K.M. (Eds.). New York, Plenum, s. 91-103.
- (54) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. og Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay. *Environ. Mutagen.*, 5 (6): 795-801.
- (55) Asakura M., Sasaki T., Sugiyama T., Arito H., Fukushima, S. og Matsushima, T. (2008). An Improved System for Exposure of Cultured Mammalian Cells to Gaseous Compounds in the Chromosomal Aberration Assay. *Mutation Res.*, 652 (2): 122-130.

- (56) Arlett C.F., *et al.* (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Ed.), Cambridge University Press, s. 66-101.
- (57) Morita T., Honma M. og Morikawa K. (2012). Effect of Reducing the Top Concentration Used in the *In Vitro* Chromosomal Aberration Test in CHL Cells on the Evaluation of Industrial Chemical Genotoxicity. *Mutation Res.*, 741 (1-2): 32-56.
- (58) Brookmire L., Chen J.J. og Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay. *Environ. Mol. Mutagen.*, 54 (1): 36-43.
- (59) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Tilgjengelig på: [<https://www.federalregister.gov/a/2012-13774>].
- (60) Honma M. og Hayashi M. (2011). Comparison of *In Vitro* Micronucleus and Gene Mutation Assay Results for P53-Competent Versus P53-Deficient Human Lymphoblastoid Cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, 52 (5): 373-384.
- (61) Moore-Brown, M.M., Clive, D., Howard, B.E., Batson, A.G. og Johnson, K.O. (1981). The Utilization of Trifluorothymidine (TFT) to Select for Thymidine Kinase-Deficient (TK^{-/-}) Mutants from L5178Y/TK^{+/-} Mouse Lymphoma Cells, *Mutation Res.*, 85 (5): 363-378.
- (62) Liber H.L., Yandell D.W. og Little J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HRPT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK locus. *Mutation Res.*, 216 (1): 9-17.
- (63) Furth E.E., Thilly, W.G., Penman, B.W., Liber, H.L. og Rand, W.M. (1981). Quantitative Assay for Mutation in Diploid Human Lymphoblasts Using Microtiter Plates. *Anal. Biochem.*, 110 (1): 1-8.
- (64) Hayashi, M, Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H. J. og Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, *Mutation Res.*, 723 (2): 87-90.
- (65) Ryan T.P. (2000). Statistical Methods for Quality Improvement. John Wiley og Sons, New York 2nd Edition.

- (66) OECD (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 199.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (67) Fleiss J.L., Levin B. og Paik M.C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

Tillæg 1

DEFINITIONER

Aneugen: alle kemikalier eller processer, der ved interaktion med komponenterne i den mitotiske og meiotiske celledelingscyklus forårsager aneuploidi i celler eller organismer.

Aneuploidi: enhver afvigelse fra det normale diploide (eller haploide) kromosomtallet af et eller flere kromosomer, men ikke af et eller flere komplette kromosomsæt (polyploidi).

Basesubstitutionsmutagener: kemikalier, der forårsager substitution af basepar i DNA.

Kemikalie: et stof eller en blanding

Kloningseffektivitet: procentdel af celler, som udplades med lav tæthed og kan vokse til en koloni, der kan tælles.

Klastogen: alle kemikalier eller processer, der forårsager strukturelle kromosomaberrationer i populationer af celler eller organismer.

Cytotoksisk effekt: for de assays, som er omfattet af denne forsøgsmetode, identificeres cytotoksisk effekt som en reduktion i relativ total vækst (RTG) eller relativ overlevelse (RS) for henholdsvis MLA og TK6.

Fremadmutation: en genmutation fra forældretypen til mutanten, som medfører ændring i eller tab af det kodede proteins enzymaktivitet eller funktion.

Frameshift-mutagener: kemikalier, der fremkalder addition eller deletion af et eller flere basepar i DNA-molekylet.

Genotoksisk: et generelt udtryk, der omfatter alle former for DNA- eller kromosombeskadigelse, herunder DNA-brud, addukter, omlejninger, mutationer, kromosomaberrationer og aneuploidi. Det er ikke alle former for genotoksiske virkninger, der forårsager mutationer eller stabil kromosomskade.

Mitotisk rekombination: under mitosen, rekombination mellem homologe kromatider, der muligvis medfører induktion af brud på DNA-dobbeltstrengene eller tab af heterozygoti.

Mutagen: forårsager arvelige ændringer af DNA-baseparssekvens(er) i gener eller i kromosomstrukturen (kromosomaberrationer).

Mutantfrekvens (MF): antallet af observerede mutantceller divideret med antallet af levedygtige celler.

Fænotypeekspressionsperiode: det tidsrum efter behandling, hvor den genetiske

ændring reparerer i genomet, og alle eksisterende genprodukter forsvinder, således at det fænotypiske karakteristikum ændres.

Relativ overlevelse (RS): RS bruges til at måle behandlingsrelateret cytotoksisk effekt i TK6. Det er cellernes relative kloningseffektivitet (CE), når de udplades umiddelbart efter cellebehandlingen, justeret for ethvert celletab under behandlingen sammenholdt med kloningseffektiviteten i den negative kontrol.

Relativ suspensionsvækst (RSG): For MLA: testkulturens relative totale to dage lange suspensionsvækst sammenlignet med den samlede to dage lange suspensionsvækst for den negative kontrolkultur/kontrollkulturen med opløsningsmiddel (Clive og Spector, 1975). RSG bør omfatte testkulturens relative vækst sammenlignet med den negative kontrolkultur/kontrollkulturen med opløsningsmiddel i behandlingsperioden.

Relativ total vækst (RTG): RTG bruges til at måle behandlingsrelateret cytotoksisk effekt i MLA. Den er et mål for testkulturernes relative (i forhold til bærestofkontrollen) vækst under behandlingen, den to dage lange ekspresion og udvælgelsen af mutanter til kloning i testforløbet. RSG for hver testkultur ganges med testkulturens relative kloningseffektivitet på tidspunktet for mutantudvælgelsen og angivet i forhold til kloningseffektiviteten for den negative kontrolkultur/kontrollkulturen med opløsningsmiddel (Clive og Spector, 1975).

S9-leverfraktioner: supernatant fra leverhomogenat efter 9 000 g centrifugering, dvs. ekstrakt fra rå lever.

S9-blanding: blanding med postmitochondrisk fraktion (S9) af lever og andre medvirkende faktorer, som er nødvendige for at skabe metabolisk enzymaktivitet.

Suspensionsvækst (SG): foldstigning i antallet af celler i løbet af behandlings- og ekspresionsfaserne af MLA. SG beregnes ved at gange foldstigningen på dag 1 med foldstigningen på dag 2 for den korte (3-4-timers) behandling. Benyttes en 24-timers behandling, er SG foldstigningen i løbet af 24-timers behandlingen ganget med foldstigningerne på ekspresionsdag 1 og 2.

Kontrolkultur med opløsningsmiddel: generelt begreb, der angiver de kontrolkulturer, som kun modtager det opløsningsmiddel, der anvendes til at opløse testkemikaliet.

Testkemikalie: alle stoffer eller blandinger, der testes ved hjælp af denne forsøgsmetode

Ubehandlet kontrol: kulturer, der ikke modtager behandling (dvs. hverken testkemikalie eller opløsningsmiddel), men behandles på samme måde som de kulturer, der modtager testkemikaliet.

Tillæg 2

FORMLER

Cytotoksisk effekt

For begge versioner (agar og mikrobørnd) af MLA

Cytotoksisk effekt defineres som den relative totale vækst (RTG), der omfatter den relative suspensionsvækst (RSG) i den to dage lange suspensionsperiode og den relative kloningseffektivitet (RCE), der opnås på tidspunktet for udvælgelsen af mutanter. RTG, RSG og RCE angives alle som en procentdel.

Beregning af RSG: Suspensionsvækst 1 (SG_1) er vækstraten mellem dag 0 og dag 1 (cellekoncentration på dag 1/cellekoncentration på dag 0), og suspensionsvækst 2 (SG_2) er vækstraten mellem dag 1 og dag 2 (cellekoncentration på dag 2/cellekoncentration på dag 1). RSG er den samlede SG ($SG_1 \times SG_2$) for den behandlede kultur sammenlignet med den ubehandlede kultur/kontrollkulturen med opløsningsmiddel. Det vil sige, at $RSG = (SG_{1(test)} \times SG_{2(test)}) / [SG_{1(kontrol)} \times SG_{2(kontrol)}]$. SG_1 beregnes ud fra den initiale cellekoncentration, som blev anvendt ved påbegyndelsen af cellebehandlingen. Dette gælder for en eventuel differentierende cytotoksisk effekt, der opstår i testkulturen/testkulturerne under cellebehandlingen.

RCE er testkulturens relative kloningseffektivitet sammenlignet med den relative kloningseffektivitet for den ubehandlede kultur/kontrollkulturen med opløsningsmiddel, der opnås på tidspunktet for udvælgelsen af mutanter.

Relativ total vækst (RTG): $RTG = RSG \times RCE$

TK6

Relativ overlevelse (RS):

Cytotoksisk effekt vurderes ved anvendelse af den relative overlevelse, dvs. cellernes kloningseffektivitet (CE), når de udplades umiddelbart efter behandling, justeret for ethvert celletab under behandlingen sammenholdt med kloningseffektiviteten i de negative kontroller (tildeles en overlevelsesprocent på 100 %). Justeringen for celletab under behandling kan beregnes som følger:

$$\text{Justeret CE} = \frac{\text{Antal celler ved behandlingsforløbets afslutning}}{\text{Antal celler ved behandlingsforløbets begyndelse}}$$

RS for en kultur, der er behandlet med et testkemikalie, beregnes som:

$$RS = \frac{\text{Justeret CE i den behandlede kultur}}{\text{Justeret CE i kontrollkulturen med opløsningsmiddel}} \times 100$$

Mutantfrekvens for både MLA og TK6

Mutantfrekvens (MF) er mutantkoloniers kloningseffektivitet i selektivt dyrkningsmedium (CE_M) justeret for kloningseffektiviteten i ikke-selektivt medium på mutantudvælgelsestidspunktet (CE_V). Dvs. $MF = CE_M / CE_V$. Beregningen af disse to former for klondannelseseffektivitet er beskrevet nedenfor for kloningsmetoder for agar og mikrobrønd.

MLA-agarversion: I den version af MLA, der anvender blød agar, fås antallet af kolonier på mutantselektionspladen (C_M) og antallet af kolonier på pladen uden selektion eller kloningseffektivitet (levedygtig tælling) (C_V) ved direkte at tælle klonerne. Når der er udpladet 600 celler med henblik på kloningseffektivitet (CE) til plader med mutantudvælgelse (CE_M) og plader uden udvælgelse eller kloningseffektivitet (levedygtig tælling) (CE_V), og der anvendes 3×10^6 -celler til udvælgelse af mutanter, er

$$CE_M = C_M / (3 \times 10^6) = (C_M / 3) \times 10^{-6}$$

$$CE_V = C_V / 600$$

MLA- og TK6-mikrobrøndversion: I mikrobrøndversionen af MLA bestemmes C_M og C_V som produktet af det samlede antal mikrobrønde (TW) og det sandsynlige antal kolonier pr. brønd (P) på plader med mikrobrønde.

$$C_M = P_M \times TW_M$$

$$C_V = P_V \times TW_V$$

Ud fra nul-betingelsen i Poisson-fordelingen (Furth et al., 1981), angives P ved

$$P = -\ln(EW / TW)$$

hvor EW er tomme brønde, og TW er totale brønde. Derfor gælder følgende:

$$CE_M = C_M / T_M = (P_M \times TW_M) / T_M$$

$$CE_V = C_V / T_V = (P_V \times TW_V) / T_V$$

For mikrobrøndversionen af MLA beregnes mutantfrekvenser for små og store kolonier på samme måde ved anvendelse af det relevante antal tomme brønde for små og store kolonier.

For TK6 er mutantfrekvenser for små og store kolonier baseret på tidligt og sent fremkomne mutanter.

B.68 FORSØGSMETODE MED KORTVARIG EKSPONERING IN VITRO TIL IDENTIFIKATION AF i) KEMIKALIER, DER FREMKALDER ALVORLIGE ØJENSKADER, OG ii) KEMIKALIER, DER IKKE KRÆVER KLASSIFICERING

FOR ØJENIRRITATION ELLER ALVORLIGE ØJENSKADER

INDLEDNING

1. Denne forsøgsmetode svarer til OECD's testvejledning (Test Guideline (TG)) 491 (2017). Forsøgsmetoden med kortvarig eksponering (STE) er en in vitro-metode, som kan anvendes under visse omstændigheder og med særlige begrænsninger til fareklassificering og mærkning af kemikalier (stoffer og blandinger), der fremkalder alvorlige øjenskader samt kemikalier, der ikke kræver klassificering hverken for alvorlige øjenskader eller for øjenirritation som defineret i De Forenede Nationers (FN) globalt harmoniserede system for klassificering og mærkning af kemikalier (GHS) (kategori 1) og Den Europæiske Unions (EU) forordning nr. 1272/2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger (CLP)¹.
2. I mange år er kemikaliers potentielle risiko for øjenskade primært blevet vurderet ved anvendelse af en in vivo-kaninøjentest (TM B.5 (8), som svarer til OECD TG 405). Det er generelt accepteret, at der i den nærmeste fremtid ikke vil være en enkelt alternativ in vitro-test, der fuldt ud vil kunne erstatte in vivo-kaninøjentesten til forudsigelse af hele spektret af alvorlige øjenskade-/øjenirritationsreaktioner for forskellige kemikaliegrupper. Strategiske kombinationer af alternative forsøgsmetoder i en (trinvis) teststrategi kan dog muligvis fuldt ud erstatte kaninøjentesten (2). Top-down-tilgangen er beregnet til testning af kemikalier, som baseret på eksisterende information kan forventes at have et højt irritationspotentiale eller fremkalde alvorlige øjenskader. Omvendt er bottom-up-tilgangen beregnet til testning af kemikalier, der baseret på eksisterende information ikke ventes at forårsage tilstrækkelig øjenirritation til, at der kræves en klassificering. Selv om STE-forsøgsmetoden ikke betragtes som værende en fuldstændig erstatning for in vivo-kaninøjentesten, er den egnet til brug som del af en trindelt teststrategi for forskriftsmæssig klassificering og mærkning såsom top-down/bottom-up-tilgangen til uden yderligere testning at identificere (i) kemikalier, der fremkalder alvorlige øjenskader (UN GHS/CLP-kategori 1), og (ii) kemikalier (bortset fra meget flygtige stoffer og alle andre faste kemikalier end overfladeaktive stoffer), som ikke kræver klassificering for øjenirritation eller alvorlige øjenskader (UN GHS/CLP – uden for kategori) (1)(2). Et kemikalie, der hverken forventes at forårsage alvorlige øjenskader (UN GHS/CLP-kategori 1) eller UN GHS/CLP – uden for kategori (hverken fremkalder alvorlige

¹ Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1272/2008 af 16. december 2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger og om ændring og ophævelse af direktiv 67/548/EØF og 1999/45/EF og om ændring af forordning (EF) nr. 1907/2006, EUT L 353 af 31.12.2008, s. 1.

øjenskader eller øjenirritation) ved STE-forsøgsmetoden, vil dog skulle testes yderligere for at fastslå en endelig klassificering. Desuden bør de relevante kompetente myndigheder høres, før STE anvendes i en bottom-up-tilgang i henhold til andre klassifikationsordninger end UN GHS/CLP. Valget af den mest egnede forsøgsmetode og anvendelsen af denne forsøgsmetode bør ses i forbindelse med OECD's vejledende dokument om integrerede tilgange til testning og vurdering for alvorlige øjenskader og øjenirritation (14).

3. Formålet med denne forsøgsmetode er at beskrive de procedurer, som anvendes til at vurdere et testkemikalies potentielle risiko for at forårsage øjenskader baseret på dets evne til at fremkalde en cytotoxisk effekt ved forsøgsmetoden med kortvarig eksponering. Kemikaliers cytotoxiske effekt på cornea-epithelceller er en vigtig virkemåde, der fører til cornea-epithelskade og øjenirritation. Cellernes levedygtighed ved STE-forsøgsmetoden vurderes ved kvantitativ måling efter ekstraktion fra celler af blåt formazansalt produceret af de levende celler ved enzymomdannelse af vitalfarvestoffet MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid), også kaldet thiazolylblåt tetrazolium-bromid (3). Den opnåede cellelevedygtighed sammenholdes med kontrolkulturen med opløsningsmiddel (relativ levedygtighed) og bruges til at anslå testkemikaliet's potentielle risiko for øjet. Et testkemikalie klassificeres som UN GHS/CLP-kategori 1, når både 5 %- og 0,05 %-koncentrationerne medfører en cellelevedygtighed under eller lig med ($\leq$) 70 %. Omvendt forudses et kemikalie at kunne klassificeres som UN GHS/CLP – uden for kategori 1, når både 5 %- og 0,05 %-koncentrationerne medfører en cellelevedygtighed over ($>$) 70 %.
4. Betegnelsen "testkemikalie" anvendes i denne forsøgsmetode om det, der testes, og vedrører ikke anvendeligheden af STE-forsøgsmetoden til testning af stoffer og/eller blandinger. Definitioner findes i tillægget.

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER

5. Denne forsøgsmetode er baseret på en protokol udviklet af Kao Corporation (4), som var genstand for to forskellige valideringsundersøgelser: en, der blev foretaget af valideringsudvalget under det japanske selskab for alternativer til dyreforsøg (Validation Committee of the Japanese Society for Alternative to Animal Experiments (JSAAE)) (5), og et andet, der blev foretaget af det japanske center for validering af alternative metoder (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM)) (6). Der blev foretaget et peer review af NICEATM/ICCVAM på grundlag af valideringsundersøgelsesrapporter og background review-dokumenter om forsøgsmetoden (7).

6. Når data opnået med STE-forsøgsmetoden på 125 kemikalier (bl.a. både stoffer og blandinger) blev anvendt til at identificere kemikalier (stoffer og blandinger), der medfører alvorlige øjenskader (UN GHS/CLP-kategori 1) (1), udviste de en generel nøjagtighed på 83 % (104/125), en falsk positiv-rate på 1 % (1/86) og en falsk negativ-rate på 51 % (20/39) sammenlignet med in vivo-kaninøjentesten (7). Falsk negativ-raten er ikke kritisk i den aktuelle sammenhæng, eftersom alle testkemikalier, der medfører en cellelevedygtighed på ≤ 70 % ved en 5 % koncentration og > 70 % ved en 0,05 % koncentration efterfølgende vil blive testet med andre tilstrækkeligt validerede in vitro-forsøgsmetoder eller, som en sidste mulighed, i in vivo-kaninøjentesten alt efter de forskriftsmæssige krav og i overensstemmelse med en sekventiel testningsstrategi med den "weight of evidence"-analyse, som i øjeblikket anbefales (1) (8). Der blev hovedsagelig testet stoffer med kun én bestanddel, skønt der også findes en begrænset mængde data om test af blandinger. Forsøgsmetoden kan ikke desto mindre teknisk set benyttes til test af stoffer med forskellige bestanddele og i forskellige blandinger. Før forsøgsmetoden anvendes til at teste en blanding for at generere data til lovmæssige formål, bør det imidlertid overvejes, om den vil give resultater, som er egnede til formålet, og i givet fald hvorfor. Sådanne overvejelser er ikke nødvendige, når der foreligger et myndighedskrav om test af blandingen. STE-forsøgsmetoden viste ingen andre særlige mangler, da den blev benyttet til at identificere testkemikalier som UN GHS/CLP-kategori 1. Undersøgeren kan overveje at anvende denne forsøgsmetode på testkemikalier, hvorved en cellelevedygtighed på ≤ 70 ved både 5 % og 0,05 % koncentration bør accepteres som indikation på alvorlig øjenskade, der bør klassificeres som UN GHS/CLP-kategori 1 uden yderligere test.
7. Når data opnået med STE-forsøgsmetoden på 130 kemikalier (bl.a. både stoffer og blandinger) anvendes til at identificere kemikalier (stoffer og blandinger), som ikke kræver klassificering for øjenirritation og alvorlige øjenskader (dvs. UN GHS/CLP – uden for kategori), udviste de en generel nøjagtighed på 85 % (110/130), en falsk negativ-rate på 12 % (9/73) og en falsk positiv-rate på 19 % (11/57) sammenlignet med in vivo-kaninøjentesten (7). Hvis meget letflygtige stoffer og andre faste stoffer end overfladeaktive stoffer udelukkes fra datasættet, forbedres den generelle nøjagtighed til 90 % (92/102), falsk negativ-raten til 2 % (1/54) og falsk positiv-raten til 19 % (9/48) (7). Som følge heraf er de potentielle mangler ved STE-forsøgsmetoden, når den benyttes til at identificere testkemikalier, som ikke kræver klassificering for øjenirritation og alvorlige øjenskader (UN GHS/CLP – uden for kategori), en høj falsk negativ-rate for i) meget flygtige stoffer med et damptryk over 6 kPa og ii) andre faste kemikalier (stoffer og blandinger) end overfladeaktive stoffer og blandinger, som udelukkende består af overfladeaktive stoffer. Sådanne kemikalier er udelukket fra STE-forsøgsmetodens anvendelsesområde (7).

8. Bortset fra de kemikalier, der er nævnt i punkt 6 og 7, indeholder det datasæt, som blev genereret af STE-forsøgsmetoden, også interne data om 40 blandinger, som sammenholdt med in vivo-Draize-øjentesten udviste en nøjagtighed på 88 % (35/40), en falsk positiv-rate på 50 % (5/10) og en falsk negativ-rate på 0 % (0/30) for forudsigelse af blandinger, der ikke kræver klassificering i henhold til UN GHS/CLP-klassificeringssystemer (9). STE-forsøgsmetoden kan derfor benyttes til at identificere blandinger som UN GHS/CLP – uden for kategori ved en bottom-up-tilgang med undtagelse af andre faste blandinger end dem, der udelukkende består af overfladeaktive stoffer som en udvidelse af dens begrænsning til faste stoffer. Endvidere bør blandinger, der indeholder stoffer med et højere damptryk end 6kPa, vurderes omhyggeligt for at undgå undervurdering i de potentielle forudsigelser og bør begrundes i hvert enkelt tilfælde.
9. STE-forsøgsmetoden kan ikke benyttes til identifikation af testkemikalier som UN GHS/CLP-kategori 2 eller UN GHS-kategori 2A (øjenirritation) eller 2B (mild øjenirritation) på grund af det betydelige antal kemikalier i UN GHS/CLP-kategori 1, der er undervurderet som kategori 2, 2A eller 2B og kemikalier i UN GHS/CLP – uden for kategori, der er overvurderet som kategori 2, 2A eller 2B (7). Til dette formål kan der være behov for at gennemføre yderligere testning med en anden egnet metode.
10. STE-forsøgsmetoden er egnet til testkemikalier, der er opløst eller har været ensartet suspenderet i mindst fem minutter i fysiologisk saltopløsning, 5 % dimethylsulfoxid (DMSO) i fysiologisk saltopløsning eller mineralolie. STE-forsøgsmetoden er ikke egnet til testkemikalier, der er uopløselige eller ikke kan suspenderes ensartet i mindst fem minutter i fysiologisk saltopløsning, 5 % DMSO i fysiologisk saltopløsning eller mineralolie. Anvendelsen af mineralolie i STE-forsøgsmetoden er mulig på grund af den kortvarige eksponering. Derfor er STE-forsøgsmetoden egnet til at forudsige vandupløselige testkemikaliers (dvs. *f.eks.* langkædede fedtalkoholer eller ketonstoffer) potentielle risiko for at forårsage øjenskader, forudsat at de kan blandes i mindst ét af de tre ovennævnte opløsningsmidler (4).
11. Betegnelsen "testkemikalie" anvendes i denne forsøgsmetode om det, der testes¹¹, og vedrører ikke STE-forsøgsmetodens anvendelighed til testning af stoffer og/eller blandinger.

¹¹ I juni 2013 blev det fælles møde enig om, at betegnelsen "testkemikalie", hvor det er muligt, bør anvendes på en mere konsekvent måde i nye og opdaterede forsøgsmetoder til at beskrive, hvad det er der testes.

PRINCIP FOR TESTEN

12. STE-forsøgsmetoden er et cytotoxicitetsbaseret in vitro-assay, som udføres på et sammenflydende enkeltlag af cornea-celler fra kanin fra Statens Seruminstitut (SIRC) dyrket på en polycarbonat-mikroplade med 96 brønde (4). Efter fem minutters eksponering for testkemikaliet måles den cytotoxiske effekt kvantitativt som den relative levedygtighed af SIRC-celler ved anvendelse af MTT-assayet (4). Nedsat cellelevedygtighed anvendes til at forudsige potentielle skadelige virkninger, som medfører øjensskade.
13. Det er rapporteret, at 80 % af en opløsning dryppet i et kaninøje udskilles gennem saccus conjunctivalis inden for 3-4 minutter, mens en højere opløsning end 80 % dryppet i det menneskelige øje udskilles inden for 1-2 minutter (10). Ved STE-forsøgsmetoden forsøges det at tilnærme disse eksponeringstider ved anvendelse af cytotoxiske effekt som en effektparameter for at vurdere omfanget af skade på SIRC-celler efter en fem minutter lang eksponering for testkemikaliet.

PÅVISNING AF KOMPETENCE

14. Inden laboratorier påbegynder rutinemæssig brug af STE-metoden, som beskrives i denne forsøgsmetode, bør de påvise deres tekniske kompetence ved korrekt identifikation af de 11 anbefalede stoffer i tabel 1. Disse stoffer blev udvalgt til at repræsentere det fuldstændige responsområde for alvorlige øjenskader eller øjenirritation på grundlag af resultaterne af in vivo-kaninøjentest (TG 405) og UN GHS/CLP-klassificeringssystemet (1). Andre udvælgelseskriterier var, at stofferne skulle være kommercielt tilgængelige, at in vivo-referencedata af høj kvalitet skulle kunne fås i handelen, og at in vitro-data af høj kvalitet fra STE-forsøgsmetoden skulle være tilgængelige (3). I situationer, hvor et stof på listen ikke kan fås, eller hvor det er begrundet, kan et andet stof anvendes, hvis der foreligger tilstrækkelige in vivo- og in vitro-referencedata herfor, forudsat at der benyttes de samme kriterier som beskrevet her.

Tabel 1: Listen over kompetencestoffer

Stof	CAS RN	Kemikaliegrupp e ¹	Fysisk form	In vivo UN GHS/CL P- kategori 2	Opløsningsmi ddel i STE- test	STE UN GHS/CLP- kat.
Benzalkoniumchlorid (10 %, vandig)	8001-54- 5	Onium- forbindelse	Flydende	Kategori 1	Fysiologisk saltopløsning	Kategori 1

Triton X-100 (100 %)	9002-93-1	Ether	Flydende	Kategori 1	Fysiologisk saltopløsning	Kategori 1
Acid Red 92	18472-87-2	Heterocyklisk forbindelse, bromforbindelse, chlorforbindelse	Fast	Kategori 1	Fysiologisk saltopløsning	Kategori 1
Natriumhydroxid	1310-73-2	Alkali, uorganisk kemikalie	Fast	Kategori 1 ³	Fysiologisk saltopløsning	Kategori 1
Butyrolacton	96-48-0	Lacton, heterocyklisk forbindelse	Flydende	Kategori 2A (kategori 2 i CLP)	Fysiologisk saltopløsning	Der kan ikke fremsættes nogen forudsigelser
1-octanol	111-87-5	Alkohol	Flydende	Kategori 2A/B ⁴ (kategori 2 i CLP)	Mineralolie	Der kan ikke fremsættes nogen forudsigelser
Cyclopentanol	96-41-3	Alkohol, kulbrinte, cyklisk	Flydende	Kategori 2A/B ⁵ (kategori 2 i CLP)	Fysiologisk saltopløsning	Der kan ikke fremsættes nogen forudsigelser
2-ethoxyethylacetat	111-15-9	Alkohol, Ether	Flydende	Uden for kategori	Fysiologisk saltopløsning	Uden for kategori
Dodecan	112-40-3	Kulbrinte, cyklisk	Flydende	Uden for kategori	Mineralolie	Uden for kategori
Methylisobutylketon	108-10-1	Keton	Flydende	Uden for kategori	Mineralolie	Uden for kategori
n,n-dimethylguanidinsulfat	598-65-2	Amidin, svovlforbindelse	Fast	Uden for kategori	Fysiologisk saltopløsning	Uden for kategori

Forkortelser: CAS RN = Registernummer i Chemical Abstracts Service

¹De kemiske stofgrupper blev fastsat ud fra oplysninger fra tidligere NICEATM-publikationer, og hvis de ikke var tilgængelige, fra National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH[®]) (via ChemIDplus[®] (National Library of Medicine), som findes på <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>), og opbygning fastlagt af NICEATM.

²Baseret på resultater fra in vivo-kaninøjentesten (OECD TG 405) og ved anvendelse af UN GHS/CLP (1).

³Klassificering som kategori 1 er baseret på den hudætsende evne af 100 % natriumhydroxid (opført på listen som et hudætsende kompetencekemikalie i OECD TG 435) og kriteriet for UN GHS/CLP-kategori 1 (1).

⁴Klassificering som 2A eller 2B afhænger af fortolkningen af UN GHS-kriterium for sontring mellem disse to kategorier, dvs. 2 ud af 6 mod 4 ud af 6 dyr med virkninger på dag 7, som er nødvendige for at generere en kategori 2A-klassificering. In vivo-datasættet omfattede to undersøgelser med tre dyr i hver. I en undersøgelse udviste to ud af tre dyr virkninger på dag 7, hvilket begrundede en kategori 2A-klassificering (11), mens alle effektparametre i den anden undersøgelse hos alle tre dyr udviste en bedring til en score på nul inden dag 7, hvilket begrundede en kategori 2B-klassificering (12).

⁵Klassificering som 2A eller 2B afhænger af fortolkningen af UN GHS-kriterium for sontring mellem disse to kategorier, dvs. 1 ud af 3 mod 2 ud af 3 dyr med virkninger på dag 7, som er nødvendige for at generere en kategori 2A-klassificering. In vivo-undersøgelsen omfattede tre dyr. Alle effektparametre bortset fra cornea-uklarhed og conjunctiva-rødme hos ét dyr opnåede en bedring til en score på nul på dag 7 eller tidligere. Det ene dyr, som ikke var kommet sig fuldstændig på dag 7, havde en score for cornea-uklarhed på 1 og en conjunctiva-rødme på 1 (på dag 7) med fuld bedring på dag 14 (11).

FREMGANGSMÅDE

Præparering af cellemonolaget

15. Cornea-cellelinjen fra kanin, SIRC, bør anvendes til at udføre STE-forsøgsmetoden. Det anbefales, at SIRC-celler anskaffes fra en velkvalificeret cellebank som f.eks. American Type Culture Collection CCL60.
16. SIRC-celler dyrkes ved 37 °C under 5 % CO₂ og fugtig atmosfære i en dyrkningsbeholder med et dyrkningsmedium bestående af Eagle's minimum essential medium (MEM) suppleret med 10 % føtalt kalveserum (FBS), 2 mM L-glutamin, 50-100 enheder/ml penicillin og 50-100 µg/ml streptomycin. Celler, der er flydt sammen i dyrkningsflasken, bør adskilles ved hjælp af en opløsning af trypsin-ethylendiamintetraeddikesyre med eller uden brug af en celleskraber. Celler opformeres (f.eks. 2-3 generationer) i en dyrkningsflaske, før de anvendes til rutinetest og bør højst dyrkes i 25 generationer fra optøning.
17. Celler, der er klar til brug i STE-forsøget, præpareres herefter ved passende tæthed og udsås på plader med 96 brønde. Den anbefalede celleudsåningstæthed er $6,0 \times 10^3$ celler pr. brønd, når cellerne anvendes fire dage efter udsåning, eller $3,0 \times 10^3$ celler pr. brønd, når cellerne anvendes fem dage efter udsåning ved en dyrkningsvolumen på 200 µl. Celler, der anvendes til STE-forsøget og udsås i et dyrkningsmedium med en passende tæthed, vil nå en konfluens på over 80 % på forsøgstidspunktet, dvs. 4-5 dage efter udsåningen.

Påføring af testkemikalier og kontrolstoffer

18. Førstevalget af opløsningsmiddel til opløsning eller suspension af testkemikalier er fysiologisk saltopløsning. Hvis testkemikallet udviser lav opløselighed eller ikke kan opløses eller suspenderes ensartet i mindst fem minutter i fysiologisk saltopløsning, anvendes 5 % DMSO (CAS#67-68-5) i fysiologisk saltopløsning som et sekundært valg af opløsningsmiddel. Til testkemikalier, der ikke kan opløses eller suspenderes ensartet i mindst fem minutter i enten en fysiologisk saltopløsning eller 5 % DMSO i fysiologisk saltopløsning, anvendes mineralolie (CAS#8042-47-5) som et tredjevalg af opløsningsmiddel.
19. Testkemikalier opløses eller suspenderes ensartet i det valgte opløsningsmiddel ved en koncentration på 5 % (w/w) og yderligere fortyndet med en 10-fold seriefortynding til 0,5 % og 0,05 % koncentration. Hvert testkemikalie skal testes ved koncentrationer på både 5 % og 0,05 %. Celler dyrket på en plade med 96 brønde eksponeres for 200 µl/brønd med enten en 5 %- eller en 0,05 %-koncentration af testkemikalieopløsningen (eller -suspensionen) i fem minutter ved stuetemperatur. Testkemikalier (stoffer med kun én bestanddel eller stoffer med flere bestanddele eller

blandinger) anses for at være ublandede stoffer og fortyndes eller suspenderes i overensstemmelse med metoden uanset deres renhed.

20. Dyrkningsmediet, som er beskrevet i punkt 16, anvendes som mediekontrol på hver plade for hver repetition. Cellerne skal desuden eksponeres for prøver af kontrolkultur med opløsningsmiddel på hver plade for hver repetition. De opløsningsmidler, der er anført i punkt 18, har ingen negative virkninger på SIRC-cellers levedygtighed.
21. Ved STE-forsøgsmetoden skal 0,01 % natriumlaurylsulfat (SLS) i fysiologisk saltopløsning anvendes som positiv kontrol på hver plade for hver repetition. For at beregne cellernes levedygtighed i den positive kontrol skal hver plade for hver repetition også omfatte en kontrol med fysiologisk saltopløsning.
22. En blindprøve er nødvendig for at bestemme compensationen for optisk tæthed og bør udføres på brønde, som kun indeholder phosphatbufret fysiologisk saltopløsning, men ingen calcium og magnesium (PBS-) eller celler.
23. Hver prøve (testkemikalie ved 5 % og 0,05 %, mediekontrol, kontrolkultur med opløsningsmiddel og positiv kontrol) bør testes tre gange i hver repetition ved at eksponere cellerne for 200 µl af det rette test- eller kontrolkemikalie i fem minutter ved stuetemperatur.
24. Referencestoffer er nyttige i forbindelse med vurdering af øjenirritationspotentialer for ukendte kemikalier fra en særlig kemisk stofgruppe eller produktgruppe eller vurdering af det relative irritationspotentialer for et øjenirriterende stof inden for et specifikt område af irritationsrespons.

Måling af cellelevedygtighed

25. Efter eksponering vaskes cellerne to gange med 200 µl PBS, og 200 µl MTT-opløsning (0,5 mg MTT/ml dyrkningsmedium) tilsættes. Efter en to timer lang reaktionstid i en inkubator (37 °C, 5 % CO₂) dekanteres MTT-opløsningen, MTT-formazan ekstraheres ved at tilsætte 200 µl 0,04 N hydrochloridsyre-isopropanol i 60 minutter i mørke ved stuetemperatur, og absorbansen af MTT-formazanopløsningen måles ved 570 nm med en pladelæser. Der opstår kun interferens mellem testkemikalier og MTT-assayet (med farvestoffer eller direkte MTT-opløsninger), hvis en betydelig mængde testkemikalie tilbageholdes i testsystemet som følge af rensning efter eksponering, hvilket er tilfældet med rekonstrueret human cornea i 3D eller rekonstrueret human epidermisvæv i 3D, men er ikke relevant for 2D-cellekulturer, som anvendes til STE-forsøgsmetoden.

Fortolkning af resultater og forudsigelsesmodel

26. De værdier for optisk tæthed (OD), der er opnået for hvert testkemikalie, benyttes herefter til at beregne cellelevedygtighed i forhold til kontrolturen med

opløsningsmiddel, der er fastsat til 100 %. Den relative cellelevedygtighed angives som en procentdel og opnås ved at dividere testkemikaliets OD med OD for kontrolkulturen med opløsningsmiddel efter fratrækning af blindprøvens OD fra begge værdier.

$$\text{Cellelevedygtighed (\%)} = \frac{(OD_{570}\text{testkemikalie}) - (OD_{570}\text{blindprøve})}{(OD_{570}\text{kontrol m/opløsn.}) - (OD_{570}\text{blind.})} \times 100$$

Tilsvarende angives den relative cellelevedygtighed for hver kontrolkultur med opløsningsmiddel som en procentdel og fås ved at dividere OD for hver kontrolkultur med opløsningsmiddel med OD for mediekontrollen efter fratrækning af blindprøvens OD fra begge værdier.

27. Der bør udføres tre uafhængige repetitioner, som hver indeholder tre replikatbrønde (*dvs.* n=9). Det aritmetiske gennemsnit af de tre brønde for hvert testkemikalie og hver kontrolkultur med opløsningsmiddel i hver uafhængig repetition bruges til at beregne det aritmetiske gennemsnit for relativ cellelevetid. Det endelige aritmetiske gennemsnit for cellelevedygtighed beregnes ud fra de tre uafhængige repetitioner.
28. Cut-off-værdierne for cellelevedygtighed til identificering af testkemikalier, som medfører alvorlige øjenskader (UN GHS/CLP-kategori 1), og testkemikalier, der ikke kræver klassificering for øjenirritation eller alvorlige øjenskader (UN GHS/CLP – uden for kategori) er angivet nedenfor.

Tabel 2: Forudsigelsesmodel for STE-forsøgsmetoden

Cellernes levedygtighed		UN GHS/CLP-klassificering	Anvendelse
Ved 5 %	Ved 0,05 %		
> 70 %	> 70 %	Uden for kategori	Stoffer og blandinger med undtagelse af: i) meget flygtige stoffer med et damptryk over 6 kPa ¹ og ii) andre faste kemikalier (stoffer og blandinger) end overfladeaktive stoffer og blandinger, som kun består af overfladeaktive stoffer
≤ 70 %	> 70 %	Der kan ikke fremsættes nogen forudsigelser	Ikke relevant
≤ 70 %	≤ 70 %	Kategori 1	Stoffer og blandinger ²

¹ Blandinger, der indeholder stoffer med et højere damptryk end 6kPa, vurderes omhyggeligt for at undgå undervurdering i de potentielle forudsigelser og bør begrundes i hvert enkelt tilfælde.

² På grundlag af resultater, der hovedsagelig var opnået med stoffer med kun én bestanddel, men der findes også en begrænset mængde data om test af blandinger. Forsøgsmetoden kan ikke desto mindre teknisk set benyttes til test af stoffer med forskellige bestanddele og i forskellige blandinger. Før forsøgsmetoden anvendes til at teste en blanding for at generere data til lovmæssige formål, bør det overvejes, om den vil give resultater, som er egnede til formålet, og i givet fald hvorfor.

Sådanne overvejelser er ikke nødvendige, når der foreligger et myndighedskrav om test af blandingen.

Acceptkriterier

29. Testresultaterne anses for at være acceptable, når alle de følgende kriterier er opfyldt:

- a) Mediekontrollens optiske tæthed (eksponeret for dyrkningsmediet) bør være 0,3 eller højere efter fratrækning af blindprøvens optiske tæthed.
- b) Levedygtigheden for kontrolkulturen med opløsningsmiddel bør være 80 % eller derover i forhold til mediekontrollen. Såfremt der anvendes mange kontrolkulturer med opløsningsmiddel i hver repetition, bør hver af disse kontroller vise en større cellelevedygtighed end 80 % for at kvalificere de testede testkemikalier med de pågældende opløsningsmidler.
- c) Den cellelevedygtighed, der opnås med den positive kontrol (0,01 % SLS), bør ligge inden for standardafvigelse for det historiske gennemsnit. De øvre og nedre acceptgrænser for den positive kontrol bør opdateres hyppigt, dvs. hver tredje måned eller hver gang, der udføres en acceptabel test i laboratorier, hvor der sjældent udføres test (dvs. sjældnere end én gang om måneden). Såfremt laboratoriet ikke gennemfører et tilstrækkeligt antal forsøg for at fastlægge en statistisk robust, positiv kontrolfordeling, kan det accepteres at benytte de øvre og nedre acceptgrænser, som fastsættes af metodeudvikleren, dvs. mellem 21,1 % og 62,3 %, i overensstemmelse med laboratoriets tidligere data, mens en intern fordeling opbygges under de første rutinetest.
- d) Standardafvigelsen for den endelige cellelevedygtighed, som udledes af tre uafhængige repetitioner, bør ligge under 15 % for både 5 %- og 0,05 %-koncentrationer af testkemikaliets.

Hvis et eller flere af disse kriterier ikke opfyldes, bør der ses bort fra resultaterne, og tre andre uafhængige repetitioner udføres.

DATA OG RAPPORTERING

Data

30. Data rapporteres for hver enkelt brønd (f.eks. værdier for cellernes levedygtighed) for hver repetition og samlet gennemsnit, standardafvigelse og klassificering.

Testrapport

31. Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie og kontrolstoffer

- stof med kun én bestanddel: kemisk identifikation, f.eks. IUPAC- eller CAS-navn(e), CAS-registreringsnummer/numre, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel og/eller andre identifikatorer
- stof med flere bestanddele, UVCB-stoffer og blandinger: kendetegnet så vidt muligt ved f.eks. kemisk identitet (jf. ovenfor), renhed, kvantitativ forekomst og bestanddelenes relevante fysisk-kemiske egenskaber (jf. ovenfor) i det omfang, det er muligt
- fysisk tilstand, flygtighed, pH, LogP, molekylvægt, kemisk gruppe og yderligere fysisk-kemiske egenskaber, som er relevante for undersøgelsen, i det omfang det er muligt
- renhed, kemisk identitet af urenheder i det omfang, det er relevant og praktisk muligt, osv.
- eventuel behandling inden testen (f.eks. opvarmning, formaling)
- opbevaring og stabilitet i det omfang, det er muligt.

Betingelser for forsøgsmetoden og procedurer

- navn og adresse på sponsoren, testfaciliteten og undersøgelseslederen
- beskrivelse af den anvendte forsøgsmetode
- anvendte cellelinjer, deres oprindelse, antal generationer og graden af konfluens for de celler, der anvendes til test
- detaljer om den anvendte testprocedure
- antal anvendte gentagelser og replikater
- koncentrationer af testkemikaliet (hvis en anden end de anbefalede)
- begrundelse for valg af opløsningsmiddel for de enkelte testkemikalier
- varigheden af eksponeringen for testkemikaliet (hvis en anden end den anbefalede)
- beskrivelse af eventuelle ændringer i testproceduren
- beskrivelse af de anvendte vurderings- og beslutningskriterier
- henvisning til det tidligere positive kontrolgennemsnit og standardafvigelse:
- påvisning af laboratoriets kompetence til at anvende forsøgsmetoden (f.eks. ved test af kompetencestoffer) eller til at påvise reproducerbare resultater af forsøgsmetoden over tid.

Resultater

- for hvert testkemikalie og kontrolstof og hver testet koncentration bør de enkelte OD-værdier for hver replikatbrønd opstilles i tabelform, og følgende angives: det

aritmetiske gennemsnit af OD-værdier for hver uafhængig repetition, den procentvise cellelevedygtighed for hver uafhængig repetition og det endelige aritmetiske gennemsnit for cellelevedygtighed og standardafvigelse i procent over tre repetitioner

- resultater for dyrkningsmedium, opløsningsmiddel og positiv kontrol, der påviser egnede acceptkriterier for undersøgelsen
- beskrivelse af andre observerede virkninger
- den samlede afledte klassificering med henvisning til den anvendte forudsigelsesmodel og/eller de anvendte beslutningskriterier.

Diskussion af resultaterne

Konklusioner

LITTERATUR

- (1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition. New York and Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Tilgængelig på: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.
- (2) Scott L, *et al.* (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *in vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9.
- (3) Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to 7 Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
- (4) Takahashi Y, *et al.* (2008). Development of the Short Time Exposure (STE) Test: an *In Vitro* Eye Irritation Test Using SIRC Cells. *Toxicol. In Vitro* 22,760-770.
- (5) Sakaguchi H, *et al.* (2011). Validation Study of the Short Time Exposure (STE) Test to Assess the Eye Irritation Potential of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 25,796-809.
- (6) Kojima H, *et al.* (2013). Second-Phase Validation of Short Time Exposure Tests for Assessment of Eye Irritation Potency of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 27, s. 1855-1869.
- (7) ICCVAM (2013). Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document, NIH. Tilgængelig på: [http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf].
- (8) Kapitel B.5 i dette bilag, Akut øjenirritation/-ætsning.
- (9) Saito K, *et al.* (2015). Predictive Performance of the Short Time Exposure Test for Identifying Eye Irritation Potential of Chemical Mixtures.
- (10) Mikkelsen TJ, Chrai SS og Robinson JR. (1973). Altered Bioavailability of Drugs in the Eye Due to Drug-Protein Interaction. *J. Pharm. Sci.* 1648-1653.
- (11) ECETOC (1998). Eye Irritation Reference Chemicals Data Bank. Technical Report (No 48. (2)), Bruxelles, Belgien.

- (12) Gautheron P, *et al.* (1992). Bovine Corneal Opacity and Permeability Test: an *In Vitro* Assay of Ocular Irritancy. *Fundam Appl Toxicol.* 18, 442–449.
- (13) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (14) OECD (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 263). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

Tillæg

DEFINITIONER

Nøjagtighed: overensstemmelsen mellem forsøgsmetodens resultater og accepterede referenceværdier. Den er et mål for forsøgsmetodens ydeevne og et af aspekterne af relevans. Udtrykket benyttes ofte som synonym for konkordans, forstået som den andel af korrekte udfald, forsøgsmetoden giver (13).

Referencestof: et stof, der anvendes som standard til sammenligning med et testkemikalie. Et referencestof skal have følgende egenskaber: (i) en eller flere ensartede og pålidelige kilder, (ii) strukturel og funktionel lighed med den stofgruppe, der testes, (iii) kendte fysisk/kemiske egenskaber, (iv) støttedata om kendte egenskaber og (v) kendt styrke i det ønskede responsområde.

Bottom-up-tilgang: en trinvis tilgang til et testkemikalie, som mistænkes for ikke at kræve klassificering for øjenirritation eller alvorlige øjenskader, og som starter med bestemmelse af kemikalier, der ikke kræver klassificering (negativt resultat) i forhold til andre kemikalier (positivt resultat).

Kemikalie: et stof eller en blanding.

Øjenirritation: frembringelse af forandring i øjet, som opstår efter påføring af et testkemikalie på øjets anteriore overflade, og som er fuldt reversibelt inden for 21 dage efter påføring. Synonymt med "Reversible virkninger på øjet" og UN GHS/CLP-kategori 2.

Falsk negativ-rate: den andel af alle positive kemikalier, som ved en forsøgsmetode fejlagtigt identificeres som negative. Det er en indikator for forsøgsmetodens ydeevne.

Falsk positiv-rate: den andel af alle negative kemikalier, som ved en forsøgsmetode fejlagtigt identificeres som positive. Det er en indikator for forsøgsmetodens ydeevne.

Fare: den iboende egenskab ved et middel eller en situation, som kan forårsage skadelige virkninger, når en organisme, et system eller en (sub)population eksponeres for det pågældende middel.

Mediekontrol: et ubehandlet replikat, som indeholder alle et testsystems komponenter. Prøven behandles sammen med prøver behandlet med testkemikallet og andre kontroller for at afgøre, hvorvidt opløsningsmidlet interagerer med testsystemet.

Blanding: blanding eller opløsning, der består af to eller flere stoffer.

Stof med kun én bestanddel: et stof, der defineres af sin mængdemæssige sammensætning, hvori en hovedbestanddel udgør mindst 80 % (w/w).

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid thiazolylblåt tetrazolium-bromid.

Stof med flere bestanddele: et stof, der defineres af sin mængdemæssige sammensætning, hvori flere end én hovedbestanddel er til stede i en koncentration på $\geq 10\%$ (w/w) og $< 80\%$ (w/w). Et stof, der består af flere forskellige bestanddele, er resultatet af en fremstillingsproces. Forskellen mellem en blanding og et stof med forskellige bestanddele er, at blandingen er fremstillet ved at blande to eller flere stoffer uden kemisk reaktion. Et stof, der består af flere forskellige bestanddele, er resultatet af en kemisk reaktion.

OD: optisk tæthed.

Positiv kontrol: et replikat, som indeholder alle komponenterne fra et testsystem og er behandlet med et stof, som vides at inducere en positiv respons. For at sikre, at det er muligt at vurdere variabiliteten i den positive kontrolrespons over tid, bør den positive respons ikke være overdrevent stor.

Relevans: beskrivelse af sammenhængen mellem testen og den pågældende virkning og dens meningsfuldhed og brugbarhed til et bestemt formål. Det angives, i hvilket omfang testen måler eller forudsiger den pågældende biologiske virkning korrekt. Forsøgsmetodens nøjagtighed (konkordans) indgår i vurderingen af dens relevans (10).

Pålidelighed: mål for, i hvilken grad en forsøgsmetode kan reproduceres i og mellem laboratorier over en længere periode, når den udføres efter samme protokol. Den bedømmes ved beregning af reproducerbarhed inden for og mellem laboratorier og repeterbarhed inden for laboratorier (13).

Følsomhed: andel af alle positive/aktive kemikalier, der klassificeres korrekt ved testen. Det er et mål for nøjagtigheden af en forsøgsmetode, som giver kategoriske resultater, og er et vigtigt kriterium ved vurderingen af en forsøgsmetodes relevans (10).

Alvorlig øjenskade: frembringelse af vævsbeskadigelse i øjet eller alvorlig fysisk synsnedsættelse, som opstår efter påføring af et testkemikalie på øjets anteriore overflade, og som ikke er fuldt reversibel inden for 21 dage efter påføring. Synonymt med "irreversible virkninger på øjet" og UN GHS/CLP-kategori 1.

Opløsningsmiddel-/bærestofkontrol: en ubehandlet prøve, som indeholder alle komponenterne fra et testsystem, herunder det opløsningsmiddel eller bærestof, som behandles sammen med de testkemikaliebehandlede prøver og andre kontroller for at fastlægge basisresponsen for de prøver, som er behandlet med testkemikaliets opløst i det samme opløsningsmiddel eller bærestof. Når denne prøve testes med en samtidig mediekontrol, viser den også, hvorvidt opløsningsmidlet eller bærestoffet interagerer med testsystemet.

Specifitet: andel af alle negative/inaktive kemikalier, der klassificeres korrekt ved testen. Det er et mål for nøjagtigheden af en forsøgsmetode, som giver kategoriske resultater, og er et vigtigt kriterium ved vurderingen af en forsøgsmetodes relevans (13).

Stof: et grundstof og forbindelser heraf, naturlige eller industrielt fremstillet, indeholdende sådanne tilsætningsstoffer, som er nødvendige til bevarelse af stoffets stabilitet, og sådanne urenheder, som følger af fremstillingsprocessen, bortset fra opløsningsmidler, der kan udskilles, uden at det påvirker stoffets stabilitet eller ændrer dets sammensætning.

Overfladeaktivt stof: også kaldet for afspændingsmiddel. Dette kemikalie, f.eks. et vaske- og rengøringsmiddel, der kan reducere overfladespændingen i en væske og dermed give den mulighed for at skumme eller trænge gennem faste stoffer, kaldes også for befugtningsmiddel.

Testkemikalie: ethvert stof eller enhver blanding, der testes ved hjælp af denne forsøgsmetode.

Trindelt testningsstrategi: ved anvendelse af den trinvis teststrategi gennemgås alle eksisterende oplysninger om et testkemikalie i en bestemt rækkefølge ved anvendelse af en "weight of evidence"-proces på hvert trin for at fastslå, om der foreligger tilstrækkelige oplysninger til at træffe en fareklassificeringsafgørelse, inden der fortsættes til næste trin. Hvis et testkemikalies irritationspotentiale kan underbygges på grundlag af eksisterende oplysninger, er der ikke behov for at foretage yderligere test. Hvis et testkemikalies irritationspotentiale ikke kan underbygges på grundlag af eksisterende oplysninger, foretages en trindelt sekventiel dyreforsøgsprocedure, indtil der kan foretages en utvetydig klassificering.

Top-down-tilgang: trinvis tilgang, som anvendes for et testkemikalie, der mistænkes for at forårsage alvorlig øjenskade, og som starter med bestemmelse af kemikalier, som forårsager alvorlig øjenskade (positivt resultat), i forhold til andre kemikalier (negativt resultat).

De Forenede Nationers globalt harmoniserede system for klassificering og mærkning af kemikalier (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals – UN GHS): Et system til klassificering af kemikalier (stoffer og blandinger) efter standardiserede typer og niveauer af fysisk fare, sundhedsfare og miljøfare med tilhørende kommunikationselementer såsom piktogrammer, signalord, faresætninger, sikkerhedssætninger og sikkerhedsdatablade, således at oplysninger om kemikaliernes skadelige virkninger kan videreformidles med henblik på at beskytte mennesker (f.eks. arbejdsgivere, arbejdstagere, transportører, forbrugere og redningspersonel) og miljøet (1).

UN GHS/CLP-kategori 1: se "Alvorlige øjenskader".

UN GHS/CLP-kategori 2: se "Øjenirritation".

UN GHS/CLP – uden for kategori: Kemikalier, der ikke er klassificeret som øjenirriterende stoffer i UN GHS/CLP-kategori 1 eller 2 (eller UN GHS-kategori 2A eller 2B).

UVCB: stoffer med ukendt eller variabel sammensætning, komplekse

reaktionsprodukter eller biologiske materialer.

B.69 FORSØGSMETODE MED REKONSTRUERET HUMANT CORNEA-LIGNENDE EPITHEL (RhCE) TIL PÅVISNING AF KEMIKALIER, SOM IKKE KRÆVER KLASSIFICERING OG MÆRKNING FOR ØJENIRRITATION ELLER ALVORLIGE ØJENSKADER

INDLEDNING

1. Denne forsøgsmetode svarer til OECD's testvejledning (Test Guideline (TG)) 492 (2017). *Alvorlige øjenskader* defineres som frembringelse af vævsbeskadigelse i øjet eller alvorlig fysisk synsnedsættelse, som opstår efter påføring af et testkemikalie på øjets anteriore overflade, og som ikke er fuldt reversibel inden for 21 dage efter påføring som defineret i De Forenede Nationers globale harmoniserede system for klassificering og mærkning af kemikalier (UN GHS) (1) og Den Europæiske Unions forordning (EU) 1272/2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger (CLP)¹. *Øjenirritation* defineres også i overensstemmelse med UN GHS og CLP som frembringelse af forandringer i øjet, der opstår efter påføring af et testkemikalie på øjets anteriore overflade og er fuldt reversibel inden for 21 dage efter påføring. Testkemikalier, der medfører alvorlige øjenskader, er klassificeret som UN GHS/CLP-kategori 1, mens kemikalier, der medfører øjenirritation, er klassificeret som UN GHS/CLP-kategori 2. Testkemikalier, der ikke klassificeres for øjenirritation eller alvorlig øjensskade, defineres på samme måde som de kemikalier, der ikke opfylder kravene med hensyn til klassificering som UN GHS/CLP-kategori 1 eller 2 (2A eller 2B), dvs. de betegnes som UN GHS/CLP – uden for kategori.
2. Vurderingen af alvorlige øjenskader/øjenirritation har typisk omfattet brug af forsøgsdyr (TM B.5) (2). Valget af den mest egnede forsøgsmetode og anvendelsen af denne forsøgsmetode skal ses i sammenhæng med OECD's vejledende dokument om integrerede tilgange til testning og vurdering for alvorlige øjenskader og øjenirritation (39).
3. Denne forsøgsmetode beskriver en in vitro-procedure, som gør det muligt at identificere kemikalier (stoffer og blandinger), der ikke kræver klassificering og mærkning for øjenirritation eller alvorlige øjenskader i overensstemmelse med UN GHS/CLP. Den gør brug af rekonstrueret humant cornea-lignende epithel (RhCE), som nøje efterligner det humane cornea-epithels histologiske, morfologiske,

¹ Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1272/2008 af 16. december 2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger og om ændring og ophævelse af direktiv 67/548/EØF og 1999/45/EF og om ændring af forordning (EF) nr. 1907/2006, EUT L 353 af 31.12.2008, s. 1.

biokemiske og fysiologiske egenskaber. Fire andre in vitro-forsøgsmetoder er blevet valideret, betragtet som videnskabeligt gyldige og vedtaget som TM B.47 (3), B.48 (4), B.61 (5) og B.68 (6), hvis effektparameter for menneskers sundhed er alvorlige øjenskader/øjenirritation.

4. To validerede test, der anvender RhCE-modeller, der kan fås i handelen, er inkluderet i denne forsøgsmetode. Der er foretaget valideringsundersøgelser til vurdering af øjenirritation/alvorlige øjenskader (7)(8)(9)(10)(11)(12)(13) under anvendelse af EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) og SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). Som testsystem gør hver af disse test brug af RhCE-vævsmodeller, der kan fås i handelen, og som i den følgende tekst omtales som de validerede referencemetoder – henholdsvis VRM 1 og VRM 2. På grundlag af disse valideringsundersøgelser og det uafhængige peer review heraf (9)(12) blev det konkluderet, at EpiOcular™ EIT og SkinEthic™ HCE EIT kan identificere kemikalier korrekt (både stoffer og blandinger), som ikke kræver klassificering og mærkning for øjenirritation eller alvorlige øjenskader i overensstemmelse med UN GHS, og testene blev anbefalet som videnskabeligt gyldige til det pågældende formål (13).
5. Det er i øjeblikket generelt accepteret, at der i den nærmeste fremtid ikke vil være en enkelt in vitro-forsøgsmetode, der fuldt ud vil kunne erstatte in vivo-Draize-øjentesten(2)(14) til forudsigelse af hele spektret af alvorlige øjenskader/øjenirritation for forskellige kemikaliegrupper. Strategiske kombinationer af flere alternative forsøgsmetoder i (trinvis) teststrategier såsom bottom-up/top-down-tilgangen kan dog muligvis fuldt ud erstatte Draize-øjentesten (15). Bottom-up-tilgangen (15) er beregnet til at blive anvendt, når et kemikalie på grundlag af eksisterende oplysninger ikke forventes at forårsage tilstrækkelig øjenirritation til at kræve en klassificering, mens top-down-tilgangen (15) er beregnet til at blive anvendt, når et kemikalie på grundlag af eksisterende oplysninger forventes at forårsage alvorlige øjenskader. EpiOcular™ EIT og SkinEthic™ HCE EIT anbefales til at identificere kemikalier, der ikke kræver klassificering for øjenirritation eller alvorlige øjenskader ifølge UN GHS/CLP (uden for kategori), uden yderligere testning inden for en teststrategi som bottom-up/top-down-tilgangen i henhold til Scott *et al.*, f.eks. som et indledende skridt i bottom-up-tilgangen eller som et af de sidste skridt i top-down-tilgangen (15). EpiOcular™ EIT og SkinEthic™ HCE EIT er dog ikke beregnet til at kunne sondre mellem UN GHS/CLP-kategori 1 (alvorlige øjenskader) og UN GHS/CLP-kategori 2 (øjenirritation). Denne opdeling vil skulle foretages på et andet trin i teststrategien (15). Et testkemikalie, der med EpiOcular™ EIT eller SkinEthic™ HCE EIT identificeres som et kemikalie, der kræver klassificering for øjenirritation/alvorlige øjenskader, vil således kræve yderligere testning (in vitro og/eller in vivo), for at der kan nås en endelig konklusion (UN GHS/CLP – uden for kategori, kategori 2 eller kategori 1) under anvendelse af f.eks. TM B.47, B.48, B.61 eller B.68.

6. Formålet med denne forsøgsmetode er at beskrive den procedure, som anvendes til at vurdere et testkemikalies potentielle risiko for at forårsage øjenskader baseret på dets evne til at fremkalde en cytotoxisk effekt i et RhCE-væv som målt ved MTT-assayet (16) (jf. punkt 21). RhCE-vævs levedygtighed efter eksponering for et testkemikalie bestemmes ved sammenligning med væv, der behandles med det negative kontrolstof (levedygtighed i %) og anvendes herefter til at forudsige testkemikaliets risiko for at forårsage øjenskade.
7. Der foreligger ydeevnestandarder (17) for at lette valideringen af nye eller ændrede in vitro-RhCE-baserede test, der ligner EpiOcular™ EIT og SkinEthic™ HCE EIT, i overensstemmelse med OECD's vejledende dokument nr. 34 (18) og give mulighed for rettidig ændring af OECD TG 492, så de kan blive opført heri. Gensidig godkendelse af data i henhold til OECD-aftalen vil kun være garanteret for test, der er valideret i henhold til ydeevnestandarderne, hvis disse test er gennemgået og medtaget i OECD's tilhørende testvejledning.

DEFINITIONER

8. Definitioner findes i tillæg 1.

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER

9. Denne forsøgsmetode er baseret på tredimensionale RhCE-vævsmodeller, som fås i handelen. De er fremstillet ved anvendelse af enten primære humane epidermis-keratinocytter (dvs. EpiOcular™ OCL-200) eller humane udødeliggjorte cornea-epithelceller (dvs. SkinEthic™ HCE/S). EpiOcular™ OCL-200- og SkinEthic™ HCE/S-RhCE-vævsmodeller ligner den tredimensionale opbygning af in vivo-cornea-epithel og fremstilles ved hjælp af celler fra relevante arter (19)(20). Endvidere måler testene direkte cytotoxisk effekt som følge af kemikaliets penetration gennem cornea og forårsagelse af celle- og vævsskade. Den cytotoxiske reaktion bestemmer herefter det samlede resultat af alvorlige øjenskader/øjenirritation in vivo. Cellebeskadigelse kan opstå ved flere virkemåder (jf. punkt 20), men cytotoxisk effekt spiller en vigtig, hvis ikke primær, mekanistisk rolle for bestemmelse af den samlede reaktion på et kemikalie i form af alvorlige øjenskader/øjenirritation, som giver sig udtryk in vivo, hovedsagelig ved cornea-uklarhed, iritis, conjunctiva-rødme og/eller conjunctiva-chemosis, uanset hvilke fysisk-kemiske processer, der ligger til grund for vævsbeskadigelsen.
10. En lang række af kemikalier, som dækker en bred vifte af kemiske stoffer, kemikaliegrupper, molekyelvægte, LogP'er, kemiske strukturer osv., er blevet testet i den valideringsundersøgelse, som ligger til grund for denne forsøgsmetode. EpiOcular™ EIT-valideringsdatabasen indeholdt 113 kemikalier i alt, der dækker

95 forskellige organiske funktionelle grupper ifølge en analyse af OECD's QSAR-værktøjskasse (8). De fleste af disse kemikalier var stoffer med kun én bestanddel, men flere stoffer med flere bestanddele (bl.a. 3 homopolymerer, 5 copolymerer og 10 kvasi-polymerer) blev også medtaget i undersøgelsen. Med hensyn til fysisk form og UN GHS/CLP-kategorier fordelte de 113 testede kemikalier sig som følger: 13 væsker i kategori 1, 15 faste stoffer i kategori 1, 6 væsker i kategori 2A, 10 faste stoffer i kategori 2A, 7 væsker i kategori 2B, 7 faste stoffer i kategori 2B, 27 væsker uden for kategori og 28 faste stoffer uden for kategori (8). SkinEthic™ HCE EIT-valideringsdatabasen indeholdt 200 kemikalier i alt, der dækker 165 forskellige organiske funktionelle grupper (8)(10)(11). De fleste af disse kemikalier var stoffer med kun én bestanddel, men flere stoffer med flere bestanddele (bl.a. 10 polymerer) blev også medtaget i undersøgelsen. Med hensyn til fysisk form og UN GHS/CLP-kategorier fordelte de 200 testede kemikalier sig som følger: 27 væsker i kategori 1, 24 faste stoffer i kategori 1, 19 væsker i kategori 2A, 10 faste stoffer i kategori 2A, 9 væsker i kategori 2B, 8 faste stoffer i kategori 2B, 50 væsker uden for kategori og 53 faste stoffer uden for kategori (10)(11).

11. Denne forsøgsmetode kan benyttes til test af stoffer og blandinger og faste stoffer, væsker, halvfaste stoffer og vokser. Væskerne kan være vandige eller ikke-vandige, og de faste stoffer kan være vandopløselige eller uopløselige i vand. Faste stoffer skal males til et fint pulver, før de påføres, når det overhovedet er muligt. Der kræves ingen anden forbehandling af teststoffet. Gasser og aerosoler er ikke vurderet ved en valideringsundersøgelse. Selv om det er tænkeligt, at disse stoffer kan undersøges ved hjælp af RhCE-teknologi, muliggør den nuværende forsøgsmetode ikke undersøgelse af gasser og aerosoler.
12. Testkemikalier, der absorberer lys i det samme område som MTT-formazan (naturligt eller efter behandling), og testkemikalier, som direkte kan interferere med målinger af vævets levedygtighed og reducere vitalfarvestoffet MTT (til MTT-formazan), kan kræve anvendelse af tilpassede kontroller med henblik på korrektioner. Hvilken type af tilpassede kontroller, der kan være nødvendige, varierer alt efter den type interferens, testkemikaliets fremkalder, og den procedure, der benyttes til at kvantificere MTT-formazan (jf. punkt 36-42).
13. Resultater, der er fremkommet ved undersøgelser til prævalidering (21)(22) og fuld validering (8)(10)(11), har vist, at både EpiOcular™ EIT og SkinEthic™ HCE EIT kan overføres til laboratorier, der betragtes som uerfarne med gennemførelsen af assays, og også kan reproducere i og mellem laboratorier. På grundlag af disse undersøgelser er niveauet for reproducerbarhed med hensyn til konkordans i de forudsigelser, der kan forventes af EpiOcular™ EIT vedrørende data om 113 kemikalier, i størrelsesordenen 95 % i laboratorier og 93 % mellem laboratorier. Niveauet for reproducerbarhed med hensyn til konkordans i de forudsigelser, der kan

forventes af SkinEthic™ HCE EIT vedrørende data om 120 kemikalier, er i størrelsesordenen 92 % i laboratorier og 95 % mellem laboratorier.

14. EpiOcular™ EIT kan anvendes til at identificere kemikalier, der ikke kræver klassificering for øjenirritation eller alvorlige øjenskader i overensstemmelse med UN GHS- og CLP-klassificeringssystemet. Ud fra de data, der fremgår af valideringsundersøgelsen (8), har EpiOcular™ EIT en samlet nøjagtighed på 80 % (baseret på 112 kemikalier), en følsomhed på 96 % (baseret på 57 kemikalier), en falsk negativ-rate på 4 % (baseret på 57 kemikalier), en specificitet på 63 % (baseret på 55 kemikalier) og en falsk positiv-rate på 37 % (baseret på 55 kemikalier), sammenholdt med referencedata fra in vivo-kaninøjentest (TM B.5) (2)(14), der er klassificeret i overensstemmelse med UN GHS- og CLP-klassificeringssystemet. En undersøgelse, hvor 97 flydende agrokemiske formuleringer blev testet med EpiOcular™ EIT, viste lignende resultater af forsøgsmetoden for denne type blandinger som dem, der blev opnået i valideringsundersøgelsen (23). De 97 formuleringer fordelte sig som følger: 21 i kategori 1, 19 i kategori 2A, 14 i kategori 2B og 43 uden for kategori, klassificeret efter UN GHS-klassificeringssystemet på grundlag af referencedata fra in vivo-kaninøjentesten (TM B.5) (2)(14). Der blev opnået en samlet nøjagtighed på 82 % (baseret på 97 formuleringer), en følsomhed på 91 % (baseret på 54 formuleringer), en falsk negativ-rate på 9 % (baseret på 54 formuleringer), en specificitet på 72 % (baseret på 43 formuleringer) og en falsk positiv-rate på 28 % (baseret på 43 formuleringer) (23).
15. SkinEthic™ HCE EIT kan anvendes til at identificere kemikalier, som ikke kræver klassificering for øjenirritation eller alvorlige øjenskader efter UN GHS- og CLP-klassificeringssystemet. Ud fra de data, der fremgår af valideringsundersøgelsen (10)(11), har SkinEthic™ HCE EIT en samlet nøjagtighed på 84 % (baseret på 200 kemikalier), en følsomhed på 95 % (baseret på 97 kemikalier), en falsk negativ-rate på 5 % (baseret på 97 kemikalier), en specificitet på 72 % (baseret på 103 kemikalier) og en falsk positiv-rate på 28 % (baseret på 103 kemikalier), sammenholdt med referencedata fra in vivo-kaninøjentest (TM B.5) (2)(14), der er klassificeret i overensstemmelse med UN GHS- og CLP-klassificeringssystemet.
16. De falsk negativ-rater, som blev opnået med begge RhCE-test for enten stoffer eller blandinger, falder inden for den 12 % samlede sandsynlighed for, at kemikalier identificeres som enten UN GHS/CLP-kategori 2 eller UN GHS/CLP – uden for kategori ved in vivo-Draize-øjentesten i gentagne test. Dette skyldes metodens iboende variabilitet inden for testen (24). De falsk positive-rater, som blev opnået med begge RhCE-forsøgsmetoder med stoffer eller blandinger, er ikke kritiske i forbindelse med denne forsøgsmetode, eftersom alle testkemikalier, der fremkalder en vævslevedygtighed svarende til eller lavere end de fastsatte tærskelværdier (jf. punkt 44), vil kræve yderligere test med andre in vitro-forsøgsmetoder eller som

sidste mulighed hos kaniner alt efter de forskriftsmæssige krav ved anvendelse af en sekventiel teststrategi i en "weight-of-evidence"-analyse. Disse forsøgsmetoder kan anvendes til alle typer af kemikalier, hvor der bør accepteres et negativt resultat, som ikke klassificerer et kemikalie for øjenirritation og alvorlige øjenskader (UN GHS/CLP – uden for kategori). De relevante kompetente myndigheder bør høres, før EpiOcular™ EIT og SkinEthic™ HCE EIT anvendes i henhold til andre klassifikationsordninger end UN GHS/CLP.

17. En begrænsning af denne forsøgsmetode er, at den ikke gør det muligt at sondre mellem øjenirritation/reversible virkninger for øjet (kategori 2) og alvorlige øjenskader/irreversible virkninger for øjet (kategori 1) som defineret i UN GHS og CLP, og heller ikke mellem øjenirriterende stoffer (valgfri kategori 2A) og milde øjenirriterende stoffer (valgfri kategori 2B), som defineret i UN GHS (1). Til disse formål kræves der yderligere testning med andre in vitro-forsøgsmetoder.
18. Betegnelsen "testkemikalie" anvendes i denne forsøgsmetode om det, der testes¹, og vedrører ikke RhCE-forsøgsmetodens anvendelighed til testning af stoffer og/eller blandinger.

PRINCIP FOR TESTEN

19. Testkemikalien påføres lokalt på mindst to tredimensionale RhCE-vævsmodeller, og vævets levedygtighed måles efter eksponering og en inkubationsperiode efter behandling. RhCE-væv rekonstrueres fra primære humane epidermis-keratinocytter eller humane udødeliggjorte cornea-epithelceller, som er blevet dyrket i flere dage, så de danner et lagdelt, stærkt differentieret pladeepithel, som morfologisk ligner det, der findes i den menneskelige cornea. EpiOcular™ RhCE-vævsmodellen består af mindst tre levedygtige cellelag og en ikke-keratiniseret overflade, der udviser en cornea-lignende struktur svarende til den, som findes in vivo. SkinEthic™ HCE RhCE-vævsmodellen består af mindst fire levedygtige cellelag, herunder søjleformede basalceller, midlertidige vingeceller og overfladiske pladeceller svarende til det normale humane cornea-epithel (20)(26).
20. Kemikalieinducerede alvorlige øjenskader/øjenirritation, der in vivo hovedsagelig giver sig udslag i cornea-uklarhed, iritis, conjunctiva-rødme og/eller conjunctiva-

¹ I juni 2013 blev OECD på et fælles møde enig om, at betegnelsen "testkemikalie", hvor det er muligt, bør anvendes på en mere konsekvent måde i nye og opdaterede OECD-testvejledninger til at beskrive, hvad det er, der testes.

chemosis, er en følge af en kaskade af begivenheder, der begynder med kemikaliets penetration gennem cornea og/eller conjunctiva og fremkaldelse af skader på cellerne. Cellebeskadigelse kan opstå ved flere virkemåder, herunder: lysis af cellemembranen (f.eks. ved overfladeaktive stoffer, organiske opløsningsmidler), koagulering af makromolekyler (især proteiner) (f.eks. ved overfladeaktive stoffer, organiske opløsningsmidler, baser og syrer), forsæbning af lipider (f.eks. ved baser) samt alkylering og andre kovalente interaktioner med makromolekyler (f.eks. ved blegemidler, peroxider og alkylatorer) (15)(27)(28). Det er dog blevet påvist, at cytotoxisk effekt spiller en vigtig, om ikke primær, mekanistisk rolle for bestemmelse af den samlede reaktion på et kemikalie i form af alvorlige øjenskader/øjenirritation, uanset hvilke fysisk-kemiske processer, der ligger til grund for vævsbeskadigelsen (29)(30). Endvidere bestemmes et kemikalies risiko for at forårsage alvorlige øjenskader/øjenirritation primært af omfanget af den indledende skade (31), der hænger sammen med omfanget af celledød (29) og med omfanget af de efterfølgende reaktioner og senere resultater (32). Således påvirker let irriterende stoffer normalt kun corneas overfladeepithel, de mildt og moderat irriterende stoffer primært epithellet og stroma i overfladen, mens stærkt øjenirriterende stoffer beskadiger epithellet, dyb stroma og til tider corneas endothel (30)(33). Målingen af RhCE-vævsmodellens levedygtighed efter lokal eksponering for et testkemikalie for at identificere kemikalier, som ikke kræver klassificering for alvorlige øjenskader/øjenirritation (UN GHS/CLP – uden for kategori), er baseret på den antagelse, at alle kemikalier, der fremkalder alvorlige øjenskader eller øjenirritation, vil inducere cytotoxisk effekt i cornea-epithellet og/eller conjunctiva.

21. RhCE-vævs levedygtighed måles typisk ved enzymomdannelse af vitalfarvestoffet MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, thiazolylblåt tetrazolium-bromid, CAS-nummer 298-93-1) forårsaget af de levedygtige celler i vævet til et blåt MTT-formazansalt, der måles kvantitativt efter ekstraktion fra vævene (16). Kemikalier, som ikke kræver klassificering og mærkning efter UN GHS/CLP (uden for kategori), identificeres som kemikalier, der ikke nedsætter vævets levedygtighed under en fastsat tærskel (dvs. vævslevedygtighed > 60 % i EpiOcular™ EIT og SkinEthic™ HCE EITL¹ eller > 50 %, i SkinEthic™ HCE EITS²) (jf. punkt 44).

¹ EITL: EIT til væsker ved anvendelse af SkinEthic™ HCE.

² EITS: EIT til faste stoffer ved anvendelse af SkinEthic™ HCE.

PÅVISNING AF KOMPETENCE

22. Inden laboratorier påbegynder rutinemæssig brug af RhCE-test til lovmæssige formål, bør de påvise deres tekniske kompetence ved korrekt at forudsige de 15 kompetencekemikalier, der er anført i tabel 1. Disse kemikalier blev udvalgt blandt de kemikalier, som anvendes i valideringsundersøgelserne af VRM'er (8)(10)(11). De udvalgte kemikalier omfatter så vidt muligt kemikalier, der: (i) dækker forskellige fysiske former, ii) dækker det fulde spektrum af in vivo-reaktioner i form af alvorlige øjenskader/øjenirritation baseret på resultater af høj kvalitet opnået ved in vivo-kaninøjentesten som reference (TM B.5) (2)(14) og UN GHS-klassificeringssystemet (dvs. kategori 1, 2A, 2B eller uden for kategori) (1) og CLP-klassificeringssystemet (dvs. kategori 1, 2 eller uden for kategori), (iii) dækker de forskellige in vivo-klassificeringsfaktorer (24)(25), (iv) er repræsentative for de kemikaliegrupper, der blev anvendt i valideringsundersøgelsen (8)(10)(11), (v) dækker et godt og bredt udsnit af organiske funktionelle grupper (8)(10)(11), vi) har veldefinerede kemiske strukturer (8)(10)(11), (vii) er farvede og/eller direkte MTT-opløsninger, (viii) gav reproducerbare resultater ved RhCE-forsøgsmetoderne under valideringer af dem, (ix) blev korrekt forudset ved RhCE-forsøgsmetoderne under valideringsundersøgelsen af dem, (x) dækker det fulde spektrum af in vitro-reaktioner baseret på data af høj kvalitet om RhCE-forsøgsmetoder (0-100 % levedygtighed), xi) findes i handelen og xii) ikke er forbundet med uoverkommelige anskaffelses- og/eller bortskaffelsesomkostninger. Hvis et stof på listen ikke kan fås eller af andre gyldige grunde ikke kan anvendes, kan der anvendes et andet kemikalie, som opfylder ovennævnte kriterier, f.eks. blandt de kemikalier, der blev anvendt ved valideringen af VRM. Sådanne afvigelser bør dog begrundes.

Kemisk betegnelse	CAS RN	Organisk funktionel gruppe ¹	Fysisk form	VRM1-levedygtighed (%) ²	VRM2-levedygtighed (%) ³	VRM-forudsigelse	MTT-reduktionsmiddel	Farveinterf.
Diethyltoluamid	134-62-3	Benzamid	L	15,6 ± 6,3	2,8 ± 0,9	Der kan ikke fremsættes nogen forudsigelser	N	N
2,2-dimethyl-3-methylenbicyclo [2.2.1] heptan	79-92-5	Forgrenet alkan med tertiært kulstof, alken, bicycloheptan, forbundne kulstofringe, cycloalkan	S	4,7 ± 1,5	15,8 ± 1,1	Der kan ikke fremsættes nogen forudsigelser	N	N
In vivo Uden for kategori⁴								
1-ethyl-3-methylimidazoletylsulfat	342573-75-5	Alkoxy, ammoniumsalt, aryl, imidazol, sulfat	L	79,9 ± 6,4	79,4 ± 6,2	Uden for kat.	N	N
Dicaprylylether	629-82-3	Alkoxy, Ether	L	97,8 ± 4,3	95,2 ± 3,0	Uden for kat.	N	N
Piperonylbutoxid	51-03-6	Alkoxy, benzodioxol, benzyl, Ether	L	104,2 ± 4,2	96,5 ± 3,5	Uden for kat.	N	N
Polyethylenglycol (PEG-40)-hydrogeneret ricinusolie	61788-85-0	Acylal, alkohol, allyl, Ether	Viskøs	77,6 ± 5,4	89,1 ± 2,9	Uden for kat.	N	N
1-(4-chlorphenyl)-3-(3,4-dichlorphenyl)-urinstof	101-20-2	Aromatisk heterocyklisk halid, arylhalogenid, urinstofderivater	S	106,7 ± 5,3	101,9 ± 6,6	Uden for kat.	N	N
2,2'-methylen-bis-(6-(2H-benzotriazol-2-yl)-4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenol)	103597-45-1	Forgrenet alkan med kvartært kulstof, smeltede carbocykliske forbindelser, aromatiske, smeltede mættede heterocykliske forbindelser, prækursorer quinoide forbindelser, tert-butyl	S	102,7 ± 13,4	97,7 ± 5,6	Uden for kat.	N	N
Kalium-tetrafluorborat	14075-53-7	Uorganisk salt	S	88,6 ± 3,3	92,9 ± 5,1	Uden for kat.	N	N

Forkortelser: CASRN = Registernummer i Chemical Abstracts Service UN GHS = De Forenede Nationers globalt harmoniserede system for klassificering og mærkning af kemikalier (1), VRM1 = valideret referencemetode, EpiOcular™ EIT, VRM2 = valideret referencemetode, SkinEthic™ HCE EIT, Farveinterf. = farveinterferens med måling af standardabsorbans (optisk densitet (OD)) af MTT-formazan.

¹ Organisk funktionel gruppe tildelt efter en nested analyse ifølge en OECD-værktøjskasse 3.1 (8).

² Baseret på resultater opnået med EpiOcular™ EIT i EURL ECVAM/Cosmetics Europe Eye Irritation Validation Study (EIVS) (8).

³ Baseret på resultater opnået med SkinEthic™ HCE EIT i valideringsundersøgelsen (10)(11).

⁴ Baseret på resultater fra in vivo-kaninøjentesten (TM B.5/OECD TG 405) (2)(14) og ved anvendelse af UN GHS.

⁵ Baseret på resultater opnået i CEFIC CONsortiums in vitro-undersøgelse Eye Irritation testing strategy (CON4EI) Study.

⁶ Klassificering som 2A eller 2B afhænger af fortolkningen af UN GHS-kriteriet for sontring mellem disse to kategorier, dvs. 1 dyr ud af 3 mod 2 dyr ud af 3 med virkninger på dag 7, som er nødvendige for at generere en kategori 2A-klassificering. In vivo-undersøgelsen omfattede tre dyr. Alle effektparametre bortset fra cornea-uklarhed hos et dyr, der opnåede en bedring til en score på nul på dag 7 eller tidligere. Det ene dyr, som ikke kom sig fuldt ud inden dag 7, havde en cornea-uklarhed på 1 (på dag 7) og opnåede fuld bedring på dag 9.

23. Som led i påvisningen af kompetence anbefales det, at brugere kontrollerer vævenes barriereegenskaber efter modtagelse som beskrevet af producenten af RhCE-vævsmodellen (jf. punkt 25, 27 og 30). Dette er navnlig vigtigt, hvis vævene sendes over lange afstande/er længe undervejs. Når en test er helt fastlagt, og kompetencen med hensyn til brugen heraf erhvervet og påvist, vil denne rutinemæssige kontrol ikke være nødvendig. Når en test benyttes rutinemæssigt, anbefales det dog fortsat at vurdere barriereegenskaberne med regelmæssige mellemrum.

FREMGANGSMÅDE

24. De test, der i øjeblikket er dækket af denne forsøgsmetode, er de videnskabeligt validerede EpiOcular™ EIT og SkinEthic™ HCE EIT (9)(12)(13), der omtales som de validerede referencemetoder (henholdsvis VRM1 og VRM2). Standardprocedurer for RhCE-forsøgsmetoderne er tilgængelige og bør anvendes ved gennemførelse og brug af forsøgsmetoderne i et laboratorium (34)(35). Følgende punkter og tillæg 2 indeholder en beskrivelse af de vigtigste komponenter og procedurer i RhCE-testene.

KOMPONENTERNE I RHCE-FORSØGSMETODEN

Almindelige betingelser

25. Relevante humant afledte celler bør anvendes til at rekonstruere cornea-lignende tredimensionalt epithelvæv, som bør bestå af gradvist lagdelte, men ikke forhornede celler. RhCE-vævsmodellen præpareres i indsatser med en porøs syntetisk membran, som næringsstoffer kan passere igennem til cellerne. Der bør være flere lag levedygtige, ikke-keratiniserede epithelceller til stede i det rekonstruerede cornea-lignende epithel. RhCE-vævsmodellens epitheloverflade skal have direkte luftkontakt, så der kan ske direkte lokal eksponering for testkemikalierne på en måde, der ligner den måde, hvorpå cornea-epithelet vil være eksponeret in vivo. RhCE-vævsmodellen skal danne en tilstrækkeligt robust funktionel barriere til at kunne modstå hurtig gennemtrængning af cytotoxiske referencestoffer, f.eks. Triton X-100 eller natriumdodecylsulphat (SDS). Barrierefunktionen påvises og kan vurderes ved at bestemme enten den eksponeringstid, der er nødvendig for at nedsætte vævets levedygtighed med 50 % (ET₅₀) efter påføring af et referencestof ved en fastsat koncentration (f.eks. 100 µl 0,3 % (v/v) Triton X-100) eller den koncentration, hvorved et referencestof nedsætter vævenes levedygtighed med 50 % (IC₅₀) efter en fastsat eksponeringstid (f.eks. 30 minutters behandling med 50 µl SDS) (jf. punkt 30). RhCE-vævsmodellens fysiske udformning skal forhindre, at testkemikaliets passerer uden om kanten af det levedygtige væv, hvilket kan forringe modelleringen af eksponeringen af cornea. De humant afledte celler, der anvendes til at opbygge RhCE-vævsmodellen, skal være fri for kontamination med bakterier, virus,

mykoplasma og svampe. Leverandøren skal kontrollere vævsmodellens sterilitet for fravær af kontaminering med svampe og bakterier.

Funktionsmæssige betingelser

Levedygtighed

26. MTT-assayet foretrækkes til kvantificering af vævslevedygtigheden (16). Levedygtige celler i RhCE-vævsmodellen reducerer vitalfarvestoffet MTT til blå MTT-formazanbundfald, som herefter ekstraheres fra vævet ved anvendelse af isopropanol (eller et lignende opløsningsmiddel). Det ekstraherede MTT-formazan kan kvantificeres ved anvendelse af enten måling af en standardabsorbans (optisk densitet (OD)) eller en HPLC/UPLC-spektrofotometriprocedure (36). OD af ekstraktionsmidlet alene bør være tilstrækkeligt lille, dvs. $OD < 0,1$. Brugere af RhCE-vævsmodellen skal sikre, at hver batch af den anvendte RhCE-vævsmodel overholder de fastlagte kriterier for den negative kontrol. Intervaller for de acceptable OD-værdier til negativ kontrol for VRM'er er anført i tabel 2. En bruger af HPLC/UPLC-spektrofotometri bør som acceptkriterie for den negative kontrol anvende de OD-intervaller til negativ kontrol, der er anført i tabel 2. Det skal i testrapporten godtgøres, at vævet fra behandling med det negative kontrolstof er en stabil kultur (giver enslydende målinger af vævslevedygtighed) i hele testeksponeringsperioden. En lignende procedure bør følges af vævsproducenten som led i kvalitetskontrollen ved godkendelse af en vævsbatch, men i dette tilfælde kan andre godkendelseskriterier end dem, der er anført i tabel 2, finde anvendelse. Udvikleren/leverandøren af RhCE-vævsmodellen skal fastsætte et interval (øvre og nedre grænse) for acceptable OD-værdier for negativ kontrol (i betingelserne for kvalitetskontrol af forsøgsmetoden).

Tabel 2: Intervaller for acceptable OD-værdier for negativ kontrol (for testbrugere)

Test	Nedre acceptgrænse	Øvre acceptgrænse
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM1 (for protokoller for både væsker og faste stoffer)	$> 0,8^1$	$< 2,5$
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM2 (for protokoller for både væsker og faste stoffer)	$> 1,0$	$\leq 2,5$

¹Denne acceptgrænse tager højde for mulig langvarig forsendelse/opbevaringstid (f.eks. > 4 dage), som har vist sig ikke at påvirke forsøgsmetodens resultater (37).

Barrierefunktion

27. RhCE-vævsmodellen skal være tilstrækkeligt tyk og robust til at kunne modstå hurtig gennemtrængning af cytotoxiske referencestoffer, som anslået af f.eks. ET_{50} (Triton

X-100) eller IC₅₀ (SDS) (tabel 3). Udvikleren/leverandøren af den anvendte RhCE-vævsmodel skal påvise barrierefunktionen for hver enkelt batch af RhCE-vævsmodellen ved levering af vævene til slutbrugeren (jf. punkt 30).

Morfologi

28. En histologisk undersøgelse af RhCE-vævsmodellen skal påvise en human cornea-lignende epithelstruktur (bl.a. mindst tre lag levedygtige epithelceller og en ikke-keratiniseret overflade). For VRM'er har udvikleren/leverandøren fastlagt passende morfologi, og den behøver derfor ikke påvises igen af brugeren af en forsøgsmetode for hver enkelt anvendt vævsbatch.

Reproducerbarhed

29. Resultaterne af forsøgsmetoden med positive og negative kontroller skal vise tidsmæssig reproducerbarhed.

Kvalitetskontrol

30. RhCE-vævsmodellen bør kun anvendes, hvis udvikleren/leverandøren påviser, at hver batch af den anvendte RhCE-vævsmodel overholder veldefinerede produktionsgodkendelseskriterier, hvoraf levedygtighed (punkt 26) og barrierefunktion (punkt 27) er de vigtigste. Udvikleren/leverandøren af RhCE-vævsmodellen skal fastsætte et interval for acceptable værdier (øvre og nedre grænser) for barrierefunktionerne som målt ved ET₅₀ eller IC₅₀ (jf. punkt 25 og 26). De ET₅₀- og IC₅₀-godkendelsesintervaller, som udvikleren/leverandøren af RhCE-vævsmodeller (anvendt i VRM'er) som kriterie for batchfrigivelse, er angivet i tabel 3. Udvikleren/leverandøren af RhCE-vævsmodellen skal fremlægge data, der dokumenterer overensstemmelse med alle produktionsgodkendelseskriterier, for brugere af forsøgsmetoden, således at disse kan medtage de pågældende oplysninger i testrapporten. Kun resultater, som er opnået med væv, der opfylder alle disse kriterier for produktionsgodkendelse, kan accepteres til at give en pålidelig vurdering af kemikalier, som ikke kræver klassificering og mærkning for øjenirritation eller alvorlige øjenskader i overensstemmelse med UN GHS/CLP.

Tabel 3: Kriterium for batchgodkendelse ved kvalitetskontrol

Test	Nedre acceptgrænse	Øvre acceptgrænse
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM1 (100 µl 0,3 % (v/v) Triton X-100)	ET ₅₀ = 12,2 min	ET ₅₀ = 37,5 min
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM2 (30 minutters behandling med 50 µl SDS)	IC ₅₀ = 1 mg/ml	IC ₅₀ = 3,2 mg/ml

Påføring af testkemikalie og kontrolstoffer

31. Der anvendes mindst to vævsgentagelser for hvert testkemikalie og hvert kontrolstof i hver analyseserie. Der anvendes to forskellige behandlingsprotokoller, en for flydende testkemikalier og en for faste testkemikalier (34)(35). For begge metoder og protokoller fugtes vævsmodellens overflade med kalcium- og magnesiumfrit Dulbeccos phosphatbufret fysiologisk saltopløsning ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -frit DPBS) før påføring af testkemikalier for at efterligne fugtbetingelserne i det menneskelige øje. Vævsbehandlingen indledes med eksponering for testkemikalie(r) og kontrolstoffer. For begge behandlingsprotokoller i de to VRM'er påføres en tilstrækkelig mængde testkemikalie eller kontrolstof til, at epitheloverfladen dækkes med et jævnt lag, og der samtidig undgås en ubegrænset dosis (jf. punkt 32 og 33) (tillæg 2).
32. Testkemikalier, der kan pipetteres ved 37 °C eller lavere temperaturer (om nødvendigt ved hjælp af en pipette med positiv fortrængning), behandles som væsker i VRM'erne, og ellers som faste stoffer (jf. punkt 33). I VRM'erne fordeles testkemikaliets jævnt over vævsoverfladen (dvs. en påføring på minimum 60 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$) (jf. tillæg 2, (33)(34)). De kapillarvirkninger (virkninger på overfladespændingen), som kan opstå på grund af de lave volumener, der påføres indsatsen (på vævets overflade), bør så vidt muligt undgås for at sikre korrekt dosering af vævet. Væv, der behandles med flydende testkemikalier, inkuberes i 30 minutter under standarddyrkningsbetingelser (37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2 , ≥ 95 % RH). Ved afslutningen af eksponeringsperioden fjernes det flydende testkemikalie og kontrolstofferne forsigtigt fra vævsoverfladen ved skylning med rigelig $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -frit DPBS ved stuetemperatur. Dette skylletrin følges af nedsænkning i frisk dyrkningsmedium ved stuetemperatur (for at fjerne testkemikalie, der eventuelt er absorberet i vævet) i en forud fastsat periode, som varierer alt efter den anvendte VRM. Kun for VMR1 anvendes en inkubation efter eksponering i frisk dyrkningsmedium under standarddyrkningsbetingelser før udførelsen af MTT-assayet (jf. tillæg 2, (34)(35)).
33. Testkemikalier, som ikke kan pipetteres ved temperaturer op til 37 °C, behandles som faste stoffer i VRM'er. Mængden af testkemikalie skal være tilstrækkelig til at dække hele vævets overflade, dvs. at der bør påføres mindst 60 mg/cm^2 (tillæg 2). Når det er muligt, bør faste stoffer testes som fint pulver. Væv, der behandles med faste testkemikalier, inkuberes i en forud fastsat periode (afhængigt af den anvendte VRM) under standarddyrkningsbetingelser (jf. tillæg 2, (34)(35)). Ved afslutningen af eksponeringsperioden fjernes det faste testkemikalie og kontrolstofferne forsigtigt fra vævsoverfladen ved skylning med rigelig $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -frit DPBS ved stuetemperatur. Dette skylletrin følges af en nedsænkning i frisk dyrkningsmedium ved stuetemperatur efter eksponering (for at fjerne testkemikalie, der eventuelt er absorberet i vævet) i en forud fastsat periode, som varierer alt efter den anvendte VRM, og en inkubation i frisk medium under standarddyrkningsbetingelser, før MTT-assayet udføres (jf. tillæg 2 (34)(35)).

34. Sideløbende negative og positive kontroller bør medtages i hver analyseserie for at påvise, at vævenes levedygtighed (bestemt med den negative kontrol) og følsomhed (bestemt med den positive kontrol) ligger inden for de acceptintervaller, som defineres på grundlag af tidligere data. Den sideløbende negative kontrol giver også referencen (100 % vævslevedygtighed) til at beregne den relative procentvise levedygtighed for de væv, der behandles med testkemikaliet (% levedygtighed_{Test}). Det anbefalede positive kontrolstof, der skal anvendes med VRM'erne, er ren methylacetat (CAS-nr. 79-20-9, fås i handelen fra f.eks. Sigma-Aldrich, Cat# 45997, væske). De anbefalede negative kontrolstoffer, der skal anvendes med VRM1 og VRM2, er ultrarent henholdsvis H₂O- og Ca²⁺/Mg²⁺-frit DPBS. Det var disse kontrolstoffer, der blev anvendt i valideringsundersøgelserne af VRM'erne, og det er dem, de fleste tidligere data foreligger for. Anvendelsen af egnede alternative positive eller negative kontrolstoffer skal være tilstrækkeligt videnskabeligt begrundet. Negative og positive kontroller bør testes med de(n) samme protokol(ler) som dem, der benyttes for de testkemikalier, der er medtaget i analyseserien (dvs. for væsker og/eller faste stoffer). Denne anvendelse bør følges af eksponering for behandlingen, skylning, nedsænkning efter eksponering og eventuelt inkubation efter eksponering som beskrevet for kontroller, som gennemføres sideløbende med flydende testkemikalier (jf. punkt 32) eller for kontroller, der gennemføres sideløbende med faste testkemikalier (jf. punkt 33), før MTT-assayet udføres (jf. punkt 35) (34)(35)). En enkelt række negative og positive kontroller er tilstrækkelig for alle testkemikalier med samme fysiske form (væsker eller faste stoffer), der medtages i den samme analyseserie.

Måling af vævslevedygtighed

35. MTT-assayet er en standardiseret kvantitativ metode (16), som skal benyttes til måling af vævslevedygtighed i forbindelse med denne forsøgsmetode. Den er forenelig med brug i en tredimensional vævsmodel. MTT-assayet udføres straks efter inkubationstiden efter eksponering. I VRM'er anbringes RhCE-vævsmodelprøven i 0,3 ml MTT-opløsning til 1 mg/ml i 180 ± 15 minutter under standarddyrkningsbetingelser. Vitalfarvestoffet MTT reduceres til blå MTT-formazanbundfald af de levedygtige celler i RhCE-vævsmodellen. Det udfældede blå MTT-formazan ekstraheres herefter fra vævet ved hjælp af en passende mængde isopropanol (eller et lignende opløsningsmiddel) (34) (35). Væv, der testes med flydende testkemikalier, bør ekstraheres både fra vævenes top og bund, mens væv, der testes med faste testkemikalier og farvede væsker, kun ekstraheres fra vævets bund (for at minimere potentiel kontaminering af isopropanol-ekstraktionsopløsningen med testkemikalie, som måske er forblevet på vævet). Væv, der testes med flydende testkemikalier, som ikke med det samme vaskes af, kan også ekstraheres fra vævets bund alene. De negative og positive kontrolstoffer, der testes samtidig, bør behandles på samme måde som det testede kemikalie. Det ekstraherede MTT-formazan kan

kvantificeres enten ved en måling af standardabsorbans (OD) ved anvendelse af et højest ± 30 nm bredt filterbånd ved 570 nm eller ved anvendelse af en HPLC/UPLC-spektrofotometriprocedure (jf. punkt 42) (11)(36).

36. Testkemikaliets optiske egenskaber eller dets kemiske reaktion med MTT kan interferere med målingen af MTT-formazan og føre til et forkert skøn over vævslevedygtigheden. Testkemikalier kan interferere med målingen af MTT-formazan ved direkte reduktion af MTT til blåt MTT-formazan og/eller ved farveinterferens, hvis testkemikaliets naturligt eller på grund af behandlingsprocedurer absorberer i det samme absorbansinterval som MTT-formazan (dvs. omkring 570 nm). Der bør udføres forudgående kontroller før testning for at identificere potentielle direkte MTT-reduktionsmidler og/eller kemikalier, som fremkalder farveinterferens, og der bør udføres supplerende kontroller for at spore og korrigere for potentiel interferens fra sådanne testkemikalier (jf. punkt 37-41). Dette er især vigtigt, når et bestemt testkemikalie ikke er helt fjernet fra RhCE-vævsmodellen ved skylning, eller når det gennemtrænger det cornea-lignende epithel og derfor er til stede i RhCE-vævsmodellerne, når MTT-assayet er udført. For testkemikalier, der absorberer lys i det samme interval som MTT-formazan (naturligt eller efter behandling), som ikke er kompatibelt med måling af standardabsorbans (OD) af MTT-formazan på grund af for stærk interferens, dvs. stærk absorption ved 570 ± 30 nm, kan der benyttes en HPLC/UPLC-spektrofotometriprocedure til at måle MTT-formazan (jf. punkt 41 og 42) (11)(36). Det er nærmere beskrevet i SOP'erne for VRM'erne, hvordan man sporer og korrigerer for direkte MTT-reduktion og farvestoffernes interferens (34)(35). I henholdsvis tillæg III og IV findes der også illustrative flowdiagrammer over, hvordan man identificerer og håndterer direkte MTT-opløsninger og/eller farveinterfererende kemikalier for VRM1 og VRM2.
37. For at identificere den potentielle interferens fra testkemikalier, der absorberer lys i det samme interval som MTT-formazan (naturligt eller efter behandling), og afgøre, om der er behov for yderligere kontrol, tilsættes testkemikaliets til vand og/eller isopropanol og inkuberes i en passende tid ved stuetemperatur (jf. tillæg 2, (34) (35)). Hvis testkemikaliets i vand og/eller isopropanol absorberer tilstrækkeligt lys i intervallet 570 ± 20 nm til VRM1 (jf. tillæg 3), eller hvis en farvet opløsning opnås ved blanding af testkemikaliets med vand til VRM2 (jf. tillæg 4), antages testkemikaliets at interferere med målingen af standardabsorbansen (OD) for MTT-formazan, og der bør foretages yderligere farvestofkontrol, eller alternativt bør der anvendes en HPLC/UPLC-spektrofotometriprocedure, og i så fald er disse kontroller ikke nødvendige (jf. punkt 41 og 42 og tillæg III og IV) (34)(35). Når der foretages en måling af standardabsorbansen (OD), påføres hvert interfererende testkemikalie på mindst to levedygtige vævsgentagelser, som gennemgår hele testproceduren, men inkuberes med dyrkningsmedium i stedet for MTT-opløsning under MTT-

inkubationstrinnet for at generere en kontrol af en ikke-specifik farve i levende væv (NSC_{living}) (34)(35). NSC_{living}-kontrollen skal udføres sideløbende med testningen af det farvede testkemikalie, og i tilfælde af flere test skal der foretages en uafhængig NSC_{living}-kontrol for hver test, der udføres (i hver analyseserie) på grund af den iboende biologiske variabilitet i levende væv. En korrekt vævslevedygtighed beregnes som: den procentvise vævslevedygtighed opnået med levende væv eksponeret for det interfererende testkemikalie og inkuberet med MTT-opløsning (% levedygtigheds_{test}) minus den procentvise ikke-specifik farve opnået med levende væv eksponeret for det interfererende testkemikalie og inkuberet med medium uden MTT kørt samtidig med den test, der korrigeres (% NSC_{living}), dvs. korrekt vævslevedygtighed = [% levedygtigheds_{test}] - [% NSC_{living}].

38. For at identificere direkte MTT-reduktionsmidler bør hvert testkemikalie tilsættes til en frisklavet MTT-opløsning. En passende mængde testkemikalie tilsættes til en MTT-opløsning, og blandingen inkuberes i ca. tre timer under standarddyrkningsbetingelser (jf. tillæg III og IV) (34)(35). Hvis MTT-blandingen, der indeholder testkemikaliets (eller suspension til uopløselige testkemikalier), bliver blå/violet, antages testkemikaliets direkte at reducere MTT, og der bør foretages en yderligere funktionskontrol på ikke-levedygtige RhCE-vævsmodeller uafhængigt af anvendelsen af målingen af standardabsorbans (OD) eller en HPLC/UPLC-spektrofotometriprocedure. Ved denne supplerende funktionskontrol anvendes dødt væv, hvor der kun er metabolisk residualaktivitet, men absorberer og tilbageholder testkemikaliets på samme måde som levedygtigt væv. Dødt væv under VRM1 præpareres ved eksponering for lav temperatur ("freeze-killed"). Dødt væv under VRM2 præpareres ved langvarig inkubation (f.eks. i mindst 24 ± 1 timer) i vand efterfulgt af opbevaring ved lave temperatur ("water-killed"). Hvert MTT-reducerende testkemikalie påføres på mindst to døde vævs gentagelser, som gennemgår hele testproceduren for at generere en ikke-specifik MTT-reduktionskontrol (NSMTT) (34)(35). En enkelt NSMTT-kontrol er tilstrækkelig pr. testkemikalie, uanset hvor mange uafhængige test/analyserier der udføres. En korrekt vævslevedygtighed beregnes som: den procentvise vævslevedygtighed, der opnås med levende væv, som eksponeres for MTT-reduktionsmidlet (% levedygtigheds_{test}) minus den procentvise ikke-specifikke MTT-reduktion, der opnås med det døde væv, som udsættes for det samme MTT-reduktionsmiddel, beregnet i forhold til den negative kontrol, der foretages sideløbende med den test, der korrigeres (% NSMTT), dvs. den faktiske vævslevedygtighed = [% levedygtigheds_{test}] - [% NSMTT].
39. Testkemikalier, der identificeres som kemikalier, der fremkalder både farveinterferens (jf. punkt 37) og direkte MTT-reduktion (jf. punkt 38), vil også kræve et tredje sæt kontroller, når målingen af standardabsorbansen (OD) udføres, ud over NSMTT- og NSC_{living}-kontrollerne, der er beskrevet ovenfor. Dette er sædvanligvis tilfældet med

mørke testkemikalier, der absorberer lys i intervallet 570 ± 30 nm (f.eks. blå, violette, sorte), fordi deres egen farve forstyrrer vurderingen af deres evne til direkte at reducere MTT, som beskrevet i punkt 38. Dette nødvendiggør anvendelsen af NSMTT-kontroller som standard sammen med NSC_{living}-kontroller. Testkemikalier, for hvilke der udføres både NSMTT- og NSC_{living}-kontroller, kan blive absorberet og tilbageholdt af både levende og dødt væv. Derfor kan NSMTT-kontrollen i dette tilfælde ikke blot korrigere for testkemikaliets potentielle direkte MTT-reduktion, men også for den farveinterferens, der opstår, når testkemikaliets absorberes og tilbageholdes af dødt væv. Dette kan medføre dobbeltkorrektion for farveinterferens, da NSC_{living}-kontrollen allerede korrigerer for farveinterferens, som opstår, når testkemikaliets absorberes og tilbageholdes af levende væv. For at undgå eventuel dobbeltkorrektion for farveinterferens skal der gennemføres en tredje kontrol for ikke-specifik farve i dødt væv (NSC_{killed}) (jf. tillæg III og IV) (34)(35). I denne yderligere kontrol påføres testkemikaliets på mindst to døde vævsprøver, som gennemgår hele testproceduren, men inkuberes med dyrkningsmedium i stedet for MTT-opløsning under MTT-inkubationstrinnet. En enkelt NSC_{killed}-kontrol er tilstrækkelig pr. testkemikalie, uanset hvor mange uafhængige test/analyserier der er udført, men bør udføres sideløbende med NSMTT-kontrollen og med den samme vævsbatch. En korrekt vævslevedygtighed beregnes som: den procentvise vævslevedygtighed opnået med levende væv eksponeret for testkemikaliets (% levedygtighed_{test}) minus % NSMTT minus % NSC_{living} plus den procentvise ikke-specifikke farve opnået med dødt væv eksponeret for det interfererende testkemikalie og inkuberet med dyrkningsmedium uden MTT beregnet i forhold til den negative kontrol, som gennemføres samtidig med den test, der korrigeres (% NSC_{killed}), dvs. korrekt vævslevedygtighed = [% levedygtighed_{test}] - [% NSMTT] - [% NSC_{living}] + [% NSC_{killed}].

40. Det er vigtigt at bemærke, at en ikke-specifik MTT-reduktion og ikke-specifik farveinterferens kan øge vævsekstraktets OD (når der udføres målinger af standardabsorbans) over spektrofotometrets linearitetsinterval, og at ikke-specifik MTT-reduktion også kan øge vævsekstraktets topareal for MTT-formazan (ved udførelse af HPLC/UPLC-målinger ved hjælp af spektrofotometri) over spektrofotometrets linearitetsinterval. På dette grundlag er det vigtigt for hvert laboratorium at bestemme linearitetsintervallet for deres spektrofotometers OD/topareal med f.eks. MTT-formazan (CAS # 57360-69-7), som fås i handelen fra f.eks. Sigma-Aldrich (Cat# M2003), før der indledes testning af testkemikalier til lovmæssige formål.
41. Måling af standardabsorbans (OD) ved hjælp af et spektrofotometer er hensigtsmæssig til at vurdere direkte MTT-opløsningsmidler og farveinterfererende testkemikalier, når den observerede interferens med måling af MTT-formazan ikke er

for stærk (dvs. OD-værdierne af vævsekstrakter opnået med testkemikaliet uden nogen korrektion for direkte MTT-reduktion og/eller farveinterferens ligger inden for spektrofotometrets lineære interval). Ikke desto mindre bør resultater for testkemikalier, som producerer % NSMTT og/eller % NSC_{living} $\geq$ 60 % (VRM1 og VRM2 for væskeprotokol) eller 50 % (VRM2 for faste stoffers protokol), af den negative kontrol tages med forsigtighed, da dette er den fastlagte tærskelværdi, som anvendes i VRM'erne for at skelne mellem klassificerede og ikke-klassificerede kemikalier (jf. punkt 44). Standardabsorbans (OD) kan dog ikke måles, når interferensen med målingen af MTT-formazan er for stærk (dvs. fører til ukorrigerede OD-værdier for testvævsekstrakten, som falder uden for spektrofotometrets lineære interval). Farvede testkemikalier eller testkemikalier, som bliver farvede i kontakt med vand eller isopropanol, der interfererer for stærkt med målingen af standardabsorbans (OD) af MTT-formazan, kan stadig vurderes ved anvendelse af HPLC/UPLC-spektrofotometri (jf. tillæg III og IV). Dette skyldes, at HPLC/UPLC-systemet giver mulighed for at separere MTT-formazan fra kemikaliet, før det kvantificeres (36). Af denne grund kræves NSC_{living}- eller NSC_{killed}-kontroller aldrig, når der anvendes HPLC/UPLC-spektrofotometri uafhængigt af det testede kemikalie. NSMTT-kontroller bør ikke desto mindre benyttes, hvis testkemikaliet mistænkes for direkte at reducere MTT (efter proceduren i punkt 38). NSMTT-kontroller bør også benyttes med testkemikalier, der har en farve (deres egen eller en farve, der kommer frem i vand), som forhindrer vurderingen af deres evne til direkte at reducere MTT som beskrevet i punkt 38. Ved benyttelse af HPLC/UPLC-spektrofotometri til at måle MTT-formazan beregnes den procentvise vævslevedygtighed som en procentdel af toparealet for MTT-formazan, der opnås med levende væv, som eksponeres for testkemikaliet i forhold til toparealet for MTT formazan opnået med den sideløbende negative kontrol. For testkemikalier, der direkte kan reducere MTT, beregnes korrekt vævslevedygtighed som: % levedygtigheds_{test} minus % NSMTT som beskrevet i den sidste sætning i punkt 38. Endelig bør det bemærkes, at direkte MTT-opløsninger eller direkte MTT-opløsningsmidler, der også er farveinterfererende, og som tilbageholdes i vævet efter behandling og reducerer MTT så stærkt, at de fører til OD-værdier (ved anvendelse måling af standard-OD) eller toparealer (ved anvendelse af UPLC/HPLC-spektrofotometri) for de testede vævsekstrakter, som falder uden for spektrofotometrets linearitetsinterval, ikke kan vurderes med RhCE-forsøgsmetoder, skønt disse kun forventes at opstå i meget sjældne situationer.

42. HPLC/UPLC-spektrofotometri kan anvendes med alle typer af testkemikalier (farvede, ikke-farvede, MTT-opløsninger og opløsninger uden MTT) til måling af MTT-formazan (11)(36). På grund af de mange forskellige HPLC/UPLC-spektrofotometri-systemer er det ikke muligt for den enkelte bruger at skabe nøjagtig de samme betingelser. Kvalificeringen af HPLC/UPLC-spektrofotometrisystemet bør som sådan påvises, før det anvendes til at kvantificere MTT-formazan fra

vævsekstrakter ved at opfylde acceptkriterierne til en række parametre for standardkvalificering baseret på dem, der er beskrevet i retningslinjerne for industrien om bioanalytisk metodevalidering fra den amerikanske Food and Drug Administration (FDA) (36)(38). Disse centrale parametre og deres acceptkriterier er vist i tillæg 5. Når acceptkriterierne i tillæg 5 er blevet opfyldt, anses HPLC/UPLC-spektrofotometrisystemet for at være kvalificeret og klar til at måle MTT-formazan under de forsøgsbetingelser, som er beskrevet i denne forsøgsmetode.

Acceptkriterier

43. For hver analyseserie, hvor der anvendes RhCE-vævsbatcher, som opfylder kvalitetskontrollen (jf. punkt 30), skal væv behandlet med det negative kontrolstof give OD-resultater, der afspejler kvaliteten af de væv, som har gennemgået alle forsendelses- og modtagelsestrin og alle protokolprocesser, og må ikke ligge uden for de tidligere fastsatte grænser som beskrevet i tabel 2 (jf. punkt 26). På tilsvarende måde skal væv, der behandles med det positive kontrolstof, dvs. methylacetat, udvise en gennemsnitlig vævslevedygtighed på $< 50 \%$ i forhold til den negative kontrol ved VRM1 med protokollen for enten flydende eller faste stoffer og $\leq 30 \%$ (protokollen for væsker) eller $\leq 20 \%$ (protokollen for faste stoffer) i forhold til den negative kontrol ved VRM2 og således afspejle vævenes evne til at reagere på et lokalirriterende testkemikalie under forsøgsmetodens vilkår (34)(35). Variabiliteten mellem vævsprøver af testkemikalier og kontrolstoffer skal ligge inden for de accepterede grænser (dvs. at forskellen i levedygtighed mellem to vævsprøver skal ligge under 20% , eller standardafvigelsen mellem tre vævsprøver må ikke overstige 18%). Hvis enten den negative kontrol eller positive kontrol i en analyseserie ligger uden for de accepterede intervaller, anses analyseserien for "ikke-kvalificeret" og bør gentages. Hvis variabiliteten mellem vævsprøver for et testkemikalie ligger uden for de accepterede intervaller, skal testen anses for at være "ikke-kvalificeret", og testkemikaliets skal testes igen.

Fortolkning af resultater og forudsigelsesmodel

44. OD-værdier/toparealer opnået med vævsekstraktprøven for hvert testkemikalie anvendes til at beregne den gennemsnitlige vævslevedygtighed i procent (gennemsnit mellem vævsprøver) normaliseret til den negative kontrol, som fastsættes til 100% . Tærskelværdien for den procentvise vævslevedygtighed for identifikation af testkemikalier, der ikke kræver klassificering for øjenirritation eller alvorlige øjenskader (UN GHS/CLP – uden for kategori), er anført i tabel 4. Resultaterne skal således fortolkes som følger:
- Testkemikaliets identificeres således, at det ikke kræver klassificering og mærkning ifølge UN GHS/CLP (uden for kategori), hvis den gennemsnitlige procentvise vævslevedygtighed efter eksponering og inkubation efter eksponering ligger over ($>$)

tærskelværdien af den fastsatte procentvise vævslevedygtighed som vist i tabel 4. I så fald kræves der ingen yderligere testning efter andre forsøgsmetoder.

- Såfremt den gennemsnitlige procentvise vævslevedygtighed efter eksponering og inkubation efter eksponering ligger under eller er lig med ($\leq$) tærskelværdien for den fastsatte procentvise vævslevedygtighed, kan der ikke fremsættes nogen forudsigelse, som det fremgår af tabel 4. I så fald vil yderligere testning efter andre forsøgsmetoder være påkrævet, fordi RhCE-forsøgsmetoderne viser et vist antal falsk positive resultater (jf. punkt 14-15) og ikke kan ende mellem UN GHS/CLP-kategori 1 og 2 (jf. punkt 17).

Tabel 4: Forudsigelsesmodeller ifølge UN GHS- og CLP-klassificering

VRM	Uden for kategori	Der kan ikke fremsættes nogen forudsigelser
VRM 1 - EpiOcular™ EIT (for begge protokoller)	Gennemsnitlig vævslevedygtighed > 60 %	Gennemsnitlig vævslevedygtighed $\leq$ 60 %
VRM 2 - SkinEthic™ HCE EIT (for protokollen for væsker)	Gennemsnitlig vævslevedygtighed > 60 %	Gennemsnitlig vævslevedygtighed $\leq$ 60 %
VRM2 - SkinEthic™ HCE EIT (for protokollen for faste stoffer)	Gennemsnitlig vævslevedygtighed > 50 %	Gennemsnitlig vævslevedygtighed $\leq$ 50 %

45. En enkelt test bestående af mindst to vævsprøver bør være tilstrækkelig for et testkemikalie, når resultatet er entydigt. I tilfælde af tvetydige resultater såsom diskordante gentagne målinger, og/eller hvis den gennemsnitlige procentvise vævslevedygtighed er 60 ± 5 % (VRM1 og VRM2 for protokollen for væsker) eller 50 ± 5 % (VRM2 for protokollen for faste stoffer), skal det dog overvejes at foretage en anden test samt en tredje, hvis resultaterne af de første to test er diskordante.
46. Forskellige tærskelværdier for procentvis vævslevedygtighed, der adskiller klassificerede og ikke-klassificerede testkemikalier, kan overvejes for specifikke typer blandinger, hvis det er passende og begrundet, med henblik på at øge forsøgsmetodens samlede resultater for de pågældende typer blandinger (jf. punkt 14). Referencekemikalier kan være nyttige ved vurdering af risikoen for alvorlige øjenskader/øjenirritation ved ukendte testkemikalier eller en ukendt produktgruppe eller ved vurdering af et klassificeret kemikalies potentielle relative øjenætsende toksicitet inden for et specifikt område af irritationsresponsen.

DATA OG RAPPORTERING

Data

47. Data fra individuelle vævsgentagelser i en analyseserie (f.eks. OD-værdier/toparealer for MTT-formazan og beregnede data for procentvis vævslevedygtighed for

testkemikaliets og kontrolstoffer samt forudsigelse fra den endelige RhCE-forsøgsmetode) rapporteres i tabelform for hvert testkemikalie, herunder om nødvendigt data fra gentagne test. Endvidere rapporteres den gennemsnitlige procentvise vævslevedygtighed og forskel i levedygtighed mellem to vævsgentagelser (hvis $n = 2$ vævsgentagelser) eller standardafvigelse (hvis $n \geq 3$ vævsgentagelser) for hvert testkemikalie og kontrolstof. Alle observerede interferenser for et testkemikalie med målingen af MTT-formazan gennem direkte MTT-reduktion og/eller farvet interferens rapporteres for hvert testet kemikalie.

Testrapport

48. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie

Stof med kun én bestanddel

- kemisk identifikation, f.eks. IUPAC- eller CAS-navn(e), CAS-registreringsnummer/-numre, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel og/eller andre identifikatorer
- fysisk tilstand, flygtighed, pH, LogP, molekylvægt, kemisk gruppe og yderligere fysisk-kemiske egenskaber, som er relevante for undersøgelsen, i det omfang det er muligt
- renhed, urenheders kemiske identitet, i det omfang det er relevant og praktisk muligt, osv.
- eventuel behandling inden testen (f.eks. opvarmning, formalin)
- opbevaring og stabilitet i det omfang, det er muligt.

Stof med flere bestanddele, UVCB-stoffer og blandinger

- kendetegnet så vidt muligt ved f.eks. kemisk identitet (jf. ovenfor), renhed, kvantitativ forekomst og bestanddelenes relevante fysisk-kemiske egenskaber (jf. ovenfor) i det omfang, det er muligt
- fysisk tilstand og yderligere fysisk-kemiske egenskaber, som er relevante for undersøgelsen, i det omfang det er muligt
- renhed, urenheders kemiske identitet, i det omfang det er relevant og praktisk muligt, osv.
- eventuel behandling inden testen (f.eks. opvarmning, formalin)
- opbevaring og stabilitet i det omfang, det er muligt.

Positive og negative kontrolstoffer

- kemisk identifikation, f.eks. IUPAC- eller CAS-navn(e), CAS-registreringsnummer/-numre, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel og/eller andre identifikatorer
- fysisk tilstand, flygtighed, molekylvægt, kemisk gruppe og yderligere fysisk-kemiske egenskaber, som er relevante for undersøgelsen, i det omfang det er muligt
- renhed, urenheders kemiske identitet, i det omfang det er relevant og praktisk muligt, osv.
- eventuel behandling inden testen (f.eks. opvarmning, formaling)
- opbevaring og stabilitet i det omfang, det er muligt
- begrundelse for eventuel anvendelse af en anden negativ kontrol end ultrarent H₂O eller Ca²⁺/Mg²⁺-frit DPBS
- begrundelse for eventuel anvendelse af en anden positiv kontrol end rent methylacetat
- henvisning til tidligere positive og negative kontrolresultater, der udviser passende acceptkriterier for analyseserien.

Oplysninger om sponsor og testfacilitet

- navn og adresse på sponsoren, testfaciliteten og undersøgelseslederen.

RhCE-vævsmodel og anvendt protokol (eventuelt med begrundelse for valg)

Betingelser for forsøgsmetoden

- den anvendte RhCE-vævsmodel, herunder batchnummer
- bølgelængde og båndpas (hvis relevant) anvendt til kvantificering af MTT-formazan og måleudstyrets linearitetsinterval (f.eks. spektrofotometer)
- beskrivelse af den metode, der blev anvendt til kvantificering af MTT-formazan
- eventuelt beskrivelse af det anvendte HPLC/UPLC-spektrofotometrisystem
- komplet dokumentation for den anvendte RhCE-vævsmodel, herunder om dens ydeevne. Der skal bl.a. gives oplysning om:
 - i) kvalitetskontrol vedrørende levedygtighed (leverandør)
 - ii) levedygtighed under betingelserne for forsøgsmetoden (bruger)
 - iii) kvalitetskontrol vedrørende barrierefunktion
 - iv) morfologi (hvis tilgængelig)
 - v) reproducerbarhed og forudsigelsesevne
 - vi) anden kvalitetskontrol af RhCE-vævsmodellen, hvis tilgængelig
- reference til historiske data for RhCE-modellen. Der skal bl.a. gives oplysning om: om kvalitetskontroldataene kan accepteres, sammenlignet med data fra tidligere batcher

- erklæring om, at testfaciliteten har dokumenteret kompetence i anvendelsen af forsøgsmetoden før rutinemæssig anvendelse ved testning af kompetencekemikalier

Acceptkriterier for analyseserier og test

- positive og negative kontrolgennemsnitsværdier og acceptintervaller på grundlag af historiske data
- acceptabel variabilitet mellem vævsprøver til positiv og negativ kontrol
- acceptabel variabilitet mellem vævsprøver til testkemikaliets.

Testprocedure

- detaljer om den anvendte testprocedure
- doser af det anvendte testkemikalie og anvendte kontrolstoffer
- varighed og temperatur for eksponering, nedsænkning efter eksponering og inkubationstid efter eksponering (hvor det er relevant)
- beskrivelse af eventuelle ændringer i forsøgsmetoden
- eventuel angivelse af kontroller anvendt til direkte MTT-reduktionsmidler og/eller farvede testkemikalier
- antal vævsprøver anvendt pr. testkemikalie og kontrol (positiv kontrol, negativ kontrol, NSMTT, NSCliving og NSCKilled, hvis relevant)

Resultater

- angivelse i tabelform af data fra hvert enkelt testkemikalie og hvert enkelt kontrolstof til hver analyseserie (herunder gentagne forsøg, hvis det er relevant) og hver gentagen måling, herunder OD-værdier eller topareal for MTT-formazan, vævslevedygtighedsprocent, gennemsnitlig vævslevedygtighedsprocent, vævsprøveforskelle eller standardafvigelse og endelig forudsigelse
- eventuelle resultater af kontroller anvendt for direkte MTT-reduktionsmidler og/eller farvede testkemikalier, herunder OD-værdi eller topareal for MTT-formazan, % NSMTT, % NSCliving, % NSCKilled, forskelle mellem vævsprøver eller standardafvigelse, endelig korrekt vævslevedygtighedsprocent og endelig forudsigelse
- resultater opnået med testkemikaliets/-kemikalierne og kontrolstofferne i forhold til de fastlagte acceptkriterier for analyseserier og test
- beskrivelse af andre observerede virkninger, f.eks. farvning af væv på grund af et farvet testkemikalie.

Diskussion af resultaterne

Konklusion

LITTERATUR

- (1) UN (2015). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, New York and Geneva: United Nations. Tilgængelig på: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.
- (2) Kapitel B.5 i dette bilag, Akut øjenirritation/-ætsning.
- (3) Kapitel B.47 i dette bilag, Forsøgsmetode til påvisning af oksecornea-uklarhed og -permeabilitet til identifikation af i) kemikalier, der medfører alvorlig øjenskade, og ii) kemikalier, der ikke kræver klassificering for øjenirritation eller alvorlig øjenskade.
- (4) Kapitel B.48 i dette bilag, Isoleret kyllingeøje-forsøgsmetode til identifikation af i) kemikalier, der fremkalder alvorlig øjenskade og ii) kemikalier, der ikke kræver klassificering.
- (5) Kapitel B.61 i dette bilag, Fluoresceinudsivnings-forsøgsmetode til identifikation af øjenætsende stoffer og stærkt øjenirriterende stoffer.
- (6) Kapitel B.68 i dette bilag, Forsøgsmetode med kortvarig eksponering in vitro til identifikation af i) kemikalier, der fremkalder alvorlige øjenskader, og ii) kemikalier, der ikke kræver klassificering for øjenirritation eller alvorlige øjenskader.
- (7) Freeman, S.J., Alépée N., Barroso, J., Cole, T., Compagnoni, A., Rubingh, C., Eskes, C., Lammers, J., McNamee, P., Pfannenbecker, U., Zuang, V. (2010). Prospective Validation Study of Reconstructed Human Tissue Models for Eye Irritation Testing. *ALTEX* 27, Special Issue 2010, 261-266.
- (8) EC EURL ECVAM (2014). EURL ECVAM - Cosmetics Europe prospective validation study of Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE)-based test methods for identifying chemicals not requiring classification and labelling for serious eye damage/eye irritation: Validation Study Report. EUR 28125 EN; doi:10.2787/41680. Tilgængelig på: <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC100280>.
- (9) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2014). ESAC Opinion on the EURL ECVAM Eye Irritation Validation Study (EIVS) on EpiOcularTM EIT and SkinEthicTM HCE and a related Cosmetics Europe study on HPLC/UPLC-spectrophotometry as an alternative endpoint detection system for MTT-formazan. ESAC Opinion No 2014-03 of 17 November 2014; EUR 28173 DA doi: 10.2787/043697. Tilgængelig på: <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103702>.

- (10) Alépée, N., Leblanc, V., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Lelièvre, D., Meloni, M., Nardelli, L., Roper, C.S, Santirocco, E., Toner, F., Van Rompay, A., Vinall, J., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory validation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using liquid chemicals. *Toxicol. In Vitro* 31, 43-53.
- (11) Alépée, N., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Meloni, M., Nardelli, L., Vinall, C.J., Toner, F., Roper, C.S, Van Rompay, A.R., Leblanc, V., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory evaluation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using solid chemicals and overall performance of the test method with regard to solid and liquid chemicals testing. *Toxicol. In Vitro* 34, 55-70.
- (12) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2016). ESAC Opinion on the SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). ESAC Opinion No 2016-02 of 24 June 2016; EUR 28175 EN; doi : 10.2787/390390. Tilgængelig på: <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103704>.
- (13) EC EURL ECVAM (2016). Recommendation on the Use of the Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Serious Eye Damage/Eye Irritation According to UN GHS. (Manuskript under udarbejdelse).
- (14) Draize, J.H., Woodard, G., Calvery, H.O. (1944). Methods for the Study of Irritation and Toxicity of Substances Applied Topically to the Skin and Mucous Membranes. *Journal of Pharmacol. and Exp. Therapeutics* 82, 377-390.
- (15) Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., Zuang, V. (2010). A Proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *In Vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9.
- (16) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
- (17) OECD (2016). Series on Testing and Assessment No 216: Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Cornea-Like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage, Based on the Validated Reference

Methods EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE EIT described in TG 492. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

- (18) OECD (2005). Series on Testing and Assessment No 34: Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (19) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Hayden, P., Kubilus, J., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2011). Development of the EpiOcular™ Eye Irritation Test for Hazard Identification and Labelling of Eye Irritating Chemicals in Response to the Requirements of the EU Cosmetics Directive and REACH Legislation. *Altern. Lab. Anim.* 39, 339-364.
- (20) Nguyen, D.H., Beuerman, R.W., De Wever, B., Rosdy, M. (2003). Three-dimensional construct of the human corneal epithelium for in vitro toxicology. In: Salem, H., Katz, S.A. (Eds), *Alternative Toxicological Methods*, CRC Press, s. 147-159.
- (21) Pfannenbecker, U., Bessou-Touya, S., Faller, C., Harbell, J., Jacob, T., Raabe, H., Tailhardat, M., Alépée, N., De Smedt, A., De Wever, B., Jones, P., Kaluzhny, Y., Le Varlet, B., McNamee, P., Marrec-Fairley, M., Van Goethem, F. (2013). Cosmetics Europe multi-laboratory pre-validation of the EpiOcular™ reconstituted Human Tissue Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 619-626.
- (22) Alépée, N., Bessou-Touya, S., Cotovio, J., de Smedt, A., de Wever, B., Faller, C., Jones, P., Le Varlet, B., Marrec-Fairley, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., van Goethem, F., McNamee, P. (2013). Cosmetics Europe Multi-Laboratory Pre-Validation of the SkinEthic™ Reconstituted Human Corneal Epithelium Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 1476-1488.
- (23) Kolle, S.N., Moreno, M.C.R., Mayer, W., van Cott, A., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R. (2015). The EpiOcular™ Eye Irritation Test is the Method of Choice for *In Vitro* Eye Irritation Testing of Agrochemical Formulations: Correlation Analysis of EpiOcular™ Eye Irritation Test and BCOP Test Data to UN GHS, US EPA and Brazil ANIVSA Classifications. *Altern. Lab. Anim.* 43, 1-18.
- (24) Adriaens, E., Barroso, J., Eskes, C., Hoffmann, S., McNamee, P., Alépée, N., Bessou-Touya, S., De Smedt, A., De Wever, B., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Zuang, V. (2014). Retrospective Analysis of the Draize Test for Serious Eye Damage/Eye Irritation: Importance of Understanding the *In Vivo* Endpoints Under UN GHS/EU CLP for the Development and Evaluation of *In Vitro* Test Methods. *Arch. Toxicol.* 88, 701-723.

- (25) Barroso, J., Pfannenbecker, U., Adriaens, E., Alépée, N., Cluzel, M., De Smedt, A., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Templier, M., McNamee, P. (2017). Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation *in vivo* data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD). *Arch. Toxicol.* 91, 521-547.
- (26) Meloni, M., De Servi, B., Marasco, D., Del Prete, S. (2011). Molecular mechanism of ocular surface damage: Application to an *in vitro* dry eye model on human corneal epithelium. *Molecular Vision* 17, 113-126.
- (27) Hackett, R.B., McDonald, T.O. (1991). Eye Irritation. In *Advances in Modern Toxicology: Dermatoxicology* Marzulli F.N. and Maibach H.I. (Eds.), 4th Edition, s. 749-815. Washington, DC, USA: Hemisphere Publishing Corporation.
- (28) Fox, D.A., Boyes, W.K. (2008). Toxic Responses of the Ocular and Visual System. In Cassaret and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons Klaassen C.D.(Ed.), 7th Edition, s. 665-697. Withby, ON, Canada: McGraw-Hill Ryerson.
- (29) Jester, J.V., Li, H.F., Petroll, W.M., Parker, R.D., Cavanagh, H.D., Carr, G.J., Smith, B., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant Induced Corneal Injury Correlates with Cell Death. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 922-936.
- (30) Maurer, J.K., Parker, R.D., Jester, J.V. (2002). Extent of Corneal Injury as the Mechanistic Basis for Ocular Irritation: Key Findings and Recommendations for the Development of Alternative Assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36, 106-117.
- (31) Jester, J.V., Li, L., Molai, A., Maurer, J.K. (2001). Extent of Corneal Injury as a Mechanistic Basis for Alternative Eye Irritation Tests. *Toxicol. In Vitro* 15, 115-130.
- (32) Jester, J.V., Petroll, W.M., Bean, J., Parker, R.D., Carr, G.J., Cavanagh, H.D., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant-Induced Corneal Injury Predicts Extent of Subsequent Ocular Responses. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 2610-2625.
- (33) Jester, J.V. (2006). Extent of Corneal Injury as a Biomarker for Hazard Assessment and the Development of Alternative Models to the Draize Rabbit Eye Test. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 25, 41-54.
- (34) EpiOcular™ EIT SOP, Version 8 (March 05, 2013). EpiOcular™ EIT for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Tilgængelig på:

[<https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index>].

- (35) SkinEthic™ HCE EIT SOP, Version 1. (July 20, 2015). SkinEthic™ HCE Eye Irritation Test (EITL for Liquids, EITS for Solids) for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Tilgængelig på: <https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index>.
- (36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., McNamee, P. (2015). Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT-Reduction Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29, 741-761.
- (37) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Handa, Y., DeLuca, J., Truong, T., Hunter, A., Kearney, P., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2015). EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) for Hazard Identification and Labeling of Eye Irritating Chemicals: Protocol Optimization for Solid Materials and Extended Shipment Times. *Altern. Lab Anim.* 43, 101-127.
- (38) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. May 2001. Tilgængelig på: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>.
- (39) OECD (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Series on Testing and Assessment No 263. ENV Publications, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

Tillæg 1

DEFINITIONER

Nøjagtighed: overensstemmelsen mellem forsøgsmetodens resultater og accepterede referenceværdier. Den er et mål for forsøgsmetodens ydeevne og et af aspekterne af "relevans". Udtrykket benyttes ofte som synonym for "konkordans", forstået som den andel af korrekte udfald, forsøgsmetoden fører til (18).

Referencekemikalie: et kemikalie, der anvendes som standard til sammenligning med et testkemikalie. Et referencekemikalie skal have følgende egenskaber: i) en eller flere ensartede og pålidelige kilder til identifikation og karakterisering heraf, ii) strukturel og funktionel lighed og/eller kemisk lighed eller lighed med hensyn til produktgruppe med de(t) kemikalie(r), der testes, iii) kendte fysisk-kemiske egenskaber, iv) støttedata om kendte virkninger og v) kendt styrke i det ønskede responsområde.

Bottom-up-tilgang: trinvis tilgang til et testkemikalie mistænkt for ikke at kræve klassificering og mærkning for øjenirritation eller alvorlige øjenskader, der starter med bestemmelse af kemikalier, som ikke kræver klassifikation og mærkning (negativt resultat) fra andre kemikalier (positivt resultat).

Kemikalie: et stof eller en blanding.

Konkordans: se "Nøjagtighed".

Cornea: den transparente del af øjeæblets forside, som dækker øjets iris og pupil, og hvorigennem lys kommer ind i øjets indre.

CV: variationskoefficient

Dev.: afvigelse.

EIT: øjenirritationstest.

EURL ECVAM: EU-referencelaboratorium for alternativer til dyreforsøg.

Øjenirritation: frembringelse af forandringer i øjet, som opstår efter påføring af et testkemikalie på øjets anteriore overflade, og som er fuldt reversibel inden for 21 dage efter påføring. Synonymt med "Reversible virkninger på øjet" og "UN GHS/CLP-kategori 2".

ET₅₀: den eksponeringstid, der er nødvendig for at nedsætte vævets levedygtighed med 50 % ved påføring af et referencekemikalie i en nærmere angivet fast koncentration.

Falsk negativ-rate: den andel af alle positive stoffer som ved en forsøgsmetode fejlagtigt identificeres som negativ. Det er en indikator for forsøgsmetodens ydeevne.

Falsk positiv-rate: Den andel af alle negative stoffer, som ved en forsøgsmetode fejlagtigt identificeres som positiv. Det er en indikator for forsøgsmetodens ydeevne.

Fare: den iboende egenskab ved et middel eller en situation, som kan forårsage skadelige virkninger, når en organisme, et system eller en (sub)population eksponeres for det pågældende middel.

HCE: SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (humant cornea-epithel)

HPLC: High Performance Liquid Chromatography (højtryksvæskekromatografi)

IC₅₀: koncentration, hvor et referencekemikalie nedsætter vævets levedygtighed med 50 % efter en fast eksponeringstid (f.eks. 30 minutters behandling med SDS).

Ubegrænset dosis: den mængde testkemikalie, som er påført på RhCE-vævsmodellen ud over den mængde, der er nødvendig for helt at dække epitelets overflade på en ensartet måde.

Irreversible virkninger på øjet: se "Alvorlige øjenskader".

LLOQ: Lower Limit of Quantification (laveste kvantitative bestemmelsesgrænse)

LogP: logaritmen af oktanol/vand-fordelingskoefficient

Blanding: blanding eller opløsning, der består af to eller flere stoffer.

Stof med kun én bestanddel: et stof, der defineres af sin mængdemæssige sammensætning, hvori en hovedbestanddel udgør mindst 80 % (w/w).

Stof med flere bestanddele: et stof, der defineres af sin mængdemæssige sammensætning, hvori flere end én hovedbestanddel er til stede i en koncentration på ≥ 10 % (w/w) og < 80 % (w/w). Et stof, der består af flere forskellige bestanddele, er resultatet af en fremstillingsproces. Forskellen mellem en blanding og et stof med forskellige bestanddele er, at blandingen er fremstillet ved at blande to eller flere stoffer uden kemisk reaktion. Et stof, der består af flere forskellige bestanddele, er resultatet af en kemisk reaktion.

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid thiazolylblåt tetrazolium-bromid.

Negativ kontrol: en prøve, som indeholder alle komponenterne fra et forsøgssystem og er behandlet med et stof, som ikke vides at inducere en positiv respons i testsystemet. Prøven behandles sammen med prøver behandlet med testkemikaliets og andre kontroller og anvendes til at bestemme 100 % vævslevedygtighed.

Ikke klassificeret: kemikalier, der ikke er klassificeret for øjenirritation (UN GHS/CLP-kategori 2, UN GHS-kategori 2A eller 2B) eller alvorlige øjenskader (UN GHS/CLP-kategori 1). Synonymt med "UN GHS/CLP – uden for kategori".

NSC_{killed}: ikke-specifik farve i dødt væv

NSC_{living}: ikke-specifik farve i levende væv

NSMTT: ikke-specifik MTT-reduktion.

OD: optisk tæthed.

Ydeevnestandarder: standarder, som med udgangspunkt i en valideret forsøgsmetode, der blev betragtet som videnskabeligt valid, danner grundlag for at vurdere, om en foreslået forsøgsmetode, som er mekanistisk og funktionelt tilsvarende, er sammenlignelig. De indeholder bl.a.: i) de centrale dele af forsøgsmetoden, ii) en minimumsliste med referencekemikalier udvalgt blandt de kemikalier, der benyttes til at påvise, at den validerede forsøgsmetodes ydeevne er acceptabel, og (iii) de sammenlignelige niveauer af nøjagtighed og pålidelighed, som er fastsat efter, hvad der er opnået med den validerede forsøgsmetode, og som det skal påvises, at den foreslåede forsøgsmetode kan yde, ved vurdering ud fra minimumslisten med referencekemikalier (18).

Positiv kontrol: en prøve, som indeholder alle komponenterne fra et forsøgssystem og er behandlet med et stof, som vides at inducere en positiv respons i testsystemet. Prøven behandles sammen med prøver behandlet med testkemikaliet og andre kontroller. For at sikre, at det er muligt at vurdere variabiliteten i den positive kontrolrespons over tid, bør den positive respons ikke være overdrevent stor.

Relevans: beskrivelse af sammenhængen mellem testen og den pågældende virkning og dens meningsfuldhed og brugbarhed til et bestemt formål. Det angives, i hvilket omfang testen måler eller forudsiger den pågældende biologiske virkning korrekt. Forsøgsmetodens nøjagtighed (konkordans) indgår i vurderingen af dens relevans (18).

Pålidelighed: mål for, i hvilken grad en forsøgsmetode kan reproduceres i og mellem laboratorier over en længere periode, når den udføres efter samme protokol. Den bedømmes ved beregning af reproducerbarhed inden for og mellem laboratorier og repeterbarhed inden for laboratorier (18).

Erstatningstest: test, der erstatter en test, som bruges rutinemæssigt og er godkendt til fareidentifikation og/eller risikovurdering, og som vurderes at sikre en tilsvarende eller bedre beskyttelse af menneskers og dyrs sundhed eller miljøet alt afhængigt af situationen i forhold til den godkendte test, i alle testsituationer og for alle kemikalier (18).

Reproducerbarhed: overensstemmelse mellem resultater af gentagne test af samme testkemikalie med samme testprotokol (jf. "Pålidelighed") (18).

Reversible virkninger på øjet: se "Øjenirritation".

RhCE: rekonstrueret humant cornea-lignende epithel

Analyseserie: en analyseserie består af et eller flere testkemikalier, der testes samtidig med en negativ kontrol og en positiv kontrol.

Standardafvigelse: standardafvigelse

Følsomhed: andelen af alle positive/aktive testkemikalier, der klassificeres korrekt ved

testen. Det er et mål for nøjagtigheden af en forsøgsmetode, som giver kategoriske resultater, og er et vigtigt kriterium ved vurderingen af en forsøgsmetodes relevans (18).

Alvorlig øjenskade: frembringelse af vævsbeskadigelse i øjet eller alvorlig fysisk synsnedsettelse, som opstår efter påføring af et testkemikalie på øjets anteriore overflade, og som ikke er fuldt reversibel inden for 21 dage efter påføring. Synonymt med "Irreversible virkninger på øjet" og "UN GHS/CLP-kategori 1".

Standardprocedurer (SOP): formelle skriftlige procedurer med detaljeret beskrivelse af, hvordan rutinemæssig og testspecifik laboratoriepraksis bør udføres. De er et krav i henhold til GLP.

Specificitet: andelen af alle negative/inaktive testkemikalier, der klassificeres korrekt ved testen. Det er et mål for nøjagtigheden af en forsøgsmetode, som giver kategoriske resultater, og er et vigtigt kriterium ved vurderingen af en forsøgsmetodes relevans (18).

Stof: et grundstof og forbindelser heraf, i naturlig tilstand eller industrielt fremstillet, herunder sådanne tilsætningsstoffer, som er nødvendige til bevarelse af stoffets stabilitet, og sådanne urenheder, som følger af fremstillingsprocessen, bortset fra opløsningsmidler, der kan udskilles, uden at det påvirker stoffets stabilitet eller ændrer dets sammensætning.

Test: et enkelt testkemikalie, der sideløbende testes i mindst to vævsprøver, som defineret i den tilsvarende standardprocedure.

Vævslevedygtighed: parameter, der måler den samlede aktivitet i en cellepopulation i et rekonstrueret væv som deres evne til at reducere vitalfarvestoffet MTT, og som, afhængigt af den effektparameter, der måles, og udformningen af testen, korrelerer med det samlede antal levende celler og/eller deres levedygtighed.

Top-down-tilgang: trinvis tilgang, der anvendes for et kemikalie, som mistænkes for at forårsage alvorlige øjenskader, der starter med bestemmelse af kemikalier, som forårsager alvorlige øjenskader (positivt resultat), i forhold til andre kemikalier (negativt resultat).

Testkemikalie: alle stoffer eller blandinger, der testes ved hjælp af denne forsøgsmetode

Trindelt testningsstrategi: trindelt teststrategi, hvor der anvendes sekventielle forsøgsmetoder. Alle eksisterende oplysninger om et testkemikalie gennemgås i en bestemt rækkefølge ved anvendelse af en "weight of evidence"-proces på hvert trin for at fastslå, om der foreligger tilstrækkelige oplysninger til at træffe en fareklassificeringsafgørelse, inden der fortsættes til strategiens næste trin. Hvis et testkemikalies farepotentiale/styrke kan underbygges på et givet trin baseret på eksisterende oplysninger, er der ikke behov for at foretage yderligere test (18).

ULOQ: Upper Limit of Quantification (øverste kvantitative bestemmelsesgrænse)

De Forenede Nationers globalt harmoniserede system for klassificering og mærkning af kemikalier (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals – UN GHS): et system til klassificering af kemikalier (stoffer og

blandinger) efter standardiserede typer og niveauer af fysisk fare, sundhedsfare og miljøfare med tilhørende kommunikationselementer såsom piktogrammer, signalord, faresætninger, sikkerhedssætninger og sikkerhedsdatablade, således at oplysninger om kemikaliernes skadelige virkninger kan videreformidles med henblik på at beskytte mennesker (f.eks. arbejdsgivere, arbejdstagere, transportører, forbrugere og redningspersonel) og miljøet (1).

UN GHS/CLP-kategori 1: se "Alvorlige øjenskader".

UN GHS/CLP-kategori 2: se "Øjenirritation".

UN GHS/ CLP – uden for kategori: kemikalier, der ikke opfylder kravene med hensyn til klassificering som UN GHS/CLP-kategori 1 eller 2 (eller UN GHS-kategori 2A eller 2B). Synonymt med "Ikke-klassificeret".

UPLC: Ultra-High Performance Liquid Chromatography (ultra-højtryksvæskechromatografi)

UVCB: stoffer med ukendt eller variabel sammensætning, komplekse reaktionsprodukter eller biologiske materialer.

Gyldig forsøgsmetode: en forsøgsmetode, der anses for at være tilstrækkeligt relevant og pålidelig til et bestemt formål, og som er baseret på videnskabeligt forsvarlige principper. En forsøgsmetode har aldrig absolut gyldighed, men er kun gyldig i forbindelse med et bestemt formål (18).

Valideret forsøgsmetode: en forsøgsmetode, for hvilken der er gennemført valideringsundersøgelser for at fastslå relevansen (herunder nøjagtigheden) og pålideligheden til et bestemt formål. Det er vigtigt at være opmærksom på, at en valideret forsøgsmetode måske ikke har tilstrækkelig ydeevne med hensyn til nøjagtighed og pålidelighed til at være acceptabel til det planlagte formål (18).

VRM: Valideret referencemetode

VRM1: EpiOcular™ EIT omtales som valideret referencemetode 1.

VRM2: SkinEthic™ HCE EIT omtales som valideret referencemetode 2.

"Weight of evidence"-analyse: En proces, hvor styrkerne og svaghederne ved forskellige oplysninger afvejes for at nå frem til og underbygge en konklusion om et testkemikalies farepotentiale.

Tillæg 2

VIGTIGSTE KOMPONENTER I RHCE-TEST VALIDERET TIL IDENTIFIKATION AF KEMIKALIER, SOM IKKE KRÆVER KLASSIFICERING OG MÆRKNING FOR ØJENIRRITATION ELLER ALVORLIGE ØJENSKADER

Testkomponenter	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Protokoller	Væsker (kan pipetteres ved 37 ± 1 °C eller lavere temperaturer i 15 min.)	Faste stoffer (kan ikke pipetteres)	Væsker og viskøse stoffer (kan pipetteres)	Faste stoffer (kan ikke pipetteres)
Modelareal	0,6 cm ²	0,6 cm ²	0,5 cm ²	0,5 cm ²
Antal vævsprøver	Mindst 2	Mindst 2	Mindst 2	Mindst 2
Forhåndskontrol for farveinterferens	50 µl + 1 ml H₂O i 60 min. ved 37 ± 2 °C, $5 \pm 1\%$ CO₂, $\geq 95\%$ RH (ikke-farvede testkemikalier) eller 50 µl + 2 ml isopropanol blandet i 2-3 timer ved stuetemp. (farvede testkemikalier) → Hvis testkemikaliets OD ved 570 ± 20 nm efter fratrækning af OD for isopropanol eller vand er $> 0,08$ (som svarer til ca. 5 % af den gennemsnitlige OD for den negative kontrol), bør der foretages tilpassede "living" kontroller.	50 mg + 1 ml H₂O i 60 min. ved 37 ± 2 °C, $5 \pm 1\%$ CO₂, $\geq 95\%$ RH (ikke-farvede testkemikalier) og/eller 50 mg + 2 ml isopropanol blandet i 2-3 timer ved stuetemp. (farvede og ikke-farvede testkemikalier) → Hvis testkemikaliets OD ved 570 ± 20 nm efter fratrækning af OD for isopropanol eller vand er $> 0,08$ (som svarer til ca. 5 % af den gennemsnitlige OD af den negative kontrol), bør der foretages tilpassede "living" kontroller.	10 µl + 90 µl H₂O blandet i 30 ± 2 min. ved stuetemp. (RT, 18-28 °C) → Hvis testkemikaliets er farvet, bør der gennemføres tilpassede "living"-kontroller	10 mg + 90 µl H₂O blandet i 30 ± 2 min. ved stuetemp. → Hvis testkemikaliets er farvet, bør der gennemføres tilpassede "living"-kontroller

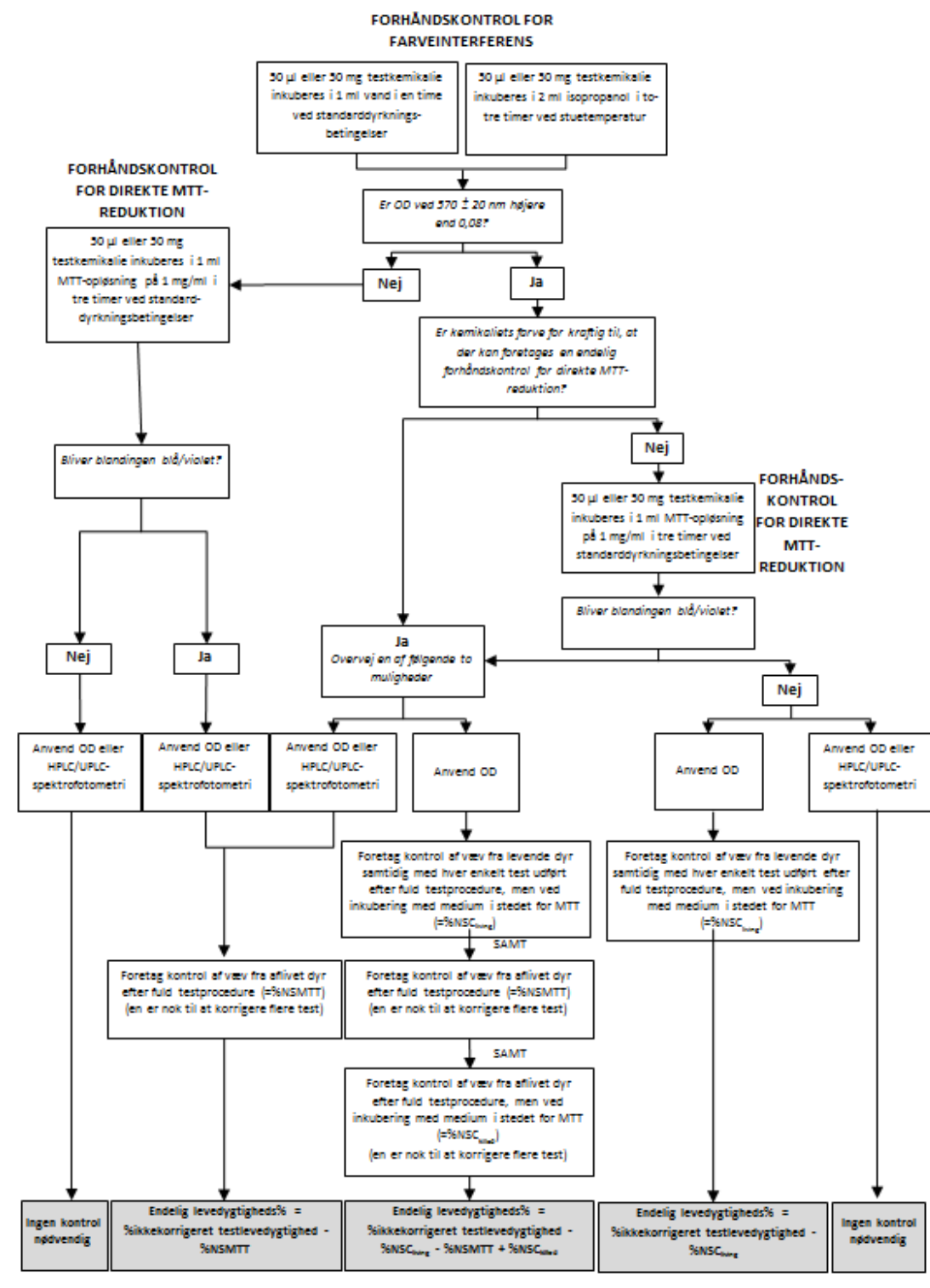
Testkomponenter	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Forhåndskontrol for direkte MTT-reduktion	50 µl + 1 ml MTT 1 mg/ml opløsning i 180 ± 15 min. ved 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH → Hvis opløsningen bliver blå/violet, bør der gennemføres tilpassede "freeze-killed"-kontroller (50 µl sterilt afioniseret vand i MTT-opløsning bruges som negativ kontrol)	50 mg + 1 ml MTT 1 mg/ml opløsning i 180 ± 15 min. ved 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH → Hvis opløsningen bliver blå/violet, bør der gennemføres tilpassede "freeze-killed"-kontroller (50 µl sterilt afioniseret vand i MTT-opløsning bruges som negativ kontrol)	30 µl + 300 µl MTT 1 mg/ml opløsning i 180 ± 15 min. ved 37 ± 2 °C, 5 ± 1, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH → Hvis opløsningen bliver blå/violet, bør der gennemføres tilpassede "water-killed"-kontroller (30 µl sterilt afioniseret vand i MTT-opløsning bruges som negativ kontrol)	30 mg + 300 µl MTT 1 mg/ml opløsning i 180 ± 15 min. ved 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH → Hvis opløsningen bliver blå/violet, bør der gennemføres tilpassede "water-killed"-kontroller (30 µl sterilt afioniseret vand i MTT-opløsning bruges som negativ kontrol)
Forbehandling	20 µl Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -frit DPBS i 30±2 min. ved 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH, beskyttet mod lys.	20 µl Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -frit DPBS i 30±2 min. ved 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH, beskyttet mod lys.	-	-
Behandlingsdoser og påføring	50 µl (83,3 µl/cm ²)	50 mg (83,3 mg/cm ²) ved hjælp af et kalibreret værktøj (f.eks. en strøget skefuld, der er kalibreret, så den rummer 50 mg natriumchlorid).	10 µl Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -frit DPBS + 30 ± 2 µl (60 µl/cm ²) Til viskøse stoffer benyttes et nylonnet	30 µl Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -frit DPBS + 30 ± 2 mg (60 mg/cm ²)
Eksponeringstid og temperatur	30 min. (± 2 min.) i dyrkningsmedium ved 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH	6 timer (± 0,25 timer) i dyrkningsmedium ved 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH	30 min. (± 2 min.) i dyrkningsmedium ved 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH	4 timer (± 0,1 timer) i dyrkningsmedium ved 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH
Skylning ved stuetemperatur	3 gange i 100 ml Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -frit DPBS	3 gange i 100 ml Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -frit DPBS	20 ml Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -frit DPBS	25 ml Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -frit DPBS
Nedsænkning eksponering efter	12 min. (± 2 min.) ved stuetemp. i dyrkningsmedium	25 min. (± 2 min.) ved stuetemp. i dyrkningsmedium	30 min (± 2 min.) ved 37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % RH i dyrkningsmedium	30 min. (± 2 min.) ved stuetemp. i dyrkningsmedium

Testkomponenter	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Inkubation efter eksponering	120 min. (± 15 min.) i dyrkningsmedium ved 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH	18 timer (± 0,25 min.) i dyrkningsmedium ved 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH	Ingen	18 timer (± 0,5 timer) i dyrkningsmedium ved 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH
Negativ kontrol	50 µl H ₂ O Testes samtidig	50 µl H ₂ O Testes samtidig	30 ± 2 µl Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -frit DPBS Testes samtidig	30 ± 2 µl Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -frit DPBS Testes samtidig
Positiv kontrol	50 µl methylacetat Testes samtidig	50 µl methylacetat Testes samtidig	30 ± 2 µl methylacetat Testes samtidig	30 ± 2 µl methylacetat Testes samtidig
MTT-opløsning	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
MTT-inkubationstid og temperatur	180 min. (± 15 min.) ved 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH	180 min. (± 15 min.) ved 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH	180 min. (± 15 min.) ved 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH	180 min. (± 15 min.) ved 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH
Ekstraktionsopløsningsmiddel	2 ml isopropanol (ekstraktion fra top og bund af indsatsen ved at gennembore vævet)	2 ml isopropanol (ekstraktion fra bund af indsatsen ved at gennembore vævet)	1,5 ml isopropanol (ekstraktion fra top og bund af indsatsen)	1,5 ml isopropanol (ekstraktion fra bund af indsatsen)
Ekstraktionstid og -temperatur	2-3 timer under omrystning (~120 o/min.) ved stuetemp. eller natten over ved 4-10 °C	2-3 timer under omrystning (~120 o/min.) ved stuetemp. eller natten over ved 4-10 °C	4 timer under omrystning (~120 o/min.) ved stuetemp. eller mindst natten over uden omrystning ved 4-10 °C	Mindst 2 timer under omrystning (~120 o/min.) ved stuetemp.
OD-aflæsning	570 nm (550-590 nm) uden referencefilter	570 nm (550-590 nm) uden referencefilter	570 nm (540-600 nm) uden referencefilter	570 nm (540-600 nm) uden referencefilter
Kvalitetskontrol af væv	Behandling med 100 µl 0,3 % (v/v) Triton X-100 12,2 min. ≤ ET ₅₀ ≤ 37,5 min.	Behandling med 100 µl 0,3 % (v/v) Triton X-100 12,2 min. ≤ ET ₅₀ ≤ 37,5 min.	behandling i 30 min. med SDS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC ₅₀ ≤ 3,5 mg/ml	behandling i 30 min. med SDS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC ₅₀ ≤ 3,2 mg/ml

Testkomponenter	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Acceptkriterier	1. Den gennemsnitlige OD for vævsprøver behandlet med negativt kontrolstof bør være $> 0,8$ og $< 2,5$. 2. Den gennemsnitlige levedygtighed for vævsprøver eksponeret i 30 min. for positivt kontrolstof, udtrykt som % af den negative kontrol, bør være < 50 %. 3. Forskellen i levedygtighed mellem to vævsprøver bør være under 20 %.	1. Den gennemsnitlige OD for vævsprøver behandlet med negativt kontrolstof bør være $> 0,8$ og $< 2,5$. 2. Den gennemsnitlige levedygtighed for vævsprøver eksponeret i 6 timer for positivt kontrolstof, udtrykt som % af den negative kontrol, bør være < 50 %. 3. Forskellen i levedygtighed mellem to vævsprøver bør være under 20 %.	1. Den gennemsnitlige OD for vævsprøver behandlet med negativt kontrolstof bør være $> 1,0$ og $\leq 2,5$. 2. Den gennemsnitlige levedygtighed for vævsprøver eksponeret i 30 min. for positivt kontrolstof, udtrykt som % af den negative kontrol, bør være ≤ 30 %. 3. Forskellen i levedygtighed mellem to vævsprøver bør være under 20 %.	1. Den gennemsnitlige OD for vævsprøver behandlet med negativt kontrolstof bør være $> 1,0$ og $\leq 2,5$. 2. Den gennemsnitlige levedygtighed for vævsprøver eksponeret i 4 timer for positivt kontrolstof, udtrykt som % af den negative kontrol, bør være ≤ 20 %. 3. Forskellen i levedygtighed mellem to vævsprøver bør være under 20 %.

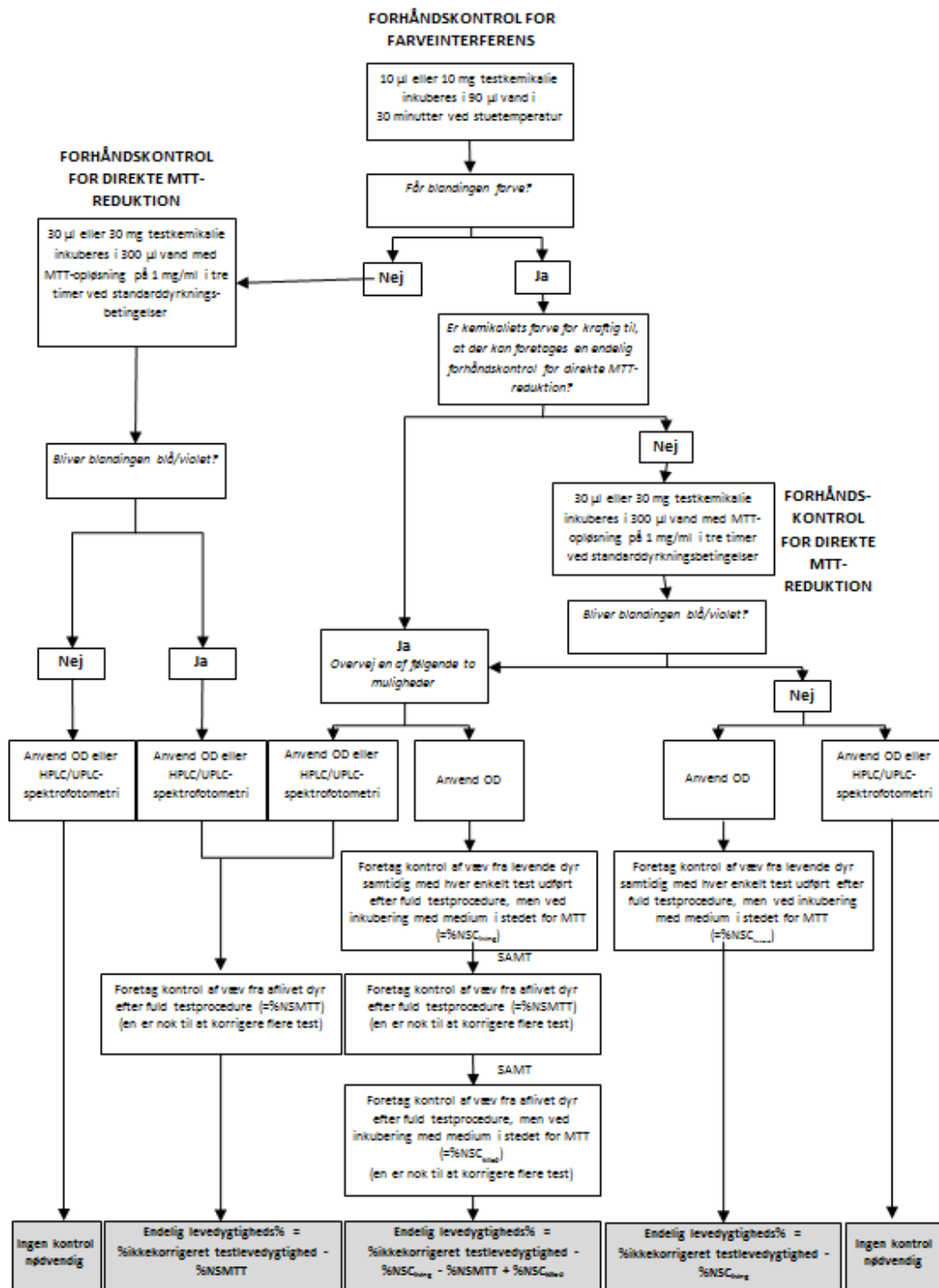
Tillæg 3

ILLUSTRATIVT FLOWDIAGRAM OVER RETNINGSLINJER FOR, HVORDAN MAN IDENTIFICERER OG HÅNTERER DIREKTE MTT-REDUKTIONSMIDLER OG/ELLER FARVEINTERFERERENDE KEMIKALIER BASERET PÅ VRM1 SOP



Tillæg 4

ILLUSTRATIVT FLOWDIAGRAM OVER RETNINGSLINJER FOR, HVORDAN MAN IDENTIFICERER OG HÅNDTERER DIREKTE MTT-REDUKTIONSMIDLER OG/ELLER FARVEINTERFERERENDE KEMIKALIER BASERET PÅ VRM2 SOP



Tillæg 5

NØGLEPARAMETRE OG ACCEPKRITERIER FOR KVALIFICERING AF ET HPLC/UPLC-SPEKTROFOTOMETRISYSTEM TIL MÅLING AF MTT-FORMAZAN EKSTRAHERET FRA RHCE-VÆVSMODELLER

Parameter	Protokol fra FDA-vejledning (36)(38)	Acceptkriterier
Selektivitet	Analyse af isopropanol, "living blank" (isopropanolekstrakt fra modeller af levende RhCE-væv uden behandling), "dead blank" (isopropanolekstrakt fra modeller af dødt RhCE-væv uden behandling) og et farvestof (f.eks. methylenblåt)	$A_{\text{realinterferens}} \leq 20 \% \text{ af } A_{\text{realLLOQ}}^1$
Præcision	Kvalitetskontroller (dvs. MTT-formazan ved 1,6 µg/ml, 16 µg/ml og 160 µg/ml) i isopropanol (n=5)	$CV \leq 15 \% \text{ eller } \leq 20 \% \text{ for LLOQ}$
Nøjagtighed	Kvalitetskontroller i isopropanol (n=5)	$\%Dev \leq 15 \% \text{ eller } \leq 20 \% \text{ for LLOQ}$
Matrixvirkning	Kvalitetskontrol i "living blank" (n=5)	$85 \% \leq \text{matrixvirkning i } \% \leq 115 \%$
Overførsel	Analyse af isopropanol efter en ULOQ ² -standard	$A_{\text{realinterferens}} \leq 20 \% \text{ af } A_{\text{realLLOQ}}$
Reproducerbarhed (inden for en dag)	Tre uafhængige kalibreringskurver (baseret på seks på hinanden følgende 1/3-opløsninger af MTT-formazan i isopropanol begyndende ved ULOQ, dvs. 200 µg/ml). Kvalitetskontroller i isopropanol (n=5)	Kalibreringskurver: $\%Dev \leq 15 \% \text{ eller } \leq 20 \% \text{ for LLOQ}$ Kvalitetskontroller: $\%Dev \leq 15 \% \text{ og } CV \leq 15 \%$
Reproducerbarhed (mellem flere dage)	Dag 1: en kalibreringskurve og kvalitetskontroller i isopropanol (n=3) Dag 2: en kalibreringskurve og kvalitetskontroller i isopropanol (n=3) Dag 3: en kalibreringskurve og kvalitetskontroller i isopropanol (n=3)	
MTT-formazans kortsigtede stabilitet i RhCE-vævsekstrakt	Kvalitetskontroller i "living blank" (n=3) analyseret på præpareringsdagen og efter 24 timers opbevaring ved stuetemperatur	$\%Dev \leq 15 \%$
MTT-formazans langsigtede stabilitet i RhCE-vævsekstrakt (hvis påkrævet)	Kvalitetskontroller i "living blank" (n=3) analyseret på præpareringsdagen og efter flere dages opbevaring ved -20 °C	$\%Dev \leq 15 \%$

¹ LLOQ: nedre grænse for kvantitativ bestemmelse, defineret så den dækker 1-2 % vævslevedygtighed, dvs. 0,8 µg/ml.

² ULOQ: øvre grænse for kvantitativ bestemmelse, defineret så den er mindst to gange så høj som den højeste forventede MTT-formazankoncentration i isopropanolekstrakter fra negative kontroller (~70 µg/ml i VRM), dvs. 200 µg/ml.

B.70 IN VITRO-ASSAYS MED HUMAN REKOMBINANT ØSTROGENRECEPTOR (hrER) TIL PÅVISNING AF KEMIKALIER MED ER-AFFINITET

GENEREL INDLEDNING

OECD's ydeevnebaserede forsøgsretningslinje

1. Denne forsøgsmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 493 (2015). TG 493 er en ydeevnebaseret forsøgsretningslinje (PBTG) med beskrivelse af metoden for *in vitro* assays med human rekombinant østrogenreceptor til påvisning af stoffer med østrogenreceptor-affinitet (hrER-affinitetassays). Den omfatter to mekanistisk og funktionelt lignende assays til identifikation af østrogenreceptorbindere (dvs. ER α) og ventes at lette udviklingen af nye lignende eller modificerede assays i overensstemmelse med de principper for validering, som er fastsat i OECD's Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment (1). De fuldt validerede referenceforsøgsmetoder (tillæg 2 og tillæg 3), som danner grundlag for denne PBTG, er:

- Freyberger-Wilson (FW) *In Vitro* Estrogen Receptor (ER) Binding Assay Using a Full Length Human Recombinant ER α (2) og
- The Chemical Evaluation and Research Institute's (CERI) *In Vitro* Estrogen Receptor Binding Assay Using a Human Recombinant Ligand Binding Domain Protein (2).

Der findes ydeevnestandarder (PS) (3) for at lette udvikling og validering af lignende forsøgsmetoder til den samme fareegenskab og give mulighed for rettidig ændring af PBTG 493, så nye lignende assays kan føjes til en opdateret PBTG. Lignende testassays vil dog først blive tilføjet efter OECD's kontrol af og samtykke til, at ydeevnestandarderne er opfyldt. De assays, der er omfattet af TG 493, kan uden forskel anvendes til at opfylde OECD-medlemslandenes krav til forsøgsresultaterne om østrogenreceptor-affinitet, samtidig med at de drager fordel af OECD's gensidige anerkendelse af data.

Baggrund og principper for de assays, der indgår i denne forsøgsmetode

2. OECD iværksatte i 1998 en højt prioriteret aktivitet om revision af eksisterende og udvikling af nye forsøgsretningslinjer til screening og test af potentielle hormonforstyrrende kemikalier. OECD's begrebsramme for testning og vurdering af potentielle hormonforstyrrende kemikalier blev revideret i 2012. Den oprindelige og reviderede begrebsramme er vedlagt som bilag til det vejledende dokument, Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (4). Begrebsrammen omfatter fem niveauer, idet hvert niveau svarer til forskellige niveauer af biologisk kompleksitet. De ER-affinitetsassays, som beskrives i denne forsøgsmetode, er niveau 2, der omfatter "*in vitro*-assays, der giver data om en eller flere udvalgte endokrine mekanismer/veje". Denne forsøgsmetode er til *in vitro*-

receptoraffinitetsassays udformet til at identificere ligander for den humane østrogenreceptor alfa (ER α).

3. Relevansen af in vitro-ER-affinitets-assayet for biologiske funktioner er tydeligt påvist. ER-affinitetsassays er udformet til at identificere kemikalier, som har potentiale til at forstyrre østrogenhormonvejen, og er i udstrakt grad blevet anvendt i den seneste snes år til at karakterisere ER-vævsfordeling samt til at identificere ER-agonister/-antagonister. Disse assays afspejler ligand-receptor-interaktionen, som er det indledende skridt på østrogensignaleringsvejen og er væsentlig for reproduktionsfunktionen hos alle hvirveldyr.
4. Østrogenerns interaktion med ER'er kan påvirke transkription af østrogenkontrollerede gener og inducere ikke-genomiske virkninger, der kan føre til induktion eller inhibering af cellulære processer, herunder processer, som er nødvendige for celleproliferation, normal fosterudvikling og reproduktiv funktion (5)(6)(7). Forstyrrelse af normale østrogensystemer kan have potentiale til at udløse skadelige virkninger på normal udvikling (ontogenese), reproduktiv sundhed og det reproduktive systems integritet. Mangelfuld ER-signaleringsvej kan medføre virkninger som øget risiko for hormonbetinget cancer, forringet forplantningsevne og ændringer i fostervækst og -udvikling (8).
5. In vitro-affinitetsassays er baseret på direkte interaktion mellem et stof med et specifikt bindingssted for receptorliganden, som regulerer gentranskriptionen. Den vigtigste komponent for bindingsassayet vedrørende human rekombinant østrogenreceptor alfa (hrER α) måler en radioaktivt mærket ligands evne ([^{3} H]17 β -østradiol) til at binde sig til ER under tilstedeværelse af stigende koncentrationer af et testkemikalie (dvs. konkurrent). Testkemikalier, som har en høj ER-affinitet, konkurrerer med den radioaktivt mærkede ligand ved en lavere koncentration sammenlignet med kemikalier med lavere affinitet for receptoren. Dette assay består af to vigtige komponenter: et mætningsbindingsforsøg for at karakterisere parametrene for interaktion mellem receptor og ligand og dokumentere ER-specificitet efterfulgt af et forsøg med kompetitiv binding, der karakteriserer konkurrencen mellem et testkemikalie og en radioaktivt mærket ligand for binding til ER.
6. CERT's valideringsstudier og FW-bindingsassays har påvist deres relevans og pålidelighed i overensstemmelse med deres formål (2).
7. Definitioner og forkortelser brugt i denne forsøgsmetode er beskrevet i tillæg 1.

Anvendelsesområde og begrænsninger i forbindelse med receptorbindingsassays

8. Disse assays foreslås til screenings- og prioriteringsformål, men kan også give oplysninger til en molekylær initiering (MIE), som kan anvendes i en "weight of evidence"-analyse. De analyserer kemikaliets binding til ER α -ligandens bindingsområde i et in vitro-system. Således bør resultaterne ikke direkte ekstrapoleres til den komplekse signalering og regulering af det intakte hormonsystem in vivo.

9. Binding af den naturlige ligand, 17 β -østradiol, er det indledende skridt i en række molekylære begivenheder, der aktiverer transkriptionen af målgener og i sidste ende kulminerer med en fysiologisk forandring (9). Binding til ER α -ligandbindingsområdet betragtes som en af de centrale mekanismer ved ER-medieret hormonforstyrrelse (ED), skønt der findes andre mekanismer, gennem hvilke ED kan forekomme, bl.a. (i) interaktioner med andre ER α -steder end ligandbindingslommen, (ii) interaktioner med andre receptorer af relevans for østrogensignaler, ER- β og G-proteinkoblet østrogenreceptor, andre receptorer og enzymsystemer i hormonsystemet, (iii) hormonsyntese, (iv) metabolisk aktivering og/eller inaktivering af hormoner, (v) fordeling af hormoner til målvæv og (vi) udskilning af hormoner fra kroppen. Ingen af de assays, der er omfattet af denne forsøgsmetode, behandler disse virkemåder.
10. Denne forsøgsmetode behandler stoffers evne til at binde sig til humant ER α og skelner ikke mellem ER α -agonister og -antagonister. Disse assays behandler heller ikke yderligere downstream-begivenheder såsom gentranskription eller fysiologiske forandringer. I betragtning af at alene enkeltstoffer med kun én bestanddel blev anvendt under valideringen, er anvendeligheden på forsøgsblandinger ikke blevet behandlet. Assays kan dog teoretisk set benyttes til test af stoffer med forskellige bestanddele og blandinger. Før forsøgsmetoden anvendes til at teste en blanding for at generere data til lovmæssige formål, bør det overvejes, om den vil give resultater, som er egnede til formålet, og i givet fald hvorfor. Sådanne overvejelser er ikke nødvendige, når der foreligger et myndighedskrav om test af blandingen.
11. De cellefrie receptorsystemer har ingen iboende metabolisk kapacitet, og de blev ikke valideret i kombination med metaboliske enzymsystemer. Det kunne dog være muligt at indarbejde metabolisk aktivitet i forsøgsdesignet, men dette ville kræve en yderligere valideringsindsats.
12. Kemikalier, der kan denaturere proteinet (dvs. receptorprotein), såsom overfladeaktivt stof eller kemikalier, der kan ændre assaybufferens pH-værdi, kan ikke testes eller kan kun testes ved koncentrationer uden sådanne interaktioner. Ellers er det koncentrationsområde, som kan testes i assays for et testkemikalie, begrænset ved sin opløselighed i assaybufferen.
13. Til orientering viser tabel 1 testresultaterne for de 24 stoffer, som blev testet i begge de fuldt validerede assays, der beskrives i denne forsøgsmetode. Af disse stoffer er 17 klassificeret som ER-bindere og 6 som ikke-bindere baseret på offentliggjorte rapporter, herunder in vitro-assays for ER-transkriptionsaktivering og/eller det uterotrofiske assay (9)(10)(11)(12)(13)(14)(15). I henhold til de data, der er opsummeret i tabel 1, var der næsten 100 % overensstemmelse mellem de to assays om klassificeringer af alle stoffer op til 10⁻⁴M, og hvert stof blev korrekt klassificeret som en ER-binder eller ikke-binder. Supplerende information om denne gruppe af stoffer samt supplerende stoffer, som er

testet i ER-bindingsassays i løbet af valideringsundersøgelserne, er anført i ydeevnestandarderne for hrER-bindingsassayet (3), tillæg 2 (tabel 1, 2 og 3).

Tabel 1: Klassificering af stoffer som ER-bindere eller ikke-bindere ved testning i FW- og CERi-hrER-bindingssassays med sammenligning med forventet respons

	Stof	CAS RN	Forventet respons	FW-assay		CERi-assay		MESH-kemikalie: Gruppe	Produktgruppe
				Koncentration s-område (M)	Klassificering	Koncentration s-område (M)	Klassificering		
1	17 β -østradiol	50-28-2	<i>Binder</i>	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Binder	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Binder	Steroid	Lægemiddel, dyrlæge
2	Norethynodrel	68-23-5	<i>Binder</i>	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-4}$	Binder	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-4}$	Binder	Steroid	Lægemiddel, dyrlæge
3	Norethindron	68-22-4	<i>Binder</i>	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-4}$	Binder	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-4}$	Binder	Steroid	Lægemiddel, dyrlæge
4	Di- <i>n</i> -butylphthalat	84-74-2	<i>Ikke-binder*</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Ikke-binder*†	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Ikke-binder*†	Kulbrinte (cyklisk), ester	Blødgører, kemisk mellemprodukt
5	DES	56-53-1	<i>Binder</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	Kulbrinte (cyklisk), phenol	Lægemiddel, dyrlæge
6	17 α -ethynylostradiol	57-63-6	<i>Binder</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	Steroid	Lægemiddel, dyrlæge
7	Meso-hexestrol	84-16-2	<i>Binder</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	Kulbrinte (cyklisk), phenol	Lægemiddel, dyrlæge
8	Genistein	446-72-0	<i>Binder</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	Kulbrinte (heterocyklisk), flavonoid	Naturprodukt
9	Equol	531-95-3	<i>Binder</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	Phytoøstrogenmetabolit	Naturprodukt
10	Butylparaben (<i>n</i> -butyl-4-hydroxybenzoat)	94-26-8	<i>Binder</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	Paraben	Konserveringsmiddel
11	Nonylphenol (blanding)	84852-15-3	<i>Binder</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	Alkylphenol	Mellemprodukt
12	<i>o,p'</i> -DDT	789-02-6	<i>Binder</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	Organiske chlorforbindelser	Insekticid
13	Corticosteron	50-22-6	<i>Ikke-binder*</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Ikke-binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Ikke-binder	Steroid	Naturprodukt
14	Zearalenon	17924-92-4	<i>Binder</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	Kulbrinte (heterocyklisk), lacton	Naturprodukt
15	Tamoxifen	10540-29-1	<i>Binder</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	Kulbrinte (cyklisk)	Lægemiddel, dyrlæge
16	5 α -dihydrotestosteron	521-18-6	<i>Binder</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	Steroid, ikke-phenolisk	Naturprodukt
17	Bisphenol A	80-05-7	<i>Binder</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	Phenol	Kemisk mellemprodukt
18	4- <i>n</i> -heptylphenol	1987-50-4	<i>Binder</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Usikker ^a	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	Alkylphenol	Mellemprodukt
19	Kepon (chlordecon)	143-50-0	<i>Binder</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	Kulbrinter (halogenerede)	Pesticid

20	Benz(a)anthracen	56-55-3	<i>Ikke-binder</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ikke-binder ^b	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ikke-binder ^b	Aromatiske kulbrinter	Mellemprodukt
21	Enterolacton	78473-71-9	<i>Binder</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	Phytoøstrogen	Naturprodukt
22	Progesteron	57-83-0	<i>Ikke-binder*</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Ikke-binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Ikke-binder	Steroid	Naturprodukt
23	Octyltriethoxysilan	2943-75-1	<i>Ikke-binder</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ikke-binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ikke-binder	Silan	Overflademodifikator
24	Atrazin	1912-24-9	<i>Ikke-binder*</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Ikke-binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Ikke-binder	heterocyklisk forbindelse	Herbicide

*Opløselighedsgrænse $< 1 \times 10^{-4}$ M.

*Anvendelsen og klassificeringen af di-n-butylphthalat (DBP) som ikke-binder var baseret på testning op til 10^{-4} M, fordi det i nogle laboratorier under prævalideringsundersøgelserne var observeret, at stoffet var uopløseligt ved 10^{-3} M (f.eks. turbiditet).

† Under valideringsundersøgelsen blev di-n-butylphthalat (DBP) testet som et kodet teststof ved koncentrationer op til 10^{-3} M. Under disse betingelser observerede nogle laboratorier enten et fald i radioligandbinding ved den højeste koncentration (10^{-3} M) og/eller en flertydig kurvetilpasning. For disse analyseserier blev DBP klassificeret som "usikker" eller "binder" i 3 ud af 5 laboratorier, som benyttede CERi-assayet, og 5 ud af 6 laboratorier, der benyttede FW-assayet (jf. henvisning (2), afsnit IV.B.3a,b og VI.A).

^a Klassificeringen var ikke i overensstemmelse med den forventede klassificering. Klassificeringen af 4-n-heptylphenol som "usikker" eller "ikke-binder" af 3 ud af 5 laboratorier resulterede i en gennemsnitlig klassificering som usikker. En nøjere kontrol afslørede, at dette skyldtes begrænsninger i kemikalieopløseligheden, som forhindrede beregningen af en fuld bindingskurve.

^b I løbet af valideringsundersøgelsen blev benz(a)anthracen omklassificeret som en ikke-binder (dvs. negativt) på grundlag af offentliggjort litteratur, som påviste, at in vitro-østrogenaktivitet rapporteret for dette stof (16) primært afhænger af dets metaboliske aktivering (17)(18). Enzymmetabolisk aktivering af stoffet ville ikke forventes i de cellefrie hrER-bindingsassays, som de anvendes i denne valideringsundersøgelse med deltagelse af flere laboratorier. Således er den korrekte klassificering for dette stof en "ikke-binder", når det anvendes under forsøgsbetingelser til FW- og CERi-assays.

KOMPONENTER I hrER-BINDINGSASSAY

De centrale dele af assayets komponenter

- Denne forsøgsmetode gælder for assays, der anvender en ER-receptor og en passende stærk ligand til receptoren, der kan bruges som markør/sporstof for assayet og kan fortrænges med stigende koncentrationer af et testkemikalie. Bindingsassays indeholder følgende to hovedkomponenter: 1) mætningsbinding og 2) kompetitiv binding. Mætningsbindingsassayet benyttes til at bekræfte receptorpræparaternes specificitet og aktivitet, mens det kompetitive bindingsforsøg benyttes til at vurdere et testkemikalies evne til at binde sig til hrER.

Kontroller

- Grundlaget for forslaget til sideløbende referenceøstrogen og kontroller bør beskrives. Sideløbende kontroller (opløsningsmiddel (bærestof), positiv (ER-binder, stærk og svag affinitet), negativ (ikke-binder)), hvor det er relevant, viser, at assayet virker under testbetingelser og danner grundlag for sammenligninger af forsøg. De indgår normalt i acceptkriterierne for et givet forsøg (1). Fuldstændige koncentrationskurver for referenceøstrogen og kontroller (dvs. svag binder og ikke-binder) anvendes på én plade under hver analyseserie. Alle andre plader skal indeholde: 1) en høj (næsten fuld fortrængning af

radioaktivt mærket ligand) og middelhøj (næsten IC_{50}) koncentration af E2 og svag binder, hver især in triplo 2) en kontrolkultur med opløsningsmiddel og ikke-specifik binding, hver især in triplo.

Procedurer for standardkvalitetskontrol

16. Procedurer for standardkvalitetskontrol udføres som beskrevet for hvert assay for at sikre aktive receptorer og korrekte kemiske koncentrationer, og at tolerancegrænser forbliver stabile gennem mange replikationer og bevarer evnen til at give de forventede ER-bindingsresponsen over tid.

Påvisning af laboratoriets kompetence

17. Inden ukendte kemikalier testes med et af de assays, der indgår i denne forsøgsmetode, skal det enkelte laboratorium påvise kompetence til at bruge assayet ved at udføre mætningsassays til at bekræfte ER-præparatets specificitet og aktivitet og kompetitive bindingsassays med referenceøstrogen og kontroller (svag binder og ikke-binder). Laboratoriet skal oprette en historisk database med resultater for referenceøstrogenet og de kontroller, der er genereret fra 3-5 uafhængige forsøg gennemført på forskellige dage. Disse forsøg skal danne grundlaget for referenceøstrogenet og de historiske kontroller for laboratoriet og vil blive anvendt til en delvis vurdering af, om assayet kan godkendes til fremtidige analyseserier.
18. Testsystemets responsivitet vil også blive bekræftet ved at teste de kompetencestoffer, som er anført i tabel 2. Listen over kompetencestoffer er en del af de referencestoffer, der er anført i Performance Standards for the ER binding assays (3). Disse stoffer kan fås i handelen, repræsenterer kemikaliegrupper, der i almindelighed er forbundet med ER-bindingsaktivitet, og udviser et passende styrkeområde, som forventes for ER-binding (dvs. stærk til svag) og ikke-bindere (dvs. negative). For hvert kompetencestof skal de testede koncentrationer dække det område, der er anført i tabel 2. Der udføres mindst tre forsøg for hvert stof, og resultaterne skal være i overensstemmelse med den forventede kemiske aktivitet. Hvert forsøg gennemføres uafhængigt (dvs. med friske receptorfortyndinger, kemikalier og reagens) med tre replikater for hver koncentration. Kompetence påvises ved korrekt klassificering (positiv/negativ) af hvert kompetencestof. Kompetencetest udføres af hver enkelt tekniker, når han/hun lærer et assay.

Tabel 2: Liste over kontroller og kompetencestoffer for kompetitive hrER-bindingsassays¹

Nr.	Stof	CAS RN ²	Forventet respons ^{3,4}	Testkoncentrationsområde (M)	MeSH-kemikaliegruppe ⁵	Produktgruppe ⁶
Kontroller (referenceøstrogen, svag binder, ikke-binder)						
1	17β-østradiol (E2)	50-28-2	Binder	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Steroid	Lægemiddel, dyrlæge
2	Norethynodrel (eller) Norethindron	68-23-5 (eller) 68-22-4	Binder	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-6}$	Steroid	Lægemiddel, dyrlæge
3	Octyltriethoxysilan	2943-75-1	Ikke-binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Silan	Overflademodifikator
Kompetencestoffer⁶						
4	Diethylstilbestrol	56-53-1	Binder	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Kulbrinte (cyklisk), phenol	Lægemiddel, dyrlæge
5	17α-ethynyløstradiol	57-63-6	Binder	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Steroid	Lægemiddel, dyrlæge
6	Meso-hexestrol	84-16-2	Binder	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Kulbrinte (cyklisk), phenol	Lægemiddel, dyrlæge
7	Tamoxifen	10540-29-1	Binder	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Kulbrinte (cyklisk)	Lægemiddel, dyrlæge
8	Genistein	446-72-0	Binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Heterocyklisk forbindelse, flavonoid	Naturprodukt
9	Bisphenol A	80-05-7	Binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Phenol	Kemisk mellemprodukt
10	Zearalalon	17924-92-4	Binder	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-3}$	Heterocyklisk forbindelse, lacton	Naturprodukt

11	Butylparaben	94-26-8	Binder	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-3}$	Carboxylsyre, phenol	Konserveringsmiddel
12	Atrazin	1912-24-9	Ikke-binder	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	heterocyklisk forbindelse	Herbicide
13	Di-n-butylphthalat (DBP) ⁷	84-74-2	Ikke-binder ⁸	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Kulbrinte (cyklisk), ester	Blødgører, kemisk mellemprodukt
14	Corticosteron	50-22-6	Ikke-binder	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-4}$	Steroid	Naturprodukt

1 Hvis et kompetencestof ikke længere kan fås i handelen, kan der anvendes et stof med samme ER-bindingsklassificering, sammenlignelig styrke og kemiske sammensætning.

2 Forkortelser: CAS RN = Registernummer i Chemical Abstracts Service.

3 Klassificering som en ER α -binder eller ikke-binder i løbet af valideringsundersøgelsen for CERI- og FW-hrER-bindingsassays (2).

⁴ ER-bindingsaktivitet var baseret på ICCVAM Background Review Documents (BRD) for ER-bindings- og TA-assays (9) samt empiriske data og andre oplysninger fra omtalte undersøgelser, der er offentliggjort og bedømt (10)(11)(12)(13)(14)(15).

⁵ Stoffer blev fordelt i en eller flere kemikaliegrupper ved hjælp af det amerikanske National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH), en internationalt anerkendt standardiseret klassificeringsordning (tilgængelig på: <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁶ Stoffer blev fordelt i en eller flere produktgrupper ved hjælp af det amerikanske National Library of Medicine's Hazardous Substances Database (tilgængelig på: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).

⁷ DPB kan anvendes som en alternativ kontrol-ikke-binder testet med en maksimal koncentration på 10^{-4} M.

⁸ Opløselighedsgrænsen for dette stof er 10^{-4} M. Anvendelsen og klassificeringen af di-n-butylphthalat (DBP) som ikke-binder var baseret på testning op til 10^{-4} M, fordi det var observeret, at stoffet var uopløseligt ved 10^{-3} M (f.eks. turbiditet) i nogle laboratorier under prævalideringsundersøgelserne.

Opløselighedstest og bestemmelse af dosisinterval for testkemikalier

19. Der udføres en foreløbig test for at bestemme opløselighedsgrænsen for hvert testkemikalie og for at afdække det passende koncentrationsområde, der skal anvendes, når testen udføres. Opløselighedsgrænsen for hvert testkemikalie skal indledningsvis bestemmes i opløsningsmidlet og yderligere bekræftes under assaybetingelser. De endelige koncentrationer, der testes i assayet, bør ikke overstige 1 mM. Test af områdebestemmelsen består af en kontrolkultur med opløsningsmiddel sammen med otte log-seriefortyndinger, der begynder ved den maksimalt acceptable koncentration (f.eks. 1 mM eller lavere, baseret på opløselighedsgrænsen), og idet der noteres tilstedeværelse af uklarhed eller bundfald. Koncentrationer i det andet og tredje forsøg bør tilpasses, hvis det er relevant, for bedre at karakterisere koncentrationsresponskurven.

Acceptkriterier for testanalyserien

20. Godkendelse eller forkastelse af en analyserie er baseret på vurdering af de resultater, der er opnået for referenceøstrogen og den kontrol, der er anvendt til hvert enkelt forsøg. For det første skal de fuldstændige koncentrationskurver for referencekontrollerne fra hvert forsøg for plade 1 opfylde resultatmålingsmetoderne med parametrene for kurvetilpasningen (f.eks. IC₅₀ og Hills kurve) baseret på de resultater, der er rapporteret for de respektive protokoller for CERI- og FW-assayene (tillæg 2 og 3) og de historiske kontrolldata fra det laboratorium, der udfører testen. Alle kontroller (referenceøstrogen, svag binder og ikke-binder) skal være klassificeret korrekt for hvert forsøg. For det andet skal kontrollerne på alle efterfølgende plader vurderes for overensstemmelse med plade 1. Der skal benyttes et tilstrækkeligt koncentrationsområde for testkemikaliets for klart at definere toppen af den kompetitive bindingskurve. Variabilitet mellem replikater ved hver koncentration af testkemikaliets samt mellem de tre uafhængige analyserier skal være rimelige og videnskabeligt forsvarlige. Evnen til at gennemføre assayet konsistent skal påvises ved udvikling og vedligeholdelse af en historisk database for referenceøstrogenet og kontrollerne. Standardafvigelser eller variationskoefficienter (CV) for gennemsnit af kurver for referenceøstrogen og svage bindere, der fungerer som kontrol, og som lever op til parametrene fra flere forsøg, kan anvendes som et mål for reproducerbarhed i laboratorier. Der bør anlægges en faglig vurdering ved gennemgang af pladekontrolresultaterne fra hver analyserie samt for hvert testkemikalie.

Endvidere skal følgende principper for acceptkriterier overholdes:

- Der skal være tilstrækkelige data til en kvantitativ vurdering af ER-binding.
- De testede koncentrationer skal forblive inden for testkemikaliets opløselighedsområde.

Analyse af data

21. Den definerede fremgangsmåde ved analyse af data om mætning og kompetitiv binding skal overholde de centrale principper for karakterisering af interaktioner mellem receptor og

ligand. Mæthedsbindingsdata analyseres normalt under anvendelse af en ikke-lineær regressionsmodel, der tager højde for samlet og ikke-specifik binding. En korrektion for ligandnedbrydning (f.eks. Swillens, 1995 (19)) kan være nødvendig ved bestemmelse af $B_{\max}$ og K_d . Data fra kompetitive bindingsassays omdannes normalt (f.eks. procentvis specifik binding og testkemikaliekoncentration ($\log M$)). Skøn over $\log (IC_{50})$ for hvert testkemikalie bør bestemmes ved anvendelse af passende ikke-lineært kurvetilpasningssoftware, så det passer til en Hill-ligning med fire parametre. Efter en indledende analyse bør der foretages en gennemgang af kurvetilpasningsparametrene og en visuel gennemgang af, hvor godt bindingsdataene passer til den genererede kompetitive bindingskurve. I nogle tilfælde kan det være nødvendigt at foretage en supplerende analyse for at få den bedste kurvetilpasning (f.eks. begrænsning af top og/eller bund af kurven, anvendelse af 10 %-reglen, jf. tillæg 4 og henvisning 2 (afsnit III.A.2)).

22. Hvis acceptkriterierne opfyldes (punkt 20), er det tegn på, at assaysystemet fungerer korrekt, men det er ingen garanti for, at enhver test vil producere nøjagtige data. Kan de korrekte resultater af den første test gentages, er det bedste tegn på, at der blev produceret nøjagtige data.

Generelle kriterier for datafortolkning

23. Der er i øjeblikket ingen universelt anerkendt metode for fortolkning af ER-bindingsdata. Både kvalitative (f.eks. binder/ikke-binder) og/eller kvantitative (f.eks. $\log IC_{50}$, relativ affinitet (RBA) osv.) vurderinger af hrER-medieret aktivitet bør være baseret på empiriske data og en solid videnskabelig vurdering.

Testrapport

24. Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Assay:

- det anvendte assay

Kontrol/reference/testkemikalie

- oprindelse, batchnummer, frist for anvendelse, hvis dette foreligger
- testkemikaliet's stabilitet, hvis denne er kendt
- testkemikaliet's opløselighed og stabilitet i opløsningsmidlet, hvis dette er kendt
- måling af pH-værdi, osmolalitet og bundfald i det dyrkningsmedium, som testkemikaliet blev tilsat, hvor det er relevant.

Stof med kun én bestanddel:

- fysisk udseende, vandopløselighed og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber

- kemisk identifikation, f.eks. IUPAC- eller CAS-navn, CAS-nummer, SMILES eller InChI-kode, strukturformel, renhed, kemisk identitet af urenheder i det omfang, det er relevant og praktisk muligt osv.

Stof med flere bestanddele, UVCB-stoffer og blandinger:

- så vidt muligt kendetegnet ved kemisk identitet (jf. ovenfor), kvantitativ forekomst og bestanddelenes relevante fysisk-kemiske egenskaber

Opløsningsmiddel/bærestof:

- karakterisering (art, leverandør og batch)
- begrundelse for valg af opløsningsmiddel/bærestof
- testkemikaliets opløselighed og stabilitet i opløsningsmidlet/bærestoffet, hvis dette er kendt

Receptorer:

- receptorkilde (leverandør, katalognr., parti, receptorart, aktiv receptorkoncentration fra leverandøren, certificering fra leverandøren)
- karakterisering af receptorer (herunder mætningsbindingsresultater): K_d , B_{max}
- opbevaring af receptorer
- radioaktivt mærket ligand:
- leverandør, katalognr., parti, specifik aktivitet

Testbetingelser:

- begrænsninger for opløselighed under assaybetingelser
- sammensætning af bindingsbuffer
- receptorkoncentration
- sporstofkoncentration (dvs. radioaktivt mærket ligand)
- testkemikaliekoncentrationer
- procent bærestof i det endelige assay
- inkubationstemperatur og -periode
- metode for bunden/fri separation
- positive og negative kontrol-/referencestoffer
- kriterier for bedømmelse af test som positive, negative eller usikre

Testgodkendelse:

- faktiske IC_{50} -værdier og værdier for Hills kurve for sideløbende positive kontrol-/referencestoffer

Resultater:

- primære og bundne/frie data
- bekræftelseskontrol af denaturering, hvis det er relevant
- den laveste effektive koncentration (LEC), hvis den foreligger
- RBA og/eller IC_{50} -værdier, hvis det er relevant
- koncentration/respons-sammenhængen, når det er muligt
- eventuelle statistiske analyser sammen med en måling af fejl og konfidens (f.eks. SEM (middelfejlen på middeltallet), standardafvigelse, CV eller 95 % CI) og en beskrivelse af, hvordan disse værdier blev opnået

Diskussion af resultater:

- anvendelse af 10 %-reglen

Konklusion

LITTERATUR

- (1) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (2) OECD (2015). Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrER α), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (3) OECD (2015). Performance Standards for Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrER α), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 222), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (4) OECD (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (5) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept, Climacteric, 5 Suppl 2: s. 20-6.
- (6) Welboren W.J., *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and How are they Regulated? *Endocr. Relat. Cancer.*, 16(4): s. 1073-89.
- (7) Younes M. og Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 135(1): s. 63-6.
- (8) Diamanti-Kandarakis *et al.* (2009). Endocrine-Disrupting Chemicals: an Endocrine Society Sci. Statement, *Endo Rev* 30(4):293-342.
- (9) ICCVAM (2002). Background Review Document. Current Status of Test Methods for Detecting Endocrine Disruptors: *In Vitro* Estrogen Receptor Binding Assays. (NIH Publication No 03-4504). National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC.
- (10) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.
- (11) ICCVAM (2006). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

- (12) Akahori Y. *et al.* (2008). Relationship Between the Results of *In Vitro* Receptor Binding Assay to Human Estrogen Receptor Alpha and *In Vivo* Uterotrophic Assay: Comparative Study with 65 Selected Chemicals, *Toxicol. In Vitro*, 22(1): 225-231.
- (13) OECD (2007). Additional Data Supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in Rodents, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 67), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (14) Takeyoshi, M. (2006). Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line, Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI): Japan. s. 1-188.
- (15) Yamasaki, K; Noda, S; Imatanaka, N; Yakabe, Y. (2004). Comparative Study of the Uterotrophic Potency of 14 Chemicals in a Uterotrophic Assay and their Receptor-Binding Affinity, *Toxicol. Letters*, 146: 111-120.
- (16) Kummer V; Maskova, J; Zraly, Z; Neca, J; Simeckova, P; Vondracek, J; Machala, M. (2008). Estrogenic Activity of Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Uterus of Immature Wistar Rats. *Toxicol. Letters*, 180: 213-221.
- (17) Gozgit, JM; Nestor, KM; Fasco, MJ; Pentecost, BT; Arcaro, KF. (2004). Differential Action of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Endogenous Estrogen-Responsive Genes and on a Transfected Estrogen-Responsive Reporter in MCF-7 Cells. *Toxicol. and Applied Pharmacol.*, 196: 58-67.
- (18) Santodonato, J. (1997). Review of the Estrogenic and Antiestrogenic Activity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Relationship to Carcinogenicity. *Chemosphere*, 34: 835-848.
- (19) Swillens S (1995). Interpretation of Binding Curves Obtained with High Receptor Concentrations: Practical Aid for Computer Analysis, *Mol Pharmacol* 47(6):1197-1203.

Tillæg 1

DEFINITIONER OG FORKORTELSER

10 %-regel: mulighed for at se bort fra datapunkter i analyser, hvor gennemsnittet af replikater for det procentvise specifikt bundne [^3H]17 β -østradiol ligger på 10 % eller mere over den, som blev observeret for gennemsnitsværdien ved en lavere koncentration (jf. tillæg 4).

Acceptkriterier: minimumsstandarder for udførelse af forsøgskontroller og referencestandarder. Alle acceptkriterier skal være opfyldt, for at et forsøg kan betragtes som gyldigt.

Nøjagtighed (konkordans): overensstemmelsen mellem forsøgsmetodens resultater og accepterede referenceværdier. Den er et mål for forsøgsmetodens ydeevne og et af aspekterne af relevans. Udtrykket benyttes ofte som synonym for "konkordans", forstået som den andel af korrekte udfald, som assayet fører til (1).

CF: OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters (OECD's konceptuelle ramme for test og vurdering af hormonforstyrrende kemikalier).

Kemikalie: et stof eller en blanding

CV: Coefficient of variation (variationskoefficient)

E2: 17 β -østradiol

ED: hormonforstyrrende virkning

hER α : human østrogenreceptor alfa

ER: østrogenreceptor

Østrogenaktivitet: et kemikalies evne til at efterligne 17 β -østradiol med hensyn til dets evne til at binde sig til østrogenreceptorer Binding til hER α kan påvises med denne forsøgsmetode.

IC₅₀: halvdelen af den maksimale effektive koncentration af et inhiberende testkemikalie

ICCVAM: US Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods.

Reproducerbarhed mellem laboratorier: mål for, i hvilken grad forskellige kvalificerede laboratorier kan opnå de samme resultater kvalitativt og kvantitativt, når de anvender samme protokol og tester de samme stoffer. Reproducerbarheden mellem laboratorier bestemmes forud for og under valideringsprocessen og angiver, i hvilken grad et assay kan overføres mellem laboratorier med et vellykket resultat. Kaldes også ekstern reproducerbarhed (1).

Reproducerbarhed inden for laboratorier: bestemmelse af, i hvilken grad kvalificeret personale på det samme laboratorium kan reproducere resultater ved at anvende en specifik protokol på forskellige tidspunkter. Kaldes også "intern reproducerbarhed" (1).

LEC: laveste effektive koncentration er den laveste koncentration af testkemikaliet, som giver en respons (dvs. den laveste testkemikaliekoncentration, ved hvilken foldinduktionen er statistisk

forskellig fra den sideløbende bærestofkontrol).

Me-too test: populært udtryk for et assay, som strukturelt og funktionelt ligner en valideret og anerkendt referenceforsøgsmetode. Benyttes som synonym for lignende forsøgsmetoder

PBTG: ydeevnebaseret forsøgsretningslinje

Ydeevnestandarder: standarder, der med udgangspunkt i en valideret forsøgsmetode danner grundlag for at vurdere, om et foreslået assay, som er mekanistisk og funktionelt tilsvarende, er sammenligneligt. De indeholder (1) de centrale dele af assayet, (2) en minimumsliste over referencekemikalier, som er udvalgt blandt de kemikalier, der anvendes til at påvise, at den validerede forsøgsmetodes ydeevne er acceptabel, og (3) de sammenlignelige niveauer af nøjagtighed og pålidelighed, som er fastsat efter, hvad der er opnået med den validerede forsøgsmetode, og som det skal påvises, at det foreslåede assay kan yde ved vurdering ud fra minimumslisten over referencekemikalier (1).

Kompetencestoffer: en delmængde af referencestoffer, der indgår i ydeevnestandarderne, og som laboratorier kan anvende til at påvise teknisk kompetence med et standardiseret assay. Udvælgelseskriterier for disse stoffer omfatter typisk, at de repræsenterer responsområdet, fås i handelen, og at der foreligger referencedata af høj kvalitet.

Kompetence: dokumenteret evne til at gennemføre et assay korrekt, før ukendte stoffer testes.

Referenceøstrogen: 17 β -østradiol (E2, CAS 50-28-2)

Referenceforsøgsmetoder: de assays, hvorpå PBTG 493 er baseret

RBA: Relativ affinitet. RBA af et stof beregnes som en procentdel af logaritmen (IC₅₀) til stoffet i forhold til logaritmen (IC₅₀) af 17 β -østradiol.

Relevans: beskrivelse af sammenhængen mellem et assay og den pågældende virkning og dens meningsfuldhed og brugbarhed til et bestemt formål. Det angives, i hvilket omfang assayet måler eller forudsiger den relevante biologiske virkning korrekt. Assayets nøjagtighed (konkordans) indgår i vurderingen af dets relevans (1).

Pålidelighed: mål for, i hvilken grad et assay kan reproduceres i og mellem laboratorier over en længere periode, når det udføres efter samme protokol. Det bedømmes ved beregning af reproducerbarhed inden for og mellem laboratorier.

Standardafvigelse: standardafvigelse

Testkemikalie: alle stoffer eller blandinger, der testes ved hjælp af denne forsøgsmetode

Valideret forsøgsmetode: et assay, for hvilket der er gennemført valideringsundersøgelser for at fastslå relevansen (herunder nøjagtigheden) og pålideligheden til et bestemt formål. Det er vigtigt at være opmærksom på, at en valideret forsøgsmetode måske ikke har en tilstrækkelig ydeevne med hensyn til nøjagtighed og pålidelighed til at være acceptabel til det planlagte formål (1).

Validering: den proces, hvorved pålideligheden og relevansen af en bestemt tilgang, metode, proces eller vurdering eller et bestemt assay fastslås til et defineret formål (1).

Tillæg 2

FREYBERGER-WILSONS *IN VITRO*-ASSAYS VEDRØRENDE ØSTROGENRECEPTORMÆTNING (ER α) OG KOMPETITIV BINDING VED ANVENDELSE AF REKOMBINANT ER α I FULD LÆNGDE

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER (JF. OGSÅ GENEREL INDLEDNING)

1. Dette in vitro-assay vedrørende østrogenreceptormætning (ER α) og kompetitiv binding anvender human receptor ER α (hrER α) i fuld længde, som produceres i og isoleres fra baculovirusinficerede insektceller. Protokollen, som blev udviklet af Freyberger og Wilson, gennemgik en international valideringsundersøgelse i flere laboratorier (2), der har påvist dens relevans og pålidelighed til assayets tilsigtede formål.
2. Dette assay er en screeningsprocedure til påvisning af stoffer, som kan binde sig til hrER α i fuld længde. Det benyttes til at bestemme et testkemikalies evne til at konkurrere med 17 β -østradiol om binding til hrER α . Kvantitative assayresultater kan omfatte IC₅₀ (et mål for den koncentration af testkemikaliets, der er nødvendig for at fortrænge halvdelen af [³H]-17 β -østradiol fra hrER α), og testkemikalienes relative affiniteter for hrER α sammenlignet med 17 β -østradiol. Til kemikaliescreeningsformål kan acceptable kvalitative assayresultater omfatte klassificeringer af testkemikalier som enten hrER α -bindere, ikke-bindere eller usikre baseret på kriterier beskrevet for bindingskurver.
3. Assayet anvender en radioaktivt mærket ligand, som kræver, at laboratoriet har licens til radioaktive materialer. Alle procedurer med radioisotoper og farlige kemikalier skal følge forskrifter og procedurer som beskrevet i national lovgivning.
4. Afsnittene "**GENEREL INDLEDNING**" og "**hrER-BINDINGSASSAYETS KOMPONENTER**" skal læses, før dette assay benyttes til lovmæssige formål. Definitioner og forkortelser, der benyttes i denne testvejledning, er beskrevet i tillæg 1.

PRINCIPPER FOR ASSAYET (JF. OGSÅ GENEREL INDLEDNING)

5. hrER α -bindingsassayet måler en radioaktivt mærket ligands ([³H]17 β -østradiol) evne til at binde sig til ER under tilstedeværelse af stigende koncentrationer af et testkemikalie (dvs. konkurrent). Testkemikalier, som har en høj ER-affinitet, konkurrerer med den radioaktivt mærkede ligand ved en lavere koncentration sammenlignet med kemikalier med lavere affinitet for receptoren.
6. Dette assay består af to vigtige komponenter: et mætningsbindingsforsøg for at karakterisere parametrene for interaktion mellem receptor og ligand efterfulgt af et forsøg

med kompetitiv binding, der karakteriserer konkurrencen mellem et testkemikalie og en radioaktivt mærket ligand for binding til ER.

7. Formålet med mætningsbindingsforsøget er at karakterisere en særlig batch af receptorer for affinitet og antal i forberedelsen af det kompetitive bindingsforsøg. Mætningsbindingsforsøget måler, under ligevægtsbetingelser, en fast østrogenreceptorkoncentrations affinitet for dens naturlige ligand (repræsenteret ved dissociationskonstanten, K_d) og koncentrationen af aktive receptorsteder (B_{max}).
8. Det kompetitive bindingsforsøg måler et stofs affinitet til at konkurrere med $[3H]17\beta$ -østradiol om binding til ER. Affiniteten kvantificeres af koncentrationen af testkemikaliets, som under ligevægtsbetingelser, inhiberer 50 % af den specifikke binding af $[3H]17\beta$ -østradiol (kaldet den "inhiberende koncentration på 50 %" eller IC_{50}). Denne kan også vurderes ved hjælp af den relative affinitet (RBA, i forhold til IC_{50} for østradiol målt separat i den samme analyseserie). Det kompetitive bindingsforsøg måler bindingen af $[3H]17\beta$ -østradiol ved en fast koncentration under tilstedeværelse af en bred vifte (otte størrelsesordener) af testkemikaliekoncentrationer. Dataene tilpasses herefter, hvor det er muligt, så de danner Hill-ligningen (Hill, 1910), der beskriver en kompetitiv binders fortrængning af den radioaktive ligand ét sted. Omfanget af fortrængningen af det radioaktivt mærkede østradiol ved ligevægt anvendes til at karakterisere testkemikaliets som en binder, ikke-binder eller som et kemikalie, der genererer en usikker respons.

FREMGANGSMÅDE

Påvisning af acceptabel ydeevne for hrER α -protein

9. Før der rutinemæssigt udføres mætningsassays og kompetitive bindingsassays, skal det påvises, at hver ny batch hrER α fungerer korrekt i det laboratorium, hvor det vil blive anvendt. Ydeevnen påvises gennem en totinsproces. Det drejer sig om følgende trin:
 - Der udføres et $[^3H]$ - 17β -østradiol-bindingsassay for at påvise hrER α -specificitet og mætning. Ikke-lineær regressionsanalyse af disse data (f.eks. BioSoft, McPherson, 1985; Motulsky, 1995) og det efterfølgende Scatchard-plot bør dokumentere hrER α -affiniteten for $[^3H]$ - 17β -østradiol (K_d) og antallet af receptorer (B_{max}) for hver batch hrER α .
 - Der udføres et kompetitivt bindingsassay ved anvendelse af kontrolstofferne (referenceøstrogen (17β -østradiol), en svag binder (f.eks. norethynodrel eller norethindron) og en ikke-binder (octyltriethoxysilan, OTES). Hvert laboratorium bør oprette en historisk database for at dokumentere konsistensen af IC_{50} og andre relevante værdier for referenceøstrogenet og den svage binder blandt forsøg og forskellige batcher af hrER α . Parametrene for de kompetitive bindingskurver for kontrolstofferne bør ligge inden for de grænser for konfidensintervallet på 95 % (jf. tabel 1), der blev udviklet ved hjælp af data fra laboratorier, som deltog i valideringsundersøgelsen for dette assay (2).

Tabel 1: Ydeevnekriterier udviklet for referenceøstrogen og svage bindere, FW-hrER bindingsassay

Stof	Parameter	Gennemsnit ^a	Standardafvigelse (n)	95 %-konfidensintervaller ^b	
				Nedre grænse	Øvre grænse
17β-østradiol	Top (%)	100,44	10,84 (67)	97,8	103,1
	Bund (%)	0,29	1,25 (67)	-0,01	0,60
	Hills kurve	-1,06	0,20 (67)	-1,11	-1,02
	LogIC ₅₀ (M)	-8,92 ^c	0,18 (67)	-8,97	-8,88
Norethynodrel	Top (%)	99,42	8,90 (68)	97,27	101,60
	Bund (%)	2,02	3,42 (68)	1,19	2,84
	Hills kurve	-1,01	0,38 (68)	-1,10	-0,92
	Log IC ₅₀ (M)	-6,39	0,27 (68)	-6,46	-6,33
Norethindron^c	Top (%)	96,14	8,44 (27)	92,80	99,48
	Bund (%)	2,38	5,02 (27)	0,40	4,37
	Hills kurve	-1,41	0,32 (27)	-1,53	-1,28
	LogIC ₅₀ (M)	-5,73	0,27 (27)	-5,84	-5,62

^aGennemsnit (n) $\pm$ standardafvigelse blev beregnet ved hjælp af skøn over kurvetilpassede parametre (Hill-ligning med fire parametre) til kontrolanalyse serier udført i fire laboratorier under valideringsundersøgelsen (jf. bilag N i reference 2).

^b Konfidensintervallerne på 95 % anføres som en rettesnor for acceptkriterier.

^c Testning af norethindron var valgfri for delopgave 4 under valideringsundersøgelsen (jf. reference 2, jf. delopgave 4). Således blev gennemsnittet $\pm$ standardafvigelse (n) beregnet ved hjælp af kurvetilpassede skøn (Hill-ligning med fire parametre) for kontrolanalyse serier udført i to laboratorier.

Intervallet for IC₅₀ vil afhænge af Kd af receptorpræparatet og koncentrationen af den radioaktivt mærkede ligand, som anvendes i det enkelte laboratorium. En passende justering af IC₅₀-intervallet baseret på betingelserne for udførelse af assayet vil være acceptabel.

Påvisning af laboratoriets kompetence

10. Jf. punkt 17 og 18 og tabel 2 i afsnittet "**hrER-BINDINGSASSAYETS KOMPONENTER**" i denne forsøgsmetode. Hvert assay (mætning og kompetitiv binding) bør bestå af tre uafhængige analyse serier (dvs. friske fortyndinger af receptor, kemikalier og reagenser) på forskellige dage, og hver analyse serie bør indeholde tre replikater.

Bestemmelse af receptor(hrER α)koncentration

11. Den aktive receptorkoncentration varierer lidt efter batch og opbevaringsforhold. Af denne grund bør den koncentration af aktiv receptor, der modtages fra leverandøren, bestemmes. Dette vil give den rette koncentration af aktiv receptor på tidspunktet for analyse serien.
12. Under forhold svarende til kompetitiv binding (dvs. 1 nM [³H]-østradiol) bør nominelle koncentrationer på 0,25, 0,5, 0,75 og 1 nM receptor inkuberes i fravær af (total binding) og under tilstedeværelse (ikke-specifik binding) af 1 μ M umærket østradiol. Specifik binding beregnet som forskellen mellem total og ikke-specifik binding afsættes i forhold til den nominelle receptorkoncentration. Den receptorkoncentration, som giver specifikke

bindingsværdier svarende til 20 % af de tilsatte radioaktivt mærkede stoffer, hænger sammen med den tilsvarende nominelle receptorkoncentration, og denne receptorkoncentration anvendes til mætningsforsøg og kompetitive bindingsforsøg. En slutkoncentration for hrER på 0,5 nM vil ofte opfylde denne betingelse.

13. Hvis 20 %-kriteriet gentagne gange ikke kan opfyldes, kontrolleres forsøgs-setuppet for potentielle fejl. Hvis 20 %-kriteriet ikke opfyldes, kan det tyde på, at der er meget lidt aktiv receptor i rekombinantbatchen, og det bør overvejes at anvende en anden receptorbatch.

Mætningsassay

14. Otte stigende koncentrationer af [^3H]17 β -østradiol vurderes in triplo under følgende tre betingelser (jf. tabel 2):

- i fravær af umærket 17 β -østradiol og under tilstedeværelse af ER. Dette er bestemmelsen af den totale binding ved måling af radioaktiviteten i de brønde, som kun har [^3H]17 β -østradiol.
- under tilstedeværelse af en 1 000-fold uforholdsmæssig koncentration af umærket 17 β -østradiol i forhold til mærket 17 β -østradiol og tilstedeværelse af ER. Formålet med denne betingelse er at mætte de aktive bindingssteder med umærket 17 β -østradiol og, ved at måle radioaktiviteten i brøndene, bestemme den ikke-specifikke binding. Eventuelt tilbageværende varmt østradiol, som kan binde sig til receptoren, anses for at kunne binde sig til et ikke-specifikt sted, da koldt østradiol bør have en så høj koncentration, at det binder sig til alle tilgængelige specifikke steder på receptoren
- i fravær af umærket 17 β -østradiol og af ER (bestemmelse af samlet radioaktivitet).

Fremstilling af [^3H]-17 β -østradiol og umærkede 17 β -østradiol-opløsninger

15. Fortyndinger af [^3H]-17 β -østradiol fremstilles ved tilsætning af assaybuffer til en 12 nM stamopløsning af [^3H]-17 β -østradiol for at opnå koncentrationer, der indledningsvis ligger fra 0,12 nM til 12 nM. Ved at tilsætte 40 μl af disse opløsninger til de respektive assaybrønde på en mikrotiterplade med 96 brønde (i en endelig mængde på 160 μl) fås den endelige assaykoncentration fra 0,03 til 3,0 nM. Fremstilling af assaybuffer, [^3H]-17 β -østradiolstamopløsning og fortyndinger samt bestemmelse af koncentrationerne er beskrevet i detaljer i FW-protokollen (2).
16. Fortyndinger af 17 β -østradiol-opløsninger i ethanol fremstilles ved at tilsætte assaybuffer for at få otte stigende koncentrationer, der indledningsvis ligger fra 0,06 μM til 6 μM . Ved at tilsætte 80 μl af disse opløsninger til de respektive assaybrønde på en mikrotiterplade med 96 brønde (i en endelig mængde på 160 μl) fremkommer de endelige assaykoncentrationer, der ligger fra 0,03 μM til 3 μM . Den endelige koncentration af umærket 17 β -østradiol i brøndene i det enkelte ikke-specifikke bindingsassay bør være 1 000 fold den mærkede [^3H]-17 β -østradiolkoncentration. Fremstilling af fortyndinger af umærket 17 β -østradiol er beskrevet i detaljer i FW-protokollen (2).

17. Den nominelle receptorkoncentration, som giver en specifik binding på $20 \pm 5 \%$, bør anvendes (jf. punkt 12-13). hrER α -opløsningen fremstilles umiddelbart inden anvendelsen.
18. Mikrotiterpladerne med 96 brønde forberedes som illustreret i tabel 2 med 3 replikater pr. koncentration. Et eksempel på pladekoncentration og volumenfordeling af [^3H]-17 β -østradiol, umærket 17 β -østradiol, buffer og receptor er anført i tillæg 2.2.

Tabel 2: Layout for en mikrotiterplade til mætningsbindingsassay

	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>	<i>11</i>	<i>12</i>	
<i>A</i>	0,03 nM [³ H] E ₂ + ER			0,06 nM [³ H] E ₂ + ER			0,08 nM [³ H] E ₂ + ER			0,10 nM [³ H] E ₂ + ER			Total binding (opløsning smiddel)
<i>B</i>	0,30 nM [³ H] E ₂ + ER			0,60 nM [³ H] E ₂ + ER			1,0 nM [³ H] E ₂ + ER			3,0 nM [³ H] E ₂ + ER			
<i>C</i>													
<i>D</i>	0,03 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,03 μM E ₂			0,06 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,06 μM E ₂			0,08 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,08 μM E ₂			0,10 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,10 μM E ₂			Ikke- specifik binding
<i>E</i>	0,30 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,30 μM E ₂			0,60 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,60 μM E ₂			1,0 nM [³ H] E ₂ + ER + 1,0 μM E ₂			3,0 nM [³ H] E ₂ + ER + 3,0 μM E ₂			
<i>F</i>													
<i>G</i>													
<i>H</i>													

[^3H] E $_2$: [^3H]-17 β -østradiol

ER: østrogenreceptor

E $_2$: umærket 17 β -østradiol

19. Assaymikrotiterplader inkuberes ved 2-8 °C i 16-20 timer og anbringes på en rotator i inkubationsperioden.

Måling af [^3H]-17 β -østradiol bundet til hrER α

20. [^3H]-17 β -østradiol bundet til hrER α separeres fra fri [^3H]-17 β -østradiol ved at tilsætte 80 μl kold DCC-suspension til hver brønd, ryste mikrotiterpladerne i 10 minutter og centrifugere i 10 minutter ved omkring 2 500 o/min. For at minimere dissociation af bundet [^3H]-17 β -østradiol fra hrER α under denne proces er det særdeles vigtigt, at buffere og assaybrønde holdes mellem 2 og 8 °C, og at hvert skridt udføres hurtigt. En rysteanordning til mikrotiterplader er nødvendig for at behandle plader effektivt og hurtigt.
21. 50 μl supernatant, som indeholder hrER α -bundet [^3H]-17 β -østradiol, bør herefter tages ekstremt forsigtigt for at undgå enhver kontaminering af brøndene ved kontakt med DCC og anbringes på en anden mikrotiterplade.
22. 200 μl scintillationsvæske, der kan omdanne kinetisk energi fra nukleare emissioner til lysenergi, tilsættes herefter til hver brønd (A1-B12 og D1 til E12). Brønd G1-H12

(identificeret som dpms i alt) udgør seriefortyndinger af [³H]-17β-østradiol (40 µl), som bør hældes direkte i scintillationsvæsken i brøndene på målepladen som anført i tabel 3, dvs. at disse brønde kun indeholder 200 µl af scintillationsvæsken og den rette fortynding af [³H]-17β-østradiol. Disse mål viser, hvor meget [³H]-17β-østradiol i dpms der blev tilsat til hvert sæt brønde til den totale binding og ikke-specifikke binding.

Tabel 3: Layout for en mikrotiterplade til mætningsbindingsassay, måling af radioaktivitet

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [³ H] E ₂ + ER			0,06 nM [³ H] E ₂ + ER			0,08 nM [³ H] E ₂ + ER			0,10 nM [³ H] E ₂ + ER			Total binding (opløsningsmiddel)
B	0,30 nM [³ H] E ₂ + ER			0,60 nM [³ H] E ₂ + ER			1,0 nM [³ H] E ₂ + ER			3,0 nM [³ H] E ₂ + ER			
C													
D	0,03 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,03 μM E ₂			0,06 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,06 μM E ₂			0,08 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,08 μM E ₂			0,10 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,10 μM E ₂			Ikke-specifik binding
E	0,30 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,30 μM E ₂			0,60 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,60 μM E ₂			1,0 nM [³ H] E ₂ + ER + 1,0 μM E ₂			3,0 nM [³ H] E ₂ + ER + 3,0 μM E ₂			
F													
G	0,03 nM [³ H] E ₂ (dpms i alt)			0,06 nM [³ H] E ₂			0,08 nM [³ H] E ₂			0,10 nM [³ H] E ₂			dpms i alt*
H	0,30 nM [³ H] E ₂			0,60 nM [³ H] E ₂			1,0 nM [³ H] E ₂			3,0 nM [³ H] E ₂			

[³H] E₂: [³H]-17β-østradiol

ER: østrogenreceptor

E₂: umærket 17β-østradiol

dpms: disintegrationer pr. minut

*De varme seriefortyndinger af [³H]-mærket østradiol her tilsættes direkte til 200 µl scintillationsvæske i brønd G1 til H12.

23. Målingen indledes efter mindst 2 timer, og tælltiden bør være 40 minutter pr. brønd. Der bør anvendes en scintillationstæller til en mikrotiterplade til bestemmelse af dpm/brønd med korrektion for quenching. Er der ikke adgang til en scintillationstæller til mikrotiterplader, kan prøverne måles i en konventionel tæller. Under disse forhold kan det overvejes at nedsætte tælltiden.

Kompetitivt bindingsassay

24. Det kompetitive bindingsassay måler bindingen af en enkelt koncentration af [³H]-17β-østradiol under tilstedeværelse af stigende koncentrationer af et testkemikalie. Der bør anvendes tre sideløbende replikater ved hver koncentration inden for én analyseserie. Endvidere bør der udføres tre ikke-sideløbende analyseserier for hvert kemikalie, der testes. Assayet bør opsættes med en eller flere mikrotiterplader med 96 brønde.

Kontroller

25. Ved udførelsen af assayet medtages samtidig opløsningsmiddel og kontroller (dvs. referenceøstrogen, svag binder og ikke-binder) i hvert forsøg. Fuldstændige koncentrationskurver for referenceøstrogen og kontroller (dvs. svag binder og ikke-binder) anvendes på én plade under hver analyseserie. Alle øvrige plader bør hver indeholde i) en høj- (maksimal fortrængning) og middel- (ca. IC_{50}) koncentration af E2 og svag binder in triplo, ii) kontrolkultur med opløsningsmiddel og ikke-specifik binding, hver især mindst in triplo. Procedurer for fremstilling af assaybuffer, kontroller, [^3H]-17 β -østradiol, hrER α og testkemikalieopløsninger er beskrevet i reference 2 (bilag K, jf. FW-assayprotokol).

Kontrolkultur med opløsningsmiddel

26. Kontrolkulturen med opløsningsmiddel viser, at opløsningsmidlet ikke interagerer med testsystemet og måler også total binding (TB). Ethanol er det foretrukne opløsningsmiddel. Såfremt den højeste koncentration af testkemikaliet ikke er opløseligt i ethanol, kan DMSO anvendes. Koncentrationen af ethanol eller DMSO, hvis det anvendes, i de endelige assaybrønde er 1,5 % og må ikke overstige 2 %.

Bufferkontrol

27. Bufferkontrollen (BC) bør hverken indeholde opløsningsmiddel eller testkemikalie, men alle assayets øvrige komponenter. Resultaterne af bufferkontrollen sammenlignes med opløsningsmiddelkontrollen for at kontrollere, at det anvendte opløsningsmiddel ikke påvirker assaysystemet.

Stærk binder (referenceøstrogen)

28. 17 β -østradiol (CAS 50-28-2) er den endogene ligand og binder sig med høj affinitet til ER, undertype alfa. En standardkurve, som anvender umærket 17 β -østradiol, fremstilles til hvert hrER α kompetitivt bindingsassay, så der kan foretages en variabilitetsvurdering ved gennemførelse af assayet over længere tid i det samme laboratorium. Otte opløsninger af umærket 17 β -østradiol fremstilles i ethanol med koncentrationer i assaybrønde i området 100 nM-10 pM (-7[logM] til -11[logM]), med følgende intervaller: (-7[logM], -8[logM], -8,5[logM], -9[logM], -9,5[logM], -10[logM], -11[logM]). Den højeste koncentration af umærket 17 β -østradiol (1 μ M) tjener også som ikke-specifik bindingsindikator. Denne koncentration er angivet ved mærket "NSB" i tabel 4, selv om den også indgår i standardkurven.

Svag binder

29. En svag binder (norethynodrel (CAS 68-23-5) eller norethindron (CAS 68-22-4)) bør medtages for at påvise hvert forsøgs følsomhed og for at give mulighed for en vurdering af variabiliteten, når assayet udføres over længere tid. Otte opløsninger af den svage binder fremstilles i ethanol med koncentrationer i assaybrøndene i området fra 3 nM til 30 μ M (-8,5[logM] til -4,5[logM]) med følgende intervaller: -4,5[logM], -5[logM], -5,5[logM], -6[logM], -6,5[logM], -7[logM], -7,5[logM], -8,5[logM].

Ikke-binder

30. Octyltriethoxysilan (OTES, CAS 2943-75-1) bør anvendes som den negative kontrol (ikke-binder). Det giver sikkerhed for, at det med det udførte assay kan påvises, når testkemikalierne ikke binder sig til hrER α . Otte opløsninger af ikke-binderen fremstilles i ethanol med koncentrationer i assaybrøndene i området fra 0,1 nM til 1 000 μ M ($-10[\log M]$ til $-3[\log M]$) i log-stigninger. Di-*n*-butylphthalat (DBP) kan bruges som en alternativ ikke-binder som kontrol. Det er påvist, at dens maksimale opløselighed er $-4[\log M]$.

hrER α -koncentration

31. Den mængde receptor, som giver en specifik binding på 20 ± 5 % af 1 nM radioaktivt mærket ligand (jf. punkt 12-13 i tillæg 2), bør anvendes. hrER α -opløsningen fremstilles umiddelbart inden anvendelsen.

[^3H]-17 β - α stradiol

32. Koncentrationen af [^3H]-17 β - α stradiol i assaybrøndene skal være 1,0 nM.

Testkemikalier

33. I første omgang er det nødvendigt at foretage en opløselighedstest for at fastslå opløselighedsgrænsen for hvert testkemikalie og for at afdække det passende koncentrationsområde, der skal anvendes, når testprotokollen udføres. Opløselighedsgrænsen for hvert testkemikalie skal indledningsvis bestemmes i opløsningsmidlet og yderligere bekræftes under assaybetingelser. Den endelige koncentration, som testes i assayet, bør ikke overstige 1 mM. Områdebestemmelsen består af en kontrolkultur med opløsningsmiddel sammen med otte log-seriefortyndinger, der begynder ved den maksimalt acceptable koncentration (f.eks. 1 mM eller lavere, baseret på opløselighedsgrænsen), og idet der noteres tilstedeværelse af uklarhed eller bundfald (jf. også punkt 35). Testkemikaliets testes ved anvendelse af otte logaritmiske kurver beregnet efter koncentrationsintervaller som defineret ved den foregående test til bestemmelse af dosisinterval. Koncentrationer i det andet og tredje forsøg bør tilpasses, hvis det er relevant, for bedre at karakterisere koncentrationsresponskurven.
34. Fortyndinger af testkemikaliets fremstilles i et passende opløsningsmiddel (jf. punkt 26 i tillæg 2). Hvis den højeste koncentration af testkemikaliets ikke kan opløses i hverken ethanol eller DMSO, og tilsætning af mere opløsningsmiddel ville medføre, at opløsningsmiddelkoncentrationen i det endelige rør blev større end den acceptable grænse, kan den højeste koncentration reduceres til den næste lavere koncentration. I så fald kan en supplerende koncentration tilsættes i den lave ende af koncentrationsserien. Andre koncentrationer i serien bør forblive uændrede.
35. Testkemikalieopløsningerne bør overvåges nøje, når de tilsættes til assaybrønden, da testkemikaliets kan danne bundfald ved tilsætning til assaybrønden. Data for alle brønde, der indeholder bundfald, bør udelukkes fra kurvetilpasningen, og årsagen til udelukkelsen af data noteres.

36. Hvis der allerede findes oplysninger fra andre kilder, som angiver en log (IC₅₀) for et testkemikalie, kan det være hensigtsmæssigt at sætte en geometrisk afstand mellem fortyndingerne (dvs. 0,5 logenheder omkring den forventede log(IC₅₀)). Det endelige resultat bør afspejle en tilstrækkelig spredning af koncentrationer på begge sider af log(IC₅₀), herunder "top" og "bund", således at bindingskurven kan karakteriseres tilstrækkeligt.

Organisering af assaypladen

37. Mærkede mikrotiterplader bør forberedes under hensyntagen til seksdobbelte inkubationer med koder for kontrolkultur med opløsningsmiddel, den højeste koncentration af referenceøstroget, der også fungerer som indikator for ikke-specifik binding (NSB) og bufferkontrol, og under hensyntagen til tredobbelte inkubationer med koder for hver af de otte koncentrationer af den ikke-bindende kontrol (octyltriethoxysilan), de syv lavere koncentrationer for referenceøstroget, de otte koncentrationsdosisniveauer for den svage binder og de otte koncentrationer af hvert testkemikalie. Et eksempel på layout for pladediagrammet til de fulde koncentrationskurver for referenceøstroget og kontrol er anført nedenfor i tabel 4. Supplerende mikrotiterplader bruges til testkemikalier og bør omfatte pladekontroller, dvs.: 1) en høj- (maksimal fortrængning) og middel- (ca. IC₅₀) koncentration af E2 og svag binder in triplo, 2) kontrolkultur med opløsningsmiddel og ikke-specifik binding, hver især seksdobbelt (tabel 5). Et eksempel på arbejdsark til layout for en mikrotiterplade til et kompetitivt assay, der anvender tre ukendte testkemikalier, er anført i tillæg 2.3. De koncentrationer, som er angivet i tabel 4 og 5, er assayets endelige koncentrationer. Den maksimale koncentration for E2 bør være 1×10⁻⁷ M, og for den svage binder bør den højeste anvendte koncentration for den svage binder på plade 1 anvendes. IC₅₀-koncentrationen skal bestemmes af laboratoriet på grundlag af deres historiske kontrol database. Det forventes, at denne værdi vil ligne den, der blev observeret i valideringsundersøgelserne (jf. tabel 1).

Tabel 4: Layout for mikrotiterpladen til et kompetitivt bindingsassay, fulde koncentrationskurver for referenceøstroget og kontroller (plade 1).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (kun opløsningsmiddel)			TB (kun opløsningsmiddel)			NSB			NSB		
B	E2 (1×10 ⁻⁷)			E2 (1×10 ⁻⁸)			E2 (1×10 ^{-8,5})			E2 (1×10 ⁻⁹)		
C	E2 (1×10 ^{-9,5})			E2 (1×10 ⁻¹⁰)			E2 (1×10 ⁻¹¹)			Blindprøve*		
D	NE (1×10 ^{-4,5})			NE (1×10 ⁻⁵)			NE (1×10 ^{-5,5})			NE (1×10 ⁻⁶)		
E	NE (1×10 ^{-6,5})			NE (1×10 ⁻⁷)			NE (1×10 ^{-7,5})			NE (1×10 ^{-8,5})		
F	OTES (1×10 ⁻³)			OTES (1×10 ⁻⁴)			OTES (1×10 ⁻⁵)			OTES (1×10 ⁻⁶)		
G	OTES (1×10 ⁻⁷)			OTES (1×10 ⁻⁸)			OTES (1×10 ⁻⁹)			OTES (1×10 ⁻¹⁰)		
H	Blindprøve (til varm)**			Blindprøve (til varm)**			Bufferkontrol			Bufferkontrol		

I dette eksempel er den svage binder norethinodrel (NE)

* reel blindprøve, brønd ikke benyttet

** blindprøve ikke anvendt under inkubationen, men anvendt til at bekræfte den samlede tilsatte radioaktivitet.

Tabel 5: Layout til mikrotiterpladen til et kompetitivt bindingsassay, fulde koncentrationskurver til testkemikalier og pladekontroller

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (kun opløsningsmiddel)			TB (kun opløsningsmiddel)			NSB			NSB		
B	TC1 (1×10 ⁻³)			TC1 (1×10 ⁻⁴)			TC1 (1×10 ⁻⁵)			TC1 (1×10 ⁻⁶)		
C	TC1 (1×10 ⁻⁷)			TC1 (1×10 ⁻⁸)			TC1 (1×10 ⁻⁹)			TC1 (1×10 ⁻¹⁰)		
D	TC2 (1×10 ⁻³)			TC2 (1×10 ⁻⁴)			TC2 (1×10 ⁻⁵)			TC2 (1×10 ⁻⁶)		
E	TC2 (1×10 ⁻⁷)			TC2 (1×10 ⁻⁸)			TC2 (1×10 ⁻⁹)			TC2 (1×10 ⁻¹⁰)		
F	TC3 (1×10 ⁻³)			TC3 (1×10 ⁻⁴)			TC3 (1×10 ⁻⁵)			TC3 (1×10 ⁻⁶)		
G	TC3 (1×10 ⁻⁷)			TC3 (1×10 ⁻⁸)			TC3 (1×10 ⁻⁹)			TC3 (1×10 ⁻¹⁰)		
H	NE (IC ₅₀)			NE (1×10 ^{-4,5})			E2 (IC ₅₀)			E2 (1×10 ⁻⁷)		

I dette eksempel er den svage binder norethinodrel (NE)

Gennemførelse af kompetitivt bindingsassay

38. Som vist i tabel 6 tilsættes 80 µl kontrolkultur med opløsningsmiddel, bufferkontrol, referenceøstrogen, svag binder, ikke-binder og testkemikalier fremstillet i assaybuffer til brøndene. Herefter tilsættes 40 µl af en 4 nM [³H]-17β-østradiolopløsning til hver enkelt brønd. Efter en let rotation i 10-15 minutter ved 2-8 °C tilsættes 40 µl hrERα-opløsning. Assaymikrotiterpladerne inkuberes ved 2-8 °C i 16-20 timer og anbringes på en rotator i inkubationsperioden.

Tabel 6: Mængde af assaykomponenter til kompetitivt bindingsassay med hrER, mikrotiterplader

Mængde (µl)	Indholdsstof
80	Umærket 17β-østradiol, norethinodrel, OTES, testkemikalier, opløsningsmiddel eller buffer
40	4 nM [³ H]-17β-østradiolopløsning
40	hrERα-opløsning, koncentration som bestemt
160	Samlet mængde i hver assaybrønd

39. Kvantificeringen af [³H]-17β-østradiol bundet til hrERα efter separation af [³H]-17β-østradiol bundet til hrERα fra fri [³H]-17β-østradiol ved at tilsætte 80 µl kold DCC-

suspension til hver brønd bør herefter udføres som beskrevet i punkt 20-23 for mætningsbindingsassayet.

40. Brønd H1-6 (identificeret som blindprøve (til varm) i tabel 4) repræsenterer dpms i [³H]-mærket østradiol i 40 µl. Delprøven på 40 µl hældes direkte i scintillationsvæsken i brønd H1-H6.

Acceptkriterier

Mætningsbindingsassay

41. Den specifikke bindingskurve bør nå et plateau i takt med anvendelsen af stigende koncentrationer af [³H]-17β-østradiol, hvilket viser mætningen af hrERα med ligand.
42. Den specifikke binding ved 1 nM [³H]-17β-østradiol bør ligge inden for det acceptable område på 15-25 % af den gennemsnitlige målte samlede radioaktivitet, der tilsættes på tværs af analyseserier. Lejlighedsvis ligger udsving uden for dette område er acceptable, men hvis analyseserier konsekvent ligger uden for dette område, eller en særlig analyse serie ligger væsentligt uden for dette område, bør proteinkoncentrationen justeres, og mætningsassayet gentages.
43. Dataene bør generere et lineært Scatchard-plot.
44. Den ikke-specifikke binding bør ikke være uforholdsmæssigt stor. Værdien for den ikke-specifikke binding bør typisk være < 35 % af den totale binding. Forholdet kan dog undertiden overstige denne grænse ved måling af en meget lav dpm for den laveste testede koncentration af radioaktivt mærket 17β-østradiol.

Kompetitiv bindingsassay

45. Stigende koncentrationer af umærket 17β-østradiol bør fortrænge [³H]-17β-østradiol fra receptoren på en måde, der stemmer overens med en kompetitiv binding ét sted.
46. IC₅₀-værdien for referenceøstroget (dvs. 17β-østradiol) bør omtrent svare til den molære koncentration af [³H]-17β-østradiol plus den K_d, der er bestemt ud fra mætningsbindingsassayet.
47. Den samlede specifikke binding bør til stadighed ligge inden for det acceptable område på 20 ± 5 %, når den gennemsnitlige målte koncentration af den samlede radioaktivitet, som tilsættes til hver brønd, var 1 nM på tværs af analyseserier. Lejlighedsvis ligger udsving uden for dette område er acceptable, men hvis analyseserier konsekvent ligger uden for dette område, eller en særlig analyse serie ligger væsentligt uden for området, bør proteinkoncentrationen justeres.
48. Opløsningsmidlet bør ikke ændre assayets følsomhed eller reproducerbarhed. Resultaterne af kontrolkulturen med opløsningsmiddel (TB-brønde) sammenlignes med bufferkontrollen for at kontrollere, at det anvendte opløsningsmiddel ikke påvirker assaysystemet.

Resultaterne af TB og bufferkontrol bør være sammenlignelige, hvis opløsningsmidlet ikke påvirker assayet.

49. Ikke-binderen bør ikke fortrænge mere end 25 % af [^3H]-17 β -østradiol fra hrER α ved test op til 10^{-3} M (OTES) eller 10^{-4} M (DBP).
50. Der blev udviklet ydeevnekriterier for referenceøstrogen og to svage bindere (f.eks. norethynodrel, norethindron) ved hjælp af data fra valideringsundersøgelsen af FW hrER-bindingssassayet (bilag N i reference 2). Der er anført 95 %-konfidensintervaller for den gennemsnitlige (n) +/- standardafvigelse for alle kontrolanalyserier på tværs af de laboratorier, der deltog i valideringsundersøgelsen. Der blev beregnet 95 %-konfidensintervaller for de kurvetilpassede parametre (dvs. top, bund, Hills kurve, logIC $_{50}$) for referenceøstrogen og svage bindere og for log $_{10}$ RBA af de svage bindere i forhold til referenceøstrogen, og de angives som ydeevnekriterier for positive kontroller. Tabel 1 viser forventede intervaller for kurvetilpassede parametre, der kan benyttes som ydeevnekriterier. I praksis kan området for IC $_{50}$ variere lidt baseret på Kd af receptorpræparatet og ligandkoncentrationen.
51. Der blev ikke udviklet ydeevnekriterier for kurvetilpassede parametre til testkemikalier på grund af den brede vifte af eksisterende potentielle testkemikalier og variation i potentielle affiniteter og udfald (f.eks. fuld kurve, delkurve, ingen kurvetilpasning). Der bør dog anlægges en faglig vurdering ved gennemgang af resultater fra hver analyserie for et testkemikalie. Der skal benyttes et tilstrækkeligt koncentrationsområde for testkemikaliets for klart at definere toppen (f.eks. 90-100 % af bindingen) af den kompetitive kurve. Variabiliteten mellem replikater ved hver koncentration af testkemikaliets samt mellem de tre ikke-sideløbende analyserier skal være rimelig og videnskabeligt forsvarlig. Kontroller fra hver analyserie for et testkemikalie skal tilnærmes resultatmålinger rapporteret for dette FW-assay og skal stemme overens med tidligere kontrolldata fra de respektive laboratorier.

ANALYSE AF DATA

Mætningsbindingsassay

52. Der måles både samlet og ikke-specifik binding. På grundlag af disse værdier beregnes specifik binding af stigende koncentrationer af [^3H]-17 β -østradiol under ligevægtsbetingelser ved fratrækning af ikke-specifik binding fra samlet binding. En graf over specifik binding i forhold til [^3H]-17 β -østradiolkoncentration bør nå et plateau for maksimal specifik binding som tegn på mætning af hrER α med [^3H]-17 β -østradiol. Endvidere bør analyse af data dokumentere bindingen af [^3H]-17 β -østradiol til et enkelt bindingssted med høj affinitet. Ikke-specifik, samlet og specifik binding bør vises på en mætningsbindingskurve. Ved yderligere analyse af disse data bør der benyttes en ikke-lineær regressionsanalyse (f.eks. BioSoft, McPherson, 1985; Motulsky, 1995) med en endelig visning af data som et Scatchard-plot.

53. Dataanalysen skal bestemme Bmax og Kd på grundlag af de totale bindingsdata alene ud fra den antagelse, at ikke-specifik binding er lineær, medmindre der gives en begrundelse for at benytte en anden metode. Der bør desuden benyttes en robust regression ved bestemmelse af den bedste tilpasning, medmindre der gives en begrundelse. Den valgte metode til robust regression skal anføres. Der bør altid korrigeres for liganddepletering (f.eks. ved hjælp af Swillens metode, 1995) ved bestemmelse af Bmax og Kd ud fra mætningsbindingsdata.

Kompetitivt bindingsassay

54. Den kompetitive bindingskurve plottes som specifik [^3H]-17 β -østradiolbinding mod konkurrentens koncentration (log10-enheder). Den koncentration af testkemikaliyet, der inhiberer 50 % af den maksimale specifikke [^3H]-17 β -østradiolbinding, er IC₅₀-værdien.
55. Skøn over log(IC₅₀)-værdier for de positive kontroller (f.eks. referenceøstrogen og svag binder) bestemmes ved anvendelse af en passende ikke-lineær kurvetilpasningssoftware, som passer til en Hill-ligning med fire parametre (f.eks. BioSoft, McPherson, 1985; Motulsky, 1995). Top, bund, hældning og log(IC₅₀) skal normalt være frie ved tilpasning af disse kurver. Der bør benyttes robust regression ved bestemmelse af den bedste tilpasning, medmindre der gives en begrundelse. Der bør ikke korrigeres for liganddepletion. Efter den indledende analyse skal hver bindingskurve revideres for at sikre, at den passer til modellen. Den relative affinitet (RBA) for den svage binder beregnes som en procentdel af log (IC₅₀) for den svage binder i forhold til log (IC₅₀) for 17 β -østradiol. Resultaterne fra de positive kontroller og ikke-binderkontrollen bør vurderes ved hjælp af målinger af assayets ydeevne i punkt 45-50 i dette tillæg 2.
56. Data for alle testkemikalier analyseres gennem en trinvis tilgang for at sikre, at dataene analyseres indgående, og at hver kompetitiv bindingskurve klassificeres korrekt. Det anbefales, at hver analyseserie for et testkemikalie indledningsvis gennemgår en standardiseret dataanalyse, som er identisk med den, der benyttes for referenceøstrogen og kontroller for svag binder (jf. punkt 55 ovenfor). Når analysen er færdig, foretages en teknisk gennemgang af kurvetilpasningsparametrene samt en visuel gennemgang af, hvor godt dataene passer til den genererede kompetitive bindingskurve for hver analyseserie. Under denne tekniske gennemgang er observationer af et koncentrationsafhængigt fald i den procentvise specifikt bundne [^3H]-17 β -østradiol, lave variabilitet mellem de tekniske replikater ved hver kemisk koncentration og konsistens i tilpassede parametre mellem de tre analyseserier et godt tegn på, at assayet og dataanalyserne blev gennemført korrekt.

Fortolkning af data

57. Forudsat at alle acceptkriterier er opfyldt, anses et testkemikalie for at være en binder for hrER α , hvis der kan tilpasses en bindingskurve, og det laveste punkt på responskurven inden for dataområdet er under 50 % (figur 1).

58. Såfremt alle acceptkriterier er opfyldt, anses et testkemikalie for at være en ikke-binder for hrER α , hvis:

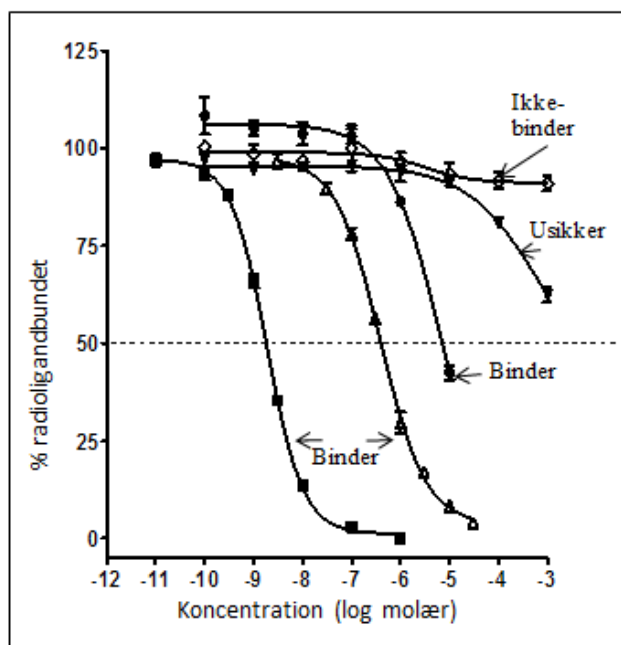
- der kan tilpasses en bindingskurve, og det laveste punkt på den tilpassede responskurve inden for dataområdet ligger over 75 %, eller
- der ikke kan tilpasses en bindingskurve, og den laveste ikke-udjævnede, gennemsnitlige, procentvise binding blandt koncentrationsgrupperne i dataene ligger over 75 %.

59. Testkemikalierne anses for usikre, hvis ingen af de ovennævnte betingelser er opfyldt (f.eks. det laveste punkt på den tilpassede responskurve ligger mellem 76 og 51 %).

Tabel 7: Kriterier for klassificering på grundlag af et testkemikalies kompetitive bindingskurve.

Klassificering	Kriterier
Binder ^a	En bindingskurve kan tilpasses. Det laveste punkt på responskurven inden for dataområdet er mindre end 50 % .
Ikke-binder ^b	Hvis en bindingskurve kan tilpasses, er det laveste punkt på den tilpassede responskurve inden for dataområdet over 75 % . Hvis en bindingskurve ikke kan tilpasses, er den laveste ikke-udjævnede, gennemsnitlige, procentvise binding blandt koncentrationsgrupperne i dataene over 75 % .
Usikker ^c	Enhver testbar analyseserie, som hverken er en binder eller en ikke-binder (f.eks. Det laveste punkt på den tilpassede responskurve er mellem 76 og 51 %).

Figur 1: Eksempler på klassificering af testkemikalier ved anvendelse af kompetitiv bindingskurve.



60. Flere analyseserier for et testkemikalie, der gennemføres i et laboratorium, kombineres ved at tildele hver analyseserie en numerisk værdi og beregne gennemsnittet på tværs af analyseserierne som vist i tabel 8. Resultater for de kombinerede analyseserier i hvert laboratorium sammenlignes med den forventede klassificering for hvert testkemikalie.

Tabel 8: Metode til klassificering af testkemikalier ved anvendelse af flere analyseserier i et laboratorium

Tildeling af værdi til hver analyseserie:	
Klassificering	Numerisk værdi
Binder	2
Usikker	1
Ikke-binder	0
Klassificering af gennemsnitlig numerisk værdi på tværs af analyseserier:	
Klassificering	Numerisk værdi
Binder	Gennemsnit $\geq 1,5$
Usikker	$0,5 \leq \text{Gennemsnit} < 1,5$
Ikke-binder	Gennemsnit $< 0,5$

TESTRAPPORT

61. Jf. punkt 24 i "**hrER-BINDINGSASSAYETS KOMPONENTER**" i denne forsøgsmetode.

Tillæg 2.1

TERMINOLOGI

[³H]E₂: 17 β -østradiol radioaktivt mærket med tritium

DCC: dextranovertrukket trækul

E₂: umærket 17 β -østradiol (inert)

Assaybuffer: 10 mM tris, 10 mg bovint serumalbumin/ml, 2 mM DTT, 10 % glycerol, 0,2 mM leupeptin, pH 7,5

hrER α : human rekombinant østrogenreceptor alfa (ligandbindingsområde)

Replikat: en af flere brønde, der har samme indhold ved de samme koncentrationer, og som analyseres sideløbende inden for én analyseserie. I denne protokol testes hver koncentration af testkemikallet in triplo, dvs. at der er tre replikater, som analyseres samtidig ved hver koncentration af testkemikallet.

Analyseserie: et fuldstændigt sæt assaybrønde på mikrotiterplade, der kører sideløbende, og som giver alle nødvendige oplysninger til at karakterisere bindingen af et testkemikalie til hrER α (nemlig samlet [³H]-17 β -østradiol tilsat til assaybrønden, maksimal binding af [³H]-17 β -østradiol til hrER α , ikke-specifik binding og total binding ved forskellige koncentrationer af testkemikallet). En analyseserie kan bestå af så lidt som én assaybrønd (dvs. replikat) pr. koncentration, men eftersom denne protokol kræver tredobbelt analyse, består én analyseserie af tre assaybrønde pr. koncentration. Endvidere kræver denne protokol tre uafhængige (dvs. ikke-sideløbende) analyseserier pr. kemikalie.

Tillæg 2.2

TYPISK [³H]-17B-ØSTRADIOLMÆTNINGSASSAY MED TRE REPLIKATBRØNDE

Typisk [³ H]-17β-østradiolmætningsassay med tre replikatbrønde												
Placering	Replikat	Kode for brøndtype	Varm E2 Begyndelseskonzentration (nM)	Varm E2 Volumen (μl)	Varm E2 Slutkoncentration (nM)	Kold E2 Begyndelseskonzentration (nM)	Kold E2 Volumen (μl)	Kold E2 Slutkoncentration (uM)	Buffervolumen (μl)	Receptorvolumen (μl)	Samlet volumen i brøndene	
A1	1	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160	
A2	2	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160	
A3	3	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160	
A4	1	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160	
A5	2	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160	
A6	3	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160	
A7	1	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160	
A8	2	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160	
A9	3	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160	
A10	1	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160	
A11	2	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160	
A12	3	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160	
B1	1	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160	
B2	2	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160	
B3	3	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160	
B4	1	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160	
B5	2	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160	
B6	3	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160	
B7	1	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160	
B8	2	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160	
B9	3	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160	
B10	1	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160	
B11	2	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160	
B12	3	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160	
D1	1	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160	
D2	2	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160	
D3	3	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160	
D4	1	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160	
D5	2	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160	
D6	3	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160	
D7	1	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160	
D8	2	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160	
D9	3	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160	
D10	1	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160	
D11	2	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160	
D12	3	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160	

Typisk [3H]-17β-østradiolmætningsassay med tre replikatbrønde											
Placering	Replikat	Kode for brøndtype	Varm E2 Begyndelseskonecentration (nM)	Varm E2 Volumen (μl)	Varm E2 Slutkoncentration (nM)	Kold E2 Begyndelseskonecentration (μM)	Kold E2 Volumen (μl)	Kold E2 Slutkoncentration (μM)	Buffervolumen (μl)	Receptorvolumen (μl)	Samlet volumen i brøndene
E1	1	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E2	2	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E3	3	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E4	1	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E5	2	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E6	3	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E7	1	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E8	2	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E9	3	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E10	1	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E11	2	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E12	3	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
G1	1	Varm	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G2	2	Varm	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G3	3	Varm	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G4	1	Varm	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G5	2	Varm	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G6	3	Varm	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G7	1	Varm	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G8	2	Varm	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G9	3	Varm	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G10	1	Varm	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G11	2	Varm	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G12	3	Varm	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
H1	1	Varm	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H2	2	Varm	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H3	3	Varm	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H4	1	Varm	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H5	2	Varm	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H6	3	Varm	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H7	1	Varm	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H8	2	Varm	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H9	3	Varm	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H10	1	Varm	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H11	2	Varm	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H12	3	Varm	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40

Bemærk, at de "varme" brønde er tomme under inkubation. De 40 μl tilsættes kun til scintillationstælling.

Tillæg 2.3: Kompetitivt bindingsassay: brøndlayout

Plade	Placering	Replik	Brøndtype	Brøndkode	Koncentrationskode	Konkurrent Begyndelseskoncentration (M)	hrER-stamkultur (µl)	Buffervolumen (µl)	Sporstof (varm E2) Volumen (µl)	Volumen fra fortyndingsplade (µl)	Slutvolumen (µl)	Konkurrent Slutkoncentration (M)
S	A1	1	total binding	TB	TB1	-	40		40	80	160	-
S	A2	2	total binding	TB	TB2	-	40		40	80	160	-
S	A3	3	total binding	TB	TB3	-	40		40	80	160	-
S	A4	1	total binding	TB	TB4	-	40		40	80	160	-
S	A5	2	total binding	TB	TB5	-	40		40	80	160	-
S	A6	3	total binding	TB	TB6	-	40		40	80	160	-
S	A7	1	kold E2 (høj)	NSB	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	A8	2	kold E2 (høj)	NSB	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	A9	3	kold E2 (høj)	NSB	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	A10	1	kold E2 (høj)	NSB	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	A11	2	kold E2 (høj)	NSB	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	A12	3	kold E2 (høj)	NSB	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	B1	1	kold E2	S	S1	2.00E-07	40	-	40	80	160	1.0E-07
S	B2	2	kold E2	S	S1	2.00E-07	40	-	40	80	160	1.0E-07
S	B3	3	kold E2	S	S1	2.00E-07	40	-	40	80	160	1.0E-07
S	B4	1	kold E2	S	S2	2.00E-08	40	-	40	80	160	1.0E-08
S	B5	2	kold E2	S	S2	2.00E-08	40	-	40	80	160	1.0E-08
S	B6	3	kold E2	S	S2	2.00E-08	40	-	40	80	160	1.0E-08
S	B7	1	kold E2	S	S3	6.00E-09	40	-	40	80	160	3.0E-09
S	B8	2	kold E2	S	S3	6.00E-09	40	-	40	80	160	3.0E-09
S	B9	3	kold E2	S	S3	6.00E-09	40	-	40	80	160	3.0E-09
S	B10	1	kold E2	S	S4	2.00E-09	40	-	40	80	160	1.0E-09
S	B11	2	kold E2	S	S4	2.00E-09	40	-	40	80	160	1.0E-09
S	B12	3	kold E2	S	S4	2.00E-09	40	-	40	80	160	1.0E-09
S	C1	1	kold E2	S	S5	6.00E-10	40	-	40	80	160	3.0E-10
S	C2	2	kold E2	S	S5	6.00E-10	40	-	40	80	160	3.0E-10
S	C3	3	kold E2	S	S5	6.00E-10	40	-	40	80	160	3.0E-10
S	C4	1	kold E2	S	S6	2.00E-10	40	-	40	80	160	1.0E-10
S	C5	2	kold E2	S	S6	2.00E-10	40	-	40	80	160	1.0E-10
S	C6	3	kold E2	S	S6	2.00E-10	40	-	40	80	160	1.0E-10
S	C7	1	kold E2	S	S7	2.00E-11	40	-	40	80	160	1.0E-11
S	C8	2	kold E2	S	S7	2.00E-11	40	-	40	80	160	1.0E-11
S	C9	3	kold E2	S	S7	2.00E-11	40	-	40	80	160	1.0E-11
S	C10	1	blindprøve	blindprøve	B1	-	-	160	-	-	160	-
S	C11	2	blindprøve	blindprøve	B2	-	-	160	-	-	160	-
S	C12	3	blindprøve	blindprøve	B3	-	-	160	-	-	160	-
S	D1	1	norethynodrel	NE	WP1	6.00E-05	40	-	40	80	160	3.0E-05
S	D2	1	norethynodrel	NE	WP1	6.00E-05	40	-	40	80	160	3.0E-05
S	D3	1	norethynodrel	NE	WP1	6.00E-05	40	-	40	80	160	3.0E-05
S	D4	1	norethynodrel	NE	WP2	2.00E-05	40	-	40	80	160	1.0E-05
S	D5	1	norethynodrel	NE	WP2	2.00E-05	40	-	40	80	160	1.0E-05
S	D6	1	norethynodrel	NE	WP2	2.00E-05	40	-	40	80	160	1.0E-05
S	D7	1	norethynodrel	NE	WP3	6.00E-06	40	-	40	80	160	3.0E-06
S	D8	1	norethynodrel	NE	WP3	6.00E-06	40	-	40	80	160	3.0E-06
S	D9	1	norethynodrel	NE	WP3	6.00E-06	40	-	40	80	160	3.0E-06
S	D10	1	norethynodrel	NE	WP4	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	D11	1	norethynodrel	NE	WP4	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	D12	1	norethynodrel	NE	WP4	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06

Kompetitivt bindingsassay: brøndlayout												
Plade	Placering	Replikat	Brøndtype	Brøndkode	Koncentrationskode	Konkurrent Begyndelseskoncentration (M)	hrER-stamkultur (µl)	Buffervolumen (µl)	Sporstof (varm E2) Volumen (µl)	Volumen fra fortyndingsplade (µl)	Slutvolumen (µl)	Konkurrent Slutkoncentration (M)
S	E1	1	norethynodrel	NE	WP	6.00E-07-	40		40	80	160	3.0E-07
S	E2	2	norethynodrel	NE	WP	6.00E-07-	40		40	80	160	3.0E-07
S	E3	3	norethynodrel	NE	WP	6.00E-07-	40		40	80	160	3.0E-07
S	E4	1	norethynodrel	NE	WP	2.00E-07-	40		40	80	160	1.0E-07
S	E5	2	norethynodrel	NE	WP	2.00E-07-	40		40	80	160	1.0E-07
S	E6	3	norethynodrel	NE	WP	2.00E-07-	40		40	80	160	1.0E-07
S	E7	1	norethynodrel	NE	WP	6.00E-08-	40	-	40	80	160	3.0E-08
S	E8	2	norethynodrel	NE	WP	6.00E-08-	40	-	40	80	160	3.0E-08
S	E9	3	norethynodrel	NE	WP	6.00E-08-	40	-	40	80	160	3.0E-08
S	E10	1	norethynodrel	NE	WP	6.00E-09-	40	-	40	80	160	3.0E-09
S	E11	2	norethynodrel	NE	WP	6.00E-09-	40	-	40	80	160	3.0E-09
S	E12	3	norethynodrel	NE	WP	6.00E-09-	40	-	40	80	160	3.0E-09
S	F1	1	OTES	N	OTES	2.00E-03	40	-	40	80	160	1.0E-03
S	F2	2	OTES	N	OTES	2.00E-03	40	-	40	80	160	1.0E-03
S	F3	3	OTES	N	OTES	2.00E-03	40	-	40	80	160	1.0E-03
S	F4	1	OTES	N	OTES	2.00E-04	40	-	40	80	160	1.0E-04
S	F5	2	OTES	N	OTES	2.00E-04	40	-	40	80	160	1.0E-04
S	F6	3	OTES	N	OTES	2.00E-04	40	-	40	80	160	1.0E-04
S	F7	1	OTES	N	OTES	2.00E-05	40	-	40	80	160	3.0E-05
S	F8	2	OTES	N	OTES	2.00E-05	40	-	40	80	160	3.0E-05
S	F9	3	OTES	N	OTES	2.00E-05	40	-	40	80	160	3.0E-05
S	F10	1	OTES	N	OTES	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	F11	2	OTES	N	OTES	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	F12	3	OTES	N	OTES	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	G1	1	OTES	N	OTES	2.00E-07	40	-	40	80	160	3.0E-07
S	G2	2	OTES	N	OTES	2.00E-07	40	-	40	80	160	3.0E-07
S	G3	3	OTES	N	OTES	2.00E-07	40	-	40	80	160	3.0E-07
S	G4	1	OTES	N	OTES	2.00E-08	40	-	40	80	160	1.0E-08
S	G5	2	OTES	N	OTES	2.00E-08	40	-	40	80	160	1.0E-08
S	G6	3	OTES	N	OTES	2.00E-08	40	-	40	80	160	1.0E-08
S	G7	1	OTES	N	OTES	2.00E-09	40	-	40	80	160	1.0E-09
S	G8	2	OTES	N	OTES	2.00E-09	40	-	40	80	160	1.0E-09
S	G9	3	OTES	N	OTES	2.00E-09	40	-	40	80	160	1.0E-09
S	G10	1	OTES	N	OTES	2.00E-10	40	-	40	-	160	1.0E-10
S	G11	2	OTES	N	OTES	2.00E-10	40	-	40	-	160	1.0E-10
S	G12	3	OTES	N	OTES	2.00E-10	40	-	40	-	160	1.0E-10
S	H1	1	varm	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H2	1	varm	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H3	1	varm	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H4	1	varm	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H5	1	varm	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H6	1	varm	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H7	1	bufferkontrol	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H8	1	bufferkontrol	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H9	1	bufferkontrol	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H10	1	bufferkontrol	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H11	1	bufferkontrol	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H12	1	bufferkontrol	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-

Bemærk, at de "varme" brønde er tomme under inkubation. De 40 µl tilsættes kun til scintillationstælling.

Kompetitivt bindingsassay: brøndlayout													
Plade	Placering	Replik	Brøndtype	Brøndkode	Koncentrations-kode	Konkurrent Begyndelseskoncentration (M)	hrER-stamkultur (μl)	Buffervolumen (μl)	Sporstof (varm E2) Volumen (μl)	Varmløst volumen fra fortyndingsplade (μl)	Slutvolumen (μl)	Konkurrent Slutkoncentration (M)	
P1	A1	1	total binding	TB	TBB1B1	-	40	-	40	80	160	-	
P1	A2	2	total binding	TB	TB2	-	40	-	40	80	160	-	
P1	A3	3	total binding	TB	TB3	-	40	-	40	80	160	-	
P1	A4	1	total binding	TB	TB4	-	40	-	40	80	160	-	
P1	A5	2	total binding	TB	TB5	-	40	-	40	80	160	-	
P1	A6	3	total binding	TB	TB6	-	40	-	40	80	160	-	
P1	A7	1	kold E2 (høj)	NSB	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06	
P1	A8	2	kold E2 (høj)	NSB	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06	
P1	A9	3	kold E2 (høj)	NSB	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06	
P1	A10	1	kold E2 (høj)	NSB	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06	
P1	A11	2	kold E2 (høj)	NSB	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06	
P1	A12	3	kold E2 (høj)	NSB	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06	
P1	B1	1	Testkemikalie 1	TC1	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03	
P1	B2	2	Testkemikalie 1	TC1	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03	
P1	B3	3	Testkemikalie 1	TC1	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03	
P1	B4	1	Testkemikalie 1	TC1	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04	
P1	B5	2	Testkemikalie 1	TC1	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04	
P1	B6	3	Testkemikalie 1	TC1	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04	
P1	B7	1	Testkemikalie 1	TC1	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05	
P1	B8	2	Testkemikalie 1	TC1	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05	
P1	B9	3	Testkemikalie 1	TC1	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05	
P1	B10	1	Testkemikalie 1	TC1	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06	
P1	B11	2	Testkemikalie 1	TC1	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06	
P1	B12	3	Testkemikalie 1	TC1	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06	
P1	C1	1	Testkemikalie 1	TC1	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07	
P1	C2	2	Testkemikalie 1	TC1	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07	
P1	C3	3	Testkemikalie 1	TC1	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07	
P1	C4	1	Testkemikalie 1	TC1	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08	
P1	C5	2	Testkemikalie 1	TC1	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08	
P1	C6	3	Testkemikalie 1	TC1	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08	
P1	C7	1	Testkemikalie 1	TC1	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09	
P1	C8	2	Testkemikalie 1	TC1	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09	
P1	C9	3	Testkemikalie 1	TC1	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09	
P1	C10	1	Testkemikalie 1	TC1	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10	
P1	C11	2	Testkemikalie 1	TC1	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10	
P1	C12	3	Testkemikalie 1	TC1	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10	
P1	D1	1	Testkemikalie 2	TC2	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03	
P1	D2	2	Testkemikalie 2	TC2	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03	
P1	D3	3	Testkemikalie 2	TC2	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03	
P1	D4	1	Testkemikalie 2	TC2	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04	
P1	D5	2	Testkemikalie 2	TC2	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04	
P1	D6	3	Testkemikalie 2	TC2	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04	
P1	D7	1	Testkemikalie 2	TC2	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05	
P1	D8	2	Testkemikalie 2	TC2	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05	
P1	D9	3	Testkemikalie 2	TC2	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05	
P1	D10	1	Testkemikalie 2	TC2	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06	
P1	D11	2	Testkemikalie 2	TC2	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06	
P1	D12	3	Testkemikalie 2	TC2	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06	
P1	E1	1	Testkemikalie 2	TC2	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07	
P1	E2	2	Testkemikalie 2	TC2	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07	
P1	E3	3	Testkemikalie 2	TC2	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07	

Kompetitivt bindingsassay: brøndlayout												
Plade	Placering	Replik	Brøndtype	Brøndkode	Koncentrations- kode	Konkurrent Begyndelseskonc entration (M)	hrER- stamkultur (μ l)	Buffervolumen (μ l)	Sporstof (varm E2) Volumen (μ l)	Volumen fra fortyndingsplade (μ l)	Slutvolumen (μ l)	Konkurrent Slutkoncentratio n (M)
P1	E4	1	Testkemikalie 2	TC2	6	-	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	E5	2	Testkemikalie 2	TC2	6	-	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	E6	3	Testkemikalie 2	TC2	6	-	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	E7	1	Testkemikalie 2	TC2	7	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	E8	2	Testkemikalie 2	TC2	7	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	E9	3	Testkemikalie 2	TC2	7	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	E10	1	Testkemikalie 2	TC2	8	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	E11	2	Testkemikalie 2	TC2	8	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	E12	3	Testkemikalie 2	TC2	8	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	F1	1	Testkemikalie 3	TC3	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	F2	2	Testkemikalie 3	TC3	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	F3	3	Testkemikalie 3	TC3	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	F4	1	Testkemikalie 3	TC3	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	F5	2	Testkemikalie 3	TC3	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	F6	3	Testkemikalie 3	TC3	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	F7	1	Testkemikalie 3	TC3	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	F8	2	Testkemikalie 3	TC3	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	F9	3	Testkemikalie 3	TC3	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	F10	1	Testkemikalie 3	TC3	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	F11	2	Testkemikalie 3	TC3	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	F12	3	Testkemikalie 3	TC3	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	G1	1	Testkemikalie 3	TC3	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	G2	2	Testkemikalie 3	TC3	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	G3	3	Testkemikalie 3	TC3	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	G4	1	Testkemikalie 3	TC3	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	G5	2	Testkemikalie 3	TC3	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	G6	3	Testkemikalie 3	TC3	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	G7	1	Testkemikalie 3	TC3	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	G8	2	Testkemikalie 3	TC3	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	G9	3	Testkemikalie 3	TC3	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	G10	1	Testkemikalie 3	TC3	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	G11	2	Testkemikalie 3	TC3	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	G12	3	Testkemikalie 3	TC3	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	H1	1	norethynodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H2	2	norethynodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H3	3	norethynodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H4	1	norethynodrel	NE		1.00E-4.5	40	0	40	80	160	
P1	H5	2	norethynodrel	NE		1.00E-4.5	40	0	40	80	160	
P1	H6	3	norethynodrel	NE		1.00E-4.5	40	0	40	80	160	
P1	H7	1	kold E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H8	2	kold E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H9	3	kold E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H10	1	kold E2 S			1.00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H11	2	kold E2 S			1.00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H12	3	kold E2 S			1.00E-7	40	0	40	80	160	

Tillæg 3

CHEMICAL EVALUATION AND RESEARCH INSTITUTE'S (CERI) IN VITRO-ASSAY VEDRØRENDE ØSTROGENRECEPTORBINDING VED ANVENDELSE AF ET LIGANDBINDINGSDOMÆNE AF HUMANT REKOMBINANT ERA-PROTEIN

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER (JF. OGSÅ GENEREL INDLEDNING)

1. Dette in vitro-assay vedrørende østrogenreceptor(ER α)-mætning og kompetitiv binding anvender et ligandbindingsdomæne (LBD) af humant ER α (hrER α). Denne proteinmodel blev produceret af Chemicals Evaluation Research Institute (CERI), Japan og findes som et glutathion-S-transferase (GST) fusionsprotein og udtrykkes i *E. coli*. CERI-protokollen gennemgik en international valideringsundersøgelse (2) i flere laboratorier, der har påvist dens relevans og pålidelighed i forbindelse med assayets tilsigtede formål.
2. Assayet er en screeningsprocedure til påvisning af stoffer, der kan binde sig til hrER α . Det bruges til at bestemme et testkemikalies evne til at konkurrere med 17 β -østradiol om binding til hrER α -LBD. Kvantitative assayresultater kan omfatte IC₅₀ (et mål for den koncentration af testkemikaliets, der er nødvendig for at fortrænge halvdelen af [³H]-17 β -østradiol fra hrER α), og testkemikalierne relative affiniteter for hrER α sammenlignet med 17 β -østradiol. Til kemikaliescreeningsformål kan acceptable kvalitative assayresultater omfatte klassificeringer af testkemikalier som enten hrER α -bindere, ikke-bindere eller usikre baseret på kriterier beskrevet for bindingskurver.
3. Assayet anvender en radioaktivt mærket ligand, som kræver, at laboratoriet har licens til radioaktive materialer. Alle procedurer med radioisotoper og farlige kemikalier skal følge forskrifter og procedurer som beskrevet i national lovgivning.
4. Afsnittene "GENEREL INDLEDNING" og "hrER-BINDINGSASSAYETS KOMPONENTER" skal læses, før dette assay benyttes til lovmæssige formål. Definitioner og forkortelser, der benyttes i denne testvejledning, er beskrevet i tillæg 1.

PRINCIPPER FOR ASSAYET (JF. OGSÅ GENEREL INDLEDNING)

5. hrER α -bindingsassayet måler en radioaktivt mærket ligands ([³H]17 β -østradiol) evne til at binde sig til ER under tilstedeværelse af stigende koncentrationer af et testkemikalie (dvs. konkurrent). Testkemikalier, som har en høj ER-affinitet, konkurrerer med den radioaktivt mærkede ligand ved en lavere koncentration sammenlignet med kemikalier med lavere affinitet for receptoren.
6. Dette assay består af to vigtige komponenter: et mætningsbindingsforsøg for at karakterisere parametrene for interaktion mellem receptor og ligand efterfulgt af et forsøg med kompetitiv binding, der karakteriserer konkurrencen mellem et testkemikalie og en radioaktivt mærket ligand for binding til ER.

7. Formålet med mætningsbindingsforsøget er at karakterisere en særlig batch af receptorer for affinitet og antal i forberedelsen af det kompetitive bindingsforsøg. Mætningsbindingsforsøget måler, under ligevægtsbetingelser, en fast østrogenreceptorkoncentrations affinitet for dens naturlige ligand (repræsenteret ved dissociationskonstanten, K_d) og koncentrationen af aktive receptorsteder (B_{max}).
8. Det kompetitive bindingsforsøg måler et stofs affinitet til at konkurrere med [^3H]17 β -østradiol med hensyn til binding til ER. Affiniteten kvantificeres af koncentrationen af testkemikaliet, som under ligevægtsbetingelser inhiberer 50 % af den specifikke binding af [^3H]17 β -østradiol (kaldet den "inhiberende koncentration på 50 %" eller IC_{50}). Denne kan også vurderes ved hjælp af den relative affinitet (RBA, i forhold til IC_{50} af østradiol målt separat i den samme analyseserie). Det kompetitive bindingsforsøg måler bindingen af [^3H]17 β -østradiol ved en fast koncentration under tilstedeværelse af en bred vifte (otte størrelsesordener) af testkemikaliekoncentrationer. Dataene tilpasses herefter, hvor det er muligt, så de danner Hill-ligningen (Hill, 1910), der beskriver en kompetitiv binders fortrængning af den radioaktive ligand ét sted. Omfanget af fortrængningen af det radioaktivt mærkede østradiol ved ligevægt anvendes til at karakterisere testkemikaliet som en binder, ikke-binder eller som et kemikalie, der genererer en usikker respons.

FREMGANGSMÅDE

Påvisning af acceptabel ydeevne for hrER α -protein

9. Før der rutinemæssigt udføres mætningsassays og kompetitive bindingsassays, skal det påvises, at hver ny batch hrER α fungerer korrekt i det laboratorium, hvor det vil blive anvendt. Ydeevnen påvises gennem en tottrinsproces. Det drejer sig om følgende trin:
 - Der udføres et [^3H]-17 β -østradiol-mætnings- og bindingsassay for at påvise hrER α -specificitet og mætning. Ikke-lineær regressionsanalyse af disse data (f.eks. BioSoft, McPherson, 1985; Motulsky, 1995) og det efterfølgende Scatchard-plot bør dokumentere hrER α -affiniteten for [^3H]-17 β -østradiol (K_d) og antallet af receptorer (B_{max}) for en bestemt batch hrER α .
 - Der udføres et kompetitivt bindingsassay ved anvendelse af kontrolstofferne (referenceøstrogen (17 β -østradiol), en svag binder (f.eks. norethynodrel eller norethindron) og en ikke-binder (octyltriethoxysilan, OTES). Hvert laboratorium bør oprette en historisk database for at dokumentere konsistensen af IC_{50} og de relevante værdier for referenceøstrogenet og den svage binder blandt forsøg og forskellige batcher af hrER α . Parametrene for de kompetitive bindingskurver for kontrolstofferne bør desuden ligge inden for de grænser for konfidensintervallet på 95 % (jf. tabel 1), der blev udviklet ved hjælp af data fra laboratorier, som deltog i valideringsundersøgelsen for dette assay (2).

Tabel 1: Ydeevnekriterier udviklet for referenceøstrogen og svage bindere, CERI's hrER-bindingssassay

Stof	Parameter	Gennemsnit ^a	Standard-afvigelse (n)	95 %-konfidensintervaller ^b	
				Nedre grænse	Øvre grænse
17β-østradiol	Top	104,74	13,12 (70)	101,6	107,9
	Bund	0,85	2,41 (70)	0,28	1,43
	Hills kurve	-1,22	0,20 (70)	-1,27	-1,17
	LogIC ₅₀	-8,93	0,23 (70)	-8,98	-8,87
Norethynodrel	Top	101,31	10,55 (68)	98,76	103,90
	Bund	2,39	5,01 (68)	1,18	3,60
	Hills kurve	-1,04	0,21 (68)	-1,09	-0,99
	LogIC ₅₀	-6,19	0,40 (68)	-6,29	-6,10
Norethindron^c	Top	92,27	7,79 (23)	88,90	95,63
	Bund	16,52	10,59 (23)	11,94	21,10
	Hills kurve	-1,18	0,32 (23)	-1,31	-1,04
	LogIC ₅₀	-6,01	0,54 (23)	-6,25	-5,78

^a Gennemsnit ± standardafvigelse med prøvestørrelse (n) blev beregnet ved hjælp af kurvetilpassede skøn (Hill-ligning med fire parametre) til kontrolanalyseserier udført i fire laboratorier under valideringsundersøgelsen (jf. bilag N i reference 2).

^b 95 % konfidens anføres som en rettesnor for acceptkriterier.

^c Testning af norethindron var valgfri for delopgave 4 under valideringsundersøgelsen (jf. reference 2, delopgave 4). Således blev gennemsnittet ± standardafvigelse (n) beregnet ved hjælp af kurvetilpassede skøn (Hill-ligning med fire parametre) for kontrolanalyseserier udført i to laboratorier.

Intervaller for IC₅₀ vil afhænge af K_d af receptorpræparatet og koncentrationen af den radioaktivt mærkede ligand, som anvendes i det enkelte laboratorium. En passende justering af IC₅₀-intervallet baseret på betingelserne for udførelse af assayet vil være acceptabel.

Påvisning af laboratoriets kompetence

10. Jf. punkt 17 og 18 og tabel 2 i afsnittet "**hrER-BINDINGSASSAYETS KOMPONENTER**" i denne forsøgsmetode. Hvert assay (mætning og kompetitiv binding) bør bestå af tre uafhængige analyseserier (dvs. friske fortyndinger af receptor, kemikalier og reagenser) på forskellige dage, og hver analyseserie bør indeholde tre replikater.

Bestemmelse af receptor(hrERα)koncentration

11. Den aktive receptorkoncentration varierer lidt efter batch og opbevaringsforhold. Af denne grund bør den koncentration af aktiv receptor, der modtages fra leverandøren, bestemmes. Dette vil give den rette koncentration af aktiv receptor på tidspunktet for analyseserien.
12. Under forhold svarende til kompetitiv binding (dvs. 0,5 nM [³H]-østradiol) bør nominelle koncentrationer på 0,1, 0,2, 0,4 og 0,6 nM receptor inkuberes i fravær af (total binding) og under tilstedeværelse (ikke-specifik binding) af 1 μM umærket østradiol. Specifik binding beregnet som forskellen mellem total og ikke-specifik binding afsættes i forhold til den nominelle receptorkoncentration. Den receptorkoncentration, som giver specifikke

bindingsværdier svarende til 40 % af de tilsatte radioaktivt mærkede stoffer, hænger sammen med den tilsvarende receptorkoncentration, og denne receptorkoncentration anvendes til mætningsforsøg og kompetitive bindingsforsøg. En slutkoncentration for hrER på 0,2 nM vil ofte opfylde denne betingelse.

13. Hvis 40 %-kriteriet gentagne gange ikke kan opfyldes, kontrolleres forsøgs-setuppet for potentielle fejl. Hvis 40 %-kriteriet ikke opfyldes, kan det tyde på, at der er meget lidt aktiv receptor i rekombinantbatchen, og det bør overvejes at anvende en anden receptorbatch.

Mætningsassay

14. Otte stigende koncentrationer af [^3H]-17 β -østradiol vurderes in triplo under følgende tre betingelser (jf. tabel 2):

- a. i fravær af umærket 17 β -østradiol og under tilstedeværelse af ER Dette er den kvantitative analyse af den totale binding ved måling af radioaktiviteten i de brønde, som kun har [^3H]-17 β -østradiol
- b. under tilstedeværelse af en 2 000-fold uforholdsmæssig koncentration af umærket 17 β -østradiol i forhold til mærket 17 β -østradiol og tilstedeværelse af ER. Formålet med denne betingelse er at mætte de aktive bindingssteder med umærket 17 β -østradiol og, ved at måle radioaktiviteten i brøndene, bestemme den ikke-specifikke binding. Eventuelt tilbageværende varmt østradiol, som kan binde sig til receptoren, anses for at kunne binde sig til et ikke-specifikt sted, da koldt østradiol bør have en så høj koncentration, at det binder sig til alle tilgængelige specifikke steder på receptoren
- c. i fravær af umærket 17 β -østradiol og af ER (bestemmelse af samlet radioaktivitet).

Fremstilling af [^3H]-17 β -østradiol, umærkede 17 β -østradiol-opløsninger og hrER α

15. En 40 nM-opløsning af [^3H]-17 β -østradiol fremstilles af en 1 μM stamopløsning af [^3H]-17 β -østradiol i DMSO ved at tilsætte DMSO (for at fremstille 200 nM) og assaybuffer ved stuetemperatur (for at fremstille 40 nM). Ved hjælp af denne 40 nM-opløsning fremstilles serierne af [^3H]-17 β -østradiolfortyndinger i et område fra 0,313 nM til 40 nM med assaybuffer ved stuetemperatur (som vist i kolonne 12 i tabel 2). Assayets slutkoncentrationer i området fra 0,0313 til 4,0 nM fås ved at tilsætte 10 μl af disse opløsninger til de respektive assaybrønde på en mikrotiterplade med 96 brønde (jf. tabel 2 og 3). Fremstilling af assaybuffer, beregning af den originale stamopløsning af [^3H]-17 β -østradiol baseret på dens specifikke aktivitet, fremstilling af fortyndinger og bestemmelse af koncentrationerne er beskrevet i detaljer i CERI-protokollen (2).
16. Fortyndinger af opløsninger af umærket 17 β -østradiol fremstilles af en stamopløsning af 1 nM 17 β -østradiol ved tilsætning af assaybuffer for at få otte stigende koncentrationer, der indledningsvis ligger fra 0,625 μM til 80 μM . Assayets slutkoncentrationer i området fra 0,0625 til 8 nM fås ved at tilsætte 10 μl af disse opløsninger til de respektive assaybrønde

på en mikrotiterplade med 96 brønde til måling af ikke-specifik binding (jf. tabel 2 og 3). Fremstilling af fortyndinger af umærket 17 β -østradiol er beskrevet i detaljer i CERI-protokollen (2).

17. Den receptorkoncentration, som giver 40 ± 10 % specifik binding, bør anvendes (jf. punkt 12-13). hrER α -opløsningen bør fremstilles med iskold assaybuffer umiddelbart før brug, dvs. efter at alle brønde til total binding, ikke-specifik binding og varm ligand alene er blevet fremstillet.

18. Mikrotiterpladerne med 96 brønde forberedes som illustreret i tabel 2 med 3 replikater pr. [^3H]-17 β -østradiolkoncentration. Volumenfordelingen af [^3H]-17 β -østradiol, umærket 17 β -østradiol, buffer og receptor er anført i tabel 3.

Tabel 2: Layout for en mikrotiterplade til mætningsbindingsassay

	1*	2*	3*	4*	5*	6*	7*	8*	9*	10	11**	12**
	Til måling af TB			Til måling af NSB			Til bestemmelse af varm ligand alene				Umærkede E2-fortyndinger til pladekolonne 4-6.	[^3H]E2-fortyndinger til pladekolonne 1-9.
A	0,0313 nM [^3H] E ₂ + ER			0,0313 nM [^3H] E ₂ + 0,0625 μM E ₂ + ER			0,0313 nM				0,625 μM	0,313 nM
B	0,0625 nM [^3H] E ₂ + ER			0,0625 nM [^3H] E ₂ + 0,125 μM E ₂ + ER			0,0625 nM				1,25 μM	0,625 nM
C	30,125 nM [^3H] E ₂ + ER			0,125 nM [^3H] E ₂ + 0,25 μM E ₂ + ER			0,125 nM				2,5 μM	1,25 nM
D	0,250 nM [^3H] E ₂ + ER			0,250 nM [^3H] E ₂ + 0,5 μM E ₂ + ER			0,250 nM				5 μM	2,5 nM
E	0,50 nM [^3H] E ₂ + ER			0,50 nM [^3H] E ₂ + 1 μM E ₂ + ER			0,50 nM				10 μM	5 nM
F	1,00 nM [^3H] E ₂ + ER			1,00 nM [^3H] E ₂ + 2 μM E ₂ + ER			1,00 nM				20 μM	10 nM
G	2,00 nM [^3H] E ₂ + ER			2,00 nM [^3H] E ₂ + 4 μM E ₂ + ER			2,00 nM				40 μM	20 nM
H	4,00 nM [^3H] E ₂ + ER			4,00 nM [^3H] E ₂ + 8 μM E ₂ + ER			4,00 nM				80 μM	40 nM

TB: total binding

NSB: ikke-specifik binding

[^3H] E₂: [^3H]17 β -østradiol

E2: umærket 17 β -østradiol

*De her angivne koncentrationer er slutkoncentrationer i hver brønd.

**Fortyndingerne af umærket E2 og [^{3} H]E2 kan fremstilles i på anden plade.

Tabel 3: Reagensmængder til mætningsmikrotiterpladen

Kolonnenummer		1	2	3	4	5	6	7*	8*	9*
Fremstillingstrin		TB-brønde			NSB-brønde			Varm ligand alene		
Komponentvolumen til reaktionsbrønde og tilsætningsrækkefølge	Buffer	60 µl			50 µl			90 µl		
	umærket E2 fra kolonne 11 i tabel 2	-			10 µl			-		
	[3H]E2 fra kolonne 12 i tabel 2	10 µl			10 µl			10 µl		
	hrERα	30 µl			30 µl			-		
Samlet reaktionsvolumen		100 µl			100 µl			100 µl		
Inkubation		REAKTION EFTER 2 TIMERS INKUBATION						Kvantificering af radioaktivitet lige efter fremstilling. Ingen inkubation		
Behandling med 0,4 % DCC		Ja			Ja			Nej		
Volumen af 0,4 % DCC		100 µl			100 µl			-		
Filtrering		Ja			Ja			Nej		
MÅLING AF DPMS										
Kvantificeringsvolumen tilsat til scintillationscocktail		100 µl**			100 µl**			50 µl		

* Hvis der anvendes en LSC til mikroplader til måling af dpms, er fremstilling af varm ligand alene på den samme assayplade med TB- og NSB-brønde ikke hensigtsmæssig. Den varme ligand alene bør fremstilles på en anden plade.

** Hvis DCC separeres ved centrifugering, bør de 50 μ l supernatant måles med LSC for at undgå kontaminering af DCC.

19. Assaymikrotiterplader til bestemmelse af total binding og ikke-specifik binding inkuberes ved stuetemperatur (22-28 °C) i to timer.

Måling af [^{3} H]-17 β -østradiol bundet til hrER α

20. Efter inkubationsperioden på to timer bør [^{3} H]-17 β -østradiol bundet til hrER α separeres fra fri [^{3} H]-17 β -østradiol ved tilsætning af 100 μ l iskold 0,4 % DCC-suspension til brøndene. Pladerne anbringes herefter på is i 10 minutter, og reaktionsblandingen og DCC-blandingen filtreres ved overførsel til et mikrotiterpladefilter for at fjerne DCC. 100 μ l af filtratet tilsættes herefter til scintillationsvæsken i LSC-glas til bestemmelse af disintegration pr. minut (dpms) pr. glas ved væskescintillationstælling.
21. Er der ikke adgang til et mikropladefilter, kan DCC fjernes ved centrifugering. 50 μ l supernatant, der indeholder hrER α -bundet [^{3} H]-17 β -østradiol, tages herefter ekstremt

forsigtigt for at undgå enhver kontaminering af brøndene ved kontakt med DCC og anvendes til scintillationstælling.

22. Betingelsen om den varme ligand alene anvendes til bestemmelse af disintegration pr. minut (dpm) af [^3H]-17 β -østradiol tilsat til assaybrøndene. Radioaktiviteten kvantificeres lige efter fremstillingen. Disse brønde bør ikke inkuberes og bør ikke behandles med DCC-suspension, men deres indhold bør hældes direkte i scintillationsvæsken. Disse mål viser, hvor meget [^3H]-17 β -østradiol i dpms der blev tilsat til hvert sæt brønde til den totale binding og ikke-specifikke binding.

Kompetitivt bindingsassay

23. Det kompetitive bindingsassay måler bindingen af en enkelt koncentration af [^3H]-17 β -østradiol under tilstedeværelse af stigende koncentrationer af et testkemikalie. Der bør anvendes tre sideløbende replikater ved hver koncentration inden for én analyseserie. Endvidere bør der udføres tre ikke-sideløbende analyseserier for hvert kemikalie, der testes. Assayet bør opsættes med en eller flere mikrotiterplader med 96 brønde.

Kontroller

24. Ved udførelsen af assayet medtages samtidig opløsningsmiddel og kontroller (dvs. referenceøstrogen, svag binder og ikke-binder) i hvert forsøg. Fuldstændige koncentrationskurver for referenceøstrogen og kontroller (dvs. svag binder og ikke-binder) anvendes på én plade under hver analyseserie. Alle andre plader bør indeholde i) en høj- (maksimal fortrængning dvs. næsten fuld fortrængning af radioaktivt mærket ligand) og medium- (næsten IC₅₀) koncentration med E2 og svag binder in triplo ii) kontrolkultur med opløsningsmiddel og ikke-specifik binding, hver især in triplo. Procedurer for fremstilling af assaybuffer, [^3H]-17 β -østradiol, hrER α og testkemikalieopløsninger er beskrevet i detaljer i CERI-protokollen (2).

Kontrolkultur med opløsningsmiddel

25. Kontrolkulturen med opløsningsmiddel viser, at opløsningsmidlet ikke interagerer med testsystemet og måler også total binding (TB). DMSO er det foretrukne opløsningsmiddel. Såfremt den højeste koncentration af testkemikaliets ikke er opløseligt i DMSO, kan ethanol anvendes. DMSO-koncentrationen i slutassaybrøndene bør ligge på 2,05 % og kan øges op til 2,5 % i tilfælde af testkemikaliets manglende opløselighed. DMSO-koncentrationer over 2,5 % bør ikke anvendes, fordi højere koncentrationer af opløsningsmidlet interfererer med assayet. For testkemikalier, som ikke er opløselige i DMSO, men er opløselige i ethanol, kan der højst anvendes 2 % ethanol i assayet uden interferens.

Bufferkontrol

26. Bufferkontrollen (BC) bør hverken indeholde opløsningsmiddel eller testkemikalie, men alle assayets øvrige komponenter. Resultaterne af bufferkontrollen sammenlignes med opløsningsmiddelkontrollen for at kontrollere, at det anvendte opløsningsmiddel ikke påvirker assaysystemet.

Stærk binder (referenceøstrogen)

27. 17β -østradiol (CAS 50-28-2) er den endogene ligand og binder sig med høj affinitet til ER, undertype α . En standardkurve, som anvender umærket 17β -østradiol, fremstilles til hvert hrER α kompetitivt bindingsassay, så der kan foretages en variabilitetsvurdering ved gennemførelse af assayet over længere tid i det samme laboratorium. Otte opløsninger af umærket 17β -østradiol fremstilles i DMSO og assaybuffer med slutkoncentrationer i assaybrøndene, så de kan bruges til standardkurven med følgende intervaller: 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , $10^{-8,5}$, 10^{-9} , $10^{-9,5}$, 10^{-10} , 10^{-11} M. Den højeste koncentration af umærket 17β -østradiol (1 μ M) bør fungere som indikator for ikke-specifik binding. Denne koncentration er angivet ved mærket "NSB" i tabel 4, selv om den også indgår i standardkurven.

Svag binder

28. En svag binder (norethynodrel (CAS 68-23-5) eller alternativt norethindron (CAS 68-22-4)) bør medtages for at påvise følsomheden af hvert forsøg og for at give mulighed for en vurdering af variabiliteten, når assayet udføres over længere tid. Otte opløsninger af den svage binder fremstilles i DMSO og assaybuffer med slutkoncentrationer i assaybrøndene som følger: $10^{-4,5}$, $10^{-5,5}$, 10^{-6} , $10^{-6,5}$, 10^{-7} , $10^{-7,5}$, 10^{-8} og 10^{-9} M.

Ikke-binder

29. Octyltriethoxysilan (OTES, CAS 2943-75-1) bør anvendes som den negative kontrol (ikke-binder). Det giver sikkerhed for, at der med det udførte assay påvises testkemikalier, som ikke binder sig til hrER α . Otte opløsninger af ikke-binder fremstilles i DMSO og assaybuffer, med slutkoncentrationer i assaybrøndene som følger: 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} M. Di-n-butylphthalat (DBP, CAS 84-72-2) kan anvendes som en alternativ ikke-binder, men kun testet op til 10^{-4} M. Det er påvist, at den maksimale opløselighed af DBP i assayet er 10^{-4} M.

hrER α -koncentration

30. Den mængde receptor, som giver en specifik binding på 40 ± 10 %, bør anvendes (jf. punkt 12-13 i tillæg 3). hrER α -opløsningen bør fremstilles ved fortynding af den funktionelle hrER α i iskold assaybuffer, umiddelbart inden brug.

[^{3} H]- 17β -østradiol

31. Slutkoncentrationen af [^{3} H]- 17β -østradiol i assaybrøndene skal være 0,5 nM.

Testkemikalier

32. I første omgang er det nødvendigt at foretage en opløselighedstest for at fastslå opløselighedsgrænsen for hvert testkemikalie og for at afdække det passende koncentrationsområde, der skal anvendes, når testprotokollen udføres. Opløselighedsgrænsen for hvert testkemikalie skal indledningsvis bestemmes i opløsningsmidlet og herefter yderligere bekræftes under assaybetingelser. Den slutkoncentration, der testes i assayet, bør ikke overstige 1 mM. Områdebestemmelsen omfatter en kontrolkultur med opløsningsmiddel sammen med mindst otte log-

seriefortyndinger, der begynder ved den maksimale acceptable koncentration (f.eks. 1 mM eller lavere, baseret på opløselighedsgrænsen), og idet der noteres tilstedeværelse af uklarhed eller bundfald (jf. også punkt 35 i tillæg 3). Når koncentrationsområdet for testningen er fastlagt, testes et testkemikalie ved anvendelse af otte log-koncentrationer med passende intervaller som defineret i den foregående test til bestemmelse af dosisinterval. Koncentrationer, som testes i det andet og tredje forsøg, bør yderligere tilpasses, hvis det er relevant, for om nødvendigt bedre at kunne karakterisere koncentration/respons-kurven.

33. Fortyndinger af testkemikaliet fremstilles i det relevante opløsningsmiddel (jf. punkt 25 i tillæg 3). Hvis den højeste koncentration af testkemikaliet hverken kan opløses i DMSO eller ethanol, og tilsætning af mere opløsningsmiddel vil medføre, at opløsningsmiddelkoncentrationen i slutrøret bliver større end den acceptable grænse, kan den højeste koncentration reduceres til den næste lavere koncentration. I så fald kan en supplerende koncentration tilsættes i den lave ende af koncentrationsserien. Andre koncentrationer i serien bør forblive uændrede.
34. Testkemikalieopløsningerne bør overvåges nøje, når de tilsættes til assaybrønden, da testkemikaliet kan danne bundfald ved tilsætning til assaybrønden. Data for alle brønde, der indeholder bundfald, bør udelukkes fra kurvetilpasningen, og årsagen til udelukkelsen af data noteres.
35. Hvis der allerede findes oplysninger fra andre kilder, som angiver en log (IC₅₀) for et testkemikalie, kan det være hensigtsmæssigt at sætte en tættere geometrisk afstand mellem fortyndingerne omkring den forventede log(IC₅₀) (dvs. 0,5 log-enheder). Slutresultaterne bør vise nok tilstrækkelig spredning af koncentrationer på begge side af log(IC₅₀), herunder "top" og "bund", således at bindingskurven kan karakteriseres tilstrækkeligt.

Organisering af assaypladen

36. Mærkede mikrotiterplader bør forberedes ved anvendelse af seksdobbelte inkubationer for kontrolkulturen med opløsningsmiddel, den højeste koncentration af referenceøstrogen (E2), der også fungerer som indikator for ikke-specifik binding (NSB), bufferkontrol, de otte koncentrationer af den ikke-bindende kontrol (octyltriethoxysilan), de syv lavere koncentrationer af referenceøstrogen (E2), de otte koncentrationer af den svage binder (norethynodrel eller norethindron) og de otte koncentrationer af hvert testkemikalie (TC). Et layouteksempel på pladelayoutdiagrammet til de fulde koncentrationskurver for referenceøstrogen og kontroller er anført nedenfor i tabel 4. Supplerende mikrotiterplader bruges til testkemikaliet og bør omfatte pladekontroller (dvs. i) en høj- (maksimal fortrængning) og middel- (ca. IC₅₀) koncentration af E2 og svag binder in triplo, ii) kontrolkultur med opløsningsmiddel (som total binding) og ikke-specifik binding, hver især seksdobbelt (tabel 5). Et eksempel på et arbejdsark for layout til en mikrotiterplade til et kompetitivt assay med tre ukendte testkemikalier er anført i tillæg 3.3. De koncentrationer, der er anført på arbejdsarket og i tabel 4 og 5, henviser til de slutkoncentrationer, som er anvendt i hver assaybrønd. Den maksimale koncentration for E2 bør være 1×10^{-7} M, og for

den svage binder bør den højeste anvendte koncentration for den svage binder på plade 1 anvendes. IC₅₀-koncentrationen skal bestemmes af laboratoriet på grundlag af deres historiske kontroldatabase. Forventningen er, at denne værdi vil ligne den, der blev observeret i valideringsundersøgelserne (jf. tabel 1).

Tabel 4: Layout for mikrotiterpladen til et kompetitivt bindingsassay^{1,2}, fulde koncentrationskurver for referenceøstrogen og kontroller (plade 1).

	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>	<i>11</i>	<i>12</i>
	Bufferkontrol og positiv kontrol (E2)			Svagt positiv (norethynodrel)			Negativ kontrol (OTES)			TB og NSB		
<i>A</i>	Blindprøve*			1×10 ⁻⁹ M			1×10 ⁻¹⁰ M			TB (kontrolkultur med opløsningsmiddel) (2,05 % DMSO)		
<i>B</i>	E2 (1×10 ⁻¹¹ M)			1×10 ⁻⁸ M			1×10 ⁻⁹ M					
<i>C</i>	E2 (1×10 ⁻¹⁰ M)			1×10 ^{-7,5} M			1×10 ⁻⁸ M			NSB (10 ⁻⁶ M E2)		
<i>D</i>	E2 (1×10 ^{-9,5} M)			1×10 ⁻⁷ M			1×10 ⁻⁷ M					
<i>E</i>	E2 (1×10 ⁻⁹ M)			1×10 ^{-6,5} M			1×10 ⁻⁶ M			Bufferkontrol		
<i>F</i>	E2 (1×10 ^{-8,5} M)			1×10 ⁻⁶ M			1×10 ⁻⁵ M					
<i>G</i>	E2 (1×10 ⁻⁸ M)			1×10 ^{-5,5} M			1×10 ⁻⁴ M			Blindprøve (til varm)**		
<i>H</i>	E2 (1×10 ⁻⁷ M)			1×10 ^{-4,5} M			1×10 ⁻³ M					

¹ Prøveopstilling for standardmikrotiterpladen, som skal benyttes ved hvert forsøg.

² Bemærk, at denne mikrotiterplade er lavet ved anvendelse af fortyndinger fremstillet på fortyndingspladen, som er beskrevet for standarderne i de foregående afsnit.

I dette eksempel er den svage binder norethinodrel (NE)

* reel blindprøve, brønd ikke benyttet

** blindprøve ikke benyttet under inkubationen, men brugt til at bekræfte den samlede tilsatte radioaktivitet.

Tabel 5: Layout til mikrotiterpladen til et kompetitivt bindingsassay, supplerende plader til testkemikalier (TC) og pladekontroller.

	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>	<i>11</i>	<i>12</i>
	Testkemikalie 1 (TC-1)			Testkemikalie 2 (TC-2)			Testkemikalie 3 (TC-3)			Kontroller		
<i>A</i>	TC-1 (1×10 ⁻¹⁰ M)			TC-2 (1×10 ⁻¹⁰ M)			TC-3 (1×10 ⁻¹⁰ M)			E2 (1×10 ⁻⁷ M)		
<i>B</i>	TC-1 (1×10 ⁻⁹ M)			TC-2 (1×10 ⁻⁹ M)			TC-3 (1×10 ⁻⁹ M)			E ₂ (IC ₅₀)		
<i>C</i>	TC-1 (1×10 ⁻⁸ M)			TC-2 (1×10 ⁻⁸ M)			TC-3 (1×10 ⁻⁸ M)			NE (1×10 ^{-4,5} M)		

D	TC-1 (1×10^{-7} M)	TC-2 (1×10^{-7} M)	TC-3 (1×10^{-7} M)	NE (IC_{50})
E	TC-1 (1×10^{-6} M)	TC-2 (1×10^{-6} M)	TC-3 (1×10^{-6} M)	NSB (10^{-6} M E2)
F	TC-1 (1×10^{-5} M)	TC-2 (1×10^{-5} M)	TC-3 (1×10^{-5} M)	
G	TC-1 (1×10^{-4} M)	TC-2 (1×10^{-4} M)	TC-3 (1×10^{-4} M)	TB (kontrolkultur med opløsningsmiddel)
H	TC-1 (1×10^{-3} M)	TC-2 (1×10^{-3} M)	TC-3 (1×10^{-3} M)	

I dette eksempel er den svage binder norethinodrel (NE)

Gennemførelse af kompetitivt bindingsassay

37. Mens brønde til total binding og blindprøver (til varm) undtages som vist i tabel 6, sættes 50 µl assaybuffer i hver brønd og blandes med 10 µl af kontrolkulturen med opløsningsmiddel, referenceøstrogen (E2), svag binder, ikke-binder og testkemikalier, henholdsvis 10 µl af en 5 nM [^{3} H]-17β-østradiolopløsning. Herefter blev der tilsat 30 µl iskold receptoropløsning til hver plade og blandet forsigtigt. hrERα-opløsningen bør være det sidste reagens, der tilsættes. Assaymikrotiterplader bør inkuberes ved stuetemperatur (22-28 °C) i to timer.

Tabel 6: Mængde af assaykomponenter til kompetitivt bindingsassay med hrER, mikrotiterplader

Kolonnenummer Forberedelsestrin		Andre end TB-brønde	TB-brønde	Blindprøve (til varm)
Komponentvolumen til reaktionsbrønde og tilsætningsrækkefølge	Assaybuffer ved stuetemperatur	50 µl	60 µl	90 µl
	Umærket E2, svag binder, ikke-binder, opløsningsmiddel og testkemikalier*	10 µl	-	-
	[^{3} H]-17β-østradiol, der giver en slutkoncentration på 0,5 nM (dvs. 5 nM)	10 µl	10 µl	10 µl
	hrERα-koncentration som fastlagt (jf. punkt 12-13)	30 µl	30 µl	-
Samlet mængde i hver assaybrønd		100 µl	100 µl	100 µl

*korrekt fremstillet, så der opnås en slutkoncentration inden for den acceptable opløsningsmiddelkoncentration.

38. Kvantificeringen af [^{3} H]-17β-østradiol bundet til hrERα efter separation af [^{3} H]-17β-østradiol bundet til hrERα fra fri [^{3} H]-17β-østradiol ved tilsætning af 100 µl iskold DCC-suspension til hver brønd bør herefter udføres som beskrevet i punkt 21-23 i tillæg 3 for mætningsbindingsassayet.

39. Brønd G10-12 og H10-12 (identificeret som blindprøve (til varm) i tabel 4) repræsenterer dpms i [^{3} H]-mærket østradiol i 10 µl. Delprøven på 10 µl hældes direkte i scintillationsvæsken.

Acceptkriterier

Mætningsbindingsassay

40. Den specifikke bindingskurve bør nå et plateau i takt med anvendelsen af stigende koncentrationer af [^3H]-17 β -østradiol, hvilket viser mætningen af hrER α med ligand.
41. Den specifikke binding ved 0,5 nM [^3H]-17 β -østradiol bør ligge inden for det acceptable område på 30-50 % af den gennemsnitlige målte samlede radioaktivitet, der tilsættes på tværs af analyseserier. Lejlighedsvis ligger udsving uden for dette område er acceptable, men hvis analyseserier konsekvent ligger uden for dette område, eller en særlig analyse serie ligger væsentligt uden for dette område, bør proteinkoncentrationen justeres, og mætningsassayet gentages.
42. Dataene bør generere et lineært Scatchard-plot.
43. Den ikke-specifikke binding bør ikke være uforholdsmæssigt stor. Værdien for den ikke-specifikke binding bør typisk være < 35 % af den totale binding. Forholdet kan dog undertiden overstige denne grænse ved måling af en meget lav dpm for den laveste testede koncentration af radioaktivt mærket 17 β -østradiol.

Kompetitivt bindingsassay

44. Stigende koncentrationer af umærket 17 β -østradiol bør fortrænge [^3H]-17 β -østradiol fra receptoren på en måde, der stemmer overens med en kompetitiv binding ét sted.
45. IC₅₀-værdien for referenceøstroget (dvs. 17 β -østradiol) bør omtrent svare til den molære koncentration af [^3H]-17 β -østradiol plus den K_d, der er bestemt ud fra mætningsbindingsassayet.
46. Den totale specifikke binding bør til stadighed ligge inden for det acceptable område på 40 $\pm$ 10 %, når den gennemsnitlige målte koncentration af den samlede radioaktivitet tilsat til hver brønd var 0,5 nM på tværs af analyseserier. Lejlighedsvis ligger udsving uden for dette område er acceptable, men hvis analyseserier konsekvent ligger uden for dette område, eller en særlig analyse serie ligger væsentligt uden for området, bør proteinkoncentrationen justeres.
47. Opløsningsmidlet bør ikke ændre assayets følsomhed eller reproducerbarhed. Resultaterne af kontrolkulturen med opløsningsmiddel (TB-brønde) sammenlignes med bufferkontrollen for at kontrollere, at det anvendte opløsningsmiddel ikke påvirker assaysystemet. Resultaterne af TB og bufferkontrol bør være sammenlignelige, hvis opløsningsmidlet ikke påvirker assayet.
48. Ikke-binderen bør ikke fortrænge mere end 25 % af [^3H]-17 β -østradiol fra hrER α ved test op til 10⁻³ M (OTES) eller 10⁻⁴ M (DBP).
49. Der blev udviklet ydeevnekriterier for referenceøstroget og to svage bindere (f.eks. norethynodrel, norethindron) ved hjælp af data fra valideringsundersøgelsen for CERI's hrER-bindingsassay (bilag N i reference 2). Der er anført 95 %-konfidensintervaller for den gennemsnitlige $\pm$ standardafvigelse (n) af alle kontrolanalyseserier på tværs af fire laboratorier, som deltog i valideringsundersøgelsen. Der blev beregnet 95 %-

konfidensintervaller for de kurvetilpassede parametre (dvs. top, bund, Hills kurve og $\log IC_{50}$) for referenceøstrogen og svage bindere og for $\log_{10} RBA$ af de svage bindere i forhold til referenceøstrogen. Tabel 1 viser forventede intervaller for kurvetilpassede parametre, der kan benyttes som ydeevnekriterier. I praksis kan området for IC_{50} variere lidt baseret på den eksperimentelt udledte K_d af receptorpræparatet og den ligandkoncentration, som blev anvendt til assayet.

50. Der blev ikke udviklet ydeevnekriterier for kurvetilpassede parametre for testkemikalier på grund af den brede vifte af eksisterende potentielle testkemikalier og variation i potentielle affiniteter og udfald (f.eks. fuld kurve, delkurve, ingen kurvetilpasning). Der bør dog anlægges en faglig vurdering ved gennemgang af resultater fra hver analyseserie for et testkemikalie. Der skal benyttes et tilstrækkeligt koncentrationsområde for testkemikaliets for klart at definere toppen (f.eks. 90-100 % af bindingen) af den kompetitive kurve. Variabiliteten mellem replikater ved hver koncentration af testkemikaliets samt mellem de tre ikke-sideløbende analyseserier skal være rimelig og videnskabeligt forsvarlig. Kontroller fra hver analyseserie for et testkemikalie skal tilnærmes resultatmålinger rapporteret for dette CERI-assay og skal stemme overens med tidligere kontrolldata fra de respektive laboratorier.

ANALYSE AF DATA

Mætningsbindingsassay

51. Der måles både samlet og ikke-specifik binding. På grundlag af disse værdier beregnes specifik binding af stigende koncentrationer af $[^3H]$ -17 β -østradiol under ligevægtsbetingelser ved fratrækning af ikke-specifik binding fra samlet binding. En graf over specifik binding i forhold til $[^3H]$ -17 β -østradiolkoncentration bør nå et plateau for maksimal specifik binding som tegn på mætning af hrER α med $[^3H]$ -17 β -østradiol. Endvidere bør analyse af data dokumentere bindingen af $[^3H]$ -17 β -østradiol til et enkelt bindingssted med høj affinitet. Ikke-specifik, samlet og specifik binding bør vises på en mætningsbindingskurve. Ved yderligere analyse af disse data bør der benyttes en ikke-lineær regressionsanalyse (f.eks. BioSoft, McPherson, 1985; Motulsky, 1995) med en endelig visning af data som et Scatchard-plot.
52. Dataanalysen skal bestemme B_{max} og K_d på grundlag af de totale bindingsdata alene ud fra den antagelse, at ikke-specifik binding er lineær, medmindre der gives en begrundelse for at benytte en anden metode. Der bør desuden benyttes en robust regression ved bestemmelse af den bedste tilpasning, medmindre der gives en begrundelse. Den valgte metode til robust regression skal anføres. Der bør altid korrigeres for liganddepletering (f.eks. ved hjælp af Swillens metode, 1995) ved bestemmelse af B_{max} og K_d ud fra mætningsbindingsdata.

Kompetitivt bindingsassay

53. Den kompetitive bindingskurve plottes som specifik [^3H]-17 β -østradiolbinding mod konkurrentens koncentration (log10-enheder). Den koncentration af testkemikaliets, der inhiberer 50 % af den maksimale specifikke [^3H]-17 β -østradiolbinding, er IC_{50} -værdien.
54. Skøn over $\log(\text{IC}_{50})$ -værdier for de positive kontroller (f.eks. referenceøstrogen og svag binder) bestemmes ved anvendelse af en passende ikke-lineær kurvetilpasningssoftware, som passer til en Hill-ligning med fire parametre (f.eks. BioSoft, McPherson, 1985; Motulsky, 1995). Top, bund, hældning og $\log(\text{IC}_{50})$ skal normalt være frie ved tilpasning af disse kurver. Der bør benyttes robust regression ved bestemmelse af den bedste tilpasning, medmindre der gives en begrundelse. Der bør ikke korrigeres for liganddepletion. Efter den indledende analyse skal hver bindingskurve revideres for at sikre, at den passer til modellen. Den relative affinitet (RBA) for den svage binder beregnes som en procentdel af $\log(\text{IC}_{50})$ for den svage binder i forhold til $\log(\text{IC}_{50})$ for 17 β -østradiol. Resultaterne fra de positive kontroller og ikke-binderkontrollen bør vurderes ved hjælp af målinger af assayets ydeevne i punkt 44-49 i dette tillæg 3.
55. Data for alle testkemikalier analyseres gennem en trinvis tilgang for at sikre, at dataene analyseres indgående, og at hver kompetitiv bindingskurve klassificeres korrekt. Det anbefales, at hver analyseserie for et testkemikalie indledningsvis gennemgår en standardiseret dataanalyse, som er identisk med den, der benyttes for referenceøstrogen og kontroller for svag binder (jf. punkt 54 i dette tillæg 3). Når analysen er færdig, foretages en teknisk gennemgang af kurvetilpasningsparametrene samt en visuel gennemgang af, hvor godt dataene passer til den genererede kompetitive bindingskurve for hver analyseserie. Under denne tekniske gennemgang er observationer af et koncentrationsafhængigt fald i den procentvise specifikt bundne [^3H]-17 β -østradiol, lav variabilitet mellem de tekniske replikater ved hver testkemikaliekoncentration og konsistens i tilpassede parametre mellem de tre analyseserier et godt tegn på, at assayet og dataanalyserne blev behørigt gennemført.

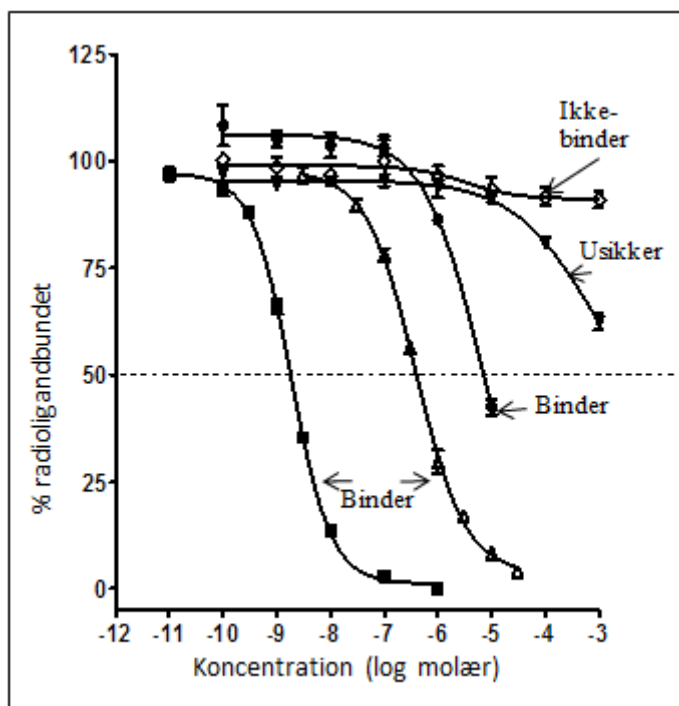
Fortolkning af data

56. Forudsat at alle acceptkriterier er opfyldt, anses et testkemikalie for at være en binder for $\text{hrER}\alpha$, hvis der kan tilpasses en bindingskurve, og det laveste punkt på responskurven inden for dataområdet er under 50 % (figur 1).
57. Såfremt alle acceptkriterier er opfyldt, anses et testkemikalie for at være en ikke-binder for $\text{hrER}\alpha$, hvis:
- der kan tilpasses en bindingskurve, og det laveste punkt på den tilpassede responskurve inden for dataområdet ligger over 75 %, eller
 - der ikke kan tilpasses en bindingskurve, og den laveste ikke-udjævnede, gennemsnitlige, procentvise binding blandt koncentrationsgrupperne i dataene ligger over 75 %.
58. Testkemikalierne anses for usikre, hvis ingen af de ovennævnte betingelser er opfyldt (f.eks. det laveste punkt på den tilpassede responskurve ligger mellem 76 og 51 %).

Tabel 7: Kriterier for klassificering på grundlag af et testkemikalies kompetitive bindingskurve.

Klassificering	Kriterier
Binder ^a	En bindingskurve kan tilpasses. • Det laveste punkt på responskurven inden for dataområdet er mindre end 50 %.
Ikke-binder ^b	Hvis en bindingskurve kan tilpasses, • er det laveste punkt på den tilpassede responskurve inden for dataområdet over 75 %. Hvis en bindingskurve ikke kan tilpasses, • er den laveste ikke-udjævnede, gennemsnitlige, procentvise binding blandt koncentrationsgrupperne i dataene over 75 %.
Usikker ^c	Enhver testbar analyseserie, som hverken er en binder eller en ikke-binder (f.eks. Det laveste punkt på den tilpassede responskurve er mellem 76 % og 51 %).

Figur 1: Eksempler på klassificering af testkemikalier ved anvendelse af kompetitiv bindingskurve.



59. Flere analyseserier for et testkemikalie, der gennemføres i et laboratorium, kombineres ved at tildele hver analyseserie en numerisk værdi og beregne gennemsnittet på tværs af analyseserierne som vist i tabel 8. Resultater for de kombinerede analyseserier i hvert laboratorium sammenlignes med den forventede klassificering for hvert testkemikalie.

Tabel 8: Metode til klassificering af testkemikalier ved anvendelse af flere analyseserier i et laboratorium

Tildeling af værdi til hver analyseserie:	
Klassificering	Numerisk værdi
Binder	2
Usikker	1
Ikke-binder	0
Klassificering af gennemsnitlig numerisk værdi på tværs af analyseserier:	
Klassificering	Numerisk værdi
Binder	Gennemsnit $\geq 1,5$
Usikker	$0,5 \leq \text{Gennemsnit} < 1,5$
Ikke-binder	Gennemsnit $< 0,5$

TESTRAPPORT

60. Jf. punkt 24 i "hrER-BINDINGSASSAYETS KOMPONENTER" i denne forsøgsmetode.

Tillæg 3.1

TERMINOLOGI

[³H]E2: 17 β -østradiol radioaktivt mærket med tritium

DCC: dextranovertrukket trækul

E2: umærket 17 β -østradiol (inert)

Assaybuffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, indeholdende 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaVO₃, 10 % glycerol, 0,2 mM leupeptin, 1 mM dithiothreitol og 10 mg/ml bovint serumalbumin

hrER α : human rekombinant østrogenreceptor alfa (ligandbindingsområde)

Replikat: en af flere brønde, der har samme indhold ved de samme koncentrationer, og som analyseres sideløbende inden for én analyseserie. I denne protokol testes hver koncentration af testkemikaliets i triplo, dvs. at der er tre replikater, som analyseres samtidig ved hver koncentration af testkemikaliets.

Analyseserie: et fuldstændigt sæt assaybrønde på mikrotiterplade, der kører sideløbende, og som giver alle nødvendige oplysninger til at karakterisere bindingen af et testkemikalie til hrER α (nemlig samlet [³H]-17 β -østradiol tilsat til assaybrønden, maksimal binding af [³H]-17 β -østradiol til hrER α , ikke-specifik binding og total binding ved forskellige koncentrationer af testkemikaliets). En analyseserie kan bestå af så lidt som én assaybrønd (dvs. replikat) pr. koncentration, men eftersom denne protokol kræver tredobbelt analyse, består én analyseserie af tre assaybrønde pr. koncentration. Endvidere kræver denne protokol tre uafhængige (dvs. ikke-sideløbende) analyseserier pr. kemikalie.

Tillæg 3.2

KOMPETITIVT BINDINGSASSAY: BRØNDLAYOUT

Plade	Placering	Replikat	Brøndtype	Brøndkode	Koncentrations-kode	Konkurrent Begyndelseskone- centration (M)	hrER- stamkultur (µl)	Buffervolumen (µl)	Sporstof (varm E2) Volumen (µl)	Volumen fra fortyndingsplade (µl)	Slutvolumen (µl)	Konkurrent Slutkoncentratio- n (M)
S	A1	1	Blindprøve	BK	BK1	—	—	—	—	—	—	—
S	A2	2	Blindprøve	BK	BK2	—	—	—	—	—	—	—
S	A3	3	Blindprøve	BK	BK3	—	—	—	—	—	—	—
S	B1	1	kold E2	S	S1	1.00E-10	30	50	10	10	100	1.0E-11
S	B2	2	kold E2	S	S1	1.00E-10	30	50	10	10	100	1.0E-11
S	B3	3	kold E2	S	S1	1.00E-10	30	50	10	10	100	1.0E-11
S	C1	1	kold E2	S	S2	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	C2	2	kold E2	S	S2	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	C3	3	kold E2	S	S2	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	D1	1	kold E2	S	S3	3.16E-09	30	50	10	10	100	3.2E-10
S	D2	2	kold E2	S	S3	3.16E-09	30	50	10	10	100	3.2E-10
S	D3	3	kold E2	S	S3	3.16E-09	30	50	10	10	100	3.2E-10
S	E1	1	kold E2	S	S4	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	E2	2	kold E2	S	S4	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	E3	3	kold E2	S	S4	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	F1	1	kold E2	S	S5	3.16E-08	30	50	10	10	100	3.2E-09
S	F2	2	kold E2	S	S5	3.16E-08	30	50	10	10	100	3.2E-09
S	F3	3	kold E2	S	S5	3.16E-08	30	50	10	10	100	3.2E-09
S	G1	1	kold E2	S	S6	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	G2	2	kold E2	S	S6	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	G3	3	kold E2	S	S6	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	H1	1	kold E2	S	S7	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	H2	2	kold E2	S	S7	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	H3	3	kold E2	S	S7	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	A4	1	norethynodrel	NE	WP1	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	A5	2	norethynodrel	NE	WP1	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	A6	3	norethynodrel	NE	WP1	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	B4	1	norethynodrel	NE	WP2	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	B5	2	norethynodrel	NE	WP2	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	B6	3	norethynodrel	NE	WP2	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	C4	1	norethynodrel	NE	WP3	3.16E-07	30	50	10	10	100	3.2E-08
S	C5	2	norethynodrel	NE	WP3	3.16E-07	30	50	10	10	100	3.2E-08
S	C6	3	norethynodrel	NE	WP3	3.16E-07	30	50	10	10	100	3.2E-08
S	D4	1	norethynodrel	NE	WP4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	D5	2	norethynodrel	NE	WP4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	D6	3	norethynodrel	NE	WP4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	E4	1	norethynodrel	NE	WP5	3.16E-06	30	50	10	10	100	3.2E-07
S	E5	2	norethynodrel	NE	WP5	3.16E-06	30	50	10	10	100	3.2E-07
S	E6	3	norethynodrel	NE	WP5	3.16E-06	30	50	10	10	100	3.2E-07
S	F4	1	norethynodrel	NE	WP6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	F5	2	norethynodrel	NE	WP6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	F6	3	norethynodrel	NE	WP6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	G4	1	norethynodrel	NE	WP7	3.16E-05	30	50	10	10	100	3.2E-06
S	G5	2	norethynodrel	NE	WP7	3.16E-05	30	50	10	10	100	3.2E-06
S	G6	3	norethynodrel	NE	WP7	3.16E-05	30	50	10	10	100	3.2E-06

Kompetitivt bindingsassay: brøndlayout												
Plade	Placering	Replik	Brøndtype	Brøndkode	Koncentrations-kode	Konkurrent Begyndelseskoncentration (M)	hrER-stamkultur (µl)	Buffervolumen (µl)	Sporstof (varm E2) Volumen (µl)	Volumen fra fortyndingsplade (µl)	Slutvolumen (µl)	Konkurrent Slutkoncentration (M)
S	H4	1	norethynodrel	NE	WP8	3.16E-04	30	50	10	10	100	3.2E-05
S	H5	2	norethynodrel	NE	WP8	3.16E-04	30	50	10	10	100	3.2E-05
S	H6	3	norethynodrel	NE	WP8	3.16E-04	30	50	10	10	100	3.2E-05
S	A7	1	OTES	N	OTES1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	A8	2	OTES	N	OTES1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	A9	3	OTES	N	OTES1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	B7	1	OTES	N	OTES2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	B8	2	OTES	N	OTES2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	B9	3	OTES	N	OTES2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	C7	1	OTES	N	OTES3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	C8	2	OTES	N	OTES3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	C9	3	OTES	N	OTES3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	D7	1	OTES	N	OTES4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	D8	2	OTES	N	OTES4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	D9	3	OTES	N	OTES4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	E7	1	OTES	N	OTES5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	E8	2	OTES	N	OTES5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	E9	3	OTES	N	OTES5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	F7	1	OTES	N	OTES6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
S	F8	2	OTES	N	OTES6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
S	F9	3	OTES	N	OTES6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
S	G7	1	OTES	N	OTES7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
S	G8	2	OTES	N	OTES7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
S	G9	3	OTES	N	OTES7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
S	H7	1	OTES	N	OTES8DBP7	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
S	H8	2	OTES	N	OTES88	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
S	H9	3	OTES	N	OTES8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
S	A10	1	total binding	TB	TB1	-	30	60	10	-	100	-
S	A11	2	total binding	TB	TB2	-	30	60	10	-	100	-
S	A12	3	total binding	TB	TB3	-	30	60	10	-	100	-
S	B10	4	total binding	TB	TB4	-	30	60	10	-	100	-
S	B11	5	total binding	TB	TB5	-	30	60	10	-	100	-
S	B12	6	total binding	TB	TB6	-	30	60	10	-	100	-
S	C10	1	kold E2 (høj)	NSB	S1	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	C11	2	kold E2 (høj)	NSB	S2	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	C12	3	kold E2 (høj)	NSB	S3	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	D10	4	kold E2 (høj)	NSB	S4	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	D11	5	kold E2 (høj)	NSB	S5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	D12	6	kold E2 (høj)	NSB	S6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	E10	1	Bufferkontrol	BC	BC1	-	-	100	-	-	100	-
S	E11	2	Bufferkontrol	BC	BC2	-	-	100	-	-	100	-
S	E12	3	Bufferkontrol	BC	BC3	-	-	100	-	-	100	-
S	F10	4	Bufferkontrol	BC	BC4	-	-	100	-	-	100	-
S	F11	5	Bufferkontrol	BC	BC5	-	-	100	-	-	100	-
S	F12	6	Bufferkontrol	BC	BC6	-	-	100	-	-	100	-
S	G10*	1	Blindprøve (til	Varm	H1	-	90	-	10	-	100	-
S	G11*	2	Blindprøve (til	Varm	H2	-	90	-	10	-	100	-
S	G12*	3	Blindprøve (til	Varm	H3	-	90	-	10	-	100	-
S	H10*	4	Blindprøve (til	Varm	H4	-	90	-	10	-	100	-
S	H11*	5	Blindprøve (til	Varm	H5	-	90	-	10	-	100	-
S	H12	6	Blindprøve (til	Varm	H6	-	90	-	10	-	100	-

*: Bemærk, at de "varme" brønde er tomme under inkubation. De 10 µl tilsættes kun til scintillationstælling.

Kompetitivt bindingsassay: brøndlayout												
Plade	Placering	Replikat	Brøndtype	Brøndkode	Koncentrations-kode	Konkurrent Begyndelseskoncentration (M)	hrER-stamkultur (µl)	Buffervolumen (µl)	Sporstof (varm E2) Volumen (µl)	Volumen fra fortyndingsplade (µl)	Slutvolumen (µl)	Konkurrent Slutkoncentration (M)
P1	A1	1	Ukendt 1	U1	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A2	2	Ukendt 1	U1	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A3	3	Ukendt 1	U1	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	B1	1	Ukendt 1	U1	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B2	2	Ukendt 1	U1	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B3	3	Ukendt 1	U1	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	C1	1	Ukendt 1	U1	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C2	2	Ukendt 1	U1	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C3	3	Ukendt 1	U1	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	D1	1	Ukendt 1	U1	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D2	2	Ukendt 1	U1	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D3	3	Ukendt 1	U1	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	E1	1	Ukendt 1	U1	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E2	2	Ukendt 1	U1	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E3	3	Ukendt 1	U1	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F1	1	Ukendt 1	U1	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F2	2	Ukendt 1	U1	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F3	3	Ukendt 1	U1	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	G1	1	Ukendt 1	U1	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G2	2	Ukendt 1	U1	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G3	3	Ukendt 1	U1	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	H1	1	Ukendt 1	U1	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H2	2	Ukendt 1	U1	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H3	3	Ukendt 1	U1	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	A4	1	Ukendt 2	U2	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A5	2	Ukendt 2	U2	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A6	3	Ukendt 2	U2	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	B4	1	Ukendt 2	U2	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B5	2	Ukendt 2	U2	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B6	3	Ukendt 2	U2	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	C4	1	Ukendt 2	U2	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C5	2	Ukendt 2	U2	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C6	3	Ukendt 2	U2	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	D4	1	Ukendt 2	U2	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D5	2	Ukendt 2	U2	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D6	3	Ukendt 2	U2	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	E4	1	Ukendt 2	U2	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E5	2	Ukendt 2	U2	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E6	3	Ukendt 2	U2	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F4	1	Ukendt 2	U2	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F5	2	Ukendt 2	U2	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F6	3	Ukendt 2	U2	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	G4	1	Ukendt 2	U2	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G5	2	Ukendt 2	U2	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G6	3	Ukendt 2	U2	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	H4	1	Ukendt 2	U2	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H5	2	Ukendt 2	U2	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H6	3	Ukendt 2	U2	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03

Kompetitivt bindingsassay: brøndlayout

Plade	Placering	Replik	Brøndtype	Brøndkode	Koncentrations-kode	Konkurrent Begyndelseskoncentration (M)	hrER-stamkultur (µl)	Buffervolumen (µl)	Sporstof (varm E2) Volumen (µl)	Volumen fra fortyndingsplade (µl)	Slutvolumen (µl)	Konkurrent Slutkoncentration (M)
P1	A7	1	Ukendt 3	U3	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A8	2	Ukendt 3	U3	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A9	3	Ukendt 3	U3	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	B7	1	Ukendt 3	U3	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B8	2	Ukendt 3	U3	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B9	3	Ukendt 3	U3	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	C7	1	Ukendt 3	U3	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C8	2	Ukendt 3	U3	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C9	3	Ukendt 3	U3	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	D7	1	Ukendt 3	U3	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D8	2	Ukendt 3	U3	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D9	3	Ukendt 3	U3	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	E7	1	Ukendt 3	U3	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E8	2	Ukendt 3	U3	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E9	3	Ukendt 3	U3	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F7	1	Ukendt 3	U3	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F8	2	Ukendt 3	U3	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F9	3	Ukendt 3	U3	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	G7	1	Ukendt 3	U3	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G8	2	Ukendt 3	U3	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G9	3	Ukendt 3	U3	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	H7	1	Ukendt 3	U3	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H8	2	Ukendt 3	U3	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H9	3	Ukendt 3	U3	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	A10	1	Kontrol E2	S	E2maks1	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.00E-07
P1	A11	2	Kontrol E2	S	E2maks2	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.00E-07
P1	A12	3	Kontrol E2	S	E2maks3	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.00E-07
P1	B10	1	Kontrol E2 (IC50)	S	E2IC501	E2IC50x10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	B11	2	Kontrol E2 (IC50)	S	E2IC502	E2IC50x10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	B12	3	Kontrol E2 (IC50)	S	E2IC503	E2IC50x10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	C10	1	Kontrol NE	S	Nemax1	1.00E-3,5	30	50	10	10	100	1.00E-4.5
P1	C11	2	Kontrol NE	S	Nemax2	1.00E-3,5	30	50	10	10	100	1.00E-4.5
P1	C12	3	Kontrol NE	S	Nemax3	1.00E-3,5	30	50	10	10	100	1.00E-4.5
P1	D10	1	Kontrol NE	S	NEIC501	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	D11	2	Kontrol NE	S	NEIC502	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	D12	3	Kontrol NE	S	NEIC503	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	E10	1	kold E2 (høj)	NSB	S1	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E11	2	kold E2 (høj)	NSB	S2	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E12	3	kold E2 (høj)	NSB	S3	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F10	4	kold E2 (høj)	NSB	S4	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F11	5	kold E2 (høj)	NSB	S5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F12	6	kold E2 (høj)	NSB	S6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	G10	1	total binding	TB	TB1	-	30	60	10	-	100	-
P1	G11	2	total binding	TB	TB2	-	30	60	10	-	100	-
P1	G12	3	total binding	TB	TB3	-	30	60	10	-	100	-
P1	H10	4	total binding	TB	TB4	-	30	60	10	-	100	-
P1	H11	5	total binding	TB	TB5	-	30	60	10	-	100	-
P1	H12	6	total binding	TB	TB6	-	30	60	10	-	100	-

Tillæg 4

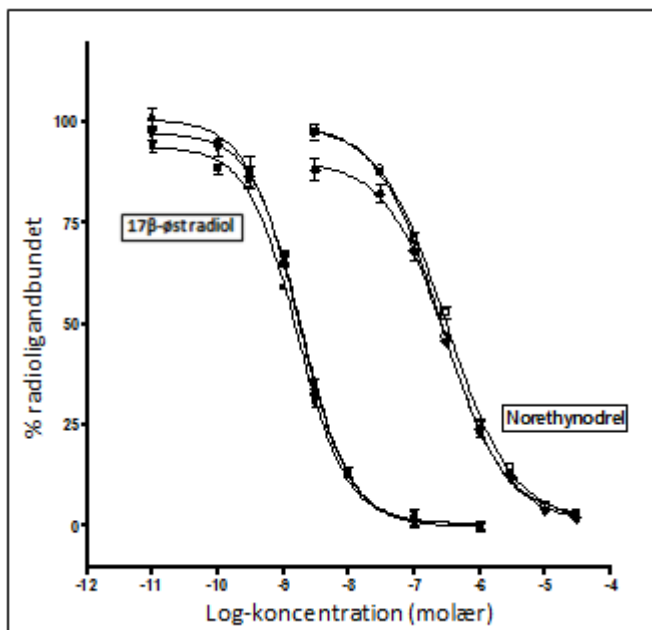
OVERVEJELSER OVER ANALYSEN AF DATA FRA DET KOMPETITIVE HRER-BINDINGSASSAY

1. Det kompetitive hrER α -bindingsassay måler bindingen af en enkelt koncentration af [^3H]-17 β -østradiol under tilstedeværelse af stigende koncentrationer af et testkemikalie. Den kompetitive bindingskurve plottes som specifik [^3H]-17 β -østradiolbinding mod konkurrentens koncentration (log₁₀-enheder). Den koncentration af testkemikallet, der inhiberer 50 % af den maksimale specifikke [^3H]-17 β -østradiolbinding, er IC₅₀.

Dataanalyse for referenceøstrogen og svag binder (1)

2. Data fra kontrolanalyserierne omdannes (dvs. procent [^3H]-17 β -østradiol-specifik binding og log-koncentrationen af kontrolkemikallet) til videre analyse. Skøn over log(IC₅₀)-værdier for de positive kontroller (f.eks. referenceøstrogen og svag binder) bestemmes ved anvendelse af en passende ikke-lineær kurvetilpasningssoftware, som passer til en Hill-ligning med fire parametre dvs. (f.eks. BioSoft, GraphPad Prism) (2). Top, bund, hældning og log(IC₅₀) kan normalt være frie ved tilpasning af disse kurver. Der bør benyttes robust regression ved bestemmelse af den bedste tilpasning, medmindre der gives en begrundelse. Den valgte metode til robust regression skal anføres. Det var ikke nødvendigt at korrigere for liganddepletering for FW- eller CERI's hrER-assays, men kan om nødvendigt overvejes. Efter den indledende analyse skal hver bindingskurve revideres for at sikre, at den passer til modellen. Den relative affinitet (RBA) for den svage binder kan beregnes som en procentdel af log (IC₅₀) for den svage binder i forhold til log (IC₅₀) for 17 β -østradiol. Resultater for de positive kontroller og ikke-binderkontrollen bør vurderes ved anvendelse af mål for assayets ydeevne og acceptkriterier som beskrevet i denne forsøgsmetode (punkt 20), tillæg 2 (FW-assay, punkt 41-51) og tillæg 3 (CERI-assay, punkt 41-51). Eksempler på tre analyserier for referenceøstrogen og svag binder er vist i figur 1.

Figur 1. Eksempler på de kompetitive bindingskurver for referenceøstrogen og den svage binder, der fungerer som kontrol

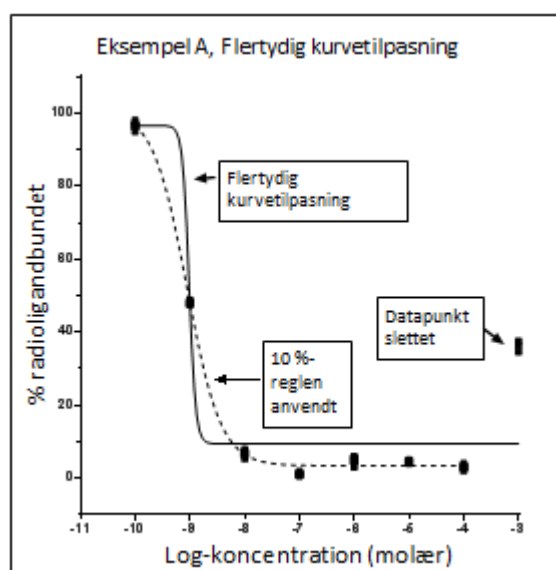


Dataanalyse for testkemikalier

3. Data for alle testkemikalier analyseres gennem en trinvis tilgang for at sikre, at dataene analyseres indgående, og at hver kompetitiv bindingskurve klassificeres korrekt. Hver analyseserie for et testkemikalie bør indledningsvis gennemgå en standardiseret dataanalyse, som er identisk med den, der benyttes for referenceøstrogen og kontroller for svag binder. Når analysen er færdig, foretages en teknisk gennemgang af kurvetilpasningsparametrene samt en visuel gennemgang af, hvor godt dataene passer til den genererede kompetitive bindingskurve for hver analyseserie. Under denne tekniske gennemgang er observationer af et koncentrationsafhængigt fald i den procentvis specifikt bundne [^3H]-17 β -østradiol, lav variabilitet mellem de tekniske replikater ved hver kemisk koncentration og konsistens i tilpassede parametre mellem de tre analyseserier et godt tegn på, at assayet og dataanalyserne blev gennemført korrekt. Der bør anlægges en faglig vurdering ved gennemgang af resultater fra hver analyseserie for et testkemikalie, og de data, der benyttes til at klassificere hvert testkemikalie som binder eller ikke-binder skal være videnskabeligt forsvarlige.
4. Undertiden kan der være eksempler på data, som kræver supplerende opmærksomhed med henblik på at analysere og fortolke hrER-bindingsdataene korrekt. Tidligere undersøgelser havde vist tilfælde, hvor det kan være kompliceret at analysere og fortolke kompetitive receptorbindingsdata på grund af en stigning i den procentvis specifikke binding, ved testning af kemikalier ved de højeste koncentrationer (figur 2). Dette er et velkendt problem, som man er stødt på ved anvendelse af protokoller til en række kompetitive receptorbindingsassays (3). I disse tilfælde observeres en koncentrationsafhængig respons

ved lavere koncentrationer, men i takt med at koncentrationen af testkemikaliet nærmer sig opløselighedsgrænsen, falder fortrængningen af [^3H]17 β -østradiol ikke længere. I disse tilfælde viser data for de højere koncentrationer, at assayets biologiske grænse er nået. F.eks. forbindes dette fænomen mange gange med kemisk uopløselighed og bundfald ved høje koncentrationer eller kan også afspejle overskridelse af det dextranovertrukne trækuls kapacitet til at fange ubundet radioaktivt mærket ligand under adskilleelsesproceduren ved de højeste kemiske koncentrationer. Hvis sådanne datapunkter ignoreres, når data om kompetitiv binding tilpasses en sigmoidal kurve, kan det undertiden føre til en forkert klassificering af et testkemikalies ER-bindingspotentiale (figur 2). For at undgå dette omfatter protokollen for FW- og CERi-hrER-bindingsassays en mulighed for at se bort fra datapunkter i de analyser, hvor replikatgennemsnittet af den procentvise specifikt bundne [^3H]17 β -østradiol ligger 10 % eller mere over den gennemsnitsværdi, som blev observeret ved en lavere koncentration (dvs. dette omtales almindeligvis som 10 %-reglen). Denne regel kan kun benyttes én gang for en given kurve, og der skal være data tilbage for mindst seks koncentrationer, således at kurven kan klassificeres korrekt.

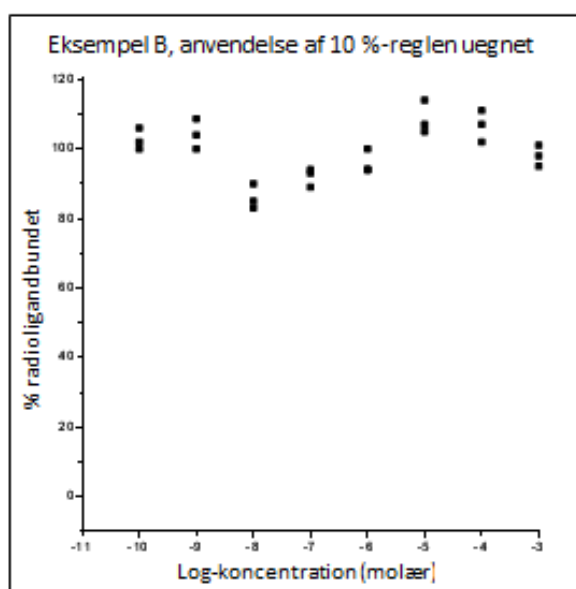
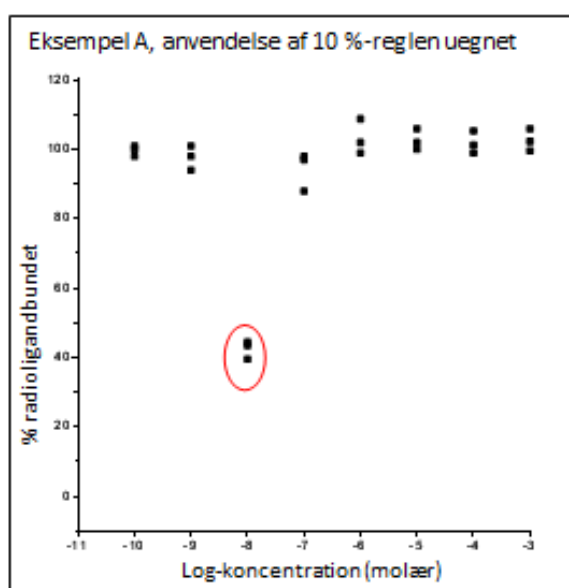
Figur 2: Eksempler, kompetitive bindingskurver med og uden anvendelse af 10 %-reglen



5. Passende anvendelse af 10 %-reglen til at korrigere disse kurver bør nøje overvejes og forbeholdes de tilfælde, hvor der er stærk indikation for en hrER-binder. Under udførelsen af forsøg til valideringsundersøgelsen af FW-hrER-bindingsassayet blev det observeret, at 10 %-reglen undertiden havde en utilsigtet og uforudset konsekvens. Kemikalier, som ikke interagerede med receptoren (dvs. reelle ikke-bindere), udviste ofte variabilitet omkring 100 % radioligandbinding, som var større end 10 % på tværs af det testede koncentrationsområde. Hvis den laveste værdi skulle være ved en lav koncentration, kan

dataene fra alle højere koncentrationer potentielt slettes fra analysen ved anvendelse af 10 %-reglen, selv om disse koncentrationer kunne være nyttige til at fastslå, at kemikaliet er en ikke-binder. Figur 3 viser eksempler, hvor anvendelsen af 10 %-reglen ikke er hensigtsmæssig

Figur 3: Eksempler, data om kompetitiv binding, hvor anvendelsen af 10 %-reglen ikke er hensigtsmæssig.



Henvisninger

- (1) OECD (2015). *Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrER α)*, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (2) Motulsky H. og Christopoulos A. (2003). *The law of mass action, In Fitting Models to Biological Data Using Linear and Non-linear Regression*. GraphPad Software Inc., San Diego, CA, s. 187-191. www.graphpad.com/manuals/Prism4/RegressionBook.pdf
- (3) Laws SC, Yavanhxay S, Cooper RL, Eldridge JC. (2006). *Nature of the Binding Interaction for 50 Structurally Diverse Chemicals with Rat Estrogen Receptors*. Toxicological Sci. 94(1):46-56.