

Brüssel, 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

ÜBERMITTLUNGSVERMERK

Absender:	Europäische Kommission
Eingangsdatum:	22. Februar 2019
Empfänger:	Generalsekretariat des Rates
Nr. Komm.dok.:	D060575/02 ANNEX
Betr.:	Anhang der VERORDNUNG (EU) .../... DER KOMMISSION vom XXX zur Änderung - zwecks Anpassung an den technischen Fortschritt - des Anhangs der Verordnung (EG) Nr. 440/2008 zur Festlegung von Prüfmethoden gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH)

Die Delegationen erhalten in der Anlage das Dokument D060575/02 ANNEX.

Anl.: D060575/02 ANNEX

Anhang – Teil 1/2

DE

ANHANG

Der Anhang der Verordnung (EG) Nr. 440/2008 wird wie folgt geändert:

(1) In Teil B erhält Kapitel B.4 folgende Fassung:

„B.4 AKUTE HAUTREIZUNG/-VERÄTZUNG

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 404 (2015). Die OECD-Richtlinien für die Prüfung von Chemikalien werden regelmäßig überprüft, um sicherzustellen, dass sie auf den besten verfügbaren wissenschaftlichen Erkenntnissen beruhen. Bei der Prüfung der OECD TG 404 wurde besonderes Augenmerk auf mögliche Verbesserungen im Hinblick auf Belange des Tierschutzes und auf die Auswertung aller bereits vorhandenen Angaben über die Chemikalie gelegt, um unnötige Versuche an Labortieren zu vermeiden. Die aktualisierte Fassung der OECD TG 404 (1981 ursprünglich angenommen und 1992, 2002 und 2015 geändert) enthält Verweise auf das IATA-Leitliniendokument (Integrated Approaches to Testing and Assessment = integrierte Prüfungs- und Bewertungsansätze) zu Hautreizungen/-verätzungen (1), in dem ein modularer Ansatz für Prüfungen auf Hautreizungen und -verätzungen vorgeschlagen wird. Die IATA beschreiben mehrere Module, in denen Informationsquellen und Analyseinstrumente zu Gruppen zusammengefasst werden. Sie enthalten i) Leitlinien dazu, wie vorhandene Daten aus Versuchen und aus anderen Quellen integriert und verwendet werden können, um das Hautreizungs- und das Hautverätzungspotenzial von Chemikalien zu bewerten, und ii) einen Vorschlag zur Durchführung ggf. erforderlicher weiterer Versuche (1). Zudem wird in dieser Leitlinie empfohlen, beim *In-vivo*-Vorversuch erforderlichenfalls die drei Mullläppchen, mit denen die Prüfchemikalie aufgetragen wird, nacheinander und nicht gleichzeitig am Körper des Tieres zu fixieren.
2. Definitionen der Begriffe Hautreizung und Hautverätzung sind der Anlage zu dieser Prüfmethode zu entnehmen.

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN

3. Im Interesse wissenschaftlicher Verlässlichkeit und des Tierschutzes sollten *In-vivo*-Prüfungen erst dann in Erwägung gezogen werden, wenn alle für das Hautverätzungs-/reizungspotenzial der Prüfchemikalie verfügbaren einschlägigen Daten auf Basis ihrer Beweiskraft (weight-of-evidence, WoE) ausgewertet worden sind, wie in den integrierten

Prüfungs- und Bewertungsansätzen für Hautverätzungen und -reizungen (d. h. in den drei Teilen dieses Leitliniendokuments und in den betreffenden Modulen) beschrieben (1). In Teil 1 werden vorhandene Daten in sieben Modulen unter Berücksichtigung von Humandaten, *In-vivo*-Daten, *In-vitro*-Daten und Daten zu physikalisch-chemischen Eigenschaften (pH-Wert, insbesondere starke Azidität oder Alkalität, usw.) sowie von Daten behandelt, die nicht auf der Verwendung von Prüfmethoden beruhen. In Teil 2 wird die Durchführung einer WoE-Analyse beschrieben. Wenn diese WoE-Analyse noch nicht zu einem schlüssigen Ergebnis führt, sollten weitere Prüfungen durchgeführt werden, wie in Teil 3 beschrieben. Dabei sollte mit *In-vitro*-Methoden begonnen werden. *In-vivo*-Prüfungen sollten erst als letzte Möglichkeit in Betracht gezogen werden. Diese Analyse soll somit dazu führen, dass weniger *In-vivo*-Prüfungen zum Hautverätzungs-/reizungspotenzial von Prüfchemikalien durchgeführt werden, wenn aus anderen Studien zu diesen beiden Endpunkten bereits ausreichende Belege verfügbar sind.

PRINZIP DER *IN-VIVO*-PRÜFUNG

4. Die Prüfchemikalie wird in einmaliger Dosierung auf die Haut eines Versuchstiers aufgetragen; nicht behandelte Hautareale dienen als Kontrolle. Der Grad der Reizung/Verätzung wird in zuvor festgelegten Zeitabständen bestimmt und bewertet und anschließend beschrieben, um eine umfassende Beurteilung der Wirkung vornehmen zu können. Die Beobachtungsdauer sollte ausreichend sein, um die Reversibilität bzw. Irreversibilität der Wirkungen vollständig zu erfassen,
5. Tiere mit starken und anhaltenden Anzeichen von Leiden und/oder Schmerzen sollten jederzeit während des Versuchs human getötet werden, wobei die Prüfchemikalie entsprechend einzustufen ist. Kriterien für die Entscheidung über die humane Tötung moribunder Tiere mit starken Leidensanzeichen sind Gegenstand eines gesonderten Leitfadens (2).

VORBEREITUNG DER *IN-VIVO*-PRÜFUNG

Auswahl von Versuchstierarten

6. Das bevorzugte Labortier ist das Albino-Kaninchen. Für diese Prüfung sind gesunde junge geschlechtsreife Kaninchen zu verwenden. Die Verwendung anderer Spezies ist zu begründen.

Vorbereitung der Versuchstiere

7. Etwa 24 Stunden vor dem Versuch wird das Fell auf dem Rücken der Versuchstiere gründlich geschoren. Dabei ist darauf zu achten, dass die Haut nicht verletzt wird. Es sind nur Tiere mit gesunder, unverletzter Haut zu verwenden.

8. Einige Kaninchenrassen haben Stellen mit dichtem Fellbewuchs, die zu bestimmten Zeiten im Jahr deutlicher hervortreten. An diesen Stellen sollte keine Prüfung durchgeführt werden.

Haltungs- und Fütterungsbedingungen

9. Die Tiere sollten einzeln gehalten werden. Die Temperatur im Versuchstierraum sollte für Kaninchen 20 °C (± 3 °C) betragen. Obwohl die relative Luftfeuchtigkeit mindestens 30 % betragen und außer bei der Reinigung vorzugsweise nicht über 70 % liegen sollte, ist ein Wert von 50-60 % anzustreben. Für die Beleuchtung ist Kunstlicht zu verwenden und so zu schalten, dass sich 12 Stunden Licht mit 12 Stunden Dunkelheit abwechseln. An die Versuchstiere kann herkömmliches Laborfutter verfüttert werden, wobei eine unbegrenzte Trinkwasserversorgung zu gewährleisten ist.

PRÜFVERFAHREN

Applikation der Prüfchemikalie

10. Die Prüfchemikalie sollte auf eine kleine Hautfläche (etwa 6 cm²) aufgetragen und mit einem Mullläppchen abgedeckt werden, das mit einem nicht reizenden Pflaster fixiert wird. Wenn eine direkte Applikation nicht möglich ist (z. B. bei Flüssigkeiten oder bestimmten Pasten), sollte die Prüfchemikalie zunächst auf das Mullläppchen gegeben werden, das anschließend auf der Haut fixiert wird. Für die Dauer der Exposition sollte das Läppchen mit einem geeigneten Semi-Okklusiv-Verband lose auf der Haut gehalten werden. Wird die Prüfchemikalie auf ein Läppchen aufgebracht, so ist dieses so auf der Haut zu fixieren, dass ein guter Hautkontakt und die gleichmäßige Verteilung der Prüfchemikalie auf der Haut gewährleistet sind. Es ist dafür zu sorgen, dass das Tier nicht an das Mullläppchen gelangt und die Prüfchemikalie nicht oral aufnehmen oder inhalieren kann.
11. Flüssige Prüfchemikalien werden gewöhnlich unverdünnt verwendet. Wird der Versuch mit Feststoffen durchgeführt (die im Bedarfsfall pulverisiert werden können), sollte die Prüfchemikalie mit gerade so viel Wasser (bzw. gegebenenfalls mit einem anderen geeigneten Vehikel) angefeuchtet werden, dass ein guter Kontakt mit der Haut sichergestellt ist. Bei Verwendung eines anderen Vehikels als Wasser sollte dessen möglicher Einfluss auf eine Reizung der Haut durch die Prüfchemikalie minimal sein.
12. Nach Ablauf der Expositionszeit, die in der Regel 4 Stunden beträgt, wird die restliche Prüfchemikalie möglichst mit Wasser oder einem geeigneten Lösungsmittel entfernt, ohne die bestehende Reaktion oder die Integrität der Epidermis zu beeinträchtigen.

Dosierung

13. Bei Flüssigkeiten werden 0,5 ml und bei Feststoffen oder Pasten 0,5 g auf die vorbereitete Hautstelle aufgetragen.

Vorversuch (*In-vivo*-Prüfung auf Hautreizung/-verätzung an einem Tier)

14. Wenn eine Prüfchemikalie aufgrund einer WoE-Analyse oder früherer *In-vitro*-Prüfungen entweder als ätzend oder reizend oder als nicht klassifiziert eingestuft wurde, sind weitere *In-vivo*-Prüfungen im Allgemeinen nicht erforderlich. Erscheint allerdings die Ermittlung zusätzlicher Daten gerechtfertigt, wird die *In-vivo*-Prüfung zunächst mit nur einem Versuchstier wie im Folgenden beschrieben durchgeführt. Dem Tier werden dann bis zu drei Mullläppchen nacheinander appliziert. Das erste Lämpchen wird nach drei Minuten entfernt. Wird keine schwere Hautreaktion festgestellt, wird ein zweites Lämpchen an einer anderen Stelle appliziert, das nach einer Stunde entfernt wird. Lassen die Beobachtungen zu diesem Zeitpunkt den Schluss zu, dass eine Exposition für die Dauer von vier Stunden ethisch verantwortbar ist, wird ein drittes Lämpchen appliziert und nach vier Stunden entfernt. Anschließend wird die Reaktion bewertet.
15. Der Versuch wird sofort abgebrochen, falls nach einer der drei sequenziellen Expositionen eine ätzende Wirkung beobachtet wird. Ist nach der Entfernung des letzten Lämpchens keine Verätzung feststellbar, wird das Tier 14 Tage lang beobachtet, sofern nicht vor Ablauf dieser Zeit Verätzungen auftreten.
16. Geht man davon aus, dass die Prüfchemikalie zwar keine hautätzende Wirkung hat, aber Hautreizungen hervorrufen kann, sollte nur ein Tier verwendet werden, dem ein einziges Lämpchen für die Dauer von vier Stunden appliziert wird.

Bestätigungsprüfung (*In-vivo*-Prüfung auf hautreizende Wirkungen an zusätzlichen Tieren)

17. Wird im Vorversuch keine ätzende Wirkung beobachtet, sollte die Reizungsreaktion bzw. die negative Reaktion an bis zu zwei weiteren Tieren mit jeweils einem Lämpchen bei einer Expositionsdauer von vier Stunden bestätigt werden. Ergibt der Vorversuch eine Reizungswirkung, kann die Bestätigungsprüfung als sequenzieller Versuch bzw. durch gleichzeitige Exposition von zwei weiteren Tieren durchgeführt werden. Findet ausnahmsweise kein Vorversuch statt, können zwei bzw. drei Tiere mit einem Lämpchen behandelt werden, das nach vier Stunden entfernt wird. Bei Verwendung von zwei Versuchstieren, die beide die gleiche Reaktion zeigen, erübrigen sich weitere Untersuchungen. Andernfalls wird auch das dritte Tier geprüft. Unklare Reaktionen könnten möglicherweise bewertet werden, indem Versuche mit weiteren Tieren durchgeführt werden.

Beobachtungszeitraum

18. Der Beobachtungszeitraum sollte so bemessen sein, dass die Reversibilität der festgestellten Wirkungen vollständig bewertet werden kann. Allerdings sollte der Versuch abgebrochen werden, sobald das betreffende Tier starke und anhaltende Anzeichen von Leiden und Schmerzen zeigt. Um feststellen zu können, ob die Wirkungen reversibel sind, sollten die Tiere für die Dauer von bis zu 14 Tagen nach Entfernung der Lämpchen

beobachtet werden. Bilden sich die Schäden vor Ablauf dieser 14 Tage zurück, sollte der Versuch zum betreffenden Zeitpunkt beendet werden.

Klinische Beobachtungen und Bewertung von Hautreaktionen

19. Die Tiere sind auf Anzeichen von Hautrötungen und Ödemen zu untersuchen, wobei die Reaktion 60 Minuten sowie 24, 48 und 72 Stunden nach Entfernen des Lappchens bewertet wird. Beim Vorversuch an einem Tier wird die behandelte Stelle auch unmittelbar nach Entfernen des Lappchens untersucht. Die Hautreaktionen werden bewertet und anhand der Punkteskala in der unten stehenden Tabelle dokumentiert. Bei Hautschädigungen, die nach 72 Stunden weder als Reizung noch als Verätzung eingestuft werden können, ist unter Umständen die Beobachtung bis zum 14. Tag erforderlich, um Aussagen zur Reversibilität der Wirkungen treffen zu können. Neben Hautreizungen sollten alle lokal begrenzten toxischen Wirkungen (z. B. Entfettung der Haut) und alle negativen systemischen Wirkungen (z. B. klinische Anzeichen für Toxizität und Veränderungen des Körpergewichts) vollständig beschrieben und dokumentiert werden. Unklare Reaktionen sollen gegebenenfalls durch eine histopathologische Untersuchung abgeklärt werden.
20. Die Bewertung von Hautreaktionen ist zwangsläufig subjektiv. Um die Einstufung von Hautreaktionen stärker zu vereinheitlichen und den Prüflabors und allen an den Versuchen und an der Auswertung der Versuchsergebnisse Beteiligten die Arbeit zu erleichtern, müssen die Prüfer im Umgang mit der Bewertungsskala (siehe unten stehende Tabelle) entsprechend geschult werden. Dabei könnte sich ein Leitfaden mit Abbildungen zur Bewertung von Hautreizungen und anderen Schädigungen als hilfreich erweisen (3).

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

21. Die Untersuchungsergebnisse sollten im Abschlussbericht in Tabellenform dargestellt werden und alle in Nummer 24 genannten Punkte umfassen.

Auswertung der Ergebnisse

22. Die Bewertung der Hautreizung sollte anhand der Art und des Schweregrads der Schädigung und deren Reversibilität bzw. Irreversibilität vorgenommen werden. Die einzelnen ermittelten Schweregrade stellen keinen allein gültigen Maßstab für die reizenden Eigenschaften eines Stoffs dar, denn es werden auch andere Effekte der Prüfchemikalie beurteilt. Vielmehr sollten diese einzelnen Graduierungswerte als Referenzwerte betrachtet werden, die zusammen mit allen anderen Ergebnissen der Studie zu beurteilen sind.
23. Bei der Bewertung von hautreizenden Reaktionen spielt auch die Reversibilität der Hautschädigung eine Rolle. Treten Reaktionen wie (begrenzter) Haarausfall, Hyperkeratose, Hyperplasie und Schuppung bis zum Ende des 14-tägigen

Beobachtungszeitraums auf, ist die Prüfchemikalie als hautreizende Chemikalie zu betrachten.

Prüfbericht

24. Der Prüfbericht muss die folgenden Angaben enthalten:

Begründung für die In-vivo-Prüfung:

- WoE-Analyse von Daten aus früheren Versuchen unter Einbeziehung von Ergebnissen aus der sequenziellen Prüfstrategie;
- Beschreibung aller einschlägigen Daten aus früheren Versuchen;
- Daten, die in den einzelnen Stufen der Prüfstrategie erhoben wurden;
- Beschreibung der durchgeführten *In-vitro*-Prüfungen mit Einzelheiten zu den angewendeten Verfahren sowie zu den Ergebnissen für Prüf-/Referenzstoffe;
- WoE-Analyse als Grundlage für die Durchführung einer *In-vivo*-Studie.

Prüfchemikalie:

- Einkomponentiger Stoff: chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS-Bezeichnung, CAS-Nummer, SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel, Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.
- Mehrkomponentiger Stoff: Gemische und Stoffe mit unbekannter oder schwankender Zusammensetzung, komplexe Reaktionsprodukte oder biologische Materialien (UVCB): so weit wie möglich charakterisiert durch die chemische Zusammensetzung (siehe oben), das quantitative Vorkommen und die relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften der einzelnen Komponenten;
- physikalisches Erscheinungsbild, Wasserlöslichkeit und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften;
- Herkunft, Chargennummer, sofern vorhanden;
- Behandlung der Prüfchemikalien/Kontrollstoffe vor der Prüfung, sofern relevant (z. B. Erwärmen, Mahlen);
- Stabilität der Prüfchemikalie, letztes Verwendungsdatum oder Datum für erneute Analyse, soweit bekannt;
- Lagerungsbedingungen.

Vehikel:

- Angaben zur Identität, (gegebenenfalls) Konzentration; Einsatzvolumen;
- Begründung der Auswahl des Vehikels.

Versuchstier(e):

- verwendete Spezies/Rasse, Begründung für den Verzicht auf die Verwendung von Albino- Kaninchen und die Nutzung anderer Tiere;
- Anzahl der Versuchstiere pro Geschlecht;
- Gewicht der einzelnen Tiere bei Versuchsbeginn und -ende;
- Alter der Tiere bei Beginn der Studie;
- Herkunft der Tiere, Haltungsbedingungen, Futter usw.

Prüfbedingungen:

- Methode der Vorbereitung der Applikationsstelle;
- Angaben zur Art der verwendeten Lämpchen sowie zur Patching-Technik;
- Angaben zur Herstellung, Applikation und Entfernung der Prüfchemikalie.

Ergebnisse:

- Tabellarische Erfassung der Bewertung des Schweregrades von Hautreizungs-/-verätzungsreaktionen zu allen Messzeitpunkten für jedes einzelne Versuchstier;
- Beschreibungen aller beobachteten Schädigungen;
- ausführliche Beschreibung von Art und Schwere der festgestellten Hautreizung bzw. -verätzung sowie Angaben zu eventuellen histopathologischen Befunden;
- Beschreibung anderer lokal begrenzter negativer (z. B. Entfettung der Haut) und systemischer Wirkungen neben den Hautreizungen bzw. -verätzungen.

Diskussion der Ergebnisse

Schlussfolgerungen

LITERATUR

- (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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.

TABELLE: BEWERTUNG VON HAUTREAKTIONEN**Bildung von Erythemen und Schorf**

Kein Erythem	0
Sehr leichtes Erythem (kaum wahrnehmbar)	1
Klar abgegrenztes Erythem	2
Mäßiges bis ausgeprägtes Erythem	3
Ausgeprägtes Erythem (dunkelrot) bis hin zur Schorfbildung, so dass eine Bewertung nicht möglich ist	4
Höchst mögliche Punktzahl: 4	

Bildung von Ödemen

Kein Ödem	0
Sehr leichtes Ödem (kaum wahrnehmbar)	1
Leichtes Ödem (Ränder des betroffenen Areals durch deutliche Schwellung klar abgegrenzt)	2
Mäßiges Ödem (Schwellung etwa 1 mm)	3
Ausgeprägtes Ödem (Schwellung mehr als 1 mm und über den Expositionsbereich hinaus)	4
Höchst mögliche Punktzahl: 4	

Zur Klärung unklarer Reaktionen kann eine histopathologische Untersuchung erfolgen.

Anlage

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

Chemikalie: Ein Stoff oder Gemisch.

Hautreizung: Das Auslösen einer reversiblen Hautschädigung nach Applikation einer Prüfchemikalie für die Dauer von bis zu 4 Stunden.

Hautverätzung: Das Auslösen einer irreversiblen Hautschädigung, d. h. einer sichtbaren, bis in das Corium reichenden Nekrose der Epidermis nach Applikation einer Prüfchemikalie für die Dauer von bis zu 4 Stunden. Verätzungsreaktionen sind gekennzeichnet durch Geschwüre, Blutungen, blutige Verschorfungen und am Ende des Beobachtungszeitraums von 14 Tagen durch eine auf ein Ausbleichen der Haut zurückzuführende Verfärbung, komplett haarlose Bereiche und Narben. Bei der Beurteilung fragwürdiger Schädigungen ist die Histopathologie mit zu berücksichtigen.

Prüfchemikalie: Ein beliebiger Stoff oder eine beliebige Mischung, der/die nach dieser Methode geprüft wird.“

(2) In Teil B erhält Kapitel B.17 folgende Fassung:

„B.17 *IN-VITRO*-GENMUTATIONSPRÜFUNG AN SÄUGETIERZELLEN ANHAND DES HPRT- UND DES XPRT-GENS

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode (PM) entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 476 (2016). Die Prüfmethode werden regelmäßig überarbeitet, um dem wissenschaftlichen Fortschritt, sich ändernden Rechtsvorgaben und Belangen des Tierschutzes gerecht zu werden. Diese überarbeitete Fassung der Prüfmethode B.17 beruht auf fast 30-jähriger Erfahrung mit dieser Prüfung sowie auf der Entwicklung einer eigenen neuen Methode für *In-vitro*-Genmutationsprüfungen an Säugetierzellen anhand des Thymidin-Kinase-Gens. Sie ist Teil einer Reihe von Prüfmethoden zur genetischen Toxikologie. Die OECD hat ein Dokument erstellt, das kurz gefasste und hilfreiche Informationen zu Untersuchungen zur genetischen Toxikologie sowie eine Übersicht über die jüngsten Änderungen der OECD-Prüfrichtlinien zur genetischen Toxikologie enthält (1).
2. Die *In-vitro*-Genmutationsprüfung an Säugetierzellen wird zum Nachweis von chemisch induzierten Genmutationen verwendet. Mit den bei dieser Prüfung verwendeten Zelllinien werden Vorwärtsmutationen in Reporter-Genen gemessen, insbesondere im endogenen Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Gen (Hprt bei Zelllinien von Nagern und HPRT bei menschlichen Zellen, bei dieser Prüfmethode gemeinsam als Hprt-Gen und als HPRT-Prüfung bezeichnet) und im Transgen von Xanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (gpt) (im Folgenden XPRT-Prüfung genannt). Durch die HPRT- und XPRT-Mutationsprüfung lassen sich unterschiedliche Spektren genetischer Ereignisse ermitteln. Neben den mit der HPRT-Prüfung nachgewiesenen Mutationsereignissen (z. B. Basenpaarsubstitutionen, Rasterverschiebungen, kleine Deletionen und Insertionen) kann die Autosomenlokation des gpt-Transgens den Nachweis von Mutationen infolge umfangreicher Deletionen und u. U. mitotischer Rekombinationen ermöglichen, die in der HPRT-Prüfung nicht erkannt wurden, weil das Hprt-Gen sich auf dem X-Chromosom befindet (2) (3) (4) (5) (6) (7). Aus rechtlichen Gründen ist die XPRT-Prüfung gegenwärtig weniger verbreitet als die HPRT-Prüfung.
3. Es gelten die Begriffsbestimmungen in Anlage 1.

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN UND BEGRENZUNGEN

4. *In vitro* durchgeführte Prüfungen erfordern in der Regel den Zusatz eines exogenen Fremdstoff-Metabolisierungssystems. Mit diesem exogenen Stoffwechselaktivierungssystem lassen sich die *In-vivo*-Bedingungen jedoch nicht gänzlich nachvollziehen.

5. Es sind unbedingt Bedingungen zu vermeiden, die zu künstlich verursachten Positivergebnissen führen könnten (d. h. mögliche Wechselwirkungen mit dem Prüfsystem), die nicht von einer direkten Interaktion zwischen den Prüfchemikalien und dem genetischen Material der Zelle herrühren; zu solchen Bedingungen gehören Veränderungen des pH-Wertes bzw. der Osmolalität (8) (9) (10), eine Interaktion mit einzelnen Komponenten des Mediums (11) (12) oder eine hochgradige Zytotoxizität (13). Zytotoxizitätswerte, die die empfohlenen Höchstwerte nach Nummer 19 überschreiten, werden mit Blick auf die HPRT-Prüfung als zu hoch betrachtet.
6. Bevor die Prüfmethode an einem Gemisch für die Generierung von Daten für einen bestimmten Regulierungszweck verwendet wird, ist zu prüfen, ob sie für den beabsichtigten Zweck angemessene Ergebnisse liefern kann und, wenn dem so ist, warum. Solche Erwägungen entfallen, wenn die Prüfung des Gemischs gesetzlich vorgeschrieben ist.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

7. Mutierte Zellen, bei denen in der HPRT-Prüfung keine Aktivität des Hprt-Enzyms bzw. in der XPRT-Prüfung keine Aktivität des xprt-Enzyms nachgewiesen wird, sind resistent gegenüber den zytostatischen Wirkungen des purinanalogen 6-Thioguanins (TG). Bei Anwesenheit von Hprt (bei der HPRT-Prüfung) bzw. von gpt (bei der XPRT-Prüfung) sind Zellen hingegen empfindlich gegenüber TG, das die Hemmung des Zellstoffwechsels verursacht und eine weitere Zellteilung verhindert. So können die Mutantenzellen bei Anwesenheit von TG proliferieren, während die normalen Zellen, die das Hprt-Enzym (bei der HPRT-Prüfung) bzw. das gpt-Enzym (bei der XPRT-Prüfung) enthalten, nicht dazu in der Lage sind.
8. Zellen in Suspensions- oder Monoschichtkultur werden über einen angemessenen Zeitraum (3-6 Stunden) mit und ohne exogenes Fremdstoff-Metabolisierungssystem (Nummer 14) mit der Prüfchemikalie behandelt und anschließend subkultiviert, um die Zytotoxizität zu bestimmen und vor der Mutantenselektion die Expression des Phänotyps zu ermöglichen (14) (15) (16) (17). Die Zytotoxizität wird anhand der relativen Überlebensrate (RS). d. h. der Klonierungseffizienz, ermittelt unmittelbar nach der Behandlung und bereinigt um Zellverluste während der Behandlung im Vergleich zur Negativkontrolle bestimmt (Nummer 18 und Anlage 2). Die behandelten Kulturen werden für einen ausreichenden Zeitraum (in der Regel mindestens 7-9 Tage), der für den jeweils gewählten Zelltyp charakteristisch ist, in einem Wachstumsmedium gehalten, um eine annähernd optimale phänotypische Expression der induzierten Mutationen zu ermöglichen. Nach der Expression des Phänotyps wird die Mutantenhäufigkeit bestimmt, indem eine bekannte Anzahl von Zellen auf ein Medium mit dem selektierenden Agens zur Bestimmung der Mutantenkolonien und auf ein Medium ohne selektierendes Agens zur Bestimmung der Klonierungseffizienz (Lebensfähigkeit) aufgeimpft wird. Nach einer geeigneten

Inkubationszeit werden die Kolonien gezählt. Die Mutantenhäufigkeit wird anhand der Anzahl der Mutantenkolonien bereinigt um die Klonierungseffizienz bei der Mutantenselektion berechnet.

BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

Vorbereitungen

Zellen

9. Die bei der HPRT- und der XPRT-Prüfung verwendeten Zelltypen sollten nachweislich eine Empfindlichkeit für chemische Mutagene, eine hohe Klonierungseffizienz, einen stabilen Karyotyp und eine geringe Spontanmutationshäufigkeit aufweisen. Für die HPRT-Prüfung werden meist die Zelllinien CHO, CHL und V79 des chinesischen Hamsters, Maus-Lymphomazellen L5178Y und menschliche Lymphoblastoidzellen TK6 verwendet (18) (19). Für die XPRT-Prüfung werden AS52-Zellen (CHO-Zellen) mit dem gpt-Transgen (nach Deletion des Hp^rt-Gens) verwendet (20) (21); die HPRT-Prüfung kann bei AS52-Zellen nicht durchgeführt werden, weil das Hp^rt-Gen deletiert wurde. Die Verwendung anderer Zelllinien sollte gerechtfertigt und validiert sein.
10. Zelllinien sind routinemäßig auf Stabilität der modalen Chromosomenzahl und Mycoplasma-Verunreinigung zu überprüfen (22) (23); bei Verunreinigung oder bei veränderter modaler Chromosomenzahl sollten Zellen nicht verwendet werden. Die normale Dauer des Zellzyklus im Prüflabor sollte bekannt sein und mit den veröffentlichten Zelleigenschaften übereinstimmen. Außerdem sollte die Spontanmutationshäufigkeit der Master-Zellenbestände geprüft werden, und bei nicht annehmbarer Mutationshäufigkeit sollten die Bestände nicht verwendet werden.
11. Vor der Verwendung bei dieser Prüfung sind die Kulturen ggf. von bereits vorhandenen Mutantenzellen zu reinigen, z. B. durch Kultivierung im HAT-Medium bei HPRT-Prüfungen und im MPA-Medium bei der XPRT-Prüfung (5) (24) (siehe Anlage 1). Die gereinigten Zellen können kryokonserviert und anschließend zur Verwendung als Arbeitsstämme wieder aufgetaut werden. Nach Erreichen der normalen Verdopplungszeiten können die frisch aufgetauten Arbeitsstämme für die Prüfungen verwendet werden. Bei Durchführung der XPRT-Prüfung sollten bei Routinekulturen von AS52-Zellen Bedingungen hergestellt werden, bei denen die Erhaltung des gpt-Transgens gewährleistet ist (20).

Medien und Kulturbedingungen

12. Die Kultivierung erfordert geeignete Kulturmedien und Inkubationsbedingungen (Kulturgefäße, befeuchtete Atmosphäre mit einer CO₂-Konzentration von 5 % und eine Inkubationstemperatur von 37 °C). Die Zellkulturen sollten immer unter Bedingungen gehalten werden, bei denen das Wachstum in der Log-Phase sichergestellt ist. Vor allem ist für Medien- und Kulturbedingungen zu sorgen, die ein optimales Zellwachstum während

der Expressionszeit und eine optimale Klonierungseffizienz der mutierenden und nichtmutierenden Zellen gewährleisten.

Vorbereitung der Kulturen

13. Zelllinien werden aus Stammkulturen gewonnen und im Kulturmedium in einer solchen Dichte überimpft, dass die Zellen in Suspensions- oder Monolayerkultur während der Behandlung und der Expressionszeit weiterhin exponentiell wachsen (z. B. sollte eine Konfluenz bei in Monolayerkultur gezüchteten Zellen vermieden werden).

Stoffwechselaktivierung

14. Bei Zellen mit unzulänglicher endogener Stoffwechselkapazität sollten exogene metabolisierende Systeme verwendet werden. Das gängigste und, sofern nicht anders begründet, standardmäßig empfohlene System, ist eine durch Ko-Faktoren ergänzte post-mitochondriale Fraktion (S9) aus der Leber von Nagern (in der Regel Ratten), die mit enzyminduzierenden Agenzien wie Aroclor 1254 (25) (26) (27) (28) oder einer Kombination aus Phenobarbiton und β -Naphthoflavon (29) (30) (31) (32) vorbehandelt wurde. Das letztgenannte Gemisch verstößt nicht gegen das Stockholmer Übereinkommen über persistente organische Schadstoffe (33) und hat sich bei der Induktion von Mischfunktionsoxidasen als ebenso wirksam wie Aroclor 1254 erwiesen (29) (31). Die S9-Fraktion wird im Endmedium in der Regel in Konzentrationen von 1 bis 2 % v/v verwendet, kann jedoch auf 10 % v/v erhöht werden. Die Wahl der Art und Konzentration des exogenen Metabolisierungssystems oder metabolischen Agens ist möglicherweise von der geprüften Stoffklasse abhängig (34) (35) (36).

Vorbereitung der Prüfchemikalie

15. Feste Prüfchemikalien sollten vor der Zellbehandlung in geeigneten Lösungsmitteln gelöst und ggf. verdünnt werden (Nummer 16). Flüssige Prüfchemikalien können dem Versuchssystem vor der Behandlung direkt beigegeben und/oder verdünnt werden. Gasförmige oder flüchtige Prüfchemikalien sind durch entsprechende Modifikationen der Standardprotokolle zu prüfen, z. B. durch Behandlung in hermetisch verschlossenen Kulturgefäßen (37) (38). Zubereitungen der Prüfchemikalie sollten kurz vor der Behandlung hergestellt werden, es sei denn, die Stabilität der Chemikalie bei Lagerung wird nachgewiesen.

PRÜFBEDINGUNGEN

Lösungsmittel

16. Das Lösungsmittel sollte so gewählt werden, dass eine optimale Löslichkeit der Prüfchemikalien gewährleistet ist, ohne dass die Durchführung der Prüfung beeinträchtigt wird, z. B. durch Veränderung des Zellwachstums, Beeinträchtigung der Integrität der Prüfchemikalie, Reaktion mit Kulturgefäßen oder Behinderung des

Metabolisierungssystemen. Nach Möglichkeit sollte ein wässriges Lösungsmittel (oder Kulturmedium) verwendet werden. Gründlich erprobte Lösungsmittel sind z. B. Wasser und Dimethylsulfoxid. Organische Lösungsmittel sollten 1 % v/v und wässrige Lösungsmittel (Kochsalzlösung oder Wasser) 10 % v/v im Endmedium möglichst nicht überschreiten. Kommen weniger gründlich erprobte Lösungsmittel zur Verwendung (z. B. Ethanol oder Aceton), ist deren Verwendung durch Daten zu stützen, die belegen, dass sie mit den Prüfchemikalien und mit dem Prüfsystem verträglich und in der verwendeten Konzentration nicht genotoxisch sind. Sind keine entsprechenden Belege verfügbar, sollten unbedingt unbehandelte Kontrollen (siehe Anlage 1) einbezogen werden, um nachzuweisen, dass durch die gewählten Lösungsmittel keine schädlichen oder mutagenen Wirkungen ausgelöst werden.

Messung der Zytotoxizität und Auswahl der Expositionskonzentrationen

17. Bei der Bestimmung der höchsten Konzentration der Prüfchemikalie sind Konzentrationen zu vermeiden, die zu künstlich positiven Reaktionen führen können, z. B. zu übermäßiger Zytotoxizität (Nummer 20), Ausfällungen im Kulturmedium (Nummer 21) oder ausgeprägten Veränderungen des pH-Werts oder der Osmolalität (Nummer 5). Sofern die Prüfchemikalie zum Zeitpunkt der Zugabe den pH-Wert des Mediums erheblich verändert, lässt sich der pH-Wert auch durch Anwendung eines Puffers im Endmedium einstellen, damit künstlich positive Reaktionen vermieden und geeignete Kulturbedingungen aufrechterhalten werden.
18. Die Konzentrationen werden u. a. nach der Zytotoxizität ausgewählt (Nummern 20-22). Wenngleich die Bewertung der Zytotoxizität im Rahmen eines Vorversuchs nützlich sein kann, um eine bessere Bestimmung der im Hauptversuch verwendeten Konzentrationen vornehmen zu können, ist ein Vorversuch nicht erforderlich. Auch wenn die anfängliche Zytotoxizität bewertet wird, ist im Hauptversuch die Zytotoxizität jeder einzelnen Kultur zu messen. Die Zytotoxizität sollte anhand der relativen Überlebensrate (RS) (d. h. der Klonierungseffizienz (CE)) von Zellen ermittelt werden, die nach der Behandlung umgehend plattiert werden; dabei ist eine Bereinigung um Zellverluste während der Behandlung auf der Grundlage der Zellzahl im Vergleich zur bereinigten Klonierungseffizienz bei Negativkontrollen (mit einer Überlebensrate von 100 %) vorzunehmen (Formel siehe Anlage 2).
19. Es sollten mindestens vier Prüfkonzentrationen (ausgenommen das Lösungsmittel und Positivkontrollen) ausgewertet werden, die die Akzeptanzkriterien erfüllen (geeignete Zytotoxizität, Anzahl der Zellen usw.). Die Verwendung von Zweifachkulturen ist zu empfehlen, doch können für jede überprüfte Konzentration auch Replikat- oder Einfachkulturen herangezogen werden. Die Ergebnisse aus den unabhängigen Replikatkulturen bei einer gegebenen Konzentration sollten getrennt angegeben werden, können zu Datenanalysezwecken aber auch gepoolt werden (17). Bei Prüfchemikalien mit geringer Zytotoxizität oder ohne zytotoxische Wirkung sind in der Regel

Konzentrationsintervalle mit zwei- bis dreifacher Konzentration geeignet. Wenn zytotoxische Wirkungen auftreten, sollten die Prüfkonzentrationen einen Bereich ausgehend vom Wert, bei dem die Zytotoxizität deutlich wird, bis zu Konzentrationen mit mäßiger oder geringer oder nicht vorhandener Toxizität umfassen. Viele Prüfchemikalien zeigen steile Konzentrations-Wirkungs-Kurven. Um Daten zu mäßiger oder geringer Toxizität zu erhalten oder um die Dosis-Wirkungs-Beziehungen im Einzelnen auszuwerten, kann es daher erforderlich sein, Konzentrationen mit kleineren Abständen und/oder mehr als vier Konzentrationen zu verwenden, insbesondere in Fällen, in denen ein Wiederholungsversuch erforderlich ist (Nummer 43). Die Verwendung von mehr als 4 Konzentrationen kann besonders bei Verwendung von Einfachkulturen wichtig sein.

20. Wenn die Höchstkonzentration auf der Zytotoxizität beruht, sollte bei der Höchstkonzentration eine relative Überlebensrate von 10-20 % erreicht werden. Besondere Sorgfalt ist dann geboten, wenn positive Ergebnisse nur bei relativen Überlebensraten von höchstens 10 % zu verzeichnen sind (Nummer 43).
21. Im Falle schwer löslicher Chemikalien, die bei Konzentrationen unterhalb der niedrigsten unlöslichen Konzentration nicht zytotoxisch sind, sollte die höchste analysierte Konzentration am Ende der Behandlung mit der Prüfchemikalie eine Trübung oder eine mit bloßem Auge oder mithilfe eines Inversmikroskops erkennbare Ausfällung bewirken. Auch wenn die Zytotoxizität oberhalb der niedrigsten unlöslichen Konzentration auftritt, ist es ratsam, nur eine Konzentration zu testen, bei der es zu einer Trübung oder sichtbaren Ausfällung kommt, da künstliche Wirkungen eine Folge dieser Ausfällung sein könnten. Bei der Konzentration, bei der es zu einer Ausfällung kommt, ist unbedingt sicherzustellen, dass die Ausfällung nicht die Durchführung des Versuchs beeinträchtigt. Es ist möglicherweise sinnvoll, die Löslichkeit im Kulturmedium vor dem Versuch zu bestimmen.
22. Wird keine Ausfällung bzw. keine grenzwertige Zytotoxizität beobachtet, sollte die höchste Versuchskonzentration 10 mM, 2 mg/ml oder 2 µl/ml entsprechen, je nachdem, welcher Wert der niedrigere ist (39) (40). Sofern die Zusammensetzung der Prüfchemikalie nicht genau definiert ist, z. B. ein Stoff mit unbekannter oder schwankender Zusammensetzung, komplexe Reaktionsprodukte oder biologische Materialien (UVCB) (41), Umweltextrakte usw., muss die höchste Konzentration möglicherweise höher angesetzt werden (z. B. bei 5 mg/ml), sofern keine ausreichende Zytotoxizität vorhanden ist, um die Konzentration der einzelnen Bestandteile zu erhöhen. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass diese Anforderungen sich von denen für Humanpharmazeutika unterscheiden können (42).

Kontrollen

23. Bei allen Versuchsbedingungen sind jeweils gleichzeitige Negativkontrollen (Nummer 16) anzulegen, bei denen das Behandlungsmedium lediglich Lösungsmittel enthält, die ansonsten aber auf die gleiche Weise behandelt wurden wie die Behandlungskulturen.

24. Gleichzeitige Positivkontrollen müssen angelegt werden, um die Eignung des Labors zum Nachweis von Mutagenen unter den Bedingungen des verwendeten Prüfprotokolls sowie ggf. die Wirksamkeit des exogenen Metabolisierungssystems nachzuweisen. Beispiele für Positivkontrollen sind der folgenden Tabelle 1 zu entnehmen. Es können andere geeignete Positivkontrollstoffe verwendet werden, sofern dies begründet ist. Da *In-vitro*-Prüfungen an Säugetierzellen auf genetische Toxizität hinreichend standardisiert sind, können Prüfungen anhand von Behandlungen mit und ohne exogene Stoffwechselaktivierung mit einer einzelnen Positivkontrolle durchgeführt werden, bei der eine Stoffwechselaktivierung erforderlich ist. In diesem Fall wird durch die Reaktion einer einzelnen Positivkontrolle sowohl die Aktivität des Stoffwechselaktivierungssystems als auch die Reaktionsfähigkeit des Prüfsystems nachgewiesen. Jede Positivkontrolle sollte bei einer oder mehreren Konzentrationen durchgeführt werden, die voraussichtlich eine reproduzierbare und erkennbare Zunahme gegenüber dem Hintergrund ergeben, womit sich die Empfindlichkeit des Versuchssystems nachweisen lässt, und die Wirkung sollte nicht durch einen Zytotoxizitätswert beeinträchtigt werden, der die in dieser Prüfmethode vorgegebenen Grenzen überschreitet (Nummer 20).

Tabelle 1: Zur Beurteilung der Eignung des Labors und zur Wahl der Positivkontrollen empfohlene Referenzstoffe.

Stoffwechselaktivierungsstatus	Lage	Stoff und CAS-Nr.
Ohne exogene Stoffwechselaktivierung	<i>Hprt</i>	Ethylmethansulfonat [CAS-Nr. 62-50-0] Ethylnitrosoharnstoff (ENU) [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]
Mit exogener Stoffwechselaktivierung	<i>Hprt</i>	3-Methylcholanthren [CAS-Nr. 56-49-5] 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)

VERFAHREN

Behandlung mit der Prüfchemikalie

25. Proliferierende Zellen werden mit und ohne Stoffwechselaktivierungssystem mit der Prüfchemikalie behandelt. Die Exposition sollte über einen geeigneten Zeitraum (gewöhnlich 3 bis 6 Stunden) erfolgen.
26. Die Mindestzahl der für jede Prüfung und im jeweiligen Stadium der Prüfung verwendeten Zellen (Kontrolle und behandelte Kultur) sollte auf der Spontanmutationshäufigkeit beruhen. Als Faustregel ist anzunehmen, dass die Anzahl an behandelten Zellen und an Passagen so groß sein muss, dass in jeder einzelnen Kultur und in allen Phasen der Prüfung

ständig 10 Spontanmutationen zu verzeichnen sind (17). Die Spontanmutationshäufigkeit liegt in der Regel zwischen 5 und 20×10^{-6} . Um eine hinreichende Anzahl an Spontanmutationen (mindestens 10) bei einer Spontanmutationshäufigkeit von 5×10^{-6} zu erhalten, müssten selbst bei Kulturen, die mit Konzentrationen behandelt wurden, bei denen sich eine Zytotoxizität von 90 % (relative Überlebensrate 10 %) ergibt, mindestens 20×10^6 Zellen behandelt werden. Außerdem muss während der Expressionszeit eine hinreichende Anzahl an Zellen (mindestens 2 Millionen) kultiviert und zur Mutantenselektion plattiert werden (17).

Expressionszeit des Phänotyps und Messung der Mutationshäufigkeit

27. Nach der Dauer der Behandlung werden die Zellen kultiviert, um die Expression des Mutantenphänotyps zu ermöglichen. Im Allgemeinen sind mindestens 7-9 Tage hinreichend für eine annähernd optimale phänotypische Expression neu induzierter Hprt- und xprt-Mutanten (43) (44). In diesem Zeitraum werden Zellen regelmäßig subkultiviert, um ein exponentielles Wachstum aufrechtzuerhalten. Nach der phänotypischen Expression werden die Zellen im Medium mit und ohne selektierendes Agens (6-Tioguanin) nochmals plattiert, um die Anzahl der Mutanten bzw. die Klonierungseffizienz zum Zeitpunkt der Selektierung zu bestimmen. Diese Plattierung kann mit Schalen für Monoschichtkulturen oder mit Mikrotiterplatten für Zellen in Suspensionskultur vorgenommen werden. Für die Mutantenselektion sollten die Zellen mit einer Dichte plattiert werden, bei der eine optimale Wiederfindung der Mutanten gewährleistet ist (d. h. eine metabolische Kooperation vermieden wird) (17). Die Platten werden über einen angemessenen Zeitraum für ein optimales Koloniewachstum (z. B. 7-12 Tage) inkubiert. Anschließend werden die Kolonien gezählt. Die Mutantenhäufigkeit wird anhand der Anzahl der Mutantenkolonien bereinigt um die Klonierungseffizienz bei der Mutantenselektion berechnet (Formeln siehe Anlage 2).

Kompetenz des Labors

28. Um ausreichende Erfahrungen mit der Prüfung zu sammeln, bevor routinemäßige Prüfungen erfolgen, sollte das Labor eine Reihe von Versuchen mit positiven Referenzstoffen durchgeführt haben, die sich unterschiedlicher Mechanismen (mindestens ein aktiver Mechanismus mit und ein aktiver Mechanismus ohne Stoffwechselaktivierung, ausgewählt aus den in Tabelle 1 aufgeführten Stoffen) und verschiedener Negativkontrollen (unter Verwendung verschiedener Lösungsmittel/Vehikel) bedienen. Die Reaktionen dieser Positiv- und Negativkontrollen sollten mit der Literatur im Einklang stehen. Dies gilt nicht für erfahrene Labors, d. h. für Labors, die über eine Datenbank mit historischen Daten gemäß der Definition unter den Nummern 30 bis 33 verfügen.
29. Unabhängig davon, ob eine Stoffwechselaktivierung gegeben ist, sollte eine Auswahl von Positivkontrollstoffen (siehe Tabelle 1 in Nummer 25) untersucht werden, um die Fähigkeit zur Erkennung mutagener Chemikalien nachzuweisen und die Wirksamkeit des

Stoffwechselaktivierungssysteme zu ermitteln und zum einen die Eignung der Bedingungen für das Zellwachstum während der Behandlung sowie für die phänotypische Expression und für die Mutantenselektion und zum anderen die Eignung der Auswertungsverfahren zu belegen. Zum Nachweis der Empfindlichkeit und dynamischen Bandbreite des Versuchssystems sollte eine Spanne der Konzentrationen der ausgewählten Stoffe festgelegt werden, um reproduzierbare und konzentrationsbezogene Zunahmen gegenüber dem Hintergrund zu erhalten.

Historische Kontrolldaten

30. Das Labor sollte Folgendes bestimmen:

- Bereich und Verteilung historischer Positivkontrollen und
- Bereich und Verteilung historischer Negativkontrollen (unbehandelt, Lösungsmittel).

31. Beim erstmaligen Erwerb von Daten zur Verteilung einer historischen Negativkontrolle sollten gleichzeitige Negativkontrollen veröffentlichten Kontrolldaten entsprechen (22). Werden weitere Versuchsdaten zur Verteilung der Kontrollen hinzugefügt, sollten gleichzeitige Negativkontrollen idealerweise innerhalb von 95% der Kontrollgrenzen der gewählten Verteilung liegen (17) (45) (46).

32. Die Datenbank des Labors zu historischen Negativkontrollen sollte zunächst mit mindestens 10 Versuchen angelegt werden. Vorzugsweise sollte sie jedoch aus mindestens 20 Versuchen bestehen, die unter vergleichbaren Versuchsbedingungen durchgeführt wurden. Labors sollten Qualitätskontrollverfahren anwenden, wie z. B. Qualitätsregelkarten (z. B. C-Karten oder X-Bar-Karten (47)), um zu ermitteln, wie variabel ihre Positiv- und Negativkontrolldaten sind, und um nachzuweisen, dass die Methodik in ihrem Labor kontrolliert wird (46). Weitere Empfehlungen zum Aufbau und zur Verwendung von Sammlungen historischer Daten (d. h. Kriterien für die Aufnahme und den Ausschluss von Daten in bzw. aus historischen Datensätzen und die Akzeptanzkriterien für einen bestimmten Versuch) sind den Literaturangaben zu entnehmen (45).

33. Negativkontrolldaten sollten die Mutantenhäufigkeit aus einer Einzelkultur oder vorzugsweise aus Replikatkulturen erfassen, wie in Nummer 23 beschrieben. Gleichzeitige Negativkontrollen sollten idealerweise innerhalb der Kontrollgrenzen von 95% der gewählten Verteilung in der Datenbank des Labors zu historischen Negativkontrollen liegen (17) (45) (46). Sofern gleichzeitige Negativkontrolldaten außerhalb der Kontrollgrenzen von 95% liegen, ist es zulässig, sie in die historische Kontrollverteilung aufzunehmen, solange es sich bei den Daten nicht um „extreme Ausreißer“ handelt und nachgewiesen werden kann, dass das Prüfsystem kontrolliert wird (siehe oben) und nachweislich kein technisches oder menschliches Versagen vorliegt.

34. Sämtliche Änderungen am Versuchsprotokoll sind auf ihre Übereinstimmung mit den bereits vorhandenen Datenbanken historischer Kontrolldaten des Labors zu prüfen. Bei größeren Inkonsistenzen sollte eine neue Datenbank historischer Kontrolldaten erstellt werden.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Darstellung der Prüfergebnisse

35. Die Darstellung der Prüfergebnisse sollte sämtliche für die Berechnung der Zytotoxizität (ausgedrückt als relative Überlebensrate) erforderlichen Daten beinhalten. Die Daten für behandelte Kulturen und für Kontrollkulturen sollten die Anzahl der Zellen am Ende der Behandlung, die Anzahl der unmittelbar nach der Behandlung plattierten Zellen und die Koloniezahlen (bzw. bei der Mikrotitermethode die Anzahl der Vertiefungen ohne Kolonien) beinhalten. Die relative Überlebensrate der Kulturen sollten jeweils als Prozentanteil der gleichzeitigen Lösungsmittelkontrolle ausgedrückt werden (Begriffsbestimmungen siehe Anlage 1).
36. Die Darstellung der Prüfergebnisse sollte zudem sämtliche für die Berechnung der Mutantenhäufigkeit erforderlichen Daten beinhalten. Die Daten für behandelte Kulturen und Kontrollkulturen sollten Folgendes umfassen: (1) die Anzahl der mit und ohne selektierendes Agens plattierten Zellen (zum Zeitpunkt der Plattierung der Zellen zur Mutantenselektion) und (2) die ermittelte Koloniezahl (bzw. bei der Mikrotitermethode die Anzahl der Vertiefungen ohne Kolonien) auf den Platten mit und ohne selektierendes Agens. Die Mutantenhäufigkeit wird anhand der Anzahl der Mutantenkolonien (auf den Platten mit dem selektierenden Agens) bereinigt um die Klonierungseffizienz (auf den Platten ohne selektierendes Agens) berechnet. Die Mutantenhäufigkeit sollte als Anzahl der Mutantenzellen pro Million lebensfähiger Zellen ausgedrückt werden (Begriffsbestimmungen siehe Anlage 1).
37. Die Daten der einzelnen Kulturen sind zu dokumentieren. Zusätzlich sollten alle Daten in tabellarischer Form zusammengefasst werden.

Akzeptanzkriterien

38. Die Akzeptanz eines Versuchs beruht auf folgenden Kriterien:
- Die Daten der gleichzeitigen Negativkontrolle gelten als zulässig für die Aufnahme in die Datenbank des Labors mit historischen Negativkontrolldaten (Nummer 33).
 - Gleichzeitige Positivkontrollen (Nummer 24) sollten Reaktionen hervorrufen, die mit den Reaktionen kompatibel sind, die in der Datenbank für historische Positivkontrollen erzeugt werden, und, verglichen mit den gleichzeitigen Negativkontrollen, eine statistisch signifikante Zunahme aufweisen.

- Zwei Versuchsbedingungen (d. h. mit und ohne Stoffwechselaktivierung) wurden geprüft, wenn nicht bei einem Versuch positive Ergebnisse ermittelt wurden (Nummer 25).
- Eine angemessene Zahl an Zellen und Konzentrationen ist analysierbar (Nummern 25, 26 und 19).
- Die Kriterien für die Auswahl der höchsten Konzentration entsprechen den Kriterien unter den Nummern 20, 21 und 22.

Beurteilung und Auswertung

39. Unter der Voraussetzung, dass alle Akzeptanzkriterien erfüllt sind, gilt eine Prüfchemikalie als eindeutig positiv, wenn bei einer der getesteten Versuchsbedingungen

- mindestens eine der Versuchskonzentrationen, verglichen mit der gleichzeitigen Negativkontrolle, eine statistisch signifikante Zunahme aufweist,
- ein geeigneter Trendtest zeigt, dass die Zunahme konzentrationsabhängig ist,
- Ergebnisse außerhalb der Verteilung der historischen Negativkontrolldaten liegen (z. B. Kontrollgrenze von 95 % beruhend auf einer Poisson-Verteilung, siehe Nummer 33).

Sind all diese Kriterien erfüllt, wird davon ausgegangen, dass die Prüfchemikalie in diesem Versuchssystem Genmutationen in Säugerzellkulturen auslösen kann. Für Empfehlungen zu den am besten geeigneten statistischen Methoden siehe Literaturhinweise (46) (48).

40. Unter der Voraussetzung, dass alle Akzeptanzkriterien erfüllt sind, gilt eine Prüfchemikalie als eindeutig negativ, wenn unter allen untersuchten Versuchsbedingungen

- keine der Versuchskonzentrationen eine statistisch signifikante Zunahme gegenüber der gleichzeitigen Negativkontrolle aufweist,
- die Bewertung anhand einer geeigneten Trendprüfung keine konzentrationsabhängige Zunahme ergibt,
- alle Ergebnisse innerhalb der Verteilung der historischen Negativkontrolldaten liegen (z. B. Kontrollgrenze von 95 % beruhend auf einer Poisson-Verteilung, siehe Nummer 33).

Es wird dann davon ausgegangen, dass die Prüfchemikalie keine Genmutationen in Säugerzellkulturen in diesem Versuchssystem auslösen kann.

41. Bei einer eindeutig positiven oder negativen Reaktion ist eine Verifizierung nicht erforderlich.

42. In den Fällen, in denen die Reaktion, wie oben beschrieben, weder eindeutig negativ noch eindeutig positiv ist, oder um die biologische Relevanz eines Ergebnisses zu untermauern, sollten die Daten durch eine fachkundige Beurteilung und/oder anhand weiterer Untersuchungen bewertet werden. Die Durchführung eines Wiederholungsversuchs,

möglicherweise unter veränderten Versuchsbedingungen (z. B. Abstände der Konzentrationen, andere Metabolisierungsbedingungen (d. h. Konzentration (S9) oder Herkunft (S9)), könnten hilfreich sein.

43. In seltenen Fällen erlaubt der Datensatz selbst nach weiteren Untersuchungen keine definitive Aussage zu positiven oder negativen Ergebnissen. Daher sollte die Reaktion der Prüfchemikalie als nicht eindeutig eingestuft werden (d. h. für ein positives und für ein negatives Ergebnis besteht die gleiche Wahrscheinlichkeit).

Prüfbericht

44. Der Prüfbericht sollte folgende Angaben enthalten:

Prüfchemikalie:

- Herkunft, Chargennummer, ggf. begrenztes Verwendungsdatum;
- Stabilität der Prüfchemikalie, falls bekannt;
- Löslichkeit und Stabilität der Prüfchemikalie im Lösungsmittel, falls bekannt;
- Messung des pH-Werts, Osmolalität und ggf. Niederschlag im Kulturmedium, dem die Prüfchemikalie zugegeben wurde.

Einkomponentiger Stoff:

- physikalisches Erscheinungsbild, Wasserlöslichkeit und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften;
- chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS-Bezeichnung, CAS-Nummer, SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel, Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.

Mehrkomponentiger Stoff, UVCB-Stoffe und Gemische:

- so weit wie möglich charakterisiert durch die chemische Zusammensetzung (siehe oben), das quantitative Vorkommen und die relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften der einzelnen Komponenten.

Lösungsmittel:

- Begründung der Auswahl des Lösungsmittels;
- Anteil des Lösungsmittels im endgültigen Kulturmedium.

Zellen:

Bei Labor-Masterkulturen:

- Art, Herkunft der Zelllinien;

- Passagenanzahl (wenn verfügbar) und Laborgeschichte;
- Karyotypmerkmale und/oder Modalzahl der Chromosomen;
- zum Erhalt der Zellkultur verwendete Verfahren;
- Nichtvorhandensein von Mycoplasma;
- Verdopplungszeit der Zellen.

Prüfbedingungen:

- Begründung der Wahl der Konzentrationen und der Anzahl der Kulturen, darunter z. B. Angaben zur Zytotoxizität und Löslichkeitsgrenze;
- Medienzusammensetzung, CO₂-Konzentration, Feuchtigkeit;
- Konzentration der Prüfchemikalie, ausgedrückt als Endkonzentration im Kulturmedium (z. B. µg oder mg/ml oder mM des Kulturmediums);
- Konzentration (und/oder Volumen) des Lösungsmittels und der beigegebenen Prüfchemikalie im Kulturmedium;
- Inkubationstemperatur;
- Inkubationszeit;
- Behandlungsdauer;
- Zelldichte während der Behandlung;
- Art und Zusammensetzung des Stoffwechselaktivierungssystems (Herkunft von S9, Zubereitungsmethode des S9-Gemisches, Konzentration oder Volumen des S9-Gemisches und S9 im Endmedium, Qualitätskontrollen von S9);
- Positiv- und Negativkontrollstoffe, Endkonzentrationen für die jeweiligen Behandlungsbedingungen;
- Dauer der Expressionszeit (ggf. einschließlich Anzahl der überimpften Zellen, Subkulturen und Medienwechsel);
- Bezeichnung und Konzentration des selektierenden Agens;
- Akzeptanzkriterien der Prüfungen;
- Methoden zur Zählung der lebensfähigen und mutierten Zellen;
- Methoden zur Bestimmung der Zytotoxizität;
- evtl. zusätzliche Angaben zur Zytotoxizität und zum verwendeten Verfahren;
- Inkubationszeiten nach dem Plattieren;
- Kriterien zur Einstufung der Studien als positiv, negativ oder nicht eindeutig;

- Methoden zur Bestimmung von pH-Wert, Osmolalität und Ausfällung.

Ergebnisse:

- Anzahl der behandelten Zellen und Anzahl der subkultivierten Zellen der einzelnen Kulturen;
- Bestimmung der Zytotoxizität und ggf. sonstige Beobachtungen;
- Ausfällungszeichen und Bestimmungszeit;
- Anzahl der plattierten Zellen im selektiven und im nicht selektiven Medium;
- Anzahl der Kolonien im nicht selektiven Medium und Anzahl der resistenten Kolonien im selektiven Medium sowie entsprechende Mutantenhäufigkeiten;
- nach Möglichkeit Dosis-Wirkungs-Verhältnis;
- Daten zu gleichzeitigen Negativ-(Lösungsmittel-)Kontrollen und Positivkontrollen (Konzentrationen und Lösungsmittel);
- Daten zu historischen Negativ-(Lösungsmittel-)Kontrollen und Positivkontrollen mit Bereichen, Mittelwerten und Standardabweichungen und Konfidenzintervall (z. B. 95 %) sowie Anzahl der Datensätze;
- statistische Analysen (für einzelne Kulturen und (ggf.) für gepoolte Replikatkulturen) sowie ggf. p-Werte.

Diskussion der Ergebnisse.

Schlussfolgerung

LITERATUR

- (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. und Tindall, K.R. (Hrsg.) (1987). Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, New York.
- (3) Chu, E.H.Y. und 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. und 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. und Stankowski, L.F. Jr. (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. und 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. und 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. und 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. und 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. und Marzin, D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid.

- Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Arch. Mol. Mutation Res.*, 49, 439-452.
- (12) Long, L.H., Kirkland, D., Whitwell, J. und 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. und 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. und 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. und 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. und 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. und Asquith, J.C. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Hrsg.), CambridgeUniversity Press, S. 66-101.
 - (18) Hsie, A.W., Casciano, D.A., Couch, D.B., Krahn, D.F., O'Neill, J.P. und 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, L.F. Jr., Machanoff, R. und 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. und 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 in Vorbereitung).
- (23) Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Hay, R., Merten, O.W., Price, A., Schechtman, L., Stacey, G. und 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. und 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. und 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. und 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. und 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. und 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. und 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. und 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. und Philpot, R.M. (Hrsg.), Elsevier, North-Holland, S. 85-88.

- (31) Ong, T.-M., Mukhtar, M., Wolf, C.R. und 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. und 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). Stockholmer Übereinkommen über persistente organische Schadstoffe, Umweltprogramm der Vereinten Nationen (UNEP). Abrufbar unter: [<http://www.pops.int.html>].
- (34) Tan, E.-L. und 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 Cammalian Cells (CHO/HGPRT system): Enhancement by Calcium Phosphate. *Environ. Mol. Mutation.*, 4, 7-18.
- (36) Li, A.P. (1984). Use of Aroclor 1254-Induced Rat Liver Homogenate in the Assaying of Promutagens in Chinese Hamster Ovary Cells. *Environ. Mol. Mutation*, 4, 7-18.
- (37) Krahn, D.F., Barsky, F.C. und McCooey, K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (Hrsg.). *Genotoxic Effects of Airborne Agents*. New York, Plenum, S. 91-103.
- (38) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. und 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. Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Arch. 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). Auf Anfrage erhältlich von der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung.
- (40) Brookmire, L., Chen, J.J. und 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. Abrufbar unter: [\[https://federalregister.gov/a/2012-13774\]](https://federalregister.gov/a/2012-13774).
- (43) O'Neill, J.P. und 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. und 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. und 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (47) Richardson, C., Williams, D.A., Allen, J.A., Amphlett, G., Chanter, D.O. und Phillips, B. (1989). Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Kirkland, D.J., (Hrsg.) Cambridge University Press, Cambridge, S. 141-154.
- (48) Fleiss, J. L., Levin, B. und Paik, M. C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

Anlage 1

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

Basenpaaraustauschmutagene: Chemikalien, die den Austausch von Basenpaaren in der DNA verursachen.

Chemikalie: Ein Stoff oder ein Gemisch.

Expressionszeit des Phänotyps: Die Zeit nach der Behandlung, in der sich die genetische Alteration im Genom ausprägt und bereits vorhandene Genprodukte so weit abgebaut werden, dass die phänotypischen Eigenschaften verändert werden.

Genotoxisch: Ein allgemeiner Begriff, der alle Typen von DNA- oder Chromosomenschädigungen umfasst, einschließlich DNA-Brüchen, Addukt-Neubildungen, Mutationen, Chromosomenaberrationen sowie Aneuploidie. Nicht alle genotoxischen Effekte führen zu Mutationen oder stabilen Chromosomenschäden.

HAT-Medium: Medium, das Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin enthält und verwendet wird, um Kulturen von Hp^rt-Mutanten zu reinigen.

Klonierungseffizienz: Der Prozentanteil der mit einer niedrigen Dichte plattierten Zellen, die sich zu einer zählbaren Kolonie entwickeln können.

Konzentrationen: Endkonzentrationen der Prüfchemikalie im Kulturmedium

Lösungsmittelkontrolle: Allgemeiner Begriff zur Bezeichnung der Kontrollkulturen, die nur mit dem Lösungsmittel behandelt werden, das verwendet wird, um die Prüfchemikalie zu lösen.

Mitotische Rekombination: Während der Mitose Rekombination homologer Chromatiden, die zur Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen oder einem Verlust der Heterozygotie führen kann.

MPA-Medium: Medium, das Xanthin, Adenin, Thymidin, Aminopterin und Mycophenolsäure enthält und verwendet wird, um Kulturen von Xp^rt-Mutanten zu reinigen.

Mutagen: Auslöser einer Erbgutveränderung der DNA-Basenpaarsequenz(en) in Genen oder in der Chromosomenstruktur (Chromosomenaberrationen).

Mutationshäufigkeit: Anzahl der ermittelten Mutantenkolonien geteilt durch die Anzahl der im selektierenden Medium plattierten Zellen, bereinigt um die Klonierungseffizienz (oder die Lebensfähigkeit) zum Zeitpunkt der Selektierung.

Prüfchemikalie: Stoff oder Gemisch, der/das mit dieser Prüfmethode untersucht wird.

Rasterschubmutagene: Chemikalien, die die Addition oder Deletion eines oder mehrerer Basenpaare im DNA-Molekül verursachen.

Relative Überlebensrate: Die relative Überlebensrate ist ein Maß der behandlungsbedingten Zytotoxizität. Sie ist identisch mit Klonierungseffizienz von Zellen, die nach der Behandlung umgehend plattiert werden; dabei ist eine Bereinigung um Zellverluste während der Behandlung im Vergleich zur Klonierungseffizienz bei Negativkontrollen (mit einer Überlebensrate von 100 %) vorzunehmen.

S9-Gemisch: Gemisch aus der S9-Leberfraktion und für die metabolische Enzymaktivität notwendigen Ko-Faktoren.

S9-Leberfraktionen: Überstand des Leberhomogenats nach Zentrifugieren bei 9000 g, d. h. Rohleberextrakt.

Unbehandelte Kontrolle: Kulturen, die nicht behandelt werden (d. h. weder mit der Prüfchemikalie noch mit Lösungsmittel), jedoch gleichzeitig in gleicher Weise aufgearbeitet werden wie die Kulturen, die mit der Prüfchemikalie behandelt werden.

UVCB: Chemische Stoffe mit unbekannter oder schwankender Zusammensetzung, komplexe Reaktionsprodukte oder biologische Materialien.

Vorwärtsmutation: Genmutation vom Elterntyp zur mutierten Form, die eine Veränderung oder den Ausfall der Enzymaktivität oder der Funktion des kodierten Proteins bewirkt.

Zytotoxizität: Bei den Versuchen im Zusammenhang mit dieser Prüfmethode wird Zytotoxizität definiert als eine Reduzierung der relativen Überlebensrate der behandelten Zellen gegenüber der Negativkontrolle (siehe einschlägige Nummer).

Anlage 2

FORMELN ZUR BEWERTUNG DER ZYTOTOXIZITÄT UND DER MUTANTENHÄUFIGKEIT

Die Zytotoxizität wird anhand der relativen Überlebensrate ermittelt, d. h. anhand der Klonierungseffizienz (CE) von Zellen, die nach der Behandlung umgehend plattiert werden; dabei ist eine Bereinigung um Zellverluste während der Behandlung im Vergleich zur bereinigten Klonierungseffizienz bei Negativkontrollen (mit einer Überlebensrate von 100 %) vorzunehmen (siehe folgende Formel zur Berechnung der relativen Überlebensrate).

Die bereinigte CE einer mit einer Prüfmethode behandelten Kultur wird wie folgt berechnet:

$$\text{Bereinigte CE} = \frac{\text{Anzahl der Zellen am Ende der Behandlung}}{\text{Anzahl der Zellen bei Beginn der Behandlung}}$$

Die relative Überlebensrate (RS) einer mit einer Prüfmethode behandelten Kultur wird wie folgt berechnet:

$$\text{RS} = \frac{\text{Bereinigte CE der behandelten Kultur}}{\text{Bereinigte CE der Lösungsmittelkontrolle}} \times 100$$

Als Mutantenhäufigkeit wird die Klonierungseffizienz von Mutantenkolonien im selektierenden Medium geteilt durch die zum Zeitpunkt der Selektierung in einem nicht selektierenden Medium für dieselbe Kultur ermittelte Klonierungseffizienz bezeichnet.

$$\text{Mutantenhäufigkeit} = \frac{\text{Klonierungseffizient von Mutantenkolonien im selektierenden Medium}}{\text{Klonierungseffizienz im nicht selektierenden Medium}}$$

Verwendung von Platten zur Ermittlung der Klonierungseffizienz:

CE = Anzahl der plattierten Kolonien/Zellen.

Verwendung von Mikrotiterplatten zur Ermittlung der Klonierungseffizienz:

Die Anzahl der Kolonien je Vertiefung auf den Mikrotiterplatten entwickelt sich entsprechend der Poisson-Verteilung.

Klonierungseffizienz = $-\text{LnP}(0)$ / Anzahl der pro Vertiefung plattierten Zellen

Wobei $-\text{LnP}(0)$ = wahrscheinliche Anzahl leerer überimpfter Vertiefungen; diese Anzahl wird mit der folgenden Formel beschrieben:

$\text{LnP}(0) = -\text{Ln} (\text{Anzahl leerer Vertiefungen} / \text{Anzahl plattierter Vertiefungen})$

(3) In Teil B erhält Kapitel B.22 folgende Fassung:

„B.22 DOMINANT-LETAL-PRÜFUNG AN NAGERN

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode (PM) entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 478 (2016). Die Prüfmethode werden regelmäßig überarbeitet, um dem wissenschaftlichen Fortschritt, sich ändernden Rechtsvorgaben und Belangen des Tierschutzes gerecht zu werden. Diese modifizierte Fassung der Prüfmethode beruht auf mehr als 30-jähriger Erfahrung mit dieser Prüfung und trägt der Tatsache Rechnung, dass die Prüfung in andere Toxizitätsprüfungen eingebunden oder mit anderen Toxizitätsprüfungen kombiniert werden kann (z. B. mit Untersuchungen der Entwicklungs-, Reproduktions- und Genotoxizität); aufgrund ihrer Beschränkungen und der Verwendung einer großen Anzahl an Versuchstieren, soll diese Prüfmethode jedoch nicht als primäre Methode, sondern eher als ergänzende Prüfmethode angewendet werden, die nur dann zum Einsatz kommt, wenn aus rechtlichen Gründen keine Alternative besteht. Durch die Kombination von Toxizitätsprüfungen kann die Anzahl der für Toxizitätsprüfungen zu verwendenden Versuchstiere erheblich reduziert werden. Die OECD hat ein Dokument erstellt, das kurz gefasste und hilfreiche Informationen zu Untersuchungen zur genetischen Toxikologie sowie eine Übersicht über die jüngsten Änderungen der OECD-Prüfrichtlinien zur genetischen Toxikologie enthält (1).
2. Mit der Dominant-Letal-Prüfung (DL-Prüfung) soll untersucht werden, ob Chemikalien aufgrund von Chromosomenaberrationen in Keimzellen Mutationen auslösen. Außerdem ist die Dominant-Letal-Prüfung für die Bewertung von Genotoxizität von Bedeutung, da trotz artenspezifischer Unterschiede Faktoren des *In-vivo*-Stoffwechsels, der Pharmakokinetik und von DNA-Reparaturprozessen aktiv sind und zu den Reaktionen beitragen. Die Induktion einer DL-Mutation durch Behandlung mit einer Prüfchemikalie weist darauf hin, dass die Chemikalie das Keimgewebe des Versuchstiers geschädigt hat.
3. DL-Mutationen bewirken den Tod des Embryos bzw. des Fötus. Die Induktion einer DL-Mutation durch Behandlung mit einer Prüfchemikalie weist darauf hin, dass die Chemikalie die Keimzellen des Versuchstiers geschädigt hat.
4. Eine DL-Prüfung ist hilfreich für die Bestätigung positiver Prüfergebnisse mit somatischen *In-vivo*-Endpunkten und stellt einen relevanten Endpunkt für die Abschätzung der Gefahren für den Menschen und des Risikos genetischer Erkrankungen dar, die über die Keimbahn übertragen werden. Dieser Versuch erfordert jedoch eine große Anzahl an Versuchstieren und ist arbeitsintensiv; daher ist die Durchführung dieses Versuchs sehr teuer und zeitaufwändig. Wegen der verhältnismäßig großen spontanen Häufigkeit von DL-Mutationen besteht bei diesem Versuch im Allgemeinen nur eine beschränkte

Empfindlichkeit im Hinblick auf die Erkennung geringer Erhöhungen der Mutationshäufigkeit.

5. Die Definitionen der Schlüsselbegriffe sind Anlage 1 zu entnehmen.

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN

6. Meist wird die Prüfung an Mäusen durchgeführt (2) (3) (4). Andere Arten (beispielsweise Ratten) (5) (6) (7) (8) kommen manchmal möglicherweise ebenfalls in Betracht, wenn dies wissenschaftlich gerechtfertigt ist. Dominante Letalgene sind im Allgemeinen auf starke Chromosomenaberrationen (strukturelle und numerische Anomalien) zurückzuführen (9) (10) (11), Genmutationen können jedoch nicht ausgeschlossen werden. DL-Mutationen sind Mutationen, die per se in einer Keimzelle oder nach der Befruchtung im frühen Embryonalstadium auftreten; sie verursachen keine Funktionsstörung der Gameten, sind aber für das befruchtete Ei oder den sich entwickelnden Embryo tödlich.
7. Einzelne männliche Tiere werden in angemessenen Abständen der Behandlung mit jungfräulichen weiblichen Tieren verpaart. Die Anzahl der Paarungen nach der Behandlung richtet sich nach dem eigentlichen Zweck der DL-Untersuchung (Nummer 23); sie muss ausreichen, um alle Stadien der Reifung männlicher Keimzellen einer Untersuchung auf dominante Letalgene unterziehen zu können (12).
8. Wenn Anzeichen dafür bestehen, dass die Prüfchemikalie oder ein reaktiver Metabolit bzw. reaktive Metaboliten die Hoden nicht erreicht bzw. erreichen, ist diese Prüfung nicht geeignet.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

9. Im Allgemeinen werden die männlichen Tiere über einen geeigneten Expositionsweg mit einer Prüfchemikalie behandelt und dann mit unbehandelten jungfräulichen weiblichen Tieren verpaart. Verschiedene Keimzellarten können durch Verwendung aufeinander folgender Paarungsintervalle geprüft werden. Nach einer angemessenen Zeit nach der Paarung werden die weiblichen Tiere getötet und die Uteri der Tiere einer Untersuchung unterzogen, um die Anzahl der Implantate sowie der lebenden und der toten Embryonen zu ermitteln. Der dominante Letaleffekt einer Prüfchemikalie wird anhand des Vergleichs der lebenden Implantate pro weibliches Tier in der behandelten Gruppe mit der Anzahl lebender Implantate pro weibliches Tier in der Vehikel-/Lösungsmittel-Kontrollgruppe bestimmt. Die Differenz zwischen der Anzahl toter Implantate pro weibliches Tier in der behandelten Gruppe und der Anzahl toter Implantate pro weibliches Tier in der Kontrollgruppe entspricht dem durch die Prüfchemikalie induzierten Postimplantationsverlust. Der Postimplantationsverlust wird durch Ermittlung des Verhältnisses toter Implantate zur Gesamtzahl der Implantate in der behandelten Gruppe im Vergleich zum Verhältnis toter Implantate zur Gesamtzahl der Implantate in der

Kontrollgruppe ermittelt. Der Präimplantationsverlust kann anhand des Vergleichs der Anzahl der Corpora lutea abzüglich der Gesamtzahl der Implantate bzw. der Anzahl der Gesamtimplantate pro weibliches Tier in der behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe abgeschätzt werden.

ÜBERPRÜFUNG DER EIGNUNG DES LABORS

10. Die Kompetenz zur Durchführung dieses Versuchs sollte durch den Nachweis der Fähigkeit zur Reproduktion der Häufigkeiten dominanter Letalgene aus veröffentlichten Daten (z. B. (13) (14) (15) (16) (17) (18)) mit Positivkontrollstoffen (einschließlich schwacher Reaktionen) (wie beispielsweise in Tabelle 1 genannt) sowie mit Vehikeln und durch die Ermittlung von Häufigkeiten bei Negativkontrollen in einem annehmbaren Datenbereich (siehe vorstehende Literatur) oder – wenn verfügbar – durch die historische Kontrollverteilung des jeweiligen Labors belegt werden.

BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

Vorbereitungen

Auswahl von Versuchstierarten

11. Es sollten junge gesunde und geschlechtsreife Tiere üblicher Labortierstämme zum Einsatz kommen. Gewöhnlich werden Mäuse verwendet, doch kommen auch Ratten in Betracht. Außerdem können andere geeignete Säugetierarten verwendet werden, sofern dies im Bericht wissenschaftlich begründet wird.

Haltungs- und Fütterungsbedingungen

12. Bei Nagern sollte die Temperatur im Versuchstierraum 22 °C ($\pm$ 3 °C) betragen. Die relative Luftfeuchtigkeit sollte vorzugsweise bei 50 bis 60 % liegen, mindestens aber 40 % betragen und außer bei der Reinigung des Raumes 70 % nicht übersteigen. Der Raum sollte künstlich beleuchtet sein, wobei die Beleuchtung im 12-Stunden-Rhythmus ein- und ausgeschaltet werden sollte. An die Versuchstiere kann herkömmliches Laborfutter verfüttert werden, wobei eine unbegrenzte Trinkwasserversorgung zu gewährleisten ist. Die Auswahl des Futters wird eventuell dadurch beeinflusst, dass eine geeignete Beimischung einer Prüfchemikalie gewährleistet werden muss, wenn diese über das Futter verabreicht wird. Vor der Behandlung bzw. der Paarung sollten die Nager in kleinen gleichgeschlechtlichen Gruppen (höchstens fünf Tiere) gehalten werden, sofern kein aggressives Verhalten zu erwarten ist oder festgestellt wird, vorzugsweise in Käfigen mit festem Boden und angemessener Ausstattung des Lebensumfelds. Sie können auch einzeln gehalten werden, wenn dies wissenschaftlich gerechtfertigt ist.

Vorbereitung der Versuchstiere

13. Gesunde und geschlechtsreife männliche und weibliche adulte Tiere werden randomisiert und den einzelnen Kontroll- bzw. Behandlungsgruppen zugeteilt. Es erfolgt eine Einzelidentifizierung der Tiere unter Verwendung einer humanen, minimalinvasiven Methode (z. B. durch Anbringen von Ringen, Marken oder Mikrochips oder durch biometrische Identifizierung, nicht jedoch durch Kupieren der Zehen oder Ohren). Die Tiere werden über einen Zeitraum von mindestens fünf Tagen unter Laborbedingungen eingewöhnt. Die Käfige sind so aufzustellen, dass etwaige standortbedingte Auswirkungen möglichst gering sind. Eine gegenseitige Kontamination durch die Positivkontrolle und die Prüfchemikalie ist zu vermeiden. Zu Beginn des Versuchs sollte die Abweichung des Körpergewichts der Tiere vom Mittelwert so gering wie möglich sein und bei beiden Geschlechtern nicht mehr als $\pm 20 \%$ betragen.

Vorbereitung der Dosierung

14. Feste Prüfchemikalien sollten vor der Verabreichung an die Tiere in geeigneten Lösungsmitteln oder Vehikeln gelöst oder suspendiert oder in das Futter bzw. das Trinkwasser gegeben werden. Flüssige Prüfchemikalien können direkt verabreicht oder zuvor verdünnt werden. Bei Exposition durch Inhalation können die Prüfchemikalien je nach ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften als Gase, Dämpfe oder festes/flüssiges Aerosol verabreicht werden. Es sind frische Zubereitungen der Prüfchemikalie zu verwenden, es sei denn, die Stabilität der Chemikalie bei Lagerung wird nachgewiesen, und die entsprechenden Lagerbedingungen werden definiert.

Prüfbedingungen

Lösungsmittel/Vehikel

15. Das Lösungsmittel/Vehikel sollte in der verwendeten Dosierung keine toxischen Wirkungen hervorrufen und nicht im Verdacht stehen, mit der Prüfchemikalie eine chemische Reaktion einzugehen. Werden keine allgemein bekannten Lösungsmittel/Vehikel verwendet, so sind Referenzdaten zur Kompatibilität beizubringen. Nach Möglichkeit sollte ein wässriges Lösungsmittel/Vehikel verwendet werden. Beispiele für üblicherweise verwendete, kompatible Lösungsmittel/Vehikel sind Wasser, physiologische Kochsalzlösung, Methylcelluloselösung, Carboxymethylcellulose-Natriumsalzlösung, Olivenöl und Maisöl.

Positivkontrollen

16. Grundsätzlich sind parallel Positivkontrolltiere zu verwenden, wenn das Labor nicht seine Befähigung zur Durchführung der Prüfung nachgewiesen und die Prüfung in letzter Zeit (beispielsweise in den letzten 5 Jahren) nicht regelmäßig durchgeführt hat. Allerdings brauchen Positivkontrolltiere nicht auf demselben Expositionsweg wie die mit der Prüfchemikalie behandelten Tiere behandelt und nicht für alle Paarungsintervalle Proben genommen zu werden. Die Positivkontrollstoffe sollten unter den in der Prüfung

bestehenden Bedingungen bekanntermaßen dominante Letalgene induzieren. Bis auf die Verabreichung der Prüfchemikalie sind die Tiere der Kontrollgruppen ebenso zu behandeln wie die Tiere der Behandlungsgruppen.

17. Die Dosen der Positivkontrollstoffe sind so auszuwählen, dass sie schwache oder moderate Wirkungen hervorrufen, mit denen die Leistung und Empfindlichkeit des Versuchs kritisch bewertet werden können, gleichzeitig aber konsistent positive dominante Letaleffekte induziert werden. Beispiele für Positivkontrollstoffe und für geeignete Dosierungen sind Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1: Beispiele für Positivkontrollstoffe

Stoff [CAS-Nr.] (Referenznummer)	Effektiver Dosisbereich (mg/kg) (Nagetierarten)	Verabreichungs- dauer (Tage)
Triethylenmelamin [51-18-3] (15)	0,25 (Mäuse)	1
Cyclophosphamid [50-18-0] (19)	50-150 (Mäuse)	5
Cyclophosphamid [50-18-0] (5)	25-100 (Ratten)	1
Ethylmethansulfonat [62-50-0] (13)	100-300 (Mäuse)	5
Monomeres Acrylamid [79-06-1] (17)	50 (Mäuse)	5
Chlorambucil [305-03-3] (14)	25 (Mäuse)	1

Negativkontrollen

18. In jede Probenahme sind Negativkontrolltiere einzubeziehen, die nur ein Lösungsmittel oder ein Vehikel erhalten und ansonsten in derselben Weise behandelt werden wie die Behandlungsgruppen (20). Um die Eignung der Vehikelkontrolle festzustellen, sollten darüber hinaus in jede Probenahme auch unbehandelte Kontrolltiere einbezogen werden, soweit keine historischen oder veröffentlichten Kontrolldaten vorliegen, aus denen hervorgeht, dass das gewählte Lösungsmittel/Vehikel keine dominanten Letalgene und keine sonstigen schädlichen Wirkungen induziert.

VERFAHREN

Anzahl der Versuchstiere

19. Einzelne männliche Tiere werden nacheinander in geeigneten zuvor festgelegten Intervallen (z. B. wöchentlich, Nummern 21 und 23) vorzugsweise mit einem jungfräulichen weiblichen Tier verpaart. Die Anzahl der männlichen Tiere pro Gruppe

sollte so gewählt werden, dass sie (in Verbindung mit der Anzahl der verpaarten weiblichen Tiere in den einzelnen Paarungsintervallen) ausreichend ist, um die erforderliche statistische Aussagekraft für den Nachweis mindestens einer Verdopplung der Häufigkeit dominanter Letalgene (Nummer 44) sicherzustellen.

20. Die Anzahl der weiblichen Tiere pro Paarungsintervall sollte anhand von Berechnungen der statistischen Aussagekraft so gewählt werden, dass mindestens eine Verdopplung der Häufigkeit dominanter Letalgene nachgewiesen werden kann (d. h. ausreichend trüchtige weibliche Tiere zur Hervorbringung von insgesamt mindestens 400 Implantaten) (20) (21) (22) (23) und dass mindestens ein totes Implantat pro Analyseeinheit (d. h. Paarungsgruppe pro Dosis) zu erwarten ist (24).

Verabreichungsdauer und Paarungsintervalle

21. Die Anzahl der Paarungsintervalle nach der Behandlung richtet sich nach dem Behandlungsplan; sie sollte gewährleisten, dass alle Stadien der Reifung männlicher Keimzellen auf die Induzierung dominanter Letalgene untersucht werden (12) (25). Bei einer Einzelbehandlung unter Verabreichung von bis zu fünf Tagesdosen sollten nach der letzten Behandlung in wöchentlichen Abständen 8 (Mäuse) bzw. 10 (Ratten) Paarungen vorgenommen werden. Bei Mehrfachdosierungen kann die Anzahl der Paarungsintervalle entsprechend dem Anteil der längeren Dauer des Verabreichungszeitraums reduziert werden, sofern alle Phasen der Spermatogenese wie vorgesehen evaluiert werden können (nach einer Expositionszeitdauer von 28 Tagen beispielsweise sind bei Mäusen bereits 4 wöchentliche Paarungen zur Evaluierung aller Phasen der Spermatogenese ausreichend). Alle Behandlungs- und Paarungspläne sollten wissenschaftlich begründet sein.
22. Weibliche Tiere sollten mindestens für die Dauer eines Östruszyklus (bei Mäusen und Ratten jeweils eine Woche) mit den männlichen Tieren zusammenbleiben. Weibliche Tiere, die sich innerhalb dieser Woche nicht gepaart haben, können für ein späteres Paarungsintervall verwendet werden. Alternativ können die Tiere zusammenbleiben, bis die Paarung erfolgt ist (was durch die Feststellung von Spermien in der Vagina oder das Vorliegen eines Vaginalpropfs nachzuweisen ist).
23. Die Exposition und der Paarungsplan hängen vom eigentlichen Zweck der DL-Untersuchung ab. Wenn das Ziel in der Feststellung besteht, ob eine bestimmte Chemikalie per se DL-Mutationen induziert, besteht die akzeptierte Methode in der Exposition eines vollständigen Spermatogenesezyklus (beispielsweise 7 Wochen bei Mäusen und 5-7 Behandlungen wöchentlich) und einer Paarung am Ende des Zyklus. Besteht das Ziel jedoch in der Ermittlung des Keimzellentyps, in dem dominante Letalgene induziert werden können, ist eine einmalige Exposition (über 5 Tage) mit einer anschließenden Paarungszeit von einer Woche vorzuziehen.

Dosierungen

24. Wenn zunächst eine Dosisfindungsstudie durchgeführt wird, da keine geeigneten Daten zur Dosierungswahl verfügbar sind, sollte diese im gleichen Labor unter Verwendung des/der gleichen Spezies, Rasse, Geschlechts und Behandlungsverfahrens wie im Hauptversuch stattfinden (26). Ziel der Studie sollte sein, die maximal verträgliche Dosis (MTD) zu ermitteln, die definiert ist als die höchste Dosierung, die vertragen wird, ohne dass Anzeichen von Toxizität auftreten, die die Studie, bezogen auf den Untersuchungszeitraum, begrenzen würden (z. B. durch Abweichungen in Verhalten oder Reaktionen, geringen Rückgang des Körpergewichts oder Zytotoxizität des blutbildenden Systems, ausgenommen jedoch Tod oder Anzeichen von Schmerzen und Leiden, die eine humane Tötung erforderlich machen würden (27)).
25. Die maximal verträgliche Dosis (MTD) darf zudem den Paarungserfolg nicht beeinträchtigen (21).
26. Prüfchemikalien mit spezifischen biologischen Aktivitäten bei niedrigen, nicht toxischen Dosen (wie Hormone und Mitogene) und Chemikalien mit gesättigten toxikokinetischen Eigenschaften können als Ausnahmen von den Kriterien zur Dosisfestsetzung angesehen werden und sind auf Fallbasis zu bewerten.
27. Um Dosis-Wirkungs-Informationen zu erhalten, sollte eine vollständige Studie eine Negativkontrollgruppe und mindestens drei Dosierungen enthalten, die sich in der Regel um einen Faktor von 2 (maximal von 4) unterscheiden. Ruft die Prüfchemikalie in einer Dosisfindungsstudie oder nach bereits vorhandenen Daten keine Toxizität hervor, so sollte die Höchstdosis für eine Einzelgabe 2000 mg/kg Körpergewicht betragen. Wirkt die Prüfchemikalie jedoch toxisch, sollte die MTD die höchste verabreichte Dosierung sein und die Dosierung vorzugsweise einen Bereich vom Höchstwert bis zu einer Dosierung abdecken, die wenig oder keine Toxizität erzeugt. Bei nicht toxischen Chemikalien beträgt die Grenzdosis für einen Verabreichungszeitraum von mindestens 14 Tagen 1000 mg/kg Körpergewicht/Tag und bei Verabreichungszeiträumen von weniger als 14 Tagen 2000 mg/kg Körpergewicht/Tag.

Verabreichung der Dosen

28. Bei der Versuchsplanung ist der zu erwartende Expositionsweg beim Menschen zu berücksichtigen. Daher können mit entsprechender Begründung Verabreichungswege wie etwa eine Aufnahme über die Nahrung, über das Trinkwasser, eine subkutane, intravenöse, topische oder orale (über eine Magensonde) Verabreichung oder eine Verabreichung durch Inhalation oder Implantation gewählt werden. In jedem Fall sollte der Verabreichungsweg so gewählt werden, dass das bzw. die Zielgewebe eine angemessene Exposition erfährt bzw. erfahren. Eine intraperitoneale Injektion wird in der Regel nicht empfohlen, da diese nicht als Verabreichungsweg beim Menschen vorgesehen ist, und sollte nur mit spezieller wissenschaftlicher Begründung angewandt werden. Sofern die Prüfchemikalie der Nahrung

oder dem Trinkwasser beigemischt wird, ist insbesondere im Fall von Einzeldosierungen darauf zu achten, dass ein ausreichender Abstand zwischen der Nahrungsmittel- und Trinkwasseraufnahme und der Paarung eingehalten wird, damit ein Nachweis der Wirkungen möglich ist (Nummer 31). Welches Flüssigkeitsvolumen jeweils höchstens durch Sonde oder Injektion verabreicht werden kann, hängt von der Größe des Versuchstiers ab. Das Volumen sollte im Normalfall 1 ml/100g Körpergewicht nicht überschreiten, bei wässrigen Lösungen kommen aber auch 2 ml/100g in Betracht. Werden größere Volumina verwendet (sofern nach Tierschutzvorschriften erlaubt), ist dies zu begründen. Schwankungen der Prüfvolumina sind durch entsprechende Dosierung so gering wie möglich zu halten, damit bei allen Dosen ein gemessen am Körpergewicht gleich bleibendes Volumen gewährleistet ist.

Beobachtungen

29. Mindestens einmal täglich – vorzugsweise zum gleichen Zeitpunkt und unter Berücksichtigung des Zeitraums, in dem der Wirkungsgipfel nach Verabreichung der Dosis zu erwarten ist – sollten allgemeine klinische Beobachtungen der Versuchstiere vorgenommen und protokolliert werden. Mindestens zweimal täglich während der Verabreichungszeit sind alle Tiere auf Morbidität und Mortalität zu überprüfen. Alle Tiere sollten zu Studienbeginn und mindestens einmal pro Woche während Studien mit Wiederholungsdosen sowie bei humaner Tötung gewogen werden. Die Futteraufnahme wird mindestens wöchentlich gemessen. Wenn die Prüfchemikalie über das Trinkwasser verabreicht wird, sollte auch die Wasseraufnahme bei jedem Wasserwechsel und mindestens einmal wöchentlich gemessen werden. Tiere mit Anzeichen von übermäßiger, jedoch nicht tödlich wirkender Toxizität sollten vor Ende des Prüfzeitraums human getötet werden (27).

Gewebeentnahme und -verarbeitung

30. Weibliche Tiere werden in der zweiten Hälfte der Gravidität am Trächtigkeitstag (GD) 13 bei Mäusen bzw. an GD 14-15 bei Ratten human getötet. Die Uteri werden auf dominante Letaleffekte untersucht, um die Anzahl der Implantate, der lebenden und toten Embryonen und der Corpora lutea zu ermitteln.
31. Die Uterushörner und die Ovarien werden freigelegt, um die Corpora lutea zählen zu können, und die Feten entfernt, gezählt und gewogen. Die Uteri sind sorgfältig auf durch lebende Feten verdeckte Resorptionen zu prüfen. Dabei sollte sichergestellt werden, dass alle Resorptionen gezählt werden. Die Fötusmortalität wird dokumentiert. Die Anzahl der erfolgreich befruchteten weiblichen Tiere und die Gesamtzahl der Implantate sowie die Präimplantationsverluste und die Postimplantationsmortalität (einschließlich Früh- und Spätresorptionen) sind ebenfalls zu erfassen. Außerdem können die sichtbaren Feten mindestens 2 Wochen in Bouinscher Lösung fixiert und anschließend auf schwere

äußerliche Fehlbildungen untersucht werden (28), um weitere Informationen über die reproduktions- und entwicklungsbezogenen Auswirkungen der Prüfchemikalie zu erhalten.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Auswertung der Ergebnisse

32. Die Daten sind in tabellarischer Form unter Angabe der Anzahl der verpaarten männlichen Tiere, der Anzahl der trächtigen weiblichen Tiere und der Anzahl nicht trächtiger weiblicher Tiere darzustellen. Die Ergebnisse jeder Paarung einschließlich der Identität aller männlichen und weiblichen Tiere sind einzeln anzugeben. Für behandelte männliche Tiere sollten das Paarungsintervall und die Dosierung und für die einzelnen weiblichen Tiere die Anzahl lebender sowie toter Implantate dokumentiert werden.
33. Der Postimplantationsverlust wird durch Ermittlung des Verhältnisses toter Implantate zur Gesamtzahl der Implantate in der behandelten Gruppe im Vergleich zum Verhältnis toter Implantate zur Gesamtzahl der Implantate in der Vehikel-/Lösungsmittelkontrollgruppe ermittelt.
34. Der Präimplantationsverlust wird als Differenz zwischen der Anzahl der Corpora lutea und der Anzahl der Implantate oder als Verringerung der Durchschnittsanzahl der Implantate pro weibliches Tier gegenüber den Kontrollpaarungen berechnet. Wird der Präimplantationsverlust berechnet, ist er anzugeben.
35. Der DL-Faktor wird wie folgt berechnet: $(\text{Postimplantationsmortalität}/\text{Gesamtzahl der Implantate pro weibliches Tier}) \times 100$.
36. Daten zur Toxizität und klinische Anzeichen (gemäß Nummer 29) sind zu dokumentieren.

Akzeptanzkriterien

37. Die folgenden Kriterien entscheiden über die Gültigkeit eines Versuchs:
 - Die gleichzeitige Negativkontrolle wird im Einklang mit veröffentlichten Normen für historische Negativkontrolldaten und mit den historischen Kontrolldaten des Labors (sofern verfügbar) durchgeführt (Nummern 10 und 18).
 - Gleichzeitige Positivkontrollen induzieren Reaktionen, die im Einklang mit veröffentlichten Normen für historische Positivkontrolldaten bzw. mit den historischen Kontrolldaten des Labors (sofern verfügbar) stehen und bewirken eine statistisch signifikante Erhöhung im Vergleich zur Negativkontrolle (Nummern 17 und 18).
 - Eine angemessene Gesamtzahl an Implantaten und Dosierungen wurde analysiert (Nummer 20).
 - Die Kriterien für die Auswahl der Höchstdosis entsprechen den Kriterien unter den Nummern 24 und 27.

Bewertung und Auswertung der Ergebnisse

38. Es sind mindestens drei behandelte Dosisgruppen zu analysieren, um ausreichende Daten für Dosis-Wirkungs-Analysen zu liefern.

39. Unter der Voraussetzung, dass alle Akzeptanzkriterien erfüllt sind, gilt eine Prüfchemikalie als eindeutig positiv, wenn

- mindestens eine der Versuchsdosierungen eine statistisch signifikante Zunahme gegenüber der gleichzeitigen Negativkontrolle aufweist,
- die Zunahme im Hinblick auf mindestens eine Versuchsbedingung (z. B. ein Paarungsintervall von einer Woche) bei Auswertung mit einer geeigneten Prüfung dosisabhängig ist und
- Ergebnisse außerhalb des akzeptablen Bereichs für Negativkontrolldaten bzw. der Verteilung der historischen Negativkontrolldaten des Labors (z. B. der auf einer Poisson-Verteilung beruhenden Kontrollgrenze von 95 %) liegen (sofern verfügbar).

Wenn diese Voraussetzungen erfüllt sind, wird angenommen, dass die Prüfchemikalie in Keimzellen der Versuchstiere DL-Mutationen induziert. Empfehlungen zu den am besten geeigneten statistischen Methoden sind Nummer 44 zu entnehmen; weitere statistische Ansätze werden in der Fachliteratur empfohlen (20) (21) (22) (24) (29). Bei durchgeführten statistischen Prüfungen sollte das Tier als Versuchseinheit zugrunde gelegt werden.

40. Unter der Voraussetzung, dass alle Akzeptanzkriterien erfüllt sind, gilt eine Prüfchemikalie als eindeutig negativ, wenn

- keine der Versuchsdosierungen eine statistisch signifikante Zunahme gegenüber der gleichzeitigen Negativkontrolle hervorruft,
- bei keiner Versuchsbedingung eine dosisabhängige Zunahme festzustellen ist und
- alle Ergebnisse innerhalb eines akzeptablen Bereichs der historischen Negativkontrolldaten des Labors (z. B. der auf einer Poisson-Verteilung beruhenden Kontrollgrenze von 95 %) liegen (sofern verfügbar).

Wenn diese Voraussetzungen erfüllt sind, wird angenommen, dass die Prüfchemikalie nicht geeignet ist, in Keimzellen der Versuchstiere DL-Mutationen zu induzieren.

41. Bei einer eindeutig positiven oder negativen Reaktion ist eine Verifizierung nicht erforderlich.

42. In den Fällen, in denen die Reaktion weder eindeutig negativ noch eindeutig positiv ist, oder um die biologische Relevanz eines Ergebnisses zu untermauern (z. B. eine geringe oder grenzwertige Zunahme), sollten die Daten durch eine fachkundige Beurteilung

und/oder anhand weiterer Untersuchungen der vorliegenden abgeschlossenen Versuche bewertet werden (beispielsweise wenn beurteilt werden soll, ob das positive Ergebnis außerhalb des akzeptablen Bereichs von Negativkontrolldaten oder der historischen Negativdaten des betreffenden Labors liegt) (30).

43. In seltenen Fällen erlaubt der Datensatz selbst nach weiteren Untersuchungen keine definitive Aussage zu positiven oder negativen Ergebnissen, so dass die Reaktion als nicht eindeutig eingestuft wird.
44. Bei durchgeführten statistischen Prüfungen sollte das männliche Tier als Versuchseinheit zugrunde gelegt werden. Die Zählraten (z. B. die Anzahl der Implantate pro weibliches Tier) können auf einer Poisson-Verteilung beruhen, und/oder Anteile (etwa der Anteil toter Implantate) können eine Binomialverteilung ergeben; diese Daten weisen häufig jedoch eine übermäßige Verteilung auf (31). Daher sollte bei der statistischen Analyse zunächst mithilfe von Varianztests wie z. B. des Cochran-Tests zur Ermittlung der binomialen Varianz (32) oder des Tarone-C(α)-Tests zur Ermittlung einer binomialen übermäßigen Verteilung (31) (33) eine Untersuchung auf übermäßige oder zu geringe Verteilung vorgenommen werden. Wenn keine Abweichungen von der Binomialverteilung festgestellt wird, kann mit dem Cochran-Armitage-Trendtest (34) und mit paarweisen Vergleichen mit der Kontrollgruppe mit dem exakten Test nach Fischer (35) eine Untersuchung auf die Entwicklung von Anteilen bei verschiedenen Dosierungen vorgenommen werden. Ähnlich können dann, wenn keine Abweichungen von der Poisson-Verteilung festgestellt werden, Entwicklungen der Zahlen durch Poisson-Regression untersucht (36) und paarweise Vergleiche mit der Kontrollgruppe vor dem Hintergrund des Poisson-Modells mithilfe von Kontrastpaaren vorgenommen werden (36). Wenn eine signifikant übermäßig starke oder geringe Verteilung festgestellt wird, werden parameterfreie Methoden empfohlen. (23) (31). Dazu zählen rangbezogene Prüfungen wie der Jonckheere-Terpstra-Trendtest (37) und Mann-Whitney-Tests (38) für paarweise Vergleiche mit der Vehikel-/Lösungsmittel-Kontrollgruppe sowie Permutations-, Resampling- oder Bootstrap-Trendtests und paarweise Vergleiche mit der Kontrollgruppe (31) (39).
45. Eine DL-Prüfung mit positivem Ergebnis ist ein Nachweis für die Genotoxizität der Prüfchemikalie an den Keimzellen der behandelten männlichen Tiere der Versuchstierart.
46. Indem ermittelt wird, ob die gemessenen Werte innerhalb oder außerhalb des historischen Kontrollbereichs liegen, lassen sich Leitlinien für die Bewertung der biologischen Signifikanz der Reaktion herleiten (40).

Prüfbericht

47. Der Prüfbericht sollte folgende Angaben enthalten:

Zusammenfassung

Prüfchemikalie:

- Herkunft, Chargennummer, ggf. begrenztes Verwendungsdatum;
- Stabilität der Prüfchemikalie, falls bekannt;
- Löslichkeit und Stabilität der Prüfchemikalie im Lösungsmittel, falls bekannt;
- Messung des pH-Werts, der Osmolalität und ggf. des Niederschlags im Kulturmedium, dem die Prüfchemikalie zugegeben wurde.

Einkomponentiger Stoff:

- physikalisches Erscheinungsbild, Wasserlöslichkeit und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften;
- chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS-Bezeichnung, CAS-Nummer, SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel, Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.

Mehrkomponentiger Stoff, UVCB-Stoffe und Gemische:

- so weit wie möglich charakterisiert durch die chemische Zusammensetzung (siehe oben), das quantitative Vorkommen und die relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften der einzelnen Komponenten.

Zubereitung der Prüfchemikalie:

- Begründung der Auswahl des Vehikels;
- Löslichkeit und Stabilität der Prüfchemikalie im Lösungsmittel/Vehikel, falls bekannt;
- Zubereitung von Formulierungen für Nahrung, Trinkwasser oder Inhalationspräparaten;
- analytische Bestimmung der Formulierungen (z. B. Stabilität, Homogenität, nominale Konzentrationen), wenn erfolgt.

Versuchstiere:

- Art/Stamm und Begründung der getroffenen Wahl;
- Anzahl, Alter und Geschlecht der Tiere;
- Herkunft der Tiere, Haltungsbedingungen, Futter usw.;
- Methode zur eindeutigen Identifizierung der Tiere;
- bei Kurzzeitstudien: individuelles Körpergewicht der männlichen Tiere zu Beginn und am Ende der Studie; bei Studien über einer Woche: individuelles Körpergewicht während der Studie und Futteraufnahme. Bereich des Körpergewichts, Mittelwert und Standardabweichung für jede Gruppe.

Prüfbedingungen:

- Daten zu den Positiv- und Negativkontrollen (Vehikel/Lösungsmittel),

- Daten aus der Dosisfindungsstudie,
- Begründung der gewählten Dosisstufen;
- Angaben zur Zubereitung der Prüfchemikalie;
- Angaben zur Verabreichung der Prüfchemikalie;
- Begründung des Verabreichungswegs;
- Methoden zur Toxizitätsmessung beim Tier, einschließlich, soweit verfügbar, histopathologischer oder hämatologischer Analysen, sowie Angaben zur Häufigkeit, mit der die Tiere beobachtet und ihre Körpergewichte gemessen wurden;
- Methoden zur Überprüfung, ob die Prüfchemikalie ins Zielgewebe oder in den allgemeinen Kreislauf gelangt ist, im Falle negativer Ergebnisse;
- tatsächliche Dosis (mg/kg Körpergewicht/Tag), berechnet aus der Konzentration der Prüfchemikalie im Futter/Wasser (ppm) und der Futter- bzw. Wasseraufnahme, falls zutreffend;
- Angaben über Futter- und Wasserqualität;
- Angaben zur Ausgestaltung der Käfigumgebung;
- detaillierte Beschreibung der Behandlungs- und Probenahmepläne und Begründung der jeweils getroffenen Wahl;
- Analgesiemethode;
- Tötungsmethode;
- Verfahren zur Isolierung und Konservierung der Gewebe;
- Herkunft und Chargennummern aller Laborkits und Reagenzien (soweit zutreffend);
- Methoden zur Auszählung von dominanten Letalgenen;
- Paarungsplan;
- Verfahren zur Feststellung, ob die Paarung erfolgt ist;
- Tötungszeitpunkt;
- Kriterien für die Auswertung von DL-Effekten einschließlich Corpora lutea, Implantaten, Resorptionen und Präimplantationsverlusten, lebenden Implantaten und toten Implantaten.

Ergebnisse:

- Zustand des Tiers vor und während des Prüfzeitraums, einschließlich Anzeichen von Toxizität;
- Körpergewicht der männlichen Tiere während der Behandlung und während der Paarungszeit;

- Zahl der verpaarten weiblichen Tiere;
- gegebenenfalls Dosis-Wirkungsverhältnis;
- Daten über Negativkontrolltiere, die gleichzeitig in den Versuch einbezogen waren, und historische Kontrolldaten aus Negativkontrollen mit Angaben zu Bereichen, Mittelwerten und Standardabweichungen;
- Daten zu gleichzeitigen Positivkontrollen;
- tabellarische Daten zu den einzelnen Muttertieren, Anzahl der Corpora lutea pro Muttertier, Anzahl der Implantate pro Muttertier, Anzahl der Resorptionen und der Präimplantationsverluste pro Muttertier, Anzahl lebender Implantate pro Muttertier, Anzahl toter Implantate pro Muttertier, Gewicht der Feten;
- die vorstehenden Daten aggregiert für die einzelnen Paarungszeiten und Dosierungen mit Häufigkeiten dominanter Letalgene;
- statistische Analysen und angewandte Methoden.

Diskussion der Ergebnisse:

Schlussfolgerung.

LITERATUR

- (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 u. a. (Hrsg.), S. 235-334, Elsevier, Amsterdam
- (3) Ehling, U.H., Machemer, L., Buselmaier, E., Dycka, D., Froberg, H., Kratochvilova, J., Lang, R., Lorke, D., Müller, D., Peh, J., Röhrborn, G., Roll, R., Schulze-Schencking, M. und Wiemann, H. (1978). Standard Protocol for the Dominant Lethal Test on Male Mice. Erstellt von der Arbeitsgruppe „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., Pharmacol.*, 352:159-167.
- (5) Knudsen I., Knudsen, I., Hansen, E.V., Meyer, O.A. und 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., u 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., White, D.M., Blauch, J.L. und Tarka, S.M. Jr. (1984). Dominant Lethal Testing of Theobromine in Rats. *Toxicol. Lett. Pharmacol.*, 20:325-329.
- (8) Rao, K.S., Cobel-Geard, S.R., Young, J.T., Hanley, T.R. Jr., Hayes, W.C., John, J.A. und 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. und 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. und Wyrobek, A.J. (2004). Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations in Mouse Zygotes Determine their Embryonic Fate. *Biol. Reprod.*, 70:616-624.

- (11) Marchetti, F. und 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. und 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. und 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. und Gallo, M.A. (1976). The dominant Lethal Effect of Dietary Triethylenemelamine, *Mutation Res.*, 40: 371-378.
- (16) James, D.A. und 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. und 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. und Generoso, W.M. (1992). Bleomycin: Female-Specific Dominant Lethal Effects in Mice, *Mutation Res.*, 296: 143-156.
- (19) Holstrom, L.M., Palmer, A.K. und Favor, J. (1993). The Rodent Dominant Lethal Assay. In *Supplementary Mutagenicity Tests*. Kirkland, D.J. und Fox, M. (Hrsg.), 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. und 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. und 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. und Piegorsch, W.W. (1993). Dominant Lethal Tests in Male and Female Mice. *Methods, Toxicol.*, 3A:124-141.

- (23) Haseman, J.K. und 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. und 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. und 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (28) Barrow, M.V., Taylor, W.J. und Morphol, J. (1969). A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Fetuses, 127, 291–306.
- (29) Kirkland, D.J., (Hrsg.)(1989). Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Cambridge University Press.
- (30) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H.-J. und Thybaud, V. (2011). “Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data”, *Mutation. Res.*, 723:87-90.
- (31) Lockhart, A.C., Piegorsch, W.W. und 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. und Johnson, N. L. (Hrsg.), 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. und 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.

Anlage 1

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

Chemikalie: Ein Stoff oder ein Gemisch.

Corpus luteum (Corpora lutea): Endokrines System im Ovarium, das jeweils an einem Follikel entsteht, aus dem eine Eizelle freigesetzt wurde. Die Anzahl der Corpora lutea (Gelbkörper) in den Ovarien (Eierstöcken) entspricht der Anzahl der beim Eisprung ausgestoßenen Eizellen.

DL-Mutation: Eine Mutation, die in der Keimzelle bzw. nach der Befruchtung auftritt und zum Tod des Embryos bzw. des Fötus führt.

Fertilitätsrate: Anzahl der verpaarten trächtigen weiblichen Tiere bezogen auf die Gesamtzahl der verpaarten weiblichen Tiere.

Paarungsintervall: Zeitraum zwischen dem Ende der Exposition und der Paarung behandelter männlicher Tiere. Durch die Steuerung dieses Intervalls können chemische Auswirkungen auf verschiedene Keimzellenarten beurteilt werden. In der Paarungszeit der Mäuse in der 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7. und 8. Woche nach Ende der Exposition werden die Auswirkungen auf Spermien, kondensierte Spermatiden, runde Spermatiden, pachytene Spermatozyten, frühe Spermatozyten, differenzierte Spermatogonien und Spermatogoniestammzellen gemessen.

Präimplantationsverluste: Differenz zwischen der Anzahl der Implantate und der Anzahl der Corpora lutea. Die Präimplantationsverluste können auch anhand der Gesamtzahl der Implantate pro weibliches Tier in der behandelten Gruppe und in der Kontrollgruppe berechnet werden.

Postimplantationsverlust: Anteil der toten Implantate in der behandelten Gruppe im Vergleich zum Anteil der toten Implantate bezogen auf die Gesamtzahl der Implantate in der Kontrollgruppe.

Prüfchemikalie: Stoff oder Gemisch, der/das mit dieser Prüfmethode untersucht wird.

UVCB: Chemische Stoffe mit unbekannter oder schwankender Zusammensetzung, komplexe Reaktionsprodukte oder biologische Materialien.

Anlage 2

ZEITLICHER ABLAUF DER SPERMATOGENESE BEI SÄUGETIEREN

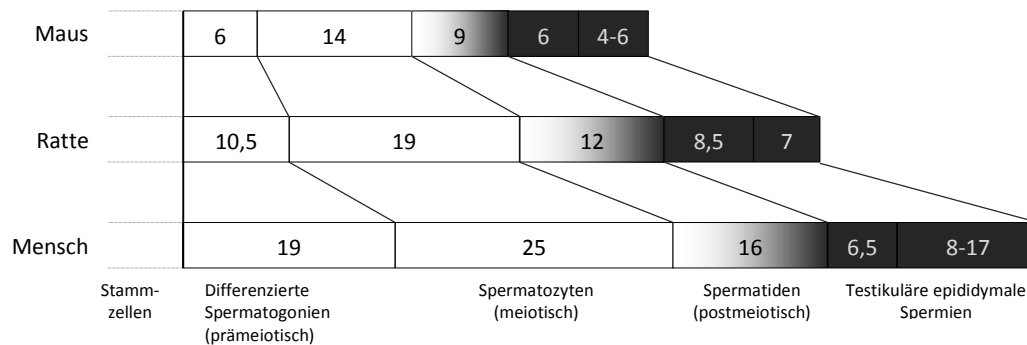


Abb. 1: Übersicht über die Dauer (in Tagen) der Entwicklung männlicher Keimzellen bei Mäusen und Ratten und beim Menschen. In den grau dargestellten Zeiträumen kommt es nicht zu DNA-Reparaturen.

In der vorstehenden Abbildung wird die Spermatogenese bei Mäusen und Ratten sowie beim Menschen schematisch dargestellt (entnommen aus Adler, 1996). Zu den nicht differenzierten Spermatogonien zählen: Spermatogonien der Typen A single, A paired und A aligned (Hess und de Franca, 2008). Der Typ A single wird als echter Stammzellentyp betrachtet; um die Auswirkungen auf Stammzellen zu beurteilen, müssen daher mindestens 49 Tage (bei Mäusen) zwischen der letzten Injektion der Prüfchemikalie und der Paarung vergehen.

Literatur

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

Hess, R.A., Moore, B.J. (2008). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. In: *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*, C. Yan Cheng (Hrsg.), Landes Biosciences and Springer Science&Business Media:1-15.“

(4) In Teil B erhält Kapitel B.23 folgende Fassung:

„B.23 SPERMATOGONIEN-PRÜFUNG AUF CHROMOSOMENABERRATIONEN BEI SÄUGETIEREN

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode (PM) entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 483 (2016). Die Prüfmethode werden regelmäßig überarbeitet, um dem wissenschaftlichen Fortschritt, sich ändernden Rechtsvorgaben und Belangen des Tierschutzes gerecht zu werden. Diese modifizierte Fassung der Prüfmethode beruht auf langjähriger Erfahrung mit diesem Versuch und trägt der Tatsache Rechnung, dass die Prüfung in andere Toxizitäts- oder Genotoxizitätsuntersuchungen eingebunden oder mit anderen Toxizitäts- oder Genotoxizitätsuntersuchungen kombiniert werden kann. Durch die Kombination von Toxizitätsuntersuchungen kann die Anzahl der Versuchstiere in Toxizitätsprüfungen verringert werden. Diese Prüfmethode ist Bestandteil einer Reihe von Prüfmethoden zur genetischen Toxikologie. Die OECD hat ein Dokument erstellt, das kurz gefasste und hilfreiche Informationen zu Untersuchungen zur genetischen Toxikologie sowie eine Übersicht über die jüngsten Änderungen der OECD-Prüfrichtlinien zur genetischen Toxikologie enthält (1).
2. Die *In-vivo*-Spermatogonienprüfung auf Chromosomenaberrationen bei Säugetieren dient zum Nachweis von Chemikalien, die bei Säugetieren strukturelle Chromosomenaberrationen in den Spermatogonien auslösen (2) (3) (4). Außerdem ist diese Prüfung insbesondere für die Bewertung der Genotoxizität relevant, da trotz artenspezifischer Unterschiede Faktoren des *In-vivo*-Stoffwechsels, der Pharmakokinetik und von DNA-Reparaturprozessen aktiv sind und zu den Reaktionen beitragen. Allerdings ist diese Methode nicht zur Messung numerischer Anomalien bestimmt und wird folglich auch nicht routinemäßig dafür eingesetzt.
3. Mit dieser Prüfung werden strukturelle Chromosomenaberrationen (sowohl Chromosomentyp- als auch Chromatidtypaberrationen) bei der Teilung von Spermatogonien festgestellt, so dass Prognosen zur Auslösung vererbbarer Mutationen in Keimzellen getroffen werden können.
4. Definitionen der Schlüsselbegriffe sind der Anlage zu entnehmen.

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN

5. Bei dieser Prüfung werden routinemäßig Nager eingesetzt, aber auch andere Arten können in einigen Fällen geeignet sein, sofern dies wissenschaftlich gerechtfertigt wird. Normalerweise entwickeln sich während der Zytogenese von Nagetierhoden mitotische (Spermatogonien) und meiotische (Spermatozyten) Metaphasen. Mitotische und meiotische Metaphasen werden nach der Chromosomenmorphologie bestimmt (4). Mit dieser zytogenetischen *In-vivo*-Prüfung werden strukturelle Chromosomenaberrationen in Mitosen von Spermatogonien ermittelt. Andere Zielzellen sind nicht Gegenstand dieser Prüfmethode.

6. Zum Nachweis von Chromatidentypaberrationen in Spermatogonien ist die erste mitotische Zellteilung nach der Behandlung zu untersuchen, bevor diese Aberrationen sich bei anschließenden Zellteilungen zu Chromosomentypaberrationen entwickeln. Die meiotische Chromosomenanalyse der Spermatozyten in der Diakinese-Metaphase I und der Metaphase II auf Aberrationen der Chromosomenstruktur kann weitere nützliche Informationen liefern.
7. In den Hoden finden sich mehrere Generationen von Spermatogonien (5); diese verschiedenen Keimzellenarten reagieren unterschiedlich empfindlich auf die Behandlung mit Chemikalien. Die festgestellten Aberrationen stellen also eine Gesamtreaktion der behandelten Spermatogonipopulationen dar. Die meisten mitotischen Zellen in Hodenpräparaten sind B-Spermatogonien mit einem Zellzyklus von 26 h (3).
8. Wenn Anzeichen dafür bestehen, dass die Prüfchemikalie oder ein reaktiver Metabolit bzw. reaktive Metaboliten die Hoden nicht erreicht bzw. erreichen, ist diese Prüfung nicht geeignet.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

9. Im Allgemeinen werden die Tiere über einen geeigneten Expositionsweg mit einer Prüfchemikalie behandelt und zu geeigneten Zeitpunkten nach der Behandlung getötet. Vor der Tötung werden die Tiere mit einem Spindelgift (z. B. Colchicin oder Colcemid®) behandelt. Aus den Keimzellen werden dann Chromosomen präpariert und gefärbt, und die Metaphasezellen werden auf Chromosomenaberrationen untersucht.

ÜBERPRÜFUNG DER EIGNUNG DES LABORS

10. Die Kompetenz zur Durchführung dieses Versuchs sollte durch den Nachweis der Fähigkeit zur Reproduktion der erwarteten Ergebnisse in Bezug auf die Häufigkeit struktureller Chromosomenaberrationen bei Spermatogonien mit Positivkontrollstoffen (einschließlich schwacher Reaktionen) wie in Tabelle 1 genannt und durch Ermittlung von Häufigkeiten bei Negativkontrollen in einem annehmbaren Kontrolldatenbereich (siehe vorstehende Literatur, z. B. (2)(3)(6)(7)(8)(9)(10)) oder – wenn verfügbar – durch die historische Kontrollverteilung des jeweiligen Labors belegt werden.

BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

Vorbereitungen

Auswahl von Versuchstierarten

11. Es sollten junge gesunde und geschlechtsreife Tiere üblicher Labortierstämme zum Einsatz kommen. Im Allgemeinen werden männliche Mäuse verwendet; allerdings können auch männliche Tiere sonstiger geeigneter Säugetierarten zum Einsatz kommen, wenn dies wissenschaftlich gerechtfertigt ist und diese Prüfung dann in Verbindung mit einer anderen

Prüfmethode durchgeführt werden kann. Die wissenschaftliche Begründung für die Verwendung anderer Versuchstiere als Nager sollte in den Bericht aufgenommen werden.

Haltungs- und Fütterungsbedingungen

12. Bei Nagern sollte die Temperatur im Versuchstiererraum 22 °C ($\pm$ 3 °C) betragen. Die relative Luftfeuchtigkeit sollte vorzugsweise bei 50 bis 60 % liegen, mindestens aber 40 % betragen und außer bei Reinigung des Raumes 70 % nicht übersteigen. Der Raum sollte künstlich beleuchtet sein, wobei die Beleuchtung im 12-Stunden-Rhythmus ein- und ausgeschaltet werden sollte. An die Versuchstiere kann herkömmliches Laborfutter verfüttert werden, wobei eine unbegrenzte Trinkwasserversorgung zu gewährleisten ist. Die Auswahl des Futters wird eventuell dadurch beeinflusst, dass eine geeignete Beimischung einer Prüfchemikalie gewährleistet werden muss, wenn diese über das Futter verabreicht wird. Nager sollten in kleinen Gruppen (maximal fünf pro Käfig) untergebracht werden, sofern kein aggressives Verhalten zu erwarten ist, vorzugsweise in Käfigen mit festem Boden und angemessener Ausgestaltung des Lebensumfelds. Sie können auch einzeln gehalten werden, wenn dies wissenschaftlich gerechtfertigt ist.

Vorbereitung der Versuchstiere

13. Gewöhnlich werden gesunde, adulte männliche Tiere (zu Beginn der Behandlung 8-12 Wochen alt) nach dem Zufallsprinzip in die Kontroll- bzw. Behandlungsgruppen eingeteilt. Es erfolgt eine Einzelidentifizierung der Tiere unter Verwendung einer humanen, minimalinvasiven Methode (z. B. durch Anbringen von Ringen, Marken oder Mikrochips oder durch biometrische Identifizierung, nicht jedoch durch Kupieren der Ohren oder Zehen). Die Tiere werden über einen Zeitraum von mindestens fünf Tagen unter Laborbedingungen eingewöhnt. Die Käfige sind so aufzustellen, dass etwaige standortbedingte Auswirkungen möglichst gering sind. Eine gegenseitige Kontamination durch die Positivkontrolle und die Prüfchemikalie ist zu vermeiden. Zu Beginn des Versuchs sollte die Abweichung des Körpergewichts der einzelnen Tiere möglichst gering sein und nicht mehr als $\pm$ 20 % betragen.

Vorbereitung der Dosierung

14. Feste Prüfchemikalien sollten vor der Verabreichung an die Tiere in geeigneten Lösungsmitteln oder Vehikeln gelöst oder suspendiert oder in das Futter bzw. das Trinkwasser gegeben werden. Flüssige Prüfchemikalien können direkt verabreicht oder zuvor verdünnt werden. Bei Exposition durch Inhalation können die Prüfchemikalien je nach ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften als Gase, Dämpfe oder festes/flüssiges Aerosol verabreicht werden. Es sind frische Zubereitungen der Prüfchemikalie zu verwenden, es sei denn, die Stabilität der Chemikalie bei Lagerung wird nachgewiesen, und die entsprechenden Lagerbedingungen werden definiert.

Prüfbedingungen – Lösungsmittel/Vehikel

15. Das Lösungsmittel/Vehikel sollte bei den gewählten Dosierungen keine toxischen Wirkungen hervorrufen und mit den Prüfchemikalien keine chemische Reaktion eingehen. Werden keine

allgemein bekannten Lösungsmittel/Vehikel verwendet, so sind Referenzdaten zur Kompatibilität beizubringen. Nach Möglichkeit sollte ein wässriges Lösungsmittel/Vehikel verwendet werden. Beispiele für üblicherweise verwendete, kompatible Lösungsmittel/Vehikel sind Wasser, physiologische Kochsalzlösung, Methylcelluloselösung, Carboxymethylcellulose-Natriumsalzlösung, Olivenöl und Maisöl. Liegen keine historischen oder veröffentlichten Kontrolldaten vor, aus denen hervorgeht, dass keine strukturellen Chromosomenaberrationen und keine anderen schädlichen Wirkungen von einem gewählten, nicht gängigen Lösungsmittel/Vehikel ausgehen, sollte die Eignung des Lösungsmittels/Vehikels in einem Vorversuch nachgewiesen werden.

Positivkontrollen

16. Grundsätzlich sind parallel Positivkontrolltiere zu verwenden, wenn das Labor nicht seine Befähigung zur Durchführung der Prüfung nachgewiesen und die Prüfung in letzter Zeit (beispielsweise in den letzten 5 Jahren) nicht regelmäßig durchgeführt hat. Umfasst der Versuch keine gleichzeitige Positivkontrolle, sollten Auswertungskontrollen (fixierte und nicht angefärbte Objektträger) einbezogen werden. Dazu eignen sich Referenzproben, die im Rahmen eines gesonderten Positivkontrollversuchs in dem Labor entnommen und gelagert wurden, das den Versuch in regelmäßigen Zeitabständen (z. B. alle 6 bis 18 Monate) durchführt (z. B. bei Eignungsprüfungen und danach ggf. auf regelmäßiger Basis).
17. Positivkontrollstoffe sollten zuverlässig bewirken, dass die Häufigkeiten der Zellen mit Chromosomenaberrationen gemessen an den spontan entstehenden Zellmengen nachweislich zunehmen. Positivkontrolldosen sollten so gewählt werden, dass die Wirkungen eindeutig sind, die Labortechniker die kodierten Proben aber nicht identifizieren können. Beispiele für Positivkontrollstoffe sind Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1: Beispiele für Positivkontrollstoffe.

Stoffe [CAS-Nr.] (Referenznummer)
Cyclophosphamid(monohydrat) [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)
Monomeres Acrylamid [CAS 79-06-1] (10)
Triethylenmelamin [CAS-Nr. 51-18-3] (8)

Negativkontrollen

18. In jede Probenahme sind Negativkontrolltiere einzubeziehen, die nur ein Lösungsmittel oder ein Vehikel erhalten und ansonsten in derselben Weise behandelt wurden wie die Behandlungsgruppen. Um die Eignung der Vehikelkontrolle festzustellen, sollten darüber hinaus in jede Probenahme auch unbehandelte Kontrolltiere einbezogen werden, soweit keine

historischen oder veröffentlichten Kontrolldaten vorliegen, aus denen hervorgeht, dass das gewählte Lösungsmittel/Vehikel keine Chromosomenaberrationen und keine sonstigen schädlichen Wirkungen induziert.

VERFAHREN

Anzahl der Versuchstiere

19. Zu Beginn der Studie sollten die Gruppengrößen so bestimmt werden, dass pro Gruppe mindestens 5 männliche Tiere einbezogen werden. Diese Anzahl der Tiere pro Gruppe gilt als ausreichend für eine angemessene statistische Aussagekraft (d. h. für den Nachweis mindestens einer Verdopplung der Häufigkeit einer Chromosomenaberration bei einer Konzentration der Negativkontrolle von mindestens 1,0 % bei einer Wahrscheinlichkeit von 80 % und einer Signifikanz von 0,05) (3) (11). Als typische Höchstmenge an Versuchstieren bei einer Untersuchung mit zwei Probenahmezeitpunkten, drei Dosisgruppen und einer gleichzeitigen Negativkontrollgruppe zuzüglich einer Positivkontrollgruppe (wobei jede Gruppe aus fünf Tieren besteht) kann von maximal 45 Versuchstieren ausgegangen werden.

Behandlungsplan

20. Die Prüfchemikalien werden gewöhnlich einmal verabreicht (d. h. als Einzelbehandlung); wenn wissenschaftlich gerechtfertigt, können auch andere Dosierungspläne verwendet werden.
21. In der Gruppe mit der höchsten Dosis wird zu zwei verschiedenen Zeitpunkten nach der Behandlung eine Stichprobe entnommen. Da die für die Aufnahme und Metabolisierung der Prüfchemikalie(n) sowie für die Wirkung auf die Zellzykluskinetik benötigte Zeit den optimalen Zeitpunkt für die Feststellung von Chromosomenaberrationen beeinflussen kann, erfolgen eine frühe Probenahme und eine weitere Probenahme etwa 24 bzw. 48 Stunden nach der Behandlung. Wenn nicht die Höchstdosis verabreicht wird, sollte die erste Probe 24 Stunden nach der Behandlung (d. h. spätestens bei Ablauf des Zellzyklus der B-Spermatogonien zur Maximierung der Wahrscheinlichkeit der Bewertung der ersten Metaphasen nach der Behandlung) entnommen werden, wenn nicht ein anderer Zeitpunkt für die Probenahme als besser geeignet bekannt und gerechtfertigt ist.
22. Für die Probenahme kommen auch andere Zeitpunkte in Frage. Bei Chemikalien, die beispielsweise S-unabhängige Effekte auslösen, ist möglicherweise eine Probenahme zu früheren Zeitpunkten (d. h. nach weniger als 24 h) angebracht.
23. Ein Behandlungsverfahren mit Wiederholungsdosis kann zur Anwendung kommen, beispielsweise in Verbindung mit einer Prüfung mit einem anderen Endpunkt und einem Verabreichungszeitraum von 28 Tagen (z. B. PM B.58); in diesem Fall werden jedoch weitere Tiergruppen benötigt, damit Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten genommen werden können. Die Eignung eines solchen Verfahrens muss jedoch in jedem Einzelfall wissenschaftlich gerechtfertigt sein.

24. Vor der Tötung wird den Tieren intraperitoneal eine geeignete Dosis eines Spindelgifts (z. B. Colcemid® oder Colchicin) verabreicht. Die Tiere werden dann zu einem geeigneten Zeitpunkt aufgearbeitet. Bei Mäusen und Ratten beträgt die betreffende Zeitspanne 3-5 Stunden.

Dosierungen

25. Wenn zunächst eine Dosisfindungsstudie durchgeführt wird, da noch keine geeigneten Daten aus anderen einschlägigen Studien zur Dosierungswahl vorliegen, sollte diese im selben Labor unter Verwendung von Tieren derselben Art und Rasse sowie nach demselben Behandlungsverfahren stattfinden, die nach den Empfehlungen für die Durchführung von Dosisfindungsstudien in der Hauptstudie durchzuführen sind (12). Ziel der Studie sollte sein, die maximal verträgliche Dosis (MTD) zu ermitteln, die als die Dosis definiert ist, die für die Dauer der Studie leichte toxische Wirkungen (z. B. Abweichungen in Verhalten oder Reaktionen, einen geringen Rückgang des Körpergewichts oder Zytotoxizität des blutbildenden Systems) induziert, jedoch weder zum Tod führt noch Anzeichen von Schmerzen, Leiden oder Ängsten hervorruft, die eine Tötung erforderlich machen würden (13).
26. Die Höchstdosis kann auch als jene Dosis definiert werden, die bestimmte Anzeichen von Toxizität in den Spermatogonien hervorruft (z. B. eine Reduzierung des Verhältnisses der Spermatogonienmitosen zur ersten und zweiten meiotischen Metaphase). Diese Reduzierung sollte nicht mehr als 50 % betragen.
27. Prüfchemikalien mit spezifischen biologischen Aktivitäten bei niedrigen, nicht toxischen Dosen (wie Hormone und Mitogene) und Chemikalien mit gesättigten toxikokinetischen Eigenschaften können als Ausnahmen von den Kriterien zur Dosisfestsetzung angesehen werden und sind auf Fallbasis zu bewerten.
28. Um Dosis-Wirkungs-Informationen zu erhalten, sollte eine vollständige Studie eine Negativkontrollgruppe (Nummer 18) und mindestens drei Dosierungen enthalten, die sich in der Regel um einen Faktor von 2 (maximal von 4) unterscheiden. Ruft die Prüfchemikalie in einer Dosisfindungsstudie oder nach bereits vorhandenen Daten keine Toxizität hervor, so sollte die Höchstdosis für eine Einzelgabe 2000 mg/kg Körpergewicht betragen. Ruft die Prüfchemikalie jedoch Toxizität hervor, sollte die MTD die höchste verabreichte Dosierung sein und die Dosierung vorzugsweise einen Bereich vom Höchstwert bis zu einer Dosierung abdecken, die wenig oder keine Toxizität erzeugt. Wenn bei allen untersuchten Dosierungen toxische Wirkungen im Zielgewebe (d. h. in den Hoden) beobachtet werden, sind weitere Untersuchungen bei nichttoxischen Dosierungen anzuraten. Studien zur ausführlicheren Charakterisierung der quantitativen Dosis-Wirkungs-Informationen erfordern gegebenenfalls weitere Dosisgruppen. Bei bestimmten Arten von Prüfchemikalien (z. B. Humanpharmazeutika), für die spezielle Anforderungen gelten, können die Grenzen variieren. Wenn die Prüfchemikalie keine toxische Wirkung induziert, sollten die Grenzdosis sowie zwei geringere Dosen (wie oben beschrieben) ausgewählt werden. Die Grenzdosis für einen Verabreichungszeitraum von mindestens 14 Tagen beträgt 1000 mg/kg Körpergewicht/Tag und bei Verabreichungszeiträumen von weniger als 14 Tagen 2000 mg/kg Körpergewicht/Tag.

Verabreichung der Dosen

29. Bei der Versuchsplanung ist der zu erwartende Expositionsweg beim Menschen zu berücksichtigen. Daher können mit entsprechender Begründung Verabreichungswege wie etwa eine Aufnahme über die Nahrung, über das Trinkwasser, eine topische, subkutane, intravenöse oder orale (über eine Magensonde) Verabreichung oder eine Verabreichung durch Inhalation oder Implantation gewählt werden. In jedem Fall sollte der Verabreichungsweg so gewählt werden, dass eine angemessene Exposition des Zielgewebes sichergestellt ist. Eine Intraperitonealinjektion wird in der Regel nur in wissenschaftlich gerechtfertigten Fällen empfohlen, weil sie beim Menschen gewöhnlich keinen physiologisch relevanten Expositionsweg darstellt. Sofern die Prüfchemikalie der Nahrung oder dem Trinkwasser beigemischt wird, insbesondere im Fall von Einzeldosierungen, ist darauf zu achten, einen ausreichenden Abstand zwischen der Nahrungsmittel- und Trinkwasseraufnahme und der Probenahme einzuhalten, damit ein Nachweis der Wirkungen möglich ist (Nummer 33). Welches Flüssigkeitsvolumen jeweils höchstens durch Sonde oder Injektion verabreicht werden kann, hängt von der Größe des Versuchstiers ab. Das Volumen sollte im Normalfall 1 ml/100 g Körpergewicht nicht überschreiten, bei wässrigen Lösungen kommen aber auch 2 ml/100 g Körpergewicht in Betracht. Werden größere Volumina verwendet (sofern nach Tierschutzvorschriften erlaubt), ist dies zu begründen. Schwankungen der Prüfvolumina sind durch entsprechende Dosierung so gering wie möglich zu halten, damit bei allen Dosen ein gemessen am Körpergewicht gleich bleibendes Volumen gewährleistet ist.

Anmerkungen

30. Mindestens einmal täglich – vorzugsweise zum gleichen Zeitpunkt und unter Berücksichtigung des Zeitraums, in dem der Wirkungsgipfel nach Verabreichung der Dosis zu erwarten ist – sollten allgemeine klinische Beobachtungen der Versuchstiere vorgenommen und protokolliert werden. Mindestens zweimal täglich sind alle Tiere auf Morbidität und Mortalität zu überprüfen. Alle Tiere sollten zu Studienbeginn und mindestens einmal pro Woche bei Studien mit wiederholter Verabreichung sowie bei der Tötung gewogen werden. In Studien von mindestens einwöchiger Dauer sollten mindestens wöchentlich Messungen der Futteraufnahme vorgenommen werden. Wenn die Prüfchemikalie über das Trinkwasser verabreicht wird, sollte auch die Wasseraufnahme bei jedem Wasserwechsel und mindestens einmal wöchentlich gemessen werden. Tiere mit Anzeichen von übermäßiger, jedoch nicht tödlich wirkender Toxizität sollten vor Ende des Prüfzeitraums getötet werden (13).

Chromosomenpräparation

31. Unmittelbar nach der Tötung werden aus einem oder beiden Hoden Keimzellsuspensionen gewonnen, mit hypotoner Lösung behandelt und nach festgelegten Protokollen (z. B. (2) (14) (15)) fixiert. Die Zellen werden dann auf Objektträger aufgetropft und gefärbt (16) (17). Alle Objektträger sollten kodiert werden, damit sie bei der Auswertung nicht identifiziert werden können.

Analyse

32. Bei jedem Tier sollten mindestens 200 gut gespreizte Metaphasen analysiert werden (3)(11). Wenn die historische Häufigkeit bei Negativkontrollen $< 1\%$ ist, sollten mehr als 200 Zellen pro Tier ausgewertet werden, um die statistische Aussagekraft zu erhöhen (3). Die angewendeten Färbemethoden sollten eine Identifizierung der Zentromere ermöglichen.
33. Chromosomentyp- und Chromatidentypaberrationen sollten gesondert erfasst und Subtypen zugeordnet werden (Brüche, Austausch). Bei der Prüfung, ob eine Chemikalie signifikante Erhöhungen der Inzidenz von Zellen mit Chromosomenaberrationen induziert, sollten Gaps erfasst, aber nicht berücksichtigt werden. Die Laborpraxis sollte gewährleisten, dass die Chromosomenaberrationen von gut ausgebildeten Labortechnikern analysiert werden. Da es bei der Präparation der Objektträger häufig zum Bruch eines Teils der Metaphasezellen und zum Verlust von Chromosomen kommt, sollten die ausgewerteten Zellen eine Zentromerzahl enthalten, die der Zahl $2n \pm 2$ entspricht, wobei n die haploide Chromosomenzahl für diese Spezies ist.
34. Obwohl es bei der Prüfung um den Nachweis struktureller Chromosomenaberrationen geht, sind die Häufigkeiten von polyploiden Zellen und von Zellen mit endoreduplizierten Chromosomen bei Feststellung zu vermerken (Nummer 44).

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Behandlung der Ergebnisse

35. Die Daten für die einzelnen Tiere sind in tabellarischer Form darzustellen. Für jedes Tier sind die Anzahl der Zellen mit strukturellen Chromosomenaberrationen und die Anzahl der Chromosomenaberrationen je Zelle anzugeben. Chromatidentyp- und Chromosomentypaberrationen, die Subtypen zugeordnet sind (Brüche, Austausch), sollten dabei unter Angabe ihrer Anzahl und Häufigkeit für Versuchs- und Kontrollgruppen getrennt erfasst werden. Gaps werden gesondert vermerkt. Die Häufigkeit der Gaps ist anzugeben, wird in der Regel bei der Analyse der Gesamthäufigkeit der Chromosomenaberrationen jedoch nicht berücksichtigt. Der Anteil der Zellen mit Polyploidie und der Zellen mit endoreduplizierten Chromosomen wird angegeben, sofern beobachtet.
36. Daten zur Toxizität und klinische Anzeichen (gemäß Nummer 30) sind zu dokumentieren.

Akzeptanzkriterien

37. Die folgenden Kriterien entscheiden über die Gültigkeit eines Versuchs:
 - Die gleichzeitige Negativkontrolle wird im Einklang mit veröffentlichten Normen für historische Negativkontrolldaten (die im Allgemeinen bei $> 0\%$ und $\leq 1,5\%$ Zellen mit Chromosomenaberrationen liegen sollten) und (sofern verfügbar) mit den historischen Kontrolldaten des Labors durchgeführt (Nummern 10 und 18).

- Gleichzeitige Positivkontrollen induzieren Reaktionen, die im Einklang mit veröffentlichten Normen für historische Positivkontrolldaten bzw. mit den historischen Kontrolldaten des Labors (sofern verfügbar) stehen und bewirken eine statistisch signifikante Erhöhung im Vergleich zur Negativkontrolle (Nummern 17 und 18).
- Eine angemessene Zahl an Zellen und Dosierungen wurde analysiert (Nummern 28 und 32).
- Die Kriterien für die Auswahl der Höchstdosis entsprechen den Kriterien unter den Nummern 25 und 26.

38. Werden sowohl Mitosen als auch Meiosen beobachtet, ist das Verhältnis der Spermatogonienmitosen zur ersten und zweiten meiotischen Metaphase als Gradmesser der Zytotoxizität bei allen behandelten Tieren und bei Tieren der Negativkontrolle in einer Gesamtstichprobe von 100 sich teilenden Zellen zu bestimmen, um eine mögliche zytotoxische Wirkung festzustellen. Werden nur Mitosen beobachtet, so ist der Mitoseindex für mindestens 1000 Zellen je Tier zu bestimmen.

Beurteilung und Auswertung

39. Es sind mindestens drei behandelte Dosisgruppen zu analysieren, um ausreichende Daten für Dosis-Wirkungs-Analysen zu liefern.
40. Unter der Voraussetzung, dass alle Akzeptanzkriterien erfüllt sind, gilt eine Prüfchemikalie als eindeutig positiv, wenn
- mindestens eine der Versuchsdosierungen eine statistisch signifikante Zunahme gegenüber der gleichzeitigen Negativkontrolle aufweist,
 - die Zunahme zumindest bei einer Probenahme dosisabhängig ist, und
 - Ergebnisse außerhalb des akzeptablen Bereichs für Negativkontrolldaten bzw. der Verteilung der historischen Negativkontrolldaten des Labors (z. B. der auf einer Poisson-Verteilung beruhenden Kontrollgrenze von 95 %) liegen (sofern verfügbar).

Wenn diese Voraussetzungen erfüllt sind, wird angenommen, dass die Prüfchemikalie in Keimzellen der Versuchstiere Chromosomenaberrationen induziert. Empfehlungen zu den am besten geeigneten statistischen Methoden sind der Literatur zu entnehmen (11) (18). Die verwendeten statistischen Prüfungen müssen das Tier als Versuchseinheit berücksichtigen.

41. Unter der Voraussetzung, dass alle Akzeptanzkriterien erfüllt sind, gilt eine Prüfchemikalie als eindeutig negativ, wenn
- keine der Versuchsdosierungen eine statistisch signifikante Zunahme gegenüber der gleichzeitigen Negativkontrolle aufweist,
 - bei keiner Versuchsbedingung eine dosisabhängige Zunahme festzustellen ist und

- alle Ergebnisse innerhalb eines akzeptablen Bereichs der historischen Negativkontrolldaten des Labors (z. B. der auf einer Poisson-Verteilung beruhenden Kontrollgrenze von 95 %) liegen (sofern verfügbar).

Wenn diese Voraussetzungen erfüllt sind, wird angenommen, dass die Prüfchemikalie in Keimzellen der Versuchstiere keine Chromosomenaberrationen induziert. Empfehlungen zu den am besten geeigneten statistischen Methoden sind der Literatur zu entnehmen (11) (18). Ein negatives Ergebnis schließt nicht aus, dass die Chemikalie Chromosomenaberrationen in späteren Entwicklungsphasen induzieren könnte, die noch nicht untersucht wurden, oder dass sie Genmutationen auslöst.

42. Bei einer eindeutig positiven oder negativen Reaktion ist eine Verifizierung nicht erforderlich.
43. In den Fällen, in denen die Reaktion weder eindeutig negativ noch eindeutig positiv ist, oder um die biologische Relevanz eines Ergebnisses zu untermauern (z. B. eine geringe oder grenzwertige Zunahme), sollten die Daten durch eine fachkundige Beurteilung und/oder anhand weiterer Untersuchungen der vorliegenden abgeschlossenen Versuche bewertet werden (beispielsweise wenn beurteilt werden soll, ob das positive Ergebnis außerhalb des akzeptablen Bereichs von Negativkontrolldaten oder der historischen Negativdaten des betreffenden Labors liegt) (19).
44. In seltenen Fällen erlaubt der Datensatz selbst nach weiteren Untersuchungen keine definitive Aussage zu positiven oder negativen Ergebnissen, so dass die Reaktion als nicht eindeutig eingestuft wird.
45. Eine zahlenmäßige Zunahme der polyploiden Zellen deutet möglicherweise darauf hin, dass die Prüfchemikalie mitotische Prozesse zu hemmen und numerische Chromosomenaberrationen hervorzurufen vermag (20). Eine zahlenmäßige Zunahme der Zellen mit endoreduplizierten Chromosomen ist möglicherweise ein Anzeichen dafür, dass die Prüfchemikalie die Zellzyklusprogression zu hemmen vermag (21) (22), die neben der Hemmung mitotischer Prozesse ebenfalls ein Mechanismus der Induzierung numerischer Chromosomenänderungen ist (Nummer 2). Die Inzidenz von polyploiden Zellen und Zellen mit endoreduplizierten Chromosomen sollte daher getrennt erfasst werden.

Prüfbericht

46. Der Prüfbericht sollte folgende Angaben enthalten:

Zusammenfassung

Prüfchemikalie:

- Herkunft, Chargennummer, ggf. begrenztes Verwendungsdatum;
- Stabilität der Prüfchemikalie, falls bekannt;
- Löslichkeit und Stabilität der Prüfchemikalie im Lösungsmittel, falls bekannt;

- Messung des pH-Werts, der Osmolalität und ggf. des Niederschlags im Kulturmedium, dem die Prüfchemikalie zugegeben wurde.

Einkomponentiger Stoff:

- physikalisches Erscheinungsbild, Wasserlöslichkeit und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften;
- chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS-Bezeichnung, CAS-Nummer, SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel, Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.

Mehrkomponentiger Stoff, UVCB-Stoffe und Gemische:

- so weit wie möglich charakterisiert durch die chemische Zusammensetzung (siehe oben), das quantitative Vorkommen und die relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften der einzelnen Komponenten.

Zubereitung der Prüfchemikalie:

- Begründung der Auswahl des Vehikels.
- Löslichkeit und Stabilität der Prüfchemikalie im Lösungsmittel/Vehikel, falls bekannt;
- Zubereitung von Formulierungen für Nahrung, Trinkwasser oder Inhalationspräparaten;
- analytische Bestimmungen der Formulierungen (z. B. Stabilität, Homogenität, nominale Konzentrationen), wenn durchgeführt.

Versuchstiere:

- verwendete(r) Spezies/Stamm, Begründung für deren Verwendung;
- Anzahl und Alter der Tiere;
- Herkunft der Tiere, Haltungsbedingungen, Futter usw.;
- Methode zur eindeutigen Identifizierung der Tiere;
- bei Kurzzeitstudien: individuelles Gewicht der Tiere zu Beginn und am Ende der Studie; bei Studien über einer Woche: individuelles Körpergewicht während der Studie und Futteraufnahme. Bereich des Körpergewichts, Mittelwert und Standardabweichung für jede Gruppe.

Prüfbedingungen:

- Daten zu den Positiv- und Negativkontrollen (Vehikel/Lösungsmittel),
- Daten aus einer gegebenenfalls durchgeführten Dosisfindungsstudie;
- Begründung der gewählten Dosisstufen;
- Begründung des Verabreichungswegs;

- Angaben zur Zubereitung der Prüfchemikalie;
- Angaben zur Verabreichung der Prüfchemikalie;
- Begründung für die Tötungszeiten;
- Methoden zur Toxizitätsmessung beim Tier, einschließlich, soweit verfügbar, histopathologischer oder hämatologischer Analysen, sowie Angaben zur Häufigkeit, mit der die Tiere beobachtet und ihre Körpergewichte gemessen wurden,
- Methoden zur Überprüfung, ob die Prüfchemikalie ins Zielgewebe oder in den allgemeinen Kreislauf gelangt ist, im Falle negativer Ergebnisse;
- tatsächliche Dosis (mg/kg Körpergewicht/Tag), berechnet aus der Konzentration der Prüfchemikalie im Futter/Wasser (ppm) und der Futter- bzw. Wasseraufnahme, falls zutreffend;
- Angaben über Futter- und Wasserqualität;
- detaillierte Beschreibung der Behandlungs- und Probenahmepläne und Begründung der jeweils getroffenen Wahl;
- Tötungsmethode;
- Analgesiemethode (sofern angewandt);
- Verfahren zur Isolierung von Geweben;
- Bezeichnung des Spindelgifts, Konzentration und Behandlungsdauer;
- Methode für die Präparation der Objektträger;
- Kriterien für die Auswertung der Aberrationen;
- Anzahl der analysierten Zellen pro Tier;
- Kriterien zur Einstufung der Studien als positiv, negativ oder nicht eindeutig.

Ergebnisse:

- Zustand des Tiers vor und während des Prüfungszeitraums, einschließlich Anzeichen von Toxizität;
- Körper- und Organgewichte bei der Tötung (bei Mehrfachbehandlungen Körpergewichte während des Behandlungsverfahrens);
- Toxizitätszeichen;
- Mitoseindex;
- Verhältnis von Spermatogonienmitosen zur ersten und zweiten meiotischen Metaphase oder sonstige Anzeichen einer Exposition des Zielgewebes;
- Typ und Anzahl der Aberrationen, für jedes Tier gesondert anzugeben;

- Gesamtzahl der Aberrationen pro Gruppe mit Mittelwerten und Standardabweichungen;
- Anzahl der Zellen mit Aberrationen pro Gruppe mit Mittelwerten und Standardabweichungen;
- gegebenenfalls Dosis-Wirkungsverhältnis;
- statistische Analysen und angewandte Methoden.
- Daten zu gleichzeitigen Negativkontrollen;
- historische Negativkontrolldaten mit Bereichen, Mittelwerten und Standardabweichungen und 95-%-Grenzen für die Verteilung (wenn verfügbar) oder für die Bewertung der Annehmbarkeit der Prüfergebnisse berücksichtigte veröffentlichte historische Negativkontrolldaten;
- Daten zu gleichzeitigen Positivkontrollen;
- ggf. beobachtete Veränderungen der Ploidie, einschließlich Häufigkeiten von polyploiden und/oder endoreduplizierten Zellen;

Erörterung der Ergebnisse

Schlussfolgerung

LITERATUR

- (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. Hrsg. S. Venitt und 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. und Tanaka N. (1994). 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. und de Franca, L.R. (2008). Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. In: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, Cheng, C.Y. (Hrsg.) Landes Bioscience und 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. und Magnusson, J. (Hrsg.) Liss, New York, S. 477-484.
- (7) Cattanaach, B.M. und Pollard, C.E. (1971). Mutagenicity Tests with Cyclohexylamine in the Mouse, Mutation Res., 12, 472-474.
- (8) Cattanaach, B.M. und 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. und 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. und

- 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (14) Yamamoto, K. und Kikuchi, Y. (1978). A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes. *Mutation Res.*, 52, 207-209.
- (15) Hsu, T.C., Elder, F. und 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. und Ford, C.E. (1964). An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 3, 289-294.
- (17) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D. G. and Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetics Assays, In: D.J. Kirkland (Hrsg.) 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. und Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays In: D.J. Kirkland (Hrsg.) 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. und Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data. *Mutation Res.*, 723, 87-90.
- (20) Warr, T.J., Parry, E.M. und 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. und 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.

Anlage

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

Aneuploidie: Abweichung von der normalen diploiden (oder haploiden) Chromosomenzahl durch ein einziges Chromosom oder mehr, nicht aber durch einen ganzen (oder mehrere) Chromosomensatz/-sätze (Polyploidie).

Chemikalie: Ein Stoff oder ein Gemisch.

Chromatidentypaberration: Strukturelle Chromosomenanomalie, gekennzeichnet durch Bruch einzelner Chromatiden oder Bruch und Reunion von Chromatiden.

Chromosomentypaberration: Strukturelle Chromosomenanomalie, gekennzeichnet durch Bruch oder Bruch und Reunion beider Chromatiden an gleicher Position.

Chromosomenvielfalt: Vielfalt der Formen (metazentrisch, akrozentrisch usw.) und Größen von Chromosomen.

Clastogen: Jede Chemikalie, die strukturelle Chromosomenaberrationen in Zell- oder Organismenpopulationen verursacht.

Genotoxisch: Allgemeiner Begriff, der alle Typen von DNA- oder Chromosomenschädigungen umfasst, einschließlich Brüchen, Deletionen, Addukten, Nukleotidmodifikationen und -verknüpfungen, Rearrangements, Mutationen, Chromosomenaberrationen sowie Aneuploidie. Nicht alle genotoxischen Effekte führen zu Mutationen oder stabilen Chromosomenschäden.

Gap: Achromatische Läsion von geringerer Breite als eine Chromatide und mit minimaler Verlagerung der Chromatiden.

Mitose: Teilung des Zellkerns, die in der Regel in Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase und Telophase gegliedert ist.

Mitoseindex (MI): Anteil der Zellen einer Zellpopulation, die sich zum Beobachtungszeitpunkt in der Metaphase befinden: Gradmesser für den Vermehrungsgrad dieser Population.

Mutagen: Auslöser einer Erbgutveränderung der DNA-Basenpaarsequenz(en) in Genen oder in der Chromosomenstruktur (Chromosomenaberrationen).

Numerische Anomalie: Abweichung der Chromosomenzahl vom Normalwert, der für die verwendeten Tiere charakteristisch ist.

Polyploidie: Vorhandensein von mehr als zwei haploiden Chromosomensätzen (n) (z. B. $3n$, $4n$ usw.).

Prüfchemikalie: Stoff oder Gemisch, der/das mit dieser Prüfmethode untersucht wird.

Strukturelle Aberration: Veränderung der Chromosomenstruktur, nachweisbar durch

mikroskopische Untersuchung des Metaphase-Stadiums der Zellteilung, äußert sich in Form von Deletionen und Fragmenten, Austauschen.

UVCB: Chemische Stoffe mit unbekannter oder schwankender Zusammensetzung, komplexe Reaktionsprodukte oder biologische Materialien.

Zentromer: Region(en) eines Chromosoms, an die während der Zellteilung die Spindelfasern anhaften, wodurch die ordnungsgemäße Beförderung der Tochterchromosomen zu den Polen der Tochterzellen ermöglicht wird.“

(5) In Teil B erhält Kapitel B.40 folgende Fassung:

„B.40 IN-VITRO-HAUTVERÄTZUNG: TER-PRÜFMETHODE

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode (PM) entspricht der OECD-Prüfrichtlinie 430 (2015). Als Hautverätzung wird das Auslösen einer irreversiblen Hautschädigung, d. h. einer sichtbaren, bis in das Corium reichenden Nekrose der Epidermis nach Applikation einer Prüfchemikalie [im Sinne der Definition des Global harmonisierten Systems zur Einstufung und Kennzeichnung von Gefahrstoffen der UN (GHS) (1) und der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen (CLP-Verordnung)¹] bezeichnet. Diese aktualisierte Prüfmethode B.40 besteht in einem *In-vitro*-Verfahren zur Identifizierung nicht hautätzender und hautätzender Stoffe und Gemische nach dem UN GHS (1) und nach der CLP-Verordnung.
2. Die Bewertung von Hautverätzungen erfolgte in der Regel unter Verwendung von Labortieren (PM B.4, entsprechend OECD TG 404, ursprünglich angenommen im Jahr 1981 und geändert in den Jahren 1992, 2002 und 2015) (2). Neben dieser PM B.40 wurden noch weitere *In-vitro*-Prüfmethoden zur Untersuchung des Hautverätzungspotenzials von Chemikalien als PM B.40bis (entsprechend OECD TG 431) (3) und PM B.65 (entsprechend OECD TG 435) validiert und angenommen (4), mit denen ggf. ebenfalls Unterkategorien ätzender Chemikalien identifiziert werden können. Mehrere validierte *In-vitro*-Prüfmethoden wurden als PM B.46 (entsprechend OECD TG 439 (5) angenommen, die zur Untersuchung von Hautreizungen verwendet werden können. In einem OECD-Leitliniendokument über integrierte Prüfungs- und Bewertungsansätze (IATA = Integrated Approaches to Testing and Assessment) zur Untersuchung von Hautverätzungen und -reizungen werden mehrere Module beschrieben, in denen mehrere Informationsquellen und Analyseinstrumente zu Gruppen zusammengefasst werden. Sie enthalten i) Leitlinien dazu, wie existierende Daten aufgrund von Versuchen und aus sonstigen Quellen integriert und verwendet werden können, um das Hautreizungs- und das Hautverätzungspotenzial von Chemikalien zu bewerten, und ii) einen Vorschlag zur Durchführung ggf. erforderlicher weiterer Versuche (6).
3. Mit dieser Prüfmethode werden Hautverätzungen mit dem Endpunkt der menschlichen Gesundheit untersucht. Sie beruht auf der Methode zur Messung des elektrischen Widerstands

¹ Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen, zur Änderung und Aufhebung der Richtlinien 67/548/EWG und 1999/45/EG und zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 (ABl. L 353 vom 31.12.2008, S. 1).

der Haut (TER-Prüfung), bei der ätzende Chemikalien anhand ihrer Fähigkeit ermittelt werden, einen Verlust der normalen Beschaffenheit und Barrierefunktion der Hornhaut (*stratum corneum*) herbeizuführen. Die entsprechende OECD-Prüfrichtlinie wurde ursprünglich im Jahr 2004 angenommen und 2015 unter Berücksichtigung des IATA-Leitliniendokuments aktualisiert.

4. Um *In-vitro*-Prüfungen auf Hautverätzungen für rechtliche Zwecke zu evaluieren, wurden Vorvalidierungsstudien (7) mit anschließender formeller Validierungsstudie der TER-Prüfung mit Rattenhaut zur Bewertung von Hautverätzungen durchgeführt (8) (9) (10) (11). Die Ergebnisse dieser Studien führten zu der Empfehlung, dass die TER-Prüfmethode (auch als validierte Referenzmethode (VRM) bezeichnet) für rechtliche Zwecke zur Bewertung von *In-vivo*-Hautverätzungen verwendet werden kann (12) (13) (14).
5. Bevor eine vorgeschlagene ähnliche oder modifizierte *In-vitro*-TER-Prüfmethode zur Untersuchung auf Hautverätzungen außer der VRM für rechtliche Zwecke verwendet werden kann, sollten nach den Anforderungen der Leistungsstandards (15) Verlässlichkeit, Relevanz (Genauigkeit) und die Grenzen des Verfahrens für den vorgeschlagenen Verwendungszweck bestimmt werden, um sicherzustellen, dass es mit der VRM vergleichbar ist. Die gegenseitige Anerkennung der Daten gemäß dem OECD-Übereinkommen wird erst dann garantiert, wenn vorgeschlagene neue oder aktualisierte Prüfmethode auf der Grundlage der Leistungsstandards überprüft und in die entsprechende OECD-Prüfrichtlinie aufgenommen wurden.

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

6. Es gelten die Begriffsbestimmungen der Anlage.

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN

7. In einer Validierungsstudie (10) und in anderen veröffentlichten Studien (16) (17) wurde festgestellt, dass die TER-Prüfmethode zur Untersuchung von Rattenhaut geeignet ist, mit einer Gesamtempfindlichkeit von 94 % (51/54) und einer Spezifität von 71 % (48/68) zwischen bekannten hautätzenden Chemikalien und nicht hautätzenden Chemikalien aus einer Datenbank mit 122 Stoffen zu unterscheiden.
8. Gegenstand dieser Prüfmethode sind *In-vitro*-Hautverätzungen. Mit der Prüfmethode können nicht ätzende und ätzende Prüfchemikalien nach dem UN GHS bzw. der CLP-Verordnung festgestellt werden. Eine Einschränkung bei dieser Prüfmethode besteht den Validierungsstudien (8) (9) (10) (11) zufolge darin, dass eine Unterkategorisierung ätzender Stoffe und Gemische nach Maßgabe des UN GHS bzw. der CLP-Verordnung nicht möglich ist. Mit dem geltenden Rechtsrahmen wird festgelegt, wie diese Prüfmethode zu verwenden ist. Diese Prüfmethode vermittelt keine geeigneten Informationen über Hautreizungen; mit PM B.46 werden jedoch gezielt die gesundheitlichen Auswirkungen von Hautreizungen *in vitro* untersucht (5). Eine umfassende Evaluierung lokaler Auswirkungen auf die Haut nach einer

einmaligen dermalen Exposition ist dem OECD-Leitliniendokument über integrierte Prüfungs- und Bewertungsansätze (IATA) zu entnehmen (6).

9. In der dieser Prüfmethode zugrunde liegenden Validierung wurden zahlreiche Chemikalien (in erster Linie Stoffe) geprüft, und die empirische Datenbank der Validierungsstudie umfasste 60 Stoffe aus zahlreichen Chemikalienklassen (8) (9). Auf der Grundlage der insgesamt verfügbaren Daten ist festzustellen, dass die Prüfmethode bei zahlreichen Chemikalienklassen und Aggregatzuständen (u. a. Flüssigkeiten, halbfeste Stoffe, Feststoffe und Wachse) anwendbar ist. Da für bestimmte Aggregatzustände jedoch nicht ohne Weiteres Prüfstoffe mit geeigneten Referenzdaten verfügbar sind, ist darauf hinzuweisen, dass bei der Validierung eine vergleichsweise geringe Anzahl an Wachsen und ätzenden Feststoffen bewertet wurde. Flüssigkeiten können wässrig oder nicht wässrig und Feststoffe in Wasser löslich oder unlöslich sein. Wenn nachgewiesen werden kann, dass die Prüfmethode bei einer bestimmten Kategorie von Stoffen nicht anwendbar ist, sollte sie bei diesen nicht verwendet werden. Diese Prüfmethode kann jedoch nicht nur bei Stoffen verwendet werden, sondern wird auch als für Gemische geeignet betrachtet. Da Gemische jedoch vielfältigen Kategorien zuzurechnen sein und unterschiedliche Zusammensetzungen haben können, und da gegenwärtig nur begrenzte Informationen über die Prüfung von Gemischen verfügbar sind, sollten Prüfmethoden, bei denen nachgewiesen werden kann, dass sie für eine bestimmte Kategorie von Gemischen nicht geeignet sind (beispielsweise durch ein Verfahren entsprechend dem von Eskes u. a. (2012) vorgeschlagenen Verfahren) (18), für die betreffende Kategorie von Gemischen nicht verwendet werden. Bevor die Prüfmethode für die Generierung von Daten für einen bestimmten Regulierungszweck verwendet wird, ist zu prüfen, ob sie für den beabsichtigten Zweck angemessene Ergebnisse liefern kann und, wenn dem so ist, warum. Solche Erwägungen entfallen, wenn die Prüfung des Gemischs rechtlich vorgeschrieben ist. Gase und Aerosole wurden bislang noch nicht in Validierungsstudien bewertet (8)(9). Obwohl deren Prüfung mit der TER-Prüfmethode prinzipiell vorstellbar ist, erlaubt die vorliegende Prüfmethode das Untersuchen von Gasen und Aerosolen nicht.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

10. Die Prüfchemikalie wird in einem Zweikammersystem bis zu 24 Stunden lang auf den Epidermisflächen von Hautstücken aufgebracht, wobei die Hautstücke als Trennwand zwischen den beiden Kammern fungieren. Die Hautstücke werden 28-30 Tage alten Ratten entnommen, die zuvor tierschutzgerecht getötet wurden. Hautätzende Chemikalien werden anhand ihrer Fähigkeit ermittelt, einen Verlust der normalen Beschaffenheit und Barrierefunktion der Hornhaut (*stratum corneum*) herbeizuführen, welcher als Senkung des TER unter einen bestimmten Schwellenwert (16) gemessen wird (Nummer 32). Beim TER der Haut von Ratten wurde ein Schwellenwert von 5 k Ω auf der Grundlage umfangreicher Datenbestände für ein breites Spektrum unterschiedlicher Chemikalien gewählt, wobei die überwiegende Mehrzahl der Werte entweder eindeutig deutlich oberhalb dieses Schwellenwerts (oft > 10 k Ω) oder aber deutlich unterhalb dieses Werts (oft < 3 k Ω) lag (16). Im Allgemeinen sinkt der TER bei

Prüfchemikalien, die bei Tieren nicht hautätzend wirken, aber hautreizende bzw. nicht hautreizende Eigenschaften aufweisen, nicht bis unter diesen Schwellenwert. Außerdem kann sich durch die Verwendung anderer Hautherstellungen oder anderer Prüfgeräte der Schwellenwert verändern, wodurch eine zusätzliche Validierung notwendig wird.

11. Im Prüfverfahren ist zur Bestätigung der Prüfungen auf positive Ergebnisse im TER (einschließlich Werten um ca. 5 kΩ) ein Farbbindungsschritt vorgesehen. Durch den Farbbindungsschritt wird festgestellt, ob die steigende Ionenpermeabilität auf die materielle Zerstörung der Hornhaut (*stratum corneum*) zurückzuführen ist. Durch die TER-Methode mit Rattenhaut konnte eine gute Vorhersagegenauigkeit der hautätzenden *In-vivo*-Wirkung bei dem nach Prüfmethode B.4 (2) untersuchten Kaninchen nachgewiesen werden.

NACHWEIS DER LEISTUNGSFÄHIGKEIT

12. Vor der routinemäßigen Anwendung der TER-Prüfmethode mit Rattenhaut nach dieser Prüfmethode sollten Labors die erforderliche technische Befähigung durch eine ordnungsgemäße Klassifizierung der zwölf in Tabelle 1 empfohlenen Leistungsstoffe nachweisen. Wenn ein dort genannter Stoff nicht verfügbar ist bzw. wenn dies gerechtfertigt ist, kann ein anderer Stoff verwendet werden, für den geeignete *In-vivo*- und *In-vitro*-Referenzdaten verfügbar sind (z. B. aus der Liste der Referenzchemikalien (16)), sofern die in Tabelle 1 beschriebenen Auswahlkriterien angewendet werden.

Tabelle 1: Liste der Leistungsstoffe¹

Stoff	CAS-Nr.	Chemikalienklasse ²	UN GHS/CLP Kat. nach <i>In-vivo</i> - Ergebnissen ³	VRM Kat. nach <i>In-vitro</i> - Ergebnissen	Aggregat- zustand	pH ⁴
<i>In vivo</i> ätzende Chemikalien						
N,N'-Dimethyl dipropylenetriamin	10563-29-8	organische Base	1A	6 x C	L	8,3
1,2-Diaminopropan	78-90-0	organische Base	1A	6 x C	L	8,3
Chlorwasserstoffsäure (10 %)	7664-93-9	anorganische Säure	(1A/1B/1C)	5 x C 1x NC	L	1,2
Kaliumhydroxid (10 % aq.)	1310-58-3	anorganische Base	(1A/1B/1C)	6 x C	L	13,2
Octansäure (Caprylsäure)	124-07-2	organische Säure	1B/1C	4 x C 2 x NC	L	3,6
2-tert-Butylphenol	88-18-6	Phenol	1B/1C	4 x C 2 x NC	L	3,9
<i>In Vivo</i> nicht ätzende Chemikalien						
Isostearinsäure	2724-58-5	organische Säure	NC	6 x NC	L	3,6
4-Amino-1,2,4- Triazol	584-13-4	organische Base	NC	6 x NC	S	5.5

Stoff	CAS-Nr.	Chemikalienklasse ²	UN GHS/CLP Kat. nach <i>In-vivo</i> - Ergebnissen ³	VRM Kat. nach <i>In-vitro</i> - Ergebnissen	Aggregat- zustand	pH ⁴
Phenethylbromid	103-63-9	Elektrophil	NC	6 x NC	L	3,6
4-(Methylthio)- Benzaldehyd	3446-89-7	Elektrophil	NC	6 x NC	L	6,8
1,9-Decadien	1647-16-1	neutral organisch	NC	6 x NC	L	3,9
Tetrachlorethylen	127-18-4	neutral organisch	NC	6 x NC	L	4,5

Abkürzungen: aq = wässrig; CAS-Nr. (CAS Registry Number = CAS-Registrierungsnummer); VRM = validierte Referenzmethode; ND = nicht bestimmt.

¹ Die Leistungsstoffe, sortiert zunächst nach ätzenden und nicht ätzenden Stoffen, anschließend nach Unterkategorien ätzender Stoffe und schließlich nach Chemikalienklassen, wurden unter den in der Validierungsstudie des Europäischen Zentrum zur Validierung alternativer Methoden (EZVAM) zur TER-Prüfmethode mit Rattenhäuten ausgewählt (8) (9). Wenn nicht anderweitig angegeben, wurden die Stoffe in der Reinheit geprüft, in der sie im Handel gekauft wurden (8). Die Auswahl beinhaltete nach Möglichkeit Stoffe, die (i) repräsentativ für die Spanne der Ätzwirkungen sind (z. B. nicht ätzend, schwach ätzend usw. bis hin zu stark ätzend), die mit der VRM gemessen oder vorhergesagt werden können; (ii) repräsentativ für die in der Validierungsstudie verwendeten Chemikalienklassen sind; (iii) Aufschluss über die Leistungsmerkmale der VRM geben; (iv) durch gut definierte chemische Strukturen gekennzeichnet sind; (v) bei der *In-vivo* -Referenzprüfmethode klare Ergebnisse induzieren; (vi) im Handel erhältlich sind; (vii) nicht mit nicht tragbaren Entsorgungskosten verbunden sind.

² Von Barratt u. a. zugewiesene Chemikalienklasse (8).

³ Den UN-GHS-/CLP-Kategorien 1A, 1B und 1C entsprechen die UN-Verpackungsgruppen I, II und III.

⁴ Die pH-Werte wurden von Fentem u. a. (9) und Barratt u. a. (8) ermittelt.

VERFAHREN

13. Für die TER-Prüfmethode zur Feststellung der Ätzwirkung bei Rattenhaut sind Standardarbeitsanweisungen (SOPs) verfügbar (19). Die in dieser Prüfmethode verwendeten TER-Prüfmethoden mit Rattenhaut sollten die folgenden Anforderungen erfüllen:

Versuchstiere

14. Für die Prüfung sollten Ratten verwendet werden, weil die Empfindlichkeit von Rattenhaut gegenüber den bei dieser Prüfmethode verwendeten Stoffen bereits nachgewiesen wurde (12) und weil nur Rattenhaut bislang förmlich validiert wurde (8) (9). Alter (wenn sich die Haut vollständig gebildet hat) und Abstammung der Ratten sind von besonderer Bedeutung, damit gewährleistet ist, dass sich die Fellfollikel in der Ruhephase befinden, bevor das Fellwachstum der erwachsenen Tiere beginnt.
15. An den jungen, ca. 22 Tage alten männlichen oder weiblichen Ratten (Wistar-Ratten oder vergleichbare Abstammung) wird das Fell am Rücken und an den Flanken mit einem geeigneten Instrument sorgfältig geschoren. Anschließend werden die Tiere mit vorsichtigen Wischbewegungen gewaschen, wobei die geschorenen Flächen in eine Antibiotikallösung

getaucht werden (die Lösung enthält beispielsweise Streptomycin, Penicillin, Chloramphenicol und Amphotericin in Konzentrationen, die ein bakterielles Wachstum verhindern). Die Tiere werden dann am dritten oder vierten Tag nach dem ersten Waschvorgang erneut gewaschen und innerhalb von 3 Tagen nach dem zweiten Waschvorgang verwendet, wenn sich die Hornhaut vom Schervorgang erholt hat.

Gewinnung der Hautstücke

16. Die Versuchstiere werden im Alter von 28-30 Tagen tierschutzgerecht getötet; dieses Alter ist von entscheidender Bedeutung. Die dorsal-laterale Haut der Tiere wird entfernt und von überschüssigem subkutanem Fett befreit, das von der Haut sorgfältig abgeschält wird. Es werden Hautstücke mit einem Durchmesser von je ca. 20 mm entnommen. Die Haut kann vor der Verwendung der Hautstücke eingelagert werden, wenn sich zeigt, dass die positiven und negativen Kontrolldaten mit den an frischer Haut ermittelten Daten übereinstimmen.
17. Jedes Hautstück wird so über das Ende eines PTFE-(Polytetrafluorethylen)-Rohres gelegt, dass die Epidermisoberfläche auf dem Ende des Rohres aufliegt. Zur Fixierung des Hautstücks wird ein O-Ring aus Gummi straff über das Rohrende gezogen, so dass die Haut fixiert wird. Überflüssiges Hautgewebe wird abgeschnitten. Der O-Ring wird sodann mit gereinigter Naturvaseline zum Ende des PTFE-Rohrs hin gründlich abgedichtet. Das Rohr wird durch eine Federklemme in einer Rezeptorkammer gehalten, die MgSO_4 -Lösung (154 mM) enthält (Abbildung 1). Das Hautstück ist vollständig in die MgSO_4 -Lösung einzutauchen. Aus einer einzigen Rattenhaut können bis zu 10-15 Hautstücke entnommen werden. Die Abmessungen des Rohrs und des O-Rings sind in Abbildung 2 angegeben.
18. Vor Beginn der Prüfung wird zu Qualitätssicherungszwecken bei jeder Tierhaut der TER an zwei Hautstücken gemessen. Beide Hautstücke müssen einen Widerstand von mehr als 10 k Ω aufweisen, damit sie für die Prüfmethode verwendet werden können. Liegt der Widerstand unter 10 k Ω , sind die übrigen Hautstücke der betreffenden Tierhaut zu vernichten.

Applikation der Prüfchemikalie und Kontrollstoffe

19. Zu jedem Prüflauf (Versuch) sind gleichzeitige Positiv- und Negativkontrollen durchzuführen, damit eine angemessene Eignung des Experimentalmodells gewährleistet ist. Bei jedem Prüflauf (Versuch) sind Hautstücke eines einzigen Tieres zu verwenden. Als Prüfchemikalien für die Positiv- und Negativkontrolle sind 10 M Chlorwasserstoffsäure bzw. destilliertes Wasser zu verwenden.
20. Die flüssigen Prüfchemikalien (150 μl) werden im Rohrinneen gleichmäßig auf die epidermale Oberfläche aufgebracht. Bei Prüfungen an Feststoffen wird eine ausreichende Menge des Feststoffs gleichmäßig auf das Hautstück aufgebracht, so dass gewährleistet ist, dass die gesamte Epidermisoberfläche bedeckt ist. Auf den Feststoff wird entionisiertes Wasser (150 μl) aufgebracht und das Rohr vorsichtig bewegt. Um optimalen Kontakt der Prüfchemikalien mit der Haut zu erreichen, müssen einige Feststoffe gegebenenfalls auf 30 °C erwärmt werden, so

dass die Prüfchemikalie schmilzt oder weich wird, oder die Prüfchemikalie muss zu einem Granulat oder Pulver zermahlen werden.

21. Für jede Prüf- und Kontrollchemikalie werden bei jedem Prüflauf (Versuch) je drei Hautstücke verwendet. Die Prüfchemikalien werden für 24 h bei 20-23 °C aufgebracht. Anschließend wird die Prüfchemikalie mit fließendem Leitungswasser höchstens mit Raumtemperatur gewaschen, bis kein weiteres Material mehr entfernt werden kann.

TER-Messungen

22. Der Hautwiderstand wird als TER mit einer Wheatstone'schen Wechselstrom-Messbrücke mit niedriger Spannung gemessen (18). Die Kenndaten der Messbrücke lauten: Betriebsspannung 1-3 V, sinus- oder rechteckförmiger Wechselstrom mit 50-1000 Hz, Messbereich mindestens 0,1-30 k Ω . Die in der Validierungsstudie verwendete Datenbrücke misst Induktivität, Kapazität und Widerstand bis 2000 H, 2000 μ F bzw. 2 M Ω bei Frequenzen von 100 Hz oder 1 kHz unter Verwendung serieller oder paralleler Werte. Für die TER-Messungen werden Messungen der hautätzenden Wirkung in Widerständen bei einer Frequenz von 100 Hz und unter Verwendung serieller Werte verwendet. Vor der Messung des elektrischen Widerstands wird die Oberflächenspannung der Haut verringert, indem so viel 70%iges Ethanol hinzugegeben wird, dass die Epidermis bedeckt ist. Nach einigen Sekunden wird das Ethanol aus dem Rohr entfernt und das Hautgewebe durch Hinzufügen von 3 ml MgSO₄-Lösung (154 mM) befeuchtet. Zur Messung des Widerstands in k Ω /Hautstück (Abbildung 1) werden die Elektroden der Datenbrücke auf beiden Seiten des Hautstücks angebracht. Die Gesamtabmessungen der Elektroden sowie die Länge der Elektrode unterhalb der Abgreifklemmen sind in Abbildung 2 dargestellt. Die an der Innenelektrode angebrachte Abgreifklemme liegt während der Widerstandsmessung oben auf dem PTFE-Rohr auf, so dass stets eine gleich bleibende Elektrodenlänge in die MgSO₄-Lösung eingetaucht bleibt. Die äußere Elektrode ist in der Rezeptorkammer so angeordnet, dass sie am Kammerboden ansteht. Der Abstand zwischen der Federklemme und dem unteren Ende des PTFE-Rohrs bleibt konstant (Abbildung 2), da dieser Abstand den erzielten Widerstandswert beeinflusst. Folglich muss auch der Abstand zwischen der Innenelektrode und dem Hautstück konstant und möglichst gering sein (1-2 mm).
23. Ist der gemessene Widerstand größer als 20 k Ω , so kann dies daran liegen, dass ein Rest der Prüfchemikalie die Epidermisoberfläche des Hautstücks bedeckt. Zur weiteren Entfernung dieser Schicht kann beispielsweise versucht werden, das PTFE-Rohr mit dem Daumen (geschützt durch einen Gummihandschuh) zu verschließen und das Rohr ca. 10 Sekunden lang zu schütteln; anschließend wird die MgSO₄-Lösung weggeschüttet und die Widerstandsmessung mit frischer MgSO₄-Lösung wiederholt.
24. Eigenschaften und Abmessungen der Prüfapparatur und das verwendete Versuchsverfahren können die ermittelten TER-Werte beeinflussen. Der Schwellenwert von 5 k Ω für hautätzende Wirkung wurde aus Daten abgeleitet, die mit der/dem in dieser Methode beschriebenen speziellen Versuchsanordnung und Versuchsverfahren ermittelt wurden. Abweichende Schwellen- und Kontrollwerte gelten möglicherweise, wenn sich die Prüfbedingungen ändern

oder eine andere Versuchsanordnung verwendet wird. Daher müssen die Schwellenwerte für die Methodik und den Widerstand durch Prüfung einer Reihe von Leistungsstoffen kalibriert werden, die aus den in der Validierungsstudie (8) (9) verwendeten Stoffen oder aus Chemikalienklassen, die den untersuchten Stoffen ähneln, ausgewählt wurden. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über geeignete Leistungsstoffe.

Farbbindungsmethoden

25. Bei bestimmten nicht hautätzenden Materialien, denen die Haut ausgesetzt ist, kann der Widerstand unter den Schwellenwert von 5 k Ω sinken, wodurch es zum Ionendurchtritt durch die Hornhaut kommt und der elektrische Widerstand absinkt (9). So können beispielsweise neutrale organische Stoffe und Chemikalien mit oberflächenaktiven Eigenschaften (u. a. Detergenzien, Emulgatoren und andere Tenside) die Hautlipide entziehen, wodurch die Trennschicht ionendurchlässiger wird. Liegen die TER-Werte dieser Prüfchemikalien also unter oder um 5 k Ω und sind keine optischen Anzeichen einer Schädigung der Hautstücke zu erkennen, ist eine Beurteilung des Farbeindringvermögens an den behandelten Hautgeweben und den Kontrollgeweben durchzuführen, um festzustellen, ob die ermittelten TER-Werte durch gestiegene Hautpermeabilität oder durch hautätzende Wirkung zustande kamen (7) (9). In letzterem Fall dringt, wenn eine Unterbrechung der Hornhaut vorliegt, der auf die Hautoberfläche aufgetragene Farbstoff Sulforhodamin B rasch ein und verursacht eine Verfärbung des darunter liegenden Hautgewebes. Dieser Farbstoff ist gegenüber einer breiten Palette von Stoffen stabil und wird durch das nachstehend beschriebene Extraktionsverfahren nicht beeinflusst.

Anwendung und Entfernung von Sulforhodamin-B-Farbstoff

26. Nach der Beurteilung der TER-Prüfungen wird das Magnesiumsulfat aus dem Rohr abgeschüttet und die Haut sorgfältig auf erkennbare Schäden untersucht. Wenn keine offensichtliche größere Schädigung (z. B. eine Perforation) zu erkennen ist, werden 150 μ l einer 10%igen (w/v) Verdünnung des Farbstoffs Sulforhodamin B (Acid Red 52, CI-Nr. 45100; CAS-Nr. 3520-42-1) 2 h in destilliertem Wasser auf die Epidermis der einzelnen Hautstücke aufgetragen. Diese Hautstücke werden anschließend höchstens bei Raumtemperatur unter fließendem Wasser ca. 10 Sekunden lang abgewaschen, um überschüssige/ungebundene Farbe zu entfernen. Jedes Hautstück wird sorgfältig vom PTFE-Rohr entfernt und in ein Gefäß (z. B. ein 20-ml-Szintillationsfläschchen) eingelegt, das entionisiertes Wasser (8 ml) enthält. Die Fläschchen werden 5 Minuten lang vorsichtig geschüttelt, um restliche ungebundene Farbe zu entfernen. Nach Wiederholung des Spülvorgangs werden die Hautstücke entnommen und in Fläschchen eingelegt, die 5ml 30%iges (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS) in destilliertem Wasser enthalten, und über Nacht bei 60 °C aufbewahrt.
27. Nach dieser Inkubation werden die einzelnen Hautstücke entnommen und entsorgt und die verbleibende Lösung 8 Minuten lang bei 21 °C zentrifugiert (relative Zentrifugalkraft $\sim 175 \times g$). Eine 1-ml-Probe des oberflächenaktiven Stoffs wird im Verhältnis 1:5 (v/v) (d. h. 1 ml +

4 ml) mit 30%igem (w/v) SDS in destilliertem Wasser verdünnt. Die optische Dichte (OD) der Lösung wird bei 565 nm gemessen.

Berechnung des Farbgehalts

28. Der Gehalt an Sulforhodamin-B-Farbstoff je Hautstück wird mittels der OD-Werte (9) berechnet (molarer Extinktionskoeffizient von Sulforhodamin B bei 565 nm = $8,7 \times 10^4$, Molekulargewicht = 580). Der Farbstoffgehalt wird für jedes der drei Hautstücke durch eine entsprechende Kalibrierungskurve bestimmt und dann der mittlere Farbstoffgehalt für die Wiederholungs-Gleichtests berechnet.

Akzeptanzkriterien

29. Die mittleren TER-Werte werden akzeptiert, wenn die Ergebnisse der gleichzeitigen Positiv- und Negativkontrollen innerhalb der akzeptablen Bereiche für die Methode im Prüflabor liegen. Die akzeptablen Widerstandsbereiche für die oben beschriebene Methode und Versuchsanordnung lauten wie folgt:

Kontrolle	Stoff	Widerstandsbereich (k Ω)
Positiv-kontrolle	10 M Chlorwasserstoffsäure	0,5-1,0
Negativ-kontrolle	Destilliertes Wasser	10-25

30. Die ermittelten Mittelwerte der Farbbindung werden nur akzeptiert, wenn die Ergebnisse der gleichzeitig geprüften Kontrollen innerhalb definierter Akzeptanzgrenzen der betreffenden Methode liegen. Die für die Kontrollstoffe der oben beschriebenen Methodik und Versuchsanordnung vorgeschlagenen Akzeptanzspannen sind der folgenden Tabelle zu entnehmen:

Kontrolle	Stoff	Farbgehaltsbereich (μ g/Hautstück)
Positiv-kontrolle	10 M Chlorwasserstoffsäure	40-100
Negativ-kontrolle	Destilliertes Wasser	15-35

Auswertung der Ergebnisse

31. Der TER-Schwellenwert zur Unterscheidung zwischen ätzenden und nicht ätzenden Prüfchemikalien wurde bei der Optimierung der Prüfmethode ermittelt, in einer Vorvalidierungsphase geprüft und in einer förmlichen Validierungsstudie bestätigt.
32. Im Folgenden wird das Vorhersagemodell für die TER-Prüfmethode zur Feststellung von Hautätzungen bei Rattenhaut (9)(19) in Verbindung mit dem Klassifizierungssystem des UN GHS bzw. der CLP-Verordnung erläutert:

Die Prüfchemikalie gilt als ‚nicht hautätzend‘:

- i) wenn der Mittelwert des für die Prüfchemikalie ermittelten TER-Werts größer als 5 k Ω ist oder
- ii) wenn der Mittelwert des für die Prüfchemikalie ermittelten TER-Werts gleich 5 k Ω oder kleiner ist und
- die Hautstücke keine wahrnehmbaren Veränderungen (z. B. Perforationen) erkennen lassen, und
- der mittlere Farbstoffgehalt des Hautstücks unter (<) dem mittleren Farbstoffgehalt des Hautstücks der gleichzeitig mit 10M HCl durchgeführten Positivkontrolle liegt (siehe Nummer 30 zu Werten der Positivkontrolle).

Die Prüfchemikalie gilt als ‚hautätzend‘:

- i) wenn der für die Prüfchemikalie ermittelte Mittelwert des TER-Werts gleich 5 k Ω oder kleiner ist ($\leq$) und das Hautstück offensichtliche Schädigungen aufweist (z. B. eine Perforation) oder
 - ii) wenn der Mittelwert des für die Prüfchemikalie ermittelten TER-Werts gleich 5 k Ω oder kleiner ist, und
 - die Hautstücke keine wahrnehmbaren Veränderungen (z. B. Perforationen) erkennen lassen, aber
 - der mittlere Farbstoffgehalt des Hautstücks größer oder gleich ($\geq$) dem mittleren Farbstoffgehalt des Hautstücks der gleichzeitig mit 10M HCl durchgeführten Positivkontrolle ist (siehe Nummer 30 zu Werten der Positivkontrolle).
33. Vorausgesetzt die Prüfung liefert ein eindeutiges Ergebnis, genügt ein einziger Prüflauf (Versuch) mit drei parallel geprüften Replikat-Hautstücken. Bei Grenzergebnissen, wie z. B. nicht übereinstimmenden Replikatmessungen und/oder einer mittleren TER-Werten von $5 \pm 0,5$ k Ω , sollte ein zweiter unabhängiger Prüflauf (Versuch) in Betracht gezogen werden bzw. ein dritter bei abweichenden Ergebnissen der ersten beiden Prüfläufe (Versuche).

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Daten

34. Die Widerstandswerte (k) und ggf. die Farbstoffgehalte ($\mu\text{g}/\text{Hautstück}$) für die Prüfchemikalie sowie für Positiv- und Negativkontrollen sind in Tabellenform einschließlich der Daten für die einzelnen Replikat-Hautstücke pro Prüflauf (Versuch) und der Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung in Berichten zusammenzufassen. Alle Wiederholungsversuche sollten vermerkt werden. Für jede Prüfchemikalie sind festgestellte Schädigungen der Hautstücke zu vermerken.

Prüfbericht

35. Der Prüfbericht sollte folgende Angaben enthalten:

Prüfchemikalien und Kontrollchemikalien:

- Einkomponentiger Stoff: chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS-Bezeichnung, CAS-Nummer, SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel, Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.;
- mehrkomponentiger Stoff, UVCB und Gemische: So weit wie möglich charakterisiert durch die chemische Zusammensetzung (siehe oben), das quantitative Vorkommen und die relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften der einzelnen Komponenten;
- physikalisches Erscheinungsbild, Wasserlöslichkeit und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften;
- Herkunft, Chargennummer, sofern vorhanden;
- Behandlung der Prüfchemikalien/Kontrollstoffe vor der Prüfung, sofern relevant (z. B. Erwärmen, Mahlen);
- Stabilität der Prüfchemikalie, letztes Verwendungsdatum oder Datum für erneute Analyse, soweit bekannt;
- Lagerungsbedingungen.

Versuchstiere:

- Abstammung und Geschlecht;
- Alter der Tiere zum Zeitpunkt der Verwendung als Spendertiere;
- Herkunft der Tiere, Haltungsbedingungen, Futter usw.;
- Details zur Herstellung der Hautstücke.

Prüfbedingungen:

- Eichkurven für die Versuchsaapparaturen;
- Eichkurven für die Durchführung der Farbbindungsprüfungen, verwendete Bandbreite für die Messung von OD-Werten und die OD-Linearitätsspanne des Messgeräts (z. B. eines Spektrophotometers) (sofern relevant);
- Details des Prüfverfahrens für die TER-Messungen;
- Details des Prüfverfahrens für die Beurteilung der Farbbindefähigkeit (sofern relevant);
- verwendete Prüfdosierungen, Expositionszeitraum (-zeiträume) und -temperatur(en);
- Details zum verwendeten Waschverfahren nach dem Expositionszeitraum;
- Anzahl der je Prüfchemikalie und Kontrolle (Positiv- und Negativkontrolle) verwendeten Replikat-Hautstücke;
- Beschreibung etwaiger Änderungen am Prüfverfahren;
- Verweis auf historische Modelldaten. Dabei sollten unter anderem die folgenden Aspekte berücksichtigt werden:

- i) Akzeptanz der TER-Werte der Positiv- und Negativkontrolle (in $k\Omega$) mit Verweis auf die Spannen der Widerstandswerte der Positiv- und Negativkontrollen,
 - ii) Akzeptanz der Farbstoffgehaltswerte der Positiv- und Negativkontrolle (in $\mu\text{g}/\text{Hautstück}$) mit Verweis auf die Spannen der Farbstoffgehaltswerte der Positiv- und Negativkontrollen,
 - iii) Akzeptanz der Prüfergebnisse mit Verweis auf die historischen Schwankungen zwischen Replikat-Hautstücken;
- Beschreibung der berücksichtigten Entscheidungskriterien und des verwendeten Vorhersagemodells.

Ergebnisse:

- Tabellarische Darstellung der Daten der Versuche zur Beurteilung der TER-Werte und der Farbbindefähigkeit (wenn relevant) für die einzelnen Prüfchemikalien und Kontrollen, für jeden einzelnen Prüflauf (Versuch) und für jedes Replikat-Hautstück (einzelne Tiere und einzelne Hautproben), Mittel, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten;
- Beschreibung etwaiger beobachteter Wirkungen;
- abgeleitete Einstufung mit Bezug auf das Vorhersagemodell und/oder angewandte Entscheidungskriterien.

Erörterung der Ergebnisse

Schlussfolgerungen

LITERATUR

- (1) Vereinte Nationen (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), fünfte überarbeitete Ausgabe, UN New York und Genf, 2013. Abrufbar unter:
[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html].
- (2) Kapitel B.4 dieses Anhangs, Akute Hautreizung/-verätzung.
- (3) Kapitel B.40bis dieses Anhangs, *In-vitro*-Hautmodell.
- (4) Kapitel B.65 dieses Anhangs, *In-vitro*-Methode zur Untersuchung der Membranbarriere.
- (5) Kapitel B.46 dieses Anhangs, *In-vitro*-Hautreizung: Prüfmethode mit rekonstruierter humaner 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, 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., and Balls, M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 6. *ATLA* 23, 219-255.
- (8) Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P. und 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., and Liebsch, M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests For Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxic.In Vitro* 12, 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, CA., Repetto, G., Sladowski, D., Spielmann, H. und 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), herausgegeben vom Wissenschaftlich Beratenden Ausschuss (ESAC) des ECVAM (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 EpiDermTM (EPI-200), EPISKINTM (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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
 - (16) Oliver, G.J.A., Pemberton, M.A. und 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. und 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., Brüscheiler, 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. und 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung,
Paris.

ABBILDUNG 1: APPARATUR FÜR DIE TER-PRÜFUNG MIT RATTENHAUT

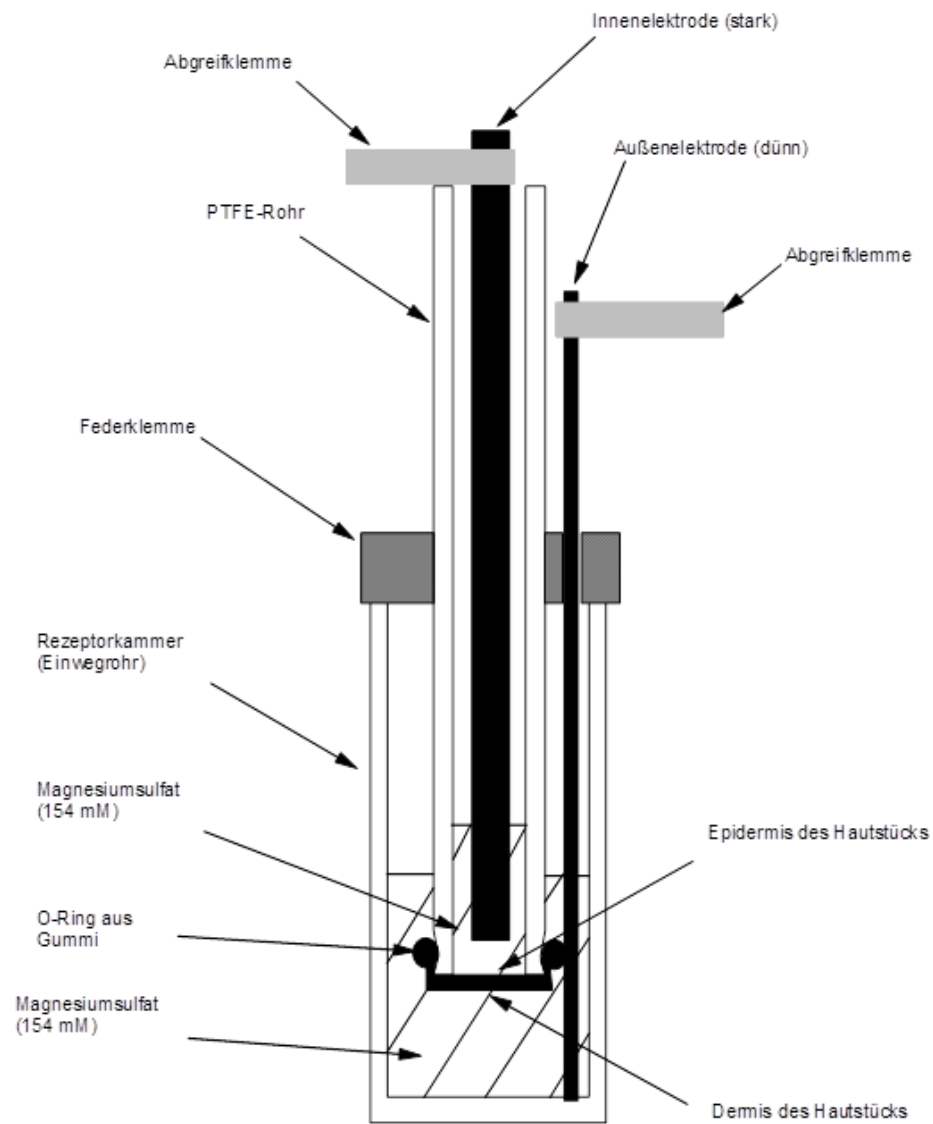
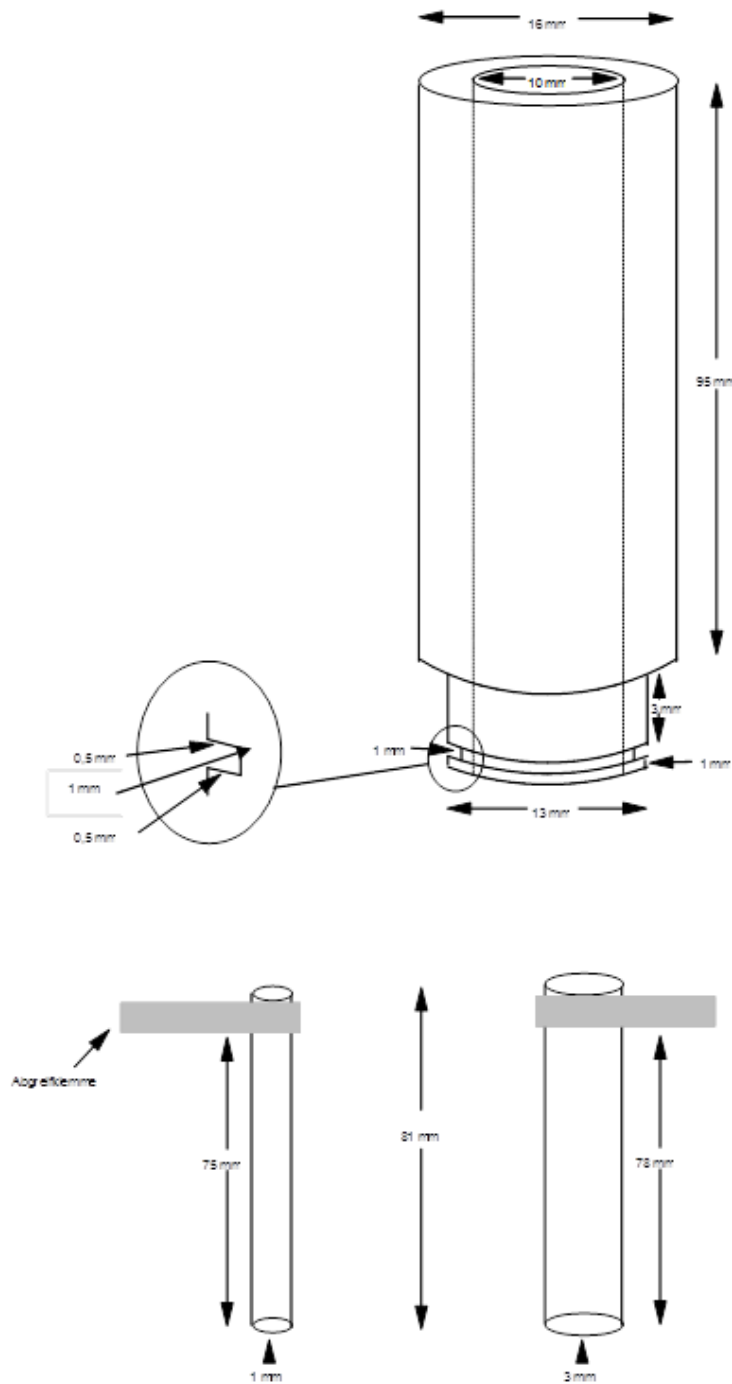


ABBILDUNG 2: ABMESSUNGEN DER POLYTETRAFLUORETHYLEN- (PTFE-) UND REZEPTORROHRE UND DER VERWENDETEN ELEKTRODEN



Kritische Faktoren der obigen Apparaturen:

- Innendurchmesser des PTFE-Rohrs,
- Länge der Elektroden in Relation zum PTFE-Rohr und zum Rezeptorrohr, so dass die Hautscheibe nicht mit den Elektroden in Kontakt kommen sollte und die Elektrode auf einer Standardlänge mit der MgSO_4 -Lösung in Kontakt steht,
- die Menge an MgSO_4 -Lösung im Rezeptorrohr muss in Relation zum Füllstand im PTFE-Rohr den in Abbildung 1 dargestellten Flüssigkeitsstand ergeben,
- das Hautstück muss so am PTFE-Rohr befestigt sein, dass der elektrische Widerstand ein richtiges Maß für die Hauteigenschaften darstellt.

Anlage

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

C: Hautätzend

Chemikalie: Ein Stoff oder ein Gemisch.

Einkomponentiger Stoff: Ein nach seiner quantitativen Zusammensetzung definierter Stoff, bei dem mehr als ein Hauptbestandteil in einer Konzentration von mindestens 80 % w/w vorliegt.

Gemisch: Ein Gemisch oder eine Lösung, die aus zwei oder mehr Stoffen besteht.

Genauigkeit: Der Grad an Übereinstimmung zwischen Testergebnissen und akzeptierten Referenzwerten. Die Genauigkeit ist ein Maß der Leistung der Prüfmethode und ein Aspekt der Relevanz. Der Begriff wird oft im Sinne von ‚Übereinstimmung‘ verwendet und bezeichnet den Anteil der korrekten Ergebnisse einer Prüfmethode (20).

GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals = Global harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung) (UN): Ein System zur Klassifizierung von Chemikalien (Stoffen und Gemischen) nach standardisierten Typen und Stufen physikalischer, gesundheitlicher und ökologischer Gefahren und zur entsprechenden Kennzeichnung durch Piktogramme, Signalwörter, Gefahrenhinweise, Sicherheitshinweise und Sicherheitsdatenbögen, um zum Schutz des Menschen (einschließlich Arbeitgeber, Arbeiter, Spediteure, Verbraucher und Notfall-Einsatzkräfte) und der Umwelt Informationen über die schädlichen Wirkungen der betreffenden Chemikalien zu verbreiten (1).

Hautverätzung, *in vivo*: Das Auslösen einer irreversiblen Hautschädigung, d. h. einer sichtbaren, bis in das Corium reichenden Nekrose der Epidermis nach Applikation einer Prüfchemikalie für die Dauer von bis zu 4 Stunden. Verätzungsreaktionen sind gekennzeichnet durch Geschwüre, Blutungen, blutige Verschorfungen und am Ende des Beobachtungszeitraums von 14 Tagen durch eine auf ein Ausbleichen der Haut zurückzuführende Verfärbung, komplett haarlose Bereiche und Narben. Bei der Beurteilung fragwürdiger Schädigungen ist die Histopathologie mit zu berücksichtigen.

IATA: Integrated Approach to Testing and Assessment = integrierter Prüfungs- und Bewertungsansatz.

Leistungsstandards (PS): Auf einer validierten Prüfmethode beruhende Normen, auf deren Grundlage die Vergleichbarkeit einer vorgeschlagenen, mechanistisch und funktionell ähnlichen Prüfmethode bewertet werden kann. Sie umfassen (i) wesentliche Elemente der Prüfmethode; (ii) ein Mindestverzeichnis von Referenzchemikalien, ausgewählt aus den Chemikalien, die zum Nachweis der akzeptablen Leistung der validierten Referenzmethode verwendet werden; und (iii) je nach den für die validierte Referenzmethode erzielten Ergebnissen die vergleichbaren Zuverlässigkeits- und Genauigkeitswerte, die die vorgeschlagene Prüfmethode bei der Bewertung anhand des Mindestverzeichnisses von Referenzchemikalien demonstrieren sollte.

Mehrkomponentiger Stoff: Ein nach seiner quantitativen Zusammensetzung definierter Stoff,

bei dem mehr als ein Hauptbestandteil in einer Konzentration von mindestens $\geq 10\%$ w/w und $< 80\%$ w/w vorliegt. Ein mehrkomponentiger Stoff ist das Ergebnis eines Herstellungsprozesses. Der Unterschied zwischen einem Gemisch und einem mehrkomponentigen Stoff besteht darin, dass ein Gemisch durch die Mischung von zwei oder mehr Stoffen ohne chemische Reaktion entsteht. Ein mehrkomponentiger Stoff wird durch eine chemische Reaktion gebildet.

NC: Nicht hautätzend

OD: Optische Dichte.

PK: Positivkontrolle, ein Replikat, das alle Komponenten eines Prüfsystems enthält und mit einem Stoff behandelt wird, der bekanntermaßen eine positive Reaktion hervorruft. Um sicherzustellen, dass Abweichungen bei der Positivkontrollreaktion im Zeitverlauf bewertet werden können, sollte die Reaktion nicht zu heftig sein.

Prüfchemikalie: Stoff oder Gemisch, der/das mit dieser Prüfmethode untersucht wird.

Prüflauf: Eine einzelne Prüfchemikalie, die gleichzeitig an mindestens drei Replikat-Hautstücken geprüft wird.

Relevanz: Dieser Begriff bezieht sich auf das Verhältnis zwischen der Prüfmethode und der betreffenden Wirkung und auf die Frage, ob er aussagekräftig und nützlich für einen bestimmten Zweck ist. Er beschreibt das Ausmaß, in dem die Prüfmethode die untersuchte biologische Wirkung korrekt misst oder vorhersagt. Die Relevanz schließt eine Beurteilung der Genauigkeit (Übereinstimmung) einer Prüfmethode ein (20).

Sensitivität: Der Anteil aller positiven/wirkenden Chemikalien, die durch die Prüfmethode korrekt eingestuft werden. Die Sensitivität ist ein Maß der Genauigkeit einer Prüfmethode mit kategorialen Ergebnissen und ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung ihrer Relevanz (20).

Spezifität: Der Anteil aller negativen/wirkungslosen Chemikalien, die durch die Prüfmethode korrekt eingestuft werden. Die Spezifität ist ein Maß der Genauigkeit einer Prüfmethode mit kategorialen Ergebnissen und ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung ihrer Relevanz (20).

Stoff: Ein chemisches Element und seine Verbindungen in natürlicher Form oder gewonnen durch ein Herstellungsverfahren, einschließlich der zur Wahrung seiner Stabilität notwendigen Zusatzstoffe und der durch das angewandte Verfahren bedingten Verunreinigungen, aber mit Ausnahme von Lösungsmitteln, die von dem Stoff ohne Beeinträchtigung seiner Stabilität und ohne Änderung seiner Zusammensetzung abgetrennt werden können.

TER (Transcutaneous Electrical Resistance): Ein Maß für den elektrischen Widerstand der Haut, angegeben als Widerstand in Ohm. Ein einfaches und stabiles Verfahren zur Beurteilung der Barrierefunktion, indem der Ionendurchtritt durch die Haut mithilfe einer Wheatstone-Messbrücke aufgezeichnet wird.

Übereinstimmung: Die Übereinstimmung ist ein Maß der Leistung einer Prüfmethode für Prüfverfahren mit kategorialen Ergebnissen und ein Aspekt der Relevanz. Der Begriff wird gelegentlich gleichbedeutend mit Genauigkeit verwendet und als Anteil aller geprüften Chemikalien definiert, die korrekt als positiv oder negativ eingestuft werden. Die

Übereinstimmung hängt in hohem Maße von der Prävalenz positiver Ergebnisse bei den Typen der untersuchten Prüfchemikalien ab (20).

UVCB: Stoffe mit unbekannter oder schwankender Zusammensetzung, komplexe Reaktionsprodukte oder biologische Materialien.

Zuverlässigkeit: Maß der Verlässlichkeit der Reproduzierbarkeit der Prüfmethode innerhalb von und zwischen Laboratorien in einem bestimmten Zeitintervall bei einheitlichem Protokoll. Die Zuverlässigkeit wird durch Berechnung der Intra- und Interlabor-Reproduzierbarkeit bewertet (20).“

(6) In Teil B erhält Kapitel B.40bis folgende Fassung:

„40bis *IN-VITRO*-PRÜFUNG AUF HAUTÄTZENDE WIRKUNG: PRÜFMETHODE MIT REKONSTRUIERTER HUMANER EPIDERMIS (RHE)

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode (PM) entspricht der OECD-Prüfrichtlinie 431 (2016). Als Hautverätzung wird das Auslösen einer irreversiblen Hautschädigung, d. h. einer sichtbaren, bis in das Corium reichenden Nekrose der Epidermis nach Applikation einer Prüfchemikalie [im Sinne der Definition des Global harmonisierten Systems zur Einstufung und Kennzeichnung von Gefahrstoffen der UN (GHS) (1) und der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen (CLP-Verordnung)¹] bezeichnet. Diese aktualisierte Prüfmethode B.40bis besteht in einem *In-vitro*-Verfahren zur Identifizierung nicht ätzender und ätzender Stoffe und Gemische nach dem UN GHS und der CLP-Verordnung. Sie ermöglicht auch eine partielle Unterkategorisierung ätzender Chemikalien.
2. Die Bewertung des Hautverätzungspotenzials von Chemikalien erfolgte in der Regel unter Verwendung von Labortieren (PM B.4, entsprechend OECD TG 404, ursprünglich angenommen im Jahr 1981 und geändert in den Jahren 1992, 2002 und 2015) (2). Neben dieser Prüfmethode B.40bis wurden noch zwei weitere *In-vitro*-Prüfmethode zur Untersuchung des Verätzungspotenzials von Chemikalien als Prüfmethode B.40 (entsprechend OECD TG 430) (3) und PM B.65 (entsprechend OECD TG 435) validiert und angenommen (4). Außerdem wurde die *In-vitro*-Prüfmethode B.46 (entsprechend OECD TG 439) (5) als Methode zur Untersuchung des Hautreizungspotenzials angenommen. In einem OECD-Leitliniendokument über integrierte Prüfungs- und Bewertungsansätze (IATA = Integrated Approaches to Testing and Assessment) zur Untersuchung von Hautverätzungen und -reizungen werden mehrere Module beschrieben, in denen Informationsquellen und Analyseinstrumente zu Gruppen zusammengefasst werden. Sie enthalten i) Leitlinien dazu, wie vorhandene Daten aus Untersuchungen und aus anderen Quellen integriert und verwendet werden können, um das Hautreizungs- und das Hautverätzungspotenzial von Chemikalien zu bewerten, und ii) einen Vorschlag zur Durchführung ggf. erforderlicher weiterer Untersuchungen (6).
3. Mit dieser Prüfmethode werden Hautverätzungen mit dem Endpunkt der menschlichen Gesundheit untersucht. Für die Prüfmethode wird (aus menschlichen, nicht transformierten

¹ Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen, zur Änderung und Aufhebung der Richtlinien 67/548/EWG und 1999/45/EG und zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 (ABl. L 353 vom 31.12.2008, S. 1).

Keratinocyten) rekonstruierte humane Epidermis (RhE) verwendet, die die histologischen, morphologischen, biochemischen und physiologischen Eigenschaften der menschlichen Oberhaut, d. h. der Epidermis weitgehend widerspiegelt. Die entsprechende OECD-Prüfrichtlinie wurde ursprünglich 2004 angenommen und 2013 unter Berücksichtigung weiterer Prüfmethode unter Verwendung der RhE-Modelle und der Möglichkeit zur Verwendung der Methoden zur Unterstützung der Unterkategorisierung ätzender Chemikalien zunächst im Jahr 2013 und anschließend nochmals im Jahr 2015 unter Verweis auf das IATA-Leitliniendokument und unter Einführung der Verwendung eines alternativen Verfahrens zur Messung der Viabilität aktualisiert.

4. Bei dieser Prüfmethode kommen vier validierte im Handel erhältliche RhE-Modelle zum Einsatz. Nach Vorvalidierungsstudien (7) wurde an zwei dieser im Handel erhältlichen Prüfmodelle – dem EpiSkin™-Standardmodell (SM) und dem EpiDerm™ Skin Corrosivity Test (SCT) (EPI-200) (im Folgenden ‚validierte Referenzmodelle‘ (VRM) – eine förmliche Validierungsstudie zur Bewertung der Hautverätzung (8)(9)(10) durchgeführt (11) (12). Die Ergebnisse dieser Studien führten zur Empfehlung, dass die beiden genannten VRM für rechtliche Zwecke zur Unterscheidung zwischen ätzenden (C) und nicht ätzenden (NC) Stoffen verwendet werden können und dass mit EpiSkin™ zudem die Unterkategorisierung ätzender Stoffe unterstützt werden kann (13)(14)(15). Zwei weitere im Handel erhältliche *In-vitro*-Verfahren auf der Grundlage von RhE-Modellen zeigten nach Validierungsstudien auf Basis der Leistungsstandards ähnliche Ergebnisse wie das VRM EpiDerm™ (16)(17)(18): die RhE-Modelle SkinEthic™¹ und epiCS® (früher auch als EST-1000 bezeichnet), die auch für rechtliche Zwecke zur Unterscheidung zwischen ätzenden und nicht ätzenden Stoffen verwendet werden können (19)(20). Post-Validierungsstudien der Hersteller des RhE-Modells in den Jahren 2012 bis 2014 mit einem verbesserten Protokoll, bei dem Interferenzen durch unspezifische MTT-Reduktion durch die Prüfchemikalien korrigiert werden, ermöglichten zum einen eine bessere Unterscheidung zwischen den Wirkungen C und NC und unterstützten zum anderen die Unterkategorisierung ätzender Chemikalien (21)(22). Die in der Post-Validierung mit dem EpiDerm™ SCT, der SkinEthic™ RHE und EpiCS® gewonnenen Daten wurden weiteren statistischen Analysen unterzogen, um alternative Vorhersagemodelle mit besserer Vorhersagefähigkeit für Unterkategorisierungen zu entwickeln (23).
5. Bevor eine vorgeschlagene ähnliche oder modifizierte *In-vitro*-RhE-Prüfmethode zur Untersuchung auf Hautverätzungen außer den VRM für rechtliche Zwecke verwendet werden kann, sollten nach den Anforderungen der nach den Grundsätzen des OECD-

¹ Die Abkürzung RhE (Reconstructed human Epidermis = rekonstruierte humane Epidermis) wird für alle auf der RhE-Technologie beruhenden Modelle verwendet. In Verbindung mit dem SkinEthic™-Modell wird die Abkürzung RHE im gleichen Sinn verwendet, jedoch ausschließlich in Großbuchstaben geschrieben, da sie in dieser Schreibung Bestandteil des Namens ist, unter dem diese spezifische Prüfmethode auf dem Markt angeboten wird.

Leitliniendokuments Nr. 34 (25) entwickelten Leistungsstandards (24) die Verlässlichkeit, die Relevanz (Genauigkeit) und die Grenzen des Verfahrens für den vorgeschlagenen Verwendungszweck bestimmt werden, um sicherzustellen, dass es mit den VRM vergleichbar ist. Die gegenseitige Anerkennung der Daten wird erst dann garantiert, wenn vorgeschlagene neue oder aktualisierte Prüfmethode auf der Grundlage der Leistungsstandards überprüft und in die entsprechende Prüfrichtlinie aufgenommen wurden. Die in diese Prüfrichtlinie aufgenommenen Prüfmodelle können verwendet werden, um sowohl länderbezogene Anforderungen an die Prüfergebnisse der *In-vitro*-Prüfmethode zur Untersuchung von Hautverätzungen zu erfüllen als auch die gegenseitige Anerkennung von Daten beanspruchen zu können.

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

6. Es gelten die Begriffsbestimmungen in Anlage 1.

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN

7. Diese Prüfmethode ermöglicht die Identifizierung nicht ätzender und ätzender Stoffe und Gemische nach dem UN GHS und der CLP-Verordnung. Außerdem unterstützt diese Prüfmethode die Zuordnung ätzender Stoffe und Gemische zur optionalen Unterkategorie 1A nach Maßgabe des UN GHS (1) sowie eine Kombination der Unterkategorien 1B und 1C (21)(22)(23). Eine Einschränkung bei dieser Prüfmethode besteht darin, dass bei Hautverätzungen wegen der begrenzten Auswahl gut bekannter Chemikalien der Unterkategorie 1C in *In-vivo*-Untersuchungen nicht zwischen den Unterkategorien 1B und 1C nach dem UN GHS und der CLP-Verordnung unterschieden werden kann. Mithilfe der Prüfmodelle EpiSkin™, EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE und epiCS® können Unterkategorisierungen (d. h. Unterscheidungen zwischen 1A und 1B-und-1C gegenüber NC) vorgenommen werden.
8. In der Validierung zur Unterstützung der in diese Prüfmethode einbezogenen Prüfmodelle zur Identifizierung nicht ätzender und ätzender Chemikalien wurden zahlreiche Chemikalien (in erster Linie Stoffe) geprüft, und die empirische Datenbank der Validierungsstudie umfasste 60 Chemikalien aus zahlreichen Chemikalienklassen (8)(9)(10). Zum Nachweis der Sensitivität, der Spezifität, der Genauigkeit und der laborinternen Reproduzierbarkeit des Versuchs zur Unterkategorisierung haben die Entwickler der Prüfungen Untersuchungen durchgeführt; die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden von der OECD geprüft (21)(22)(23). Auf der Grundlage der insgesamt verfügbaren Daten ist festzustellen, dass die Prüfmethode bei zahlreichen Chemikalienklassen und Aggregatzuständen (u. a. Flüssigkeiten, halbfeste Stoffe, Feststoffe und Wachse) anwendbar ist. Flüssigkeiten können wässrig oder nicht wässrig und Feststoffe in Wasser löslich oder unlöslich sein. Sofern möglich, sollten Feststoffe vor der Applikation zu Feinpulver gemahlen werden; eine weitere Vorbehandlung der Probe ist nicht nötig. Wenn nachgewiesen werden kann, dass die in diese Prüfmethode einbezogenen Prüfmodelle bei einer bestimmten Kategorie von Prüfchemikalien nicht anwendbar sind, sollten

sie bei dieser Kategorie von Prüfchemikalien nicht verwendet werden. Diese Prüfmethode kann jedoch nicht nur bei Stoffen verwendet werden, sondern wird auch als für Gemische geeignet betrachtet. Da Gemische allerdings vielfältigen Kategorien zuzurechnen sein und unterschiedliche Zusammensetzungen haben können, und da gegenwärtig nur begrenzte Informationen über die Prüfung von Gemischen verfügbar sind, sollten Prüfmethoden, bei denen nachgewiesen werden kann, dass sie für eine bestimmte Kategorie von Gemischen nicht geeignet sind (beispielsweise durch ein Verfahren entsprechend dem in (26) vorgeschlagenen Verfahren), für die betreffende Kategorie von Gemischen nicht verwendet werden. Bevor die Prüfmethode für die Generierung von Daten für einen bestimmten Regulierungszweck verwendet wird, ist zu prüfen, ob sie für den beabsichtigten Zweck angemessene Ergebnisse liefern kann und, wenn dem so ist, warum. Solche Erwägungen entfallen, wenn die Prüfung des Gemischs rechtlich vorgeschrieben ist. Gase und Aerosole wurden bislang noch nicht in Validierungsstudien bewertet (8)(9)(10). Obwohl deren Prüfung mit der RhE-Technologie prinzipiell vorstellbar ist, erlaubt die vorliegende Prüfmethode das Untersuchen von Gasen und Aerosolen nicht.

9. Prüfchemikalien, die Licht im selben Spektrum absorbieren können wie MTT-Formazan, und Prüfchemikalien, die in der Lage sind, den lebenswichtigen Farbstoff MTT zu reduzieren (zu MTT-Formazan), können die Messungen der Gewebeviabilität stören und erfordern die Verwendung geeigneter Kontrollen zur Korrektur. Die Art der möglicherweise erforderlichen geeigneten Kontrollen hängt von der Art der durch die Prüfchemikalie ausgelösten Interferenzen und vom Verfahren zur Messung von MTT-Formazan ab (Nummern 25-31).
10. Diese Prüfmethode vermittelt keine geeigneten Informationen über Hautreizungen; mit PM B.46, die auf demselben RhE-Prüfsystem (allerdings mit einem anderen Protokoll) beruht, werden jedoch gezielt die gesundheitlichen Auswirkungen von Hautreizungen *in vitro* untersucht (5). Eine umfassende Evaluierung lokaler Auswirkungen auf die Haut nach einer einmaligen dermalen Exposition ist dem OECD-Leitliniendokument über integrierte Prüfungs- und Bewertungsansätze (IATA) zu entnehmen (6). Dieser IATA-Ansatz umfasst die Durchführung von *In-vitro*-Prüfungen auf hautätzende Wirkung (wie sie in dieser Methode beschrieben werden) und auf Hautreizungen, bevor Prüfungen an lebenden Tieren in Betracht gezogen werden. Die Verwendung menschlicher Haut unterliegt anerkanntermaßen ethischen Überlegungen und Bedingungen auf nationaler und internationaler Ebene.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

11. Die Prüfchemikalie wird oberflächlich auf ein dreidimensionales RhE-Modell aufgetragen, das aus nicht veränderten humanen epidermalen Keratinozyten besteht, die zu einem mehrschichtigen, ausdifferenzierten Modell humaner Epidermis kultiviert wurden. Das Modell besteht aus geordneten Basal-, Stachel- und Körnerzellschichten und einer mehrlagigen Hornschicht (*stratum corneum*), die interzelluläre lamellare Fettschichten enthält, deren dominierende Lipidklassen dem *in vivo* gefundenen Lipidmuster entsprechen.

12. Diese RhE-Prüfmethode basiert auf der Voraussetzung, dass ätzende Chemikalien in der Lage sind, durch Diffusion oder Erosion die Hornhaut zu durchdringen, und darüber hinaus eine zytotoxische Wirkung auf die darunter liegenden Zellschichten ausüben. Die Zellviabilität wird durch Enzymkonversion des Vitalfarbstoffs MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid, Thiazolyl-Blau-Tetrazoliumbromid; CAS-Nummer 298-93-1] zu einem blauen Formazan-Salz gemessen, das nach seiner Extraktion aus Geweben quantifiziert wird (27). Ätzende Chemikalien werden anhand ihrer Fähigkeit erkannt, die Zellviabilität unter vorgegebene Schwellenwerte zu senken (Nummern 35 und 36). Die Prüfmethode auf der Grundlage von RhE-Modellen zur Untersuchung von Hautverätzungen hat sich bei der Prüfung von Kaninchen nach PM B.4 (2) als für die Vorhersage von In-vivo-Hautkorrosionswirkungen geeignet erwiesen.

NACHWEIS DER LEISTUNGSFÄHIGKEIT

13. Vor der routinemäßigen Anwendung eines der vier validierten RhE-Prüfmodelle nach dieser Prüfmethode sollten Labors die erforderliche technische Befähigung durch eine ordnungsgemäße Klassifizierung der zwölf in Tabelle 1 empfohlenen Leistungsstoffe nachweisen. Bei Verwendung der Methode zur Unterklassifizierung konnten zudem die richtigen Unterkategorien nachgewiesen werden. Wenn ein dort genannter Stoff nicht verfügbar ist bzw. wenn dies gerechtfertigt ist, kann ein anderer Stoff verwendet werden, für den geeignete *In-vivo*- und *In-vitro*-Referenzdaten verfügbar sind (z. B. aus der Liste der Referenzchemikalien (24)), sofern die in Tabelle 1 beschriebenen Auswahlkriterien angewendet werden.

Tabelle 1: Liste der Leistungsstoffe¹

Stoff	CAS-Nr.	Chemikalienklasse ²	UN-GHS- /CLP-Kat. nach <i>In-vivo</i> - Ergebnissen ³	VRM Kat. nach <i>In-vitro</i> - Ergebnissen ⁴	MTT- Reduktions- mittel ⁵	Aggregat- zustand
Unterkategorie 1A <i>In vivo</i> ätzende Chemikalien						
Bromessigsäure	79-08-3	Organische Säure	1A	(3) 1A	--	S
Bortrifluoridhydrat	13319-75-0	Anorganische Säure	1A	(3) 1A	--	L
Phenol	108-95-2	Phenol	1A	(3) 1A	--	S
Dichloracetylchlorid	79-36-7	Elektrophil	1A	(3) 1A	--	L
Kombination von <i>in vivo</i> ätzenden Chemikalien der Unterkategorien 1B-und-1C						
Glyoxylsäure-Monohydrat	563-96-2	Organische Säure	1B-und-1C	(3) 1B-und-1C	--	S
Milchsäure	598-82-3	Organische Säure	1B-und-1C	(3) 1B-und-1C	--	L
Ethanolamin	141-43-5	Organische Base	1B	(3) 1B-und-1C	Y	Viskose
Chlorwasserstoffsäure (14,4 %)	7647-01-0	Anorganische Säure	1B-und-1C	(3) 1B-und-1C	--	L
<i>In Vivo</i> nicht ätzende Chemikalien						

Phenethylbromid	103-63-9 CIPAC-Nr.	Elektrophil	NC	(3) NC	Y	L
4-Amino-1,2,4-triazol	584-13-4	Organische Base	NC	(3) NC	--	S
4-(Methylthio)-Benzaldehyd	3446-89-7	Elektrophil	NC	(3) NC	Y	L
Laurinsäure	143-07-7	Organische Säure	NC	(3) NC	--	S

Abkürzungen: CAS-Nr. (CAS Registry Number = CAS-Registrierungsnummer); VRM = validierte Referenzmethode; NC = nicht ätzend.

¹ Die Leistungsstoffe wurden zunächst nach ätzenden und nicht ätzenden Stoffen, danach nach Unterkategorien ätzender Stoffe und schließlich nach Chemikalienklassen sortiert und unter den in den ECVAM-Validierungsstudien zur Bewertung von EpiSkin™ und EpiDerm™ (8) (9) (10) sowie aufgrund von Post-Validierungsstudien auf der Grundlage von Daten ausgewählt, die von den Entwicklern von EpiSkin™ (22), EpiDerm™, SkinEthic™ und epiCS® (23) bereitgestellt wurden. Wenn nicht anderweitig angegeben, wurden die Stoffe in der Reinheit geprüft, in der sie im Handel gekauft wurden (8)(10). Die Auswahl beinhaltet nach Möglichkeit Stoffe, die (i) repräsentativ für die Spanne der Ätzwirkungen sind (z. B. nicht ätzend, schwach ätzend usw. bis hin zu stark ätzend), die mit den VRM gemessen oder vorhergesagt werden können; (ii) repräsentativ für die in den Validierungsstudien verwendeten Chemikalienklassen sind; (iii) durch gut definierte chemische Strukturen gekennzeichnet sind; (iv) mit der VRM reproduzierbare Ergebnisse induzieren; (v) bei der *In-vivo* -Referenzprüfmethode klare Ergebnisse induzieren; (vi) im Handel erhältlich sind; (vii) nicht mit nicht tragbaren Entsorgungskosten verbunden sind.

² Von Barratt u. a. zugewiesene Chemikalienklasse (8).

³ Den UN-GHS-/CLP-Kategorien 1A, 1B und 1C entsprechen die UN-Verpackungsgruppen I, II und III.

⁴ Die in dieser Tabelle angegebenen *In-vitro*-Vorhersagen aufgrund von VRM wurden in von den Entwicklern der Prüfmethode durchgeführten Post-Validierungsprüfungen mit den Prüfmodellen EpiSkin™ und EpiDerm™ (VRM) ermittelt.

⁵ Bei den in den ECVAM-Validierungsstudien zu Hautverätzungen ermittelten Viabilitätswerten wurden keine Korrekturen unter Berücksichtigung der direkten MTT-Reduzierung vorgenommen. (In den Validierungsstudien wurden keine Kontrollen mit abgetötetem Gewebe durchgeführt.) Die in dieser Tabelle genannten und von den Entwicklern der Prüfmethode generierten Post-Validierungsdaten beruhen jedoch auf geeigneten Kontrollen (23).

14. Im Rahmen des Nachweises der Leistungsfähigkeit sollte der Benutzer die vom Hersteller des Hautmodells spezifizierten Barriereigenschaften der Gewebe nach Erhalt überprüfen. Dies ist besonders dann wichtig, wenn die Gewebe über große Entfernungen/Zeiträume transportiert werden. Sobald eine Methode erfolgreich etabliert und ihre Leistungsfähigkeit demonstriert wurde, ist diese Überprüfung nicht mehr routinemäßig erforderlich. Allerdings empfiehlt es sich auch bei routinemäßig angewandten Prüfmethode, die Barriereigenschaften in regelmäßigen Abständen zu kontrollieren.

VERFAHREN

15. Im Folgenden werden die Elemente und die Verfahren der in dieser Prüfmethode verwendeten RhE-Prüfmodelle zur Bewertung von Hautverätzungen allgemein beschrieben. Die als zur Verwendung im Rahmen dieser Prüfmethode wissenschaftlich fundiert bewerteten und unterstützten RhE-Modelle (d. h. die Modelle EpiSkin™ (SM), EpiDerm™ (EPI-200), SkinEthic™ RHE und epiCS®) (16)(17)(19)(28)(29)(30)(31)(32)(33) sind im Handel

erhältlich. Standardarbeitsanweisungen (SOPs) für diese vier RhE-Modelle sind verfügbar (34)(35)(36)(37), und die jeweiligen wesentlichen Elemente der Prüfmethode werden in Anlage 2 kurz beschrieben. Bei der Einführung und Verwendung eines dieser Modelle im Labor sollten die relevanten SOPs berücksichtigt werden. Die vier RhE-Prüfmodelle dieser Prüfmethode sollten die folgenden Anforderungen erfüllen:

ELEMENTE DER RHE-PRÜFMETHODE

Allgemeine Bedingungen

16. Die Epithelschicht sollte aus normalen menschlichen Keratinozyten gebildet werden. Unter der funktionsfähigen Hornschicht (*stratum corneum*) sollten mehrere Lagen lebensfähiger Epithelzellen (Basalzellschicht, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*) vorhanden sein. Die Hornschicht sollte mehrlagig sein und das zur Erzeugung einer funktionsfähigen Barriere essenzielle Lipidprofil aufweisen und muss robust genug sein, um das schnelle Eindringen zytotoxischer Referenzchemikalien wie Natriumdodecylsulfat (SDS) oder Triton X-100 zu verhindern. Die Barrierefunktion kann entweder durch Bestimmung der Konzentration, bei der eine Referenzchemikalie die Viabilität der Gewebe nach einer vorgegebenen Expositionsdauer um 50 % verringert (IC_{50}), oder durch die Bestimmung der Expositionszeit bewertet werden, die erforderlich ist, um die Zellviabilität bei Anwendung der Referenzchemikalie in einer vorgegebenen festen Konzentration um 50 % zu reduzieren (ET_{50}) (Nummer 18). Die Rückhalteeigenschaften des RhE-Modells müssen ausschließen, dass Material rund um die Hornschicht in lebensfähiges Gewebe eindringt und die Modellierung der Hautexposition beeinträchtigt. Das RhE-Modell sollte nicht mit Bakterien, Viren, Mykoplasma oder Pilzen kontaminiert sein.

Funktionale Bedingungen

Viabilität

17. Die Größenordnung der Viabilität der Gewebe wird mit der MTT-Prüfung bestimmt (27). Die lebensfähigen Zellen des RhE-Gewebemodells reduzieren den lebenswichtigen Farbstoff MTT zu einem blauen MTT-Formazan-Niederschlag, der dann mit Isopropanol (oder einem ähnlichen Lösungsmittel) aus dem Gewebe extrahiert wird. Die optische Dichte (OD) des Extraktionslösungsmittels allein sollte ausreichend gering sein, d. h. $OD < 0,1$. Das extrahierte MTT-Formazan kann durch eine Standard-(OD)-Absorptionsmessung oder mit einem HPLC/UPLC-Spektrometrieverfahren (38) quantifiziert werden. Die Anwender des RhE-Modells sollten sicherstellen, dass jede Charge des verwendeten Modells die vorgegebenen Kriterien für die Negativkontrolle erfüllt. Der Entwickler/Hersteller des Hautmodells sollte eine Akzeptanzspanne (oberer und unterer Grenzwert) für die OD-Werte der Negativkontrolle festlegen. Die Akzeptanzspanne der OD-Werte der Negativkontrolle für die vier validierten RhE-Prüfmodelle dieser Prüfmethode sind Tabelle 2 zu entnehmen. Bei Durchführung einer HPLC/UPLC-Spektrophotometrie sollten die in Tabelle 2 genannten OD-Spannen der Negativkontrolle als Akzeptanzkriterium für die Negativkontrolle verwendet werden. Es sollte

dokumentiert werden, dass die mit der Negativkontrolle behandelten Gewebe über die gesamte Dauer der Exposition stabil bleiben (bzw. vergleichbare OD-Messungen ergeben).

Tabelle 2: Akzeptanzspannen für OD-Werte der Negativkontrolle zur Kontrolle der Chargenqualität

	Untere Akzeptanzgrenze	Obere Akzeptanzgrenze
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. Das *stratum corneum* und die Zusammensetzung seiner Fette sollten das schnelle Eindringen bestimmter zytotoxischer Referenzchemikalien wie z. B. SDS oder Triton X-100 verhindern. Dies wird durch die Ermittlung von IC₅₀ oder ET₅₀ bestimmt (Tabelle 3). Die Barrierefunktion der einzelnen Chargen des verwendeten RhE-Modells sollte nach der Lieferung der Gewebe an den Endverwender vom Entwickler/Hersteller des RhE-Modells nachgewiesen werden (Nummer 21).

Morphologie

19. Die histologische Untersuchung des RhE-Modells sollte unter Nachweis einer aus mehreren Lagen bestehenden und der menschlichen Hornschicht (*epidermis*) ähnelnden Struktur mit *stratum basale*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum* und *stratum corneum* erfolgen; das Modell sollte ein Lipidprofil ähnlich dem Lipidprofil der menschlichen Epidermis aufweisen. Die histologische Untersuchung der einzelnen zum Nachweis einer geeigneten Morphologie der Gewebe verwendeten Chargen des RhE-Modells sollte jeweils nach der Lieferung der Gewebe an den Endverwender vom Entwickler/Hersteller des RhE-Modells nachgewiesen werden (Nummer 21).

Reproduzierbarkeit.

20. Die Anwender der Prüfmethode sollten die Reproduzierbarkeit der Prüfmethode mit den Positiv- und den Negativkontrollen über längere Zeit nachweisen. Außerdem sollte die Prüfmethode nur dann verwendet werden, wenn der Entwickler/Hersteller des RhE-Modells Daten vorlegt, die die Reproduzierbarkeit mit ätzenden und mit nicht ätzenden Chemikalien z. B. aus der Liste der Leistungsstoffe (Tabelle 1) über längere Zeit belegen. Bei Verwendung einer Prüfmethode zur Unterkategorisierung sollte zudem die Reproduzierbarkeit in Bezug auf Unterkategorien nachgewiesen werden.

Qualitätskontrolle (QK)

21. Das RhE-Modell sollte nur dann verwendet werden, wenn der Entwickler/Hersteller nachweist, dass jede Charge des verwendeten Hautmodells bestimmten Freigabekriterien genügt, von

denen die Kriterien der *Viabilität* (Nummer 17), der *Barrierefunktion* (Nummer 18) und der *Morphologie* (Nummer 19) die wichtigsten sind. Diese Daten werden den Anwendern der Prüfmethode zur Verfügung gestellt werden, damit diese sie in den Prüfbericht aufnehmen können. Nur mit freigegebenen Gewebechargen erzielte Ergebnisse können für eine zuverlässige Vorhersage für die Einstufung von Verätzungen akzeptiert werden. Der Entwickler/Hersteller des Hautmodells (oder – bei Verwendung eines hauseigenen Modells – der Prüfer) legt eine Akzeptanzspanne (oberer und unterer Grenzwert) für IC₅₀ bzw. ET₅₀ fest. Die Akzeptanzspannen der vier validierten Prüfmodelle sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Chargenfreigabekriterien im Rahmen der Qualitätskontrolle

	Untere Akzeptanzgrenze	Obere Akzeptanzgrenze
EpiSkin™ (SM) (18-stündige Behandlung mit 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 h	ET ₅₀ = 8,7 h
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (35)	ET ₅₀ = 4,0 h	ET ₅₀ = 10,0 h
epiCS® (1 % Triton X-100) (36)	ET ₅₀ = 2,0 h	ET ₅₀ = 7,0 h

Applikation der Prüf- und Kontrollchemikalien

22. Für jede Prüfchemikalie und für die Kontrollen sollten für jeden Expositionszeitraum mindestens zwei Gewebereplikate verwendet werden. Bei flüssigen und festen Chemikalien sollte eine ausreichende Menge der Prüfchemikalie gleichmäßig auf die gesamte Oberfläche der Epidermis aufgetragen werden; überschüssige Dosen sind zu vermeiden, d. h. es sollten mindestens 70 µl/cm² oder 30 mg/cm² verwendet werden. Je nach Modell sollte die Epidermis-Oberfläche vor der Applikation fester Chemikalien mit deionisiertem oder destilliertem Wasser angefeuchtet werden, um guten Hautkontakt zu gewährleisten (34)(35)(36)(37). Feststoffe sollten nach Möglichkeit als Feinpulver geprüft werden. Es ist eine für die Prüfchemikalie geeignete Applikationsmethode zu wählen (siehe z. B. Nummern 34-37). Am Ende des Expositionszeitraums sollte die Prüfchemikalie mit einer wässrigen Pufferlösung oder 0,9 % NaCl von der Epidermis abgewaschen werden. Je nachdem, welches der vier validierten RhE-Prüfmodelle verwendet wird, werden pro Prüfchemikalie zwei oder drei Expositionszeiträume verwendet (für alle vier validen RhE-Modelle: 3 Minuten und 1 Stunde; bei EpiSkin™ eine zusätzliche Expositionszeit von nochmals 4 Stunden). Je nach verwendetem RhE-Prüfmodell und je nach bewertetem Expositionszeitraum kann die Inkubationstemperatur während der Exposition zwischen der Raumtemperatur und 37 °C liegen.

23. Bei jeder Studie sollten gleichzeitig Negativkontrollen und Positivkontrollen (PK) verwendet werden, um nachweisen zu können, dass die Viabilität (mit der NK), die Barrierefunktion und die daraus resultierende Empfindlichkeit der Gewebe (mit der PK) innerhalb einer vorgegebenen historischen Akzeptanzspanne liegen. Als PK-Chemikalien werden je nach verwendetem RhE-Modell Eisessigsäure oder 8N KOH vorgeschlagen. 8N KOH ist ein direktes MTT-Reduktionsmittel, für das möglicherweise geeignete Kontrollen benötigt werden wie in den Nummern 25 und 26 beschrieben. Für die Negativkontrollen wird 0,9%ige (w/v) NaCl-Lösung oder Wasser empfohlen.

Zellviabilitätsmessungen

24. Die MTT-Prüfung sollte als quantitative Methode zur Messung der Zellviabilität nach dieser Prüfmethode verwendet werden (27). Die Gewebeprobe wird für 3 Stunden in eine MTT-Lösung mit geeigneter Konzentration (z. B. 0,3 oder 1 mg/ml) gelegt. Der blaue Formazan-Niederschlag wird sodann mit Hilfe eines Lösungsmittels (z. B. Isopropanol, Säure-Isopropanol) aus dem Gewebe extrahiert, und die Formazankonzentration wird durch Bestimmung des OD-Werts bei 570 nm innerhalb einer Filter-Bandbreite von maximal ± 30 nm oder mit einem HPLC/UPLC-Spektrophotometrieverfahren gemessen (Nummern 30 und 31) (38).
25. Prüfchemikalien können die MTT-Untersuchung durch direkte Reduzierung des MTT zu blauem Formazan und/oder Farbbinterferenzen stören, wenn die Prüfchemikalie an sich oder infolge von Behandlungsverfahren in derselben OD-Spanne wie Formazan (570 ± 30 nm, hauptsächlich blaue und violette Chemikalien) absorbiert. Zusätzliche Kontrollen (z. B. die nicht spezifische MTT-Reduktionskontrolle (NSMTT) oder die nicht spezifische Farbkontrolle (NSC) sollten verwendet werden, um eine potenzielle Interferenz aufgrund dieser Prüfchemikalien zu erkennen und zu korrigieren (Nummern 26 bis 30). Dies ist besonders dann wichtig, wenn eine bestimmte Prüfchemikalie nicht vollständig aus dem Gewebe ausgewaschen wurde oder die Epidermis durchdringt und daher bei Durchführung der MTT-Viabilitätsprüfung auch in den Geweben enthalten ist. Für eine genaue Beschreibung der richtigen Durchführung der Korrektur der direkten MTT-Reduktion und der Interferenzen durch Färbemittel siehe die Standardarbeitsanweisungen für die Prüfmodelle (34) (35) (36) (37).
26. Um direkte MTT-Reduktionsmittel zu identifizieren, sollten die Prüfchemikalien jeweils zu frisch hergestelltem MTT-Medium hinzugegeben werden (34) (35) (36) (37). Wenn sich das MTT-Gemisch mit der Prüfchemikalie blau/violett verfärbt, ist davon auszugehen, dass die Prüfchemikalie das MTT direkt reduziert; anschließend sollte unabhängig von der Durchführung der Standardabsorptions-(OD-)Messung oder einer HPLC/UPLC-Spektrophotometrie eine weitere Funktionsprüfung vorgenommen werden. Bei dieser zusätzlichen Funktionsprüfung werden abgetötete Gewebe mit nur noch residualer metabolischer Aktivität eingesetzt, die die Prüfchemikalie in ähnlichem Umfang wie lebensfähige Gewebe absorbieren. Jede MTT reduzierende Chemikalie wird auf mindestens zwei abgetötete Gewebereplikate pro Expositionszeitraum aufgetragen, die der vollständigen

Prüfung auf hautätzende Wirkungen unterzogen werden. Anschließend wird die tatsächliche Viabilität des Gewebes als Prozentanteil der bei lebenden Geweben nach Exposition gegenüber dem MTT-Reduktionsmittel gemessenen Viabilität abzüglich des Prozentanteils der nicht spezifischen MTT-Reduktion durch dasselbe MTT-Reduktionsmittel bei abgetöteten Geweben bezogen auf die gleichzeitig mit der zu korrigierenden Prüfung durchgeführte Negativkontrolle (%NSMTT) berechnet.

27. Um potenzielle Interferenzen durch Prüffarbstoffe oder durch Prüfchemikalien zu ermitteln, die sich verfärben, wenn sie mit Wasser oder mit Isopropanol in Berührung kommen, und um über die Notwendigkeit weiterer Kontrollen entscheiden zu können, sollte die Prüfchemikalie in Wasser (Umgebung während der Exposition) und/oder Isopropanol (Extraktionslösung) einer Spektralanalyse unterzogen werden. Wenn die Prüfchemikalie in Wasser und/oder Isopropanol Licht im Bereich von 570 ± 30 nm absorbiert, sollten weitere Farbkontrollen durchgeführt oder eine HPLC/UPLC-Spektrophotometrie vorgenommen werden. Im letztgenannten Fall sind diese Kontrollen nicht erforderlich (Nummern 30 und 31). Bei Durchführung der Standardabsorptions-(OD-)Messung wird jeder interferierende Prüffarbstoff auf mindestens zwei lebensfähige Gewebereplikate pro Expositionszeit aufgetragen; diese Replikate werden der vollständigen Prüfung auf Hautverätzungen unterzogen, aber während der MTT-Inkubation nicht mit der MTT-Lösung, sondern mit einem Medium inkubiert, um eine nicht spezifische Farbkontrolle (NSC_{lebend}) herzustellen. Wegen der inhärenten Variabilität lebender Gewebe muss pro Expositionszeitraum und pro Prüffarbstoff (bei jedem Prüflauf) gleichzeitig die NSC_{lebend} -Kontrolle durchgeführt werden. Die tatsächliche Viabilität des Gewebes wird dann als Prozentanteil der ermittelten Viabilität bei lebendem Gewebe nach der Exposition gegenüber der interferierenden Prüfchemikalie und nach Inkubation mit der MTT-Lösung abzüglich des Prozentanteils der nicht spezifischen Farbe berechnet, die bei gleichzeitig mit der zu korrigierenden Prüfung untersuchten lebenden Geweben nach Exposition gegenüber der interferierenden Prüfchemikalie und nach Inkubation mit einem Medium ohne MTT entstanden ist (% NSC_{lebend}).
28. Wenn festgestellt wurde, dass Prüfchemikalien sowohl eine direkte MTT-Reduktion (Nummer 26) als auch Farbinterferenzen (Nummer 27) bewirken, wird bei der Durchführung der Standardabsorptions-(OD-)Messung neben den in vorstehenden Nummern beschriebenen Kontrollen (NSMTT und NSC_{lebend}) eine dritte Kontrollreihe benötigt. Dies ist gewöhnlich bei dunklen Prüfchemikalien der Fall, die beim MTT-Versuch Interferenzen verursachen (z. B. blau, violett oder schwarz), weil deren Fähigkeit zur direkten MTT-Reduktion durch die inhärente Farbqualität dieser Chemikalien beeinträchtigt wird (Nummer 26). Diese Prüfchemikalien können Bindungen sowohl mit lebenden als auch mit abgetöteten Geweben eingehen. Daher kann bei der NSMTT-Kontrolle eine Korrektur nicht nur der potentiellen direkten MTT-Reduktion durch die Prüfchemikalie, sondern auch der Farbinterferenz infolge der Bindung der Prüfchemikalie an abgetötete Gewebe erfolgen. Dies kann eine doppelte Korrektur der Farbinterferenz zur Folge haben, da mit der NSC_{lebend} -Kontrolle bereits die Farbinterferenz aufgrund der Bindung der Prüfchemikalie an lebende Gewebe erfolgt. Um eine

mögliche doppelte Korrektur von Farbbinterferenzen zu vermeiden, muss eine dritte Kontrolle mit nicht spezifischen Farben mit abgetöteten Geweben ($NSC_{abgetötet}$) untersucht werden. Bei dieser zusätzlichen Kontrolle wird die Prüfchemikalie auf mindestens zwei abgetötete Gewebereplikate pro Expositionszeitraum aufgetragen, die dem vollständigen Prüfverfahren zu unterziehen sind, wobei die Gewebe jedoch während der MTT-Inkubation nicht mit der MTT-Lösung, sondern mit einem Medium inkubiert werden. Unabhängig von der Anzahl der durchgeführten unabhängigen Prüfungen/Prüfläufe ist pro Prüfchemikalie eine einzige $NSC_{abgetötet}$ -Kontrolle hinreichend. Diese Kontrolle sollte jedoch gleichzeitig mit der $NSMTT$ -Kontrolle sowie möglichst mit derselben Gewebearcharge durchgeführt werden. Die tatsächliche Viabilität des Gewebes wird dann als Prozentanteil der ermittelten Viabilität bei lebendem Gewebe nach der Exposition gegenüber der Prüfchemikalie abzüglich $\%NSMTT$ und abzüglich $\%NSC_{lebend}$ zuzüglich des Prozentanteils der nicht spezifischen Farbe berechnet, die nach Exposition der abgetöteten Gewebe gegenüber der interferierenden Prüfchemikalie und nach Inkubation mit einem Medium ohne MTT entstanden ist; dieser Prozentanteil wird bezogen auf die gleichzeitig mit der zu korrigierenden Prüfung untersuchte Kontrolle ($\%NSC_{abgetötet}$) ermittelt.

29. Wichtig ist die Feststellung, dass nicht spezifische MTT-Reduktionen und nicht spezifische Farbbinterferenzen bei den Gewebextrakten Ergebnisse oberhalb der Linearitätsspanne des Photospektrometers begünstigen können. Daher sollte jedes Labor vor der Untersuchung von Prüfchemikalien für rechtliche Zwecke die Linearitätsspanne seines Spektrophotometers mit im Handel bezogenem MTT-Formazan (CAS-Nr. 57360-69-7) ermitteln. Insbesondere durch die Standardabsorptions-(OD-)Messung mit einem Spektrophotometer können direkte MTT-Reduktionsmittel und Farbbinterferenzen verursachende Prüfchemikalien in den Fällen untersucht werden, in denen die mit einer Prüfchemikalie ermittelten und nicht um die direkte MTT-Reduktion und/oder um Farbbinterferenzen korrigierten ODs der Gewebextrakte innerhalb der Linearitätsspanne des Spektrophotometers liegen oder in denen eine Prüfchemikalie aufgrund des nicht korrigierten Prozentanteils der Viabilität bereits als hautätzend eingestuft wurde (Nummern 35 und 36). Ergebnisse bei Prüfchemikalien mit $\%NSMTT$ und/oder $\%NSC_{lebend} > 50 \%$ der Negativkontrolle sind jedoch mit Sorgfalt zu bewerten.
30. Wenn die Ergebnisse von Prüffarbstoffen wegen übermäßiger Interferenzen beim MTT-Versuch mit der Standardabsorptions-(OD-)Messung nicht vereinbar sind, kann alternativ MTT-Formazan durch HPLC/UPLC-Spektrophotometrie gemessen werden (Nummer 31) (37). Bei der HPLC/UPLC-Spektrophotometrie kann das MTT-Formazan vor der Quantifizierung von der Prüfchemikalie getrennt werden (38). Daher werden unabhängig von der zu prüfenden Chemikalie keine NSC_{lebend} - oder $NSC_{abgetötet}$ -Kontrollen benötigt, wenn eine HPLC/UPLC-Spektrophotometrie vorgenommen wird. $NSMTT$ -Kontrollen sollten jedoch verwendet werden, wenn vermutet wird, dass eine Prüfchemikalie MTT direkt reduziert oder wenn die Farbe einer Prüfchemikalie die Beurteilung ihrer Fähigkeit zur direkten MTT-Reduktion beeinträchtigt (Nummer 26). Wenn MTT-Formazan durch HPLC/UPLC-Spektrophotometrie gemessen wird,

ist der Prozentanteil der Viabilität des Gewebes als Prozentanteil der MTT-Formazan-Peak-Fläche, die mit lebenden Geweben nach Exposition gegenüber der Prüfchemikalie ermittelt wurde, bezogen auf die MTT-Formazan-Peak-Fläche der gleichzeitigen Negativkontrolle zu berechnen. Bei Prüfchemikalien, die MTT direkt reduzieren können, wird die tatsächliche Gewebeviabilität als Prozentanteil der Gewebeviabilität von lebenden Geweben nach der Exposition gegenüber der Prüfchemikalie abzüglich %NSMTT berechnet. Und schließlich ist festzustellen, dass auch direkte MTT-Reduktionsmittel (die nach der Behandlung in den Geweben gebunden sein und MTT so stark reduzieren können, dass es (bei Standard-OD-Messungen) zu ODs oder (bei der Untersuchung der Gewebeextrakte durch UPLC-/HPLC-Spektrophotometrie) zu Peakflächen außerhalb der Linearitätsspanne des Spektrophotometers und zu Farbinterferenzen kommen kann) nicht bewertet werden können. Solche Fälle sind allerdings sehr selten.

31. MTT-Formazan-Messungen können bei allen Arten von Prüfchemikalien (gefärbt, nicht gefärbt, MTT-Reduktionsmittel und Mittel, die keine MTT-Reduktion bewirken) auch durch HPLC/UPLC-Spektrophotometrie vorgenommen werden (38). Wegen der Vielfalt der HPLC/UPLC-Spektrophotometriesysteme sollte die Eignung des jeweiligen HPLC/UPLC-Spektrophotometriesystems vor der Verwendung zur Quantifizierung von MTT-Formazan in Gewebextrakten durch Erfüllung der Akzeptanzkriterien für eine Reihe von Standard-Qualifikationsparametern auf der Grundlage der Branchenleitlinien der US-amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) für die Validierung bioanalytischer Methoden nachgewiesen werden (38)(39). Diese Schlüsselparmeter sowie die jeweiligen Akzeptanzkriterien sind Anlage 4 zu entnehmen. Wenn die in Anlage 4 beschriebenen Akzeptanzkriterien erfüllt sind, wird das betreffende HPLC/UPLC-Spektrophotometriesystem als geeignet für die Messung von MTT-Formazan unter den in dieser Prüfmethode beschriebenen Versuchsbedingungen betrachtet.

Akzeptanzkriterien

32. Bei allen Prüfmethoden unter Verwendung valider RhE-Modelle sollten die mit der Negativkontrolle behandelten Gewebe OD-Werte entsprechend der Qualität der Gewebe ergeben (siehe Tabelle 2) und die historisch ermittelten Grenzen nicht unterschreiten. Mit der PK, d. h. mit Eisessigsäure oder 8N KOH, behandelte Gewebe sollten unter den Bedingungen des Prüfmodells auf eine hautätzende Chemikalie reagieren können (siehe Anlage 2). Die Variabilität zwischen Gewebereplikaten für die Prüfchemikalie und/oder Kontrollchemikalien sollten innerhalb der akzeptierten Grenzen der Anforderungen des jeweiligen validen RhE-Modells liegen (siehe Anlage 2), d. h. beispielsweise die Differenz der Viabilität zwischen den beiden Gewebereplikaten sollte nicht mehr als 30 % betragen. Wenn die Negativ- oder die Positivkontrolle bei einem Prüflauf Werte außerhalb der akzeptierten Spannen ergibt, ist der Prüflauf als nicht geeignet zu betrachten und sollte wiederholt werden. Liegt die Variabilität von Prüfchemikalien außerhalb des definierten Bereichs, sollte sie nochmals geprüft werden.

Auswertung der Ergebnisse und Prädiktionsmodell

33. Die für jede Prüfchemikalie ermittelten OD-Werte sollten zur Berechnung einer prozentualen Viabilität im Vergleich zur Negativkontrolle herangezogen werden, die gleich 100 % gesetzt wird. Wenn eine HPLC/UPLC-Spektrophotometrie durchgeführt wird, ist der Prozentanteil der Viabilität des Gewebes als Prozentanteil der MTT-Formazan-Peak-Fläche, die mit lebenden Geweben nach Exposition gegenüber der Prüfchemikalie ermittelt wurde, bezogen auf die MTT-Formazan-Peak-Fläche der gleichzeitigen Negativkontrolle zu berechnen. Den folgenden Nummern 35 und 36 sind die prozentualen Schwellenwerte der Zellviabilität für die Prüfmodelle dieser Prüfmethode zu entnehmen, nach denen hautätzende von nicht hautätzenden Prüfchemikalien unterschieden werden (bzw. nach denen zwischen Unterkategorien hautätzender Chemikalien unterschieden wird). Diese Schwellenwerte sollten bei der Auswertung der Ergebnisse zugrunde gelegt werden.
34. Kann eine eindeutige Klassifizierung vorgenommen werden, so ist ein einziger, aus mindestens zwei Geweben bestehender Prüflauf ausreichend. Bei Grenzergebnissen, wie z. B. nicht übereinstimmenden Replikatmessungen, kann ein zweiter Prüflauf in Betracht gezogen werden bzw. ein dritter bei abweichenden Ergebnissen der ersten beiden Prüfläufe.
35. In der folgenden Tabelle 4 wird das Vorhersagemodell für die das Prüfmodell EpiSkin™ zur Feststellung von Hautätzungen (9)(34)(22) in Verbindung mit dem Klassifizierungssystem des UN GHS bzw. der CLP-Verordnung erläutert:

Tabelle 4: Vorhersagemodell EpiSkin™

Nach Expositionszeitpunkten (t=3, 60 und 240 Minuten) gemessene Viabilität	Zu berücksichtigende Vorhersage
< 35 % nach einer Expositionszeit von 3 min	Hautätzend: • Optionale Unterkategorie 1A*
≥ 35 % nach einer Expositionszeit von 3 min UND < 35 % nach einer Expositionszeit von 60 min ODER ≥ 35 % nach einer Expositionszeit von 60 min UND < 35 % nach einer Expositionszeit von 240 min	Hautätzend: • Eine Kombination der optionalen Unterkategorien 1B-und-1C
≥ 35 % nach einer Expositionszeit von 240 min	Nicht hautätzend

*) Die zur Bewertung der Eignung der RhE-Prüfmodelle zur Unterkategorisierung generierten Daten haben gezeigt, dass etwa 22 % aller Ergebnisse der Unterkategorie 1A des Prüfmodells EpiSkin™ tatsächlich Stoffe/Gemische der Unterkategorien 1B oder 1C sein (und somit Überklassifizierungen darstellen) könnten (siehe Anlage 3).

36. Die Vorhersagemodelle der Prüfmodelle EpiDerm™ SCT (10)(23)(35), SkinEthic™ RHE (17)(18)(23)(36) und epiCS® (16)(23)(37) zur Bewertung von Hautverätzungen nach der Klassifizierung des UN GHS bzw. der CLP-Verordnung sind Tabelle 5 zu entnehmen:

Tabelle 5: EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE und epiCS®

Nach Expositionszeitpunkten (t=3 und 60 Minuten) gemessene Viabilität	Zu berücksichtigende Vorhersage
SCHRITT 1 für EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE und epiCS®	
< 50 % nach einer Expositionszeit von 3 min	Hautätzend
≥ 50 % nach einer Expositionszeit von 3 min UND < 15 % nach einer Expositionszeit von 60 min	Hautätzend
≥ 50 % nach einer Expositionszeit von 3 min UND ≥ 15 % nach einer Expositionszeit von 60 min	Nicht hautätzend
SCHRITT 2 für EpiDerm™ SCT – für Stoffe/Gemische, bei denen in Schritt 1 eine hautätzende Wirkung festgestellt wurde	
< 25% nach einer Expositionszeit von 3 min	Optionale Unterkategorie 1A *
≥ 25 % nach einer Expositionszeit von 3 min	Eine Kombination der optionalen
SCHRITT 2 für SkinEthic™ RHE – für Stoffe/Gemische, bei denen in Schritt 1 eine hautätzende Wirkung festgestellt wurde	
< 18 % nach einer Expositionszeit von 3 min	Optionale Unterkategorie 1A *
≥ 18 % nach einer Expositionszeit von 3 min	Eine Kombination der optionalen
SCHRITT 2 für epiCS® – für Stoffe/Gemische, bei denen in Schritt 1 eine hautätzende Wirkung festgestellt wurde	
< 15 % nach einer Expositionszeit von 3 min	Optionale Unterkategorie 1A *
≥ 15 % nach einer Expositionszeit von 3 min	Eine Kombination der optionalen

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Daten

37. Für jede Prüfung sollten Daten aus einzelnen Gewebereplikaten (z. B. OD-Werte und Daten über die berechnete prozentuale Zellviabilität für jede Prüfchemikalie, einschließlich Einstufung), gegebenenfalls auch Daten aus Wiederholungsversuchen, tabellarisch zusammengefasst werden. Außerdem sollten die Mittelwerte und die Spannen der Viabilität und die Variationskoeffizienten zwischen Gewebereplikaten der einzelnen Prüfungen angegeben werden. Für jede geprüfte Chemikalie sollten zudem festgestellte Interaktionen mit dem MTT-Reagens durch direkte MTT-Reduktionsmittel oder Prüffarbstoffe berichtet werden.

Prüfbericht

38. Der Prüfbericht sollte folgende Angaben enthalten:

Prüfchemikalien und Kontrollchemikalien

- Einkomponentiger Stoff: chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS-Bezeichnung, CAS-Nummer, SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel, Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.;
- mehrkomponentiger Stoff, UVCB und Gemische: So weit wie möglich charakterisiert durch die chemische Zusammensetzung (siehe oben), das quantitative Vorkommen und die relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften der einzelnen Komponenten;
- physikalisches Erscheinungsbild, Wasserlöslichkeit und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften;
- Herkunft, Chargennummer, sofern vorhanden;
- Behandlung der Prüfchemikalien/Kontrollstoffe vor der Prüfung, sofern relevant (z. B. Erwärmen, Mahlen);
- Stabilität der Prüfchemikalie, letztes Verwendungsdatum oder Datum für erneute Analyse, soweit bekannt;
- Lagerungsbedingungen.

Verwendetes RhE-Modell und verwendetes Protokoll und Gründe für die Auswahl (wenn relevant)

Prüfbedingungen:

- Verwendetes RhE-Modell (einschließlich Chargennummer);
- Eichdaten für das zur Messung der Zellviabilität verwendete Messgerät (z. B. Spektrophotometer), Wellenlänge und Bandbreite (wenn relevant) für die Quantifizierung von MTT-Formazan und die Linearitätsspanne des Messgeräts;
- Beschreibung der verwendeten Methode zur Quantifizierung von MTT-Formazan;
- Beschreibung der Qualifizierung des HPLC/UPLC-Spektrophotometriesystems (wenn relevant);
- umfassende Begleitdokumentation für das betreffende Hautmodell, einschließlich seiner Leistung. Diese sollte unter anderem die folgenden Aspekte beinhalten:
 - i) Viabilität;
 - ii) Barrierefunktion;
 - iii) Morphologie;
 - iv) Reproduzierbarkeit und Vorhersagefähigkeit;
 - v) Qualitätskontrollen (QK) des Modells;
- Verweis auf historische Modelldaten. Dabei sollten unter anderem die folgenden Aspekte berücksichtigt werden:

- Akzeptanz der QK-Daten mit Verweis auf historische Chargendaten;
- Nachweis der Befähigung zur Durchführung der Prüfmethode vor der regelmäßigen Verwendung durch die Prüfung von Leistungsstoffen.

Prüfverfahren:

- Details zum verwendeten Prüfverfahren (einschließlich verwendeter Waschverfahren nach dem Expositionszeitraum);
- Dosierungen der verwendeten Prüf- und Kontrollchemikalien;
- Expositionszeitraum (-zeiträume) und -temperatur(en);
- Angabe verwendeter Kontrollen für direkte MTT-Reduktionsmittel und/oder Prüffarbstoffe (wenn relevant);
- Anzahl der pro Prüfchemikalie und pro Kontrolle (PK, Negativkontrolle und NSMTT, NSC_{lebend} und NSC_{abgetötet}, wenn relevant) und pro Expositionszeitraum verwendeten Gewebereplikate;
- Beschreibung der berücksichtigten Entscheidungskriterien und des verwendeten Vorhersagemodells auf der Grundlage des verwendeten RhE-Modells;
- Beschreibung etwaiger Änderungen am Prüfverfahren (einschließlich Waschverfahren).

Akzeptanzkriterien für Prüfläufe und Prüfungen

- Mittelwerte und Akzeptanzspannen der Positiv- und der Negativkontrollen auf der Grundlage historischer Daten;
- akzeptable Variabilität zwischen Gewebereplikaten für Positiv- und Negativkontrollen;
- akzeptable Variabilität zwischen Gewebereplikaten für die Prüfchemikalie.

Ergebnisse:

- Tabellarische Darstellung der Daten für die einzelnen Prüfchemikalien und Kontrollen, für die einzelnen Expositionszeiträume, Prüfläufe und Replikatmessungen einschließlich OD bzw. MTT-Formazan-Peakfläche, prozentuale Gewebeviabilität, mittlere prozentuale Gewebeviabilität, Unterschiede zwischen Replikaten, Standardabweichungen und/oder Variationskoeffizienten (wenn relevant);
- gegebenenfalls Ergebnisse verwendeter Kontrollen für direkte MTT-Reduktionsmittel und/oder Prüffarbstoffe einschließlich OD oder MTT-Formazan-Peakflächen, %NSMTT, %NSC_{lebend}, %NSC_{abgetötet}, Unterschiede zwischen Gewebereplikaten, Standardabweichungen und/oder Variationskoeffizienten (wenn relevant) und endgültige korrigierte prozentuale Gewebeviabilität;
- mit der Prüfchemikalie (den Prüfchemikalien) und den Kontrollchemikalien ermittelte Ergebnisse bezogen auf die definierten Akzeptanzkriterien für Prüfläufe und Prüfungen;

- Beschreibung anderer beobachteter Wirkungen;
- abgeleitete Einstufung mit Bezug auf das Vorhersagemodell und/oder angewandte Entscheidungskriterien.

Erörterung der Ergebnisse

Schlussfolgerungen

LITERATUR

- (1) UN (2013). GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals = Global harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung) der Vereinten Nationen, fünfte überarbeitete Auflage, UN New York und Genf. Abrufbar unter:
http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html
- (2) Kapitel B.4 dieses Anhangs, Akute Hautreizung/-verätzung.
- (3) Kapitel B.40 dieses Anhangs, *In-vitro*-Hautreizung:
- (4) Kapitel B.65 dieses Anhangs, *In-vitro*-Methode zur Untersuchung der Membranbarriere.
- (5) Kapitel B.46 dieses Anhangs, *In-vitro*-Hautreizung: Prüfmethode mit rekonstruierter humaner 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, 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., Poncet, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P., and Balls, M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The report and Recommendations of ECVAM Workshop 6. *ATLA* 23:219-255.
- (8) Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., and Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and distribution of the Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 12:471-482.
- (9) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhütter, H.-G., and Liebsch, M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *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. und 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. und 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), herausgegeben vom Wissenschaftlich Beratenden Ausschuss (ESAC) des ECVAM (ESAC10), 3. April 1998.
- (15) EC-ECVAM (2000). Statement on the Application of the EpiDerm™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, herausgegeben vom Wissenschaftlich Beratenden Ausschuss (ESAC) des ECVAM (ESAC14), 21. März 2000.
- (16) Hoffmann, J., Heisler, E., Karpinski, S., Losse, J., Thomas, D., Siefken, W., Ahr, H.J., Vohr, H.W. und 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. und 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. und 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, herausgegeben vom Wissenschaftlich Beratenden Ausschuss (ESAC) des ECVAM (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, herausgegeben vom Wissenschaftlich Beratenden Ausschuss (ESAC) des ECVAM (ESAC30), 12. Juni 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (22) Alépée, N., Grandidier, M.H. und 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. und 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (26) Eskes, C., u. a. (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul.Toxicol.Pharmacol.* 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., u. a. (1994). The Episkin Model: Successful Reconstruction of Human *Epidermis In Vitro*. In: *In Vitro* Skin Toxicology. Rougier, A., Goldberg, A.M. und Maibach, H.I. (Hrsg.) 133-140.
- (29) Cannon, C. L., Neal, P.J., Southee, J.A., Kubilus, J. und Klausner, M. (1994), New Epidermal Model for Dermal Irritancy Testing. *Toxicol.in Vitro* 8:889 - 891.
- (30) Poncet, M., Boelsma, E., Weerheim, A., Mulder, A., Bouwstra, J. und 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. und 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, C.J., Mason, V.S. und 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, S.R., Prosky, S.J., Meunier, S.F. und Parenteau, N.L. (1994). Development of a Bilayered Lebend Skin Construct for Clinical Applications. *Biotech. Bioeng.* 43/8:747-756.
- (34) EpiSkin™ SOP (Dezember 2011). *INVITTOX* Protocol (No 118). EpiSkin™ Skin Corrosivity Test.
- (35) EpiDerm™ SOP (Februar 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 (Januar 2012). *INVITTOX* Protocol SkinEthic™ Skin Corrosivity Test.
- (37) EpiCS® SOP (Januar 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. und McNamee, P. Use of HPLC/UPLC- spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)- based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29: 741-761.
- (39) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. (Mai 2001). Abrufbar unter:
[\[http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf\]](http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf).

Anlage 1

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

Chemikalie: Ein Stoff oder ein Gemisch.

Einkomponentiger Stoff: Ein nach seiner quantitativen Zusammensetzung definierter Stoff, bei dem mehr als ein Hauptbestandteil in einer Konzentration von mindestens 80 % w/w vorliegt.

ET₅₀: Kann durch Ermittlung der Expositionszeit abgeschätzt werden, die erforderlich ist, um die Zellviabilität bei Anwendung der Referenzchemikalie in vorgegebener fester Konzentration um 50 % zu reduzieren; siehe auch IC₅₀.

Genauigkeit: Der Grad an Übereinstimmung zwischen Testergebnissen und akzeptierten Referenzwerten. Die Genauigkeit ist ein Maß der Leistung der Prüfmethode und ein Aspekt der Relevanz. Der Begriff wird oft im Sinne von ‚Übereinstimmung‘ verwendet und bezeichnet den Anteil der korrekten Ergebnisse einer Prüfmethode (25).

GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals = Global harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung): Ein System zur Klassifizierung von Chemikalien (Stoffen und Gemischen) nach standardisierten Typen und Stufen physikalischer, gesundheitlicher und ökologischer Gefahren und zur entsprechenden Kennzeichnung durch Piktogramme, Signalwörter, Gefahrenhinweise, Sicherheitshinweise und Sicherheitsdatenbögen, um zum Schutz des Menschen (einschließlich Arbeitgeber, Arbeiter, Spediteure, Verbraucher und Notfall-Einsatzkräfte) und der Umwelt Informationen über die schädlichen Wirkungen der betreffenden Chemikalien zu verbreiten (1).

Hautverätzung, *in vivo*: Das Auslösen einer irreversiblen Hautschädigung, d. h. einer sichtbaren, bis in das Corium reichenden Nekrose der Epidermis nach Applikation einer Prüfchemikalie für die Dauer von bis zu 4 Stunden. Verätzungsreaktionen sind gekennzeichnet durch Geschwüre, Blutungen, blutige Verschorfungen und am Ende des Beobachtungszeitraums von 14 Tagen durch eine auf ein Ausbleichen der Haut zurückzuführende Verfärbung, komplett haarlose Bereiche und Narben. Bei der Beurteilung fragwürdiger Schädigungen ist die Histopathologie mit zu berücksichtigen.

HPLC: Hochleistungs-Flüssigkeitschromatografie.

IATA: Integrated Approach to Testing and Assessment = integrierter Prüfungs- und Bewertungsansatz.

IC₅₀: Kann durch Ermittlung der Konzentration abgeschätzt werden, bei der eine Referenzchemikalie die Viabilität der Gewebe nach einer vorgegebenen Expositionszeit um 50 % (IC₅₀) reduziert; siehe auch ET₅₀.

Leistungsstandards (PS): Auf einer validierten Prüfmethode beruhende Normen, auf deren

Grundlage die Vergleichbarkeit einer vorgeschlagenen, mechanistisch und funktionell ähnlichen Prüfmethode bewertet werden kann. Sie umfassen (i) wesentliche Elemente der Prüfmethode; (ii) ein Mindestverzeichnis von Referenzchemikalien, ausgewählt aus den Chemikalien, die zum Nachweis der akzeptablen Leistung der validierten Referenzmethode verwendet werden; und (iii) je nach den für die validierte Referenzmethode erzielten Ergebnissen die vergleichbaren Zuverlässigkeits- und Genauigkeitswerte, die die vorgeschlagene Prüfmethode bei der Bewertung anhand des Mindestverzeichnisses von Referenzchemikalien demonstrieren sollte (25).

Mehrkomponentiger Stoff: Ein nach seiner quantitativen Zusammensetzung definierter Stoff, bei dem mehr als ein Hauptbestandteil in einer Konzentration von mindestens $\geq 10\%$ w/w und $< 80\%$ w/w vorliegt. Ein mehrkomponentiger Stoff ist das Ergebnis eines Herstellungsprozesses. Der Unterschied zwischen einem Gemisch und einem mehrkomponentigen Stoff besteht darin, dass ein Gemisch durch die Mischung von zwei oder mehr Stoffen ohne chemische Reaktion entsteht. Ein mehrkomponentiger Stoff wird durch eine chemische Reaktion gebildet.

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid; Thiazolyl-Blau-Tetrazoliumbromid.

NC: Nicht hautätzend

NSC_{abgetötet}-Kontrolle: Nicht spezifische Farbkontrolle mit abgetöteten Geweben.

NSC_{lebend}-Kontrolle: Nicht spezifische Farbkontrolle mit lebenden Geweben.

NSMTT: Nicht spezifische MTT-Reduktion.

OD: Optische Dichte.

PK: Positivkontrolle, ein Replikat, das alle Komponenten eines Prüfsystems enthält und mit einer Chemikalie behandelt wird, die bekanntermaßen eine positive Reaktion hervorruft. Um sicherzustellen, dass Abweichungen bei der Positivkontrollreaktion im Zeitverlauf bewertet werden können, sollte die Reaktion nicht zu heftig sein.

Prüfchemikalie: Stoff oder Gemisch, der/das mit dieser Prüfmethode untersucht wird.

Prüflauf: Ein Prüflauf besteht aus einer oder mehreren Prüfchemikalien, die gleichzeitig mit einer Negativ- und einer Positivkontrolle geprüft werden.

Relevanz: Dieser Begriff bezieht sich auf das Verhältnis zwischen der Prüfmethode und der betreffenden Wirkung und auf die Frage, ob er aussagekräftig und nützlich für einen bestimmten Zweck ist. Er beschreibt das Ausmaß, in dem die Prüfmethode die untersuchte biologische Wirkung korrekt misst oder vorhersagt. Die Relevanz schließt eine Beurteilung der Genauigkeit (Übereinstimmung) einer Prüfmethode ein (25).

Sensitivität: Der Anteil aller positiven/wirkenden Chemikalien, die durch die Prüfmethode korrekt eingestuft werden. Die Sensitivität ist ein Maß der Genauigkeit einer Prüfmethode mit kategorialen Ergebnissen und ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung ihrer Relevanz (25).

Spezifität: Der Anteil aller negativen/wirkungslosen Chemikalien, die durch die Prüfmethode korrekt eingestuft werden. Die Spezifität ist ein Maß der Genauigkeit einer Prüfmethode mit kategorialen Ergebnissen und ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung ihrer Relevanz (25).

Stoff: Ein chemisches Element und seine Verbindungen in natürlicher Form oder gewonnen durch ein Herstellungsverfahren, einschließlich der zur Wahrung seiner Stabilität notwendigen Zusatzstoffe und der durch das angewandte Verfahren bedingten Verunreinigungen, aber mit Ausnahme von Lösungsmitteln, die von dem Stoff ohne Beeinträchtigung seiner Stabilität und ohne Änderung seiner Zusammensetzung abgetrennt werden können.

Übereinstimmung: Die Übereinstimmung ist ein Maß der Leistung einer Prüfmethode für Prüfverfahren mit kategorialen Ergebnissen und ein Aspekt der Relevanz. Der Begriff wird gelegentlich gleichbedeutend mit Genauigkeit verwendet und als Anteil aller geprüften Chemikalien definiert, die korrekt als positiv oder negativ eingestuft werden. Die Übereinstimmung hängt in hohem Maße von der Prävalenz positiver Ergebnisse bei den Typen der untersuchten Prüfchemikalien ab (25).

Überschüssige Dosis: Die Menge der auf die Haut aufgetragenen Prüfchemikalie, die über die zur vollständigen und gleichmäßigen Bedeckung der Hautoberfläche erforderliche Menge hinausgeht. Ein Gemisch oder eine Lösung, die aus zwei oder mehr nicht reagierenden Stoffen besteht.

UPLC: Ultra-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatografie.

UVCB: Stoffe mit unbekannter oder schwankender Zusammensetzung, komplexe Reaktionsprodukte oder biologische Materialien.

Zellviabilität: Parameter zur Messung der Gesamtaktivität einer Zellpopulation, z. B. Fähigkeit zellulärer mitochondrialer Dehydrogenasen, den Vitalfarbstoff MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid, Thiazolyl-Blau) zu reduzieren, der je nach gemessenem Endpunkt und angewandtem Prüfkonzept der Gesamtzahl und/oder der Vitalität lebender Zellen entspricht.

Zuverlässigkeit: Beschreibung der Beziehung zwischen der Prüfung und der untersuchten Wirkung und ob die Prüfung aussagekräftig und nützlich für einen bestimmten Zweck ist. Sie wird durch Berechnung der Intra- und Interlabor-Reproduzierbarkeit bewertet (25).

Anlage 2

HAUPTELEMENTE DER FÜR DIE PRÜFUNG VON HAUTVERÄTZUNGEN VALIDIERTEN RHE-PRÜFMODELLE

Prüfmodell- elemente	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Modell- oberfläche	0,38 cm ²	0,63 cm ²	0,5 cm ²	0,6 cm ²
Anzahl der Gewebe- replikate	Mindestens 2 pro Expositionszeitraum	2-3 pro Expositionszeitraum	Mindestens 2 pro Expositionszeitraum	Mindestens 2 pro Expositionszeitraum

Prüfmodell- elemente	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Behandlungs- dosierungen und Auftragung	<u>Flüssigkeiten und viskose Flüssigkeiten</u>: 50 µl ± 3 µl (131,6 µl/cm²) <u>Feststoffe</u>: 20 ± 2 mg (52,6 mg/cm²) + 100 µl ± 5 µl NaCl solution (9 g/l) <u>Wachstypig/klebrig</u>: 50 ± 2 mg (131,6 mg/cm²) mit Nylon-Maschenfilter	<u>Flüssigkeiten</u>: 50 µl (79,4 µl/cm²) mit oder ohne Nylon-Maschenfilter <i>Vorversuch mit Nylon-Maschenfilter zur Verwendbarkeit der Prüfchemikalie</i> <u>Halbfeste Stoffe</u>: 50 µl (79,4 µl/cm²) <u>Feststoffe</u>: 25 µl H₂O (bzw. erforderlichenfalls mehr) + 25 mg (39,7 mg/cm²) <u>Wachstypige Stoffe</u>: Eine flache „Scheibe“ mit einem Durchmesser von 8 mm auf dem mit 15 µl H₂O befeuchteten Gewebe.	<u>Flüssigkeiten und viskose Flüssigkeiten</u>: 40 µl ± 3 µl (80 µl/cm²) mit Nylon-Maschenfilter <i>Vorversuch mit Nylon-Maschenfilter zur Verwendbarkeit der Prüfchemikalie</i> <u>Feststoffe</u>: 20 µl ± 2 µl H₂O + 20 ± 3 mg (40 mg/cm²) <u>Wachstypige/klebrige Stoffe</u>: 20 ± 3 mg (40 mg/cm²) mit Nylon-Maschenfilter	<u>Flüssigkeiten</u>: 50 µl (83,3 µl/cm²) mit Nylon-Maschenfilter <i>Vorversuch mit Nylon-Maschenfilter zur Verwendbarkeit der Prüfchemikalie</i> <u>Halbfeste Stoffe</u>: 50 µl (83,3 µl/cm²) <u>Feststoffe</u>: 25 mg (41,7 mg/cm²) + 25 µl H₂O (bzw. erforderlichenfalls mehr) <u>Wachstypige Stoffe</u>: Eine flache „Scheibe“ mit einem Durchmesser von 8 mm auf dem mit 15 µl H₂O befeuchteten Gewebe.
Vorabprüfung auf direkte MTT- Reduktion	50 µl (Flüssigkeiten) oder 20 mg (Feststoffe) + 2 ml MTT 0,3 mg/ml Lösung 180 ± 5 min bei 37 °C, 5 % CO₂, 95 % relative Luftfeuchtigkeit → Wenn die Lösung sich blau/violett färbt, sollten geeignete in Wasser abgetötete Kontrollen untersucht werden.	50 µl (Flüssigkeiten) oder 25 mg (Feststoffe) + 1 ml MTT 1 mg/ml Lösung 60 min bei 37 °C, 5 % CO₂, 95 % relative Luftfeuchtigkeit → Wenn die Lösung sich blau/violett färbt, sollten durch Gefrieren abgetötete Kontrollen untersucht werden.	40 µl (Flüssigkeiten) oder 20 mg (Feststoffe) + 1 ml MTT 1 mg/ml Lösung für 180 ± 15 min bei 37 °C, 5 % CO₂, 95 % relative Luftfeuchtigkeit → Wenn die Lösung sich blau/violett färbt, sollten durch Gefrieren abgetötete Kontrollen untersucht werden.	50 µl (Flüssigkeiten) oder 25 mg (Feststoffe) + 1 ml MTT 1 mg/ml Lösung 60 min bei 37 °C, 5 % CO₂, 95 % relative Luftfeuchtigkeit → Wenn die Lösung sich blau/violett färbt, sollten durch Gefrieren abgetötete Kontrollen untersucht werden.

Prüfmodell- elemente	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Vorabprüfung auf Farbinter- ferenzen	10 µl (Flüssigkeiten) bzw. 10 mg (Feststoffe) + 90 µl H ₂ O 15 min gemischt bei Raumtemperatur → Wenn sich die Lösung färbt, sollten Prüfungen an geeigneten lebenden Kontrollen durchgeführt werden.	50 µl (Flüssigkeiten) bzw. 25 mg (Feststoffe) + 300 µl H ₂ O 60 min bei 37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % relative Luftfeuchtigkeit → Wenn sich die Lösung färbt, sollten Prüfungen an geeigneten lebenden Kontrollen durchgeführt werden.	40 µl (Flüssigkeiten) bzw. 20 mg (Feststoffe) + 300 µl H ₂ O 60 min gemischt bei Raumtemperatur → Wenn sich die Prüfchemikalie färbt, sollten Prüfungen an geeigneten lebenden Kontrollen durchgeführt werden.	50 µl (Flüssigkeiten) bzw. 25 mg (Feststoffe) + 300 µl H ₂ O 60 min bei 37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % relative Luftfeuchtigkeit → Wenn sich die Lösung färbt, sollten Prüfungen an geeigneten lebenden Kontrollen durchgeführt werden.
Expositions- zeitraum und -temperatur	3 min, 60 min (± 5 min) und 240 min (± 10 min) In belüftetem Schrank Raumtemperatur (RT) (18-28 °C)	3 min bei Raumtemperatur und 60 min bei 37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % relative Luftfeuchtigkeit	3 min bei Raumtemperatur und 60 min bei 37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % relative Luftfeuchtigkeit	3 min bei Raumtemperatur und 60 min bei 37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % relative Luftfeuchtigkeit
Waschen	25 ml 1x PBS (2 ml/Prüflauf)	20x unter konstanter vorsichtiger Spülung mit 1x PBS	20x unter konstanter vorsichtiger Spülung mit 1x PBS	20x unter konstanter vorsichtiger Spülung mit 1x PBS
Negativ- kontrolle	50 µl NaCl-Lösung (9 g/l) Geprüft über alle Expositionszeiträume	50 µl H ₂ O Geprüft über alle Expositionszeiträume	40 µl H ₂ O Geprüft über alle Expositionszeiträume	50 µl H ₂ O Geprüft über alle Expositionszeiträume
Positivkontrolle	50 µl Eisessig Nur über 4 h geprüft	50 µl 8N KOH Geprüft über alle Expositionszeiträume	40 µl 8N KOH Nur über 1 h geprüft	50 µl 8N KOH Geprüft über alle Expositionszeiträume

Prüfmodell- elemente	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
MTT-Lösung	2 ml 0,3 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
MTT Inkubationszeit und -temperatur	180 min (± 15 min) bei 37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % relative Luftfeuchtigkeit	180 min bei 37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % relative Luftfeuchtigkeit	180 min (± 15 min) bei 37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % relative Luftfeuchtigkeit	180 min bei 37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % relative Luftfeuchtigkeit
Extraktions- lösung	500 µl Isopropanol acidifiziert (0,04 N HCl in Isopropanol) (isoliertes Gewebe, vollständig eingelegt)	2 ml Isopropanol (Extraktion oben und unten aus dem Einsatz)	1,5 ml Isopropanol (Extraktion oben und unten aus dem Einsatz)	2 ml Isopropanol (Extraktion oben und unten aus dem Einsatz)
Expositions- zeitraum und -temperatur	Über Nacht bei Raumtemperatur, vor Licht geschützt	Über Nacht ohne Schütteln bei Raumtemperatur oder 120 min mit Schütteln (~120 rpm) bei Raumtemperatur	Über Nacht ohne Schütteln bei Raumtemperatur oder 120 min mit Schütteln (~120 rpm) bei Raumtemperatur	Über Nacht ohne Schütteln bei Raumtemperatur oder 120 min mit Schütteln (~120 rpm) bei Raumtemperatur
OD-Anzeige	570 nm (545 - 595 nm) ohne Referenzfilter	570 nm (oder 540 nm) ohne Referenzfilter	570 nm (540 - 600 nm) ohne Referenzfilter	540 - 570 nm ohne Referenzfilter
Kontrolle der Gewebequalität	18-stündige Behandlung mit SDS 1,0 mg/ml ≤ IC ₅₀ ≤ 3,0 mg/ml	Behandlung mit 1 % Triton X-100 4,08 h ≤ ET ₅₀ ≤ 8,7 h	Behandlung mit 1 % Triton X-100 4,0 h ≤ ET ₅₀ ≤ 10,0 h	Behandlung mit 1 % Triton X-100 2,0 h ≤ ET ₅₀ ≤ 7,0 h

Prüfmodell- elemente	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Akzeptanz- kriterien	1. Die mittlere OD der mit der Negativkontrolle (NaCl) behandelten Gewebereplikate sollte bei allen Expositionszeiträumen $\geq 0,6$ und $\leq 1,5$ sein. 2. Die prozentuale mittlere Viabilität der Gewebereplikate bezogen auf die Negativkontrolle sollte nach 4-stündiger Exposition gegenüber der Positivkontrolle (Eisessigsäure) ≤ 20 % sein. 3. Im Viabilitätsbereich von 20-100 % und bei ODs $\geq 0,3$ sollten die Unterschiede der Viabilität zwischen den beiden Gewebereplikaten nicht mehr als 30 % betragen.	1. Die mittlere OD der mit der Negativkontrolle (H₂O) behandelten Gewebereplikate sollte bei allen Expositionszeiträumen $\geq 0,8$ und $\leq 2,8$ sein. 2. Die mittlere Viabilität der Gewebereplikate nach 1-stündiger Exposition gegenüber der Positivkontrolle (8N KOH), ausgedrückt in % der Negativkontrolle, sollte < 15 % sein. 3. Bei einer Viabilität von 20-100 % sollte der Variationskoeffizient (VK) zwischen den Gewebereplikaten bei ≤ 30 % liegen.	1. Die mittlere OD der mit der Negativkontrolle (H₂O) behandelten Gewebereplikate sollte bei allen Expositionszeiträumen $\geq 0,8$ und $\leq 3,0$ sein. 2. Die mittlere Viabilität der Gewebereplikate nach 1-stündiger (bzw. ggf. 4-stündiger) Exposition gegenüber der Positivkontrolle (8N KOH), ausgedrückt in % der Negativkontrolle, sollte < 15 % sein. 3. Im Viabilitätsbereich von 20-100 % und bei ODs $\geq 0,3$ sollten die Unterschiede der Viabilität zwischen den beiden Gewebereplikaten nicht mehr als 30 % betragen.	1. Die mittlere OD der mit der Negativkontrolle (H₂O) behandelten Gewebereplikate sollte bei allen Expositionszeiträumen $\geq 0,8$ und $\leq 2,8$ sein. 2. Die mittlere Viabilität der Gewebereplikate nach 1-stündiger Exposition gegenüber der Positivkontrolle (8N KOH), ausgedrückt in % der Negativkontrolle, sollte < 20 % sein. 3. Im Viabilitätsbereich von 20-100 % und bei ODs $\geq 0,3$ sollten die Unterschiede der Viabilität zwischen den beiden Gewebereplikaten nicht mehr als 30 % betragen.

Anlage 3

LEISTUNG DER PRÜFMODELLE ZUR UNTERKATEGORISIERUNG

Die folgende Tabelle bietet einen Überblick über die Leistung der vier Prüfmodelle, die auf der Grundlage einer Reihe von 80 von den vier Entwicklern der Prüfmodelle geprüften Chemikalien berechnet wurde. Die Berechnungen wurden vom OECD-Sekretariat vorgenommen und von einer Experten-Untergruppe geprüft und angenommen (21) (23).

Mithilfe der Prüfmodelle EpiSkin™, EpiDerm™, SkinEthic™ und epiCS® können Unterkategorisierungen (d. h. Unterscheidungen zwischen 1A und 1B-und-1C gegenüber NC) vorgenommen werden.

Die Leistungsangaben, die Überklassifizierungsraten, die Unterqualifizierungsraten und die Genauigkeit (Vorhersagefähigkeit) der vier Prüfmodelle beruhen auf einer Reihe von 80 Chemikalien, die für jedes Prüfmodell jeweils in 2 oder 3 Prüfläufen untersucht wurden:

STATISTIKEN ZU VORHERSAGEN AUFGRUND DER GESAMTEN CHEMIKALIENREIHE				
(n= 80 Chemikalien, die über 2 getrennte Prüfläufe mit epiCS® bzw. mit 3 getrennten Prüfläufen mit EpiDerm™ SCT, EpiSkin™ und SkinEthic™ RHE untersucht wurden, d. h. insgesamt 159* bzw. 240 Klassifikationen)				
*Eine Chemikalie wurde infolge mangelnder Verfügbarkeit einmal mit epiCS® untersucht (23).				
	EpiSkin™	EpiDerm™	SkinEthic™	epiCS®
Überklassifizierungen:				
1B-und-1C überklassifiziert als 1A	21,5 %	29,0 %	31,2 %	32,8 %
Negativkontrolle überklassifiziert als 1B-und-1C	20,7 %	23,4 %	27,0 %	28,4 %
Negativkontrolle überklassifiziert als 1A	0,00 %	2,7 %	0,0 %	0,00 %
Überklassif. Korr.	20,7 %	26,1 %	27,0 %	28,4 %
Allgemeine Überklassifizierungsrate (alle Kategorien)	17,9 %	23,3 %	24,5 %	25,8 %
Unterklassifizierungen:				
1A unterklassifiziert als 1B-und-1C	16,7 %	16,7 %	16,7 %	12,5 %
1A unterklassifiziert als Negativkontrolle	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
1B-und-1C unterklassifiziert als Negativkontrolle	2,2 %	0,00 %	7,5 %	6,6 %
Allgemeine Unterklassifizierungsrate (alle Kategorien)	3,3 %	2,5 %	5,4 %	4,4 %

Korrekte Klassifizierungen:				
1A korrekt klassifiziert	83,3 %	83,3 %	83,3 %	87,5 %
1B-und-/1C korrekt klassifiziert	76,3 %	71,0 %	61,3 %	60,7 %
Negativkontrolle korrekt klassifiziert	79,3 %	73,9 %	73,0 %	71,62 %
Gesamtgenauigkeit	78,8 %	74,2 %	70 %	69,8 %

NC: Nicht hautätzend

Anlage 4

Schlüsselparameter und Akzeptanzkriterien für die Qualifizierung eines HPLC/UPLC-Spektrophotometriesystems zur Messung von aus RhE-Gewebe extrahiertem MTT-Formazan

Parameter	Protokoll abgeleitet aus FDA-Leitlinie (37)(38)	Akzeptanzkriterien
Selektivität	Analyse von Isopropanol, Blindprobe lebend (Isopropanol-Extrakt aus lebenden RhE-Geweben ohne Behandlung), Blindprobe abgetötet (Isopropanol-Extrakt aus abgetöteten RhE-Geweben ohne Behandlung)	$\frac{\text{Fläche}_{\text{Interferenz}}}{\text{Fläche}_{\text{LLOQ}}^1} \leq 20 \%$
Präzision	Qualitätskontrollen (d. h. MTT-Formazan bei 1,6 µg/ml, 16 µg/ml und 160 µg/ml) in Isopropanol (n=5)	VK $\leq 15 \%$ bzw. $\leq 20 \%$ für LLOQ
Genauigkeit	Qualitätskontrollen mit Isopropanol (n=5)	% Abw. $\leq 15 \%$ bzw. $\leq 20 \%$ für LLOQ
Matrixeffekt	Qualitätskontrollen mit Blindprobe lebend (n=5)	$85 \% \leq \text{Matrixeffekt} \% \leq 115 \%$
Übertragung	Analyse Isopropanol nach einem ULOQ ² -Standard	$\frac{\text{Fläche}_{\text{Interferenz}}}{\text{Fläche}_{\text{LLOQ}}} \leq 20 \%$
Reproduzierbarkeit (innerhalb eines Tages)	3 unabhängige Eichkurven (aufgrund von 6 aufeinander folgenden Verdünnungen von MTT-Formazan in Isopropanol im Verhältnis 1:3 beginnend mit der ULOQ, d. h. 200 µg/ml); Qualitätskontrollen in Isopropanol (n=5)	Eichkurven: % Abw. $\leq 15 \%$ bzw. $\leq 20 \%$ für LLOQ Qualitätskontrollen: % Abw. $\leq 15 \%$ und VK $\leq 15 \%$
Reproduzierbarkeit (innerhalb eines Tages)	Tag 1: 1 Eichkurve und Qualitätskontrollen in Isopropanol (n=3) Tag 2: 1 Eichkurve und Qualitätskontrollen in Isopropanol (n=3) Tag 3: 1 Eichkurve und Qualitätskontrollen in Isopropanol (n=3)	
Kurzzeitstabilität von MTT-Formazan in RhE-Gewebeextrakt	Qualitätskontrollen in Blindproben lebend (n=3), die am Tag der Vorbereitung sowie nach 24-stündiger Lagerung bei Raumtemperatur analysiert wurden.	% Abw. $\leq 15 \%$
Langzeitstabilität von MTT-Formazan in RhE-Gewebeextrakt (erforderlichenfalls)	Qualitätskontrollen in Blindproben lebend (n=3), die am Tag der Vorbereitung sowie nach mehrtägiger Lagerung bei einer spezifizierten Temperatur (z. B. 4 °C, -20 °C, -80 °C) analysiert wurden.	% Abw. $\leq 15 \%$

¹ LLOQ Untere Quantifizierungsgrenze, definiert als Gewebeviabilität von 1-2 %, d. h. 0,8 µg/ml.

² ULOQ Obere Quantifizierungsgrenze, definiert als mindestens zweimal so hoch wie die erwartete MTT-Formazan-Konzentration in Isopropanol-Extrakten aus Negativkontrollen, d. h. 200 µg/ml.“

(7) In Teil B erhält Kapitel B.46 folgende Fassung:

„B.46 IN-VITRO-HAUTREIZUNG: PRÜFMETHODE MIT REKONSTRUIERTER HUMANER EPIDERMIS

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode (PM) entspricht der OECD-Prüfrichtlinie 439 (2015). Als Hautreizung wird das Auslösen einer reversiblen Hautschädigung nach Applikation einer Prüfchemikalie für die Dauer von bis zu 4 Stunden [Definition nach dem Global Harmonisierten System (GHS) zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien der Vereinten Nationen (UN)](1) und nach Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen (CLP-Verordnung)¹ bezeichnet. Die vorliegende Prüfmethode besteht in einem *In-vitro*-Verfahren, das zur Ermittlung schädlicher Wirkungen von hautreizenden Chemikalien (Stoffen und Gemischen) gemäß UN GHS und CLP-Verordnung Kategorie 2 (2) verwendet werden kann. In Regionen, in denen die optionale UN-GHS-Kategorie 3 (leichte Reizstoffe) nicht übernommen wurde, kann diese Prüfmethode auch zur Identifizierung nicht klassifizierter Chemikalien verwendet werden. Je nach Rechtsrahmen und verwendetem Klassifizierungssystem kann diese Prüfmethode daher im Rahmen einer Prüfstrategie zur Ermittlung des Hautreizungspotenzials von Chemikalien entweder als eigenständige Ersatzprüfung zur *In-vivo*-Untersuchung auf Hautreizungen oder als teilweise Ersatzprüfung verwendet werden (3).
2. Die Bewertung von Hautreizungen erfolgte in der Regel unter Verwendung von Labortieren [PM B.4, entsprechend OECD TG 404, ursprünglich angenommen im Jahr 1981 und geändert in den Jahren 1992, 2002 und 2015] (4). Für die Untersuchung auf Hautverätzungen wurden drei validierte *In-vitro*-Prüfmethode als PM B.40 (entsprechend OECD TG 430), PM B.40bis (entsprechend OECD TG 431) und PM B.65 (entsprechend OECD TG 435) angenommen (5) (6) (7). In einem OECD-Leitliniendokument über integrierte Prüfungs- und Bewertungsansätze (IATA = Integrated Approaches to Testing and Assessment) zur Untersuchung von Hautverätzungen und -reizungen werden mehrere Module beschrieben, in denen Informationsquellen und Analyseinstrumente zu Gruppen

¹ Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen, zur Änderung und Aufhebung der Richtlinien 67/548/EWG und 1999/45/EG und zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 (ABl. L 353 vom 31.12.2008, S. 1).

zusammengefasst werden. Sie enthalten i) Leitlinien dazu, wie vorhandene Daten aus Prüfungen und aus anderen Quellen integriert und verwendet werden können, um das Hautreizungs- und das Hautverätzungspotenzial von Chemikalien zu bewerten, und ii) einen Vorschlag zur Durchführung ggf. erforderlicher weiterer Prüfungen (3).

3. Mit dieser Prüfmethode werden Hautreizungen mit dem Endpunkt der menschlichen Gesundheit untersucht. Sie beruht auf dem *In-vitro*-Prüfsystem zur Untersuchung rekonstruierter humaner Epidermis (RhE), die die biochemischen und physiologischen Eigenschaften der menschlichen Oberhaut (d. h. der Epidermis) weitgehend widerspiegelt. Im RhE-Prüfsystem werden menschliche nicht transformierte Keratinozyten als zelluläres Ausgangsmaterial zur Rekonstruktion eines Epidermismodells mit repräsentativer Histologie und Zellarchitektur verwendet. Leistungsstandards (PS) erleichtern die Validierung und Bewertung ähnlicher und modifizierter Prüfmethoden, die auf der Verwendung von RhE und der Einhaltung der Grundsätze des OECD-Leitliniendokuments Nr. 34 beruhen (8)(9). Die entsprechende OECD-Prüfrichtlinie wurde ursprünglich 2010 angenommen und 2013 unter Berücksichtigung weiterer Prüfmethoden unter Verwendung von RhE-Modellen zunächst im Jahr 2013 und anschließend nochmals im Jahr 2015 unter Verweis auf das IATA-Leitliniendokument und unter Einführung der Verwendung eines alternativen Verfahrens zur Messung der Viabilität aktualisiert.
4. Zu vier im Handel erhältlichen *In-vitro*-Prüfmodellen wurden auf dem RhE-Prüfsystem (Sensitivität 80 %, Spezifität 70 % und Genauigkeit 75 %) beruhende Vorvalidierungs-, Optimierungs- und Validierungsstudien durchgeführt (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28). Diese vier Prüfmodelle werden in diese Prüfmethode aufgenommen und in Anlage 2 genannt, die auch Informationen zur Art der zur Validierung der jeweiligen Prüfmethoden verwendeten Validierungsstudien enthält. Wie in Anlage 2 erläutert, wurden diese Prüfmethode und die Leistungsstandards mit der validierten Referenzmethode (VRM) entwickelt (8).
5. Die gegenseitige Anerkennung der Daten gemäß dem OECD-Übereinkommen wird nur dann für nach den Leistungsstandards (8) validierte Prüfmodelle garantiert, wenn diese Prüfmodelle von der OECD geprüft und angenommen wurden. Die in diese Prüfmethode aufgenommenen Prüfmodelle und die entsprechende OECD TG können gleichermaßen verwendet werden, um sowohl länderbezogene Anforderungen an die Prüfergebnisse der *In-vitro*-Prüfmethoden zur Untersuchung von Hautreizungen zu erfüllen als auch die gegenseitige Anerkennung von Daten beanspruchen zu können.
6. In diesem Dokument gelten die Begriffsbestimmungen in Anlage 1.

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN UND BEGRENZUNGEN

7. Eine Begrenzung der Prüfmethode, wie durch die umfassende prospektive Validierungsstudie zur Bewertung und Beschreibung von RhE-Prüfmethoden (16) nachgewiesen, besteht insofern, als keine Einstufung von Stoffen in die optionale Kategorie 3 (leichte Reizstoffe) des UN-GHS-Systems möglich ist (1). Daher wird mit dem Rechtsrahmen in den Mitgliedstaaten festgelegt, wie diese Prüfmethode zu verwenden ist. Die EU hat Kategorie 3 nicht in die CLP-Verordnung aufgenommen. Eine umfassende Evaluierung lokaler Auswirkungen auf die Haut nach einer einmaligen dermalen Exposition ist dem OECD-Leitliniendokument über integrierte Prüfungs- und Bewertungsansätze (IATA) zu entnehmen (3). Die Verwendung menschlicher Haut unterliegt anerkanntermaßen ethischen Überlegungen und Bedingungen auf nationaler und internationaler Ebene.
8. Mit dieser Prüfmethode werden Hautreizungen mit dem Endpunkt der menschlichen Gesundheit untersucht. Obwohl diese Prüfmethode keine angemessenen Informationen über Hautätzungen liefert, wird darauf hingewiesen, dass PM B.40bis (entsprechend OECD-Prüfrichtlinie 431) über Hautätzung auf demselben Prüfsystem auf der Grundlage eines RhE-Modells beruht, aber ein anderes Protokoll vorsieht (Kapitel 6). Die vorliegende Prüfmethode beruht auf Modellen unter Verwendung menschlicher Keratinozyten, die *in vitro* das Zielorgan der zu schützenden Spezies repräsentieren. Darüber hinaus bildet sie den Anfangsschritt der Entzündungskaskade bzw. des Wirkmechanismus ab (Zell- und Gewebeschädigung mit resultierendem lokalisiertem Trauma), der während der Reizung *in vivo* auftritt. Für die dieser Prüfmethode zugrunde liegende Validierung wurden Chemikalien unterschiedlicher Klassen untersucht. In der dieser Prüfmethode zugrunde liegenden Validierung wurden zahlreiche Chemikalien geprüft, und die Datenbank der Validierungsstudie umfasste insgesamt 58 Chemikalien (16) (18) (23). Die Prüfmethode ist auf Feststoffe, Flüssigkeiten, halbfeste Stoffe und Wachse anwendbar. Flüssigkeiten können wässrig oder nicht wässrig und Feststoffe in Wasser löslich oder unlöslich sein. Sofern möglich, sollten Feststoffe vor der Applikation zu Feinpulver gemahlen werden; eine weitere Behandlung der Probe ist nicht nötig. Gase und Aerosole wurden bislang in keiner Validierungsstudie bewertet (29). Obwohl deren Prüfung mit der RhE-Technologie prinzipiell vorstellbar ist, erlaubt die vorliegende Prüfmethode das Untersuchen von Gasen und Aerosolen nicht.
9. Bevor die Prüfmethode für die Generierung von Daten für einen bestimmten Regulierungszweck verwendet wird, ist zu prüfen, ob sie für den beabsichtigten Zweck angemessene Ergebnisse liefern kann und, wenn dem so ist, warum. Solche Erwägungen entfallen, wenn die Prüfung des Gemischs rechtlich vorgeschrieben ist. Da Gemische jedoch vielfältigen Kategorien zuzurechnen sein und unterschiedliche Zusammensetzungen haben können, und da gegenwärtig nur begrenzte Informationen über die Prüfung von Gemischen verfügbar sind, sollten Prüfmethoden, bei denen nachgewiesen werden kann, dass sie für eine bestimmte Kategorie von Gemischen nicht geeignet sind (beispielsweise durch ein Verfahren entsprechend dem von Eskes u. a. 2012 vorgeschlagenen Verfahren

(30)), für die betreffende Kategorie von Gemischen nicht verwendet werden. Vorsicht ist ebenfalls geboten, wenn festgestellt wird, dass diese Prüfmethode für spezifische Chemikalienklassen oder physikalisch-chemische Eigenschaften nicht geeignet ist.

10. Prüfchemikalien, die Licht im selben Spektrum absorbieren können wie MTT-Formazan, und Prüfchemikalien, die in der Lage sind, den lebenswichtigen Farbstoff MTT zu reduzieren (zu MTT-Formazan), können die Messungen der Zellviabilität stören und erfordern die Verwendung geeigneter Kontrollen zur Korrektur (Nummern 28-34).
11. Vorausgesetzt die Prüfung liefert ein eindeutiges Ergebnis, genügt ein einziger Prüflauf mit drei parallel geprüften Replikat-Geweben. Bei Grenzergebnissen, wie z. B. nicht übereinstimmenden Replikatmessungen und/oder einer mittleren prozentualen Viabilität von $50 \pm 5 \%$, sollte ein zweiter Prüflauf in Betracht gezogen werden bzw. ein dritter bei abweichenden Ergebnissen der ersten beiden Prüfläufe.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

12. Die Prüfchemikalie wird oberflächlich auf ein dreidimensionales RhE-Modell aufgetragen, das aus nicht veränderten humanen epidermalen Keratinozyten besteht, die zu einem mehrschichtigen, ausdifferenzierten Modell humaner Epidermis kultiviert wurden. Das Modell besteht aus geordneten Basal-, Stachel- und Körnerzellschichten und einer mehrlagigen Hornschicht (*stratum corneum*), die interzelluläre lamellare Fettschichten enthält, deren dominierende Lipidklassen dem *in vivo* gefundenen Lipidmuster entsprechen.
13. Durch Chemikalien hervorgerufene Reizungen der Haut manifestieren sich hauptsächlich als Erytheme und Ödeme. Diese Symptome sind das Ergebnis einer Kaskade von Ereignissen, an deren Beginn das Eindringen der Chemikalien in das *stratum corneum* steht, in dem die Chemikalien die darunter liegenden Keratinozytenschichten schädigen können. Die beschädigten Zellen können entweder Entzündungsmediatoren freisetzen oder eine Entzündungskaskade induzieren, die auch auf die Zellen der Dermis wirken, insbesondere auf die Stromal- und Endothelzellen der Blutgefäße. Die Dilation und erhöhte Durchlässigkeit der Endothelzellen erzeugen letztendlich das festgestellte Erythem bzw. Ödem (29). Mit den Prüfmethode unter Verwendung von RhE (ohne Vaskularisierung im *In-vitro*-Prüfsystem) werden anhand der Zellviabilität die auslösenden Ereignisse in der Kaskade (z. B. Zell- bzw. Gewebeschäden) (16) (17) gemessen.
14. Die Zellviabilität an Modellen rekonstruierter menschlicher Epidermis wird durch Enzymkonversion des Vitalfarbstoffs MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid, Thiazolyl-Blau; CAS-Nummer 298-93-1] zu einem blauen Formazan-Salz gemessen, das nach seiner Extraktion aus Geweben quantifiziert wird (31). Reizstoffe werden anhand ihrer Fähigkeit erkannt, die Zellviabilität unter vorgegebene Schwellenwerte zu senken (d. h. $\leq 50 \%$ bei Reizstoffen der UN-GHS-/CLP-Kategorie 2).

Je nach Rechtsrahmen und Anwendbarkeit der Prüfmethode können Chemikalien, die eine Zellviabilität oberhalb des vorgegebenen Grenzwerts erzeugen, als nicht-reizend eingestuft werden (d. h. > 50 %, keine Einstufung).

NACHWEIS DER LEISTUNGSFÄHIGKEIT

15. Vor der routinemäßigen Anwendung eines der vier validierten RhE-Prüfmodelle nach dieser Prüfmethode (Anlage 2) sollten Labors die erforderliche technische Befähigung durch eine ordnungsgemäße Klassifizierung der zehn in Tabelle 1 empfohlenen Leistungsstoffe nachweisen. Wenn beispielsweise ein dort genannter Stoff nicht verfügbar ist, kann ein anderer Stoff verwendet werden, für den geeignete *In-vivo*- und *In-vitro*-Referenzdaten verfügbar sind (z. B. aus der Liste der Referenzchemikalien (8)), sofern die in Tabelle 1 beschriebenen Auswahlkriterien angewendet werden. Die Verwendung alternativer Leistungsstoffe sollte gerechtfertigt sein.
16. Im Rahmen des Nachweises der Leistungsfähigkeit sollten die Benutzer die vom Hersteller des Hautmodells spezifizierten Barriereigenschaften der Gewebe nach Erhalt überprüfen. Dies ist besonders dann wichtig, wenn die Gewebe über große Entfernungen/Zeiträume transportiert werden. Sobald eine Methode erfolgreich etabliert und ihre Leistungsfähigkeit festgestellt und nachgewiesen wurde, ist diese Überprüfung nicht mehr routinemäßig erforderlich. Allerdings empfiehlt es sich auch bei routinemäßig angewandten Prüfmethoden, die Barriereigenschaften in regelmäßigen Abständen zu kontrollieren.

Tabelle 1: Leistungsstoffe¹

Stoff	CAS-Nr.	<i>In-vivo</i> -Punktzahl ²	Aggregatzustand	UN-GHS-Kategorie
NICHT KLASSIFIZIERTE STOFFE (UN GHS KEINE EINSTUFUNG)				
Naphthalen-Essigsäure	86-87-3	0	Feststoff	Keine Einst.
Isopropanol	67-63-0	0,3	Flüssigkeit	Keine Einst.
Methylstearat	112-61-8	1	Feststoff	Keine Einst.
Heptyl-Butyrat	5870-93-9	1,7	Flüssigkeit	Keine Einst. (wahlfrei Kat. 3) ³
Hexyl-Salicylat	6259-76-3	2	Flüssigkeit	Keine Einst. (wahlfrei Kat. 3) ³
KLASSIFIZIERTE STOFFE (UN-GHS-KATEGORIE 2)				
Cyclamenaldehyd	103-95-7	2,3	Flüssigkeit	Kat. 2
1-Bromhexan	111-25-1	2,7	Flüssigkeit	Kat. 2
Kaliumhydroxid (5% aq.)	1310-58-3	3	Flüssigkeit	Kat. 2
1-Methyl-3-phenyl-1-piperazin;	5271-27-2	3,3	Feststoff	Kat. 2
Heptanal	111-71-7	3,4	Flüssigkeit	Kat. 2

¹ Die Leistungsstoffe bestehen aus einer Untergruppe der in der Validierungsstudie verwendeten Stoffe, und die Auswahl basiert auf den folgenden Kriterien: i) die Chemikalien sind im Handel erhältlich; ii) sie repräsentieren die volle Bandbreite der Draize-Reizstufen (von nicht reizend bis stark reizend); iii) sie haben eine klar definierte chemische Struktur; iv) sie sind repräsentativ für die im Validierungsprozess verwendete chemische Funktionalität; v) sie führten bei mehreren Prüfungen und in mehreren Labors zu reproduzierbaren *In-vitro*-

Ergebnissen; (vi) sie wurden *in vitro* korrekt vorhergesagt; (vii) sie weisen kein extrem toxisches Profil auf (z. B. krebserregend oder toxisch für das Reproduktionssystem) und sind nicht mit nicht tragbaren Entsorgungskosten verbunden.

2 *In-vivo*-Punktzahl nach PM B.4 (4).

3 Im Rahmen dieser Prüfmethode wird die wahlfreie UN-GHS-Kategorie 3 (leichte Reizstoffe) (1) als Keine Einstufung betrachtet.

VERFAHREN

17. Im Folgenden werden die Elemente und Verfahren einer RhE-Prüfmethode zur Bewertung von Hautreizungen beschrieben. (Zu den Parametern der einzelnen Prüfmodelle siehe auch Anlage 3.) Für die vier Modelle, die die Anforderungen dieser Prüfmethode erfüllen, sind Standardarbeitsweisen (SOPs) verfügbar (32) (33) (34) (35).

ELEMENTE DER RHE-PRÜFMETHODE

Allgemeine Bedingungen

18. Die Epithelschicht sollte aus normalen menschlichen Keratinozyten gebildet werden. Unter der funktionsfähigen Hornschicht (*stratum corneum*) sollten mehrere Lagen lebensfähiger Epithelzellen (Basalzellschicht, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*) vorhanden sein. Die Hornschicht sollte mehrlagig sein und das zur Erzeugung einer funktionsfähigen Barriere essenzielle Lipidprofil aufweisen. Die Barriere muss robust genug sein, um das schnelle Eindringen zytotoxischer Referenzchemikalien wie Natriumdodecylsulfat (SDS) oder Triton X-100 zu verhindern. Die Barrierefunktion kann entweder durch Bestimmung der Konzentration, bei der eine Referenzchemikalie die Viabilität der Gewebe nach einer vorgegebenen Expositionsdauer um 50 % verringert (IC_{50}), oder durch die Bestimmung der Expositionszeit bewertet werden, die erforderlich ist, um die Zellviabilität bei Anwendung der Referenzchemikalie in einer vorgegebenen festen Konzentration um 50 % zu reduzieren (ET_{50}). Die Rückhalteeigenschaften des RhE-Modells müssen ausschließen, dass Material rund um die Hornschicht in lebensfähiges Gewebe eindringt und die Modellierung der Hautexposition beeinträchtigt. Das RhE-Modell sollte nicht mit Bakterien, Viren, Mykoplasma oder Pilzen kontaminiert sein.

Funktionale Bedingungen

Viabilität

19. Die Größenordnung der Viabilität wird mit der MTT-Prüfung bestimmt (31). Die lebensfähigen Zellen des RhE-Gewebemodells können den lebenswichtigen Farbstoff MTT zu einem blauen MTT-Formazan-Niederschlag reduzieren, der dann mit Isopropanol (oder einem ähnlichen Lösungsmittel) aus dem Gewebe extrahiert wird. Die optische Dichte (OD) des Extraktionslösungsmittels allein sollte ausreichend gering sein, d. h. $OD < 0,1$. Das extrahierte MTT-Formazan kann durch eine Standard-(OD)-Absorptionsmessung oder

mit einem HPLC/UPLC-Spektrometrierfahren (36) quantifiziert werden. Die Anwender des RhE-Modells sollten sicherstellen, dass jede Charge des verwendeten Modells die vorgegebenen Kriterien für die Negativkontrolle erfüllt. Der Entwickler/Hersteller des Hautmodells sollte eine Akzeptanzspanne (oberer und unterer Grenzwert) für die OD-Werte der Negativkontrolle (unter den Bedingungen der Prüfmethode zur Untersuchung von Hautreizungen) festlegen. Die Akzeptanzspanne der OD-Werte für die vier validierten RhE-Prüfmodelle dieser Prüfmethode sind Tabelle 2 zu entnehmen. Bei Durchführung einer HPLC/UPLC-Spektrophotometrie sollten die in Tabelle 2 genannten OD-Spannen der Negativkontrolle als Akzeptanzkriterium für die Negativkontrolle verwendet werden. Es sollte dokumentiert werden, dass die mit der Negativkontrolle behandelten Gewebe über den gesamten Expositionszeitraum stabil bleiben (bzw. vergleichbare Viabilitätsmessungen ergeben).

Tabelle 2: Akzeptanzbereiche für OD-Werte der Negativkontrolle der Prüfmodelle dieser Prüfmethode

	Untere Akzeptanzgrenze	Obere Akzeptanzgrenze
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. Das *stratum corneum* und die Zusammensetzung seiner Fette sollten das schnelle Eindringen zytotoxischer Referenzchemikalien wie z. B. SDS oder Triton X-100 verhindern. Dies ist anhand der Werte für IC₅₀ oder ET₅₀ abzuschätzen (Tabelle 3).

Morphologie

21. Bei der histologischen Untersuchung des RhE-Modells sollte nachgewiesen werden, dass das Modell eine der menschlichen Epidermis ähnliche Struktur (einschließlich mehrlagigem *stratum corneum*) aufweist.

Reproduzierbarkeit

22. Die Ergebnisse der Positivkontrolle und der Negativkontrollen der Prüfmethode sollen die Reproduzierbarkeit über längere Zeit belegen.

Qualitätskontrolle (QK)

23. Das RhE-Modell sollte nur dann verwendet werden, wenn der Entwickler/Hersteller nachweist, dass jede Charge des verwendeten Hautmodells bestimmten Freigabekriterien genügt, von denen die Kriterien der *Viabilität* (Nummer 19), der *Barrierefunktion* (Nummer 20) und der *Morphologie* (Nummer 21) die wichtigsten sind. Diese Daten sollten den Benutzern der Prüfmethode zur Verfügung gestellt werden, damit diese sie in ihre Prüfberichte aufnehmen können. Der Entwickler/Hersteller des Hautmodells (oder – bei

Verwendung eines hauseigenen Modells – der Prüfer) sollte eine Akzeptanzspanne (oberer und unterer Grenzwert) für IC₅₀ bzw. ET₅₀ festlegen. Nur mit geeigneten Geweben erzielte Ergebnisse können für eine zuverlässige Vorhersage für die Einstufung von Reizwirkungen akzeptiert werden. Die Akzeptanzspanne der vier RhE-Prüfmodelle dieser Prüfmethode sind Tabelle 3 zu entnehmen.

Tabelle 3: Beispiele für Chargenfreigabekriterien der Prüfmodelle dieser Prüfmethode im Rahmen der Qualitätskontrolle

	Untere Akzeptanzgrenze	Obere Akzeptanzgrenze
EpiSkin™ (SM) (18-stündige Behandlung mit 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 h	ET ₅₀ = 8,7 h
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (34)	ET ₅₀ = 4,0 h	ET ₅₀ = 10,0 h
LabCyte EPI-MODEL24 SIT (18-stündige Behandlung mit SDS) (35)	IC ₅₀ = 1,4 mg/ml	IC ₅₀ = 4,0 mg/ml

Applikation der Prüf- und Kontrollchemikalien

24. Für jede Prüfchemikalie und für die Kontrollen bei jedem Prüflauf sollten mindestens drei Replikate verwendet werden. Bei flüssigen und festen Chemikalien sollte eine ausreichende Menge der Prüfchemikalie gleichmäßig auf die gesamte Oberfläche der Epidermis aufgetragen werden; überschüssige Dosen sind zu vermeiden, d. h. es sollten 26 bis 83 µl/cm² bzw. mg/cm² verwendet werden (siehe Anlage 3). Bei festen Chemikalien sollte die Epidermis-Oberfläche vor der Applikation mit deionisiertem oder destilliertem Wasser angefeuchtet werden, um guten Hautkontakt zu gewährleisten. Feststoffe sollten nach Möglichkeit als Feinpulver geprüft werden. In manchen Fällen kann ein Nylon-Maschenfilter zum gleichmäßigen Verteilen verwendet werden (siehe Anlage 3). Am Ende der Expositionszeit sollte die Prüfchemikalie mit wässriger Pufferlösung oder 0,9 % NaCl von der Hautoberfläche abgewaschen werden. Je nach verwendeten RhE-Prüfmodellen betragen die Expositionszeiträume zwischen 15 und 60 Minuten bei einer Inkubationstemperatur zwischen 20 und 37 °C. Diese Expositionszeiträume und -temperaturen wurden für die jeweiligen RhE-Prüfmethoden optimiert und tragen den unterschiedlichen inhärenten Merkmalen der Prüfmodelle (z. B. der Barrierefunktion) Rechnung (siehe Anlage 3).
25. Bei jedem Prüflauf sollten gleichzeitig Negativkontrollen und Positivkontrollen (PK) verwendet werden, um nachweisen zu können, dass die Viabilität (mit der NK), die Barrierefunktion und die daraus resultierende Empfindlichkeit der Gewebe (mit der PK) innerhalb einer vorgegebenen historischen Akzeptanzspanne liegen. Als PK-Chemikalie

wird 5%iges wässriges SDS empfohlen. Als NK empfehlen sich Wasser oder Phosphatpuffer (PBS).

Zellviabilitätsmessungen

26. Bei dem Prüfverfahren ist von wesentlicher Bedeutung, dass die Viabilitätsmessung nicht unmittelbar nach der Exposition gegenüber der Prüfchemikalie, sondern nach einer ausreichend langen Inkubationszeit des gewaschenen Gewebes (nach der Behandlung) in einem frischen Medium erfolgt. Während dieser Zeit kann sich das Gewebe von milden zytotoxischen Wirkungen erholen bzw. deutliche zytotoxische Effekte können sich herausbilden. Bei der Optimierung von zwei der RhE-Prüfmodelle dieser Prüfmethode hat sich eine 42-stündige Inkubation nach der Behandlung als optimal erwiesen (11) (12) (13) (14) (15).
27. Die MTT-Prüfung ist eine standardisierte quantitative Methode, die zur Messung der Zellviabilität nach dieser Prüfmethode angewandt werden sollte. Sie ist zur Anwendung in einem dreidimensionalen Gewebemodell geeignet. Die Gewebeprobe wird für 3 Stunden in eine MTT-Lösung mit geeigneter Konzentration (z. B. 0,3-1 mg/ml) gelegt. Das MTT wird von den lebensfähigen Zellen in blaues Formazan umgewandelt. Der blaue Formazan-Niederschlag wird sodann mit Hilfe eines Lösungsmittels (z. B. Isopropanol, Säure-Isopropanol) aus dem Gewebe extrahiert, und die Formazankonzentration wird durch Bestimmung des OD-Werts bei 570 nm innerhalb einer Filter-Bandbreite von maximal ± 30 nm oder mit einem HPLC/UPLC-Spektrophotometrieverfahren gemessen (Nummer 34) (36).
28. Optische Eigenschaften der Prüfchemikalie oder ihre chemische Wirkung auf MTT (z. B. die Tatsache, dass Chemikalien Färbungen nicht nur bewirken, sondern auch verhindern oder umkehren können) können die Versuche beeinträchtigen und damit zu falschen Viabilitätsschätzungen führen. Dies kann der Fall sein, wenn eine bestimmte Prüfchemikalie nicht komplett von dem Gewebe abgewaschen wurde oder wenn sie in die Epidermis eindringt. Wirkt sich die Prüfchemikalie unmittelbar auf MTT aus (MTT-Reduktionsmittel), ist sie natürlich gefärbt oder verfärbt sie sich während der Gewebebehandlung, so sollten zum Nachweis und zur Korrektur einer etwaigen Interferenz der Prüfchemikalie mit der Viabilitätsmesstechnik zusätzliche Kontrollen verwendet werden (Nummern 29 und 33). Für eine genaue Beschreibung der richtigen Durchführung der Korrektur der direkten MTT-Reduktion und der Interferenzen durch Färbemittel siehe die Standardarbeitsanweisungen für die vier validierten Prüfmodelle dieser Prüfmethode (32) (33) (34) (35).
29. Um direkte MTT-Reduktionsmittel zu identifizieren, sollten die Prüfchemikalien jeweils zu frisch hergestellter MTT-Lösung hinzugegeben werden. Wenn sich das MTT-Gemisch mit der Prüfchemikalie blau/violett verfärbt, ist davon auszugehen, dass die Prüfchemikalie das MTT direkt reduziert; anschließend sollte unabhängig von der Durchführung der Standardabsorptions-(OD-)Messung oder einer HPLC/UPLC-Spektrophotometrie eine

weitere Funktionsprüfung der nicht lebensfähigen RhE-Gewebe vorgenommen werden. Bei dieser zusätzlichen Funktionsprüfung werden abgetötete Gewebe mit nur noch residualer metabolischer Aktivität eingesetzt, die die Prüfchemikalie in ähnlicher Weise wie lebensfähige Gewebe absorbieren. Jede MTT reduzierende Prüfchemikalie wird auf mindestens zwei abgetötete Gewebereplikate aufgetragen, die dem gesamten Prüfverfahren unterzogen werden, um eine nicht spezifische MTT-Reduktion (NSMTT) zu bewirken (32) (33) (34) (35). Pro Prüfchemikalie ist unabhängig von der Anzahl der durchgeführten unabhängigen Prüfungen/Prüfläufe eine einzelne NSMTT-Kontrolle ausreichend. Anschließend wird die tatsächliche Viabilität des Gewebes als Prozentanteil der bei lebenden Geweben nach Exposition gegenüber dem MTT-Reduktionsmittel gemessenen Viabilität abzüglich des Prozentanteils der nicht spezifischen MTT-Reduktion durch dasselbe MTT-Reduktionsmittel bei abgetöteten Geweben bezogen auf die gleichzeitig mit der zu korrigierenden Prüfung durchgeführte Negativkontrolle (%NSMTT) berechnet.

30. Um potenzielle Interferenzen durch Prüffarbstoffe oder durch Prüfchemikalien zu ermitteln, die sich verfärben, wenn sie mit Wasser oder mit Isopropanol in Berührung kommen, und um über die Notwendigkeit weiterer Kontrollen entscheiden zu können, sollte die Prüfchemikalie in Wasser (Umgebung während der Exposition) und/oder Isopropanol (Extraktionslösung) einer Spektralanalyse unterzogen werden. Wenn die Prüfchemikalie in Wasser und/oder Isopropanol Licht im Bereich von 570 ± 30 nm absorbiert, sollten weitere Farbkontrollen durchgeführt oder eine HPLC/UPLC-Spektrophotometrie vorgenommen werden. Im letztgenannten Fall sind diese Kontrollen nicht erforderlich (Nummern 33 und 34). Bei Durchführung der Standardabsorptions-(OD-)Messung wird jeder interferierende Prüffarbstoff auf mindestens zwei lebensfähige Gewebereplikate aufgetragen; diese Replikate werden dem vollständigen Prüfverfahren unterzogen, aber während der MTT-Inkubation nicht mit der MTT-Lösung, sondern mit einem Medium inkubiert, um eine nicht spezifische Farbkontrolle (NSC_{lebend}) herzustellen. Die NSC_{lebend} -Kontrolle muss gleichzeitig mit der Prüfung der gefärbten Prüfchemikalie durchgeführt werden, und bei mehreren Prüfungen ist wegen der inhärenten biologischen Variabilität lebender Gewebe für jede durchgeführte Prüfung (bei jedem Prüflauf) eine unabhängige NSC_{lebend} -Kontrolle durchzuführen. Die tatsächliche Viabilität des Gewebes wird dann als Prozentanteil der ermittelten Viabilität bei lebendem Gewebe nach der Exposition gegenüber der interferierenden Prüfchemikalie und nach Inkubation mit der MTT-Lösung abzüglich des Prozentanteils der nicht spezifischen Farbe berechnet, die bei gleichzeitig mit der zu korrigierenden Prüfung untersuchten lebenden Geweben nach Exposition gegenüber der interferierenden Prüfchemikalie und nach Inkubation mit einem Medium ohne MTT entstanden ist (% NSC_{lebend}).
31. Wenn festgestellt wurde, dass Prüfchemikalien sowohl eine direkte MTT-Reduktion (Nummer 29) als auch Farbinterferenzen (Nummer 30) bewirken, wird bei der Durchführung der Standardabsorptions-(OD-)Messung neben den in vorstehenden Nummern beschriebenen Kontrollen (NSMTT und NSC_{lebend}) eine dritte Kontrollreihe

benötigt. Dies ist gewöhnlich bei dunklen Prüfchemikalien der Fall, die beim MTT-Versuch Interferenzen verursachen (z. B. blau, violett oder schwarz), weil deren Fähigkeit zur direkten MTT-Reduktion durch die inhärente Farbqualität dieser Chemikalien beeinträchtigt wird (Nummer 29). Diese Prüfchemikalien können Bindungen sowohl mit lebenden als auch mit abgetöteten Geweben eingehen. Daher kann bei der NSMTT-Kontrolle eine Korrektur nicht nur der potentiellen direkten MTT-Reduktion durch die Prüfchemikalie, sondern auch der Farbinterferenz infolge der Bindung der Prüfchemikalie an abgetötete Gewebe erfolgen. Dies kann eine doppelte Korrektur der Farbinterferenz zur Folge haben, da mit der NSC_{lebend}-Kontrolle bereits die Farbinterferenz aufgrund der Bindung der Prüfchemikalie an lebende Gewebe erfolgt. Um eine mögliche doppelte Korrektur von Farbinterferenzen zu vermeiden, muss eine dritte Kontrolle mit nicht spezifischen Farben mit abgetöteten Geweben (NSC_{abgetötet}) untersucht werden. Bei dieser zusätzlichen Kontrolle wird die Prüfchemikalie auf mindestens zwei abgetötete Gewebereplikate aufgetragen, die dem vollständigen Prüfverfahren zu unterziehen sind, wobei die Gewebe jedoch während der MTT-Inkubation nicht mit der MTT-Lösung, sondern mit einem Medium inkubiert werden. Unabhängig von der Anzahl der durchgeführten unabhängigen Prüfungen/Prüfläufe ist pro Prüfchemikalie eine einzige NSC_{abgetötet}-Kontrolle hinreichend. Diese Kontrolle sollte jedoch gleichzeitig mit der NSMTT-Kontrolle sowie möglichst mit derselben Gewebecharge durchgeführt werden. Die tatsächliche Viabilität des Gewebes wird dann als Prozentanteil der ermittelten Viabilität bei lebendem Gewebe nach der Exposition gegenüber der Prüfchemikalie abzüglich %NSMTT und abzüglich %NSC_{lebend} zuzüglich des Prozentanteils der nicht spezifischen Farbe berechnet, die nach Exposition der abgetöteten Gewebe gegenüber der interferierenden Prüfchemikalie und nach Inkubation mit einem Medium ohne MTT entstanden ist; dieser Prozentanteil wird bezogen auf die gleichzeitig mit der zu korrigierenden Prüfung untersuchte Kontrolle (%NSC_{abgetötet}) ermittelt.

32. Wichtig ist die Feststellung, dass nicht spezifische MTT-Reduktionen und nicht spezifische Farbinterferenzen bei den Gewebextrakten Ergebnisse oberhalb der Linearitätsspanne des Photospektrometers begünstigen können. Daher sollte jedes Labor vor der Untersuchung von Prüfchemikalien für rechtliche Zwecke die Linearitätsspanne seines Spektrophotometers mit im Handel bezogenem MTT-Formazan (CAS-Nr. 57360-69-7) ermitteln. Durch die Standardabsorptions-(OD-)Messung mit einem Spektrophotometer können direkte MTT-Reduktionsmittel und Farbinterferenzen verursachende Prüfchemikalien in den Fällen untersucht werden, in denen die mit einer Prüfchemikalie ermittelten und nicht um die direkte MTT-Reduktion und/oder um Farbinterferenzen korrigierten ODs der Gewebextrakte innerhalb der Linearitätsspanne des Spektrophotometers liegen oder in denen der nicht korrigierte Prozentanteil der Viabilität der Prüfchemikalie bereits $\leq 50\%$ ist. Ergebnisse bei Prüfchemikalien mit %NSMTT und/oder %NSC_{lebend} $> 50\%$ der Negativkontrolle sind jedoch mit Sorgfalt

zu bewerten, da dies der Schwellenwert ist, nach dem zwischen klassifizierten und nicht klassifizierten Chemikalien unterschieden wird (Nummer 36).

33. Wenn die Ergebnisse von Prüffarbstoffen wegen übermäßiger Interferenzen beim MTT-Versuch mit der Standardabsorptions-(OD-)Messung nicht vereinbar sind, kann alternativ MTT-Formazan durch HPLC/UPLC-Spektrophotometrie gemessen werden (Nummer 34) (36). Bei der HPLC/UPLC-Spektrophotometrie kann das MTT-Formazan vor der Quantifizierung von der Prüfchemikalie getrennt werden (36). Daher werden unabhängig von der zu prüfenden Chemikalie keine NSC_{lebend}- oder NSC_{abgetötet}-Kontrollen benötigt, wenn eine HPLC/UPLC-Spektrophotometrie vorgenommen wird. NSMTT-Kontrollen sollten jedoch verwendet werden, wenn vermutet wird, dass eine Prüfchemikalie MTT direkt reduziert oder wenn die Farbe einer Prüfchemikalie die Beurteilung ihrer Fähigkeit zur direkten MTT-Reduktion beeinträchtigt (Nummer 29). Wenn MTT-Formazan durch HPLC/UPLC-Spektrophotometrie gemessen wird, ist der Prozentanteil der Viabilität des Gewebes als Prozentanteil der MTT-Formazan-Peak-Fläche, die mit lebenden Geweben nach Exposition gegenüber der Prüfchemikalie ermittelt wurde, bezogen auf die MTT-Formazan-Peak-Fläche der gleichzeitigen Negativkontrolle zu berechnen. Bei Prüfchemikalien, die MTT direkt reduzieren können, wird die tatsächliche Gewebeviabilität als Prozentanteil der Gewebeviabilität von lebenden Geweben nach der Exposition gegenüber der Prüfchemikalie abzüglich %NSMTT berechnet. Und schließlich ist festzustellen, dass auch direkte MTT-Reduktionsmittel (die nach der Behandlung in den Geweben gebunden sein und MTT so stark reduzieren können, dass es (bei Standard-OD-Messungen) zu ODs oder (bei der Untersuchung der Gewebeextrakte durch UPLC-/HPLC-Spektrophotometrie) zu Peakflächen außerhalb der Linearitätsspanne des Spektrophotometers und zu Farbbinterferenzen kommen kann) nicht bewertet werden können. Solche Fälle sind allerdings sehr selten.
34. MTT-Formazan-Messungen können bei allen Arten von Prüfchemikalien (gefärbt, nicht gefärbt, MTT-Reduktionsmittel und Mittel, die keine MTT-Reduktion bewirken) auch durch HPLC/UPLC-Spektrophotometrie vorgenommen werden (36). Wegen der Vielfalt der HPLC/UPLC-Spektrophotometriesysteme sollte die Eignung des jeweiligen HPLC/UPLC-Spektrophotometriesystems vor der Verwendung zur Quantifizierung von MTT-Formazan in Gewebextrakten durch Erfüllung der Akzeptanzkriterien für eine Reihe von Standard-Qualifikationsparametern auf der Grundlage der Branchenleitlinien der US-amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) für die Validierung bioanalytischer Methoden nachgewiesen werden (36)(37). Diese Schlüsselparmeter sowie die jeweiligen Akzeptanzkriterien sind Anlage 4 zu entnehmen. Wenn die in Anlage 4 beschriebenen Akzeptanzkriterien erfüllt sind, wird das betreffende HPLC/UPLC-Spektrophotometriesystem als geeignet für die Messung von MTT-Formazan unter den in dieser Prüfmethode beschriebenen Versuchsbedingungen betrachtet.

Akzeptanzkriterien

35. Bei jeder Prüfung mit validen Chargen des betreffenden RhE-Modells (siehe Absatz 23) sollten mit der Negativkontrolle behandelte Gewebe OD-Werte aufweisen, die die Gewebequalität nach abgeschlossenen Beförderungs- und Annahmevergängen und sämtlichen Schritten des Protokolls belegen. Die OD-Werte der Kontrollen sollten nicht unter historisch etablierten unteren Grenzwerten liegen. Ähnlich sollte auch nachgewiesen werden, dass mit der PK, d. h. mit 5%igem wässrigen SDS, behandelte Gewebe unter den Bedingungen der Prüfmethode (siehe Anlage 3 sowie die Standardarbeitsanweisungen für die vier Prüfmodelle dieser Prüfmethode (32) (33) (34) (35)) auf eine hautreizende Chemikalie reagieren können. Entsprechende und geeignete Maße der Variabilität zwischen Gewebereplikaten (d. h. Standardabweichungen (SD)) sollten innerhalb der für das verwendete Prüfmodell festgelegten Akzeptanzgrenzen liegen (siehe Anlage 3).

Auswertung der Ergebnisse und Prädiktionsmodell

36. Die für jede Prüfchemikalie erhaltenen OD-Werte können zur Berechnung einer prozentualen Zellviabilität im Vergleich zur Negativkontrolle, die auf 100 % festgesetzt ist, herangezogen werden. Wenn eine HPLC/UPLC-Spektrophotometrie durchgeführt wird, ist der Prozentanteil der Viabilität des Gewebes als Prozentanteil der MTT-Formazan-Peak-Fläche, die mit lebenden Geweben nach Exposition gegenüber der Prüfchemikalie ermittelt wurde, bezogen auf die MTT-Formazan-Peak-Fläche der gleichzeitigen Negativkontrolle zu berechnen. Der Grenzwert der prozentualen Zellviabilität, der zwischen Reizstoff und bisher nicht klassifizierten Prüfchemikalien unterscheidet, und das (die) statistische(n) Verfahren zur Auswertung der Ergebnisse und zur Identifizierung von Reizstoffen sollten genau definiert und dokumentiert werden und nachweislich geeignet sein (weitere Informationen siehe Standardarbeitsanweisungen zu den Prüfmodellen). Die Grenzwerte für die Vorhersage der Reizung sind nachstehend angegeben:

- Für die Prüfchemikalie ist festzustellen, dass eine Einstufung und Kennzeichnung nach dem UN GHS bzw. der CLP-Verordnung (Kategorie 2 oder Kategorie 1) erforderlich ist, wenn die prozentuale mittlere Gewebeviabilität nach der Exposition und der Inkubation nach der Behandlung kleiner oder gleich ($\leq$) 50 % ist. Da die RhE-Prüfmodelle dieser Prüfmethode nicht zwischen den UN-GHS-/CLP-Kategorien 1 und 2 unterscheiden können, werden weitere Informationen über Hautverätzungen benötigt, um über die endgültige Einstufung der Chemikalien zu entscheiden [siehe auch OECD-Leitliniendokument zu IATA (3)]. Wenn festgestellt wird, dass die Prüfchemikalie nicht ätzend ist (z. B. mit den Prüfmethoden 40, B.40bis oder B.65) und die Gewebeviabilität nach der Exposition und nach Inkubation nach der Behandlung kleiner oder gleich ($\leq$) 50 % ist, wird die Prüfchemikalie als hautreizend nach UN-GHS-/CLP-Kategorie 2 betrachtet.
- Je nach dem Rechtsrahmen der Mitgliedstaaten gilt die Prüfchemikalie als nicht hautreizend im Sinne der Kategorie Keine Einstufung nach UN GHS/CLP, wenn die

Gewebeviabilität nach der Exposition und der Inkubation nach der Behandlung mehr als (>) 50 % beträgt.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Daten

37. Für jeden Prüflauf sollten Daten aus einzelnen Replikatgeweben (z. B. OD-Werte und Daten über die berechnete prozentuale Zellviabilität für jede Prüfchemikalie, einschließlich Einstufung), gegebenenfalls auch Daten aus Wiederholungsversuchen, tabellarisch zusammengefasst werden. Darüber hinaus sollten für jeden Prüflauf die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung übermittelt werden. Außerdem sollten für jede geprüfte Chemikalie festgestellte Interaktionen mit dem MTT-Reagens und Prüffarbstoffen berichtet werden.

Prüfbericht

38. Der Prüfbericht sollte folgende Angaben enthalten:

Prüfchemikalien und Kontrollchemikalien

- Einkomponentiger Stoff: chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS-Bezeichnung, CAS-Nummer, SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel, Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.;
- mehrkomponentiger Stoff, UVCB und Gemische: So weit wie möglich charakterisiert durch die chemische Zusammensetzung (siehe oben), das quantitative Vorkommen und die relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften der einzelnen Komponenten;
- physikalisches Erscheinungsbild, Wasserlöslichkeit und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften;
- Herkunft, Chargennummer, sofern vorhanden;
- Behandlung der Prüf-/Kontrollchemikalien vor der Prüfung, sofern relevant (z. B. Erwärmen, Mahlen);
- Stabilität der Prüfchemikalie, letztes Verwendungsdatum oder Datum für erneute Analyse, soweit bekannt;
- Lagerungsbedingungen.

Verwendetes RhE-Modell und verwendetes Protokoll und Gründe für die Auswahl (wenn relevant)

Prüfbedingungen:

- Verwendetes RhE-Modell (einschließlich Chargennummer);

- Eichdaten für das zur Messung der Zellviabilität verwendete Messgerät (z. B. Spektrophotometer), Wellenlänge und Bandbreite (wenn relevant) für die Quantifizierung von MTT-Formazan und die Linearitätsspanne des Messgeräts; Beschreibung der Methode zur Quantifizierung von MTT-Formazan;
- Beschreibung der Qualifizierung des HPLC/UPLC-Spektrophotometriesystems (wenn relevant); umfassende Begleitdokumentation für das betreffende Hautmodell, einschließlich seiner Leistung. Diese sollte unter anderem die folgenden Aspekte beinhalten:
 - i) Viabilität;
 - ii) Barrierefunktion;
 - iii) Morphologie;
 - iv) Reproduzierbarkeit und Vorhersagbarkeit;
 - v) Qualitätskontrollen (QK) des Modells;
- Verweis auf historische Modelldaten. Dabei sollte unter anderem die Akzeptanz der QK-Daten unter Einbeziehung historischer Chargendaten berücksichtigt werden;
- Nachweis der Befähigung zur Durchführung der Prüfmethode vor der regelmäßigen Verwendung durch die Prüfung von Leistungstoffen.

Prüfverfahren:

- Details zum verwendeten Prüfverfahren (einschließlich verwendeter Waschverfahren nach dem Expositionszeitraum); Dosierung der Prüfchemikalien und der Kontrollen;
- Expositionszeitraum und -temperatur und Inkubationszeitraum nach der Exposition;
- Angabe verwendeter Kontrollen für direkte MTT-Reduktionsmittel und/oder Prüffarbstoffe (wenn relevant);
- Anzahl der pro Prüfchemikalie und pro Kontrolle (PK, Negativkontrolle und NSMTT, NSC_{lebend} und NSC_{abgetötet}, wenn relevant) und der verwendeten Gewebereplikate;
- Beschreibung der berücksichtigten Entscheidungskriterien und des verwendeten Vorhersagemodells auf der Grundlage des verwendeten RhE-Modells;
- Beschreibung etwaiger Änderungen der Prüfverfahren (einschließlich Waschverfahren).

Akzeptanzkriterien für Prüfläufe und Prüfungen:

- Mittelwerte und Akzeptanzspannen der Positiv- und der Negativkontrollen auf der Grundlage historischer Daten; akzeptable Variabilität zwischen Gewebereplikaten für Positiv- und Negativkontrollen;
- akzeptable Variabilität zwischen Gewebereplikaten für die Prüfchemikalie.

Ergebnisse:

- Tabellarische Darstellung der Daten für die einzelnen Prüfchemikalien, für die einzelnen Prüfläufe und Replikatmessungen einschließlich OD bzw. MTT-Formazan-Peakfläche, prozentuale Gewebeviabilität, mittlere prozentuale Gewebeviabilität und Standardabweichungen;
- gegebenenfalls Ergebnisse verwendeter Kontrollen für direkte MTT-Reduktionsmittel und/oder Prüffarbstoffe einschließlich OD oder MTT-Formazan-Peakflächen, %NSMTT, %NSC_{lebend}, %NSC_{abgetötet}, Standardabweichung und endgültige korrigierte prozentuale Gewebeviabilität;
- mit der Prüfchemikalie (den Prüfchemikalien) und den Kontrollen ermittelte Ergebnisse bezogen auf die definierten Akzeptanzkriterien für Prüfläufe und Prüfungen;
- Beschreibung anderer beobachteter Wirkungen;
- abgeleitete Einstufung mit Bezug auf das Vorhersagemodell und/oder angewandte Entscheidungskriterien.

Erörterung der Ergebnisse

Schlussfolgerungen

LITERATUR

- (1) Vereinte Nationen (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), fünfte überarbeitete Ausgabe, UN New York und Genf, 2013. Abrufbar unter: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.
- (2) EURL-ECVAM (2009). Erklärung zur “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”, herausgegeben vom Wissenschaftlich Beratenden Ausschuss (ESAC) des ECVAM (ESAC31), 9. April 2009. Abrufbar unter: 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (4) Kapitel B.4 dieses Anhangs, Akute Hautreizung/-verätzung.
- (5) Kapitel B.40 dieses Anhangs, *In-vitro*-Hautverätzung: TER-Prüfmethode.
- (6) Kapitel B.40bis dieses Anhangs, *In-vitro*-Hautverätzung: Prüfmethode mit rekonstruierter humaner Epidermis (RHE).
- (7) Kapitel B.65 dieses Anhangs, *In-vitro*-Methode zur Untersuchung der Membranbarriere.
- (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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, 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. und 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. und 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. und 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. und 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. und 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. und 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. und 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. und 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. und 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. Abrufbar unter: 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. *Hinweis: Dies sind die ursprünglichen Leistungsstandards für die Validierung von zwei Prüfmethoden. Diese Leistungsstandards sollten nicht mehr verwendet werden, da inzwischen eine aktualisierte Fassung (8) verfügbar ist.*
- (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. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 137), Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (24) Katoh, M., Hamajima, F., Ogasawara, T. und 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. und 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, 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. und 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. und 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., u. a. (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™ (Februar 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™ (geändert im März 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. und 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 in Vorbereitung.
- (37) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Mai 2001. Abrufbar unter: [<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>].
- (38) Harvell, J.D., Lamminstausta, K. und Maibach, H.I. (1995). Irritant Contact Dermatitis, in: Practical Contact Dermatitis, S. 7-18 (Hrsg. Guin, J. D.). Mc Graw-Hill, New York.

- (39) EURL-ECVAM (2009). Performance Standards for in vitro skin irritation test methods based on Reconstructed human Epidermis (RhE). *Hinweis: Dies ist die aktuelle Fassung der ECVAM-Leistungsstandards, aktualisiert im Jahr 2009 angesichts der Einführung des UN GHS. Diese Leistungsstandards sollten nicht mehr verwendet werden, da inzwischen eine aktualisierte Fassung (8) verfügbar ist.*
- (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. Juli 2009.
- (41) EG (2001). Richtlinie 2001/59/EG der Kommission vom 6. August 2001 zur 28. Anpassung der Richtlinie 67/548/EWG des Rates zur Angleichung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften der Mitgliedstaaten für die Einstufung, Verpackung und Kennzeichnung gefährlicher Stoffe an den technischen Fortschritt, Amtsblatt der Europäischen Union L 255, S. 1.

Anlage 1

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

Chemikalie: Ein Stoff oder ein Gemisch.

Einkomponentiger Stoff: Ein nach seiner quantitativen Zusammensetzung definierter Stoff, bei dem mehr als ein Hauptbestandteil in einer Konzentration von mindestens 80 % w/w vorliegt.

Ersatzprüfung: Eine Prüfung, die eine routinemäßig angewandte Prüfung zur Identifikation von Gefahren und/oder zur Risikobewertung ersetzen soll, und die im Vergleich zur akzeptierten Prüfung nachweislich in allen möglichen Prüfsituationen und mit allen Stoffen einen gleichwertigen oder besseren Schutz der Gesundheit von Mensch oder Tier oder der Umwelt gewährleistet, je nachdem, was zutrifft (9).

ET₅₀: Kann durch Ermittlung der Expositionszeit abgeschätzt werden, die erforderlich ist, um die Zellviabilität bei Anwendung der Referenzchemikalie in vorgegebener fester Konzentration um 50% zu reduzieren; siehe auch IC₅₀.

Gemisch: Ein Gemisch oder eine Lösung, die aus zwei oder mehr Stoffen besteht.

Genauigkeit: Anteil aller positiven/aktiven Chemikalien, die durch die Prüfmethode korrekt klassifiziert werden. Die Genauigkeit ist ein Maß der Leistung der Prüfmethode und ein Aspekt der Relevanz. Der Begriff wird oft im Sinne von ‚Übereinstimmung‘ verwendet und bezeichnet den Anteil der korrekten Ergebnisse einer Prüfmethode (9).

GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals = Global harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung) der Vereinten Nationen (UN): Ein System zur Klassifizierung von Chemikalien (Stoffen und Gemischen) nach standardisierten Typen und Stufen physikalischer, gesundheitlicher und ökologischer Gefahren und zur entsprechenden Kennzeichnung durch Piktogramme, Signalwörter, Gefahrenhinweise, Sicherheitshinweise und Sicherheitsdatenbögen, um zum Schutz des Menschen (einschließlich Arbeitgeber, Arbeiter, Spediteure, Verbraucher und Notfall-Einsatzkräfte) und der Umwelt Informationen über die schädlichen Wirkungen der betreffenden Chemikalien zu verbreiten (1).

Hautreizung *in vivo*: Das Auslösen einer reversiblen Hautschädigung nach Applikation einer Prüfchemikalie für die Dauer von bis zu 4 Stunden. Eine Hautreizung ist eine lokal auftretende Reaktion des betroffenen Hautgewebes, die kurz nach der Stimulation eintritt (38). Sie wird durch eine lokale Entzündungsreaktion unter Beteiligung des angeborenen (nicht spezifischen) Immunsystems des Hautgewebes verursacht. Ihr Hauptmerkmal ist ihr umkehrbarer Prozess, der mit Entzündungsreaktionen und den bei Entzündungen gängigsten klinischen Reizsymptomen (Erythema, Ödeme, Juckreiz und Schmerzen) einhergeht.

HPLC: Hochleistungs-Flüssigkeitschromatografie.

IATA: Integrated Approach to Testing and Assessment = integrierter Prüfungs- und Bewertungsansatz.

IC₅₀: Kann durch Ermittlung der Konzentration abgeschätzt werden, bei der eine Referenzchemikalie die Viabilität der Gewebe nach einer vorgegebenen Expositionszeit um 50 % (IC₅₀) reduziert; siehe auch ET₅₀.

Leistungsstandards (PS): Auf einer validierten Prüfmethode beruhende Normen, auf deren Grundlage die Vergleichbarkeit einer vorgeschlagenen, mechanistisch und funktionell ähnlichen Prüfmethode bewertet werden kann. Sie umfassen (i) wesentliche Elemente der Prüfmethode; (ii) ein Mindestverzeichnis von Referenzchemikalien, ausgewählt aus den Chemikalien, die zum Nachweis der akzeptablen Leistung der validierten Referenzmethode verwendet werden; und (iii) je nach den für die validierte Referenzmethode erzielten Ergebnissen die vergleichbaren Genauigkeits- und Zuverlässigkeitswerte, die die vorgeschlagene Prüfmethode bei der Bewertung anhand des Mindestverzeichnisses von Referenzchemikalien demonstrieren sollte (9).

Mehrkomponentiger Stoff: Ein nach seiner quantitativen Zusammensetzung definierter Stoff, bei dem mehr als ein Hauptbestandteil in einer Konzentration von mindestens $\geq 10\%$ w/w und $< 80\%$ w/w vorliegt. Ein mehrkomponentiger Stoff ist das Ergebnis eines Herstellungsprozesses. Der Unterschied zwischen einem Gemisch und einem mehrkomponentigen Stoff besteht darin, dass ein Gemisch durch die Mischung von zwei oder mehr Stoffen ohne chemische Reaktion entsteht. Ein mehrkomponentiger Stoff wird durch eine chemische Reaktion gebildet.

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid; Thiazolyl-Blau-Tetrazoliumbromid.

NSC: Nicht spezifische Farbkontrolle mit lebenden Geweben.

NSC_{abgetötet}: Nicht spezifische Farbkontrolle mit abgetöteten Geweben.

NSMTT: Nicht spezifische MTT-Reduktion.

PK: Positivkontrolle, ein Replikat, das alle Komponenten eines Prüfsystems enthält und mit einer Chemikalie behandelt wird, die bekanntermaßen eine positive Reaktion hervorruft. Um sicherzustellen, dass Abweichungen bei der Positivkontrollreaktion im Zeitverlauf bewertet werden können, sollte die Reaktion nicht zu heftig sein.

Prüfchemikalie: Stoff oder Gemisch, der/das mit dieser Prüfmethode untersucht wird.

Prüflauf: Ein Prüflauf besteht aus einer oder mehreren Prüfchemikalien, die gleichzeitig mit einer Negativ- und einer Positivkontrolle geprüft werden.

Relevanz: Dieser Begriff bezieht sich auf das Verhältnis zwischen der Prüfmethode und der betreffenden Wirkung und auf die Frage, ob er aussagekräftig und nützlich für einen bestimmten Zweck ist. Er beschreibt das Ausmaß, in dem die Prüfung die untersuchte biologische Wirkung korrekt misst oder vorhersagt. Die Relevanz schließt eine Beurteilung

der Genauigkeit (Übereinstimmung) einer Prüfmethode ein (9).

Sensitivität: Der Anteil aller positiven/wirkenden Prüfchemikalien, die durch die Prüfung korrekt eingestuft werden. Die Sensitivität ist ein Maß der Genauigkeit einer Prüfmethode mit kategorialen Ergebnissen und ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung ihrer Relevanz (9).

Spezifität: Der Anteil aller negativen/wirkungslosen Prüfchemikalien, die durch die Prüfung korrekt eingestuft werden. Die Spezifität ist ein Maß der Genauigkeit einer Prüfmethode mit kategorialen Ergebnissen und ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung ihrer Relevanz (9).

Stoff: Ein chemisches Element und seine Verbindungen in natürlicher Form oder gewonnen durch ein Herstellungsverfahren, einschließlich der zur Wahrung seiner Stabilität notwendigen Zusatzstoffe und der durch das angewandte Verfahren bedingten Verunreinigungen, aber mit Ausnahme von Lösungsmitteln, die von dem Stoff ohne Beeinträchtigung seiner Stabilität und ohne Änderung seiner Zusammensetzung abgetrennt werden können.

Übereinstimmung: Die Übereinstimmung ist ein Maß der Leistung für Prüfmodelle mit kategorialen Ergebnissen und ein Aspekt der Relevanz. Der Begriff wird gelegentlich gleichbedeutend mit Genauigkeit verwendet und als Anteil aller geprüften Chemikalien definiert, die korrekt als positiv oder negativ eingestuft werden. Die Übereinstimmung hängt in hohem Maße von der Prävalenz positiver Ergebnisse bei den Typen der untersuchten Prüfchemikalien ab (9).

Überschüssige Dosis: Die Menge der auf die Haut aufgetragenen Prüfchemikalie, die über die zur vollständigen und gleichmäßigen Bedeckung der Hautoberfläche erforderliche Menge hinausgeht.

UPLC: Ultra-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatografie.

UVCB: Stoffe mit unbekannter oder schwankender Zusammensetzung, komplexe Reaktionsprodukte oder biologische Materialien.

Zellviabilität: Parameter zur Messung der Gesamtaktivität einer Zellpopulation, z. B. Fähigkeit zellulärer mitochondrialer Dehydrogenasen, den Vitalfarbstoff MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid, Thiazolyl-Blau) zu reduzieren, der je nach gemessenem Endpunkt und angewandtem Prüfkonzept der Gesamtzahl und/oder der Vitalität lebender Zellen entspricht.

Zuverlässigkeit: Beschreibung der Beziehung zwischen der Prüfung und der untersuchten Wirkung und ob die Prüfung aussagekräftig und nützlich für einen bestimmten Zweck ist. Sie wird durch Berechnung der Intra- und Interlabor-Reproduzierbarkeit bewertet (9).

Anlage 2

PRÜFMODELLE DIESER PRÜFMETHODE

Nr.	Prüfmodell	Art der Validierungsstudie	Literatur
1	EpiSkin™	Umfassende prospektive Validierungsstudie (2003-2007). Die Elemente dieses Modells wurden zur Beschreibung der wesentlichen Elemente der Prüfmethode der ursprünglichen und der aktualisierten ECVAM-Leistungsstandards verwendet (39) (40) (21)*. Außerdem bildeten die Daten der Methode in Bezug auf die Unterscheidung zwischen nicht klassifizierten und klassifizierten Stoffen die wesentliche Grundlage für die Beschreibung der Spezifizitäts- und Sensitivitätswerte der ursprünglichen Leistungsstandards*.	(2) (10) (11) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (23) (32) (39) (40)
2	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	EpiDerm™ (<i>ursprünglich</i>): Ursprünglich wurde das Prüfmodell in den Jahren 2003-2007 gemeinsam mit Nr. 1 einer umfassenden prospektiven Validierung unterzogen. Die Elemente dieses Modells wurden zur Beschreibung der wesentlichen Elemente der Prüfmethoden der ursprünglichen und der aktualisierten ECVAM-Leistungsstandards verwendet (39) (40) (21)*. EpiDerm™ SIT (EPI-200) : Eine modifizierte Form des ursprünglichen Modells EpiDerm™ wurde im Jahr 2008 unter Verwendung der ursprünglichen ECVAM-Leistungsstandards validiert (21)*	(2) ((10) (12) (13) (15) (16) (17) (18) (20) (21) (23) (33) (39) (40) (2) (21) (22) (23) (33)
3	SkinEthic™ RHE	Validierungsstudie auf der Grundlage der ursprünglichen ECVAM-Leistungsstandards (21) im Jahr 2008*.	(2) (21) (22) (23) (31)
4	LabCyte EPI-MODEL24 SIT	Validierungsstudie (2011-2012) basierend auf den Leistungsstandards (PS) der OECD TG 439 (8), die wiederum auf den aktualisierten ECVAM-PS* (39) (40) beruhen.	(24) (25) (26) (27) (28) (35) (39) (40) und PS dieser Prüfrichtlinie (8)*

*) Die ursprünglichen Leistungsstandards (PS) des ECVAM (21) wurden im Jahr 2007 nach Abschluss der prospektiven Validierungsstudie (16) entwickelt, in der die Leistung der Prüfmodelle Nr. 1 und 2 im Hinblick auf das Klassifizierungssystem bewertet wurden, wie in der 28. Änderung der Gefahrsstoffrichtlinie (41) beschrieben. Im Jahr 2008 wurden das UN GHS (1) eingeführt und die CLP-Verordnung der EU angenommen; damit wurde der *In-vivo*-Schwellenwert für die Unterscheidung zwischen klassifizierten und nicht klassifizierten Stoffen von 2,0 auf 2,3 angehoben. Zur Anpassung an diese geänderte rechtliche Anforderung wurden im Jahr 2009 die Genauigkeitswerte und die Liste der Referenzchemikalien aktualisiert (2) (39) (40). Ebenso wie die ursprünglichen PS beruhen auch die aktualisierten PS weitgehend auf Daten aufgrund der Modelle Nr. 1 und 2 (16). Außerdem wurden jedoch Daten zu Referenzchemikalien aus Modell Nr. 3 verwendet. Im Jahr 2010 wurden die aktualisierten ECVAM-PS als Grundlage für die Festlegung der PS für diese Prüfrichtlinie angenommen (8). Für die Zwecke dieser Prüfmethode wird EpiSkin™ als VRM betrachtet,

da alle Kriterien des PS ausgehend von diesem Modell entwickelt wurden. Detaillierte Informationen über die Validierungsstudien sowie eine Zusammenstellung der generierten Daten und Hintergrundinformationen zu den erforderlichen Anpassungen der PS infolge der Einführung des UN GHS bzw. der Annahme der CLP-Verordnung sind dem erläuternden Hintergrunddokument des ECVAM/BfR zur entsprechenden OECD TG 439 zu entnehmen (23).

SIT: Prüfung auf Hautreizung

RHE: Rekonstruierte humane Epidermis

Anlage 3

SPEZIFISCHE PROTOKOLLPARAMETER DER EINZELNEN PRÜFMODELLE DIESER PRÜFMETHODE

Für die RhE-Modelle gelten sehr ähnliche Protokolle, und bei allen RhE-Modellen beträgt die Inkubationszeit nach der Behandlung 42 Stunden (32) (33) (34) (35). Die Variationen betreffen in erster Linie drei Parameter im Zusammenhang mit den verschiedenen Barrierefunktionen der Prüfmodelle: A) Vorinkubationszeit und Menge, B) Auftragung von Prüfchemikalien und C) Volumen nach der Inkubation.

	EpiSkin™ (SM)	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	SkinEthic RHE™	LabCyte EPI-MODEL24 SIT
A) Vor der Inkubation				
Inkubationszeit	18-24 Stunden	18-24 Stunden	< 2 Stunden	15-30 Stunden
Volumen des Mediums	2 ml	0,9 ml	0,3 oder 1 ml	0,5 ml
B) Auftragung der Prüfchemikalie				
Für flüssige Stoffe	10 µl (26 µl/cm ²)	30 µl oder 47 µl/cm ²)	16 µl oder 32 µl/cm ²)	25 µl oder 83 µl/cm ²)
Für feste Stoffe	10 mg (26 mg/cm ²) + DW (5 µl)	25 mg (39 mg/cm ²) + DPBS (25 µl)	16 mg (32 mg/cm ²) + DW (10 µl)	25 mg (83 mg/cm ²) + DW (25 µl)
Verwendung eines Nylon-Maschenfilters	Nicht verwendet	Wenn erforderlich	Aufgebracht	Nicht verwendet
Gesamtdauer der Aufbringung	15 Minuten	60 Minuten	42 Minuten	15 Minuten
Aufbringungs-temperatur	Raumtemperatur (RT)	a) 25 min bei RT b) 35 min bei 37 °C	Raumtemperatur (RT)	RT
C) Volumen nach der Inkubation				
Volumen des Mediums	2 ml	0,9 ml x 2	2 ml	1 ml
D) Maximale Akzeptanzvariabilität				
Standard-abweichung (SD) zwischen Gewebe-replikaten	SD18	SD18	SD18	SD18

RT Raumtemperatur

DW: destilliertes Wasser

DPBS: Dulbecco-Phosphatpuffer

Anlage 4

SCHLÜSSELPARAMETER UND AKZEPTANZKRITERIEN FÜR DIE QUALIFIZIERUNG EINES HPLC/UPLC-SPEKTROPHOTOMETRIESYSTEMS ZUR MESSUNG VON AUS RHE-GEWEBEN EXTRAHIERTEM MTT-FORMAZAN

Parameter	Protokoll abgeleitet aus FDA-Leitlinie (36) (37)	Akzeptanzkriterien
Selektivität	Analyse von Isopropanol, Blindprobe lebend (Isopropanol-Extrakt aus lebenden RhE-Geweben ohne Behandlung), Blindprobe abgetötet (Isopropanol-Extrakt aus abgetöteten RhE-Geweben ohne Behandlung)	$\text{Fläche}_{\text{Interferenz}} \leq 20 \% \text{ Fläche}_{\text{LLOQ}}^1$
Präzision	Qualitätskontrollen (d. h. MTT-Formazan bei 1,6 µg/ml, 16 µg/ml und 160 µg/ml) in Isopropanol (n=5)	$\text{VK} \leq 15 \% \text{ bzw. } \leq 20 \% \text{ für LLOQ}$
Genauigkeit	Qualitätskontrollen bei Isopropanol (n=5)	$\% \text{ Abw. } \leq 15 \% \text{ bzw. } \leq 20 \% \text{ für LLOQ}$
Matrixeffekt	Qualitätskontrollen bei Blindprobe lebend (n=5)	$85 \% \leq \text{Matrixeffekt } \% \leq 115 \%$
Übertragung	Analyse Isopropanol nach einem ULOQ ² -Standard	$\text{Fläche}_{\text{Interferenz}} \leq 20 \% \text{ Fläche}_{\text{LLOQ}}$
Reproduzierbarkeit (innerhalb eines Tages)	3 unabhängige Eichkurven (aufgrund von 6 aufeinander folgenden Verdünnungen von MTT-Formazan in Isopropanol im Verhältnis 1:3 beginnend mit der ULOQ, d. h. 200 µg/ml); Qualitätskontrollen bei Isopropanol (n=5)	Eichkurven: $\% \text{ Abw. } \leq 15 \% \text{ bzw. } \leq 20 \% \text{ für LLOQ}$
Reproduzierbarkeit (innerhalb eines Tages)	Tag 1: 1 Eichkurve und Qualitätskontrollen in Isopropanol (n=3) Tag 2: 1 Eichkurve und Qualitätskontrollen in Isopropanol (n=3) Tag 3: 1 Eichkurve und Qualitätskontrollen in Isopropanol (n=3)	Qualitätskontrollen: $\% \text{ Abw. } \leq 15 \% \text{ und VK } \leq 15 \%$
Kurzzeitstabilität von MTT-Formazan in RhE-Gewebeextrakt	Qualitätskontrollen in Blindproben lebend (n=3), die am Tag der Vorbereitung sowie nach 24-stündiger Lagerung bei Raumtemperatur analysiert wurden.	$\% \text{ Abw. } \leq 15 \%$
Langzeitstabilität von MTT-Formazan in RhE-Gewebeextrakt (erforderlichenfalls)	Qualitätskontrollen in Blindproben lebend (n=3), die am Tag der Vorbereitung sowie nach mehrtägiger Lagerung bei einer spezifizierten Temperatur (z. B. 4 °C, -20 °C, -80 °C) analysiert wurden.	$\% \text{ Abw. } \leq 15 \%$

¹LLOQ: Untere Quantifizierungsgrenze, definiert als Gewebeviabilität von 1-2 %, d. h. 0,8 µg/ml.

²ULOQ: Obere Quantifizierungsgrenze, definiert als mindestens zweimal so hoch wie die erwartete MTT-Formazan-Konzentration in Isopropanol-Extrakten aus Negativkontrollen, d. h. 200 µg/ml.“

(8) In Teil B werden die folgenden Kapitel angefügt:

„B.63 SCREENING-PRÜFUNG ZUR BEWERTUNG DER REPRODUKTIONS- /ENTWICKLUNGSTOXIZITÄT

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 421 (2016). Die OECD-Richtlinien für die Prüfung von Chemikalien werden regelmäßig unter Berücksichtigung des wissenschaftlichen Fortschritts überarbeitet. Die ursprüngliche Screening-Prüfrichtlinie 421 wurde im Jahr 1995 angenommen. Sie beruhte auf einem Protokoll für einen Vorversuch zur Bewertung der Reproduktionstoxizität, der in zwei Expertensitzungen im Jahr 1990 in London (1) und im Jahr 1992 in Tokio (2) erörtert wurde.
2. Diese Prüfmethode wurde als Folgemaßnahme der 1998 bei der OECD eingeleiteten prioritären Maßnahme zur Änderung bestehender Prüfrichtlinien und zur Entwicklung neuer Prüfrichtlinien für das Screening und die Prüfung potenzieller endokriner Disruptoren unter Festlegung von für einen endokrinen Disruptor relevanten Endpunkten aktualisiert (3). OECD TG 407 (28-Tage-Toxizitätsstudie mit wiederholter oraler Verabreichung an Nagern, Kapitel B.7 dieses Anhangs) beispielsweise wurde 2008 um geeignete Parameter zum Nachweis einer endokrinen Wirkung von Prüfchemikalien aktualisiert. Ziel der Aktualisierung von TG 421 war die Einbeziehung einiger für endokrine Disruptoren relevanter Endpunkte in Screening-TGs, bei denen die Expositionszeiträume einige der empfindlichsten Entwicklungszeiträume (Zeiträume vor oder kurz nach der Geburt) beinhalten.
3. Die ausgewählten für endokrine Disruptoren relevanten zusätzlichen Endpunkte, die Bestandteil auch von TG 443 (Erweiterte Eingenerationen-Prüfung auf Reproduktionstoxizität, Kapitel B.56 dieses Anhangs) sind, wurden auf der Grundlage einer Machbarkeitsstudie zur Untersuchung wissenschaftlicher und technischer Fragen im Zusammenhang mit deren Berücksichtigung sowie mit möglichen Anpassungen des für deren Einbeziehung erforderlichen Prüfprotokolls in TG 421 aufgenommen (4).
4. Mit dieser Prüfmethode sollen begrenzte Informationen über die Wirkungen einer Prüfchemikalie auf die Reproduktionsleistung männlicher und weiblicher Tiere (Funktion der Keimdrüsen, Paarungsverhalten, Empfängnis, Entwicklung des Conceptus, Geburt usw.) ermittelt werden. Sie ist nicht als alternative Prüfmethode und auch nicht als Ersatz für die bereits existierenden Prüfmethoden B.31, B.34, B.35 und B.56 zu betrachten.

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN

5. Diese Screening-Prüfmethode kann verwendet werden, um erste Informationen über mögliche reproduktions- und/oder entwicklungsrelevante Auswirkungen entweder bereits früh bei der Bewertung toxikologischer Eigenschaften von Chemikalien oder bei Besorgnis erregenden Chemikalien zu erhalten. Außerdem kann sie als Teil einer Reihe von Vorversuchen für existierende Chemikalien verwendet werden, für die nur wenig oder keinerlei toxikologische Informationen verfügbar sind, oder beispielsweise als Dosisfindungsstudie im Zusammenhang mit umfassenderen Reproduktions-/Entwicklungsstudien dienen. Bei der Prüfung sollten die im ‚OECD Guidance Document no 19 on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation‘ (5) genannten Grundsätze und Erwägungen beachtet werden.
6. Diese Prüfmethode liefert keine umfassenden Informationen über sämtliche Reproduktions- und Entwicklungsaspekte. Insbesondere bietet sie nur beschränkte Möglichkeiten zur Erkennung postnataler Ausprägungen einer pränatalen Exposition oder zur Feststellung von Wirkungen, die bei postnataler Exposition induziert werden können. Aufgrund (unter anderem) der verhältnismäßig geringen Anzahl an Versuchstieren in den Dosisgruppen sowie der Selektivität der Endpunkte und der kurzen Dauer der Studie werden mit dieser Methode keine Nachweise dafür erlangt, dass keine Wirkungen eintreten. Wenn keine Daten aus anderen Prüfungen zur Bewertung der Reproduktions-/Entwicklungstoxizität vorliegen, sind positive Ergebnisse zudem hilfreich für eine erste Gefährdungsabschätzung und können in Entscheidungen über die Notwendigkeit und die zeitliche Gestaltung weiterer Prüfungen beitragen.
7. Die Ergebnisse in Bezug auf die endokrinen Parameter sind im Kontext des ‚OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals‘ (6) auszuwerten. Dieser Conceptual Framework enthält die verbesserte OECD TG 421 in Niveau 4 als *In-vivo*-Prüfung zur Erlangung von Daten über negative Wirkungen auf endokrin relevante Endpunkte. Ein endokrin relevantes Signal kann jedoch nicht an sich als hinreichender Beleg dafür betrachtet werden, dass die betreffende Prüfchemikalie als endokriner Disruptor wirkt.
8. Bei dieser Prüfmethode wird angenommen, dass die Prüfchemikalie oral verabreicht wird. Bei anderen Expositionswegen können Änderungen erforderlich sein.
9. Bevor die Prüfmethode an einem Gemisch für die Generierung von Daten für einen bestimmten Regulierungszweck verwendet wird, ist zu prüfen, ob sie für den beabsichtigten Zweck angemessene Ergebnisse liefern kann und, wenn dem so ist, warum. Solche Erwägungen entfallen, wenn die Prüfung des Gemischs rechtlich vorgeschrieben ist.
10. Die Definitionen der verwendeten Begriffe sind Anlage 1 zu entnehmen.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

11. Die Prüfchemikalie wird verschiedenen Gruppen von männlichen und weiblichen Tieren in abgestuften Dosen verabreicht. Männlichen Tieren sollte die Prüfchemikalie mindestens vier Wochen bis zum Tag vor der vorgesehenen Tötung (einschließlich) verabreicht werden. (Dieser Zeitraum umfasst mindestens zwei Wochen vor der Paarung, die Paarungszeit und etwa zwei Wochen nach der Paarung). Wegen des begrenzten Verabreichungszeitraums vor der Paarung ist die Fruchtbarkeit bei männlichen Tieren möglicherweise kein besonders empfindlicher Indikator für eine testikuläre Toxizität. Daher ist eine eingehende histologische Untersuchung der Hoden von wesentlicher Bedeutung. Die Kombination eines Verabreichungszeitraums von zwei Wochen mit anschließenden Beobachtungen des Paarungsverhaltens und der Fertilität mit einem Verabreichungszeitraum von insgesamt mindestens vier Wochen und einer anschließenden detaillierten Histopathologie der männlichen Keimdrüsen wird als ausreichend für den Nachweis der meisten Wirkungen auf die männliche Fruchtbarkeit und die Spermatogenese betrachtet.
12. Weiblichen Tieren sollte die Prüfchemikalie während der gesamten Dauer der Studie verabreicht werden. Dazu zählen zwei Wochen vor der Paarung (damit mindestens zwei vollständige Östruszyklen erfasst werden), die variable Zeit bis zur Empfängnis und die Dauer der Gravidität sowie mindestens 13 Tage nach der Geburt bis zum Tag vor der vorgesehenen Tötung (einschließlich).
13. Die Dauer der Studie nach der Eingewöhnung und einer Bewertung des Östruszyklus vor der Verabreichung der Prüfchemikalie hängt von der Leistungsfähigkeit des weiblichen Tiers ab; im Allgemeinen beträgt sie etwa 63 Tage [mindestens 14 Tage vor der Paarung, (bis zu) 14 Tage Paarungszeit, 22 Tage Gravidität, 13 Tage Laktation].
14. Während des Verabreichungszeitraums werden die Tiere täglich sorgfältig auf Toxizitätszeichen beobachtet. Tiere, die während der Dauer der Prüfung sterben, und vorzeitig getötete Tiere werden seziert; die nach Abschluss der Prüfung überlebenden Tiere werden getötet und ebenfalls seziert.

BESCHREIBUNG DER METHODE

Auswahl von Versuchstierarten

15. Diese Prüfmethode ist für die Verwendung von Ratten ausgelegt. Wenn die in dieser Prüfmethode genannten Parameter an einer anderen Nagetierart untersucht werden, ist dies ausführlich zu begründen. Im internationalen Validierungsprogramm für den Nachweis von endokrinen Disruptoren in OECD TG 407 (entsprechend Kapitel B.7 in diesem Anhang) wurden ausschließlich Ratten als Versuchstiere verwendet. Stämme mit geringer Fruchtbarkeit oder bekannter hoher Häufigkeit von Entwicklungsdefekten sind nicht zu verwenden. Es sind gesunde jungfräuliche Tiere zu verwenden, die zuvor nicht in anderen

Versuchen eingesetzt wurden. Die Versuchstiere sind nach Tierart, Tierstamm, Geschlecht, Gewicht und Alter auszuwählen. Bei Beginn der Studie sollten die Gewichtsunterschiede der Tiere möglichst gering sein und 20 % des geschlechtsspezifischen Durchschnittsgewichts nicht überschreiten. Wenn die Studie als Vorstudie zu einer Langzeitstudie oder einer Eingenerationsstudie durchgeführt wird, sollten in beiden Studien vorzugsweise Tiere desselben Stamms und derselben Herkunft verwendet werden.

Haltung und Fütterung

16. Bei allen Verfahren sind die örtlichen Standards der Versuchstierpflege einzuhalten. Die Temperatur im Tierversuchsraum muss 22 °C (± 3 °) betragen. Die relative Luftfeuchtigkeit sollte mindestens 30 % betragen und – außer beim Reinigen des Raums - 70 % nicht überschreiten; anzustreben ist ein Wert von 50-60 %. Die Beleuchtung sollte künstlich sein, und die Hell- und Dunkelphasen sollten sich im Abstand von 12 Stunden abwechseln. An die Versuchstiere kann herkömmliches Laborfutter verfüttert werden, wobei eine unbegrenzte Trinkwasserversorgung zu gewährleisten ist. Die Auswahl des Futters wird eventuell dadurch beeinflusst, dass eine geeignete Beimischung der Prüfchemikalie sichergestellt werden muss, wenn die Prüfchemikalie auf diese Art verabreicht werden soll.
17. Die Tiere sollten in kleinen gleichgeschlechtlichen Gruppen untergebracht werden; sie können auch einzeln gehalten werden, wenn dies wissenschaftlich gerechtfertigt ist. Bei Gruppenhaltung sollten maximal fünf Tiere in einem Käfig untergebracht sein. Die Verpaarung erfolgt in für diesen Zweck geeigneten Käfigen. Trächtigen weiblichen Tieren sollte in Einzelhaltung Material für den Nestbau bereitgestellt werden. Säugende weibliche Tiere werden in Käfigen einzeln mit ihren Nachkommen gehalten.
18. Das Futter ist regelmäßig auf Schadstoffe zu analysieren. Eine Probe des Futters ist bis zur Fertigstellung des Abschlussberichts aufzubewahren.

Vorbereitung der Versuchstiere

19. Gesunde und geschlechtsreife junge Tiere werden randomisiert und den einzelnen Kontroll- bzw. Behandlungsgruppen zugeteilt. Die Käfige sind so aufzustellen, dass etwaige standortbedingte Auswirkungen möglichst gering sind. Die Tiere werden eindeutig gekennzeichnet und vor Beginn der Studie in ihren Käfigen über einen Zeitraum von mindestens fünf Tagen unter Laborbedingungen eingewöhnt.

Vorbereitung der Dosierung

20. Die Prüfchemikalie sollte oral verabreicht werden, wenn nicht andere Verabreichungswege als besser geeignet erscheinen. Auf oralem Weg wird die Prüfchemikalie gewöhnlich mit einer Sonde verabreicht. Alternativ können Prüfchemikalien aber auch über die Nahrung oder das Trinkwasser zugeführt werden.

21. Bei Bedarf wird die Prüfchemikalie in einem geeigneten Vehikel gelöst oder suspendiert. Es empfiehlt sich, nach Möglichkeit zunächst die Verwendung einer wässrigen Lösung/Suspension, dann eine Lösung/Emulsion in Öl (z. B. Maisöl) und erst dann eine Lösung in einem anderen Vehikel in Betracht zu ziehen. Bei anderen Vehikeln als Wasser müssen deren toxische Merkmale bekannt sein. Die Stabilität und die Homogenität der Prüfchemikalie in dem Vehikel sind zu bestimmen.

VERFAHREN

Anzahl und Geschlecht der Versuchstiere

22. Jede Gruppe sollte mit mindestens 10 männlichen und 12-13 weiblichen Tieren begonnen werden. Bei den weiblichen Tieren wird vor der Exposition der Östruszyklus untersucht, und Tiere, bei denen nicht der typische Zyklus von 4-5 Tagen festzustellen ist, werden nicht in die Studie einbezogen. Daher wird die Vorhaltung weiterer weiblicher Tiere empfohlen, damit pro Gruppe tatsächlich 10 weibliche Tiere verfügbar sind. Außer bei ausgeprägten toxischen Wirkungen dürften dann pro Gruppe mindestens 8 Graviditäten entstehen; dies ist gewöhnlich die erforderliche Mindestzahl an trächtigen Tieren pro Gruppe. So soll gewährleistet werden, dass genügend Graviditäten und Nachkommen erzeugt werden, um eine aussagekräftige Bewertung des Schädigungspotenzials der Prüfchemikalie in Bezug auf die Fertilität, die Gravidität, das Verhalten des Muttertiers, das Säugen, das Wachstum und die Entwicklung der F₁-Generation von der Empfängnis bis zu Tag 13 nach der Geburt vornehmen zu können.

Dosierung

23. Im Allgemeinen sollten mindestens drei Versuchsgruppen und eine Kontrollgruppe gewählt werden. Die Dosierungen können auf Informationen aus akuten Toxizitätsprüfungen oder auf Ergebnissen von Studien mit Wiederholungsdosen beruhen. Abgesehen von der Behandlung mit der Prüfchemikalie sollen die Tiere in der Kontrollgruppe unter identischen Bedingungen behandelt werden wie die Versuchstiere in der Prüfgruppe. Wird die Prüfchemikalie mit einem Vehikel verabreicht, muss die Kontrollgruppe das Vehikel mit dem höchsten verwendeten Volumen erhalten.
24. Bei der Wahl der Dosisstufen sollten sämtliche vorliegenden Daten zur Toxizität und (Toxiko)kinetik berücksichtigt werden. Außerdem sollte berücksichtigt werden, dass trächtige und nicht trächtige Tiere unterschiedlich empfindlich sein können. Die höchste Dosis sollte so gewählt werden, dass zwar toxische Wirkungen, aber keine Todesfälle oder schweres Leiden hervorgerufen werden. Anschließend soll eine absteigende Folge von Dosierungsstufen ausgewählt werden, um dosisabhängige Wirkungen und die niedrigste Dosis ohne zu beobachtende schädliche Wirkungen (NOAEL) zu bestimmen. Zwei- bis vierfache Abstände erweisen sich häufig als optimale Dosisabstufungen, gegenüber der

Verwendung sehr großer Intervalle (z. B. mehr als Faktor 10) ist die Hinzunahme einer vierten Prüfgruppe häufig vorzuziehen.

25. Bei allgemeiner Toxizität (z. B. vermindertes Körpergewicht, Wirkungen auf Leber, Herz, Lungen oder Nieren usw.) oder anderen Veränderungen, die möglicherweise keine toxischen Reaktionen darstellen (z. B. verminderte Futteraufnahme, Lebervergrößerung), sind die beobachteten Wirkungen auf endokrine Endpunkte mit Vorsicht zu bewerten.

Limit-Prüfung

26. Ergibt eine orale Prüfung mit einer einzigen Dosierung von mindestens 1000 mg/kg Körpergewicht/Tag oder bei Verabreichung in Futter oder Trinkwasser ein gleichwertiger prozentualer Anteil im Futter oder Trinkwasser nach den für diese Studie beschriebenen Verfahren keine wahrnehmbare Toxizität und ist aufgrund von Daten strukturverwandter Stoffe keine Toxizität zu erwarten, kann auf eine vollständige Studie mit verschiedenen Dosisabstufungen gegebenenfalls verzichtet werden. Die Limit-Prüfung kann angebracht sein, es sei denn, die Exposition beim Menschen lässt die Prüfung bei einer höheren oralen Dosis angezeigt erscheinen. Bei anderen Verabreichungsformen, z. B. Inhalation oder dermale Applikation, wird die maximal erzielbare Konzentration in vielen Fällen durch die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Prüfchemikalien bestimmt.

Verabreichung der Dosen

27. Den Tieren wird die Prüfchemikalie für die Dauer einer Woche (7 Tage) täglich verabreicht. Wird die Prüfchemikalie über eine Sonde verabreicht, so sollte dies in einer einmaligen Dosis unter Verwendung einer Magensonde oder einer geeigneten Intubationskanüle erfolgen. Das maximale Flüssigkeitsvolumen, das einem Versuchstier jeweils verabreicht werden kann, hängt von der Größe des Versuchstiers ab. Das Volumen sollte 1 ml/100 g Körpergewicht nicht überschreiten, bei wässrigen Lösungen kommen aber auch 2 ml/100 g Körpergewicht in Betracht. Außer für Reizungen auslösende oder ätzende Prüfchemikalien, die in der Regel bei höheren Konzentrationen eine Verschlimmerung bewirken, sollte die Variabilität des Prüfvolumens durch Anpassung der Konzentration möglichst gering gehalten werden, um ein konstantes Volumen bei allen Dosen zu gewährleisten.
28. Bei mit dem Futter oder dem Trinkwasser verabreichten Prüfchemikalien ist unbedingt sicherzustellen, dass die Mengen der jeweiligen Prüfchemikalie die normale Nahrungsaufnahme oder den Wasserhaushalt nicht beeinträchtigen. Wenn die Prüfchemikalie im Futter verabreicht wird, kann entweder eine konstante Konzentration im Futter (ppm) oder eine konstante Dosis, bezogen auf das Körpergewicht des Tieres, verwendet werden; die jeweils gewählte Verfahrensweise sollte angegeben werden. Eine mit einer Magensonde verabreichte Dosis soll jeweils zu denselben Tageszeiten gegeben und mindestens einmal pro Woche so angepasst werden, dass eine konstante Dosis im Verhältnis zum Körpergewicht aufrechterhalten wird.

Versuchsplan

29. Die Verabreichung sollte für beide Geschlechter mindestens 2 Wochen vor der Paarung beginnen, nachdem sich die Tiere mindestens 5 Tage lang eingewöhnt haben und nachdem die weiblichen Tiere auf einen normalen Östruszyklus (in einem 2-wöchigen Zeitraum vor der Behandlung) untersucht wurden. Die Studie sollte so geplant werden, dass mit der Bewertung des Östruszyklus bald nach Erreichen der vollständigen Geschlechtsreife begonnen wird. Der Beginn dieser Zeiträume kann je nach Rattenstämmen in den einzelnen Labors leicht variieren und beispielsweise bei Sprague-Dawley-Ratten bei einem Alter von 10 Wochen und bei Wistar-Ratten etwa bei einem Alter von 12 Wochen liegen. Muttertiere sollten an Tag 13 nach der Geburt oder kurz darauf getötet werden. Der Tag der Geburt (d. h. der Tag, an dem der Geburtsvorgang abgeschlossen wurde) wird als Tag 0 nach der Geburt bezeichnet. Weibliche Tiere, bei denen keine Besamung festzustellen ist, werden 24-26 Tage nach dem letzten Tag der Paarungszeit getötet. Die Verabreichung wird bei beiden Geschlechtern während der Paarungszeit fortgesetzt. Männliche Tiere werden auch nach der Paarungszeit noch mindestens über den vollständigen Verabreichungszeitraum von 28 Tagen behandelt. Anschließend werden sie getötet oder alternativ weiter gehalten und behandelt, damit eine zweite Paarung erfolgen kann, wenn dies als angemessen betrachtet wird.
30. Die tägliche Behandlung der weiblichen Muttertiere sollte während der Gravidität sowie mindestens bis zu Tag 13 nach der Geburt bzw. zum Tag vor der Tötung (einschließlich) fortgesetzt werden. Bei Studien, bei denen die Prüfchemikalie durch Inhalation oder dermal verabreicht wird, sollte die Verabreichung mindestens bis zu Tag 19 der Trächtigkeit (einschließlich) fortgesetzt und so bald wie möglich (spätestens PND 4) wieder aufgenommen werden.
31. Der Versuchsplan ist in Anlage 2 in einem Diagramm dargestellt.

Verpaarung

32. In der Regel sollten bei dieser Studie männliche und weibliche Tiere im Verhältnis 1:1 (ein männliches auf ein weibliches Tier) eingesetzt werden. Ausnahmen können sich gelegentlich ergeben, wenn männliche Tiere sterben. Das weibliche Tier sollte mit demselben männlichen Tier gehalten werden, bis Anzeichen für eine Paarung festgestellt werden bzw. bis zwei Wochen vergangen sind. Jeden Morgen werden die weiblichen Tiere auf Sperma oder Vaginalpfropfe untersucht. Tag 0 der Trächtigkeit wird als der Tag festgelegt, an dem die Besamung (durch Vaginalpfropf oder Spermaspuren) nachgewiesen werden kann. Bei einer erfolglosen Verpaarung kann gegebenenfalls die erneute Verpaarung weiblicher Tiere mit bewährten männlichen Tieren der gleichen Gruppe erwogen werden.

Wurfgröße

33. Am PND 4 kann die Größe eines jeden Wurfs angepasst werden, indem überschüssige Jungtiere nach dem Zufallsprinzip aussortiert werden, um je nach normalem Umfang eines Wurfs beim verwendeten Rattenstamm pro Wurf nach Möglichkeit vier oder fünf Jungtiere pro Geschlecht und Wurf zu erhalten. Von zwei der überschüssigen Jungtiere sollten Blutproben entnommen, in Pools zusammengefasst und zur Bestimmung von Serumspiegeln (T4) verwendet werden. Die selektive Eliminierung von Jungtieren, z. B. auf der Grundlage des Körpergewichts oder des anogenitalen Abstands (AGD), wird nicht empfohlen. Wenn es wegen der Anzahl männlicher bzw. weiblicher Jungtiere nicht möglich ist, pro Wurf jeweils vier oder fünf Jungtiere eines jeden Geschlechts zu erhalten, ist auch eine grobe Anpassung (beispielsweise sechs männliche und vier weibliche Tiere) akzeptabel. Wenn die Anzahl der Tiere eines Wurfs die Eliminierungsgrenze (8 oder 10 Jungtiere pro Wurf) unterschreitet, werden keine Jungtiere aussortiert. Wenn die Anzahl der Jungtiere um nur ein Tier über der Eliminierungsgrenze liegt, wird nur ein Jungtier aussortiert und zur Blutentnahme für mögliche Bewertungen der Serumspiegel (T4) verwendet.
34. Wenn die Größe des Wurfs nicht geändert wird, werden an Tag 4 nach der Geburt zwei Jungtiere pro Wurf human getötet und Blutproben zur Bestimmung der Konzentration der Schilddrüsenhormone im Serum entnommen. Nach Möglichkeit sollten diese zwei Jungtiere je Wurf weibliche Jungtiere sein, damit männliche Jungtiere zur Prüfung der Brustwarzenretention für den Fall aufgespart werden können, dass nach dem Aussortieren dieser Jungtiere keine weiblichen Tiere zur abschließenden Bewertung mehr verbleiben würden. Wenn ein Wurf weniger als 8 bzw. 10 Jungtiere hat (je nach Größe eines normalen Wurfs beim betreffenden Rattenstamm), werden keine Jungtiere aussortiert. Wenn die Anzahl der Jungtiere um nur ein Tier über der normalen Größe eines Wurfs liegt, wird nur ein Jungtier aussortiert und zur Blutentnahme für mögliche Bewertungen der Serumspiegel (T4) verwendet.

Beobachtungen am lebenden Tier

Klinische Beobachtungen

35. Während der gesamten Versuchsdauer sollten allgemeine klinische Beobachtungen mindestens einmal täglich durchgeführt werden, bei Anzeichen für Toxizität häufiger. Die Beobachtungen sollen vorzugsweise jeden Tag zur gleichen Uhrzeit erfolgen, wobei die Zeit der nach der Verabreichung erwarteten maximalen Wirkungen zu berücksichtigen ist. Auffallende Verhaltensstörungen und Anzeichen einer schweren oder verzögerten Geburt sowie alle Vergiftungserscheinungen einschließlich Mortalität sind aufzuzeichnen. In den Aufzeichnungen sind auch der Zeitpunkt des erstmaligen Auftretens, des Umfangs und der Dauer der Anzeichen für eine Toxizität zu vermerken.

Körpergewicht und Futter-/Trinkwasserverbrauch

36. Männliche und weibliche Tiere der P-Generation müssen am ersten Tag der Behandlung und anschließend mindestens in wöchentlichen Abständen sowie bei Versuchsende gewogen werden. Während der Gravidität sollten weibliche Tiere an den Tagen 0, 7, 14 und 20 sowie innerhalb von 24 Stunden nach der Geburt (Tag 0 oder Tag 1 nach der Geburt) und mindestens an den Tagen 4 und 13 nach der Geburt gewogen werden. Diese Beobachtungen sind für jedes ausgewachsene Tier einzeln zu protokollieren.
37. Vor der Paarung, vor der Gravidität und vor der Laktation sollte die Futteraufnahme mindestens einmal wöchentlich gemessen werden. Die Messung der Futteraufnahme während der Paarungszeit ist fakultativ. Wenn die Prüfchemikalie mit dem Trinkwasser verabreicht wird, sollte in diesen Zeiträumen auch die Wasseraufnahme gemessen werden.

Östruszyklen

38. Östruszyklen sollten vor Beginn der Behandlung überwacht werden, damit für die Studie weibliche Tiere mit regelmäßigem Zyklus ausgewählt werden können (Nummer 22). Außerdem sollten ab Beginn des Behandlungszeitraums bis zu Anzeichen für eine Besamung täglich Vaginalabstriche untersucht werden. Wenn Bedenken hinsichtlich akuter Auswirkungen von Stress bestehen, die bei Beginn der Verabreichung die Östruszyklen verändern könnten, können die Versuchstiere in den Labors zwei Wochen behandelt werden, um anschließend die Östruszyklen vor der Paarungszeit über mindestens zwei Wochen und anschließend bis zu Anzeichen für eine Besamung in der Paarungszeit anhand täglicher Vaginalabstriche zu überwachen. Bei der Entnahme vaginaler/zervikaler Zellen ist sorgfältig darauf zu achten, dass die Schleimhaut nicht gereizt und eine Pseudogravidität eingeleitet werden könnte (7) (8).

Parameter für die Nachkommen

39. Die Trächtigkeitsdauer wird vom Tag 0 der Gravidität an berechnet und sollte vermerkt werden. Jeder Wurf ist so bald wie möglich nach der Geburt zu untersuchen, um die Anzahl und das Geschlecht der Nachkommen, Totgeburten, Lebendgeburten und Kümmerlinge (Jungtiere, die erheblich kleiner sind als Jungtiere einer vergleichbaren Kontrollgruppe) sowie auffallende Anomalien feststellen zu können.
40. Innerhalb von 24 Stunden nach der Geburt (Tag 0 oder Tag 1 nach der Geburt) und mindestens an den Tagen 4 und 13 nach der Geburt sollten lebende Jungtiere gezählt und nach Geschlechtern unterschieden und die Würfe jeweils gewogen werden. Zusätzlich zu den in Nummer 35 genannten Beobachtungen sollte ungewöhnliches Verhalten der Nachkommen vermerkt werden.
41. Der anogenitale Abstand (AGD) sollte bei jedem Jungtier zwischen PND 0 und PND 4 am selben Tag gemessen werden. Das Körpergewicht des Jungtiers wird am Tag der Messung des AGD erfasst, der auf Jungtiergröße – vorzugsweise die Quadratwurzel des Körpergewichts – genormt sein sollte (9). Die Anzahl Brustwarzen/Warzenhöfe bei

männlichen Jungtieren ist wie in OECD GD 151 empfohlen am PND 12 oder 13 zu kontrollieren (10).

Klinisch-biochemische Untersuchungen

42. Nach dem folgenden Plan werden Blutproben an einer vorgegebenen Stelle entnommen:

- von mindestens zwei Jungtieren pro Wurf an Tag 4 nach der Geburt, wenn die Anzahl der Jungtiere dies zulässt (Nummern 33 und 34),
- von allen Muttertieren und von mindestens zwei Jungtieren pro Wurf bei Beendigung des Versuchs an Tag 13 und
- von allen adulten männlichen Tieren bei Beendigung des Versuchs.

Alle Blutproben werden unter geeigneten Bedingungen gelagert. Bei Blutproben der Jungtiere vom Tag 13 sowie bei Blutproben der adulten männlichen Tiere werden die Serumspiegel auf Schilddrüsenhormone (T4) untersucht. Wenn relevant, wird außerdem eine Bewertung von T4 bei Blutproben der Muttertiere sowie bei Jungtieren an Tag 4 vorgenommen. Ebenfalls wenn relevant können auch weitere Hormone gemessen werden. Das Blut der Jungtiere kann zur Analyse der Schilddrüsenhormone nach Würfen zu Pools zusammengefasst werden. Die Schilddrüsenhormone (T4 und TSH) sollten vorzugsweise „insgesamt“ gemessen werden.

43. Die folgenden Faktoren können die Variabilität und die absoluten Konzentrationen der Hormonbestimmungen beeinflussen:

- der Zeitpunkt der Tötung wegen Schwankungen der Hormonkonzentrationen im Tagesverlauf,
- Methode der Tötung, die gewählt wird, um übermäßigen Stress für die Tiere zu vermeiden, der die Hormonkonzentrationen beeinflussen könnte,
- Prüfkits für Hormonbestimmungen mit unterschiedlichen Standardkurven.

44. Plasmaproben, die speziell zur Hormonbestimmung vorgesehen sind, sollten immer zur gleichen Tageszeit gewonnen werden. Die verschiedenen im Handel erhältlichen Assay-Kits können bei der Analyse der Hormonkonzentration unterschiedliche numerische Werte ergeben.

Pathologie

Autopsie

45. Zum Zeitpunkt der Tötung oder bei vorzeitigem Tod im Verlauf der Studie sind die adulten Tiere makroskopisch auf etwaige Anomalien oder pathologische Veränderungen zu untersuchen. Dabei ist besonders auf die Organe des Fortpflanzungssystems zu achten. Die Anzahl der Implantationsstellen sollte vermerkt werden. Am Morgen des Tags der Sektion

ist ein Vaginalabstrich zu untersuchen, um das Stadium des Östruszyklus zu bestimmen und eine Korrelation zur histopathologischen Untersuchung der Ovarien zu ermöglichen.

46. Die Hoden und die Nebenhoden sowie die Prostata und die Samenbläschen zusammen mit den Koagulationsdrüsen aller adulter männlicher Tiere sollten ggf. von anhaftendem Gewebe befreit und möglichst umgehend nach der Sektion gewogen werden, bevor das Material eintrocknet. Als Organgewichte können ferner die Gewichte des Muskelkomplex Levator ani/bulbospongiosus, der Cowperschen Drüsen und der Glans penis bei männlichen Tieren sowie der Ovarien (Nassgewicht) und des Uterus mit Zervix bei weiblichen Tieren gemessen werden; wenn diese Gewichte berücksichtigt werden sollen, sollten die Messungen möglichst umgehend nach der Sektion vorgenommen werden.
47. Tote Jungtiere und Jungtiere, die an Tag 13 nach der Geburt oder kurz danach getötet wurden, sollten zumindest äußerlich sorgfältig auf auffallende Anomalien untersucht werden. Besondere Beachtung erfordern die externen Genitalien, die auf Anzeichen für eine veränderte Entwicklung zu untersuchen sind. An Tag 13 sollte die Schilddrüse eines männlichen und eines weiblichen Jungtieres pro Wurf konserviert werden.
48. Bei allen adulten Tieren sollten die Ovarien, Hoden, akzessorischen Geschlechtsorgane (Uterus und Zervix, Nebenhoden, Prostata, Samenbläschen und Koagulationsdrüsen), Schilddrüse und alle Organe mit makroskopischen Veränderungen konserviert werden. Eine Fixation in Formalin ist für die regelmäßige Prüfung von Hoden und Nebenhoden nicht zu empfehlen. Eine annehmbare Methode besteht in der Verwendung von Bouinscher Lösung oder modifizierter Davidson-Lösung für diese Gewebe (11). Um ein rasches Eindringen des Fixierungsmittels zu ermöglichen, kann die Tunica albuginea an beiden Enden des Organs vorsichtig und flach mit einer Nadel punktiert werden.

Histopathologie

49. Bei den Tieren der höchsten Dosisgruppe und der Kontrollgruppe sollten die Ovarien, Hoden und Nebenhoden (unter besonderer Berücksichtigung der Stadien der Spermatogenese und der Histopathologie der interstitiellen testikulären Zellstruktur) einer detaillierten histologischen Untersuchung unterzogen werden. Die übrigen konservierten Organe einschließlich der Schilddrüse von Jungtieren und von adulten Tieren können erforderlichenfalls untersucht werden. Das Gewicht der Schilddrüse kann nach der Fixierung bestimmt werden. Anhaftendes Gewebe ist sehr vorsichtig und erst nach der Fixierung zu entfernen, um Gewebeschäden zu vermeiden. Eine Gewebeschädigung könnte die histopathologische Analyse beeinträchtigen. Die Untersuchungen sind auch auf die Tiere anderer Dosisgruppen auszudehnen, wenn in der Gruppe mit der höchsten Dosis Veränderungen festgestellt werden. Der Leitfaden zur Histopathologie (11) enthält zusätzliche Informationen zur Sektion, Fixierung, Schnittherstellung und Histopathologie endokriner Gewebe.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Daten

50. Es sollen Daten zu den einzelnen Tieren bereitgestellt werden. Außerdem sollten sämtliche Daten in tabellarischer Form zusammengefasst werden; dabei werden für jede Prüfgruppe die Anzahl der Tiere zu Beginn der Prüfung, die Anzahl der während der Prüfung tot aufgefundenen Tiere beziehungsweise der aus humanen Gründen getöteten Tiere, der jeweilige Zeitpunkt des Todes beziehungsweise der Tötung, die Anzahl der fruchtbaren Tiere, die Anzahl der trächtigen weiblichen Tiere, die Anzahl der Tiere mit Anzeichen von Toxizität, eine Beschreibung der beobachteten Anzeichen von Toxizität, einschließlich des Zeitpunkts, zu dem die toxischen Wirkungen eingetreten sind, deren Dauer und Schweregrad, die Arten von histopathologischen Veränderungen und alle relevanten Daten zu den Würfen angegeben. Anlage 3 enthält ein tabellarisches Berichtsformat, das sich als sehr hilfreich für die Evaluierung der reproduktions- bzw. entwicklungstoxischen Auswirkungen erwiesen hat.
51. Wegen des begrenzten Umfangs der Studie sind statistische Analysen in Form von „Signifikanztests“ für viele Endpunkte, insbesondere für reproduktionsbezogene Endpunkte, nur von begrenzter Bedeutung. Wenn statistische Analysen durchgeführt werden, sollte die gewählte Methode der Verteilung der zu untersuchenden Variable angemessen sein und vor Beginn der Studie festgelegt werden. Statistische Analysen des AGD und der Brustwarzenretention sollten auf den Daten einzelner Jungtiere unter Berücksichtigung wurfbedingter Auswirkungen beruhen. Gegebenenfalls sind die jeweiligen Würfe als Analyseeinheit anzunehmen. Statistische Analysen des Körpergewichts der Jungtiere sollten auf den Daten einzelner Jungtiere unter Berücksichtigung der Wurfgröße beruhen. In Anbetracht des geringen Umfangs der Gruppe kann ggf. auch die Einbeziehung historischer Kontrolldaten (z. B. für die Wurfgröße) bei der Auswertung der Studie hilfreich sein.

Auswertung der Ergebnisse

52. Die Befunde dieser Toxizitätsstudie sind im Hinblick auf die beobachteten Wirkungen sowie auf Nekropsie- und Mikroskopiebefunde zu bewerten. Die Bewertung beinhaltet den vorhandenen beziehungsweise nicht vorhandenen Zusammenhang zwischen der Dosierung der Prüfchemikalie und vorhandenen Anomalien sowie deren Häufigkeit und Schwere, einschließlich makroskopischer Läsionen, identifizierter Zielorgane, Unfruchtbarkeit, klinischer Anomalien, beeinträchtigter Reproduktions- und Wurfleistungen, Körpergewichtsveränderungen, Auswirkungen auf die Mortalität und etwaiger sonstiger toxischer Auswirkungen.
53. Wegen der kurzen Dauer der Behandlung der männlichen Tiere sollte bei der Bewertung der reproduktionstoxischen Auswirkungen die Histopathologie der Hoden und der Nebenhoden zusammen mit den Fertilitätsdaten berücksichtigt werden. Die Einbeziehung verfügbarer historischer Kontrolldaten zur Reproduktions-/Entwicklungstoxizität (z. B. für

Wurfgröße, AGD, Brustwarzenretention und Serumspiegel (T4)) kann bei der Auswertung der Studie ebenfalls hilfreich sein.

54. Für die Qualitätskontrolle wird vorgeschlagen, historische Kontrolldaten zu sammeln und Variationskoeffizienten für numerische Daten zu berechnen, insbesondere für die Parameter, die mit dem Nachweis der Störung des endokrinen Systems zusammenhängen. Diese Daten können für Vergleichszwecke verwendet werden, wenn tatsächliche Studien bewertet werden.

Prüfbericht

55. Der Prüfbericht sollte folgende Angaben enthalten:

Prüfchemikalie:

- Herkunft, Chargennummer, ggf. begrenztes Verwendungsdatum;
- Stabilität der Prüfchemikalie, falls bekannt.

Einkomponentiger Stoff:

- physikalisches Erscheinungsbild, Wasserlöslichkeit und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften;
- chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS-Bezeichnung, CAS-Nummer, SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel, Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.

Mehrkomponentiger Stoff, UVCB-Stoffe und Gemische:

- so weit wie möglich charakterisiert durch die chemische Zusammensetzung (siehe oben), das quantitative Vorkommen und die relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften der einzelnen Komponenten.

Vehikel (wenn verwendet):

- Begründung der Auswahl des Vehikels, falls kein Wasser verwendet wurde;

Versuchstiere:

- Tierart/Stamm;
- Anzahl, Alter und Geschlecht der Tiere;
- Herkunft der Tiere, Haltungsbedingungen, Futter usw.;
- Gewicht der einzelnen Tiere bei Versuchsbeginn;
- Begründung für die Wahl einer anderen Art als der Ratte.

Prüfbedingungen:

- Begründung der gewählten Dosisstufen;
- Angaben zur Zubereitungsform der Prüfchemikalie/des Futters, der erreichten Konzentrationen, Stabilität und Homogenität der Zubereitung,
- Angaben zur Verabreichung der Prüfchemikalie;
- gegebenenfalls Angaben zur Umrechnung der Konzentration der Prüfchemikalie im Futter/Wasser (ppm) in die entsprechende Dosis (mg/kg Körpergewicht/Tag),
- Angaben über Futter- und Wasserqualität;
- genaue Beschreibung des Verfahrens für die Zufallsauswahl von Jungtieren zwecks Tötung (wenn Jungtiere getötet werden).

Ergebnisse:

- Körpergewicht/Änderungen des Körpergewichts,
- Angaben zur Futter- und Wasseraufnahme (wenn verfügbar);
- Daten über toxische Reaktionen nach Geschlecht und Dosierung, einschließlich Fruchtbarkeit, Trächtigkeit und sonstige Anzeichen von Toxizität;
- Graviditätslänge;
- toxische oder sonstige Wirkungen auf Reproduktion, Nachkommen, postnatales Wachstum usw.;
- Art, Schweregrad und Dauer der klinischen Beobachtungen (mit Angaben zur Reversibilität);
- Zahl adulter weiblicher Tiere mit normalem oder abnormalem Östruszyklus sowie Zyklusdauer;
- Anzahl der Lebendgeburten und der Postimplantationsverluste;
- Angaben zum Körpergewicht der Jungtiere;
- AGD aller Jungtiere (und Körpergewicht am Tag der AGD-Messung);
- Brustwarzenretention bei männlichen Jungtieren;
- Schilddrüsenhormonspiegel, Jungtiere an Tag 13 und adulte männliche Tiere (sowie Muttertiere und Jungtiere an Tag 4, wenn gemessen)
- Anzahl der Jungtiere mit sichtbaren erheblichen Anomalien, allgemeine Bewertung externer Genitalien, Anzahl der Kümmerlinge;
- Zeitpunkt des Todes im Verlauf der Studie oder Angabe, ob Tiere bis zum Schluss überlebt haben;
- Anzahl der Implantate, Wurfgröße und Wurfgewichte zum Zeitpunkt der Aufzeichnung;

- Körpergewicht bei Tötung sowie Organgewichtsdaten für die Elterntiere;
- Sektionsbefunde,
- ausführliche Beschreibung aller histopathologischen Befunde;
- Absorptionsdaten, soweit vorhanden;
- statistische Auswertung der Ergebnisse, wenn möglich.

Erörterung der Ergebnisse.

Schlussfolgerungen

Auswertung der Ergebnisse

56. Mit der Studie wird die Reproduktions-/Entwicklungstoxizität bei wiederholter Verabreichung (Nummern 5 und 6) bewertet. Die Studie könnte Aufschluss über die Notwendigkeit der Durchführung weiterer Untersuchungen geben und zu Empfehlungen für die Gestaltung von Folgestudien führen. Als Hilfe bei der Auswertung der reproduktions- und entwicklungstoxischen Ergebnisse ist das OECD Guidance Document Nr. 43 zu Rate zu ziehen (12). OECD Guidance Document Nr. 106 über die histologische Auswertung von Prüfungen zur Feststellung endokriner und reproduktionstoxischer Wirkungen bei Nagern (11) enthält Informationen zur Vorbereitung und Auswertung von (endokrinen) Organen und von Vaginalabstrichen, die für diese TG hilfreich sein könnten.

LITERATUR

- (1) OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Auf Anfrage erhältlich bei der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (2) OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokio, 27.-29. Oktober 1992. Auf Anfrage erhältlich bei der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (3) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10. und 11. März 1998. Auf Anfrage erhältlich bei der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (5) 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (7) Goldman, J.M., Murr, A.S., Buckalew, A.R., Ferrell, J.M. und 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), S. 84-97.
- (8) Sadleir, R.M.F.S (1979). Cycles and Seasons, in Auston, C.R. und Short, R.V. (Hrsg.), 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. und 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.

Anlage 1

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN (SIEHE AUCH OECD GD 150 (6))

Androgene Wirkung: Die Fähigkeit einer Chemikalie, in einem Säugetierorganismus wie ein natürliches androgenes Hormon zu wirken (z. B. Testosteron).

Antiandrogene Wirkung: Die Fähigkeit einer Chemikalie, die Wirkung eines natürlichen androgenen Hormons (z. B. Testosteron) in einem Säugetierorganismus zu unterdrücken.

Antiöstrogene Wirkung: Die Fähigkeit einer Chemikalie, die Wirkung eines natürlichen östrogenen Hormons (z. B. Östradiol 17 β) in einem Säugetierorganismus zu unterdrücken.

Antithyroide Wirkung: Die Fähigkeit einer Chemikalie, die Wirkung eines natürlichen Schilddrüsenhormons (z. B. T₃) in einem Säugetierorganismus zu unterdrücken.

Chemikalie: Ein Stoff oder Gemisch.

Dosierung: Ein allgemeiner Begriff, der die Dosis, ihre Häufigkeit und die Dauer der Verabreichung umfasst.

Dosis: Die Menge der verabreichten Prüfchemikalie. Die Dosis wird ausgedrückt als Masse der Prüfchemikalie je Einheit Körpergewicht des Versuchstiers pro Tag (z. B. mg/kg Körpergewicht/Tag) oder als konstante Konzentration im Futter.

Entwicklungstoxizität: Das Auftreten einer reproduktionstoxischen Wirkung mit prä-, peri- und postnatalen, strukturellen oder funktionellen Störungen bei der Nachkommenschaft.

Fertilitätsstörungen: Störungen der männlichen oder weiblichen Reproduktionsfunktionen oder -fähigkeit.

Maternale Toxizität: Schädliche Wirkungen auf trächtige weibliche Tiere, die entweder spezifisch (direkte Wirkungen) oder nicht spezifisch (indirekte Wirkungen) auftreten.

NOAEL: Abkürzung für No Observed Adverse Effect Level. Dies ist die höchste Dosis, bei der keine schädigenden behandlungsbedingten Wirkungen festgestellt werden.

Offensichtliche Toxizität: Ein allgemeiner Begriff zur Beschreibung deutlicher Toxizitätszeichen nach Verabreichung einer Prüfchemikalie. Diese Zeichen sollten für eine Bewertung der Gefährdung ausreichen und so schwerwiegend sein, dass bei einer Steigerung der verabreichten Dosis die Entwicklung schwerer Toxizitätszeichen und der wahrscheinliche Tod zu erwarten wären.

Östrogene Wirkung: Die Fähigkeit einer Chemikalie, in einem Säugetierorganismus wie ein natürliches östrogenes Hormon zu wirken (z. B. Östradiol 17 β).

Prüfchemikalie: Ein beliebiger Stoff oder eine beliebige Mischung, der/die nach dieser

Methode geprüft wird.

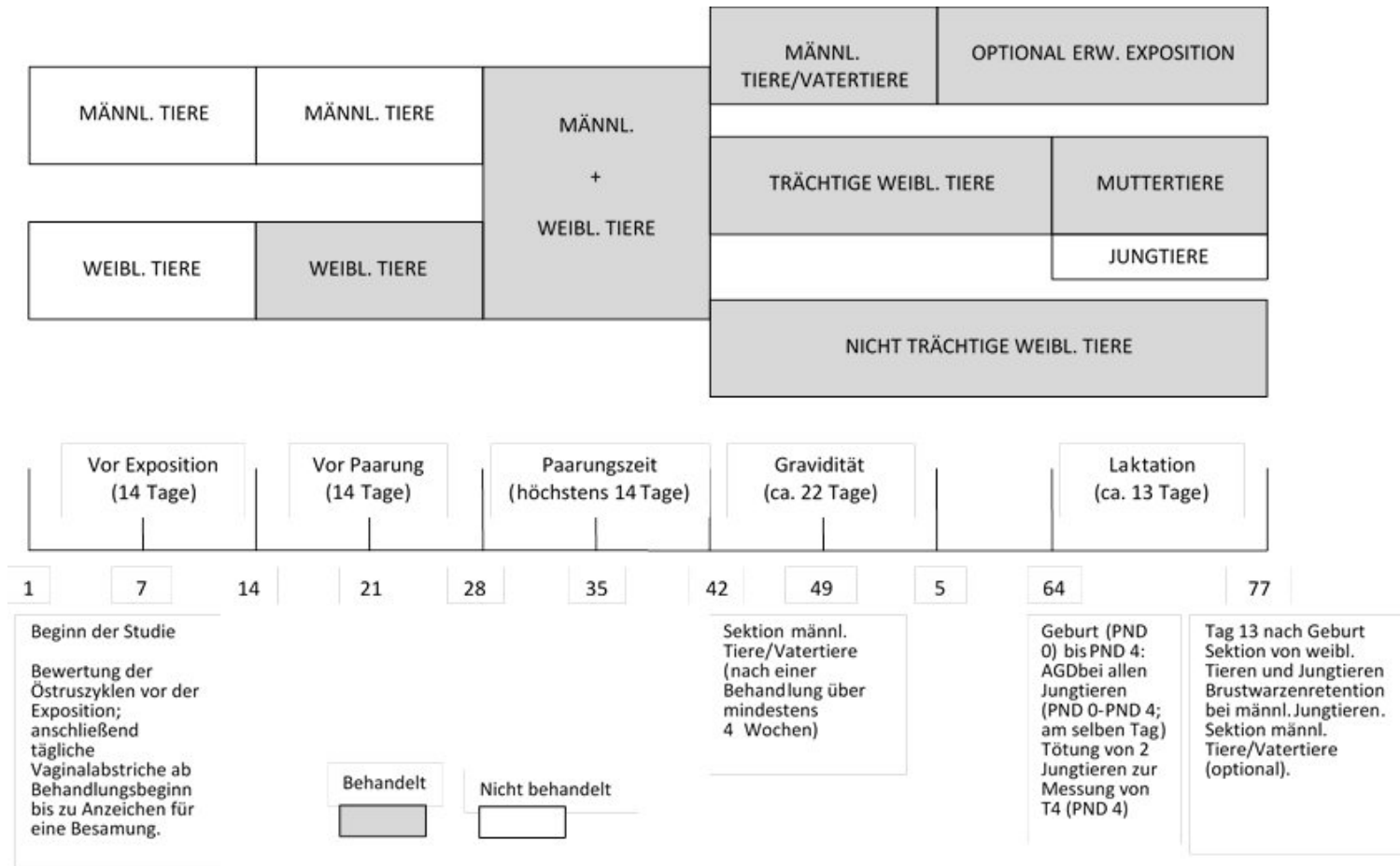
Reproduktionstoxizität: Schädliche Wirkungen auf die Nachkommenschaft und/oder Beeinträchtigung der männlichen und weiblichen Reproduktionsfunktionen oder -kapazität.

Thyroide Wirkung: Fähigkeit einer Chemikalie, in einem Säugetierorganismus wie ein natürliches Schilddrüsenhormon (z. B. T₃) zu wirken.

Validierung: Ein wissenschaftlicher Prozess zur Beschreibung der operationellen Anforderungen und Grenzen einer Prüfmethode und zum Nachweis ihrer Zuverlässigkeit und Eignung für einen bestimmten Zweck.

Anlage 2

DIAGRAMM ZUM VERSUCHSPLAN MIT ANGABEN ZUR MAXIMALEN DAUER DER STUDIE AUSGEHEND VON DER VOLLSTÄNDIGEN 14-TÄGIGEN PAARUNGSZEIT



Anlage 3

TABELLARISCHE ZUSAMMENFASSUNG DER AUSWIRKUNGEN AUF DIE REPRODUKTION/ENTWICKLUNG

BEOBACHTUNGEN	WERTE				
Dosierung (Einheiten)	0 (Kontrolle)	...	...	...	...
Ausgangspaarungen (N)					
Östruszyklus (mindestens mittlere Dauer und Häufigkeit unregelmäßiger Zyklen)					
Weibliche Tiere mit Anzeichen für eine Besamung (N)					
Trächtige weibliche Tiere (N)					
Empfängnistage 1-5 (N)					
Empfängnistage 6- (N) . ⁽¹⁾ (N)					
Gravidität ≤ 21 Tage (N)					
Gravidität = 22 Tage (N)					
Gravidität ≥ 23 Tage (N)					
Muttertiere mit lebenden Jungtieren (N)					
Muttertiere mit lebenden Jungtieren an Tag 4 pp (N)					
Implantate/Muttertier (Mittelwert)					
Lebende Jungtiere/Muttertiere bei Geburt (Mittelwert)					
Lebende Jungtiere/Muttertiere an Tag 4 (Mittelwert)					
Geschlechterverhältnis (m/w) bei Geburt (Mittelwert)					
Geschlechterverhältnis (m/w) an Tag 4 (Mittelwert)					
Wurfgewicht bei Geburt (Mittelwert)					
Wurfgewicht an Tag 4 (Mittelwert)					

⁽¹⁾ letzter Tag der Paarungszeit

Gewicht der Jungtiere bei Geburt (Mittelwert)					
Gewicht der Jungtiere zum Zeitpunkt der AGD-Messung (Mittelwert männliche Jungtiere, Mittelwert weibliche Jungtiere)					
AGD der Jungtiere am selben Tag nach der Geburt, Geburt – Tag 4 (Mittelwert männliche Jungtiere, Mittelwert weibliche Jungtiere, PND vermerken)					
Gewicht der Jungtiere an Tag 4 (Mittelwert)					
Brustwarzenretention bei männlichen Jungtieren an Tag 13 (Mittelwert)					
Gewicht der Jungtiere an Tag 13 (Mittelwert)					
JUNGTIERE MIT ANOMALIEN					
Muttertiere mit 0					
Muttertiere mit 1					
Muttertiere mit ≥ 2					
VERLUST AN NACHKOMMEN					
Pränatal / nach der Implantation (Implantationen abzüglich Lebendgeburten)					
Weibliche Tiere mit 0					
Weibliche Tiere mit 1					
Weibliche Tiere mit 2					
Weibliche Tiere mit ≥ 3					
Postnatal (Lebendgeburten abzüglich lebender Tiere an Tag 13 nach der Geburt)					
Weibliche Tiere mit 0					
Weibliche Tiere mit 1					
Weibliche Tiere mit 2					
Weibliche Tiere mit ≥ 3					

B.64 KOMBINIERTES SCREENING-PRÜFUNG MIT WIEDERHOLTER VERABREICHUNG ZUR BEWERTUNG DER REPRODUKTIONS-/ENTWICKLUNGSTOXIZITÄT

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 422 (2016). Die OECD-Richtlinien für die Prüfung von Chemikalien werden regelmäßig unter Berücksichtigung des wissenschaftlichen Fortschritts überarbeitet. Die ursprüngliche Screening-Prüfrichtlinie 422 wurde im Jahr 1996 angenommen. Sie beruhte auf einem Protokoll für eine kombinierte Screening-Prüfung mit wiederholter Verabreichung zur Bewertung der Reproduktions-/Entwicklungstoxizität, die in zwei Expertensitzungen im Jahr 1990 in London (1) und im Jahr 1992 in Tokio (2) erörtert wurde.

2. Bei dieser Prüfmethode wird eine Screening-Prüfung zur Bewertung der Reproduktions-/Entwicklungstoxizität, die auf Erfahrungen in Mitgliedstaaten aufgrund der Verwendung der ursprünglichen Methode bei in großen Mengen hergestellten Chemikalien und bei Untersuchungen mit Positivkontrollstoffen (3) (4) basiert, mit einer Toxizitätsprüfung mit wiederholter Verabreichung nach der OECD-Prüfrichtlinie 407 (28-Tage-Toxizitätsstudie mit wiederholter oraler Verabreichung an Nagern, Kapitel B.7 dieses Anhangs) kombiniert.
3. Diese Prüfmethode wurde als Folgemaßnahme der 1998 bei der OECD eingeleiteten prioritären Maßnahme zur Änderung bestehender Prüfrichtlinien und zur Entwicklung neuer Prüfrichtlinien für das Screening und die Prüfung potenzieller endokriner Disruptoren unter Festlegung von für einen endokrinen Disruptor relevanten Endpunkten aktualisiert (5). In diesem Zusammenhang wurde TG 407 (entsprechend Kapitel B.7 in diesem Anhang) im Jahr 2008 durch Parameter verbessert, mit denen eine endokrine Wirkung von Prüfchemikalien nachgewiesen werden kann. Ziel der Aktualisierung von TG 422 war die Einbeziehung einiger für endokrine Disruptoren relevanter Endpunkte in Screening-TGs, bei denen die Expositionszeiträume einige der empfindlichsten Entwicklungszeiträume (Zeiträume vor oder kurz nach der Geburt) beinhalten.
4. Die ausgewählten für endokrine Disruptoren relevanten zusätzlichen Endpunkte, die Bestandteil auch von TG 443 (Erweiterte Eingenerationen-Prüfung auf Reproduktionstoxizität, entsprechend Kapitel B.56 dieses Anhangs) sind, wurden auf der Grundlage einer Machbarkeitsstudie zur Untersuchung wissenschaftlicher und technischer Fragen im Zusammenhang mit deren Berücksichtigung sowie mit möglichen Anpassungen des für deren Einbeziehung erforderlichen Prüfprotokolls in TG 422 aufgenommen (6).
5. Mit dieser Prüfmethode sollen begrenzte Informationen über die Wirkungen einer Prüfchemikalie auf die Reproduktionsleistung männlicher und weiblicher Tiere (Funktion der Keimdrüsen, Paarungsverhalten, Empfängnis, Entwicklung des Conceptus, Geburt usw.) ermittelt werden. Sie ist nicht als alternative Prüfmethode und auch nicht als Ersatz für die bereits existierenden Prüfmethoden B.31, B.34, B.35 und B.56 zu betrachten.

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN

6. Bei der Beurteilung und Bewertung der toxischen Merkmale einer Prüfchemikalie kann die orale Toxizität nach wiederholter Verabreichung des Stoffs bestimmt werden, nachdem zunächst durch Prüfungen auf akute Wirkungen die ersten Toxizitätsdaten gewonnen wurden. Diese Prüfung gibt Aufschluss über mögliche Gesundheitsgefahren infolge wiederholter Exposition über einen begrenzten Zeitraum. Die Methode umfasst die Basisstudie zur Prüfung auf Toxizität bei wiederholter Verabreichung, die für chemische Stoffe, bei denen eine 90-Tage-Studie nicht gerechtfertigt ist (z. B. wenn das Produktionsvolumen bestimmte Grenzen nicht überschreitet), oder als Vorstudie zu einer Langzeitstudie verwendet werden kann. Bei der Prüfung sollten die im „OECD Guidance No. 19 on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for

experimental animals used in safety evaluation“ (7) genannten Grundsätze und Erwägungen beachtet werden.

7. Außerdem beinhaltet die Prüfung eine Screening-Prüfung auf Reproduktions-/Entwicklungstoxizität und kann daher auch durchgeführt werden, um ersten Aufschluss über mögliche Wirkungen auf die Reproduktionsleistung männlicher und weiblicher Tiere (Funktion der Keimdrüsen, Paarungsverhalten, Empfängnis, Entwicklung des Conceptus, Geburt usw.) entweder bereits früh bei der Bewertung toxikologischer Eigenschaften von Prüfchemikalien oder bei Besorgnis erregenden Prüfchemikalien zu erhalten. Diese Prüfmethode liefert keine umfassenden Informationen über sämtliche Reproduktions- und Entwicklungsaspekte. Insbesondere bietet sie nur beschränkte Möglichkeiten zur Erkennung postnataler Ausprägungen einer pränatalen Exposition oder zur Feststellung von Wirkungen, die bei postnataler Exposition induziert werden können. Aufgrund (unter anderem) der Selektivität der Endpunkte und der kurzen Dauer der Studie werden mit dieser Methode keine Nachweise dafür erlangt, dass keine reproduktions-/entwicklungstoxische Wirkungen eintreten. Wenn keine Daten aus anderen Prüfungen zur Bewertung der Reproduktions-/Entwicklungstoxizität vorliegen, sind positive Ergebnisse zudem hilfreich für eine erste Gefährdungsabschätzung und können bei Entscheidungen über die Notwendigkeit und die zeitliche Gestaltung weiterer Prüfungen berücksichtigt werden.
8. Die Ergebnisse in Bezug auf die endokrinen Parameter sind im Kontext des „OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals“ (8) zu interpretieren. Dieser Conceptual Framework enthält die verbesserte OECD TG 422 in Niveau 4 als *In-vivo*-Prüfung zur Erlangung von Daten über negative Wirkungen auf endokrin relevante Endpunkte. Ein endokrin relevantes Signal kann jedoch nicht an sich als hinreichender Beleg dafür betrachtet werden, dass die betreffende Prüfchemikalie als endokriner Disruptor wirkt.
9. Auch bei dieser Prüfmethode wird das Hauptaugenmerk auf neurologische Wirkungen als spezifischer Endpunkt gelegt; außerdem ist die Notwendigkeit einer sorgfältigen klinischen Beobachtung der Tiere zu betonen, um möglichst umfangreiche Daten zu erfassen. Die Methode sollte chemische Stoffe mit neurotoxischem Potenzial aufspüren, die dann gegebenenfalls eine eingehendere Untersuchung dieses Aspektes erfordern. Außerdem kann die Methode grundlegenden Aufschluss über immunologische Wirkungen ergeben.
10. Wenn keine Daten aus anderen Prüfungen zur Bewertung der systemischen Toxizität, der Reproduktions-/Entwicklungstoxizität, der Neurotoxizität und/oder der Immunotoxizität vorliegen, sind positive Ergebnisse hilfreich für eine erste Gefährdungsabschätzung und können bei Entscheidungen über die Notwendigkeit und die zeitliche Gestaltung weiterer Prüfungen berücksichtigt werden. Die Prüfung kann insbesondere als Bestandteil des SIDS-Dossiers (Screening Information Data Set) der OECD für die Bewertung existierender Chemikalien hilfreich sein, für die nur wenig oder keinerlei toxikologische

Informationen verfügbar sind; außerdem kann sie anstelle zweier getrennter Prüfungen zur Bewertung der Toxizität bei wiederholter Verabreichung (OECD TG 407, entsprechend Kapitel B.7 dieses Anhangs) bzw. der Reproduktions-/Entwicklungstoxizität (OECD TG 421, entsprechend Kapitel B.63 dieses Anhangs) durchgeführt werden. Ferner kann sie als Dosisfindungsstudie für umfassendere Untersuchungen der Reproduktions- und Entwicklungstoxizität dienen sowie dann durchgeführt werden, wenn sie aus sonstigen Gründen als relevant betrachtet wird.

11. Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass trächtige und nicht trächtige Tiere unterschiedlich empfindlich sind. Dosierungen, die sowohl zur Bewertung der allgemeinen systemischen Toxizität als auch der spezifischen Reproduktions-/Entwicklungstoxizität geeignet sind, sind daher mit dieser kombinierten Prüfung u. U. schwieriger zu ermitteln als mit einzelnen Prüfungen, die getrennt durchgeführt werden. Außerdem kann die Auswertung der Prüfergebnisse hinsichtlich der allgemeinen systemischen Toxizität schwieriger sein als bei Durchführung einer getrennten Prüfung mit wiederholter Verabreichung, insbesondere wenn in der Prüfung nicht gleichzeitig serumbezogene und histopathologische Parameter bewertet werden. In Anbetracht dieser technischen Schwierigkeiten erfordert die Durchführung dieser kombinierten Screening-Prüfung beträchtliche Erfahrung mit Toxizitätsprüfungen. Abgesehen von der geringeren Anzahl benötigter Prüftiere kann mit der kombinierten Prüfung allerdings möglicherweise besser zwischen direkten reproduktions-/entwicklungsbezogenen Wirkungen und Wirkungen unterschieden werden, die als sekundäre Wirkungen anderer (systemischer) Wirkungen zu betrachten sind.
12. Bei dieser Prüfung ist der Verabreichungszeitraum länger als bei einer herkömmlichen 28-Tage-Prüfung mit wiederholter Verabreichung. Allerdings werden von jedem Geschlecht pro Gruppe weniger Tiere verwendet als dann, wenn eine herkömmliche 28-Tage-Prüfung mit wiederholter Verabreichung zusätzlich zu einer Screening-Prüfung auf Reproduktions-/Entwicklungstoxizität durchgeführt wird.
13. Bei dieser Prüfmethode wird angenommen, dass die Prüfchemikalie oral verabreicht wird. Bei anderen Expositionswegen können Änderungen erforderlich sein.
14. Bevor die Prüfmethode an einem Gemisch für die Generierung von Daten für einen bestimmten Regulierungszweck verwendet wird, ist zu prüfen, ob sie für den beabsichtigten Zweck angemessene Ergebnisse liefern kann und, wenn dem so ist, warum. Solche Erwägungen entfallen, wenn die Prüfung des Gemischs rechtlich vorgeschrieben ist.
15. Die verwendeten Begriffe sind in Anlage 1 definiert.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

16. Die Prüfchemikalie wird verschiedenen Gruppen von männlichen und weiblichen Tieren in abgestuften Dosen verabreicht. Männlichen Tieren sollte die Prüfchemikalie mindestens vier Wochen bis zum Tag vor der vorgesehenen Tötung (einschließlich) verabreicht werden. (Dieser Zeitraum umfasst mindestens zwei Wochen vor der Paarung, die Paarungszeit und etwa zwei Wochen nach der Paarung). Wegen des begrenzten Verabreichungszeitraums vor der Paarung ist die Fruchtbarkeit bei männlichen Tieren möglicherweise kein besonders empfindlicher Indikator für eine testikuläre Toxizität. Daher ist eine eingehende histologische Untersuchung der Hoden von wesentlicher Bedeutung. Die Kombination eines Verabreichungszeitraums von zwei Wochen vor der Paarung mit anschließenden Beobachtungen des Paarungsverhaltens und der Fertilität mit einem Verabreichungszeitraum von insgesamt mindestens vier Wochen und einer anschließenden detaillierten Histopathologie der männlichen Keimdrüsen wird als ausreichend für den Nachweis der meisten Wirkungen auf die männliche Fruchtbarkeit und die Spermatogenese betrachtet.
17. Weiblichen Tieren sollte die Prüfchemikalie während der gesamten Dauer der Studie verabreicht werden. Dazu zählen zwei Wochen vor der Paarung (damit mindestens zwei vollständige Östruszyklen erfasst werden), die variable Zeit bis zur Empfängnis und die Dauer der Gravidität sowie mindestens 13 Tage nach der Geburt bis zum Tag vor der vorgesehenen Tötung (einschließlich).
18. Die Dauer der Studie nach der Eingewöhnung und einer Bewertung des Östruszyklus vor der Verabreichung der Prüfchemikalie hängt von der Leistungsfähigkeit des weiblichen Tiers ab; im Allgemeinen beträgt sie etwa 63 Tage [mindestens 14 Tage vor der Paarung, (bis zu) 14 Tage Paarungszeit, 22 Tage Gravidität, 13 Tage Laktation].
19. Während des Verabreichungszeitraums werden die Tiere täglich sorgfältig auf Toxizitätszeichen beobachtet. Tiere, die im Verlauf der Prüfung sterben, und vorzeitig getötete Tiere werden seziert; die nach Abschluss der Prüfung überlebenden Tiere werden getötet und ebenfalls seziert.

BESCHREIBUNG DER METHODE

Auswahl von Versuchstierarten

20. Diese Prüfmethode ist für die Verwendung von Ratten vorgesehen. Wenn die in dieser TG 422 genannten Parameter an einer anderen Nagetierart untersucht werden, ist dies ausführlich zu begründen. Im internationalen Validierungsprogramm für den Nachweis von endokrinen Disruptoren mit TG 407 wurde nur die Ratte als Versuchstier verwendet. Stämme mit geringer Fruchtbarkeit oder bekannter hoher Häufigkeit von Entwicklungsdefekten sind nicht zu verwenden. Es sind gesunde jungfräuliche Tiere zu verwenden, die zuvor nicht in anderen Versuchen eingesetzt wurden. Die Versuchstiere sind nach Tierart, Tierstamm, Geschlecht, Gewicht und Alter zu beschreiben. Bei Beginn der Studie sollten die Gewichtsunterschiede der Tiere möglichst gering sein und $\pm 20 \%$

des geschlechtsspezifischen Durchschnittsgewichts nicht überschreiten. Wenn die Studie als Vorstudie zu einer Langzeitstudie oder einer Eingenerationsstudie durchgeführt wird, sollten in beiden Studien vorzugsweise Tiere desselben Stamms und derselben Herkunft verwendet werden.

Haltung und Fütterung

21. Bei allen Verfahren sind die örtlichen Standards der Versuchstierpflege einzuhalten. Die Temperatur im Versuchstierraum sollte 22 °C (± 3 °C) betragen. Die relative Luftfeuchtigkeit sollte mindestens 30 % betragen und – außer beim Reinigen des Raums – 70 % nicht überschreiten. Die Beleuchtung sollte künstlich sein und die Hell- und Dunkelphasen sollten sich im Abstand von 12 Stunden abwechseln. An die Versuchstiere kann herkömmliches Laborfutter verfüttert werden, wobei eine unbegrenzte Trinkwasserversorgung zu gewährleisten ist. Die Auswahl des Futters wird eventuell dadurch beeinflusst, dass eine geeignete Beimischung der Prüfchemikalie sichergestellt werden muss, wenn die Prüfchemikalie auf diesem Weg verabreicht werden soll.
22. Die Tiere sollten in kleinen gleichgeschlechtlichen Gruppen untergebracht werden; sie können auch einzeln gehalten werden, wenn dies wissenschaftlich gerechtfertigt ist. Bei Gruppenhaltung sollten maximal fünf Tiere in einem Käfig untergebracht sein. Die Verpaarung erfolgt in für diesen Zweck geeigneten Käfigen. Trächtigen weiblichen Tieren sollte in Einzelhaltung Material für den Nestbau bereitgestellt werden. Säugende weibliche Tiere werden in Käfigen einzeln mit ihren Nachkommen gehalten.
23. Das Futter ist regelmäßig auf Schadstoffe zu analysieren. Eine Probe des Futters ist bis zur Fertigstellung des Abschlussberichts aufzubewahren.

Vorbereitung der Versuchstiere

24. Gesunde junge adulte Tiere werden randomisiert und in Behandlungsgruppen und auf Käfige verteilt. Die Käfige sind so aufzustellen, dass etwaige standortbedingte Auswirkungen möglichst gering sind. Die Tiere werden eindeutig gekennzeichnet und vor Beginn der Studie in ihren Käfigen über einen Zeitraum von mindestens fünf Tagen unter Laborbedingungen eingewöhnt.

Vorbereitung der Dosierung

25. Die Prüfchemikalie sollte oral verabreicht werden, wenn nicht andere Verabreichungswege als besser geeignet erscheinen. Auf oralem Weg wird die Prüfchemikalie gewöhnlich mit einer Sonde verabreicht. Alternativ können Prüfchemikalien aber auch über die Nahrung oder das Trinkwasser zugeführt werden.
26. Bei Bedarf wird der Prüfstoff in einem geeigneten Vehikel gelöst oder suspendiert. Es empfiehlt sich, nach Möglichkeit zunächst die Verwendung einer wässrigen Lösung/Suspension, dann eine Lösung/Suspension in Öl (z. B. Maisöl) und erst dann eine Lösung in einem anderen Vehikel in Betracht zu ziehen. Bei nicht wässrigen Vehikeln

müssen deren toxische Merkmale bekannt sein. Die Stabilität und die Homogenität der Prüfchemikalie in dem Vehikel sind zu bestimmen.

VERFAHREN

Anzahl und Geschlecht der Versuchstiere

27. Jede Gruppe sollte mit mindestens 10 männlichen und 12-13 weiblichen Tieren begonnen werden. Bei den weiblichen Tieren wird vor der Exposition der Östruszyklus untersucht, und Tiere, bei denen nicht der typische Zyklus von 4-5 Tagen festzustellen ist, werden nicht in die Studie einbezogen. Daher wird die Vorhaltung weiterer weiblicher Tiere empfohlen, damit pro Gruppe tatsächlich 10 weibliche Tiere verfügbar sind. Außer bei ausgeprägten toxischen Wirkungen dürften dann pro Gruppe mindestens 8 Graviditäten entstehen; dies ist gewöhnlich die erforderliche Mindestzahl an trächtigen Tieren pro Gruppe. So soll gewährleistet werden, dass genügend Graviditäten und Nachkommen erzeugt werden, um eine aussagekräftige Bewertung des Schädigungspotenzials der Prüfchemikalie in Bezug auf die Fertilität, die Gravidität, das Verhalten des Muttertiers, das Säugen, das Wachstum und die Entwicklung der F₁-Generation von der Empfängnis bis zu Tag 13 nach der Geburt vornehmen zu können. Sollen Tiere bereits im Verlauf der Prüfung getötet werden, ist die Anzahl der Tiere um die Zahl der Tiere zu erhöhen, die noch vor Abschluss der Studie getötet werden sollen. Zur Beobachtung der Reversibilität, der Persistenz oder des verzögerten Auftretens systemischer toxischer Wirkungen für mindestens 14 Tage nach der Behandlung ist die Einbeziehung einer zusätzlichen Satellitengruppe von fünf Tieren je Geschlecht in der Kontrollgruppe und in der Gruppe mit der höchsten Dosis in Betracht zu ziehen. Tiere der Satellitengruppen werden nicht verpaart und daher auch nicht für die Bewertung der Reproduktions-/Entwicklungstoxizität berücksichtigt.

Dosierung

28. Im Allgemeinen sollten mindestens drei Versuchsgruppen und eine Kontrollgruppe gewählt werden. Liegen keine geeigneten allgemeinen Toxizitätsdaten vor, kann eine Dosisfindungsstudie (Tiere desselben Stamms und derselben Herkunft) durchgeführt werden, um die zu verwendenden Dosen zu bestimmen. Abgesehen von der Behandlung mit der Prüfchemikalie sollten die Tiere in der Kontrollgruppe unter identischen Bedingungen behandelt werden wie die Versuchstiere in der Prüfgruppe. Wird der Prüfstoff mit einem Vehikel verabreicht, muss die Kontrollgruppe das Vehikel im höchsten verwendeten Volumen erhalten.
29. Bei der Wahl der Dosisstufen sollten sämtliche vorliegenden Daten zur Toxizität und (Toxiko)kinetik berücksichtigt werden. Außerdem sollte berücksichtigt werden, dass trächtige und nicht trächtige Tiere unterschiedlich empfindlich sein können. Die höchste Dosis sollte so gewählt werden, dass zwar toxische Wirkungen, aber keine Todesfälle oder

offensichtliches Leiden hervorgerufen werden. Anschließend sollte eine absteigende Folge von Dosisstufen gewählt werden, um dosisabhängige Wirkungen und die niedrigste Dosis ohne zu beobachtende schädliche Wirkungen nachzuweisen. Häufig sind zwei bis vier Intervalle optimal, und die Ergänzung durch eine vierte Versuchsgruppe ist häufig der Anwendung sehr langer Intervalle (z. B. größer als Faktor 10) zwischen den Verabreichungen vorzuziehen.

30. Bei allgemeiner Toxizität (z. B. vermindertes Körpergewicht, Wirkungen auf Leber, Herz, Lungen oder Nieren usw.) oder anderen Veränderungen, die möglicherweise keine toxischen Reaktionen darstellen (z. B. verminderte Futteraufnahme, Lebervergrößerung), sind die beobachteten Wirkungen auf endokrine Endpunkte mit Vorsicht zu bewerten.

Limit-Prüfung

31. Verursacht die Prüfung unter oraler Verabreichung einer Dosis von mindestens 1000 mg/kg Körpergewicht pro Tag bzw. eine entsprechende Konzentration im Futter (je nach Körpergewicht) unter Verwendung der für diese Studie beschriebenen Verfahren keine feststellbaren toxischen Wirkungen, und ist aufgrund der Daten strukturverwandter Stoffe keine Toxizität zu erwarten, kann auf eine vollständige Studie mit mehreren Dosisstufen gegebenenfalls verzichtet werden. Die Limit-Prüfung kann angebracht sein, es sei denn, die Exposition beim Menschen lässt die Prüfung bei einer höheren oralen Dosis angezeigt erscheinen. Bei anderen Verabreichungsformen, z. B. Inhalation oder dermale Applikation, wird die maximal erzielbare Exposition in vielen Fällen durch die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Prüfchemikalien bestimmt.

Verabreichung der Dosen

32. Den Tieren wird die Prüfchemikalie für die Dauer einer Woche (7 Tage) täglich verabreicht. Wird der Prüfstoff über eine Sonde verabreicht, so sollte dies in einer einmaligen Dosis unter Verwendung einer Schlundsonde oder einer geeigneten Intubationskanüle erfolgen. Das maximale Flüssigkeitsvolumen, das einem Versuchstier jeweils verabreicht werden kann, hängt von der Größe des Versuchstiers ab. Das Volumen sollte 1 ml/100 g Körpergewicht nicht überschreiten, bei wässrigen Lösungen können aber auch 2 ml/100 g Körpergewicht in Betracht gezogen werden. Außer bei reizenden oder ätzenden Prüfchemikalien, die in der Regel bei höheren Konzentrationen eine Verschlimmerung bewirken, sollte die Variabilität des Prüfvolumens durch Anpassung der Konzentration möglichst gering gehalten werden, um ein konstantes Volumen bei allen Dosen zu gewährleisten.
33. Bei mit dem Futter oder dem Trinkwasser verabreichten Prüfchemikalien ist unbedingt sicherzustellen, dass die Mengen der jeweiligen Prüfchemikalie die normale Nahrungsaufnahme oder den Wasserhaushalt nicht beeinträchtigen. Wenn die Prüfchemikalie im Futter verabreicht wird, kann entweder eine konstante Konzentration im Futter (ppm) oder eine konstante Dosis, bezogen auf das Körpergewicht des Tieres,

verwendet werden; die jeweils gewählte Verfahrensweise sollte angegeben werden. Eine mit einer Magensonde verabreichte Dosis sollte jeweils zu denselben Tageszeiten gegeben und mindestens einmal pro Woche so angepasst werden, dass eine konstante Dosis im Verhältnis zum Körpergewicht aufrechterhalten wird. Wird die kombinierte Prüfung als Vorstudie für eine Langzeitstudie über chronische Toxizität verwendet, sollte in beiden Prüfungen die gleiche Nahrung verabreicht werden.

Versuchsplan

34. Die Verabreichung sollte für beide Geschlechter mindestens 2 Wochen vor der Paarung beginnen, nachdem sich die Tiere mindestens 5 Tage lang eingewöhnt haben und nachdem die weiblichen Tiere auf einen normalen Östruszyklus (in einem 2-wöchigen Zeitraum vor der Behandlung) untersucht wurden. Die Studie sollte so geplant werden, dass mit der Bewertung des Östruszyklus bald nach Erreichen der vollständigen Geschlechtsreife begonnen wird. Der Beginn dieser Zeiträume kann je nach Rattenstämmen in den einzelnen Labors leicht variieren und beispielsweise bei Sprague-Dawley-Ratten bei einem Alter von 10 Wochen und bei Wistar-Ratten etwa bei einem Alter von 12 Wochen liegen. Muttertiere sollten an Tag 13 nach der Geburt oder kurz darauf getötet werden. Um eine nächtliche Futterkarenz der Muttertiere vor der Blutentnahme (wenn diese Option bevorzugt wird) zu ermöglichen, müssen Muttertiere und ihre Nachkommen nicht unbedingt am selben Tag getötet werden. Der Tag der Geburt (d. h. der Tag, an dem der Geburtsvorgang abgeschlossen wurde) wird als Tag 0 nach der Geburt bezeichnet. Weibliche Tiere, bei denen keine Besamung festzustellen ist, werden 24-26 Tage nach dem letzten Tag der Paarungszeit getötet. Die Verabreichung wird bei beiden Geschlechtern während der Paarungszeit fortgesetzt. Männliche Tiere werden auch nach der Paarungszeit noch mindestens über den vollständigen Verabreichungszeitraum von 28 Tagen behandelt. Anschließend werden sie getötet oder alternativ weiter gehalten und behandelt, damit eine zweite Paarung erfolgen kann, wenn dies als angemessen betrachtet wird.
35. Die tägliche Behandlung der weiblichen Muttertiere sollte während der Gravidität sowie mindestens bis zu Tag 13 nach der Geburt bzw. zum Tag vor der Tötung (einschließlich) fortgesetzt werden. Bei Studien, bei denen die Prüfchemikalie durch Inhalation oder dermal verabreicht wird, sollte die Verabreichung mindestens bis zu Tag 19 der Trächtigkeit (einschließlich) fortgesetzt und so bald wie möglich (spätestens an Tag 4 nach der Geburt (PND 4)) wieder aufgenommen werden.
36. Tiere in einer Satellitengruppe, bei denen Nachfolgebeobachtungen vorgesehen sind, (wenn überhaupt berücksichtigt) werden nicht verpaart. Sie sollten für mindestens weitere 14 Tage nach der ersten vorgesehenen Tötung von Muttertieren ohne Behandlung gehalten werden, um ein verzögertes Auftreten, die Persistenz oder die Reversibilität toxischer Wirkungen festzustellen.
37. Der Versuchsplan ist in Anlage 2 in einem Diagramm dargestellt.

Östruszyklen

38. Östruszyklen sollten vor Beginn der Behandlung überwacht werden, damit für die Studie weibliche Tiere mit regelmäßigem Zyklus ausgewählt werden können (Nummer 27). Außerdem sollten ab Beginn des Behandlungszeitraums bis zu Anzeichen für eine Besamung täglich Vaginalabstriche untersucht werden. Wenn Bedenken hinsichtlich akuter Auswirkungen von Stress bestehen, die bei Beginn der Verabreichung die Östruszyklen verändern könnten, können die Versuchstiere in den Labors zwei Wochen behandelt werden, um anschließend die Östruszyklen vor der Paarungszeit über mindestens zwei Wochen und anschließend bis zu Anzeichen für eine Besamung in der Paarungszeit anhand täglicher Vaginalabstriche zu überwachen. Bei der Entnahme vaginaler/zervikaler Zellen ist sorgfältig darauf zu achten, dass die Schleimhaut nicht gereizt wird, damit es nicht zu Pseudograviditäten kommt (8) (9).

Verpaarung

39. In der Regel sollten bei dieser Studie männliche und weibliche Tiere im Verhältnis 1:1 (ein männliches auf ein weibliches Tier) eingesetzt werden. Ausnahmen können sich gelegentlich ergeben, wenn männliche Tiere sterben. Das weibliche Tier sollte mit demselben männlichen Tier gehalten werden, bis Anzeichen für eine Paarung festgestellt werden bzw. bis zwei Wochen vergangen sind. Jeden Morgen werden die weiblichen Tiere auf Sperma oder Vaginalpfropfe untersucht. Tag 0 der Trächtigkeit ist der Tag, an dem die Besamung (durch Vaginalpfropf oder Spermaspuren) nachgewiesen werden kann. Bei einer erfolglosen Verpaarung kann gegebenenfalls die erneute Verpaarung weiblicher Tiere mit bewährten männlichen Tieren der gleichen Gruppe erwogen werden.

Wurfgröße

40. Am PND 4 kann die Größe eines jeden Wurfs angepasst werden, indem überschüssige Jungtiere nach dem Zufallsprinzip aussortiert werden, um je nach normalem Umfang eines Wurfs beim verwendeten Rattenstamm pro Wurf nach Möglichkeit vier oder fünf Jungtiere pro Geschlecht und Wurf zu erhalten. Von zwei der überschüssigen Jungtiere sollten Blutproben entnommen, in Pools zusammengefasst und zur Bestimmung von Serumspiegeln (T4) verwendet werden. Die selektive Eliminierung von Jungtieren, z. B. auf der Grundlage des Körpergewichts oder des anogenitalen Abstands (AGD), wird nicht empfohlen. Wenn es wegen der Anzahl männlicher bzw. weiblicher Jungtiere nicht möglich ist, pro Wurf jeweils vier oder fünf Jungtiere eines jeden Geschlechts zu erhalten, ist auch eine grobe Anpassung (beispielsweise sechs männliche und vier weibliche Tiere) akzeptabel. Wenn die Anzahl der Tiere eines Wurfs die Eliminierungsgrenze (8 oder 10 Jungtiere pro Wurf) unterschreitet, werden keine Jungtiere aussortiert. Wenn die Anzahl der Jungtiere um nur ein Tier über der Eliminierungsgrenze liegt, wird nur ein Jungtier aussortiert und zur Blutentnahme für mögliche Bewertungen der Serumspiegel (T4) verwendet.

41. Wenn die Größe des Wurfs nicht geändert wird, werden an Tag 4 nach der Geburt zwei Jungtiere pro Wurf human getötet und Blutproben zur Bestimmung der Konzentration der Schilddrüsenhormone im Serum entnommen. Nach Möglichkeit sollten diese zwei Jungtiere je Wurf zwei weibliche Jungtiere sein, damit männliche Jungtiere zur Prüfung der Brustwarzenretention aufgespart werden können, es sei denn, dass nach dem Aussortieren dieser Jungtiere keine weiblichen Tiere zur abschließenden Bewertung mehr verbleiben würden. Es werden keine Jungtiere aussortiert, wenn die Größe des Wurfs dadurch auf weniger als 8 bzw. 10 Jungtiere sinkt (je nach Größe eines normalen Wurfs beim betreffenden Rattenstamm). Wenn die Anzahl der Jungtiere um nur ein Tier über der normalen Größe eines Wurfs liegt, wird nur ein Jungtier aussortiert und zur Blutentnahme für mögliche Bewertungen der Serumspiegel (T4) verwendet.

Beobachtungen

42. Allgemeine klinische Beobachtungen sollten mindestens einmal täglich, vorzugsweise jeweils zur gleichen Zeit, und unter Berücksichtigung des voraussichtlichen Zeitraums nach der Verabreichung vorgenommen werden, in welchem der Wirkungsgipfel zu erwarten ist. Der Gesundheitszustand der Tiere ist zu dokumentieren. Mindestens zweimal täglich erfolgt eine Beobachtung aller Tiere auf Erkrankungen oder Todesfälle.
43. Bei allen Muttertieren sollte einmal vor der Exposition (um intraindividuelle Vergleiche zu ermöglichen) und danach mindestens einmal wöchentlich eine eingehende klinische Untersuchung erfolgen. Die Beobachtungen sind außerhalb des Käfigs, in dem die Tiere gehalten werden, in stets gleicher Umgebung und vorzugsweise stets zur gleichen Zeit täglich vorzunehmen. Sie sind sorgfältig zu dokumentieren, am besten nach einer speziell vom Prüflabor entwickelten Bewertungsskala. Durch geeignete Maßnahmen ist sicherzustellen, dass die Prüfbedingungen möglichst konstant bleiben und dass die Beobachtungen vorzugsweise durch Untersucher erfolgen, denen die Behandlung der Tiere nicht bekannt ist. Zu achten ist insbesondere auf Veränderungen an Haut, Fell, Augen, Schleimhäuten, auf Sekrete und Exkrete und auf autonome Aktivitäten (z. B. Tränensekretion, Piloerektion, Pupillengröße, ungewöhnliche Atemmuster). Gang- und Haltungsstörungen, ferner Reaktionen auf die Behandlung der Tiere sowie etwaige klonische oder tonische Bewegungen, Stereotypien (z. B. übermäßiges Putzen, wiederholte Kreisbewegungen), schwere oder verzögerte Geburt oder abnormes Verhalten (z. B. Selbstverstümmelung, Rückwärtsgehen) sollten ebenfalls dokumentiert werden (10).
44. Einmal während der Untersuchung sollte bei fünf männlichen und fünf weiblichen Tieren, die zufällig aus den Gruppen ausgewählt wurden, die sensorische Reaktivität auf Reize verschiedener Art (z. B. akustische, visuelle und propriozeptive Reize) (8) (9) (11), die Greifkraft (12) und die motorische Aktivität (13) bewertet werden. Weitere Einzelheiten zu den möglichen Untersuchungen finden sich in der Literatur. Allerdings können auch andere als dort genannte Verfahren angewendet werden. Bei männlichen Tieren sollten diese funktionellen Beobachtungen gegen Ende des Verabreichungszeitraums kurz vor der

vorgesehenen Tötung und in jedem Fall vor der Blutentnahme zur hämatologischen und klinisch-chemischen Untersuchung erfolgen (Nummern 53-56 einschließlich Fußnote 1). Weibliche Tiere sollten sich bei diesen Funktionsprüfungen in einem physiologisch ähnlichen Zustand befinden und vorzugsweise einmal in der letzten Woche der Laktation (z. B. LD 6-13) kurz vor der vorgesehenen Tötung untersucht werden. Die Zeiträume der Trennung von Muttertieren und Jungtieren sollten möglichst kurz sein.

45. Die einmalig gegen Ende der Untersuchung vorgenommenen funktionellen Beobachtungen können bei Vorstudien für eine nachfolgende Prüfung auf subchronische Toxizität (90 Tage) und bei Langzeitstudien entfallen. In diesem Fall sollten die funktionellen Beobachtungen im Rahmen dieser Folgestudie vorgenommen werden. Andererseits könnten die Daten über funktionelle Beobachtungen aus der Untersuchung mit wiederholter Verabreichung aber die Wahl der Dosisstufen für eine nachfolgende Prüfung auf subchronische oder langfristige Toxizität erleichtern.
46. In Ausnahmefällen können funktionelle Beobachtungen auch bei Gruppen entfallen, die so starke sonstige Toxizitätsanzeichen aufweisen, dass die Leistungen in Funktionsprüfungen dadurch signifikant beeinträchtigt würden.
47. Die Trächtigkeitsdauer wird von Tag 0 der Gravidität an berechnet und sollte vermerkt werden. Jeder Wurf ist so bald wie möglich nach der Geburt zu untersuchen, um die Anzahl und das Geschlecht der Nachkommen, Totgeburten, Lebendgeburten und Kümmerlinge (Jungtiere, die erheblich kleiner sind als Jungtiere einer vergleichbaren Kontrollgruppe) sowie auffallende Anomalien feststellen zu können.
48. Innerhalb von 24 Stunden nach der Geburt (Tag 0 oder Tag 1 nach der Geburt) und mindestens an den Tagen 4 und 13 nach der Geburt sollten lebende Jungtiere gezählt und nach Geschlechtern unterschieden und die Würfe jeweils gewogen werden. Zusätzlich zu den Beobachtungen bei Elterntieren (Nummern 43 und 44) sollte ungewöhnliches Verhalten der Nachkommen dokumentiert werden.
49. Der anogenitale Abstand (AGD) sollte bei jedem Jungtier zwischen PND 0 und PND 4 am selben Tag gemessen werden. Das Körpergewicht des Jungtiers wird am Tag der Messung des AGD erfasst, der auf Jungtiergröße — vorzugsweise die Quadratwurzel des Körpergewichts — genormt sein sollte (14). Die Anzahl der Brustwarzen/Warzenhöfe bei männlichen Jungtieren ist wie in OECD GD 151 empfohlen an PND 12 oder 13 zu kontrollieren (15).

Körpergewicht und Futter-/Trinkwasserverbrauch

50. Männliche und weibliche Tiere der P-Generation müssen am ersten Tag der Behandlung und anschließend mindestens in wöchentlichen Abständen sowie bei Versuchsende gewogen werden. Während der Gravidität sollten weibliche Tiere an den Tagen 0, 7, 14 und 20 sowie innerhalb von 24 Stunden nach der Geburt (Tag 0 oder Tag 1 nach der

Geburt) und mindestens an den Tagen 4 und 13 nach der Geburt gewogen werden. Diese Beobachtungen sind für jedes ausgewachsene Tier einzeln zu protokollieren.

51. Vor der Paarung, vor der Gravidität und vor der Laktation sollte die Futteraufnahme mindestens einmal wöchentlich gemessen werden. Die Messung der Futteraufnahme während der Paarungszeit ist fakultativ. Wenn die Prüfchemikalie mit dem Trinkwasser verabreicht wird, sollte in diesen Zeiträumen auch die Wasseraufnahme gemessen werden.

Hämatologie

52. Bei fünf männlichen und fünf weiblichen Tieren, die aus jeder Gruppe zufällig ausgewählt wurden, sollten während der Untersuchung einmal die folgenden hämatologischen Parameter bestimmt werden: Hämatokrit, Hämoglobinkonzentration, Erythrozytenzahl, Retikulozyten, Gesamt- und Differential-Leukozytenzahl, Thrombozytenzahl und Blutgerinnungszeit/-fähigkeit. Wenn die Prüfchemikalie oder ihre möglichen Metaboliten oxidierende Eigenschaften haben oder diese vermutet werden, sollten zusätzlich die Methämoglobinkonzentration und die Heinz-Körper bestimmt werden.
53. Blutproben sollten an einer benannten Stelle entnommen werden. Die weiblichen Tiere sollten sich bei der Entnahme der Proben in einem physiologisch ähnlichen Zustand befinden. Um bei der praktischen Handhabung Schwierigkeiten aufgrund des unterschiedlichen Beginns der Trächtigkeit zu vermeiden, kann die Blutentnahme bei weiblichen Tieren alternativ zur Probenahme unmittelbar vor dem Verfahren zur humanen Tötung der Tiere bzw. im Rahmen des Verfahrens ausschließlich am Ende des Zeitraums vor der Paarung erfolgen. Bei männlichen Tieren sollten die Blutproben vorzugsweise unmittelbar vor dem Verfahren zur humanen Tötung der Tiere bzw. im Rahmen des Verfahrens entnommen werden. Alternativ kann die Blutentnahme bei männlichen Tieren auch am Ende des Zeitraums vor der Paarung erfolgen, wenn dieser Zeitpunkt auch für die weiblichen Tiere angenommen wurde.
54. Die Blutproben sind unter geeigneten Bedingungen zu lagern.

Klinisch-biochemische Untersuchungen

55. Klinisch-biochemische Bestimmungen zur Untersuchung der wichtigsten toxischen Wirkungen in Geweben, insbesondere der Wirkungen auf Nieren und Leber, sind an Blutproben durchzuführen, die von den ausgewählten fünf männlichen und fünf weiblichen Tieren je Gruppe entnommen werden. Es empfiehlt sich eine Futterkarenz der Tiere über Nacht, bevor die Blutproben entnommen werden.¹ Die Plasma- oder Serumuntersuchungen

¹ Für eine Reihe von Serum- und Plasmabestimmungen, insbesondere der Glucose, ist eine Futterkarenz der Tiere über Nacht zu empfehlen. Der Hauptgrund dafür ist, dass die bei fehlender Futterkarenz unweigerlich

sollten die Parameter Natrium, Kalium, Glucose, Gesamtcholesterin, Harnstoff, Kreatinin, Gesamtprotein und Albumin, mindestens zwei Enzyme, die auf hepatozelluläre Wirkungen schließen lassen, (wie Alanin-Aminotransferase, Aspartat-Aminotransferase und Sorbitolhydrogenase) sowie Gallensäuren umfassen. Die Bestimmung weiterer Enzyme (aus der Leber oder anderen Organen) sowie von Bilirubin kann unter bestimmten Umständen ebenfalls wertvolle Hinweise liefern.

56. Nach dem folgenden Plan werden Blutproben an einer vorgegebenen Stelle entnommen:

- von mindestens zwei Jungtieren pro Wurf an Tag 4 nach der Geburt, wenn die Anzahl der Jungtiere dies zulässt (Nummern 40 und 41),
- von allen Muttertieren und von mindestens zwei Jungtieren pro Wurf bei Beendigung des Versuchs an Tag 13 und
- von allen adulten männlichen Tieren bei Beendigung des Versuchs.

Alle Blutproben werden unter geeigneten Bedingungen gelagert. Bei Blutproben der Jungtiere von Tag 13 sowie bei Blutproben der adulten männlichen Tiere werden die Serumspiegel auf Schilddrüsenhormone (T4) untersucht. Wenn relevant, wird außerdem eine Bewertung von T4 bei Blutproben der Muttertiere sowie bei Jungtieren an Tag 4 vorgenommen. Ebenfalls wenn relevant können auch weitere Hormone gemessen werden. Das Blut der Jungtiere kann zur Analyse der Schilddrüsenhormone nach Würfen zu Pools zusammengefasst werden. Die Schilddrüsenhormone (T4 und TSH) sollten vorzugsweise „insgesamt“ gemessen werden.

57. Optional können in der letzten Woche der Studie am Urin, der zu festgelegten Zeiten gesammelt wird, bei fünf zufällig ausgewählten männlichen Tieren je Gruppe folgende Parameter untersucht werden: Aussehen, Volumen, Osmolalität oder spezifisches Gewicht, pH-Wert, Eiweiß, Glucose und Blut/Blutzellen.

58. Darüber hinaus sollten Untersuchungen zur Bestimmung von Serummarkern für eine allgemeine Gewebeschädigung erwogen werden. Des Weiteren sollten, wenn die bekannten Eigenschaften der Prüfchemikalie im Verdacht stehen, die entsprechenden

zunehmende Variabilität zu einer Maskierung subtilerer Wirkungen führen und die Interpretation erschweren könnte. Andererseits jedoch kann die nächtliche Futterkarenz den allgemeinen Stoffwechsel der (trächtigen) Tiere beeinflussen, die Laktation und die Brutpflege sowie, insbesondere in Futterstudien, die tägliche Exposition gegenüber der Prüfchemikalie beeinträchtigen. Wenn die nächtliche Futterkarenz gewählt wird, sollten die klinisch-biochemischen Parameter nach Durchführung der funktionellen Beobachtungen bei den männlichen Tieren in Woche 4 der Studie bestimmt werden. Die weiblichen Tiere sollten nach der Trennung von den Jungtieren (z. B. an PND 13) noch einen weiteren Tag gehalten werden. Muttertiere sollten ab Laktationstag 13-14 über Nacht kein Futter mehr erhalten, und für die Bestimmung der klinisch-chemischen Parameter sollten vor der Tötung entnommene Blutproben verwendet werden.

Stoffwechselprofile zu beeinflussen, die Parameter Calcium, Phosphat, Nüchtern-Triglyzeride und -Glucose, spezifische Hormone, Methämoglobin und Cholinesterase bestimmt werden. Die Bestimmung muss auf Einzelfallbasis erfolgen.

59. Die folgenden Faktoren können die Variabilität und die absoluten Konzentrationen der Hormonbestimmungen beeinflussen:
- der Zeitpunkt der Tötung wegen Schwankungen der Hormonkonzentrationen im Tagesverlauf,
 - Methode der Tötung, die gewählt wird, um übermäßigen Stress für die Tiere zu vermeiden, der die Hormonkonzentrationen beeinflussen könnte,
 - Testkits für Hormonbestimmungen mit unterschiedlichen Standardkurven.
60. Plasmaproben, die speziell zur Hormonbestimmung vorgesehen sind, sollten immer zur gleichen Tageszeit gewonnen werden. Die verschiedenen im Handel erhältlichen Assay-Kits können bei der Analyse der Hormonkonzentration unterschiedliche numerische Werte ergeben.
61. Erweisen sich die vorliegenden Ausgangsdaten als ungeeignet, sollte eine Bestimmung hämatologischer und klinisch-biochemischer Parameter vor Versuchsbeginn oder vorzugsweise an einer nicht in die Versuchsgruppen einbezogenen Gruppe von Tieren in Betracht gezogen werden. Für weibliche Tiere müssen die Daten während der Laktation ermittelt werden.

PATHOLOGIE

Autopsie

62. Alle Versuchstiere sollten einer vollständigen, eingehenden Autopsie unterzogen werden. Sie umfasst eine sorgfältige Untersuchung der äußeren Körperoberfläche, aller Körperöffnungen sowie der Hirn-, Brust- und Bauchhöhle und ihres Inhalts. Dabei ist besonders auf die Organe des Fortpflanzungssystems zu achten. Die Anzahl der Implantationsstellen sollte vermerkt werden. Am Tag der Sektion ist ein Vaginalabstrich zu untersuchen, um das Stadium des Östruszyklus zu bestimmen und eine Korrelation zur histopathologischen Untersuchung der weiblichen Fortpflanzungsorgane zu ermöglichen.
63. Die Hoden und die Nebenhoden sowie die Prostata und die Samenbläschen zusammen mit den Koagulationsdrüsen aller adulten männlichen Tiere sollten ggf. von anhaftendem Gewebe befreit und möglichst umgehend nach der Sektion gewogen werden, bevor das Material eintrocknet. Als Organgewichte können ferner die Gewichte des Muskelkomplex Levator ani/bulbospongiosus, der Cowperschen Drüsen und der Glans penis bei männlichen Tieren sowie der Ovarien (Nassgewicht) und des Uterus mit Zervix bei weiblichen Tieren gemessen werden; wenn diese Gewichte berücksichtigt werden sollen, sollten die Messungen möglichst umgehend nach der Sektion vorgenommen werden. Von

allen adulten Tieren sollten die Ovarien, Hoden, Nebenhoden, akzessorischen Geschlechtsorgane und alle Organe aufbewahrt werden, die makroskopische Veränderungen aufweisen.

64. Von allen adulten männlichen und weiblichen Tieren sowie von einem männlichen und einem weiblichen Jungtier an Tag 13 je Wurf sollten die Schilddrüsen in dem am besten geeigneten Fixierungsmittel für die vorgesehene histopathologische Untersuchung aufbewahrt werden. Das Gewicht der Schilddrüse kann nach der Fixierung bestimmt werden. Anhaftendes Gewebe ist sehr vorsichtig und erst nach der Fixierung zu entfernen, um Gewebeschäden zu vermeiden. Eine Gewebeschädigung könnte die histopathologische Analyse beeinträchtigen. Die Blutproben müssen an einer benannten Stelle unmittelbar vor oder bei der Tötung der Tiere entnommen und fachgerecht gelagert werden (Nummer 56).
65. Außerdem sollten bei mindestens fünf zufällig ausgewählten adulten männlichen und weiblichen Tieren je Gruppe (außer bei moribunden Tieren und/oder bei vor Ende der Untersuchung human getöteten Tieren) Leber, Nieren, Nebennieren, Thymus, Milz, Hirn und Herz von anhaftendem Gewebe befreit und möglichst umgehend nach der Sektion gewogen werden, bevor das Material eintrocknet. Die folgenden Gewebe sind in dem für die betreffende Gewebeart und die vorgesehene anschließende histopathologische Untersuchung am besten geeigneten Fixierungsmittel aufzubewahren: alle Gewebe mit makroskopischen Veränderungen, Hirn (typische Regionen einschließlich Cerebrum, Cerebellum und Pons), Rückenmark, Auge, Magen, Dünn- und Dickdarm (mit Peyer'schen-Platten), Leber, Nieren, Nebennieren, Milz, Herz, Thymus, Trachea und Lungen (konserviert durch Inflation mit Fixierungsmittel und Immersion), Gonaden (Hoden und Ovarien), akzessorische Geschlechtsorgane (Uterus und Zervix, Nebenhoden, Prostata und Samenbläschen mit Koagulationsdrüsen), Vagina, Harnblase, Lymphknoten (je nach Erfahrung des Labors sollte neben dem proximalsten drainierenden Lymphknoten ein weiterer Lymphknoten entnommen werden (16)), periphere Nerven (N. ischiadicus oder N. tibialis) vorzugsweise in der Nähe des Muskels, Skelettmuskel und Knochen mit Knochenmark (Schnitt oder wahlweise ein frisch fixiertes Knochenmarkspirat). Es wird empfohlen, die Hoden durch Immersion in Bouin'scher Lösung oder modifizierter Davidson-Lösung zu fixieren (16) (17) (18). Eine Fixation in Formalin ist für diese Gewebe nicht zu empfehlen. Um ein rasches Eindringen des Fixierungsmittels zu ermöglichen, kann die Tunica albuginea an beiden Enden des Organs vorsichtig und flach mit einer Nadel punktiert werden. Die klinischen und sonstigen Befunde können weitere Gewebeuntersuchungen erforderlich machen. Auch Organe, die aufgrund der bekannten Eigenschaften des Prüfstoffs als mögliche Zielorgane in Frage kommen, sollten aufbewahrt werden.
66. Die folgenden Gewebe können wichtige Hinweise auf endokrine Wirkungen geben: Gonaden (Ovarien und Hoden), akzessorische Geschlechtsorgane (Uterus mit Zervix, Nebenhoden, Samenbläschen mit Koagulationsdrüsen, Prostata dorsolateral und ventral), Vagina, Hypophyse, männliche Brustdrüse und Nebennieren. Veränderungen der

männlichen Brustdrüsen sind nicht ausreichend dokumentiert, bei diesem Parameter können aber sehr empfindliche Reaktionen auf Stoffe mit östrogener Wirkung vorkommen. Die Beobachtung von nicht unter Nummer 65 genannten Organen/Geweben ist fakultativ.

67. Tote Jungtiere und Jungtiere, die an Tag 13 nach der Geburt oder kurz danach getötet wurden, sollten zumindest äußerlich sorgfältig auf auffallende Anomalien untersucht werden. Besondere Beachtung erfordern die externen Genitalien, die auf Anzeichen für eine veränderte Entwicklung zu untersuchen sind.

Histopathologie

68. Die konservierten Organe und Gewebe der ausgewählten Tiere der Kontrollgruppe und der Hochdosisgruppe (unter besonderer Berücksichtigung der Spermatogenese in den männlichen Keimdrüsen und der Histopathologie der interstitiellen testikulären Zellstruktur) sollten einer vollständigen histopathologischen Untersuchung unterzogen werden. Die Schilddrüsen von Jungtieren und von den übrigen adulten Tieren können erforderlichenfalls untersucht werden. Diese Untersuchungen sind auch auf die Tiere anderer Dosisgruppen auszudehnen, wenn behandlungsbedingte Veränderungen in der Gruppe mit der höchsten Dosis festgestellt werden. Der Leitfaden zur Histopathologie (10) enthält zusätzliche Informationen zur Sektion, Fixierung, Schnittherstellung und Histopathologie endokriner Gewebe.
69. Alle makroskopischen Läsionen sind zu untersuchen. Um die Ermittlung der Konzentration ohne beobachtete schädliche Wirkungen (NOAEL) zu erleichtern, sollten Zielorgane in anderen Dosisgruppen untersucht werden, insbesondere in Gruppen, für die niedrige NOAEL-Werte angegeben wurden.
70. Umfasst eine Prüfung auch eine Satellitengruppe, sind bei den Tieren dieser Gruppe die Gewebe und Organe histopathologisch zu untersuchen, bei denen in den Behandlungsgruppen Wirkungen aufgetreten sind.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Daten

71. Es sollten Daten zu den einzelnen Tieren bereitgestellt werden. Außerdem sollten sämtliche Daten in tabellarischer Form zusammengefasst werden; dabei werden für jede Prüfgruppe die Anzahl der Tiere zu Beginn der Prüfung, die Anzahl der während der Prüfung tot aufgefundenen Tiere beziehungsweise der aus humanen Gründen getöteten Tiere, der jeweilige Zeitpunkt des Todes beziehungsweise der Tötung, die Anzahl der fruchtbaren Tiere, die Anzahl der trächtigen weiblichen Tiere, die Anzahl der Tiere mit Anzeichen von Toxizität, eine Beschreibung der beobachteten Anzeichen von Toxizität, einschließlich des Zeitpunkts, zu dem die toxischen Wirkungen eingetreten sind, deren Dauer und Schweregrad, die Arten von histopathologischen Veränderungen und alle relevanten Daten zu den Würfen angegeben. Anlage 3 enthält ein tabellarisches

Berichtsformat, das sich als sehr hilfreich für die Evaluierung der reproduktions- bzw. entwicklungstoxischen Wirkungen erwiesen hat.

72. Wenn möglich, sollten die numerischen Ergebnisse mittels einer geeigneten und allgemein anerkannten statistischen Methode ausgewertet werden. Durch Vergleiche der Wirkungen in einem Dosisbereich sollte die Anwendung multipler t-Tests vermieden werden. Die statistischen Methoden sollten bei der Planung der Studie festgelegt werden. Statistische Analysen des AGD und der Brustwarzenretention sollten auf den Daten einzelner Jungtiere unter Berücksichtigung der Wurfgröße beruhen. Gegebenenfalls sind die jeweiligen Würfe als Analyseeinheit anzunehmen. Statistische Analysen des Körpergewichts der Jungtiere sollten auf den Daten einzelner Jungtiere unter Berücksichtigung der Wurfgröße beruhen. Wegen des begrenzten Umfangs der Studie sind statistische Analysen in Form von „Signifikanzprüfungen“ für viele Endpunkte, insbesondere für reproduktionsbezogene Endpunkte, nur von begrenzter Bedeutung. Einige der am weitesten verbreiteten Methoden, besonders parametrische Untersuchungen anhand von Maßen der zentralen Tendenz, sind nicht geeignet. Wenn statistische Analysen durchgeführt werden, sollte die gewählte Methode der Verteilung der zu untersuchenden Variable angemessen sein und vor Beginn der Studie festgelegt werden.

Auswertung der Ergebnisse

73. Die Befunde dieser Toxizitätsstudie sind im Hinblick auf die beobachteten Wirkungen sowie auf Nekropsie- und Mikroskopiebefunde zu bewerten. Die Bewertung beinhaltet den vorhandenen beziehungsweise nicht vorhandenen Zusammenhang zwischen der Dosierung der Prüfchemikalie und vorhandenen Anomalien sowie deren Häufigkeit und Schwere, einschließlich makroskopischer Läsionen, identifizierter Zielorgane, Unfruchtbarkeit, klinischer Anomalien, beeinträchtigter Reproduktions- und Wurfleistungen, Körpergewichtsveränderungen, Auswirkungen auf die Mortalität und etwaiger sonstiger toxischer Auswirkungen.
74. Wegen der kurzen Dauer der Behandlung der männlichen Tiere sollte bei der Bewertung der reproduktionstoxischen Wirkungen bei männlichen Tieren die Histopathologie der Hoden und der Nebenhoden zusammen mit den Fertilitätsdaten berücksichtigt werden. Die Einbeziehung verfügbarer historischer Kontrolldaten zur Reproduktions-/Entwicklungstoxizität (z. B. für Wurfgröße, AGD, Brustwarzenretention und Serumspiegel (T4)) kann bei der Auswertung der Studie ebenfalls hilfreich sein.
75. Für die Qualitätskontrolle wird vorgeschlagen, historische Kontrolldaten zu sammeln und Variationskoeffizienten für numerische Daten zu berechnen, insbesondere für die Parameter, die mit dem Nachweis der Störung des endokrinen Systems zusammenhängen. Diese Daten können für Vergleichszwecke verwendet werden, wenn tatsächliche Studien bewertet werden.

Prüfbericht

76. Der Prüfbericht sollte folgende Angaben enthalten:

Prüfchemikalie:

- Herkunft, Partienummer, ggf. begrenztes Verwendungsdatum;
- Stabilität der Prüfchemikalie, falls bekannt.

Einkomponentiger Stoff:

- physikalisches Erscheinungsbild, Wasserlöslichkeit und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften;
- chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS-Bezeichnung, CAS-Nummer, SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel, Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.

Mehrkomponentiger Stoff, UVCB-Stoffe und Gemische:

- möglichst weitgehende Charakterisierung anhand der chemischen Zusammensetzung (siehe oben), das quantitative Vorkommen und die relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften der einzelnen Komponenten.

Vehikel (wenn verwendet):

- Begründung der Auswahl des Vehikels, falls kein Wasser verwendet wurde.

Versuchstiere:

- Tierart/Stamm,
- Anzahl, Alter und Geschlecht der Tiere;
- Herkunft der Tiere, Haltungsbedingungen, Futter usw.;
- Gewicht der einzelnen Tiere bei Versuchsbeginn;
- Begründung für die Wahl einer anderen Art als der Ratte.

Prüfbedingungen:

- Begründung der gewählten Dosisstufen;
- Angaben zur Zubereitungsform des Prüfstoffs/des Futters, der erreichten Konzentration, Stabilität und Homogenität der Zubereitung;
- Angaben zur Verabreichung der Prüfchemikalie;
- gegebenenfalls Angaben zur Umrechnung der Konzentration des Prüfstoffs im Futter/Wasser (ppm) in die entsprechende Dosis (mg/kg Körpergewicht/Tag);
- Angaben über Futter- und Wasserqualität;

- genaue Beschreibung des Verfahrens für die Zufallsauswahl von Jungtieren zwecks Tötung (wenn Jungtiere getötet werden).

Ergebnisse

- Körpergewicht/Änderungen des Körpergewichts;
- gegebenenfalls Angaben zur Futter- und Wasseraufnahme;
- Daten über toxische Reaktionen nach Geschlecht und Dosierung, einschließlich Fruchtbarkeit, Trächtigkeit und sonstige Anzeichen von Toxizität;
- Graviditätslänge;
- toxische oder sonstige Wirkungen auf Reproduktion, Nachkommen, postnatales Wachstum usw.;
- Art, Schweregrad und Dauer der klinischen Beobachtungen (mit Angaben zur Reversibilität);
- Bewertung von sensorischer Aktivität, Greifkraft und motorischer Aktivität;
- hämatologische Parameter mit entsprechenden Ausgangswerten;
- klinisch-biochemische Parameter mit entsprechenden Ausgangswerten;
- Zahl adulter weiblicher Tiere mit normalem oder abnormalem Östruszyklus sowie Zyklusdauer;
- Anzahl der Lebendgeburten und der Postimplantationsverluste;
- Anzahl der Jungtiere mit sichtbaren erheblichen Anomalien, allgemeine Bewertung externer Genitalien, Anzahl der Kümmerlinge;
- Zeitpunkt des Todes im Verlauf der Studie oder Angabe, ob Tiere bis zum Schluss überlebt haben;
- Anzahl der Implantate, Wurfgröße und Wurfgewichte zum Zeitpunkt der Aufzeichnung;
- Angaben zum Körpergewicht der Jungtiere;
- AGD aller Jungtiere (und Körpergewicht am Tag der AGD-Messung);
- Brustwarzenretention bei männlichen Jungtieren;
- Schilddrüsenhormonspiegel, Jungtiere an Tag 13 und adulte männliche Tiere (sowie Muttertiere und Jungtiere an Tag 4, wenn gemessen);
- Körpergewicht bei Tötung sowie Organgewichtsdaten für die Elterntiere;
- Sektionsbefunde;
- ausführliche Beschreibung aller histopathologischen Befunde;
- Absorptionsdaten, soweit vorhanden;

- statistische Auswertung der Ergebnisse, wenn möglich.

Erörterung der Ergebnisse.

Schlussfolgerungen.

Auswertung der Ergebnisse

77. Mit der Studie wird die Reproduktions-/Entwicklungstoxizität bei wiederholter Verabreichung bewertet. Insbesondere da der Schwerpunkt sowohl auf die allgemeine Toxizität als auch auf reproduktions-/entwicklungstoxische Endpunkte gelegt wird, ermöglichen die Prüfungsergebnisse eine Unterscheidung zwischen den Wirkungen auf die reproduktions-/entwicklungstoxische Wirkung, die ohne allgemeine Toxizität auftreten, und Veränderungen, die nur bei Dosen vorkommen, die auch bei Elterntieren toxisch wirken (Nummern 7-11). Die Untersuchung könnte Aufschluss über die Notwendigkeit der Durchführung weiterer Untersuchungen geben und zu Empfehlungen für die Gestaltung von Folgestudien führen. Als Hilfe bei der Auswertung der reproduktions- und entwicklungstoxischen Ergebnisse ist OECD Guidance Document Nr. 43 zu Rate zu ziehen (19). OECD Guidance Document Nr. 106 über die histologische Auswertung von Prüfungen zur Feststellung endokriner und reproduktionstoxischer Wirkungen bei Nagern (16) enthält Informationen zur Vorbereitung und Auswertung von (endokrinen) Organen und von Vaginalabstrichen, die für diese Prüfmethode hilfreich sein könnten.

LITERATUR

- (13) OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Auf Anfrage erhältlich bei der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (14) OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokio, 27.-29. Oktober 1992. Auf Anfrage erhältlich bei der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (15) 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. und 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.
- (16) Tanaka, S., Kawashima, K., Naito, K., Usami, M., Nakadate, M., Imaida, K., Takahashi, M., Hayashi, Y., Kurokawa, Y. und Tobe, M. (1992). Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test (OECD): Familiarization Using Cyclophosphamide. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 18, 89-95.
- (17) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10. und 11. März 1998. Auf Anfrage erhältlich bei der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (18) 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (19) 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (20) Goldman, J.M., Murr, A.S., Buckalew, A.R., Ferrell, J.M. und 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), S. 84-97.

- (21) Sadleir, R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, in Auston, C.R. und Short, R.V. (Hrsg.), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.
- (22) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document (No. 60).
- (23) Moser, V.C., McDaniel, K.M. und Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Toxic. Appl. Pharmacol.*, 108, 267-283.
- (24) Meyer, O.A., Tilson, H.A., Byrd, W.C. und Riley, M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.*, 1, 233-236.
- (25) Crofton, K.M., Haward, J.L., Moser, V.C., M.W., Reiter, L.W., Tilson, H.A. und MacPhail, R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.* 13, 599-609.
- (26) Gallavan, R.H. Jr., J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp und V.L. Reynolds. (1999). „Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights“, *Reproductive Toxicology*, 13: S. 383-390.
- (27) 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (28) 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (29) Hess, R.A. und Moore, B.J. (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. In: *Methods in Reproductive Toxicology*, Chapin, R.E. und Heindel, J.J. (Hrsg.). Academic Press: San Diego, CA, S. 52-85.
- (30) Latendresse, J.R., Warbritton, A.R., Jonassen, H., Creasy, D.M. (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.

- (31) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 43), Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (32) OECD (2011), Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (No 150), Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.

Anlage 1

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN (SIEHE AUCH (20) OECD GD 150)

Androgene Wirkung: Die Fähigkeit einer Chemikalie, in einem Säugetierorganismus wie ein natürliches androgenes Hormon zu wirken (z. B. Testosteron).

Antiandrogene Wirkung: Die Fähigkeit einer Chemikalie, die Wirkung eines natürlichen androgenen Hormons (z. B. Testosteron) in einem Säugetierorganismus zu unterdrücken.

Antiöstrogene Wirkung: Die Fähigkeit einer Chemikalie, die Wirkung eines natürlichen östrogenen Hormons (z. B. 17 β -Estradiol) in einem Säugetierorganismus zu unterdrücken.

Antithyroide Wirkung: Die Fähigkeit einer Chemikalie, die Wirkung eines natürlichen Schilddrüsenhormons (z. B. T₃) in einem Säugetierorganismus zu unterdrücken.

Chemikalie: Ein Stoff oder Gemisch.

Entwicklungstoxizität: Das Auftreten einer reproduktionstoxischen Wirkung mit prä-, peri- und postnatalen, strukturellen oder funktionellen Störungen bei der Nachkommenschaft.

Dosis: Die Menge der verabreichten Prüfchemikalie. Die Dosis wird ausgedrückt als Masse der Prüfchemikalie je Einheit Körpergewicht des Versuchstiers pro Tag (z. B. mg/kg Körpergewicht/Tag) oder als konstante Konzentration im Futter.

Dosierung: Ein allgemeiner Begriff, der die Dosis, ihre Häufigkeit und die Dauer der Verabreichung umfasst.

Offensichtliche Toxizität: Ein allgemeiner Begriff zur Beschreibung deutlicher Toxizitätszeichen nach Verabreichung einer Prüfchemikalie. Diese Zeichen sollten für eine Bewertung der Gefährdung ausreichen und so schwerwiegend sein, dass bei einer Steigerung der verabreichten Dosis die Entwicklung schwerer Toxizitätszeichen und der wahrscheinliche Tod zu erwarten wären.

Fertilitätsstörungen: Störungen der männlichen oder weiblichen Reproduktionsfunktionen oder -fähigkeit.

Maternale Toxizität: Schädliche Wirkungen auf trächtige weibliche Tiere, die entweder spezifisch (direkte Wirkungen) oder nicht spezifisch (indirekte Wirkungen) auftreten und mit dem Zustand der Gravidität in Zusammenhang stehen.

NOAEL: Abkürzung für No Observed Adverse Effect Level. Dies ist die höchste Dosis, bei der keine schädigenden behandlungsbedingten Wirkungen festgestellt werden.

Östrogene Wirkung: Die Fähigkeit einer Chemikalie, in einem Säugetierorganismus wie ein natürliches östrogenes Hormon zu wirken (z. B. 17 β -Estradiol).

Reproduktionstoxizität: Schädliche Wirkungen auf die Nachkommenschaft und/oder

Beeinträchtigung der männlichen und weiblichen Reproduktionsfunktionen oder -kapazität.

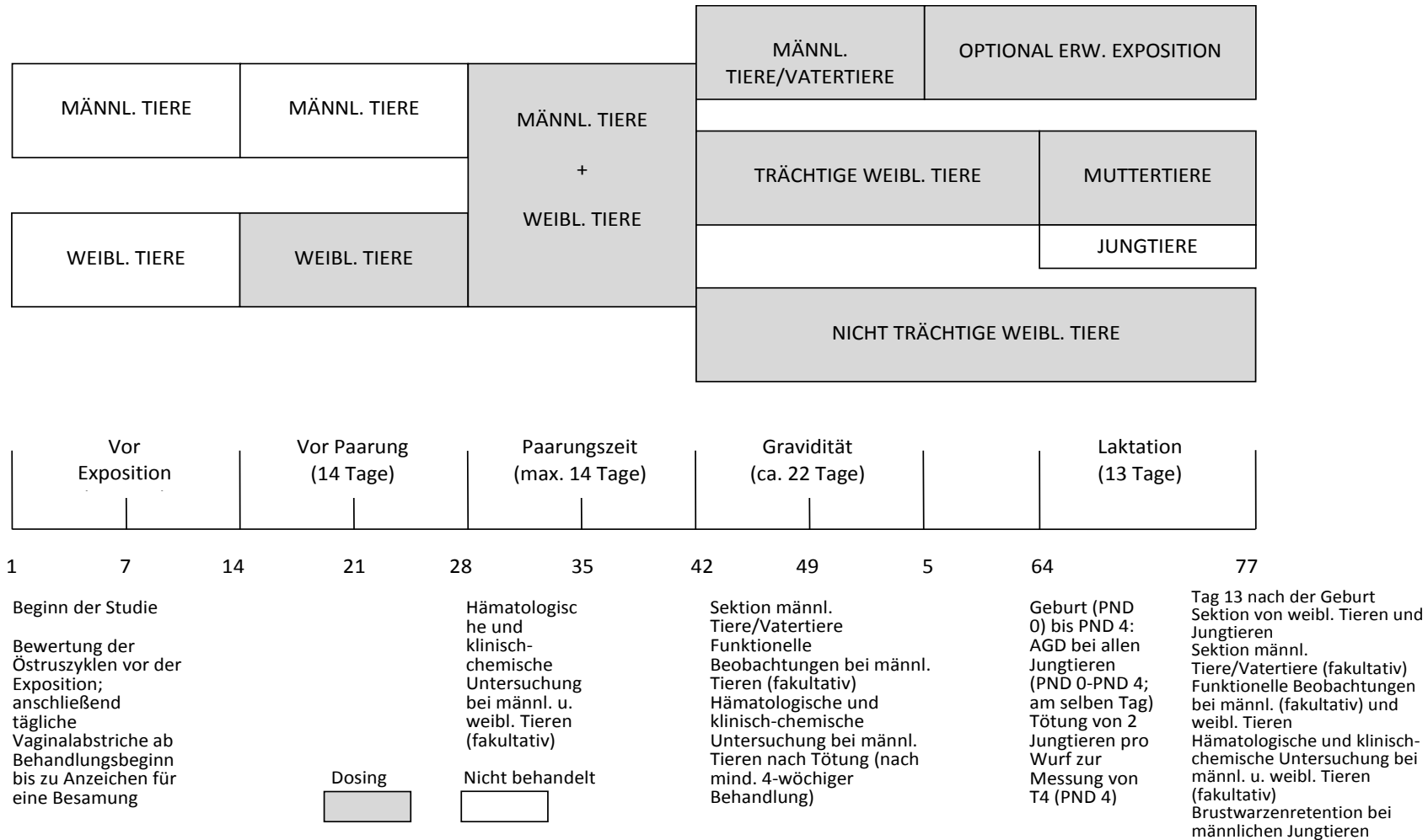
Prüfchemikalie: Ein beliebiger Stoff oder ein beliebiges Gemisch, der/das nach dieser Methode geprüft wird.

Thyroide Wirkung: Fähigkeit einer Chemikalie, in einem Säugetierorganismus wie ein natürliches Schilddrüsenhormon (z. B. T₃) zu wirken.

Validierung: Ein wissenschaftlicher Prozess zur Beschreibung der operationellen Anforderungen und Grenzen einer Prüfmethode und zum Nachweis ihrer Zuverlässigkeit und Eignung für einen bestimmten Zweck.

Anlage 2

DIAGRAMM ZUM VERSUCHSPLAN MIT ANGABEN ZUR MAXIMALEN DAUER DER STUDIE AUSGEHEND VON DER VOLLSTÄNDIGEN 14-TÄGIGEN PAARUNGSZEIT



Anlage 3

TABELLARISCHE ZUSAMMENFASSUNG DER AUSWIRKUNGEN AUF DIE REPRODUKTION/ENTWICKLUNG

BEOBACHTUNGEN	WERTE				
Dosierung (Einheiten).	0 (Kontrolle)	...	...	...	...
Ausgangspaarungen (N)					
Östruszyklus (mindestens mittlere Dauer und Häufigkeit unregelmäßiger Zyklen)					
Weibliche Tiere mit Anzeichen für eine Besamung (N)					
Trächtige weibliche Tiere (N)					
Empfängnistage 1-5 (N)					
Empfängnistage 6- (N) . . ⁽¹⁾ (N)					
Gravidität ≤ 21 Tage (N)					
Gravidität = 22 Tage (N)					
Gravidität ≥ 23 Tage (N)					
Muttertiere mit lebenden Jungtieren (N)					
Muttertiere mit lebenden Jungtieren an Tag 4 pp (N)					
Implantate/Muttertier (Mittelwert)					
Lebende Jungtiere/Muttertiere bei Geburt (Mittelwert)					
Lebende Jungtiere/Muttertiere an Tag 4 (Mittelwert)					
Geschlechterverhältnis (m/w) bei Geburt (Mittelwert)					
Geschlechterverhältnis (m/w) an Tag 4 (Mittelwert)					
Wurfgewicht bei Geburt (Mittelwert)					
Wurfgewicht an Tag 4 (Mittelwert)					
Gewicht der Jungtiere bei Geburt (Mittelwert)					
Gewicht der Jungtiere zum Zeitpunkt der AGD-Messung (Mittelwert männliche Jungtiere, Mittelwert weibliche Jungtiere)					
AGD der Jungtiere am selben Tag nach der Geburt, Geburt – Tag 4 (Mittelwert männliche Jungtiere, Mittelwert weibliche Jungtiere, PND vermerken)					
Gewicht der Jungtiere an Tag 4 (Mittelwert)					
Gewicht der Jungtiere an Tag 13 (Mittelwert)					

⁽¹⁾ letzter Tag der Paarungszeit

Brustwarzenretention bei männlichen Jungtieren an Tag 13 (Mittelwert)					
JUNGTIERE MIT ANOMALIEN					
Muttertiere mit 0					
Muttertiere mit 1					
Muttertiere mit ≥ 2					
VERLUST AN NACHKOMMEN					
Pränatal (Implantationen abzüglich Lebendgeburten)					
Weibliche Tiere mit 0					
Weibliche Tiere mit 1					
Weibliche Tiere mit 2					
Weibliche Tiere mit ≥ 3					
Postnatal (Lebendgeburten abzüglich lebender Tiere an Tag 13 nach der Geburt)					
Weibliche Tiere mit 0					
Weibliche Tiere mit 1					
Weibliche Tiere mit 2					
Weibliche Tiere mit ≥ 3					

B.65 *IN-ITRO*-PRÜFMETHODE ZUR UNTERSUCHUNG DER MEMBRAN-BARRIERE AUF HAUTVERÄTZUNGEN

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 435 (2015). Als Hautverätzung wird das Auslösen einer irreversiblen Hautschädigung, d. h. einer sichtbaren, bis in das Corium reichenden Nekrose der Epidermis nach Applikation einer Prüfchemikalie im Sinne der Definition des Global harmonisierten Systems zur Einstufung und Kennzeichnung von Gefahrstoffen der UN (GHS) (1) und der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen (CLP-Verordnung)^{1]} bezeichnet. Diese Prüfmethode entspricht der aktualisierten OECD Prüfrichtlinie 435 und besteht in einer *In-vitro*-Prüfmethode zur Untersuchung der Membranbarriere, mit der ätzende Chemikalien ermittelt werden können. Bei dieser Prüfmethode wird eine künstliche Membran verwendet, die *in situ* auf ätzende Chemikalien ähnlich reagiert wie Tierhaut.
2. Hautverätzungen wurden gewöhnlich durch Auftragen der Prüfchemikalie auf die Haut lebender Tiere und durch anschließende Bewertung des Umfangs von Gewebeschäden nach einem bestimmten Zeitraum bewertet (2). Außer dieser Prüfmethode wurden alternativ (3) (4) zum *In-vivo*-Standardverfahren zur Untersuchung von Kaninchenhaut (Kapitel B.4, entsprechend OECD TG 404) noch mehrere weitere *In-vitro*-Prüfmethoden zur Ermittlung ätzender Chemikalien (2) angenommen. In der abgestuften Prüf- und Bewertungsstrategie nach dem UN GHS zur Bewertung und Beurteilung von Hautverätzungen und im OECD-Leitliniendokument über integrierte Prüfungs- und Bewertungsansätze (IATA = Integrated Approaches to Testing and Assessment) zur Untersuchung von Hautverätzungen und -reizungen wird die Verwendung validierter und akzeptierter *In-vitro*-Prüfmethoden in den Modulen 3 und 4 beschrieben (1) (5). Die IATA beschreiben mehrere Module, in denen Informationsquellen und Analyseinstrumente zu Gruppen zusammengefasst werden. Sie enthalten i) Leitlinien dazu, wie vorhandene Daten aus Versuchen und aus anderen Quellen integriert und verwendet werden können, um das Hautreizungs- und das Hautverätzungspotenzial von Chemikalien zu bewerten, und ii) einen Vorschlag zur Durchführung ggf. erforderlicher weiterer Versuche (u. a. bei

^{1]} Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen, zur Änderung und Aufhebung der Richtlinien 67/548/EWG und 1999/45/EG und zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 (ABl. L 353 vom 31.12.2008, S. 1).

negativen Ergebnissen) (5). Bei diesem modularen Ansatz können Chemikalien aufgrund von positiven Ergebnissen, die in *In-vitro*-Prüfmethoden ermittelt wurden, als ätzend eingestuft werden, ohne Tierversuche durchführen zu müssen; dadurch wird die Verwendung von Tieren reduziert und optimiert, um Schmerzen und Qualen zu vermeiden, denen für diesen Zweck zu verwendende Tiere ausgesetzt würden.

3. Das im Handel unter der Bezeichnung Corrositex® erhältliche *In-vitro*-Membran-Barrieremodell (6) (7) (8) wurde in Validierungsstudien untersucht; dabei wurden für eine Datenbank mit 163 Stoffen und Gemischen eine Gesamtgenauigkeit zur Vorhersage von Hautverätzungen von 79 % (128/163), eine Empfindlichkeit von 85 % (76/89) und eine Spezifität von 70 % (52/74) ermittelt (7). Aufgrund ihrer anerkannten Validität wurde diese validierte Referenzmethode (VRM) zur Verwendung im Rahmen einer abgestuften Prüfstrategie zur Bewertung des hautätzenden Gefährdungspotenzials von Chemikalien empfohlen (5) (7). Bevor ein *In-vitro*-Membran-Barrieremodell zur Untersuchung auf Hautverätzungen für regulatorische Zwecke verwendet werden kann, sollten nach den Anforderungen der Leistungsstandards (10) Verlässlichkeit, Relevanz (Genauigkeit) und die Grenzen des Verfahrens für den vorgeschlagenen Verwendungszweck bestimmt werden, um sicherzustellen, dass es nach den vordefinierten Leistungsstandards (PS) mit der VRM vergleichbar ist (9). Die gegenseitige Anerkennung der Daten gemäß dem OECD-Übereinkommen wird erst dann garantiert, wenn vorgeschlagene neue oder aktualisierte Methoden auf der Grundlage der Leistungsstandards überprüft und in die gleichwertige OECD-Prüfrichtlinie aufgenommen wurden. Gegenwärtig ist das im Handel unter der Bezeichnung Corrositex® angebotene Modell die einzige *In-vitro*-Methode, die der OECD-Prüfrichtlinie 435 entspricht.
4. Andere Prüfmethoden zur Untersuchung auf Hautverätzungen beruhen auf der Verwendung rekonstituierter menschlicher Haut (OECD TG 431) (3) und isolierter Rattenhaut (OECD TG 430) (4). Diese Prüfrichtlinie sieht die Möglichkeit der Einstufung ätzender Chemikalien nach ihrer Verätzungswirkung in drei UN-GHS-Unterkategorien und nach der Verätzungsgefahr in drei UN-Verpackungsgruppen vor. Die OECD-Prüfrichtlinie wurde ursprünglich im Jahr 2006 angenommen und 2015 unter Berücksichtigung des IATA-Leitliniendokuments sowie zur Anpassung der Liste der Leistungsstoffe aktualisiert.

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

5. Es gelten die Begriffsbestimmungen der Anlage.

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN UND BEGRENZUNGEN

6. Die in dieser Prüfmethode beschriebene Untersuchung ermöglicht die Ermittlung ätzender Prüfchemikalien und die Unterkategorisierung ätzender Prüfchemikalien nach dem UN GHS bzw. der CLP-Verordnung (Tabelle 1). Außerdem kann eine solche Prüfmethode als

Entscheidungsgrundlage für die Beurteilung einer ätzenden bzw. nicht ätzenden Wirkung spezifischer Chemikalienklassen (z. B. organischer und anorganischer Säuren, Säurederivate¹ und Basen für die Zwecke der Untersuchung bestimmter Transportwirkungen) dienen (7) (11) (12). Diese Prüfmethode beschreibt ein allgemeines Verfahren ähnlich der validierten Referenzprüfmethode (7). Sie liefert keine geeigneten Informationen über Hautreizungen; mit PM B.46 (gleichwertig OECD TG 439) werden jedoch gezielt die gesundheitlichen Auswirkungen von Hautreizungen *in vitro* untersucht (13). Eine umfassende Evaluierung lokaler Auswirkungen auf die Haut nach einer einmaligen dermalen Exposition ist dem OECD-Leitliniendokument über integrierte Prüfungs- und Bewertungsansätze (IATA) zu entnehmen (5).

Tabelle 1: Die Hautverätzungskategorien und -unterkategorien des UN GHS (1)

Verätzungskategorie (Kategorie 1) (für Behörden, die keine Unterkategorien verwenden)	Potenzielle Unterkategorien von Verätzungswirkungen ² (für Behörden, die Unterkategorien (u. a. die der CLP-Verordnung) verwenden)	Hautätzend bei ≥ 1 von 3 Tieren	
		Exposition	Beobachtung
Hautätzend	Hautätzend Unterkategorie 1A	≤ 3 Minuten	≤ 1 Stunde
	Hautätzend Unterkategorie 1B	> 3 Minuten / ≤ 1 Stunde	≤ 14 Tage
	Hautätzend Unterkategorie 1C	> 1 Stunde / ≤ 4 Stunden	≤ 14 Tage

7. Eine Begrenzung der validierten Referenzmethode (7) besteht darin, dass viele nicht ätzende Chemikalien und einige ätzende Chemikalien aufgrund der Ergebnisse der ursprünglichen Kompatibilitätsprüfung für eine Untersuchung möglicherweise nicht in Betracht kommen (Nummer 13). Wässrige Chemikalien mit pH-Werten im Bereich von 4,5 bis 8,5 können häufig nicht untersucht werden; allerdings erwiesen sich 85 % der in diesem pH-Bereich untersuchten Chemikalien in Tierversuchen als nicht ätzend (7). Die Prüfmethode mit der *In-vitro*-Membranbarriere kann zur Untersuchung von (in Wasser löslichen oder nicht löslichen) Feststoffen, (wässrigen oder nicht wässrigen)

¹ Der Begriff „Säurederivat“ bezeichnet eine nicht spezifische Klasse im Allgemeinen bestehend aus Säuren, die mittelbar oder unmittelbar oder durch Modifikation oder partielle Substitution aus einer Chemikalie hervorgegangen sind. Zu dieser Klasse zählen Anhydride, Halosäuren, Salze und andere Arten von Chemikalien.

² Für die EU sieht die CLP-Verordnung für Hautverätzungen die drei Unterkategorien 1A, 1B und 1C vor.

Flüssigkeiten und Emulsionen verwendet werden. Prüfchemikalien, die bei der Kompatibilitätsprüfung jedoch keine nachweisbare Änderung bewirken (d. h. keine farbliche Veränderung im CDS (Chemical Detection System) der validierten Referenzprüfmethode) können mit der Prüfmethode unter Verwendung der Membranbarriere nicht untersucht werden. Bei diesen Chemikalien sollten andere Prüfmethoden zur Anwendung kommen.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

8. Das Prüfsystem umfasst zwei Bestandteile: eine synthetische makromolekulare Biobarriere und ein CDS (Chemical Detection System); bei dieser Prüfmethode werden mit dem CDS Schäden der Membranbarriere erkannt, die durch ätzende Prüfchemikalien nach der Aufbringung der Prüfchemikalien auf die synthetische makromolekulare Membranbarriere hervorgerufen wurden (7) und die vermutlich auf denselben Verätzungsmechanismus bzw. dieselben Verätzungsmechanismen zurückzuführen sind, die auch auf lebende Haut einwirken.
9. Die Durchdringung (oder der Durchbruch) der Membranbarriere kann mit verschiedenen Verfahren oder mit einem CDS gemessen werden, u. a. anhand von Verfärbungen eines pH-Indikatorfarbstoffs oder anderer Merkmale der Indikatorlösung unter der Barriere.
10. Die Validität der Membranbarriere, d. h. die Eignung und die Zuverlässigkeit für die beabsichtigte Verwendung, sollte nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang ist auch sicherzustellen, dass unterschiedliche Zubereitungen hinsichtlich der Barriereeigenschaften einheitlich sind (z. B. dass sie eine Barriere gegenüber nicht ätzenden Chemikalien aufrechterhalten können, oder dass sie die Verätzungsmerkmale von Chemikalien in den verschiedenen Unterkategorien von Verätzungswirkungen nach dem UN GHS unterscheiden können (1). Die vorgenommene Einstufung richtet sich nach dem Zeitraum, den eine Chemikalie benötigt, um durch die Membranbarriere in die Indikatorlösung zu gelangen.

NACHWEIS DER LEISTUNGSFÄHIGKEIT

11. Vor der routinemäßigen Anwendung der Prüfmethode mit der *In-vitro*-Membranbarriere nach dieser Prüfmethode sollten Labors die erforderliche technische Befähigung durch eine ordnungsgemäße Einstufung der zwölf in Tabelle 2 empfohlenen Leistungsstoffe nachweisen. Wenn ein dort genannter Stoff nicht verfügbar ist bzw. wenn dies gerechtfertigt ist, kann ein anderer Stoff verwendet werden, für den geeignete *In-vivo*- und *In-vitro*-Referenzdaten verfügbar sind (z. B. aus der Liste der Referenzchemikalien (10)), sofern die in Tabelle 1 beschriebenen Auswahlkriterien berücksichtigt werden.

Tabelle 2: Leistungsstoffe¹

Stoff ²	CAS-Nr.	Chemikalienklasse	<i>In-vivo</i> -UN-GHS-Unterkategorie ³	<i>In-vitro</i> -UN-GHS-Unterkategorie ³
Bortrifluoriddihydrat	13319-75-0	Anorganische Säuren	1A	1A
Salpetersäure	7697-37-2	Anorganische Säuren	1A	1A
Phosphorpentachlorid	10026-13-8	Ausgangsstoffe anorganischer Säuren	1A	1A
Valerylchlorid	638-29-9	Säurechloride	1B	1B
Natriumhydroxid	1310-73-2	Anorganische Basen	1B	1B
1-(2-Aminoethyl)piperazin	140-31-8	Aliphatische Amine	1B	1B
Benzolsulfonylchlorid	98-09-9	Säurechloride	1C	1C
N,N-Dimethylbenzylamin	103-83-3	Aniline	1C	1C
Tetraethylenepentamin	112-57-2	Aliphatische Amine	1C	1C
Eugenol	97-53-0	Phenole	NC	NC
Nonylacrylat	2664-55-3	Acrylate/Methacrylate	NC	NC
Natriumbicarbonat	144-55-8	Anorganische Salze	NC	NC

¹ Die zwölf oben genannten Stoffe enthalten jeweils drei Stoffe aus den drei UN-GHS-Unterkategorien ätzender Stoffe und drei nicht ätzende Stoffe, die im Handel leicht erhältlich sind; die Einstufungen in die UN-GHS-Unterkategorien wurden anhand der Ergebnisse leistungsfähiger *In-vivo*-Prüfungen vorgenommen. Diese Stoffe wurden aus der Liste mit den 40 Referenzstoffen im Mindestverzeichnis der Chemikalien ausgewählt, die als zum Nachweis der Genauigkeit und der Zuverlässigkeit von Prüfmethoden geeignet ermittelt wurden, strukturell und funktionell der validierten Referenzprüfmethode ähnlich sind und unter den 163 Referenzchemikalien ausgewählt wurden, die ursprünglich zur Validierung der Referenzprüfmethode verwendet wurden (Corrositex®) (7) (10) (14). Durch diesen Auswahlprozess sollten in größtmöglichem Umfang Chemikalien berücksichtigt werden, die die folgenden Anforderungen erfüllten: Sie waren repräsentativ für die Verätzungswirkungen (z. B. nicht ätzende Chemikalien oder ätzende Chemikalien der UN-Verpackungsgruppen I, II und III), die mit der validierten Referenzprüfmethode gemessen oder vorhergesagt werden können; sie waren repräsentativ für die im Validierungsprozess verwendeten Chemikalienklassen; sie wiesen klar definierte chemische Strukturen auf; sie führten in der *In-vivo*-Referenzprüfung zu eindeutigen Ergebnissen; sie waren im Handel erhältlich; sie waren nicht mit nicht tragbaren Entsorgungskosten verbunden (14).

² Stoffe, die rein bzw. mit einer Reinheit von ≥ 90 % geprüft wurden.

³ Den UN-GHS-Unterkategorien 1A, 1B und 1C entsprechen die UN-Verpackungsgruppen I, II und III. NC (nicht ätzend)

VERFAHREN

12. In den folgenden Absätzen werden die Elemente und Verfahren einer Prüfmethode mit einer künstlichen Membranbarriere zur Beurteilung der Verätzungswirkung (7) (15) auf der Grundlage der aktuellen VRM (d. h. mit der im Handel erhältlichen Membran Corrositex®) beschrieben. Die Membranbarriere und die Kompatibilitäts-/Indikator- und Kategorisierungslösungen können hergestellt, zubereitet und im Handel bezogen werden. Dies gilt beispielsweise im Falle der VRM für Corrositex®. Für die validierte Referenzprüfmethode wurde ein Prüfmethodenprotokoll als Beispiel beschrieben (7). Die Prüfung sollte bei Umgebungstemperatur (17-25 °C) vorgenommen werden, und die verwendeten Elemente sollten die folgenden Anforderungen erfüllen.

Kompatibilitätsprüfung der Prüfchemikalie

13. Vor der Durchführung der Prüfung mit der Membranbarriere wird eine Kompatibilitätsprüfung vorgenommen, um festzustellen, ob die Prüfchemikalie vom CDS erkannt wird. Wenn das CDS die Prüfchemikalie nicht erkennt, ist die Prüfmethode mit der Membranbarriere zur Beurteilung der potenziellen Verätzungswirkung dieser Prüfchemikalie nicht geeignet. In diesem Fall sollte eine andere Prüfmethode gewählt werden. Das CDS und die Expositionsbedingungen bei der Kompatibilitätsprüfung sollten der Exposition in der anschließenden Prüfung mit der Membranbarriere entsprechen.

Prüfung zur Ermittlung der Zeitkategorie für Prüfchemikalien

14. Wenn für die Prüfmethode relevant, sollten in der Kompatibilitätsprüfung als geeignet befundene Prüfchemikalien einer Prüfung zur Ermittlung der Zeitkategorie, d. h. einer Screening-Prüfung zur Unterscheidung zwischen schwachen und starken Säuren bzw. Basen, unterzogen werden. Bei der validierten Referenzprüfmethode beispielsweise wird durch eine Zeitkategorieprüfung anhand des Nachweises einer starken sauren bzw. alkalischen Reserve festgestellt, welche der beiden Zeitkategorien anzunehmen ist. Die Verätzungswirkung und die UN-GHS-Unterkategorie der hautverätzenden Wirkung sollten je nach der sauren oder alkalischen Reserve der Prüfchemikalie mit zwei unterschiedlichen Durchbruchzeiten bestimmt werden.

ELEMENTE DER PRÜFMETHODE UNTER VERWENDUNG EINER MEMBRANBARRIERE

Membranbarriere

15. Die Membranbarriere besteht aus zwei Elementen: einem makromolekularen wässrigen Protein-Gel und einer permeablen Trägermembran. Das Protein-Gel sollte für Flüssigkeiten und Feststoffe undurchlässig sein. Eine Durchlässigkeit kann aber infolge einer Verätzung entstehen. Die vollständige Membranbarriere sollte unter festgelegten Bedingungen aufbewahrt werden, bei der sich die Beschaffenheit des Gels nachweislich

nicht verändert (etwa durch Austrocknung, Wachstum von Mikroorganismen, Verrutschen oder Risse, die das Verhalten der Barriere beeinträchtigen würden). Wie lange die Membranbarriere aufbewahrt werden kann, sollte ermittelt werden. Nach Ablauf der betreffenden Frist sollten die zubereiteten Membranbarrieren nicht mehr verwendet werden.

16. Die permeable Trägermembran dient beim Geliervorgang und bei der Exposition gegenüber der Prüfchemikalie als mechanische Unterlage für das Proteingel. Die Trägermembran sollte dafür sorgen, dass das Gel nicht sackt oder verrutscht und für alle Prüfchemikalien leicht durchlässig sein.
17. Das Protein-Gel (bestehend z. B. aus Keratin, Kollagen oder Gemischen von Proteinen, die eine Gelmatrix bilden) fungiert als Zielmaterial für die Prüfchemikalie. Das Proteinmaterial wird auf die Trägermembran aufgebracht, wo es gelieren kann, bevor die Indikatorlösung mit der Membranbarriere verschlossen wird. Das Protein-Gel sollte eine einheitliche Stärke und Dichte haben und keine Lufteinschlüsse oder Schäden aufweisen, die seine Funktion beeinträchtigen könnten.

CDS (Chemical Detection System)

18. Die Indikatorlösung (die gleiche Lösung, die auch für die Kompatibilitätsprüfung verwendet wurde), sollte das Vorhandensein von Prüfchemikalien anzeigen. Für die Prüfung sollten ein pH-Indikatorfarbstoff oder eine Kombination von Farbstoffen (z. B. Kresolrot und Methylorange) verwendet werden, deren Farbe sich verändert, wenn eine Prüfchemikalie vorhanden ist. Das Messsystem kann visuell oder elektronisch sein.
19. Detektionssysteme, die zur Detektion des Durchgangs der Prüfchemikalie durch die Membranbarriere entwickelt wurden, sollten in Bezug auf ihre Relevanz und Zuverlässigkeit geprüft werden, um das Spektrum der erkennbaren Chemikalien und die quantitativen Detektionsgrenzen nachzuweisen.

DURCHFÜHRUNG DER PRÜFUNG

Anordnung der Elemente der Prüfmethode

20. Die Membranbarriere wird so in ein Fläschchen (oder Röhrchen) mit der Indikatorlösung gegeben, dass die Trägermembran vollflächig mit der Indikatorlösung in Berührung kommt und keine Luftblasen vorhanden sind. Dabei ist sorgfältig darauf zu achten, dass die Barriere nicht beschädigt wird.

Applikation der Prüfchemikalie

21. Eine geeignete Menge der Prüfchemikalie (z. B. 500 µl einer Flüssigkeit oder 500 mg eines fein vermahlenden Feststoffs (7)) wird vorsichtig auf die Oberfläche der Membranbarriere aufgetragen und gleichmäßig verteilt. Für jede Prüfchemikalie und für die entsprechenden Kontrollen wird eine angemessene Anzahl an Replikaten (z. B. vier)

(7) zubereitet (Nummern 23 bis 25). Der Zeitpunkt, zu dem die Prüfchemikalie auf die Membranbarriere aufgetragen wird, ist zu protokollieren. Um sicherzustellen, dass kurze Verätzungszeiten präzise protokolliert werden, wird die Prüfchemikalie zeitlich abgestuft auf die Replikatfläschchen gegeben.

Messung der Durchdringung der Membranbarriere

22. Die Fläschchen werden jeweils angemessen überwacht, und der Zeitpunkt der ersten Änderung der Indikatorlösung (d. h. der Zeitpunkt der Durchdringung der Barriere) wird protokolliert, und die Zeit vom Auftragen der Chemikalie bis zur Durchdringung der Membranbarriere wird ermittelt.

Kontrollen

23. Bei Prüfungen, bei denen in Verbindung mit der Prüfchemikalie ein Vehikel oder ein Lösungsmittel eingesetzt wird, sollte das Vehikel bzw. das Lösungsmittel kompatibel mit dem Membranbarriersystem sein, d. h. es sollte die Integrität des Membranbarriersystems nicht verändern und keine Auswirkungen auf die Verätzungswirkung der Prüfchemikalie haben. Die Lösungsmittelkontrolle (bzw. die Vehikelkontrolle) sollte ggf. gleichzeitig mit der Prüfchemikalie geprüft werden, um die Kompatibilität des Lösungsmittels mit dem Membranbarriersystem nachzuweisen.
24. Eine positive (hautätzende) Kontrolle mit mittlerer Verätzungswirkung (z. B. 110 ± 15 mg Natriumhydroxid (Verätzung der UN-GHS-Unterkategorie 1B)) (7) sollte gleichzeitig mit der Prüfchemikalie geprüft werden, um festzustellen, ob die Leistung des Prüfsystems annehmbar ist. Eine zweite Positivkontrolle derselben Chemikalienklasse wie die Prüfchemikalie kann zur Beurteilung des relativen Verätzungspotenzials einer ätzenden Prüfchemikalie hilfreich sein. Die ausgewählte(n) Positivkontrolle(n) sollte(n) eine mittlere Verätzungswirkung haben (z. B. UN-GHS-Unterkategorie 1B), damit Änderungen der Durchdringungszeit erkannt werden können, die den ermittelten Referenzwert in unannehmbare Weise über- oder unterschreiten und damit darauf hindeuten, dass das Prüfsystem nicht ordnungsgemäß funktioniert. Für diesen Zweck sind sehr stark ätzende Chemikalien (UN-GHS-Unterkategorie 1A) oder nicht ätzende Chemikalien nur begrenzt verwendbar. Eine ätzende Chemikalie der UN-GHS-Unterkategorie 1B würde die Erkennung einer zu kurzen oder zu langen Durchbruchzeit ermöglichen. Eine schwach ätzende Chemikalie der UN-GHS-Unterkategorie 1C könnte als Positivkontrolle eingesetzt werden, um zu prüfen, ob mit der Prüfmethode konsistent zwischen schwach ätzenden und nicht ätzenden Chemikalien unterschieden werden kann. Unabhängig vom verwendeten Ansatz sollte ein annehmbarer Reaktionsbereich der Positivkontrolle auf der Grundlage des historischen Bereichs der Durchbruchzeiten bei der (den) eingesetzten Positivkontrolle(n) entwickelt werden (beispielsweise der Mittelwert $\pm$ 2-3 Standardabweichungen). Bei jeder Prüfung sollte die genaue Durchbruchzeit der Positivkontrolle ermittelt werden, damit Abweichungen außerhalb des annehmbaren Bereichs erkannt werden können.

25. Gleichzeitig mit der Prüfchemikalie sollte als weitere Maßnahme zur Qualitätskontrolle auch eine Negativkontrolle (nicht ätzend) (z. B. 10%ige Zitronensäure oder 6%ige Propionsäure) (7) geprüft werden, um die uneingeschränkte Funktion der Membranbarriere nachzuweisen.

Akzeptanzkriterien der Untersuchung

26. Auf der Grundlage der ermittelten Zeitparameter der UN-GHS-Unterkategorien der Verätzungswirkung wird anhand des Zeitraums (in Minuten) vom Auftragen einer Prüfchemikalie auf die Membranbarriere bis zur Durchdringung der Barriere die Verätzungswirkung der Prüfchemikalie vorhergesagt. Damit eine Prüfung als annehmbar betrachtet werden kann, sollte sich bei der gleichzeitigen Positivkontrolle die erwartete Reaktionszeit für die Durchdringung ergeben (z. B. für Natriumhydroxid als Positivkontrolle 8-16 Minuten); außerdem sollte die gleichzeitige Negativkontrolle nicht ätzend sein, und die gleichzeitige Lösungsmittelkontrolle sollte – wenn berücksichtigt – weder ätzend sein noch sich auf das Verätzungspotenzial der Prüfchemikalie auswirken. Vor der routinemäßigen Durchführung einer Prüfung nach dieser Prüfmethode sollten Labors die erforderliche technische Befähigung anhand der zwölf in Tabelle 2 empfohlenen Leistungsstoffe nachweisen. Die Zuverlässigkeit und die Genauigkeit neuer vergleichbarer Methoden („Me-too-Methoden“), die ausgehend von dieser Prüfmethode entwickelt wurden und strukturell und funktionell mit der validierten Referenzmethode vergleichbar sind, (14) sollten vor ihrer Verwendung für vorgeschriebene Prüfungen anhand der vordefinierten Leistungsstandards nachgewiesen werden (10).

Auswertung von Ergebnissen und Einstufung der Verätzungswirkung von Prüfchemikalien

27. Anhand der Zeit (in Minuten) von der Auftragung der Prüfchemikalie auf die Membranbarriere bis zur Durchdringung der Barriere werden die Prüfchemikalien nach ihrer Verätzungswirkung nach UN-GHS-Unterkategorien (1) sowie ggf. nach UN-Verpackungsgruppen eingestuft (16). Bei allen vorgeschlagenen Prüfmethoden sind für jede der drei Unterkategorien ätzender Chemikalien die Schwellenwerte der Zeiträume zu ermitteln. Bei der endgültigen Entscheidung über diese Schwellenwerte ist zu beachten, dass zu niedrige Einstufungen einer Verätzungsgefahr (d. h. falsch negative Ergebnisse) möglichst minimiert werden müssen. Bei dieser Prüfmethode sollten die Schwellenwerte für Corrositex® aus Tabelle 3 angenommen werden, da die Prüfung mit Corrositex® gegenwärtig die einzige Prüfung ist, die unter die Prüfrichtlinie fällt (7).

Tabelle 3: Vorhersagemodell Corrositex®

Mittlere Durchbruchzeit (min.)		UN-GHS-Vorhersage ³
Prüfchemikalien der Kategorie 1 ¹ (mit dem Einstufungstest der Methode ermittelt)	Prüfchemikalien der Kategorie 2 ² (mit dem Einstufungstest der Methode ermittelt)	
0-3 min.	0-3 min.	Hautätzend opt. Unterkategorie 1A
> 3 bis 60 min.	> 3 bis 30 min.	Hautätzend opt. Unterkategorie 1B
> 60 bis 240 min.	> 30 bis 60 min.	Hautätzend opt. Unterkategorie 1C
> 240 min.	> 60 min.	Nicht hautätzend

¹ Prüfchemikalien mit stark saurer/alkalischer Reserve (6).

² Prüfchemikalien mit schwach saurer/alkalischer Reserve (6).

³ Die UN-GHS-Unterkategorien 1A, 1B und 1C entsprechen den UN-Verpackungsgruppen I, II und III.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Daten

28. Die Zeiten (in Minuten) von der Auftragung bis zur Durchdringung der Barriere bei der Prüfchemikalie und der (den) Positivkontrolle(n) sollten in einer Tabelle zum einen für die einzelnen Replikate und zum anderen als Mittelwerte $\pm$ der einzelnen Versuche angegeben werden.

Prüfbericht

29. Der Prüfbericht sollte folgende Angaben enthalten:

Prüfchemikalien und Kontrollchemikalien:

- Einkomponentiger Stoff: chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS-Bezeichnung, CAS-Nummer, SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel, Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.;
- mehrkomponentiger Stoff, UVCB und Gemische: möglichst weit gehende Charakterisierung durch die chemische Zusammensetzung (siehe oben), das quantitative

Vorkommen und die relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften der einzelnen Komponenten;

- physikalisches Erscheinungsbild, Wasserlöslichkeit und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften;
- Herkunft, Chargennummer, sofern vorhanden;
- Behandlung der Prüfchemikalien/Kontrollstoffe vor der Prüfung, sofern relevant (z. B. Erwärmen, Mahlen);
- Stabilität der Prüfchemikalie, letztes Verwendungsdatum oder Datum für erneute Analyse, soweit bekannt;
- Lagerungsbedingungen.

Vehikel:

- Angaben zur Identität, (gegebenenfalls) Konzentration; Einsatzvolumen;
- Begründung der Auswahl des Vehikels.

In-vitro-Membran-Barrieremodell und verwendetes Protokoll einschließlich nachgewiesener Genauigkeit und Zuverlässigkeit

Prüfbedingungen:

- Beschreibung der verwendeten Geräte und der Versuchsvorbereitung;
- Herkunft und Zusammensetzung der verwendeten *In-vitro*-Membranbarriere;
- Zusammensetzung und Merkmale der Indikatorlösung;
- Nachweismethode;
- Mengen der Prüfchemikalie und der Kontrollchemikalien;
- Anzahl der Replikate;
- Beschreibung und Begründung der Prüfung zur Einstufung der Zeiten;
- Anwendungsmethode;
- Beobachtungszeiten;
- Beschreibung der angewandten Bewertungs- und Einstufungskriterien;
- Nachweis der Befähigung zur Durchführung der Prüfmethode vor der regelmäßigen Verwendung durch die Prüfung von Leistungschemikalien.

Ergebnisse:

- Tabellarische Darstellung einzelner Rohdaten aus einzelnen Prüfungen und Kontrollen für die einzelnen Replikate;

- Beschreibung anderer beobachteter Wirkungen;
- abgeleitete Einstufung mit Bezug auf das Vorhersagemodell und/oder angewandte Entscheidungskriterien.

Erörterung der Ergebnisse.

Schlussfolgerungen.

LITERATUR

- (33) Vereinte Nationen (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), erste überarbeitete Ausgabe, UN New York und Genf, 2013. Abrufbar unter: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.
- (34) Kapitel B.4 dieses Anhangs, Akute Hautreizung/-verätzung.
- (35) Kapitel B.40bis dieses Anhangs, *In-vitro*-Prüfung auf hautätzende Wirkung: Prüfmethode mit rekonstruierter humaner Epidermis (RHE).
- (36) Kapitel B.40 dieses Anhangs, *In-vitro*-Hautverätzung: TER-Prüfmethode.
- (37) 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (38) Fentem, J.H., Archer, , G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, , R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhütter, H.-G. und 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.
- (39) ICCVAM (1999). Corrositex®. *In Vitro* Test Methods 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).
- (40) Gordon, V.C., Harvell, J.D. und 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.
- (41) 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).
- (42) 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris. Abrufbar unter: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/PerfStand-TG430-June14.pdf>.

- (43) ECVAM (2001). Statement on the Application of the CORROSITEX® Assay for Skin Corrosivity Testing. 15th Meeting of ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC), Ispira, Italien. ATLA 29, 96-97.
- (44) U.S. DOT (2002). Exemption DOT-E-10904 (Fifth Revision). 20. September 2002). Washington, D.C., U.S. DOT.
- (45) Kapitel B.46 dieses Anhangs, *In-vitro*-Hautreizung: Prüfmethode mit rekonstruierter humaner Epidermis. ICCVAM (2004). ICCVAM Recommended Performance Standards for *In Vitro* Test Methods for Skin Corrosion. NIEHS, NIH Publication No 04-4510. Abrufbar unter: http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/dermal_docs/ps/ps044510.pdf.
- (46) U.S. EPA (1996). Method 1120, Dermal Corrosion. Abrufbar unter: <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/1120.pdf>.
- (47) Vereinte Nationen (UN) (2013). UN Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Model Regulations, 18th Revised Edition (Part, Chapter 2.8), UN, 2013. Abrufbar unter: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/unrec/rev18/English/Rev18_Volume1_Part2.pdf.

Anlage

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

CDS (Chemical Detection System): Ein visuelles oder elektronisches Messsystem mit einer Indikatorlösung, die bei Vorhandensein einer Prüfchemikalie reagiert (beispielsweise durch eine Verfärbung eines pH-Indikatorfarbstoffs oder einer Kombination von Farbstoffen aufgrund des Vorliegens der Prüfchemikalie oder durch andere chemische oder elektrochemische Reaktionen).

Chemikalie: Ein Stoff oder ein Gemisch.

Einkomponentiger Stoff: Ein nach seiner quantitativen Zusammensetzung definierter Stoff, bei dem mehr als ein Hauptbestandteil in einer Konzentration von mindestens 80 % w/w vorliegt.

Gemisch: Ein Gemisch oder eine Lösung, die aus zwei oder mehr Stoffen besteht.

Genauigkeit: Der Grad an Übereinstimmung zwischen Testergebnissen und akzeptierten Referenzwerten. Die Genauigkeit ist ein Maß der Leistung der Prüfmethode und ein Aspekt der Relevanz. Der Begriff wird oft im Sinne von „Übereinstimmung“ verwendet und bezeichnet den Anteil der korrekten Ergebnisse einer Prüfmethode (9).

GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals = Global harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung): Ein System zur Klassifizierung von Chemikalien (Stoffen und Gemischen) nach standardisierten Typen und Stufen physikalischer, gesundheitlicher und ökologischer Gefahren und zur entsprechenden Kennzeichnung durch Piktogramme, Signalwörter, Gefahrenhinweise, Sicherheitshinweise und Sicherheitsdatenbögen, um zum Schutz des Menschen (einschließlich Arbeitgeber, Arbeiter, Spediteure, Verbraucher und Notfall-Einsatzkräfte) und der Umwelt Informationen über die schädlichen Wirkungen der betreffenden Chemikalien zu verbreiten (1).

Hautverätzung, *in vivo*: Das Auslösen einer irreversiblen Hautschädigung, d. h. einer sichtbaren, bis in das Corium reichenden Nekrose der Epidermis nach Applikation einer Prüfchemikalie für die Dauer von bis zu 4 Stunden. Verätzungsreaktionen sind gekennzeichnet durch Geschwüre, Blutungen, blutige Verschorfungen und am Ende des Beobachtungszeitraums von 14 Tagen durch eine auf ein Ausbleichen der Haut zurückzuführende Verfärbung, komplett haarlose Bereiche und Narben. Bei der Beurteilung fragwürdiger Schädigungen ist die Histopathologie mit zu berücksichtigen.

IATA: Integrated Approach to Testing and Assessment = integrierter Prüfungs- und Bewertungsansatz.

Leistungsstandards: Auf einer validierten Prüfmethode beruhende Normen, auf deren Grundlage die Vergleichbarkeit einer vorgeschlagenen, mechanistisch und funktionell ähnlichen Prüfmethode bewertet werden kann. Sie umfassen (i) wesentliche Elemente der Prüfmethode, (ii) ein Mindestverzeichnis von Referenzchemikalien, ausgewählt aus den

Chemikalien, die zum Nachweis der akzeptablen Leistung der validierten Referenzmethode verwendet werden, und (iii) je nach den für die validierte Referenzmethode erzielten Ergebnissen die vergleichbaren Zuverlässigkeits- und Genauigkeitswerte, die die vorgeschlagene Prüfmethode bei der Bewertung anhand des Mindestverzeichnisses von Referenzchemikalien demonstrieren sollte (9).

Mehrkomponentiger Stoff: Ein nach seiner quantitativen Zusammensetzung definierter Stoff, bei dem mehr als ein Hauptbestandteil in einer Konzentration von mindestens $\geq 10\%$ w/w und $< 80\%$ w/w vorhanden sind. Ein mehrkomponentiger Stoff ist das Ergebnis eines Herstellungsprozesses. Der Unterschied zwischen einem Gemisch und einem mehrkomponentigen Stoff besteht darin, dass ein Gemisch durch die Mischung von zwei oder mehr Stoffen ohne chemische Reaktion entsteht. Ein mehrkomponentiger Stoff wird durch eine chemische Reaktion gebildet.

NC: Nicht hautätzend

Prüfchemikalie: Stoff oder Gemisch, der/das mit dieser Prüfmethode untersucht wird.

Relevanz: Dieser Begriff bezieht sich auf das Verhältnis zwischen der Prüfmethode und der betreffenden Wirkung und auf die Frage, ob er aussagekräftig und nützlich für einen bestimmten Zweck ist. Er beschreibt das Ausmaß, in dem die Prüfmethode die untersuchte biologische Wirkung korrekt misst oder vorhersagt. Die Relevanz schließt eine Beurteilung der Genauigkeit (Übereinstimmung) einer Prüfmethode ein (9).

Sensitivität: Der Anteil aller positiven/wirkenden Chemikalien, die durch die Prüfmethode korrekt eingestuft werden. Die Sensitivität ist ein Maß der Genauigkeit einer Prüfmethode mit kategorialen Ergebnissen und ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung ihrer Relevanz (9).

Spezifizität: Der Anteil aller negativen/wirkungslosen Chemikalien, die durch die Prüfmethode korrekt eingestuft werden. Die Spezifität ist ein Maß der Genauigkeit einer Prüfmethode mit kategorialen Ergebnissen und ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung ihrer Relevanz (9).

Stoff: Ein chemisches Element und seine Verbindungen in natürlicher Form oder gewonnen durch ein Herstellungsverfahren, einschließlich der zur Wahrung seiner Stabilität notwendigen Zusatzstoffe und der durch das angewandte Verfahren bedingten Verunreinigungen, aber mit Ausnahme von Lösungsmitteln, die von dem Stoff ohne Beeinträchtigung seiner Stabilität und ohne Änderung seiner Zusammensetzung abgetrennt werden können.

Übereinstimmung: Die Übereinstimmung ist ein Maß der Leistung einer Prüfmethode für Prüfverfahren mit kategorialen Ergebnissen und ein Aspekt der Relevanz. Der Begriff wird gelegentlich gleichbedeutend mit Genauigkeit verwendet und als Anteil aller geprüften Chemikalien definiert, die korrekt als positiv oder negativ eingestuft werden. Die Übereinstimmung hängt in hohem Maße von der Prävalenz bei den Typen der untersuchten Prüfchemikalien ab (9).

UVCB: Stoffe mit unbekannter oder schwankender Zusammensetzung, komplexe Reaktionsprodukte oder biologische Materialien.

Zuverlässigkeit: Beschreibung der Beziehung zwischen der Prüfung und der untersuchten Wirkung und ob die Prüfung aussagekräftig und nützlich für einen bestimmten Zweck ist. Sie wird durch Berechnung der Intra- und Inter-Labor-Reproduzierbarkeit bewertet (9).

B.66 STTA-*IN-VITRO*-ASSAYS ZUM NACHWEIS VON ÖSTROGENREZEPTOR-AGONISTEN UND -ANTAGONISTEN

ALLGEMEINE EINLEITUNG

Leistungsbezogene OECD-Prüfrichtlinie

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 455 (2016). TG 455 ist eine PBTG (Performance-Based Test Guideline = leistungsbezogene Prüfrichtlinie), die die Methode der STTA-*in-vitro*-Assays (Stably Transfected Transactivation = Transaktivierung durch stabile Transfektion) zum Nachweis von Östrogenrezeptor-Agonisten und -Antagonisten (Estrogen Receptor (ER) Agonists and Antagonists) (ER-TA-Assays) beschreibt. Sie umfasst mehrere mechanisch und funktionell ähnliche Prüfmethoden zum Nachweis von Östrogenrezeptor-(oder ER α - und/oder ER β -)Agonisten und -Antagonisten und sollte die Entwicklung neuer ähnlicher oder modifizierter Prüfmethoden nach den Validierungsgrundsätzen im OECD Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment erleichtern (1). Die folgenden vollständig validierten Referenzprüfmethoden (Anlagen 2 und 3) sind Grundlage dieser PBTG:
 - Der STTA-Assay (2) unter Verwendung der (h) ER α -HeLa-9903-Zelllinie und
 - der VM7Luc-ER-TA-Assay (3) unter Verwendung der VM7Luc4E2-Zelllinie,¹ mit dem in erster Linie hER α sowie in beschränktem Umfang hER β (4) (5) exprimiert wird.

Zur Entwicklung und Validierung ähnlicher Assays für denselben Gefahren-Endpunkt sollten die verfügbaren Leistungsstandards (PS) (6) (7) verwendet werden. Sie ermöglichen eine frühzeitige Änderung der PBTG 455 zur Aufnahme neuer ähnlicher Assays in eine aktualisierte Fassung der PBTG; ähnliche Assays werden jedoch erst dann aufgenommen, wenn sie von der OECD geprüft wurden und von der OECD bestätigt wurde, dass die Leistungsstandards erfüllt werden. Die in TG 455 aufgenommenen Assays erfüllen die Anforderungen der OECD-Mitgliedstaaten an Prüfergebnisse bei Östrogenrezeptor-Transaktivierungen alle gleichermaßen und

¹ Vor Juni 2016 wurde diese Zelllinie als BG1Luc-Zelllinie bezeichnet. BG-1-Zellen wurden ursprünglich von Geisinger u. a. (1998) (35) beschrieben und später von Forschern am National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) charakterisiert (36). Erst vor verhältnismäßig kurzer Zeit wurde entdeckt, dass von BG-1-Zellen zwei Varianten existieren, die von Forschern verwendet werden: BG-1 Fr und BG-1 NIEHS. Eingehende Untersuchungen (u. a. DNA-Tests) der beiden Varianten von BG-1-Zelllinien durch Li u. a. (2014) (37) haben gezeigt, dass die Variante BG-1 Fr eine besondere Zelllinie war und dass die Variante BG-1 NIEHS, d. h. die ursprünglich zur Entwicklung des Assays verwendete Zelllinie, nicht die humane Ovarialkarzinom-Zelllinie BG1, sondern eine Variante der humanen Brustkrebs-Zelllinie MCF7 war. Die in dem Assay verwendete und ursprünglich als BG1Luc4E2 bezeichnete Zelllinie (38) wird nun als VM7Luc4E2 („V“ = Variante; „M7“ = MCF7-Zellen) bezeichnet. Entsprechend wird nun der Assay als VM7Luc-ER-TA-Assay bezeichnet. Die Zelllinien, auf denen der Assay beruht, haben also eine andere Herkunft. Für veröffentlichte Validierungsstudien und für die Verwendbarkeit und den Einsatz dieses Assays zur Untersuchung östrogen/antiöstrogen Chemikalien ist dies jedoch nicht von Bedeutung.

ermöglichen die gegenseitige Anerkennung der Daten gemäß dem OECD-Übereinkommen.

Hintergrund und Grundsätze der in diese Prüfmethode aufgenommenen Assays

2. Die OECD leitete 1998 mit hoher Priorität die Überarbeitung bestehender Prüfrichtlinien für Screening-Prüfungen und Untersuchungen potenziell endokriner Disruptoren und die Entwicklung neuer Prüfrichtlinien ein. Der „OECD Conceptual Framework (CF) for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals“ wurde 2012 überarbeitet. Die ursprünglichen und überarbeiteten CFs wurden dem OECD Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (8) als Anhänge beigelegt. Der CF umfasst fünf Ebenen mit jeweils eigener biologischer Komplexität. Die in dieser Prüfmethode beschriebenen ER-TA-Assays (ER-TA = Estrogen Receptor Agonists and Antagonists Transactivation) sind Ebene 2 (*In-vitro-Assays zur Ermittlung von Daten über ausgewählte endokrine Mechanismen/Wirkungspfade*) zuzuordnen. Diese Prüfmethode wurde für *In-vitro*-Transaktivierungs-Assays (TA-Assays) zur Ermittlung von Östrogenrezeptor-Agonisten und -Antagonisten (ER-Agonisten und -Antagonisten) entwickelt.
3. Das Zusammenwirken von Östrogenen mit ER kann die Transkription von Genen beeinträchtigen, die durch Östrogene gesteuert werden. Dadurch können Zellprozesse ausgelöst oder gehemmt werden (u. a. für die Zellproliferation, für die normale fetale Entwicklung und für die Reproduktion erforderliche Prozesse) (9) (10) (11). Störungen normaler östrogenen Systeme können Beeinträchtigungen der normalen Entwicklung (Ontogenese), der reproduktiven Gesundheit und des Reproduktionssystems auslösen.
4. *In-vitro*-TA-Assays beruhen auf einer mittelbaren oder unmittelbaren Wechselwirkung der Stoffe mit einem spezifischen Rezeptor, der die Transkription eines Reporter-Genprodukts steuert. Diese Assays wurden in großem Umfang zur Beurteilung der durch spezifische nukleäre Rezeptoren (z. B. ER) gesteuerten Gen-Expression verwendet (12) (13) (14) (15) (16). Sie wurden zur Erkennung einer durch die ER gesteuerten östrogenen Transaktivierung vorgeschlagen (17) (18) (19). Bei nukleären ER sind zumindest die zwei großen Untertypen α und β zu unterscheiden, die durch verschiedene Gene kodiert werden. Die betreffenden Proteine haben unterschiedliche biologische Funktionen, Gewebeverteilungen und Ligandenbindungsaffinitäten (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26). Nukleäre ER α vermitteln die klassische Östrogenreaktion (27) (28) (29) (30). Daher beziehen sich die meisten gegenwärtig zur Messung der Aktivierung oder Hemmung von ER entwickelten Modelle speziell auf ER α . Die Assays werden zur Ermittlung von Chemikalien verwendet, die nach erfolgter Ligandenbindung die ER aktivieren, was dazu führt, dass der Rezeptor-Ligandenkomplex eine Bindung mit spezifischen DNA-Response-Elementen eingeht und ein Reporter-Gen transaktiviert; dies wiederum bewirkt eine verstärkte zelluläre Expression eines Markerproteins. Für diese Assays können unterschiedliche Reporter-Reaktionen berücksichtigt werden.

Bei auf Luciferase basierenden Systemen wandelt das Enzym Luziferase das Luciferinsubstrat in ein biolumineszierendes Produkt um, das mit einem Luminometer einer quantitativen Messung unterzogen werden kann. Weitere Beispiele verbreiteter Reporter-Gene sind fluoreszierende Proteine und das *LacZ*-Gen, das β -Galactosidase kodiert. Dieses Enzym kann das farblose Substrat X-gal (5-Brom-4-chlor-indolyl-galactopyranosid) in ein blaues Produkt umwandeln, das mit einem Spektralfotometer quantitativ bestimmt werden kann. Diese Reporter-Gene können rasch und kostengünstig mit im Handel erhältlichen Test-Kits bewertet werden.

5. In Studien zur Validierung des STTA- und des VM7Luc-TA-Assays wurden die Relevanz und die Zuverlässigkeit im Hinblick auf die vorgesehene Verwendung nachgewiesen (3) (4) (5) (30). Im ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals (3) werden Leistungsstandards für luminiszenzbasierte ER-TA-Assays mit Brust-Zelllinien berücksichtigt. Diese Leistungsstandards wurden so modifiziert, dass sie sowohl beim STTA- als auch beim VM7Luc-TA-Assay angewendet werden können (2).
6. Die in der vorliegenden Prüfmethode verwendeten Begriffe und Abkürzungen werden in Anlage 1 erläutert.

Anwendungsbereich und Begrenzungen bei TA-Assays

7. Diese Assays werden für Screening- und Priorisierungszwecke vorgeschlagen, können aber auch zu mechanistischen Erkenntnissen führen, die im Rahmen von Beweiskraftermittlungen verwendet werden können. Gegenstand der Assays sind durch TA ausgelöste chemische Bindungen an die ER in einem *In-vitro*-System. Daher sollten Ergebnisse nicht unmittelbar für die komplexen Signal- und Steuerungswirkungen des intakten endokrinen *In-vivo*-Systems extrapoliert werden.
8. Durch ER vermittelte TA gelten als einer der zentralen Mechanismen endokriner Störungen (ED), wenngleich ED auch durch andere Mechanismen hervorgerufen werden können, darunter (i) Wechselwirkungen mit anderen Rezeptoren und Enzymsystemen des endokrinen Systems, (ii) Hormonsynthesen, (iii) Stoffwechselaktivierungen und/oder die Deaktivierung von Hormonen, (iv) die Verteilung von Hormonen an Zielgewebe und (v) die Beseitigung von Hormonen im Körper. Keiner der Assays im Rahmen dieser Prüfmethode hat diese Wirkungsweisen zum Gegenstand.
9. Gegenstand dieser Prüfmethode ist die Fähigkeit von Chemikalien, die ER-gesteuerte Transkription zu aktivieren (d. h. als Agonisten zu wirken) und zu unterdrücken (d. h. als Antagonisten zu fungieren). Einige Chemikalien können je nach Zelltyp sowohl als Agonisten als auch als Antagonisten wirken und sind als selektive Östrogenrezeptor-Modulatoren (SERM) bekannt. Chemikalien, für die in diesen Assays negative Ergebnisse ermittelt wurden, könnten einem Assay zur

Prüfung der ER-Bindung unterzogen werden, bevor festgestellt wird, dass sie keine Bindung mit dem Rezeptor eingehen. Außerdem geben die Assays wegen der begrenzten Metabolisierung von *In-vitro*-Zellsystemen Aufschluss vermutlich nur über die Aktivität der jeweiligen Ausgangsverbindung. Da bei der Validierung nur einzelne Stoffe verwendet wurden, wurde die Eignung für Prüfgemische nicht untersucht. Dennoch ist die Prüfmethode theoretisch auch für die Prüfung von mehrkomponentigen Stoffen, Stoffen mit unbekannter oder schwankender Zusammensetzung, komplexen Reaktionsprodukten oder biologischen Materialien (UVCB) und Gemischen geeignet. Bevor die Prüfmethode bei mehrkomponentigen Stoffen, UVCB oder Gemischen für die Generierung von Daten für einen bestimmten Regulierungszweck verwendet wird, ist zu prüfen, ob, und falls ja, warum, sie für den beabsichtigten Zweck geeignete Ergebnisse liefert. Solche Erwägungen entfallen, wenn die Prüfung des Gemischs von Rechts wegen vorgeschrieben ist.

10. Tabelle 1 enthält eine Übersicht über die Agonisten-Ergebnisse der 34 Stoffe, die mit den beiden in dieser Prüfmethode beschriebenen vollständig validierten Referenzprüfmethoden untersucht wurden. Von diesen Stoffen wurden nach veröffentlichten Berichten (u. a. aufgrund von *In-vitro*-Assays zur Prüfung auf ER-Bindungen und TA und/oder aufgrund des Uterotrophen Bioassays) (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34) 26 Stoffe sicher als ER-Agonisten und 8 als negativ eingestuft. Tabelle 2 enthält eine Übersicht über die Antagonisten-Ergebnisse der 15 Stoffe, die mit den beiden in dieser Prüfmethode beschriebenen vollständig validierten Referenzprüfmethoden untersucht wurden. Von diesen Stoffen wurden nach veröffentlichten Berichten (u. a. aufgrund von *In-vitro*-Assays zur Prüfung auf ER-Bindungen und TA) (2) (3) (18) (31) 4 Stoffe sicher/vermutlich als ER-Agonisten und 10 als negativ eingestuft. Nach den in den Tabellen 1 und 2 zusammengefassten Daten ergab sich hinsichtlich der Einstufungen aller Stoffe mit Ausnahme eines Stoffes (Mifepristone) beim Antagonisten-Assay eine 100%ige Übereinstimmung zwischen den beiden Referenzprüfmethoden, und alle Stoffe wurden zutreffend als ER-Agonisten/-Antagonisten bzw. als negativ eingestuft. Ergänzende Informationen über diese Gruppe von Chemikalien sowie über weitere Chemikalien, die im Rahmen der Validierungsstudien mit den STTA- und den VM7Luc-ER-TA-Assays untersucht wurden, sind den Leistungsstandards für die ER-TA (6) (7), Anlage 2 (Tabellen 1, 2 und 3) zu entnehmen.

Tabelle 1: Übersicht über die Ergebnisse von STTA- und VM7Luc-ER-TA-Assays bei Stoffen, die in beiden Agonisten-Prüfungen untersucht und als ER-Agonisten (POS) oder als negativ (NEG) eingestuft wurden.

	Stoff	CAS-Nr.	STTA-Assay ¹			VM7Luc-ER-TA-Assay ²		Datenquelle für die Einstufung ⁴		
			ER-TA Aktivität	PC ₁₀ -Wert (M)	PC ₅₀ -Wert ^b (M)	ER-TA Aktivität	EC ₅₀ -Wert ^{b,3} (M)	Sonstige ER-TAs ^c	ER Bindung	Uterotroph
1	17β-Estradiol	50-28-2	POS	$< 1,00 \times 10^{-11}$	$< 1,00 \times 10^{-11}$	POS	$5,63 \times 10^{-12}$	POS (227/227)	POS	POS
2	17α-Estradiol	57-91-0	POS	$7,24 \times 10^{-11}$	$6,44 \times 10^{-10}$	POS	$1,40 \times 10^{-9}$	POS (11/11)	POS	POS
3	17α-Ethinylestradiol	57-63-6	POS	$< 1,00 \times 10^{-11}$	$< 1,00 \times 10^{-11}$	POS	$7,31 \times 10^{-12}$	POS (22/22)	POS	POS
4	17β-Trenbolon	10161-33-8	POS	$1,78 \times 10^{-8}$	$2,73 \times 10^{-7}$	POS	$4,20 \times 10^{-8}$	POS (2/2)	NT	NT
5	19-Nortestosteron	434-22-0	POS	$9,64 \times 10^{-9}$	$2,71 \times 10^{-7}$	POS	$1,80 \times 10^{-6}$	POS (4/4)	POS	POS
6	4-Cumylphenol	599-64-4	POS	$1,49 \times 10^{-7}$	$1,60 \times 10^{-6}$	POS	$3,20 \times 10^{-7}$	POS (5/5)	POS	NT
7	4-tert-Octylphenol	140-66-9	POS	$1,85 \times 10^{-9}$	$7,37 \times 10^{-8}$	POS	$3,19 \times 10^{-8}$	POS (21/24)	POS	POS
8	Apigenin	520-36-5	POS	$1,31 \times 10^{-7}$	$5,71 \times 10^{-7}$	POS	$1,60 \times 10^{-6}$	POS (26/26)	POS	NT
9	Atrazin	1912-24-9	NEG	–	–	NEG	–	NEG (30/30)	NEG	NT
10	Bisphenol A	80-05-7	POS	$2,02 \times 10^{-8}$	$2,94 \times 10^{-7}$	POS	$5,33 \times 10^{-7}$	POS (65/65)	POS	POS
11	Bisphenol Ba	77-40-7	POS	$2,36 \times 10^{-8}$	$2,11 \times 10^{-7}$	POS	$1,95 \times 10^{-7}$	POS (6/6)	POS	POS
12	Butylbenzylphthalat	85-68-7	POS	$1,14 \times 10^{-6}$	$4,11 \times 10^{-6}$	POS	$1,98 \times 10^{-6}$	POS (12/14)	POS	NEG
13	Corticosteron	50-22-6	NEG	–	–	NEG	–	NEG (6/6)	NEG	NT
14	Cumestrol	479-13-0	POS	$1,23 \times 10^{-9}$	$2,00 \times 10^{-8}$	POS	$1,32 \times 10^{-7}$	POS (30/30)	POS	NT
15	Daidzein	486-66-8	POS	$1,76 \times 10^{-8}$	$1,51 \times 10^{-7}$	POS	$7,95 \times 10^{-7}$	POS (39/39)	POS	POS
16	Diethylstilbestrol	56-53-1	POS	$< 1,00 \times 10^{-11}$	$2,04 \times 10^{-11}$	POS	$3,34 \times 10^{-11}$	POS (42/42)	POS	NT
17	Di-n-butylphthalat	84-74-2	POS	$4,09 \times 10^{-6}$		POS	$4,09 \times 10^{-6}$	POS (6/11)	POS	NEG
18	Ethylparaben	120-47-8	POS	$5,00 \times 10^{-6}$	(ohne PC ₅₀)	POS	$2,48 \times 10^{-5}$	POS		NT
19	Estron	53-16-7	POS	$3,02 \times 10^{-11}$	$5,88 \times 10^{-10}$	POS	$2,34 \times 10^{-10}$	POS (26/28)	POS	POS
20	Genistein	446-72-0	POS	$2,24 \times 10^{-9}$	$2,45 \times 10^{-8}$	POS	$2,71 \times 10^{-7}$	POS (100/102)	POS	POS
21	Haloperidol	52-86-8	NEG	–	–	NEG	–	NEG (2/2)	NEG	NT
22	Kaempferol	520-18-3	POS	$1,36 \times 10^{-7}$	$1,21 \times 10^{-6}$	POS	$3,99 \times 10^{-6}$	POS (23/23)	POS	NT
23	Kepon	143-50-0	POS	$7,11 \times 10^{-7}$	$7,68 \times 10^{-6}$	POS	$4,91 \times 10^{-7}$	POS (14/18)	POS	NT
24	Ketoconazol	65277-42-1	NEG	–	–	NEG	–	NEG (2/2)	NEG	NT
25	Linuron	330-55-2	NEG	–	–	NEG	–	NEG (8/8)	NEG	NT
26	meso-Hexestrol	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	Methyltestosteron	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	Norethynodrel	68-23-5	POS	$1,11 \times 10^{-11}$	$1,50 \times 10^{-9}$	POS	$9,39 \times 10^{-10}$	POS (5/5)	POS	NT
30	p,p'-Methoxychlor	72-43-5	POS	$1,23 \times 10^{-6}$	(ohne PC ₅₀) ^b	POS	$1,92 \times 10^{-6}$	POS (24/27)	POS	POS
31	Phenobarbital	57-30-7	NEG	–	–	NEG	–	NEG (2/2)	NEG	NT
32	Reserpin	50-55-5	NEG	–	–	NEG	–	NEG (4/4)	NEG	NT
33	Spironolacton	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

Abkürzungen: CAS-NR. = CAS-Registrierungsnummer); M = molar; EC₅₀ = die Hälfte der maximalen Wirkungskonzentration eines Prüfstoffs; NEG = negativ; POS = positiv; NT = nicht geprüft; PC₁₀ (und PC₅₀) = Konzentration eines Prüfstoffs, bei der die Reaktion 10 % (bzw. 50 % bei PC₅₀) der Reaktion entspricht, die auf allen Platten mit der Positivkontrolle (E2, 1 nM) ausgelöst wird.

a Verbreitete mit dem STTA- und dem VM7Luc-ER-TA-Assay geprüfte Stoffe, die als ER-Agonisten ermittelt oder als negativ eingestuft und in der Studie zur Validierung des VM7Luc-ER-TA-Assays (ICCVAM VM7Luc ER TA Evaluation Report, Tabelle 4-1 (3) zur Bewertung der Genauigkeit verwendet wurden.

b Die Höchstkonzentration, die dann geprüft wurde, wenn aufgrund einer Zytotoxizität oder einer Unlöslichkeit keine Begrenzungen bestanden, betrug 1×10^{-5} M (STTA-Assay) bzw. 1×10^{-3} M (VM7Luc-ER-TA-Assay).

c Die Zahl in Klammern steht für die Anzahl der Prüfergebnisse, die als positiv (POS) bzw. negativ (NEG) eingestuft wurden, und wird bezogen auf die Gesamtzahl der berücksichtigten Prüfungen angegeben.

1 Angegebene Werte im 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 Die mittleren EC₅₀-Werte wurden anhand von Werten berechnet, die die Labors der Studie zur Validierung des VM7Luc-ER-TA-Assays (XDS, ECVAM und Hiyoshi) (3) angegeben hatten.

4 Die Einstufung als ER-Agonist oder als negativ beruhte auf Informationen in den ICCVAM Background Review Documents (BRD) zu Assays zur Prüfung der ER-Bindung und zu TA-Assays (31) sowie auf Informationen aus nach Erstellung der ICCVAM BRDs erfolgten und geprüften Veröffentlichungen (2) (3) (18) (31) (33) (34).

Anmerkungen: Bei den Assays im Rahmen dieser Prüfmethode werden nicht immer dieselben Messungen durchgeführt. Manchmal kann der EC₅₀-Wert nicht berechnet werden, weil keine vollständige Dosis-Reaktions-Kurve erzeugt wurde. Beim STTA-Assay ist der PC₁₀-Wert ein wichtiger Parameter; in anderen Fällen kann möglicherweise aber auch ein PC_x-Wert hilfreich sein.

Tabelle 2: Vergleich der Ergebnisse von STTA- und VM7Luc-ER-TA-Assays bei Stoffen, die in beiden Antagonisten-Prüfungen untersucht und als ER-Antagonisten (POS) oder als negativ (NEG) eingestuft wurden.

	Stoff ^a	CAS-Nr.	ER-STTA-Assay ¹		VM7Luc-ER-STTA-Assay ²		Wirkungen bei ER-STTA-Kandidaten ⁴	ICCVAM ⁵ -Konsens-klassifikation	MeSH ⁶ -Chemikalienklasse	Produktklasse ⁷
			ER-TA-Aktivität	IC ₅₀ -Wert ^b (M)	ER-TA-Aktivität	IC ₅₀ -Wert ^{b,3} (M)				
1	4-Hydroxytamoxifen	68047-06-3	POS	$3,97 \times 10^{-9}$	POS	$2,08 \times 10^{-7}$	mäßig POS	POS	Kohlenwasserstoff (cyclisch)	Pharmazeutisches Erzeugnis
2	Dibenzo(a,h)anthracen	53-70-3	POS	Ohne IC ₅₀	POS	Ohne IC ₅₀	POS	PP	Polycyclische Verbindung	Laborchemikalie, Naturprodukt
3	Mifepriston	84371-65-3	POS	$5,61 \times 10^{-6}$	NEG	–	schwach POS	NEG	Steroid	Pharmazeutisches Erzeugnis
4	Raloxifen-HCl	82640-04-8	POS	$7,86 \times 10^{-10}$	POS	$1,19 \times 10^{-9}$	mäßig POS	POS	Kohlenwasserstoff (cyclisch)	Pharmazeutisches Erzeugnis
5	Tamoxifen	10540-29-1	POS	$4,91 \times 10^{-7}$	POS	$8,17 \times 10^{-7}$	POS	POS	Kohlenwasserstoff (cyclisch)	Pharmazeutisches Erzeugnis
6	17β-Estradiol	50-28-2	NEG	–	NEG	–	PN	PN	Steroid	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärmedizinisches Agens
7	Apigenin	520-36-5	NEG	–	NEG	–	NEG	NEG	Heterocyclische Verbindung	Farbstoff, Naturprodukt, pharmazeutisches Zwischenprodukt
8	Atrazin	1912-24-9	NEG	–	NEG	–	NEG	PN	Heterocyclische Verbindung	Herbizid
9	Di-n-butylphthalat	84-74-2	NEG	–	NEG	–	NEG	NEG	Ester, Phthalsäure	Kosmetischer Inhaltsstoff, Industriechemikalie, Weichmacher
10	Fenarimol	60168-88-9	NEG	–	NEG	–	nicht geprüft	PN	Heterocyclische Verbindung, Pyrimidin	Fungizid
11	Flavon	525-82-6	NEG	–	NEG	–	PN	PN	Flavonoid, heterocyclische Verbindung	Naturprodukt, pharmazeutisches Erzeugnis
12	Flutamid	13311-84-7	NEG	–	NEG	–	NEG	PN	Amid	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärmedizinisches Agens
13	Genistein	446-72-0	NEG	–	NEG	–	PN	NEG	Flavonoid, heterocyclische Verbindung	Naturprodukt, pharmazeutisches Erzeugnis

14	p-n-Nonylphenol	104-40-5	NEG	–	NEG	–	nicht geprüft	NEG	Phenol	Chemisches Zwischenprodukt
15	Resveratrol	501-36-0	NEG	–	NEG	–	PN	NEG	Kohlenwasserstoff (cyclisch)	Naturprodukt

Abkürzungen: CASRN = CAS-Registrierungsnummer; M = molar; IC₅₀ = die Hälfte der maximalen Hemmkonzentration eines Prüfstoßs; NEG = negativ; PN = vermutlich negativ; POS = positiv; PP = vermutlich positiv.

^a Verbreitete mit dem STTA- und dem VM7Luc-ER-TA-Assay geprüfte Stoffe, die als ER-Antagonisten ermittelt oder als negativ eingestuft und in der Studie zur Validierung des VM7Luc-ER-TA-Assays zur Bewertung der Genauigkeit verwendet wurden (2) (3).

^b Die Höchstkonzentration, die dann geprüft wurde, wenn aufgrund einer Zytotoxizität oder einer Unlöslichkeit keine Begrenzungen bestanden, betrug 1 x 10⁻³ M (STTA-Assay) bzw. 1 x 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 Die mittleren EC₅₀-Werte wurden anhand von Werten berechnet, die die Labors der Studie zur Validierung des VM7Luc-ER-TA-Assays (XDS, ECVAM und Hiyoshi) (3) angegeben hatten.

⁴ Aufgrund der angegebenen Wirkungen nach historischen CERi-Daten zum ER-Assay zur Prüfung der Bindewirkung und zum uterotrophen Bioassay sowie nach Informationen aufgrund von Recherchen in offen zugänglicher Literatur (2) vermutete ER-STTA-Aktivität.

⁵ Die Einstufung als ER-Antagonist oder als negativ beruhte auf Informationen in den ICCVAM Background Review Documents (BRD) zu Assays zur Prüfung der ER-Bindung und zu TA-Assays (31) sowie auf Informationen aus nach Erstellung der ICCVAM BRDs erfolgten und geprüften Veröffentlichungen (2) (3) (18) (31).

⁶ Die Stoffe wurden nach den Medical Subject Headings (MeSH) der U.S. National Library of Medicine, einem international anerkannten standardisierten Klassifizierungssystem, (siehe <http://www.nlm.nih.gov/mesh>) einer oder mehreren Chemikalienklassen zugeordnet.

⁷ Die Stoffe wurden nach der Gefahrstoff-Datenbank der U.S. National Library of Medicine (siehe <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>) einer oder mehreren Produktklassen zugeordnet.

ELEMENTE DES ER-TA-ASSAYS

Wesentliche Elemente des Assays

11. Diese Prüfmethode gilt für Assays unter Verwendung eines stabil transfizierten oder endogenen ER α -Rezeptors und eines stabil transfizierten Reporter-Genprodukts unter Steuerung durch eines oder mehrere Östrogen-Response-Elemente; es können aber auch andere Rezeptoren (z. B. ER β) vorhanden sein. Der Assay beinhaltet die folgenden wesentlichen Elemente:

Kontrollen

12. Die Grundlage der vorgeschlagenen gleichzeitigen Referenzstandards für die einzelnen Agonisten- und Antagonisten-Assays sollte erläutert werden. Gegebenenfalls dienen gleichzeitige Kontrollen (Negativ-, Lösungsmittel- und Positivkontrolle) als Anzeichen dafür, dass der Assay unter den Prüfbedingungen funktioniert; außerdem bilden sie eine Grundlage für versuchsübergreifende Vergleiche. In der Regel sind sie Bestandteil der Akzeptanzkriterien für die Versuche (1).

Standard-Qualitätskontrollverfahren

13. Die einzelnen Assays sollten Standard-Qualitätskontrollverfahren unterzogen werden, wie jeweils beschrieben, um sicherzustellen, dass die Zelllinie auch nach mehreren Durchgängen stabil bleibt, kein Mycoplasma aufweist (d. h. frei von Bakterienkontaminationen ist) und unverändert in der Lage ist, die erwarteten durch ER vermittelten Reaktionen zu entwickeln. Außerdem sollten die Identität der Zelllinien geprüft und Untersuchungen auf andere Verunreinigungen (z. B. Pilze, Hefen und Viren) vorgenommen werden.

Nachweis der Eignung des Labors

14. Vor der Prüfung unbekannter Chemikalien mit einem der Assays dieser Prüfmethode sollte jedes Labor nachweisen, dass es in der Lage ist, den betreffenden Assay durchzuführen. Zum Nachweis seiner Leistungsfähigkeit sollte jedes Labor die 14 Leistungsstoffe in Tabelle 3 für den Agonisten-Assay und die 10 Leistungsstoffe in Tabelle 4 für den Antagonisten-Assay prüfen. Mit dieser Eignungsprüfung wird auch die Empfindlichkeit des Prüfsystems nachgewiesen. Die Liste der Leistungsstoffe ist eine Untergruppe der Referenzstoffe der Leistungsstandards für die ER-TA-Assays (6). Diese Stoffe sind im Handel erhältlich und entsprechen den Chemikalienklassen, bei denen gewöhnlich eine Aktivität von ER-Agonisten bzw. -Antagonisten zu verzeichnen ist. Außerdem zeigen sie ein geeignetes und für ER-Agonisten bzw. -Antagonisten zu erwartendes Wirkungsspektrum (d. h. stark bis schwach) und umfassen auch Negativstoffe. Die Untersuchung der Leistungsstoffe sollte an unterschiedlichen Tagen mindestens zweimal wiederholt werden. Die Leistungsfähigkeit wird durch die ordnungsgemäße Einstufung (positiv/negativ) der einzelnen Leistungsstoffe nachgewiesen. Beim Erlernen der Assays sollte die Eignungsprüfung von jedem einzelnen

Labortechniker wiederholt werden. Je nach Zelltyp können sich einige dieser Leistungsstoffe wie selektive Östrogenrezeptor-Modulatoren (SERM) verhalten und sowohl als Agonisten als auch als Antagonisten wirken. Die Leistungsstoffe werden in den Tabellen 3 und 4 jedoch nach ihrer bekannten vorwiegenden Aktivität eingestuft, die auch für die Bewertung der Leistungsfähigkeit angenommen werden sollte.

15. Zum Nachweis der Leistungsfähigkeit und zu Qualitätskontrollzwecken sollte jedes Labor Datenbanken mit historischen Daten zu Agonisten und Antagonisten mit Daten zu Referenzstandards (z. B. 17 β -Estradiol und Tamoxifen) sowie zu Positiv- und Negativkontrollchemikalien und Lösungsmittelkontrollen (z. B. DMSO) erstellen. Die Datenbank sollte beginnend mit Prüfläufen mit mindestens 10 unabhängigen Agonisten (z. B. 17 β -Estradiol) und 10 unabhängigen Antagonisten (z. B. Tamoxifen) erstellt werden. Anschließend sollten die Ergebnisse künftiger Analysen dieser Referenzstandards und Lösungsmittelkontrollen in die Datenbank aufgenommen werden, um die Konsistenz und die Leistungsfähigkeit des im jeweiligen Labor im Laufe der Zeit durchgeführten Bioassays sicherzustellen.

Tabelle 3: Liste mit (14) Leistungsstoffen für Agonisten-Assays⁸

Nr. ⁷	Stoff	CAS-Nr.	Erwartete Reaktion ¹	STTA-Assay			VM7Luc-ER-TA-Assay		MeSH-Chemikalienklasse ⁵	Produktklasse ⁶
				PC ₁₀ -Wert (M) ²	PC ₅₀ -Wert (M) ²	Prüfkonzentrationsbereich (M)	VM7Luc-EC ₅₀ -Wert (M) ³	Höchstkonzentration für Vorversuch (M) ⁴		
14	Diethylstilbestrol	56-53-1	POS	$< 1,00 \times 10^{-11}$	$2,04 \times 10^{-11}$	$10^{-14} - 10^{-8}$	$3,34 \times 10^{-11}$	$3,73 \times 10^{-4}$	Kohlenwasserstoff (cyclisch)	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärmedizinisches Agens
12	17 α -Estradiol	57-91-0	POS	$4,27 \times 10^{-11}$	$6,44 \times 10^{-10}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1,40 \times 10^{-9}$	$3,67 \times 10^{-3}$	Steroid	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärmedizinisches Agens
15	meso-Hexestrol	84-16-2	POS	$< 1,00 \times 10^{-11}$	$2,75 \times 10^{-11}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1,65 \times 10^{-11}$	$3,70 \times 10^{-3}$	Kohlenwasserstoff (cyclisch), Phenol	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärmedizinisches Agens
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	Chemisches Zwischenprodukt
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, heterocyclische Verbindung	Naturprodukt, pharmazeutisches Erzeugnis
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	Chemisches Zwischenprodukt
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, heterocyclische Verbindung	Naturprodukt
3	Butylbenzylphthalat	85-68-7	POS	$1,14 \times 10^{-6}$	$4,11 \times 10^{-6}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1,98 \times 10^{-6}$	$3,20 \times 10^{-4}$	Carboxylsäure, Ester, Phthalsäure	Weichmacher, Industriechemikalie
4	p,p'-Methoxychlor	72-43-5	POS	$1,23 \times 10^{-6}$	–	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1,92 \times 10^{-6}$	$2,89 \times 10^{-3}$	Kohlenwasserstoff (halogeniert)	Pestizid, veterinärmedizinisches Agens
1	Ethylparaben	120-47-8	POS	$5,00 \times 10^{-6}$	–	$10^{-11} - 10^{-5}$	$2,48 \times 10^{-5}$	$6,02 \times 10^{-3}$	Carboxylsäure, Phenol	Pharmazeutisches Erzeugnis, Konservierungsmittel

17	Atrazin	1912-24-9	NEG	–	–	$10^{-10} - 10^{-4}$	–	$4,64 \times 10^{-4}$	Heterocyclische Verbindung	Herbizid
20	Spironolacton	52-01-7	NEG	–	–	$10^{-11} - 10^{-5}$	–	$2,40 \times 10^{-3}$	Lacton, Steroid	Pharmazeutisches Erzeugnis
21	Ketoconazol	65277-42-1	NEG	–	–	$10^{-11} - 10^{-5}$	–	$9,41 \times 10^{-5}$	Heterocyclische Verbindung	Pharmazeutisches Erzeugnis
22	Reserpin	50-55-5	NEG	–	–	$10^{-11} - 10^{-5}$	–	$1,64 \times 10^{-3}$	Heterocyclische Verbindung, Indol	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärmedizinisches Agens

Abkürzungen: CAS-NR. = CAS-Registrierungsnummer; EC₅₀ = die Hälfte der maximalen Wirkungskonzentration eines Prüfstoﬀs; NEG = negativ; POS = positiv; PC₁₀ (und PC₅₀) = Konzentration eines Prüfstoﬀs, bei der die Reaktion 10 % (bzw. 50 % bei PC₅₀) der Reaktion entspricht, die auf allen Platten mit der Positivkontrolle (E2, 1 nM) ausgelöst wird.

- 1 Die Einstufung der ER-Agonisten-Aktivität als positiv oder als negativ beruhte auf den ICCVAM Background Review Documents (BRD) zu Assays zur Prüfung der ER-Bindung und zu TA-Assays (31) sowie auf empirischen Daten und anderen Informationen aus nach Erstellung der ICCVAM BRDs erfolgten und geprüften Untersuchungen (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34).
- 2 Angegebene Werte im 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 Die mittleren EC₅₀-Werte wurden anhand von Werten berechnet, die die Labors der Studie zur Validierung des VM7Luc-ER-TA-Assays (XDS, ECVAM und Hiyoshi) (3) angegeben hatten.
- 4 Die angegebenen Konzentrationen waren die höchsten geprüften Konzentrationen (Vorversuch) bei der Validierung des VM7Luc-ER-TA-Assays. Wenn in den Labors unterschiedliche Konzentrationen verwendet wurden, wird die höchste Konzentration angenommen. Siehe Tabelle 4-10 des 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 Die Stoffe wurden nach den Medical Subject Headings (MeSH) der U.S. National Library of Medicine, einem international anerkannten standardisierten Klassifizierungssystem, (siehe <http://www.nlm.nih.gov/mesh>) einer oder mehreren Chemikalienklassen zugeordnet.
- 6 Die Stoffe wurden nach der Gefahrstoﬀ-Datenbank der U.S. National Library of Medicine (siehe <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>) einer oder mehreren Chemikalienklassen zugeordnet.
- 7 Aus Tabelle 1 (Liste der Referenzchemikalien (22) zur Beurteilung der Genauigkeit der Prüfung von ER-Agonisten) der Leistungsstandards (6).
- 8 Wenn ein Leistungsstoﬀ nicht mehr im Handel erhältlich ist, kann ein Stoﬀ derselben Klassifikation und mit vergleichbarer Wirksamkeit, Wirkungsweise und Klassifizierung verwendet werden.

Tabelle 4: Liste mit (10) Leistungstoffen für Antagonisten-Assays

	Stoff ^a	CAS-Nr.	ER-STTA-Assay ¹			VM7Luc-ER-STTA-Assay ²			Wirkungen bei ER-STTA ¹ -Kandidaten	ICCVAM ⁵ -Konsens-klassifikation	MeSH ⁶ -Chemikalienklasse	Produktklasse ⁷
			ER-TA-Aktivität	IC ₅₀ (M)	Prüfkonzentrationsbereich (M)	ER-TA-Aktivität	IC ₅₀ ³ (M)	Höchstkonzentration für Vorversuch (M) ⁴				
1	4-Hydroxytamoxifen	68047-06-3	POS	$3,97 \times 10^{-9}$	$10^{-12} - 10^{-7}$	POS	$2,08 \times 10^{-7}$	$2,58 \times 10^{-4}$	mäßig POS	POS	Kohlenwasserstoff (cyclisch)	Pharmazeutisches Erzeugnis
2	Raloxifen-HCl	82640-04-8	POS	$7,86 \times 10^{-10}$	$10^{-12} - 10^{-7}$	POS	$1,19 \times 10^{-9}$	$1,96 \times 10^{-4}$	mäßig POS	POS	Kohlenwasserstoff (cyclisch)	Pharmazeutisches Erzeugnis
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	Kohlenwasserstoff (cyclisch)	Pharmazeutisches Erzeugnis
4	17β-Estradiol	50-28-2	NEG	–	$10^{-9} - 10^{-4}$	NEG	–	$3,67 \times 10^{-3}$	vermutlich negativ*	PN	Steroid	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärmedizinisches Agens
5	Apigenin	520-36-5	NEG	–	$10^{-9} - 10^{-4}$	NEG	–	$3,70 \times 10^{-4}$	NEG	NEG	Heterocyclische Verbindung	Farbstoff, Naturprodukt, pharmazeutisches Zwischenprodukt
6	Di-n-butylphthalat	84-74-2	NEG	–	$10^{-8} - 10^{-3}$	NEG	–	$3,59 \times 10^{-3}$	NEG	NEG	Ester, Phthalsäure	Kosmetischer Inhaltsstoff, Industriechemikalie, Weichmacher
7	Flavon	525-82-6	NEG	–	$10^{-8} - 10^{-3}$	NEG	–	$4,50 \times 10^{-4}$	vermutlich negativ*	PN	Flavonoid, heterocyclische Verbindung	Naturprodukt, pharmazeutisches Erzeugnis
8	Genistein	446-72-0	NEG	–	$10^{-9} - 10^{-4}$	NEG	–	$3,70 \times 10^{-4}$	vermutlich negativ*	NEG	Flavonoid, heterocyclische Verbindung	Naturprodukt, pharmazeutisches Erzeugnis
9	p-n-Nonylphenol	104-40-5	NEG	–	$10^{-9} - 10^{-4}$	NEG	–	$4,54 \times 10^{-4}$	nicht geprüft	NEG	Phenol	Chemisches Zwischenprodukt
10	Resveratrol	501-36-0	NEG	–	$10^{-8} - 10^{-3}$	NEG	–	$4,38 \times 10^{-4}$	vermutlich negativ*	NEG	Kohlenwasserstoff (cyclisch)	Naturprodukt

Abkürzungen: CASRN = CAS-Registrierungsnummer; M = molar; IC₅₀ = die Hälfte der maximalen Hemmkonzentration eines Prüfstoßs; NEG = negativ; PN = vermutlich negativ; POS = positiv.

* Nach einer Literaturrecherche als negativ eingestuft (2).

^a Verbreitete mit dem STTA- und dem VM7Luc-ER-TA-Assay geprüfte Stoffe, die als ER-Antagonisten ermittelt oder als negativ eingestuft und in der Studie zur Validierung des VM7Luc-ER-TA-Assays zur Bewertung der Genauigkeit verwendet wurden (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 Die mittleren EC₅₀-Werte wurden anhand von Werten berechnet, die die Labors der Studie zur Validierung des VM7Luc-ER-TA-Assays (XDS, ECVAM und Hiyoshi) (3) angegeben hatten.

⁴ Die angegebenen Konzentrationen waren die höchsten geprüften Konzentrationen (Vorversuch) bei der Validierung des VM7Luc-ER-TA-Assays. Wenn in den Labors unterschiedliche Konzentrationen verwendet wurden, wird die höchste Konzentration angenommen. Siehe Tabelle 4-11 des 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 Die Einstufung als ER-Antagonist oder als negativ beruhte auf Informationen in den ICCVAM Background Review Documents (BRD) zu Assays zur Prüfung der ER-Bindung und zu TA-Assays (31) sowie auf Informationen aus nach Erstellung der ICCVAM BRDs erfolgten und geprüften Veröffentlichungen (2) (3) (18) (31).

⁶ Die Stoffe wurden nach den Medical Subject Headings (MeSH) der U.S. National Library of Medicine, einem international anerkannten standardisierten Klassifizierungssystem, (siehe <http://www.nlm.nih.gov/mesh>) einer oder mehreren Chemikalienklassen zugeordnet.

⁷ Die Stoffe wurden nach der Gefährstoff-Datenbank der U.S. National Library of Medicine (siehe <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>) einer oder mehreren Produktklassen zugeordnet.

Akzeptanzkriterien für Prüfläufe

16. Ob ein Prüflauf akzeptiert wird, hängt von der Bewertung der Ergebnisse mit den jeweils verwendeten Referenzstandards und Kontrollen ab. Die PC_{50} - (EC_{50} -) bzw. die IC_{50} -Werte bei den Referenzstandards sollten die Akzeptanzkriterien des betreffenden Assays erfüllen (zum STTA-Assay siehe Anlage 2 und zum VM7Luc-ER-TA-Assay siehe Anlage 3), und alle positiven/negativen Kontrollen sollten für jeden akzeptierten Versuch ordnungsgemäß eingestuft werden. Die Fähigkeit zur konsistenten Durchführung der Assays sollte durch den Aufbau und die Pflege einer historischen Datenbank für die Referenzstandards und Kontrollen nachgewiesen werden (Nummer 15). Standardabweichungen (SD) oder Variationskoeffizienten (VK) der Mittelwerte von Parametern zur Anpassung der Referenzstandardkurven aus mehreren Versuchen können als Maßstab für die Reproduzierbarkeit innerhalb eines Labors herangezogen werden. Darüber hinaus sollten für Akzeptanzkriterien die folgenden Grundsätze gelten:

- Die Daten sollten hinreichend für eine quantitative Bewertung der ER-Aktivierung (beim Agonisten-Assay) bzw. zur ER-Unterdrückung (beim Antagonisten-Assay) (d. h. zur Bewertung der Wirksamkeit und Leistungsfähigkeit) sein.
- Die mittlere Reporter-Aktivität bei der Referenzkonzentration des Referenzöstrogens sollte wenigstens der bei den betreffenden Assays für die Vehikelkontrolle (Lösungsmittelkontrolle) spezifizierten Mindestaktivität entsprechen, damit eine angemessene Empfindlichkeit gewährleistet ist. Beim STTA- und beim VM7Luc-ER-TA-Assay beträgt diese Aktivität das Vierfache der Aktivität der mittleren Vehikelkontrolle der jeweiligen Platte.
- Die geprüften Konzentrationen sollten im Löslichkeitsbereich der Prüfchemikalien bleiben und nicht zytotoxisch wirken.

Analyse der Daten

17. Positive bzw. negative Reaktionen sollten nach dem für den jeweiligen Assay festgelegten Verfahren zur Auswertung der Daten analysiert werden.
18. Die Erfüllung der Akzeptanzkriterien (Nummer 16) deutet darauf hin, dass ein Assay ordnungsgemäß funktioniert. Dies gewährleistet jedoch nicht, dass ein bestimmter Prüflauf tatsächlich exakte Daten ergibt. Die Wiederholung der Ergebnisse des ersten Prüflaufs ist die beste Bestätigung dafür, dass exakte Daten ermittelt wurden. Wenn zwei Prüfläufe zu reproduzierbaren Ergebnissen führen (d. h. wenn für eine Prüfchemikalie in beiden Prüfläufen ein positives Ergebnis ermittelt wurde), ist ein dritter Prüflauf nicht erforderlich.
19. Führen zwei Prüfläufe zu unterschiedlichen Ergebnissen (z. B. bei einer einzigen Prüfchemikalie einmal ein positives und einmal ein negatives Ergebnis) oder wenn eine höhere Gewissheit hinsichtlich des Ergebnisses benötigt wird, sollten mindestens drei

unabhängige Prüfläufe durchgeführt werden. In diesem Fall wird die Einstufung anhand der beiden übereinstimmenden Ergebnisse von drei Prüfläufen vorgenommen.

Allgemeine Kriterien für die Auswertung von Daten

20. Zurzeit besteht keine allgemein anerkannte Methode zur Auswertung der Daten aus ER-TA-Assays. Allerdings sollten qualitative (z. B. positiv/negativ) und/oder quantitative (z. B. EC₅₀, PC₅₀ und IC₅₀) Bewertungen einer durch ER vermittelten Aktivität auf empirischen Daten und fundierten wissenschaftlichen Beurteilungen beruhen. Nach Möglichkeit sollten positive Ergebnisse sowohl unter Angabe der Größenordnung der Wirkung im Vergleich zur Vehikelkontrolle (Lösungsmittelkontrolle) oder zum Referenzöstrogen als auch der Konzentration beschrieben werden, bei der die Wirkung eintritt (z. B. EC₅₀, PC₅₀, RPC_{Max} oder IC₅₀).

Prüfbericht

21. Der Prüfbericht sollte folgende Angaben enthalten:

Gehalt:

- durchgeführter Assay;
- Kontrolle/Referenzstandard/Prüfchemikalie;
- Herkunft, Partienummer, ggf. begrenztes Verwendungsdatum;
- Stabilität der Prüfchemikalie, falls bekannt;
- Löslichkeit und Stabilität der Prüfchemikalie in Lösungsmittel, falls bekannt;
- Messung des pH-Werts, Osmolalität und ggf. Niederschlag im Kulturmedium, dem die Prüfchemikalie zugegeben wurde.

Einkomponentiger Stoff:

- physikalisches Erscheinungsbild, Wasserlöslichkeit und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften;
- chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS-Bezeichnung, CAS-Nummer, SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel, Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.

Mehrkomponentiger Stoff, UVCB-Stoffe und Gemische:

- so weit wie möglich charakterisiert durch die chemische Zusammensetzung (siehe oben), das quantitative Vorkommen und die relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften der einzelnen Komponenten.

Lösungsmittel/Vehikel:

- Beschreibung (Art, Lieferant und Charge);
- Begründung der Auswahl des Lösungsmittels/Vehikels;
- Löslichkeit und Stabilität der Prüfchemikalie in Lösungsmittel/in einem Vehikel, falls bekannt.

Zellen:

- Art und Herkunft der Zellen:
 - Wurde ER endogen exprimiert? Wenn nicht, welche Rezeptor(en) wurden transfiziert?
 - verwendete(s) Reporter-Genprodukt(e) (einschließlich Spezies);
 - Transfektionsmethode;
 - (ggf.) Auswahlmethode zur Aufrechterhaltung einer stabilen Transfektion);
 - ist die Transfektionsmethode für stabile Linien relevant?
- ggf. Passagenanzahl (nach dem Auftauen);
- Passagenanzahl beim Auftauen;
- zum Erhalt der Zellkultur verwendete Verfahren.

Prüfbedingungen:

- Löslichkeitsgrenzen;
- Beschreibung der eingesetzten Methoden zur Bewertung der Viabilität;
- Medienzusammensetzung, CO₂-Konzentration;
- Konzentrationen der Prüfchemikalie;
- Volumen des Vehikels und der beigegebenen Prüfchemikalie;
- Inkubationstemperatur und Feuchte;
- Behandlungsdauer;
- Zelldichte zu Beginn und während der Behandlung;
- positive und negative Referenzstandards;
- Reporter-Reagenzien (Produktbezeichnung, Hersteller und Charge);
- Kriterien zur Einstufung der Prüfläufe als positiv, negativ oder nicht eindeutig.

Akzeptanzprüfung:

- n-fache Induktionen der einzelnen Assay-Platten und Angabe, ob damit die Mindestanforderungen des betreffenden Assays nach historischen Kontrollen erfüllt werden;
- tatsächliche Werte der Akzeptanzkriterien, z. B. $\log_{10}$ -, EC_{50} , $\log_{10}$ -, PC_{50} -, $\log IC_{50}$ - und Hillslope-Werte für gleichzeitige Positivkontrollen/Referenzstandards.

Ergebnisse:

- Rohdaten und normalisierte Daten;
- höchste n-fache Induktion;
- Zytotoxizitätsdaten;
- wenn vorhanden, niedrigste Wirkungskonzentration (LEC);
- ggf. RPC_{Max} , PC_{Max} , PC_{50} , IC_{50} und/oder EC_{50} ;
- nach Möglichkeit Konzentrations-Wirkungs-Verhältnis;
- wenn vorhanden, statistische Analysen sowie Messabweichung und Konfidenzwerte (z. B. SEM, SD, VK oder 95 % CI) sowie Angaben dazu, wie diese Werte ermittelt wurden.

Erörterung der Ergebnisse.

Schlussfolgerung.

LITERATUR

- (48) 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (49) 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (50) 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.
- (51) Pujol, P., u. a. (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, *Cancer. Res.*, 58(23): S. 5367-5373.
- (52) Rogers, J.M. und 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.
- (53) 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (54) 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (55) OECD (2012). 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.

- (56) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept. *Climacteric*, 5 Suppl 2: S. 20-26.
- (57) Welboren, W.J., u. a. (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and how are they Regulated? *Endocr. Relat. Cancer*, 16(4): S. 1073-1089.
- (58) Younes, M. und Honma, N. (2011). Estrogen Receptor Beta, *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 135(1): S. 63-66.
- (59) Jefferson, W.N., u. a. (2002). Assessing Estrogenic Activity of Phytochemicals Using Transcriptional Activation and Immature Mouse Uterotrophic Responses, *Journal of Chromatography B*, 777(1-2): S. 179-189.
- (60) Sonneveld, E., u. a. (2006). Comparison of *In Vitro* and *In Vivo* Screening Models for Androgenic and Estrogenic Activities, *Toxicol. Sci.*, 89(1): S. 173-187.
- (61) Takeyoshi, M., u. a. (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.
- (62) 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.
- (63) Escande, A., u. a. (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol.*, 71(10): S. 1459-1469.
- (64) Gray, L.E. Jr. (1998). Tiered Screening and Testing Strategy for Xenoestrogens and Antiandrogens, *Toxicol. Lett.*, 102-103, 677-680.
- (65) EDSTAC (1998). Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final Report.
- (66) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.
- (67) Gustafsson, J.Ö. (1999). Estrogen Receptor β – A New Dimension in Estrogen Mechanism of Action, *Journal of Endocrinology*, 163(3): S. 379-383.
- (68) Ogawa, S., u. a. (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.

- (69) Enmark, E., u. a. (1997). Human Estrogen Receptor β -Gene Structure, Chromosomal Localization, and Expression Pattern, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82(12): S. 4258-4265.
- (70) Ball, L.J., u. a. (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.
- (71) Barkhem, T., u. a. (1998). Differential Response of Estrogen Receptor Alpha and Estrogen Receptor Beta to Partial Estrogen Agonists/Antagonists, *Mol. Pharmacol*, 54(1): S. 105-112.
- (72) Deroo, B.J. und Buensuceso, A.V. (2010). Minireview: Estrogen Receptor- β : Mechanistic Insights from Recent Studies, *Molecular Endocrinology*, 24(9): S. 1703-1714.
- (73) Harris, D.M., u. a. (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.
- (74) Anderson, J.N., Clark, J.H. und 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.
- (75) Toft, D. (1972). The Interaction of Uterine Estrogen Receptors with DNA, *Journal of Steroid Biochemistry*, 3(3): S. 515-522.
- (76) Gorski, J., u. a. (1968), Hormone Receptors: Studies on the Interaction of Estrogen with the Uterus, *Recent Progress in Hormone Research*, 24: S. 45-80.
- (77) Jensen, E.V., u. a. (1967), Estrogen-Receptor Interactions in Target Tissues, *Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale*, 56(3): S. 547-569.
- (78) 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.).
- (79) Kanno, J., u. a. (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.
- (80) Kanno, J., u. a. (2003). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two Dose-Response Studies, *Environ. Health Persp.*, 111:1530-1549.

- (81) Kanno, J., u. a. (2003), The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two – Coded Single-Dose Studies, *Environ. Health Persp.*, 111:1550-1558.
- (82) Geisinger u. a. (1989) Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, *Cancer* 63, 280-288.
- (83) Baldwin u. a. (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.
- (84) Li, Y. u. a. (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.
- (85) Rogers, , J.M. und 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.

Anlage 1

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN UND ABKÜRZUNGEN

Agonist: Ein Stoff, der eine Wirkung (z. B. eine Transkription) hervorruft, wenn er eine Bindung mit einem bestimmten Rezeptor eingeht.

Aktivkohle-/Dextranbehandlung: Behandlung von bei Zellkulturen verwendeten Seren. Bei der Behandlung mit Aktivkohle/Dextran (häufig auch als „Stripping“ bezeichnet) werden endogene Hormone und hormonbindende Proteine abgetrennt.

Akzeptanzkriterien: Mindeststandards für Kontrollen und Referenzstandards. Damit ein Versuch als gültig betrachtet werden kann, sollten alle Akzeptanzkriterien erfüllt sein.

Antagonist: Eine Art Rezeptor-Ligand oder eine Chemikalie, die nach der Bindung an einen Rezeptor an sich keine biologische Reaktion auslöst, aber durch Agonisten vermittelte Reaktionen blockiert oder dämpft.

Antiöstrogene Aktivität: Fähigkeit einer Chemikalie zur Unterdrückung der durch Östrogenrezeptoren vermittelten Wirkung von 17 β -Estradiol.

Assay: Im Zusammenhang mit dieser Prüfmethode wird als Assay eine Methode bezeichnet, die die beschriebenen Leistungskriterien erfüllt und daher als gültige Methode anerkannt wird. Elemente eines Assays sind beispielsweise die spezifische Zelllinie mit den entsprechenden Wachstumsbedingungen, spezifische Medien, in denen die Untersuchung erfolgt, die Konfiguration der Platten, Anordnung und Verdünnungen von Prüfchemikalien sowie alle sonstigen erforderlichen Qualitätskontrollmaßnahmen und mit der Untersuchung verbundenen Schritte zur Auswertung der Daten.

CF: OECD Conceptual Framework for the Testing and Evaluation of Endocrine Disrupters.

Chemikalie: Ein Stoff oder ein Gemisch.

DCC-FBS: Mit dextranbeschichteter Aktivkohle behandeltes fetales Rinderserum.

DMEM: Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium.

DMSO: Dimethylsulfoxid.

E2: 17 β -Estradiol.

EC₅₀: Die Hälfte der maximalen Wirkungskonzentration einer Prüfchemikalie.

ED: Endokrine Störung.

EFM: Östrogenfreies Medium. Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium (DMEM), ergänzt um 4,5 % mit Aktivkohle/Dextran behandeltes fetales Rinderserum (FBS), 1,9 % L-Glutamin und

0,9 % Pen/Strep.

Eignung: Die nachgewiesene Fähigkeit zur ordnungsgemäßen Durchführung eines Assays vor der Prüfung unbekannter Stoffe.

ER: Östrogenrezeptor.

ERE: Östrogen-Response-Element.

ER-TA: Östrogenrezeptor-Transaktivierung

FBS: Fetales Rinderserum.

Genauigkeit (Übereinstimmung): Der Grad an Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen eines Assays und akzeptierten Referenzwerten. Die Genauigkeit ist ein Maß der Leistung eines Assays und ein Aspekt der Relevanz. Der Begriff wird oft im Sinne von „Übereinstimmung“ verwendet und bezeichnet den Anteil der korrekten Ergebnisse eines Assays (1).

HeLa: Eine unsterbliche humane Zervikalkarzinom-Zelllinie.

HeLa9903: Ein Subklon der HeLa-Zelllinie, in den hER α und ein Luciferase-Reporter-Gen stabil transfiziert wurden.

hER β : Humaner Östrogenrezeptor β .

hER α : Humaner Östrogenrezeptor α .

IC₅₀: Die Hälfte der maximalen Wirkungskonzentration einer Prüfchemikalie mit hemmender Wirkung.

ICCVAM: Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (das US-amerikanische Validierungszentrum).

Inter-Labor-Reproduzierbarkeit: Das Ausmaß, in dem unterschiedliche qualifizierte Laboratorien, die dasselbe Protokoll verwenden und dieselben Prüfstoffe untersuchen, qualitativ und quantitativ vergleichbare Ergebnisse erzielen können. Die Inter-Labor-Reproduzierbarkeit wird während der Prävalidierungs- und Validierungsverfahren ermittelt und zeigt das Maß an, in dem ein Assay erfolgreich zwischen Laboratorien übertragen werden kann (1).

Intra-Labor-Reproduzierbarkeit: Das Ausmaß, in dem qualifizierte Personen innerhalb desselben Labors, die dasselbe spezifische Protokoll zu unterschiedlichen Zeiten verwenden, erfolgreich dieselben Ergebnisse replizieren können. Auch als „laborinterne Reproduzierbarkeit“ bezeichnet (1).

LEC: Als niedrigste Wirkungskonzentration (Lowest Effective Concentration) wird die niedrigste Konzentration einer Prüfchemikalie bezeichnet, die eine Wirkung hervorruft (d. h.

die niedrigste Konzentration einer Prüfchemikalie, bei der die n-fache Induktion sich statistisch von der gleichzeitigen Vehikelkontrolle unterscheidet).

Leistungsstandards: Auf einem validierten Assay beruhende Normen, auf deren Grundlage die Vergleichbarkeit einem vorgeschlagenen, mechanistisch und funktionell ähnlichen Assay bewertet werden kann. Sie umfassen (1) wesentliche Elemente des Assays; (2) ein Mindestverzeichnis von Referenzchemikalien, ausgewählt aus den Chemikalien, die zum Nachweis der akzeptablen Leistung der validierten Referenzmethode verwendet werden, und (3) je nach den für die validierte Referenzmethode erzielten Ergebnissen die vergleichbaren Genauigkeits- und Zuverlässigkeitswerte, die der vorgeschlagene Assay bei der Bewertung anhand des Mindestverzeichnisses von Referenzchemikalien ergeben sollte (1).

Leistungsstoffe: Eine Untergruppe der in die Leistungsstandards einbezogenen Referenzstoffe, die von Labors bei standardisierten Prüfmethoden zum Nachweis der fachlichen Kompetenz eingesetzt werden können. Auswahlkriterien für diese Stoffe sind u. a., dass sie den Reaktionsbereich abdecken und im Handel erhältlich sein müssen und dass für diese Stoffe hochwertige Referenzdaten verfügbar sein müssen.

Me-Too-Prüfung: [Im englischen Sprachraum gemeinsprachliche] Bezeichnung einer Prüfmethode, die strukturell und funktionell mit einer validierten und akzeptierten Referenzprüfmethode vergleichbar ist. Gleichbedeutend mit „vergleichbare Prüfmethode“ verwendet.

MMTV: Maus-Mammatumovirus.

MT: Metallothionein.

OHT: 4-Hydroxytamoxifen.

Östrogenaktivität: Fähigkeit einer Chemikalie, wie 17 β -Estradiol Bindungen Östrogenrezeptoren einzugehen und Östrogenrezeptoren zu aktivieren. Mit dieser Prüfmethode kann durch hER α vermittelte Östrogenaktivität nachgewiesen werden.

PBTG: Leistungsbezogene Prüfrichtlinie.

PC₁₀: Die Konzentration einer Prüfchemikalie, bei der die gemessene Aktivität in einem Agonisten-Assay auf jeder einzelnen Platte 10 % der durch die PK (1 nM E2 beim STTA-Assay) induzierten maximalen Aktivität beträgt.

PC₅₀: Die Konzentration einer Prüfchemikalie, bei der die gemessene Aktivität in einem Agonisten-Assay auf jeder einzelnen Platte 50 % der durch die PK (E2 in der für die jeweilige Prüfmethode spezifizierten Referenzkonzentration) induzierten maximalen Aktivität beträgt.

PC_{Max}: Die Konzentration einer Prüfchemikalie, die RPC_{Max} induziert.

PK (Positivkontrolle): Ein starker Wirkstoff, vorzugsweise 17 β -Estradiol, der in alle Prüfungen einbezogen wird, um das ordnungsgemäße Funktionieren der Assays

sicherzustellen.

Prüfchemikalie: Stoff oder Gemisch, der/das mit dieser Prüfmethode untersucht wird.

Prüflauf: Ein einzelner Versuch zur Bewertung der Wirkung einer Chemikalie auf das biologische Ergebnis eines Assays. Jeder Prüflauf besteht aus einem vollständigen Versuch an Replikat-Wellen mit Zellen, die gleichzeitig aus einem gemeinsamen Zellpool plattiert wurden.

Referenz-Östrogen (Positivkontrolle, PK): 17 β -Estradiol (E2, CAS 50-28-2).

Referenzprüfmethode: Die Assays, auf denen die PBTG 455 beruht.

Referenzstandard: Ein Referenzstoff zum Nachweis der Eignung eines Assays. 17 β -Estradiol ist der Referenzstandard für den STTA- und den VM7Luc-ER-TA-Assay.

Relevanz: Dieser Begriff bezieht sich auf das Verhältnis zwischen dem Assay und der betreffenden Wirkung und auf die Frage, ob er aussagekräftig und nützlich für einen bestimmten Zweck ist. Er beschreibt das Ausmaß, in dem der Assay die untersuchte biologische Wirkung korrekt misst oder vorhersagt. Die Relevanz schließt eine Beurteilung der Genauigkeit (Übereinstimmung) eines Assays ein (1).

RLU: Relative Lichteinheiten.

RNA: Ribonukleinsäure.

RPC_{Max}: Durch eine Prüfchemikalie induzierte maximale Reaktion, ausgedrückt als Prozentanteil der durch 1 nM E2 auf derselben Platte induzierten Reaktion.

RPMI: RPMI-1640-Medium, ergänzt um 0,9 % Pen/Strep und 8,0 % fetales Rinderserum (FBS).

Schwache Positivkontrolle: Ein schwacher Wirkstoff aus der Liste der Referenzchemikalien, der in alle Prüfungen einbezogen wird, um das ordnungsgemäße Funktionieren der Assays sicherzustellen.

SD: Standardabweichung,

Sensitivität: Der Anteil aller positiven/wirkenden Prüfstoffe, die durch den Assay korrekt eingestuft werden. Die Sensitivität ist ein Maß der Genauigkeit eines Assays mit kategorialen Ergebnissen und ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung seiner Relevanz (1).

Spezifität: Der Anteil aller negativen/wirkungslosen Prüfstoffe, die durch die Prüfung korrekt eingestuft werden. Die Spezifität ist ein Maß der Genauigkeit eines Assays mit kategorialen Ergebnissen und ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung seiner Relevanz (1).

Stabile Transfektion: Wenn DNA so in Zellkulturen transfiziert wird, dass sie stabil in das Zellgenom eingefügt wird, erfolgt eine stabile Expression der betreffenden Gene. Klone stabil transfizierter Zellen werden unter Verwendung stabiler Marker (z. B. Resistenz gegenüber

G418) selektioniert.

Stoff: In der REACH-Verordnung¹ werden Stoffe definiert als ein chemisches Element und seine Verbindungen in natürlicher Form oder gewonnen durch ein Herstellungsverfahren, einschließlich der zur Wahrung seiner Stabilität notwendigen Zusatzstoffe und der durch das angewandte Verfahren bedingten Verunreinigungen, aber mit Ausnahme von Lösungsmitteln, die von dem Stoff ohne Beeinträchtigung seiner Stabilität und ohne Änderung seiner Zusammensetzung abgetrennt werden können. Eine sehr ähnliche Begriffsbestimmung wird im Zusammenhang mit dem UN GHS verwendet (1).

STTA-Assay: Assay mit transkriptioneller ER α -Aktivierung unter Verwendung der Zelllinie HeLa 9903.

Studie/Untersuchung: Eine umfassende experimentelle Untersuchung zur Bewertung eines einzelnen, spezifischen Stoffs mit einem spezifischen Assay. Eine Studie umfasst sämtliche Schritte einschließlich Untersuchungen von Verdünnungen eines Prüfstoffs im Prüfmedium, Vorversuchen zur Dosisfindung, allen erforderlichen Hauptversuchen, Datenanalysen, Qualitätssicherung, Zytotoxizitätsbewertungen usw. Aufgrund einer Studie kann die mit dem jeweiligen Assay zu untersuchende Wirkung der Prüfchemikalie auf das Zielmaterial einer Toxizitätsprüfung bewertet werden (als aktiv, nicht aktiv oder nicht eindeutig) und die Stärke der Wirkung bezogen auf die positive Referenzchemikalie abgeschätzt werden.

TA (Transaktivierung): Die Auslösung einer mRNA-Synthese als Reaktion auf ein bestimmtes chemisches Signal wie beispielsweise die Bindung eines Östrogens an einen Östrogenrezeptor.

Transkription: mRNA-Synthese.

Unabhängiger Prüflauf: Ein getrennter unabhängiger Versuch, mit dem die Wirkung einer Chemikalie auf das biologische Ergebnis eines Assays mit Zellen aus einem anderen Pool sowie mit frisch verdünnten Chemikalien an unterschiedlichen Tagen oder am selben Tag durch unterschiedliche Labortechniker bewertet wird.

UVCB: Chemische Stoffe mit unbekannter oder schwankender Zusammensetzung, komplexe Reaktionsprodukte oder biologische Materialien.

¹ Verordnung EG (Nr.) 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 18. Dezember 2006 zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH), zur Schaffung einer Europäischen Agentur für chemische Stoffe, zur Änderung der Richtlinie 1999/45/EG und zur Aufhebung der Verordnung (EWG) Nr. 793/93 des Rates, der Verordnung (EG) Nr. 1488/94 der Kommission, der Richtlinie 76/769/EWG des Rates sowie der Richtlinien 91/155/EWG, 93/67/EWG, 93/105/EG und 2000/21/EG der Kommission. ABl. L 304 vom 22.11.2007, S. 1.

Validierte Prüfmethode: Ein Assay, für den zwecks Bestimmung ihrer Relevanz (einschließlich Genauigkeit) und Zuverlässigkeit für einen bestimmten Zweck Validierungsstudien durchgeführt wurden. Es wird darauf hingewiesen, dass eine validierte Prüfmethode möglicherweise nicht so genau und zuverlässig ist, dass sie für den vorgeschlagenen Zweck akzeptiert werden kann (1).

Validierung: Prozess, mit dem die Zuverlässigkeit und die Relevanz eines bestimmten Ansatzes, einer Methode, eines Assays, eines Prozesses oder einer Bewertung für einen bestimmten Zweck festgestellt wird (1).

VK (Vehikelkontrolle): Das zur Lösung der Prüf- und der Kontrollchemikalien verwendete Lösungsmittel wird ohne gelöste Chemikalie nur als Vehikel geprüft.

VK: Variationskoeffizient.

VM7: Eine immortalisierte Adenokarzinom-Zelllinie, die einen Östrogenrezeptor endogen exprimiert.

VM7Luc4E2: Die VM7Luc4E2-Zelllinie wurde aus immortalisierten VM7-Zellen (humanen Adenokarzinom-Zellen) abgeleitet, die beide Formen von Endogenrezeptoren (ER α und ER β) endogen exprimieren und mit dem Plasmid pGudLuc7.ERE stabil transfiziert wurden. Dieses Plasmid enthält vier Kopien eines synthetischen Oligonucleotids mit dem Östrogen-Response-Element vor dem MMTV-Promoter (MMTV = Maus-Mammatumovirus) und dem Leuchtkäfer-Luciferase-Gen.

Zellmorphologie: Form und Aussehen von Zellen, die in einer Monolayer-Kultur in einem einzelnen Well einer Gewebekultur-Platte gewachsen sind. Absterbende Zellen weisen häufig eine abnormale Zellmorphologie auf.

Zuverlässigkeit: Maß der Verlässlichkeit der Reproduzierbarkeit eines Assays innerhalb von und zwischen Laboratorien (Intra- und Inter-Labor-Reproduzierbarkeit) in einem bestimmten Zeitintervall bei einheitlichem Protokoll. Sie wird durch Berechnung der Intra- und Inter-Labor-Reproduzierbarkeit bewertet.

Zytotoxizität: Gefährliche Wirkungen auf Zellstrukturen oder Funktionen, die letztlich zum Absterben von Zellen führen und sich in einer Reduzierung der Anzahl der Zellen auf dem Well am Ende des Expositionszeitraums oder in einer reduzierten Messbarkeit von Zellfunktionen im Vergleich zur gleichzeitigen Vehikelkontrolle äußern können.

Anlage 2

ASSAY ZUR TRANSAKTIVIERUNG DES STABIL TRANSFIZIERTEN HUMANEN ÖSTROGENREZEPTORS α ZUM NACHWEIS DER WIRKUNG VON CHEMIKALIEN AUF ÖSTROGEN-AGONISTEN UND -ANTAGONISTEN MIT DER hER α -HeLa-9903-ZELLINIE

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN UND BEGRENZUNGEN (SIEHE AUCH ALLGEMEINE EINLEITUNG)

1. Bei diesem Transaktivierungs-Assay (TA-Assay) wird die hER α -HeLa-9903-Zelllinie zum Nachweis einer durch den humanen Östrogenrezeptor α (hER α) vermittelten Östrogen-Agonisten-Aktivität verwendet. Mit der Validierungsstudie des japanischen Chemikalienevaluierungs- und -forschungsinstituts CERi zum STTA-Assay (STTA = Stably Transfected Transactivation) unter Verwendung der hER α -HeLa-9903-Zelllinie zum Nachweis der durch den humanen Östrogenrezeptor α (hER α) vermittelten Östrogen-Agonisten- und -Antagonisten-Aktivität wurden die Relevanz des Assays für den vorgesehenen Zweck und seine Zuverlässigkeit nachgewiesen (1).
2. Dieser Assay wurde speziell zum Nachweis von hER α und einer durch hER α vermittelten TA anhand einer Messung der Chemilumineszenz als Endpunkt entwickelt. Bei Phytoöstrogenkonzentrationen von mehr als 1 μ M wurden infolge der Überaktivierung des Luciferase-Reporter-Gens Lumineszenzsignale festgestellt, die nicht durch Rezeptoren vermittelt wurden (2) (3). Die Dosis-Reaktions-Kurve zeigt, dass die tatsächliche Aktivierung des ER-Systems bei niedrigeren Konzentrationen erfolgt; bei stabil transfizierten ER-TA-Assay-Systemen muss die Luciferase-Expression bei hohen Konzentrationen von Phytoöstrogenen oder ähnlichen Verbindungen, bei denen vermutet wird, dass sie eine phytoöstrogenartige Überaktivierung des Luciferase-Reportergens verursachen, jedoch sorgfältig untersucht werden (Anlage 1).
3. Vor der Verwendung dieses Assays für rechtliche Zwecke sollten die Abschnitte „ALLGEMEINE EINLEITUNG“ und „ELEMENTE DES ER-TA-ASSAYS“ gelesen werden. Die in dieser Prüfrichtlinie verwendeten Begriffe und Abkürzungen werden in Anlage 2.1 erläutert.

PRINZIP DES ASSAYS (SIEHE AUCH ALLGEMEINE EINLEITUNG)

4. Der Assay wird zur Feststellung von Bindungen des Östrogenrezeptors mit einem Liganden verwendet. Nach der Bindung an den Liganden transloziert der Rezeptor-Liganden-Komplex in den Zellkern, wo er spezifische DNA-Response-Elemente bindet und ein Leuchtkäfer-Luciferase-Reporter-Gen transaktiviert. Dies führt zu einer verstärkten zellulären Expression des Luciferase-Enzyms. Luciferin ist ein Substrat, das durch das Luciferase-Enzym in ein

Biolumineszenz-Produkt umgewandelt wird, das mit einem Luminometer quantitativ gemessen werden kann. Die Luciferase-Aktivität kann rasch und kostengünstig mit verschiedenen im Handel erhältlichen Test-Kits bewertet werden.

5. Bei diesem Prüfsystem wird die aus einem humanen Zervikaltumor abgeleitete hER α -HeLa-9903-Zelllinie mit zwei stabil eingefügten Produkten verwendet: (i) der hER α -Expression (mit in voller Länge kodiertem humanem Rezeptor) und (ii) einem Leuchtkäfer-Luciferase-Reporterprodukt mit fünf Tandem-Repeats eines auf ein Maus-Metallothionein(MT)-Promoter-TA-Element reagierenden Vitellogenin-Östrogen-Response-Elements (ERE). Da mit dem Maus-MT-TATA-Genprodukt nachweislich die besten Ergebnisse erzielt werden, wird gewöhnlich dieses Produkt verwendet. Mit dieser hER α -HeLa-9903-Zelllinie kann die Fähigkeit einer Prüfchemikalie zur Induzierung einer durch hER α vermittelten Transaktivierung einer Luciferasegen-Expression gemessen werden.
6. Beim ER-Agonisten-Assay hängt die Auswertung der Daten davon ab, ob die durch eine Prüfchemikalie induzierte maximale Reaktion größer oder gleich einer Agonisten-Reaktion im Umfang von 10 % der Reaktion ist, die durch eine Konzentration der Positivkontrolle (PK) 17 β -Estradiol (E2) mit maximaler Induktion (1 nM) (d. h. PC₁₀) induziert wird. Beim ER-Antagonisten-Assay wird die Auswertung der Daten davon bestimmt, ob die Reaktion mindestens in einer 30%igen Reduzierung der Aktivität infolge der Spike-in-Kontrolle (25 pM E2) ohne Zytotoxizität besteht. Analysen und Auswertungen der Daten siehe Nummern 34-48.

VERFAHREN

Zelllinien

7. Für den Assay sollte die stabil transfizierte hER α -HeLa-9903-Zelllinie verwendet werden. Diese Zelllinie kann von der JCRB-Zellbank (JCRB = Japanese Collection of Research Bioresources)¹ nach Unterzeichnung einer Materialübertragungsvereinbarung (Material Transfer Agreement, MTA) bezogen werden.
8. Für die Prüfungen sollten ausschließlich als mycoplasmafrei charakterisierte Zellen verwendet werden. Die RT-PCR (Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion) ist die Methode der Wahl für den empfindlichen Nachweis einer Mycoplasma-Infektion (4) (5) (6).

Stabilität der Zelllinie

¹ JCRB Cell Bank: National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Asagi Saito, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Japan, Telefax: +81-72-641-9812.

9. Zur Überwachung der Stabilität der Zelllinie sollten E2, 17 α -Estradiol, 17 α -Methyltestosteron und Corticosteron als Referenzstandards für den Agonisten-Assay verwendet werden, und bei jeder Durchführung des Assays sollte mindestens eine vollständige Konzentrations-Reaktions-Kurve in dem in Tabelle 1 genannten Prüfkonzentrationsbereich gemessen werden. Dabei sollten die in Tabelle 1 genannten Ergebnisse ermittelt werden.
10. Beim Antagonisten-Assays sollten für jeden Prüflauf gleichzeitig vollständige Konzentrationskurven für die beiden Referenzstandards Tamoxifen und Flutamid gemessen werden. Die ordnungsgemäße Einstufung der beiden Chemikalien als positiv oder negativ sollte überwacht werden.

Bedingungen für die Haltung der Zellkulturen und für die Plattierung

11. Die Zellen werden in Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) ohne Phenolrot ergänzt mit 60 mg/l des Antibiotikums Kanamycin und 10 % mit dextranbeschichteter Aktivkohle behandeltem fetalem Rinderserumextrakt (DCC-FBS) in einem CO₂-Inkubator (5 % CO₂) bei 37 $\pm$ 1 °C gehalten. Wenn eine Konfluenz von 75-90 % erreicht ist, können Zellen mit 10 ml 0,4 x 10⁵ – 1 x 10⁵ Zellen/ml auf einer 100-mm-Zellkulturschale subkultiviert werden. Dann werden die Zellen mit 10 % FBS-EMEM (identisch mit EMEM mit DCC-FBS) suspendiert und anschließend mit einer Dichte von 1 x 10⁴ Zellen/(100 μ l x Well) in Wells einer Mikrotiterplatte plattiert. Danach werden die Zellen in einem CO₂-Inkubator (5 %) bei 37 $\pm$ 1 °C drei Stunden vorinkubiert, bevor sie der zu untersuchenden Chemikalie ausgesetzt werden. Die Verbrauchsmaterialien aus Kunststoff sollten keine Östrogenaktivität aufweisen.
12. Um die Integrität der Reaktion aufrechtzuerhalten, sollten die Zellen im konditionierten Medium über mehr als eine Passage höchstens aber bis zu 40 Passagen des tiefgefrorenen Materials vermehrt werden. Bei der hER α -HeLa-9903-Zelllinie dauert dies weniger als drei Monate. Das Zellwachstum kann jedoch verringert sein, wenn die Zellen unter ungeeigneten Kulturbedingungen vermehrt werden.
13. Das DCC-FBS kann wie in Anlage 2.2 beschrieben zubereitet oder im Handel bezogen werden.

Akzeptanzkriterien

Positive und negative Referenzstandards für den ER-Agonisten-Assay

14. Vor und während der Untersuchung sollte die Reaktion des Prüfsystems mit den jeweils geeigneten Konzentrationen eines starken Östrogens verifiziert werden: E2, ein schwaches Östrogen (17 α -Estradiol), ein sehr schwacher Agonist (17 α -Methyltestosteron) und ein Negativstoff (Corticosteron). Tabelle 1 sind annehmbare Bereichswerte angegeben, die aus der Validierungsstudie (1) entnommen wurden. Diese 4 gleichzeitigen Referenzstandards sollten in jeden Versuch einbezogen werden, und die Ergebnisse sollten jeweils im

annehmbaren Bereich liegen. Ansonsten sollten die Ursachen dafür ermittelt werden, dass die Akzeptanzkriterien nicht erfüllt werden (z. B. die Handhabung der Zellen sowie die Qualität und die Konzentration des Serums und der Antibiotika), und der Assay sollte wiederholt werden. Wenn die Akzeptanzkriterien erfüllt werden, ist die konsistente Verwendung von Materialien für die Kultivierung der Zellen von entscheidender Bedeutung, um eine möglichst geringe Variabilität der EC₅₀-, PC₅₀- und PC₁₀-Werte sicherzustellen. Die vier gleichzeitigen Referenzstandards, die in alle (unter identischen Bedingungen u. a. in Bezug auf die Materialien, die Passagenanzahl und die Labortechniker durchzuführenden) Versuche einbezogen werden sollten, können die Empfindlichkeit des Assays gewährleisten, da die PC₁₀-Werte der drei positiven Referenzstandards ebenso wie die PC₅₀- und die EC₅₀-Werte (wenn diese berechnet werden können) im annehmbaren Bereich liegen sollten (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Werte im annehmbaren Bereich für die vier Referenzstandards beim ER-Agonisten-Assay

Name	logPC ₅₀	logPC ₁₀	logPC ₅₀	Hillslope	Prüfbereich
17β-Estradiol (E2) CAS-Nr.: 50-28-2	-11,4~-10,1	<-11	-11,3~-10,1	0,7~1,5	10 ⁻¹⁴ ~10 ⁻⁸ M
17α-Estradiol CAS-Nr.: 57-91-0	-9,6~-8,1	-10,7~-9,3	-9,6~-8,4	0,9~2,0	10 ⁻¹² ~10 ⁻⁶ M
Corticosteron CAS-Nr.: 50-22-6	–	–	–	–	10 ⁻¹⁰ ~10 ⁻⁴ M
17α-Methyltestosteron CAS-Nr.: 58-18-4	-6,0~-5,1	-8,0~-6,2	–	–	10 ⁻¹¹ ~10 ⁻⁵ M

Positive und negative Referenzstandards für den ER-Antagonisten-Assay

15. Vor und während der Untersuchung sollte die Reaktion des Prüfsystems mit den jeweils geeigneten Konzentrationen eines Positivstoffs (Tamoxifen) und eines Negativstoffs (Flutamid) verifiziert werden: Tabelle 2 sind annehmbare Bereichswerte angegeben, die aus der Validierungsstudie (1) entnommen wurden. Diese beiden gleichzeitigen Referenzstandards sollten in jeden Versuch einbezogen werden, und die Ergebnisse sollten ordnungsgemäß anhand der Kriterien bewertet werden. Ansonsten sollten die Ursachen dafür ermittelt werden, dass die Kriterien nicht erfüllt werden (z. B. die Handhabung der Zellen sowie die Qualität und die Konzentration des Serums und der Antibiotika), und der Assay sollte wiederholt werden. Außerdem sollten die IC₅₀-Werte eines Positivstoffs (Tamoxifen) berechnet werden. Die Ergebnisse sollten im annehmbaren Bereich liegen. Wenn die Akzeptanzkriterien erfüllt werden, ist die konsistente Verwendung von Materialien für die Kultivierung der Zellen von entscheidender Bedeutung, um eine möglichst geringe Variabilität der IC₅₀-Werte sicherzustellen. Die beiden gleichzeitigen Referenzstandards, die in jeden (unter identischen Bedingungen u. a. in Bezug auf die Materialien, die Passagenanzahl und die Labortechniker durchzuführenden) Versuch einbezogen werden sollten, können die Empfindlichkeit des Assays sicherstellen (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Kriterien und Werte im annehmbaren Bereich für die beiden Referenzstandards beim ER-Antagonisten-Assay

Name	Kriterium	LogIC ₅₀	Prüfbereich
Tamoxifen CAS-Nr.: 10540-29-1	Positiv: IC ₅₀ sollte berechnet werden.	-5,942 ~ -7,596	10 ⁻¹⁰ ~ 10 ⁻⁵ M
Flutamid CAS-Nr.: 13311-84-7	Negativ: IC ₃₀ sollte nicht berechnet werden.	-	10 ⁻¹⁰ ~ 10 ⁻⁵ M

Positivkontrolle und Vehikelkontrolle

16. Die Positivkontrolle (PK) des ER-Agonisten-Assays (1 nM E2) und des ER-Antagonisten-Assays (10 µM TAM) sollte pro Platte mindestens dreimal geprüft werden. Auch das zur Auflösung einer Prüfchemikalie verwendete Vehikel ist als Vehikelkontrolle (VK) pro Platte mindestens dreimal zu prüfen. Wenn bei der PK nicht die Prüfchemikalie als Vehikel verwendet wird, sollte zusätzlich zu dieser VK auf der Platte mit der PK eine weitere VK ebenfalls mindestens dreimal geprüft werden.

Qualitätskriterien für den ER-Agonisten-Assay

17. Die mittlere Luciferase-Aktivität der Positivkontrolle (1 nM E2) sollte mindestens das Vierfache der mittleren VK auf jeder Platte betragen. Dieses Kriterium wird anhand der Zuverlässigkeit der Endpunktwerte der Validierungsstudie geprüft. (In der Regel werden Werte zwischen dem 4- und dem 30-Fachen ermittelt.)
18. Bei der Qualitätskontrolle für diesen Assay sollte die n-fache Induktion entsprechend dem PC₁₀-Wert der gleichzeitigen PK (1 nM E2) größer als 1+2 SD des Wertes der n-fachen Induktion (= 1) der gleichzeitigen VK sein. Bei der Priorisierung kann der PC₁₀-Wert die erforderliche Datenanalyse im Vergleich zu einer statistischen Analyse erleichtern. Eine statistische Analyse liefert wichtige Informationen, ist aber nicht als quantitativer Parameter hinsichtlich eines konzentrationsabhängigen Potenzials zu betrachten und für Priorisierungszwecke daher weniger hilfreich.

Qualitätskriterien für den ER-Antagonisten-Assay

19. Die mittlere Luciferase-Aktivität der Spike-in-Kontrolle (25 nM E2) sollte mindestens das 4-Fache der mittleren VK auf jeder Platte betragen. Dieses Kriterium wird anhand der Zuverlässigkeit der Endpunktwerte der Validierungsstudie geprüft.
20. Bei der Qualitätskontrolle des Assays sollte die relative transkriptionelle Aktivierung (RTA) von 1 nM E2 mehr als 100 % betragen; die RTA von 1 µM 4-Hydroxytamoxifen (OHT) sollte bei weniger als 40,6 % und die RTA von 100 µM Digitonin (Dig) bei weniger als 0 % liegen.

Zum Nachweis der Eignung des Labors siehe Nummer 14 und Tabellen 3 und 4 im Abschnitt „ELEMENTE DES ER-TA-ASSAYS“ bei dieser Prüfmethode.

Vehikel

21. Als gleichzeitige VK sollte Dimethylsulfoxid (DMSO) bzw. ein anderes geeignetes Lösungsmittel in der Konzentration verwendet werden, die auch bei den verschiedenen Positiv- und Negativkontrollen sowie bei den Prüfchemikalien zum Einsatz kommt. Die Prüfchemikalien sollten in einem Lösungsmittel gelöst werden, das die betreffende Prüfchemikalie löst und sich mit dem Zellmedium mischt. Geeignete Vehikel sind Wasser, Ethanol (Reinheit 95-100 %) und DMSO. Wenn DMSO verwendet wird, sollte die Konzentration höchstens 0,1 % (v/v) betragen. Bei jedem Vehikel sollte nachgewiesen werden, dass die verwendete Höchstmenge nicht zytotoxisch ist und keine Auswirkungen auf den Assay hat.

Zubereitung der Prüfchemikalien

22. Im Allgemeinen sollten die Prüfchemikalien in DMSO oder in einem anderen geeigneten Lösungsmittel gelöst und mit diesem Lösungsmittel seriell im üblichen Verhältnis von 1:10 gelöst werden, um Lösungen zur Verdünnung mit Medien zuzubereiten.

Löslichkeit und Zytotoxizität: Hinweise zur Dosisfindung

23. Mit einem Vorversuch sollte der geeignete Konzentrationsbereich der zu prüfenden Chemikalie ermittelt und festgestellt werden, ob bei der Prüfchemikalie Probleme hinsichtlich der Löslichkeit und der Zytotoxizität bestehen. Zunächst werden die Chemikalien bis zur maximalen Konzentration von 1 µl/ml, 1 mg/ml bzw. 1 mM geprüft. (Maßgeblich ist der niedrigste Wert.) Je nach dem im Vorversuch festgestellten Grad der Zytotoxizität bzw. nach der festgestellten mangelnden Löslichkeit sollte die Prüfchemikalie beim ersten gültigen Prüflauf in logarithmischen, seriellen Verdünnungen beginnend mit der maximal annehmbaren Konzentration (1 mM, 100 µM, 10 µM usw.) untersucht werden. Die Bildung von Trübungen oder Niederschlag sowie eine festgestellte Zytotoxizität sollten protokolliert werden. Die Konzentrationen im zweiten und ggf. im dritten Prüflauf sollten ggf. angepasst werden, um die Konzentrations-Reaktions-Kurve besser zu beschreiben und um Konzentrationen zu vermeiden, bei denen keine Lösung mehr erfolgt oder eine übermäßige Zytotoxizität induziert wird.
24. Bei ER-Agonisten und -Antagonisten kann eine zunehmende Zytotoxizität die typische sigmoidale Reaktion erheblich verändern oder vollständig beseitigen und sollte daher bei der Auswertung der Daten berücksichtigt werden. Für die Prüfungen sollten Methoden zur Untersuchung der Zytotoxizität verwendet werden, aus denen Informationen für eine Zellviabilität von 80 % zu entnehmen sind. Die Untersuchung sollte mit einem nach Laborerfahrungen geeigneten Assay durchgeführt werden.
25. Wenn in der Zytotoxizitätsprüfung festgestellt wird, dass die Konzentration der Prüfchemikalie die Anzahl der Zellen um 20 % oder mehr reduziert hat, ist die betreffende

Konzentration als zytotoxisch zu betrachten, und Verdünnungen ab der zytotoxischen Konzentration aufwärts sollten bei der Auswertung nicht berücksichtigt werden.

Chemische Exposition und Anordnung auf der Assay-Platte

26. Das Verfahren für chemische Verdünnungen (Schritte 1 und 2) sowie die Exposition der Zellen (Schritt 3) können wie folgt durchgeführt werden:

Schritt 1: Jede Prüfchemikalie sollte seriell in DMSO oder einem anderen geeigneten Lösungsmittel verdünnt und in die Wells einer Mikrotiterplatte gegeben werden, um die endgültigen seriellen Verdünnungen herzustellen, die in der Dosisfindungsstudie als maßgeblich ermittelt wurde (in der Regel z. B. 1 mM, 100 µM, 10 µM, 1 µM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM und 10 pM (10^{-3} - 10^{-11} M)) bei dreifacher Prüfung.

Schritt 2: Chemische Verdünnung: Zunächst sind 1,5 µl der Prüfchemikalie im Lösungsmittel auf eine Medienkonzentration von 500 µl zu verdünnen.

Schritt 3: Exposition der Zellen gegenüber der Chemikalie: 50 µl der (in Schritt 2 zubereiteten) Verdünnung mit dem Medium werden in einen Assay-Well mit 10^4 Zellen/100 µl/Well gegeben.

Für jedes Well wird ein endgültiges Medienvolumen von 150 µl als erforderlich empfohlen. Die zu untersuchenden Proben und Referenzstandards können angeordnet werden wie in den Tabellen 3 und 4 angegeben.

Tabelle 3: Beispiel für die Anordnung von Konzentrationen der Referenzstandards auf der Assay-Platte des ER-Agonisten-Assays

Reihe	17α-Methyltestosteron			Chemikalie			17α-Estradiol			E2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Konz. 1 (10 µM)	→	→	100 µM	→	→	1 µM	→	→	10 nM	→	→
B	Konz. 2 (1 µM)	→	→	10 µM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	Konz. 3 (100 nM)	→	→	1 µM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	Konz. 4 (10 nM)	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	Konz. 5 (1 nM)	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	Konz. 6 (100 pM)	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	Konz. 7 (10 pM)	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VK	→	→	→	→	→	PK	→	→	→	→	→

VK: Vehikelkontrolle (0,1 % DMSO); PK: Positivkontrolle (1 nM E2)

27. Die Referenzstandards (E2, 17α-Estradiol, 17- Methyltestosteron und Corticosteron) sollten bei jedem Prüflauf untersucht werden (Tabelle 3). PK-Wells mit 1 nM E2, die in ausschließlich mit DMSO (oder mit einem anderen geeigneten Lösungsmittel) behandelten E2- und VK-Wells eine maximale Induktion verursachen können, sollten in alle Assay-Platten einbezogen werden (Tabelle 4). Wenn in einem Versuch Zellen unterschiedlicher Herkunft (unterschiedliche Passagenzahl, unterschiedliche Chargen usw.) verwendet werden, sollten die Referenzstandards für die jeweilige Herkunft der Zellen geprüft werden.

Tabelle 4: Beispiel für die Anordnung von Konzentrationen der Prüf- und der Kontrollchemikalien auf der Assay-Platte des ER-Agonisten-Assays

Reihe	Prüfchemikalie 1			Prüfchemikalie 2			Prüfchemikalie 3			Prüfchemikalie 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Konz. 1 (10 µM)	→	→	1 mM	→	→	1 µM	→	→	10 nM	→	→
B	Konz. 2 (1 µM)	→	→	100 µM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	Konz. 3 (100 nM)	→	→	10 µM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	Konz. 4 (10 nM)	→	→	1 µM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	Konz. 5 (1 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	Konz. 6 (100 pM)	→	→	10 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	Konz. 7 (10 pM)	→	→	1 nM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VK	→	→	→	→	→	PK	→	→	→	→	→

VK: Vehikelkontrolle (0,1 % DMSO); PK: Positivkontrolle (1 nM E2)

Tabelle 5: Beispiel für die Anordnung von Konzentrationen der Referenzstandards auf der Assay-Platte des ER-Antagonisten-Assays

Reihe	Tamoxifen			Flutamid			Prüfchemikalie 1			Prüfchemikalie 2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Konz. 1 (10 µM)	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→
B	Konz. 2 (1 µM)	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→
C	Konz. 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	Konz. 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	Konz. 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	Konz. 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1 % DMSO	→	→	→	→	→	1 µM OHT	→	→	100 µM Dig	→	→
H	VK	→	→	→	→	→	PK	→	→	→	→	→

VK: Vehikelkontrolle (0,1 % DMSO), PK: Positivkontrolle (1 nM E2), OHT: 4-Hydroxytamoxifen, Dig: Digitonin.

 = gespikt mit 25 pM E2

28. Um die Antagonisten-Aktivität von Chemikalien zu ermitteln, sollten in Reihen von A bis G angeordnete Assay-Wells mit 25 pM E2 gespikt werden. Bei jedem Prüflauf sollten auch die Referenzstandards (Tamoxifen und Flutamid) geprüft werden. Jede Assay-Platte sollte mit 1 nM E2 behandelte PK-Wells, die als Qualitätskontrolle für die hER α -HeLa-9903-Zelllinie dienen kann, mit DMSO (oder einem anderen geeigneten Lösungsmittel) behandelte VK-Wells, Wells mit 0,1 % DMSO, die zusätzlich zum Spiken von E2 durch Zugabe von DMSO entsprechend der Spike-in-Kontrolle behandelt wurden, mit der Endkonzentration von 1 µM OHT behandelte Wells und mit 100 µM Dig behandelte Wells enthalten (Tabelle 5). Die nächste Assay-Platte sollte die gleiche Anordnung aufweisen, allerdings ohne die Wells mit den Referenzstandards (Tabelle 6). Wenn in einem Versuch Zellen unterschiedlicher Herkunft (unterschiedliche Passagenzahl, unterschiedliche Chargen usw.) verwendet werden, sollten die Referenzstandards für die jeweilige Herkunft der Zellen geprüft werden.

Tabelle 6: Beispiel für die Anordnung von Konzentrationen der Prüf- und der Kontrollchemikalien auf der Assay-Platte des ER-Antagonisten-Assays

Reihe	Prüfchemikalie 1			Prüfchemikalie 2			Prüfchemikalie 3			Prüfchemikalie 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Konz. 1 (10 µM)	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→
B	Konz. 2 (1 µM)	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→
C	Konz. 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	Konz. 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	Konz. 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	Konz. 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1 % DMSO	→	→	→	→	→	1 µM OHT	→	→	100 µM Dig	→	→
H	VK	→	→	→	→	→	PK	→	→	→	→	→

VK: Vehikelkontrolle (0,1 % DMSO), PK: Positivkontrolle (1 nM E2), OHT: 4-Hydroxytamoxifen, Dig: Digitonin.

 : gespickt mit 25 pM E2

29. Dass keine Randeffekte auftreten, sollte ggf. bestätigt werden, und wenn das Auftreten von Randeffekten als möglich betrachtet wird, sollte die Anordnung der Wells auf den Platten geändert werden, um diese Effekte zu vermeiden. Beispielsweise könnte eine Anordnung gewählt werden, bei der die Rand-Wells nicht berücksichtigt werden.
30. Nach Zugabe der Chemikalien sollten die Assay-Platten 20-24 Stunden in einem Inkubator mit 5 % CO₂ bei 37 ± 1 °C inkubiert werden, um die Bildung von Reporter-Genprodukten zu induzieren.
31. Bei stark flüchtigen Verbindungen ist besondere Vorsicht geboten. Bei diesen Verbindungen kann es bei unmittelbar benachbarten Kontroll-Wells zu falsch positiven Ergebnissen kommen. Dies sollte im Hinblick auf erwartete und historische Kontrollwerte beachtet werden. In den seltenen Fällen, in denen die Flüchtigkeit problematisch sein könnte, können Plattenversiegelungen helfen, einzelne Wells während der Prüfung zu isolieren. Dies ist in den betreffenden Fällen zu empfehlen.
32. Um unabhängige Ergebnisse sicherzustellen, sollten die Hauptprüfungen einer Chemikalie an unterschiedlichen Tagen wiederholt werden.

Luciferase-Assay

33. Für diesen Assay kann ein im Handel erhältliches Reagens für Luciferase-Assays [z. B. Steady-Glo® Luciferase Assay System (Promega, E2510 oder gleichwertig)] oder ein Luciferase-Assay-Standardsystem (z. B. Promega, E1500 oder gleichwertig) verwendet werden, wenn das Reagens die Akzeptanzkriterien erfüllt. Die Reagenzien für den Assay sollten nach der Empfindlichkeit des zu verwendenden Luminometers ausgewählt werden. Wenn das Luciferase-Assay-Standardsystem verwendet wird, sollte vor der Zugabe des Substrats der Luciferase Zellkultur-Lysispuffer (Cell Culture Lysis Reagent) (z. B. Promega,

E1531 oder gleichwertig) hinzugegeben werden. Die Zugabe des Luciferase-Reagens sollte nach den Herstelleranweisungen erfolgen.

ANALYSE DER DATEN

ER-Agonisten-Assay

34. Zur Erzielung einer relativen transkriptionellen Aktivität bei der PK (1 nM E2) können bei einem ER-Agonisten-Assay die Luminiszenzsignale derselben Platte in den folgenden Schritten analysiert werden (wobei auch gleichwertige mathematische Verfahren annehmbar sind):

Schritt 1: Für die VK wird der Mittelwert berechnet.

Schritt 2: Der Mittelwert der VK wird vom Wert jedes einzelnen Wells abgezogen, um die Daten zu normalisieren.

Schritt 3: Für die normalisierte PK wird der Mittelwert berechnet.

Schritt 4: Der normalisierte Wert jedes einzelnen Wells auf der Platte wird durch den Mittelwert der normalisierten PK (PK = 100 %) geteilt.

Der endgültige Wert der einzelnen Wells ist die relative transkriptionelle Aktivität dieses Wells im Vergleich zur Reaktion der PK.

Schritt 5: Der Mittelwert der relativen transkriptionellen Aktivität der einzelnen Konzentrationsgruppen der Prüfchemikalie wird berechnet. Bei der Reaktion sind zwei Dimensionen zu beachten: die gemittelte transkriptionelle Aktivität (Reaktion) und die Konzentration, bei der die Reaktion auftritt (siehe folgender Abschnitt).

Hinweise zur Induktion bei EC₅₀, PC₅₀ und PC₁₀

35. Zur Berechnung des EC₅₀-Werts wird die vollständige Konzentrations-Reaktions-Kurve benötigt. Die Erstellung dieser Kurve ist aufgrund von Begrenzungen des Prüfkonzentrationsbereichs (beispielsweise infolge von Zytotoxizität oder von Problemen hinsichtlich der Löslichkeit) allerdings u. U. nicht immer möglich oder praktikabel. Da der EC₅₀-Wert und die maximale Induktion (entsprechend dem Höchstwert der Hill-Gleichung) relevante Parameter sind, sollten diese Parameter nach Möglichkeit angegeben werden. Zur Berechnung des EC₅₀-Wertes und der maximalen Induktion sollte eine geeignete Statistik-Software verwendet werden (z. B. Graphpad Prism). Wenn die Konzentrations-Reaktions-Daten für die Hill-Logistik-Gleichung verwendet werden können, sollte der EC₅₀-Wert mit der folgenden Gleichung (7) berechnet werden:

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{\exp((\log \text{EC}_{50} - X) \times \text{Hillslope}))}$$
, wobei gilt:

X = Logarithmus der Konzentration und

Y = Reaktion; Y beginnt beim unteren Niveau (Bottom) und steigt in einer Sigmoidkurve bis zum oberen Niveau (Top). Das untere Niveau ist bei der Hill-Logistik-Gleichung gleich Null.

36. Bei den Prüfchemikalien ist jeweils Folgendes anzugeben:

RPC_{Max} (die durch eine Prüfchemikalie induzierte maximale Reaktion, ausgedrückt als Prozentanteil der durch 1 nM E2 auf derselben Platte induzierten Reaktion) sowie PC_{Max} (die Konzentration bei RPC_{Max}) und

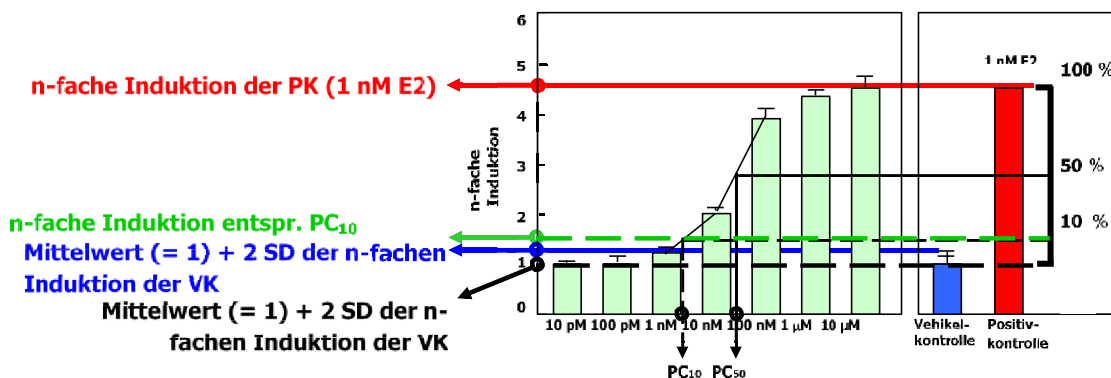
(bei positiven Chemikalien) die Konzentrationen, bei denen PC_{10} und ggf. PC_{50} induziert wird.

37. Der PC_x -Wert kann durch Interpolation zwischen zwei Punkten auf der XY-Koordinate, einem unmittelbar über und einem unmittelbar unter einem PC_x -Wert, berechnet werden. Wenn die Datenpunkte unmittelbar über und unter dem PC_x -Wert die Koordinaten (a,b) und (c,d) haben, kann der PC_x -Wert mit folgender Gleichung berechnet werden:

$$\log[PC_x] = \log[c] + (x-d)/(d-b)$$

38. Erläuterungen zu den PK-Werten sind der folgenden Abbildung 1 zu entnehmen.

Abbildung 1: Beispiel zur Ableitung von PK-Werten – Die PK (1 nM E2) wird auf jeder Assay-Platte berücksichtigt.



ER- Antagonisten-Assay

39. Zur Erzielung einer relativen transkriptionellen Aktivität (RTA) der Spike-in-Kontrolle (25 pM E2) können bei einem ER-Antagonisten-Assay die Luminiszenzsignale derselben Platte in den folgenden Schritten analysiert werden (wobei auch gleichwertige mathematische Verfahren annehmbar sind):

Schritt 1: Für die VK wird der Mittelwert berechnet.

Schritt 2: Der Mittelwert der VK wird vom Wert jedes einzelnen Wells abgezogen, um die Daten zu normalisieren.

Schritt 3: Für die normalisierte Spike-in-Kontrolle wird der Mittelwert berechnet.

Schritt 4: Der normalisierte Wert jedes einzelnen Wells auf der Platte wird durch den Mittelwert der normalisierten Spike-in-Kontrolle (Spike-in-Kontrolle = 100 %) geteilt.

Der endgültige Wert der einzelnen Wells ist die relative transkriptionelle Aktivität dieses Wells im Vergleich zur Reaktion der Spike-in-Kontrolle.

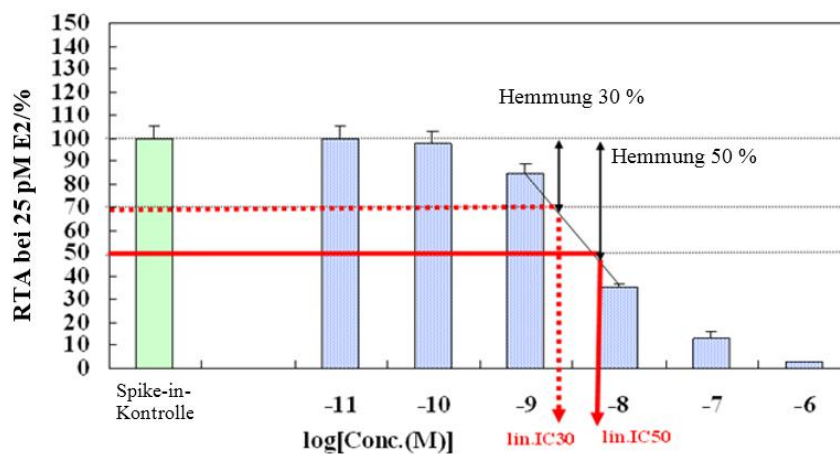
Schritt 5: Der Mittelwert der relativen transkriptionellen Aktivität der einzelnen Behandlungen wird berechnet.

Hinweise zur Induktion bei IC₃₀ und IC₅₀

40. Bei positiven Chemikalien sollten die Konzentrationen angegeben werden, bei denen IC₃₀ und ggf. IC₅₀ induziert wird.
41. Der IC_x-Wert kann durch Interpolation zwischen zwei Punkten auf der XY-Koordinate, einem unmittelbar über und einem unmittelbar unter einem IC_x-Wert, berechnet werden. Wenn die Datenpunkte unmittelbar über und unter dem IC_x-Wert die Koordinaten (c,d) und (a,b) haben, kann der IC_x-Wert mit folgender Gleichung berechnet werden:

$$\ln \text{IC}_x = a - (b - (100 - x)) \cdot (a - c) / (b - d)$$

Abbildung 2: Beispiel zur Ableitung von IC-Werten – Der Spike (25 pM E2) wird auf jeder Assay-Platte berücksichtigt.



RTA: relative transkriptionelle Aktivität

42. Die Ergebnisse sollten auf zwei (oder drei) unabhängigen Prüfläufen beruhen. Wenn bei zwei Prüfläufen vergleichbare und daher auch reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden, ist ein dritter Prüflauf nicht erforderlich. Ergebnisse können dann akzeptiert werden, wenn die folgenden Anforderungen erfüllt sind:

- Die Ergebnisse erfüllen die Akzeptanzkriterien (Nummern 14-20)

- und sind reproduzierbar.

Kriterien für die Auswertung von Daten

Tabelle 7: Kriterien für ein positives oder ein negatives Ergebnis beim ER-Agonisten-Assay

Positiv	Wenn RPC_{Max} bei mindestens zwei von zwei oder zwei von drei Prüfläufen größer oder gleich 10 % der Reaktion der Positivkontrolle ist.
Negativ	Wenn RPC_{Max} bei zwei von zwei oder zwei von drei Prüfläufen nicht mindestens gleich 10 % der Reaktion der Positivkontrolle ist.

Tabelle 8: Kriterien für ein positives oder ein negatives Ergebnis beim ER-Antagonisten-Assay

Positiv	Wenn bei mindestens zwei von zwei oder zwei von drei Prüfläufen IC_{30} berechnet wird.
Negativ	Wenn IC_{30} bei zwei von zwei oder zwei von drei Prüfläufen nicht berechnet wird.

43. Kriterien zur Auswertung der Daten sind den Tabellen 7 und 8 zu entnehmen. Positive Ergebnisse werden sowohl durch die Größenordnung der Wirkung als auch durch die Konzentration beschrieben, bei der die Wirkung eintritt. Die Beschreibung von Ergebnissen in Konzentrationen bei denen 50 % (PC_{50}) bzw. 10 % (PC_{10}) der PK-Werte beim Agonisten-Assay erreicht und 50 % (IC_{50}) bzw. 30 % (IC_{30}) des Wertes der Spike-in-Kontrolle beim Antagonisten-Assay gehemmt werden, erfüllt beide Anforderungen. Eine Prüfchemikalie wird jedoch als positiv eingestuft, wenn die durch die Prüfchemikalie induzierte maximale Reaktion (RPC_{Max}) bei mindestens zwei von zwei oder zwei von drei Prüfläufen größer oder gleich 10 % der Reaktion der PK ist. Als negativ werden Prüfchemikalien eingestuft, wenn RPC_{Max} in zwei von zwei oder zwei von drei Prüfläufen nicht mindestens 10 % der Reaktion der Positivkontrolle beträgt.
44. Die Berechnungen von PC_{10} , PC_{50} und PC_{Max} beim ER-Agonisten-Assay und von IC_{30} und IC_{50} beim ER-Antagonisten-Assay kann anhand einer Tabelle vorgenommen werden, die auf der öffentlichen Website der OECD¹ mit der Prüfrichtlinie bereitgestellt wird.
45. Es sollte hinreichend sein, die PC_{10} - oder PC_{50} - bzw. IC_{30} - oder IC_{50} -Werte mindestens zweimal zu bestimmen. Wenn die ermittelten Normalwerte von Daten im selben Konzentrationsbereich jedoch Unterschiede mit einem unannehmbar hohen Variationskoeffizienten (VK, %) aufweisen, können die Daten nicht als zuverlässig betrachtet werden. In diesem Fall sollte untersucht werden, worauf die hohe Variabilität

¹ <http://www.oecd.org/env/testguidelines>

zurückzuführen ist. Der VK der dreifachen Rohdaten (d. h. der Daten zur Leuchtdichte) der zur Berechnung von PC_{10} verwendeten Datenpunkte sollte weniger als 20 % betragen.

46. Die Erfüllung der Akzeptanzkriterien deutet darauf hin, dass das Assay-System ordnungsgemäß funktioniert. Dies gewährleistet jedoch nicht, dass ein bestimmter Prüflauf tatsächlich exakte Daten ergibt. Die Wiederholung der Ergebnisse des ersten Prüflaufs ist die beste Bestätigung dafür, dass exakte Daten ermittelt wurden.
47. Wenn beim ER-Agonisten-Assay über die für die Screening- und Priorisierungszwecke dieser Prüfrichtlinie benötigten Daten zu positiven Prüfchemikalien hinaus weitere Informationen benötigt werden (insbesondere für PC_{10} - bis PC_{49} -Chemikalien sowie bei Chemikalien, bei denen vermutet wird, dass es zu einer Überstimulation der Luciferase kommt), kann mit einem $ER\alpha$ -Antagonisten (siehe Anlage 2.1) bestätigt werden, dass die beobachtete Luciferase-Aktivität ausschließlich eine $ER\alpha$ -spezifische Reaktion ist.

PRÜFBERICHT

48. Siehe Nummer 20 im Abschnitt „ELEMENTE DES ER-TA-ASSAYS“.

LITERATUR

- (86) 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (87) Escande, A., u. a. (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol.*, 71, 1459-1469.
- (88) Kuiper, G.G., u. a. (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, *Endocrinol.*, 139, 4252-4263.
- (89) Spaepen, M., u. a. (1992). Detection of Bacterial and Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Polymerase Chain Reaction, *FEMS Microbiol. Lett.*, 78(1), 89-94.
- (90) Kobayashi, H., u. a. (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.
- (91) Dussurget, O. und Roulland-Dussoix, D. (1994). Rapid, Sensitive PCR-Based Detection of Mycoplasmas in Simulated Samples of Animal Sera, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(3), 953-959.
- (92) De Lean, A., Munson, P.J. und 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.

Anlage 2.1

FALSCH POSITIVE: BEWERTUNG VON NICHT DURCH REZEPTOREN VERMITTELTEN LUMINISZENZSIGNALEN

1. Falsch positive Ergebnisse beim ER-Agonisten-Assay können auf eine nicht durch ER vermittelte Aktivierung des Luciferase-Gens, auf eine direkte Aktivierung des Genprodukts oder eine sonstige Fluoreszenz zurückzuführen sein. Diese Wirkungen äußern sich in einer unvollständigen oder ungewöhnlichen Dosis-Reaktions-Kurve. Wenn solche Effekte vermutet werden, sollte der Effekt eines ER-Antagonisten (z. B. 4-Hydroxytamoxifen (OHT) in einer nicht toxischen Konzentration) auf die Reaktion untersucht werden. Der reine Antagonist ICI 182780 ist für diesen Zweck möglicherweise nicht geeignet, da eine hinreichende Konzentration von ICI 182780 eine Reduzierung des VK-Werts bewirken kann und da dies die Datenanalyse beeinträchtigt.
2. Um die Validität dieses Ansatzes sicherzustellen, sollten auf derselben Platte die folgenden Parameter geprüft werden:
 - Agonisten-Aktivität der unbekannten Chemikalie mit/ohne 10 μ M OHT,
 - VK (dreifach),
 - OHT (dreifach),
 - 1 nM E2 (dreifach) als Agonisten-PK und
 - 1 nM E2 + OHT (dreifach).

Kriterien für die Auswertung von Daten

Hinweis: Alle Wells sollten mit dem Vehikel in der gleichen Konzentration behandelt werden.

- Wenn die Agonisten-Aktivität der unbekannten Chemikalie durch die Behandlung mit dem ER-Antagonisten NICHT beeinträchtigt wird, ist sie als „negativ“ einzustufen.
- Wird die Agonisten-Aktivität der unbekannten Chemikalie vollständig gehemmt, sind die Entscheidungskriterien zu berücksichtigen.
- Ist die Agonisten-Aktivität bei der niedrigsten Konzentration größer oder gleich der Reaktion bei PC_{10} ist, wird die unbekannte Chemikalie mindestens in der Größenordnung der Reaktion bei PC_{10} gehemmt. Die Differenz der Reaktionen zwischen den nicht behandelten und den mit dem ER-Antagonisten behandelten Wells wird berechnet. Diese Differenz ist als tatsächliche Reaktion zu betrachten und sollte zur Berechnung der betreffenden Parameter verwendet werden, damit über die Einstufung entschieden werden kann.

Analyse der Messdaten

Der Leistungsstandard wird geprüft.

Der VK zwischen unter gleichen Bedingungen behandelten Wells wird geprüft.

1. Der Mittelwert der VK wird berechnet.
2. Vom Wert der einzelnen **nicht** mit OHT behandelten Wells wird der Mittelwert der VK abgezogen.
3. Der OHT-Mittelwert wird berechnet.
4. Vom Wert der einzelnen mit OHT behandelten Wells wird der Mittelwert der VK abgezogen.
5. Der Mittelwert der PK wird berechnet.
6. Die relative transkriptionelle Aktivität aller übrigen Wells wird bezogen auf die PK berechnet.

Anlage 2.2

ZUBEREITUNG VON MIT DEXTRANBESCHICHTETER AKTIVKOHLE (DCC) BEHANDELTEN SERUM

1. Die Behandlung von Serum mit dextranbeschichteter Aktivkohle (DCC) ist ein allgemeines Verfahren zur Entfernung von Östrogenverbindungen aus zu einem Zellmedium hinzugegebenem Serum, um verfälschte Reaktionen aufgrund von im Serum verbliebenem Östrogen auszuschließen. Mit diesem Verfahren können 500 ml fetales Rinderserum (FBS) behandelt werden.

Elemente

2. Für das Verfahren werden die folgende Ausrüstung und die folgenden Materialien benötigt:

Materialien

Aktivkohle

Dextran

Magnesiumchlorid-Hexahydrat ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)

Saccharose

1 M HEPES-Pufferlösung) (pH 7,4)

Mit einem Filtersystem hergestelltes ultrareines Wasser

Ausrüstung

Autoklaviertes Glasgefäß mit geeigneter Größe, normale Laborzentrifuge (die auf eine Temperatur von 4 °C eingestellt werden kann)

Verfahren

3. Das folgende Verfahren wird für die Verwendung von 50-ml-Zentrifugenröhrchen angepasst:

[Tag 1] Zur Zubereitung einer Suspension mit dextranbeschichteter Aktivkohle wird 1 l ultrareines Wasser mit 1,5 mM MgCl_2 , 0,25 M Saccharose, 2,5 g Aktivkohle, 0,25 g Dextran und 5 mM HEPES gemischt, bei 4 °C umgerührt und über Nacht stehen gelassen.

[Tag 2] Die Suspension wird in 50-ml-Zentrifugenröhrchen gegeben und bei 4 °C 10 Minuten mit 10 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt, und die Hälfte des Aktivkohlesediments zur Verwendung an Tag 3 bei 4 °C aufbewahrt. Die andere Hälfte der Aktivkohle wird mit FBS suspendiert, das zur Vermeidung von Ausfällungen vorsichtig aufgetaut, 30 Minuten bei 56 °C durch Wärme inaktiviert und dann in ein autoklaviertes

Glasgefäß (z. B. einen Erlenmeyer-Kolben) gegeben wurde. Diese Suspension wird über Nacht bei 4 °C vorsichtig umgerührt.

[Tag 3] Die Suspension wird in Zentrifugenröhrchen gegeben und bei 4 °C 10 Minuten mit 10 000 rpm zentrifugiert. Das FBS wird entnommen und in das an Tag 2 zubereitete und aufbewahrte frische Aktivkohlesediment gegeben. Das Aktivkohlesediment wird suspendiert und die erhaltene Suspension vorsichtig in einem autoklavierten Glasgefäß über Nacht bei 4 °C umgerührt.

[Tag 4] Die Suspension wird 10 Minuten bei einer Temperatur von 4 °C mit 10 000 rpm zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand durch einen sterilen 0,2-µm-Filter filtriert. Dieses mit DCC behandelte FBS ist bei -20 °C zu lagern und kann dann innerhalb eines Zeitraums von bis zu einem Jahr verwendet werden.

ANLAGE 3

VM7LUC-ER-TA-ASSAY ZUR BESTIMMUNG VON ÖSTROGENREZEPTOR-AGONISTEN UND -ANTAGONISTEN

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN UND BEGRENZUNGEN (SIEHE AUCH ALLGEMEINE EINLEITUNG)

1. Für diesen Assay wird die VM7Luc4E2-Zelllinie verwendet.¹ Diese Zelllinie wurde vom National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM) und vom Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) validiert (1). Die VM7Luc-Zelllinien exprimieren hauptsächlich den endogenen ER α sowie in geringerer Menge den endogenen ER β (2) (3) (4).
2. Dieser Assay ist bei zahlreichen Stoffen anwendbar, die in Dimethylsulfoxid (DMSO; CASRN 67-68-5) gelöst werden können, nicht mit DMSO oder mit dem Zellkulturmedium reagieren und bei der zu untersuchenden Konzentration nicht zytotoxisch wirken. Wenn DMSO nicht verwendet werden kann, kommen auch andere Vehikel wie beispielsweise Ethanol oder Wasser in Betracht (Nummer 12). Angesichts der nachgewiesenen Leistungsfähigkeit des VM7Luc-ER-TA-(Ant)agonisten-Assays ist davon auszugehen, dass mit diesem Assay generierte Daten Aufschluss über durch ER vermittelte Wirkungsmechanismen geben und bei der Priorisierung von Stoffen für weitere Untersuchungen berücksichtigt werden können.
3. Dieser Assay wurde speziell zum Nachweis von hER α und einer durch hER β vermittelten TA anhand einer Messung der Chemilumineszenz als Endpunkt entwickelt. Die Berücksichtigung der Chemilumineszenz in Bioassays ist allgemein üblich, da die Lumineszenz ein ausgeprägtes Signal-Rausch-Verhältnis ergibt (10). Die Aktivität der

¹ Vor Juni 2016 wurde diese Zelllinie als BG1Luc-Zelllinie bezeichnet. BG-1-Zellen wurden ursprünglich von Geisinger u. a. (1998) (12) beschrieben und später von Forschern am National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) charakterisiert (13). Erst vor verhältnismäßig kurzer Zeit wurde entdeckt, dass von BG-1-Zellen zwei Varianten existieren, die von Forschern verwendet werden: BG-1 Fr und BG-1 NIEHS. Eingehende Untersuchungen (u. a. DNA-Tests) der beiden Varianten von BG-1-Zelllinien durch Li u. a. (2014) (14) haben gezeigt, dass die Variante BG-1 Fr eine besondere Zelllinie war und dass die Variante BG-1 NIEHS, d. h. die ursprünglich zur Entwicklung des Assays verwendete Zelllinie, nicht die humane Ovarialkarzinom-Zelllinie BG1, sondern eine Variante der humanen Brustkrebs-Zelllinie MCF7 war. Die in dem Assay verwendete und ursprünglich als BG1Luc4E2 bezeichnete Zelllinie (15) wird nun als VM7Luc4E2 („V“ = Variante; „M7“ = MCF7-Zellen) bezeichnet. Entsprechend wird nun der Assay als VM7Luc-ER-TA-Assay bezeichnet. Die Zelllinien, auf denen der Assay beruht, haben also eine andere Herkunft. Für veröffentlichte Validierungsstudien und für die Verwendbarkeit und den Einsatz dieses Assays zur Untersuchung östrogen/antiöstrogen Chemikalien ist dies jedoch nicht von Bedeutung.

Leuchtkäfer-Luciferase bei zellbasierten Assays kann jedoch mit der Aktivität von Stoffen verwechselt werden, die das Luciferase-Enzym hemmen und infolge der Proteinstabilisierung sowohl eine erkennbare Hemmung als auch eine erhöhte Luminiszenz bewirken (10). Außerdem wurden bei einige luciferasebasierten EN-Reporter-Gen-Assays bei Phytoöstrogenkonzentrationen von mehr als 1 µM infolge der Überaktivierung des Luciferase-Reporter-Gens Luminiszenzsignale festgestellt, die nicht durch Rezeptoren vermittelt wurden (9) (11). Die Dosis-Reaktions-Kurve zeigt, dass die tatsächliche Aktivierung des ER-Systems bei niedrigeren Konzentrationen erfolgt; bei stabil transfizierten ER-TA-Assay-Systemen muss die Luciferase-Expression bei hohen Konzentrationen von Phytoöstrogenen oder ähnlichen Verbindungen, bei denen vermutet wird, dass sie eine phytoöstrogenartige Überaktivierung des Luciferase-Reportergens verursachen, jedoch sorgfältig untersucht werden (siehe Anlage 2).

4. Vor der Verwendung dieses Assays für rechtliche Zwecke sollten die Abschnitte „ALLGEMEINE EINLEITUNG“ und „ELEMENTE DES ER-TA-ASSAYS“ gelesen werden. Die in der vorliegenden Prüfmethode verwendeten Begriffe und Abkürzungen werden in Anlage 1 erläutert.

PRINZIP DES ASSAYS (SIEHE AUCH ALLGEMEINE EINLEITUNG)

5. Mit dem Assay werden ER-Liganden-Bindungen nach einer Translokation des Rezeptor-Liganden-Komplexes an den Zellkern nachgewiesen. Im Zellkern geht der Rezeptor-Liganden-Komplex eine Bindung mit spezifischen DNA-Response-Elements ein und transaktiviert das Reporter-Gen (*luc*). Dadurch wird die Bildung von Luciferase angeregt und anschließend die Emission von Licht bewirkt, das mit einem Luminometer gemessen werden kann. Die Luciferase-Aktivität kann rasch und kostengünstig mit verschiedenen im Handel erhältlichen Test-Kits bewertet werden. Beim VM7Luc-ER-TA-Assay wird eine auf ER reagierende humane Brustadenokarzinom-Zelllinie (VM7) verwendet, die mit einem Leuchtkäfer-*luc*-Reporter-Genprodukt stabil transfiziert wurde, das kontrolliert durch vier Östrogen-Response-Elemente vor dem Maus-Mammatumovirus-Promoter (MMTV) angeordnet wurde, um anhand der *In-vitro*-Aktivität eines ER-Agonisten oder -Antagonisten Stoffe nachzuweisen. Dieser MMTV-Promotor bewirkt nur eine geringe Kreuzreaktivität mit anderen Steroiden und nicht steroiden Hormonen (8). Kriterien für die Auswertung der Daten werden in Nummer 41 eingehend beschrieben. Eine positive Reaktion ist kurz gesagt an einer Konzentrations-Reaktions-Kurve mit mindestens drei Punkten mit sich nicht überschneidenden Fehlerbalken (Mittelwert ± SD) sowie an einer Änderung der Amplitude (normalisierte relative Lichteinheiten [RLU]) von mindestens 20 % des Höchstwerts für den betreffenden Referenzstandard (17β-Estradiol [E2; CASRN 50-28-2] beim Agonisten-Assay und Raloxifen HCl [Ral; CASRN 84449-90-1]/E2 beim Antagonisten-Assay) zu erkennen.

VERFAHREN

Zelllinie

6. Für den Assay sollte die stabil transfizierte VM7Luc4E2-Zelllinie verwendet werden. Diese Zelllinie kann gegenwärtig nur nach Maßgabe einer technischen Lizenzvereinbarung von der University of California, Davis, Kalifornien, USA¹ und von Xenobiotic Detection Systems Inc., Durham, North Carolina, USA,² bezogen werden.

Stabilität der Zelllinie

7. Um die Stabilität und die Integrität der Zelllinie aufrechtzuerhalten, sollten die Zellen im Erhaltungsmedium über mehr als eine Passage des tiefgefrorenen Materials vermehrt werden (Nummer 9). Die Kultivierung sollte sich auf höchstens 30 Passagen beschränken. Bei der VM7Luc4E2-Zelllinie werden für 30 Passagen etwa drei Monate benötigt.

Bedingungen für die Haltung der Zellkulturen und für die Plattierung

8. Die in der Guidance on Good Cell Culture Practice spezifizierten Verfahren (5) (6) sollten eingehalten werden, damit die Qualität aller Materialien und Methoden gewährleistet ist und die Integrität, die Validität und die Reproduzierbarkeit aller durchgeführten Arbeiten gewahrt werden.
9. VM7Luc4E2-Zellen werden im RPMI-1640-Medium ergänzt um 0,9 % Pen/Strep und 8,0 % fetales Rinderserum (FBS) in einem eigenen Inkubator für Gewebekulturen bei einer Temperatur von 37 ± 1 °C, 90 ± 5 % Luftfeuchtigkeit und $5,0 \pm 1$ % CO₂/Luft gehalten.
10. Nach Erreichen einer Konfluenz von ~80 % werden die VM7Luc4E2-Zellen subkultiviert und 48 Stunden in einer östrogenfreien Umgebung konditioniert, bevor sie in 96-Well-Platten plattiert werden, wo sie den Prüfchemikalien ausgesetzt und auf eine östrogenbedingte Induzierung einer Luciferase-Aktivität untersucht werden. Das östrogenfreie Medium (EFM) enthält Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium (DMEM) ohne Phenolrot, ergänzt um 4,5 % mit Aktivkohle/Dextran behandeltes fetales Rinderserum (FBS), 1,9 % L-Glutamin und 0,9 % Pen/Strep. Die Kunststoffmaterialien sollten keine Östrogenaktivität entwickeln [siehe detailliertes Protokoll (7)].

Akzeptanzkriterien

¹ Michael S. Denison, Ph.D. Professor, Dept. of Environmental Toxicology, 4241 Meyer Hall, One Shields Ave, University of California, Davis, CA 95616, E-Mail: msdenison@ucdavis.edu, (530) 754-8649.

² Xenobiotic Detection Systems Inc. 1601 East Geer Street, Suite S, Durham NC, 27704 USA, E-Mail: info@dioxins.com, Telefon: 919-688-4804, Telefax: 919-688-4404.

11. Ob eine Prüfung akzeptiert oder verworfen wird, hängt von der Auswertung der Ergebnisse mit den Referenzstandards und mit den Kontrollen aller auf einer 96-Well-Platte durchgeführten Prüfungen ab. Jeder Referenzstandard wird in mehreren Konzentrationen geprüft, und von allen Konzentrationen der Referenzstandards und der Kontrollen sind mehrere Proben verfügbar. Die Ergebnisse werden mit Qualitätskontrollen (QC) der Parameter verglichen, die aus Datenbanken mit historischen Daten zu Agonisten und Antagonisten abgeleitet wurden, die zum Nachweis ihrer Leistungsfähigkeit von den einzelnen Labors ermittelt wurden. Die Datenbanken mit historischen Datenbanken werden unter Eingabe der Werte der Referenzstandards und der Kontrollen kontinuierlich aktualisiert. Nach Änderungen der Ausrüstung oder der Laborbedingungen müssen die Datenbanken mit historischen Daten unter Umständen aktualisiert werden.

Agonisten-Prüfung

Dosisfindungsstudie

- Induktion: Zur Messung der Platteninduktion wird der höchste mittlere RLU-Wert (RLU = relative Lichteinheit) des E2-Referenzstandards durch den mittleren RLU-Wert der DMSO-Kontrolle geteilt. In der Regel wird eine 5-fache Induktion erreicht; als Akzeptanzkriterium gilt jedoch, dass die Induktion größer oder gleich der 4-fachen Induktion sein sollte.
- Ergebnisse der DMSO-Kontrolle: Die RLU-Werte der Lösungsmittelkontrolle sollten das 2,5-Fache der Standardabweichung des historischen mittleren RLU-Werts der Lösungsmittelkontrolle betragen.
- Eine Prüfung, die keines der beiden Akzeptanzkriterien erfüllt, sollte verworfen und wiederholt werden.

Hauptversuch

Der Hauptversuch beinhaltet Akzeptanzkriterien aus der Agonisten-Dosisfindungsstudie sowie Folgendes:

- Ergebnisse der Referenzstandards: Die Konzentrations-Reaktions-Kurve des E2-Referenzstandards sollte sigmoidal verlaufen und mindestens drei Werte im linearen Bereich enthalten.
- Ergebnisse der Positivkontrolle: Die RLU-Werte der Methoxychlor-Kontrolle sollten höher sein als der Mittelwert für DMSO zuzüglich der 3-fachen Standardabweichung vom DMSO-Mittelwerts.
- Eine Prüfung, die keines der Akzeptanzkriterien erfüllt, sollte verworfen und wiederholt werden.

Antagonisten-Prüfung

Dosisfindungsstudie

- Reduktion: Zur Messung der Plattenreduktion wird der höchste mittlere RLU-Wert des Ral/E2-Referenzstandards durch den mittleren RLU-Wert der DMSO-Kontrolle geteilt. In der Regel wird eine 5-fache Reduktion erreicht; als Akzeptanzkriterium gilt jedoch, dass die Reduktion größer oder gleich der 3-fachen Reduktion sein sollte.
- Ergebnisse der E2-Kontrolle: Die RLU-Werte der E2-Kontrolle sollten das 2,5-Fache der Standardabweichung des historischen mittleren RLU-Werts der E2-Kontrolle betragen.
- Ergebnisse der DMSO-Kontrolle: Die RLU-Werte der DMSO-Kontrolle sollten das 2,5-Fache der Standardabweichung des historischen mittleren RLU-Werts der Lösungsmittelkontrolle betragen.
- Eine Prüfung, die keines der Akzeptanzkriterien erfüllt, wird verworfen und wiederholt.

Hauptversuch

Der Hauptversuch beinhaltet Akzeptanzkriterien aus der Antagonisten-Dosisfindungsstudie sowie Folgendes:

- Ergebnisse der Referenzstandards: Die Konzentrations-Reaktions-Kurve des Ral/E2-Referenzstandards sollte sigmoidal verlaufen und mindestens drei Werte im linearen Bereich enthalten.
- Ergebnisse der Positivkontrolle: Die RLU-Werte der Tamoxifen/E2-Kontrolle sollten höher sein als der Mittelwert der E2-Kontrolle zuzüglich der 3-fachen Standardabweichung vom Mittelwert der E2-Kontrolle.
- Eine Prüfung, die keines der Akzeptanzkriterien erfüllt, wird verworfen und wiederholt.

Referenzstandards, Positivkontrolle und Vehikelkontrolle

Vehikelkontrolle (Agonisten- und Antagonisten-Assay)

12. Das zur Auflösung einer Prüfchemikalie verwendete Vehikel sollte als Vehikelkontrolle geprüft werden. Bei der Validierung des VM7Luc-ER-TA-Assays wurde 1 % (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO, CASRN 67-68-5) verwendet (Nummer 24). Wenn ein anderes Vehikel als DMSO verwendet wird, sollten alle Referenzstandards, Kontrollen und Prüfchemikalien mit diesem Vehikel geprüft werden.

Referenzstandard (Dosisfindung beim Agonisten-Assay)

13. Als Referenzstandard wird E2 (CASRN 50-28-2) verwendet. Der Referenzstandard für die Dosisfindungsstudie besteht aus einer seriellen Verdünnung mit vier Konzentrationen E2 ($1,84 \times 10^{-10}$, $4,59 \times 10^{-11}$, $1,15 \times 10^{-11}$ und $2,87 \times 10^{-12}$ M), wobei jede Konzentration in zwei Wells geprüft wird.

Referenzstandard (Dosisfindung beim Agonisten-Assay)

14. E2 für den Hauptversuch besteht aus einer seriellen Verdünnung 1:2 mit 11 E2-Konzentrationen (von $3,67 \times 10^{-10}$ bis $3,59 \times 10^{-13}$ M) jeweils in zwei Wells.

Referenzstandard (Dosisfindung beim Antagonisten-Assay)

15. Der Referenzstandard besteht aus einer Kombination von Ral (CASRN 84449-90-1) und E2 (CASRN 50-28-2). Ral/E2 für die Dosisfindungsstudie umfasst eine serielle Verdünnung mit Ral in drei Konzentrationen ($3,06 \times 10^{-9}$, $7,67 \times 10^{-10}$ und $1,92 \times 10^{-10}$ M) sowie einer festen Konzentration ($9,18 \times 10^{-11}$ M) E2 in zwei Wells.

Referenzstandard (Agonisten-Hauptversuch)

16. Ral/E2 für den Hauptversuch besteht aus einer seriellen Verdünnung von Ral (1:2) mit neun Ral/E2-Konzentrationen von $2,45 \times 10^{-8}$ bis $9,57 \times 10^{-11}$ M sowie einer festen Konzentration ($9,18 \times 10^{-11}$ M) E2 jeweils in zwei Wells.

Schwache Positivkontrolle (Agonist)

17. Die schwache Positivkontrolle besteht aus $9,06 \times 10^{-6}$ M *p,p'*-Methoxychlor (Methoxychlor; CASRN 72-43-5) in einem EFM.

Schwache Positivkontrolle (Antagonist)

18. Die schwache Positivkontrolle besteht aus $3,36 \times 10^{-6}$ M Tamoxifen (CASRN 10540-29-1) mit $9,18 \times 10^{-11}$ M E2 in einem EFM.

E2-Kontrolle (nur Antagonisten-Assay)

19. Die E2-Kontrolle besteht aus $9,18 \times 10^{-11}$ M E2 in einem EFM und dient als Normalwert-Negativkontrolle.

n-fache Induktion (Agonist)

20. Die Induktion der Luciferase-Aktivität des Referenzstandards (E2) wird gemessen, indem der höchste mittlere RLU-Wert des E2-Referenzstandards durch den mittleren RLU-Wert der DMSO-Kontrolle geteilt wird; dabei sollte das Ergebnis mehr als das 4-Fache betragen.

n-fache Reduktion (Antagonist)

21. Die mittlere Luciferase-Aktivität des Referenzstandards (Ral/E2) wird gemessen, indem der höchste mittlere RLU-Wert des Ral/E2-Referenzstandards durch den mittleren RLU-Wert der DMSO-Kontrolle geteilt wird; dabei sollte das Ergebnis mehr als das 3-Fache betragen.

Zum Nachweis der Eignung des Labors siehe Nummer 14 und Tabellen 3 und 4 im Abschnitt „ELEMENTE DES ER-TA-ASSAYS“ bei dieser Prüfmethode.

Vehikel

22. Die Prüfchemikalien sollten in einem Lösungsmittel gelöst werden, das die betreffende Prüfchemikalie löst und sich mit dem Zellmedium mischt. Geeignete Vehikel sind Wasser, Ethanol (Reinheit 95-100 %) und DMSO. Wenn DMSO verwendet wird, sollte die Konzentration höchstens 1 % (v/v) betragen. Bei jedem Vehikel sollte nachgewiesen werden, dass die verwendete Höchstmenge nicht zytotoxisch ist und keine Auswirkungen auf den Assay hat. Die Referenzstandards und die Kontrollen werden in 100 % Lösungsmittel gelöst und dann in einem EFM auf geeignete Konzentrationen verdünnt.

Zubereitung der Prüfchemikalien

23. Die Referenzstandards und die Kontrollen werden in 100 % DMSO (oder einem anderen geeigneten Lösungsmittel) gelöst und dann in einem EFM auf geeignete Konzentrationen verdünnt. Alle Prüfchemikalien sollten sich vor der Lösung und Verdünnung an die Raumtemperatur anpassen können. Die Lösungen der Prüfchemikalien sollten für jeden Versuch neu zubereitet werden. In den Lösungen sollten kein Niederschlag und keine Trübung zu erkennen sein. Der Referenzstandard und die Kontrollen können in größeren Mengen zubereitet und vorgehalten werden. Der endgültige Referenzstandard, die Verdünnungen der Kontrollen und die Prüfchemikalien sollten jedoch für jeden Versuch frisch zubereitet und innerhalb von 24 Stunden nach der Zubereitung verwendet werden.

Löslichkeit und Zytotoxizität: Hinweise zur Dosisfindung

24. Die Dosisfindungsstudie umfasst serielle Verdünnungen (1:10) mit sieben Verdünnungspunkten, die jeweils zweimal geprüft werden. Zunächst werden die Prüfchemikalien bis zur Höchstkonzentration von 1 mg/ml (~1 mM) beim Agonisten-Assay bzw. von 20 µg/ml (~10 µM) beim Antagonisten-Assay geprüft. Mit den Dosisfindungsstudien werden
- die im Hauptversuch zu verwendenden Ausgangskonzentrationen der Prüfchemikalien und
 - die im Hauptversuch zu verwendenden Verdünnungen der Prüfchemikalien (1:2 oder 1:5) ermittelt.
25. Die Prüfprotokolle des Agonisten- und der Antagonisten-Assays umfassen eine Bewertung der Zellviabilität/Zytotoxizität (7) im Rahmen der Dosisfindung und des Hauptversuchs. Die Methode zur Ermittlung der Zytotoxizität zur Bewertung der Zellviabilität bei der Validierung des VM7Luc-ER-TA-Assays (1) bestand in einer skalierten qualitativen visuellen Beobachtung; allerdings kann die Zytotoxizität auch mit einer quantitativen Methode bestimmt werden (siehe Protokoll (7)). Daten aufgrund von Konzentrationen der Prüfchemikalien, bei denen die Viabilität um mehr als 20 % beeinträchtigt wird, können nicht berücksichtigt werden.

Prüfung der chemischen Exposition und Anordnung auf der Assay-Platte

26. Die Zellen werden gezählt und in 96-Well-Gewebekulturplatten (2×10^5 Zellen pro Well) in ein EFM gegeben und 24 Stunden inkubiert, damit die Zellen an der Platte anhaften können. Das EFM wird entfernt und durch die Prüf- und Referenzchemikalien im EFM ersetzt und 19-24 Stunden inkubiert. Besondere Aufmerksamkeit ist bei stark flüchtigen Stoffen geboten, da durch benachbarte Kontroll-Wells falsch positive Ergebnisse entstehen können. In diesen Fällen können „Plattenversiegelungen“ helfen, die einzelnen Wells während der Prüfung zu isolieren. Dies ist in den betreffenden Fällen zu empfehlen.

Dosisfindungsstudien

27. Bei Dosisfindungsstudien werden alle Wells der 96-Well-Platte verwendet, um bis zu sechs Prüfchemikalien in seriellen Verdünnungen (1:10) mit sieben Verdünnungspunkten jeweils zweimal zu prüfen (siehe Abbildungen 1 und 2).
- Bei der Dosisfindungsstudie für *Agonisten* werden als Referenzstandard vier E2-Konzentrationen (jeweils zwei) und vier Replikat-Wells für die DMSO-Kontrolle verwendet.
 - Bei der Dosisfindungsstudie für *Antagonisten* werden als Referenzstandard drei Ral/E2-Konzentrationen mit $9,18 \times 10^{-11}$ M E2 (jeweils zwei) und drei Replikat-Wells für die E2- und die DMSO-Kontrolle verwendet.

Abbildung 1: Anordnung bei Prüfungen zur Dosisfindung bei Agonisten mit einer 96-Well-Platte

	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	VK	VK	VK	VK	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4

Abkürzungen: E2-1 bis E2-4 = Konzentrationen des E2-Referenzstandards (hoch bis niedrig); TC1-1 bis TC1-7 = Konzentrationen (hoch bis niedrig) der Prüfchemikalie 1 (TC1); TC2-1 bis TC2-7 = Konzentrationen (hoch bis niedrig) der Prüfchemikalie 2 (TC2); TC3-1 bis TC3-7 = Konzentrationen (hoch bis niedrig) der Prüfchemikalie 3 (TC3); TC4-1 bis TC4-7 = Konzentrationen (hoch bis niedrig) der Prüfchemikalie 4 (TC4); TC5-1 bis TC5-7 = Konzentrationen (hoch bis niedrig) der Prüfchemikalie 5 (TC5); TC6-1 bis TC6-7 = Konzentrationen (hoch bis niedrig) der Prüfchemikalie 6 (TC6); VK = Vehikelkontrolle (DMSO [1 % v/v EFM.]).

Abbildung 2: Anordnung bei Prüfungen zur Dosisfindung bei Antagonisten mit einer 96-Well-Platte

	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	VK	VK	VK	E2	E2	E2	Ral-1	Ral-2	Ral-3

Abkürzungen: E2 = E2-Kontrolle; Ral-1 bis Ral-3 = Konzentrationen des Raloxifen/E2-Referenzstandards (hoch bis niedrig); TC1-1 bis TC1-7 = Konzentrationen (hoch bis niedrig) der Prüfchemikalie 1 (TC1); TC2-1 bis TC2-7 = Konzentrationen (hoch bis niedrig) der Prüfchemikalie 2 (TC2); TC3-1 bis TC3-7 = Konzentrationen (hoch bis niedrig) der Prüfchemikalie 3 (TC3); TC4-1 bis TC4-7 = Konzentrationen (hoch bis niedrig) der Prüfchemikalie 4 (TC4); TC5-1 bis TC5-7 = Konzentrationen (hoch bis niedrig) der Prüfchemikalie 5 (TC5); TC6-1 bis TC6-7 = Konzentrationen (hoch bis niedrig) der Prüfchemikalie 6 (TC6); VK = Vehikelkontrolle (DMSO [1% v/v EFM.]).

Hinweis: Alle Prüfchemikalien werden mit $9,18 \times 10^{-11}$ M E2 geprüft.

28. Für jedes Well wird ein endgültiges Medienvolumen von 200 µl als erforderlich empfohlen. Für die Prüfung sind ausschließlich Prüfplatten zu verwenden, bei denen die Zellviabilität in allen Wells mindestens 80 % beträgt.

29. Die Bestimmung von Ausgangskonzentrationen für **Agonisten**-Hauptversuche wird im Protokoll für Agonisten-Assays eingehend beschrieben (7). Dabei sind die folgenden Kriterien zu berücksichtigen:

- Wenn die Konzentrationskurve der Prüfchemikalie keine Punkte enthält, die über dem Mittelwert zuzüglich der 3-fachen Standardabweichung der DMSO-Kontrolle liegen, wird der Hauptversuch an einer seriellen Verdünnung (1:2) mit 11 Verdünnungspunkten beginnend mit der maximalen löslichen Konzentration vorgenommen.
- Wenn die Konzentrationskurve der Prüfchemikalie keine Punkte enthält, die über dem Mittelwert zuzüglich der 3-fachen Standardabweichung der DMSO-Kontrolle liegen, sollte die beim Hauptversuch zu verwendende Verdünnungsreihe mit 11 Verdünnungspunkten um eine logarithmische Einheit höher als die Konzentration sein, bei der beim Vorversuch der höchste bereinigte RLU-Wert ermittelt wurde. Die Verdünnungsreihe mit 11 Verdünnungspunkten beruht auf Verdünnungen im Verhältnis 1:2 oder 1:5; das Verdünnungsverhältnis richtet sich nach den folgenden Kriterien:

Eine serielle Verdünnung im Verhältnis 1:2 mit 11 Verdünnungspunkten sollte verwendet werden, wenn der sich ergebende Konzentrationsbereich das gesamte Spektrum der Reaktionen aufgrund der in der Dosisfindungsstudie ermittelten Konzentrations-Reaktions-Kurve abdeckt. Ansonsten ist eine Verdünnung im Verhältnis 1:5 zu verwenden.

- Wenn eine Prüfchemikalie in der Dosisfindungsstudie eine biphasige Konzentrations-Reaktions-Kurve ergibt, sollten die beiden Phasen auch im Hauptversuch berücksichtigt werden.

30. Die Bestimmung von Ausgangskonzentrationen für **Antagonisten**-Hauptversuche wird im Protokoll für Antagonisten-Assays eingehend beschrieben (7). Dabei sind die folgenden Kriterien zu berücksichtigen:

- Wenn die Konzentrationskurve der Prüfchemikalie keine Punkte enthält, die unter dem Mittelwert abzüglich der 3-fachen Standardabweichung der E2-Kontrolle liegen, wird der Hauptversuch mit einer seriellen Verdünnung (1:2) mit 11 Verdünnungspunkten beginnend mit der maximalen löslichen Konzentration vorgenommen.
- Wenn die Konzentrationskurve der Prüfchemikalie keine Punkte enthält, die unter dem Mittelwert abzüglich der 3-fachen Standardabweichung der E2-Kontrolle liegen, sollte beim Hauptversuch für die Verdünnungsreihe mit 11 Verdünnungspunkten eine der folgenden Ausgangskonzentrationen verwendet werden:
 - die Konzentration mit dem niedrigsten angepassten RLU-Wert bei der Dosisfindung,
 - die maximal lösliche Konzentration (siehe Protokoll zum Antagonisten-Assay (7), Abbildung 14-2),

- die niedrigste zytotoxische Konzentration (Beispiel siehe Antagonisten-Protokoll (7), Abbildung 14-3).
- Die Verdünnungsreihe mit 11 Verdünnungspunkten beruht auf Verdünnungen im Verhältnis 1:2 oder 1:5; das Verdünnungsverhältnis richtet sich nach den folgenden Kriterien:

Eine serielle Verdünnung im Verhältnis 1:2 mit 11 Verdünnungspunkten sollte verwendet werden, wenn der sich ergebende Konzentrationsbereich das gesamte Spektrum der Reaktionen aufgrund der in der Dosisfindungsstudie ermittelten Konzentrations-Reaktions-Kurve abdeckt. Ansonsten sollte eine Verdünnung im Verhältnis 1:5 verwendet werden.

Hauptversuche

31. Ein Hauptversuch besteht aus seriellen Verdünnungen mit 11 Verdünnungspunkten (je nach Ausgangskonzentration für die Kriterien des Hauptversuchs entweder 1:2 oder 1:5), wobei jede Konzentration an drei Wells der 96-Well-Platte zu prüfen ist (siehe Abbildungen 3 und 4).
- Bei den *Agonisten*-Hauptversuchen wird E2 in 11 Konzentrationen jeweils zweifach als Referenzstandard geprüft. Jede Platte enthält 4 Replikat-Wells mit der DMSO-Kontrolle und 4 Replikat-Wells mit der Methoxychlor-Kontrolle ($9,06 \times 10^{-6}$ M).
- Bei den *Antagonisten*-Hauptversuchen werden Ral/E2 in 9 Konzentrationen mit $9,18 \times 10^{-11}$ M E2 jeweils zweifach als Referenzstandard, 4 Replikat-Wells mit der $9,18 \times 10^{-11}$ M E2 als Kontrolle, 4 Replikat-Wells als DMSO-Kontrolle und 4 Replikat-Wells mit $3,36 \times 10^{-6}$ M Tamoxifen geprüft.

Abbildung 3: Anordnung bei Agonisten-Hauptversuchen mit 96-Well-Platten

	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	VK
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VK
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VK
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VK
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

Abkürzungen: TC11-1 bis TC1-11 = Konzentrationen (hoch bis niedrig) der Prüfchemikalie 1; TC2-1 bis TC2-11 = Konzentrationen (hoch bis niedrig) der Prüfchemikalie 2; E2-1 bis E2-11 = Konzentrationen des E2-Referenzstandards (hoch bis niedrig); Meth = p,p'-Methoxychlor, schwach positive Kontrolle; VK = DMSO (1 % v/v) EFM Vehikelkontrolle.

Abbildung 4: Anordnung bei Antagonisten-Hauptversuchen mit 96-Well-Platten

	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	VK
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VK
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VK
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VK
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

Abkürzungen: E2 = E2-Kontrolle; Ral-1 bis Ral-9 = Konzentrationen des Raloxifen-/E2-Referenzstandards (hoch bis niedrig); Tam = Tamoxifen/E2, schwach positive Kontrolle; TC1-1 bis TC1-11 = Konzentrationen (hoch bis niedrig) der Prüfchemikalie 1 (TC1); TC2-1 bis TC2-11 = Konzentrationen (hoch bis niedrig) der Prüfchemikalie 2 (TC2); VK = Vehikelkontrolle (DMSO [1 % v/v EFM.]).

Hinweis: Alle Referenz- und alle Prüf-Wells enthalten jeweils E2 in einer bestimmten Konzentration ($9,18 \times 10^{-11}$ M).

32. Um unabhängige Ergebnisse sicherzustellen, sollten die Hauptversuche zur Prüfung der Chemikalien an unterschiedlichen Tagen wiederholt werden. In jedem Fall sollten mindestens zwei Hauptversuche durchgeführt werden. Wenn die Prüfergebnisse einander widersprechen (z. B. eine positives und ein negatives Ergebnis) oder wenn eine der durchgeführten Prüfungen nicht berücksichtigt werden kann, sollte eine dritte Prüfung durchgeführt werden.

Messung der Luminiszenz

33. Die Luminiszenz wird im Bereich von 300-650 nm mit einem Injektionsluminometer und einer Software zur Steuerung des Injektionsvolumens und des Messintervalls gemessen (7). Die Lichtemission der einzelnen Wells wird in RLU pro Well angegeben.

ANALYSE DER DATEN

Bestimmung von EC₅₀ /IC₅₀

34. Aus den Konzentrations-Reaktions-Daten werden der EC₅₀-Wert (die Hälfte der maximalen Wirkungskonzentration einer Prüfchemikalie [Agonisten]) und der IC₅₀-Wert (die Hälfte der maximalen Hemmkonzentration einer Prüfchemikalie [Antagonisten]) bestimmt. Bei Prüfchemikalien, die in einer oder mehreren Konzentrationen positiv bewertet wurden, wird die Konzentration, die die Hälfte der maximalen Wirkung auslöst, (IC₅₀ bzw. EC₅₀) mit einer Hill-Funktion oder mit einer geeigneten alternativen Funktion berechnet. Die Hill-Funktion ist ein logistisches mathematisches Modell mit vier Parametern, bei dem die Konzentration einer Prüfchemikalie mit der folgenden Formel in Bezug zu einer Wirkung (die gewöhnlich einer Sigmoidkurve folgt) gesetzt wird:

$$Y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{1 + 10^{(lgEC_{50} - X)Hill\ Slope}}$$

Dabei gilt:

Y = Wirkung (d. h. RLU-Werte),

X = Logarithmus der Konzentration,

Bottom = Mindestwirkung,

Top = maximale Wirkung,

lg EC₅₀ (bzw. lg IC₅₀) = Logarithmus von X als Mittelwert der Mindestwirkung und der maximalen Wirkung und

Hillslope = Steilheit der Kurve.

Mit dem Modell wird die beste Anpassung (best fit) für die Parameter Top, Bottom, Hillslope, und IC₅₀ und EC₅₀ ermittelt. Für die Berechnung der EC₅₀- und der IC₅₀-Werte sollte eine geeignete Statistik-Software verwendet werden (z. B. Graphpad Prism^R).

Bestimmung von Ausreißern

35. Eine fundierte statistische Bewertung könnte (u. a.) durch die Einbeziehung des Q-Tests (siehe Protokolle zum Agonisten- und zum Antagonisten-Assay (7)) zur Ermittlung nicht verwendbarer und aus der Datenanalyse auszuschließender Wells erleichtert werden.
36. Beim E2-Referenzstandard (zwei Proben) werden alle angepassten RLU-Werte eines Replikat-Wells bei einer bestimmten E2-Konzentration als Ausreißer betrachtet, bei denen

der Wert mehr als 20 % über oder unter dem angepassten RLU-Wert dieser Konzentration in der Datenbank der historischen Daten liegt.

Erfassung und Anpassung von Luminometer-Daten für die Dosisfindungsstudie

37. Die Rohdaten des Luminometers werden in ein Tabellenformular für den Assay übertragen. Dabei sollte geprüft werden, ob die Daten auszuschließende Ausreißer beinhalten (siehe Akzeptanzkriterien der Prüfung in Bezug auf die in den Analysen ermittelten Parameter). Folgende Berechnungen sind durchzuführen:

Agonisten:

- Schritt 1 Der Mittelwert der DMSO-Vehikelkontrolle (VK) wird berechnet.
- Schritt 2 Der Mittelwert der DMSO-VK wird vom Wert jedes einzelnen Wells abgezogen, um die Daten zu normalisieren.
- Schritt 3 Für den Referenzstandard (E2) wird die mittlere n-fache Induktion ermittelt.
- Schritt 4 Für die Prüfchemikalien wird der mittlere EC₅₀-Wert ermittelt.

Antagonisten:

- Schritt 1 Der Mittelwert der DMSO-VK wird berechnet.
- Schritt 2 Der Mittelwert der DMSO-VK wird vom Wert jedes einzelnen Wells abgezogen, um die Daten zu normalisieren.
- Schritt 3 Für den Referenzstandard (E2) wird die mittlere n-fache Reduktion ermittelt.
- Schritt 4 Der Mittelwert des E2-Referenzstandards wird berechnet.
- Schritt 5 Für die Prüfchemikalien wird der mittlere IC₅₀-Wert ermittelt.

Erfassung und Anpassung von Luminometer-Daten für Hauptversuche

38. Die Rohdaten des Luminometers werden in ein Tabellenformular für den Assay übertragen. Dabei sollte geprüft werden, ob die Daten auszuschließende Ausreißer beinhalten (siehe Akzeptanzkriterien der Prüfung in Bezug auf die in den Analysen ermittelten Parameter). Folgende Berechnungen sind durchzuführen:

Agonisten:

- Schritt 1 Der Mittelwert der DMSO-VK wird berechnet.
- Schritt 2 Der Mittelwert der DMSO-VK wird vom Wert jedes einzelnen Wells abgezogen, um die Daten zu normalisieren.
- Schritt 3 Für den Referenzstandard (E2) wird die mittlere n-fache Induktion ermittelt.
- Schritt 4 Für die Prüfchemikalien wird der mittlere EC₅₀-Wert ermittelt.
- Schritt 5 Für Methoxychlor wird der mittlere angepasste RLU-Wert berechnet.

Antagonisten:

- Schritt 1 Der Mittelwert der DMSO-VK wird berechnet.
- Schritt 2 Der Mittelwert der DMSO-VK wird vom Wert jedes einzelnen Wells abgezogen,

um die Daten zu normalisieren.

Schritt 3 Für den Referenzstandard (Ral/E2) wird die mittlere n-fache Induktion ermittelt.

Schritt 4 Für Ral/E2 und für die Prüfchemikalien wird der mittlere IC₅₀-Wert ermittelt.

Schritt 5 Für Tamoxifen wird der mittlere angepasste RLU-Wert berechnet.

Schritt 6 Der Mittelwert des E2-Referenzstandards wird berechnet.

Kriterien für die Auswertung von Daten

39. Der VM7Luc-ER-TA-Assay soll im Rahmen einer Beweiskraftermittlung die Priorisierung von Stoffen für die *In-vivo*-Prüfung von ED unterstützen. In diesem Verfahren werden die Prüfchemikalien hinsichtlich der Aktivität von ER-Agonisten oder -Antagonisten als positiv oder negativ eingestuft. Die Kriterien für die Einstufung als positiv oder negativ in der Studie zur Validierung des VM7Luc-ER-TA-Assays werden in Tabelle 1 beschrieben:

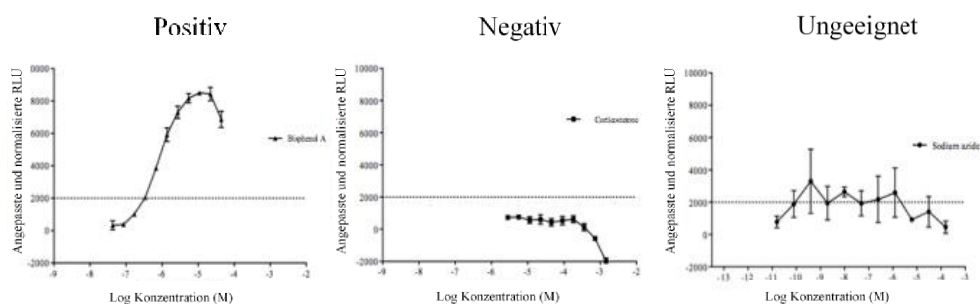
Tabelle 1: Kriterien für die Einstufung als positiv oder als negativ

AGONISTEN-AKTIVITÄT	
Positiv	- Bei allen hinsichtlich der ER-Agonisten-Aktivität als <i>positiv</i> eingestuften Prüfchemikalien sollte die Konzentrations-Reaktions-Kurve eine Basislinie gefolgt von einer positiven Steigung aufweisen und in einem Plateau oder einem Peak schließen. Manchmal sind vielleicht nur zwei dieser Merkmale (Basislinie – positive Steigung oder positive Steigung – Peak) ausgeprägt. - Der Kurvenverlauf im Bereich der positiven Steigung sollte mindestens drei Punkte mit einander nicht überschneidenden Fehlerbalken enthalten (Mittelwert $\pm$ SD). Die Punkte auf der Basislinie werden nicht berücksichtigt. Der lineare Verlauf der Kurve kann jedoch den Peak oder den ersten Punkt des Plateaus beinhalten. - Eine Einstufung als positiv setzt eine bestimmte Reaktionsamplitude voraus, d. h. eine Differenz zwischen Basislinie und Peak von mindestens 20 % des maximalen Wertes beim Referenzstandard E2 (mindestens 2000 RLU, wenn der maximale Reaktionswert der Referenzstandards [E2] auf 10 000 RLU angepasst wurde). - Nach Möglichkeit sollte für jede positiv eingestufte Prüfchemikalie ein EC₅₀-Wert berechnet werden.
Negativ	Der mittlere angepasste RLU-Wert einer bestimmten Konzentration entspricht höchstens dem mittleren RLU-Wert der DMSO-Kontrolle zuzüglich der 3-fachen Standardabweichung des DMSO-RLU-Werts.
Ungeeignet	Daten, die aufgrund erheblicher qualitativer oder quantitativer Einschränkungen nicht als gültig zum Nachweis des Vorliegens oder des Fehlens einer Aktivität akzeptiert werden können, sind als ungeeignet zu betrachten und können für die Entscheidung, ob eine Prüfchemikalie als positiv oder als negativ einzustufen ist, nicht herangezogen werden. In diesen Fällen sollten die betreffenden Chemikalien nochmals geprüft werden.

ANTAGONISTEN-AKTIVITÄT	
Positiv	- Die Prüfchemikalie ergibt eine Konzentrations-Reaktions-Kurve bestehend aus einer Basislinie mit anschließender negativer Steigung. - Der Kurvenverlauf im Bereich der negativen Steigung sollte mindestens drei Punkte mit einander nicht überschneidenden Fehlerbalken enthalten. Die Punkte auf der Basislinie werden nicht berücksichtigt. Der lineare Bereich der Kurve kann jedoch den ersten Punkt des Plateaus enthalten. - Die Aktivität des Werts der maximalen Reaktion beim Referenzstandard Ral/E2 sollte um mindestens 20 % reduziert werden (d. h. auf höchstens 8000 RLU, wenn der Wert der maximalen Reaktion des Referenzstandards [Ral/E2] auf 10 000 RLU angepasst wurde). - Die höchsten nicht zytotoxischen Konzentrationen der Prüfchemikalie sollten höchstens 1×10^{-5} M betragen. - Nach Möglichkeit sollte für jede positiv eingestufte Prüfchemikalie ein IC_{50}-Wert berechnet werden.
Negativ	Alle Datenpunkte liegen bei Konzentrationen unter $1,0 \times 10^{-5}$ M über dem ED_{80} -Wert (80 % der E2-Rektion oder 8000 RLU).
Ungeeignet	Daten, die aufgrund erheblicher qualitativer oder quantitativer Einschränkungen nicht als gültig zum Nachweis des Vorliegens oder des Fehlens einer Aktivität akzeptiert werden können, sind als ungeeignet zu betrachten und können für die Entscheidung, ob eine Prüfchemikalie als positiv oder als negativ einzustufen ist, nicht herangezogen werden. In diesen Fällen sollten die betreffenden Chemikalien nochmals geprüft werden.

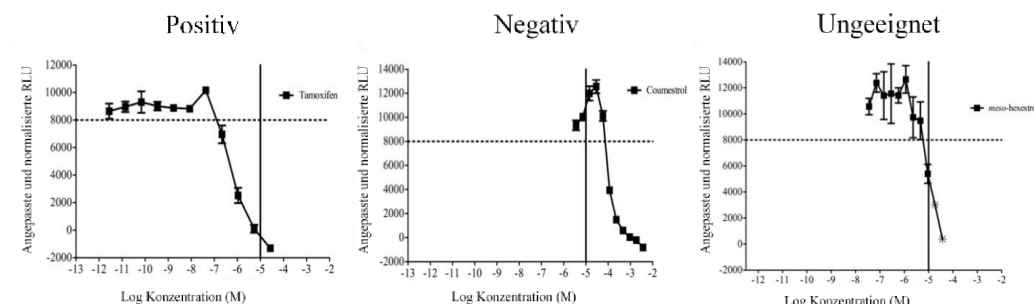
40. Positive Ergebnisse werden möglichst sowohl durch die Größenordnung der Wirkung als auch durch die Konzentration beschrieben, bei der die Wirkung eintritt. Den Abbildungen 5 und 6 sind Beispiele für als positiv, negativ und nicht geeignet zu bewertende Daten zu entnehmen.

Abbildung 5: Beispiele Agonisten: Als positiv, negativ und nicht geeignet zu bewertende Daten



Die gestrichelte Linie bezeichnet 20 % der E2-Reaktion, 2000 angepasste und normalisierte RLU-Werte.

Abbildung 6: Beispiele Antagonisten: Als positiv, negativ und nicht geeignet zu bewertende Daten



Die gestrichelte Linie bezeichnet 80 % der Ral/E2-Reaktion, 8000 angepasste und normalisierte RLU-Werte.

Die durchgehende Linie bezeichnet die Konzentration $1,00 \times 10^{-5}$ M. Eine als positiv einzustufende Reaktion sollte bei Konzentrationen unter $1,00 \times 10^{-5}$ M unter der 8000-RLU-Linie liegen.

Bei mit einem Sternchen gekennzeichneten Konzentrationen im meso-Hexestrol-Diagramm liegt die Viabilität bei mindestens 2.

Die Prüfergebnisse für meso-Hexestrol werden als nicht geeignete Daten betrachtet, da die einzige Reaktion unter 8000 RLU bei einer Konzentration von $1,00 \times 10^{-5}$ M erfolgt.

41. Die Berechnung der EC_{50} - und der IC_{50} -Werte kann mit einer Hill-Funktion mit vier Parametern vorgenommen werden (siehe Protokolle zu Agonisten- und Antagonisten-Assays (7)). Die Erfüllung der Akzeptanzkriterien deutet darauf hin, dass das System ordnungsgemäß funktioniert. Dies gewährleistet jedoch nicht, dass ein bestimmter Prüflauf tatsächlich exakte Daten ergibt. Die Wiederholung der Ergebnisse des ersten Prüflaufs ist die beste Bestätigung dafür, dass exakte Daten ermittelt wurden (siehe Nummer 19 im Abschnitt „ELEMENTE DES ER-TA-ASSAYS“).

PRÜFBERICHT

42. Siehe Nummer 20 im Abschnitt „ELEMENTE DES ER-TA-ASSAYS“.

LITERATUR

- (93) 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.
- (94) 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.
- (95) 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.
- (96) 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.
- (97) Balls M., *et al.* (2006). The Importance of Good Cell Culture Practice (GCCP), *ALTEX*, 23(Suppl): S 270-273.
- (98) Coecke, S., u. a. (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.
- (99) 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.
- (100) 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.
- (101) Escande, A., u. a. (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol.*, 71(10):1459-1469.
- (102) 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):646-657.

- (103) (11) Kuiper, G.G, u. a. (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, *Endocrinology*,139(10):4252-4263.
- (104) Geisinger u. a. (1989). Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, *Cancer* 63, 280-288.
- (105) Baldwin u. a. (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.
- (106) Li, Y., u. a. (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.
- (107) Rogers, , J.M. und Denison, M.S. (2000). Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors:development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenicand anti-estrogenic chemicals, *In Vitro & Molec. Toxicol.* 13, 67-82.

ANLAGE 4

ASSAY ZUR TRANSAKTIVIERUNG DES STABIL TRANSFIZIERTEN HUMANEN ÖSTROGENREZEPTORS α ZUM NACHWEIS DER WIRKUNG VON CHEMIKALIEN AUF ÖSTROGEN-AGONISTEN UND -ANTAGONISTEN MIT DER ER α -CALUX-ZELLINIE

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN UND BEGRENZUNGEN (SIEHE AUCH ALLGEMEINE EINLEITUNG)

1. Beim ER α -CALUX-Transaktivierungs-Assay wird die humane U2OS-Zelllinie zum Nachweis einer durch den humanen Östrogenrezeptor α (hER α) vermittelten Östrogen-Agonisten- und -Antagonisten-Aktivität verwendet. In der Studie zur Validierung des ER α -CALUX-Bioassays mit stabil transfiziertem ER α durch BioDetection Systems BV (Amsterdam, Niederlande) wurden die Relevanz und die Zuverlässigkeit des Assays für den vorgesehenen Zweck nachgewiesen (1). Die ER α -CALUX-Zelllinie exprimiert ausschließlich den humanen ER α (2) (3),
2. Dieser Assay wurde speziell zum Nachweis von hER α und einer durch hER α vermittelten Transaktivierung anhand einer Messung der Biolumineszenz als Endpunkt entwickelt. In Anbetracht des hohen Signal-Rausch-Verhältnisses ist bei Bioassays die Berücksichtigung der Biolumineszenz allgemein üblich (4).
3. Bei Phytoöstrogen-Konzentrationen von mehr als 1 μ M wurde eine Überaktivierung des Luciferase-Reportergens mit der Folge einer nicht durch den Rezeptor vermittelten Lumineszenz festgestellt (5) (6) (7). Daher müssen höhere Konzentrationen von Phytoöstrogenen oder ähnlichen Verbindungen sorgfältig untersucht werden, die bei Transaktivierungs-Assays mit stabil transfiziertem ER zu einer Überaktivierung der Luciferase-Expression führen können (siehe Anlage 2).
4. Vor der Verwendung dieses Assays für rechtliche Zwecke sollten die Abschnitte „ALLGEMEINE EINLEITUNG“ und „ELEMENTE DES ER-TA-ASSAYS“ gelesen werden. Die in der vorliegenden Prüfmethode verwendeten Begriffe und Abkürzungen werden in Anlage 1 erläutert.

PRINZIP DES ASSAYS (SIEHE AUCH ALLGEMEINE EINLEITUNG)

5. Mit dem Bioassay werden ER-Liganden-Bindungen nach einer Translokation des Rezeptor-Liganden-Komplexes an den Zellkern bewertet. Im Zellkern bindet der Rezeptor-Liganden-Komplex spezifische DNA-Response-Elemente und transaktiviert ein Leuchtkäfer-Luciferase-Reporter-Gen. Dies führt zu einer verstärkten zellulären Expression des Luciferase-Enzyms. Nach der Zugabe des Luciferase-Substrats Luciferin wird das Luciferin in ein biolumineszierendes Produkt umgewandelt. Das emittierte Licht kann mit einem Luminometer leicht erkannt und gemessen werden.

6. Für das Prüfsystem werden stabil transfizierte ER α -CALUX-Zellen verwendet. Die ER α -CALUX-Zellen stammen aus der humanen Osteoblasten-Osteosarkom-Zelllinie U2OS. Die humanen U2OS-Zellen wurden durch Copräzipitation mit Calciumphosphat mit 3xHRE-TATA-Luc und pSG5-neo-hER α stabil transfiziert. Die U2OS-Zelllinie wurde als am besten geeignete Responsive-Reporter-Zelllinie für Östrogen (und andere Steroidhormone) ausgewählt, da diese Zelllinie nur eine geringe bzw. keinerlei endogene Rezeptor-Aktivität entwickelte. Das Fehlen endogener Rezeptoren wurde nur mit Luciferase-Reporter-Plasmiden geprüft, bei denen nach Zugabe von Rezeptor-Liganden keine Aktivität festgestellt werden konnte. Außerdem stimulierte diese Zelllinie starke hormonvermittelte Reaktionen bei vorübergehender Zugabe verwandter Rezeptoren (2) (3) (8).
7. Die Prüfung von Chemikalien auf eine östrogene bzw. antiöstrogene Aktivität mit der ER α -CALUX-Zelllinie besteht aus einem Vorversuch mit anschließenden Hauptversuchen. Im Vorversuch werden die Löslichkeit, die Zytotoxizität und ein engerer Konzentrationsbereich von Prüfchemikalien für den Hauptversuch ermittelt. Bei den Hauptversuchen werden die engeren Konzentrationsbereiche der Prüfchemikalien zunächst mit den ER α -CALUX-Bioassays untersucht. Anschließend erfolgt die Einstufung der Prüfchemikalien aufgrund ihrer Wirkung als Agonisten oder Antagonisten.
8. Kriterien für die Auswertung der Daten werden in Nummer 59 eingehend beschrieben. Eine Prüfchemikalie wird kurz gesagt dann als Agonist eingestuft, wenn zwei aufeinander folgende Konzentrationen der Prüfchemikalie eine Reaktion induzieren, die größer oder gleich 10 % der maximalen Reaktion des Referenzstandards 17 β -Estradiol (PC₁₀) ist. Entsprechend wird eine Prüfchemikalie als Antagonist eingestuft, wenn zwei aufeinander folgende Konzentrationen der Prüfchemikalie eine Reaktion induzieren, die kleiner oder gleich 80 % der maximalen Reaktion des Referenzstandards Tamoxifen (PC₈₀) ist.

VERFAHREN

Zelllinien

9. Für den Assay sollte die stabil transfizierte U2OS-ER α -CALUX-Zelllinie verwendet werden. Die Zelllinie kann nach Maßgabe einer technischen Lizenzvereinbarung von BioDetection Systems BV, Amsterdam, Niederlande, bezogen werden.
10. Für die Prüfung sollten ausschließlich mycoplasmafreie Zellkulturen verwendet werden. Die zu verwendenden Zellchargen sollten entweder in Bezug auf Mycoplasma-Kontaminationen als negativ zertifiziert sein oder vor der Verwendung auf Mycoplasma untersucht werden. Die RT-PCR (Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion) sollte für den empfindlichen Nachweis einer Mycoplasma-Infektion verwendet werden (9).

Stabilität der Zelllinie

11. Um die Stabilität und die Integrität der CALUX-Zellen zu erhalten, sollten die Zellen in flüssigem Stickstoff (bei -80 °C) aufbewahrt werden. Nach dem Auftauen der Zellen zum Ansetzen einer neuen Kultur sollten die Zellen mindestens zweimal subkultiviert werden, bevor sie zur Bewertung der Agonisten- bzw. Antagonisten-Aktivität von Chemikalien verwendet werden. Die Subkultivierung sollte sich auf höchstens 30 Passagen beschränken.
12. Zur Überwachung der Stabilität der Zelllinie sollte die Empfindlichkeit des Systems zur Prüfung der Agonisten- bzw. Antagonisten-Wirkung anhand der EC₅₀- bzw. der IC₅₀-Werte des Referenzstandards untersucht werden. Außerdem sollten die relative Induktion der Positivkontrollprobe (PK) und der Negativkontrollprobe (NK) überwacht werden. Die Ergebnisse sollten mit den Akzeptanzkriterien des ER α -CALUX-Bioassays zur Untersuchung der Agonisten- (Tabelle 3C) bzw. der Antagonisten-Wirkung (Tabelle 4C) übereinstimmen. Die Referenzstandards sowie die Positiv- und die Negativkontrollen für Agonisten und Antagonisten sind in den Tabellen 1 und 2 angegeben.

Bedingungen für die Haltung der Zellkulturen und für die Plattierung

13. Die U2OS-Zellen sollten im Nährmedium (DMEM/F12 (1:1) mit Phenolrot als pH-Indikator ergänzt um fetales Rinderserum (7,5 %), nicht essentielle Aminosäuren (1%), 10 Einheiten/ml Penicillin, Streptomycin und Geneticin (G-418) als Selektionsmarker) kultiviert werden. Anschließend werden die Zellen bei 37 °C und 100 % Luftfeuchtigkeit in einem CO₂-Inkubator (5 % CO₂) inkubiert. Wenn die Zellen eine Konfluenz von 85-95 % erreicht haben, werden sie entweder subkultiviert oder zum Überimpfen in 96-Well-Mikrotiterplatten vorbereitet. Im letztgenannten Fall sind 1x10⁵ Zellen/ml im östrogenfreien Assay-Medium (DMEM/F12 (1:1) (ohne Phenolrot und ergänzt um mit dextranbeschichteter Aktivkohle behandeltes fetales Rinderserum (5 % v/v), nicht essentielle Aminosäuren (1 % v/v) und 10 Einheiten/ml Penicillin und Streptomycin) neu zu suspendieren und in die Wells der 96-Well-Mikrotiterplatten (100 µl homogenisierte Zellsuspension) zu plattieren. Vor der Exposition werden die Zellen 24 Stunden in einem CO₂-Inkubator (5 % CO₂, 37 °C, 100 % Luftfeuchtigkeit) vorinkubiert. Verwendetes Kunststoffmaterial muss östrogenfrei sein.

Akzeptanzkriterien

14. Die Agonisten- und die Antagonisten-Aktivität der Prüfchemikalie(n) werden in Prüfreihe untersucht. Eine Prüfreihe umfasst höchstens 6 Mikrotiterplatten. Jede Prüfreihe beinhaltet mindestens eine vollständige Verdünnungsreihe eines Referenzstandards, eine Positivkontrollprobe, eine Negativkontrollprobe und Lösungsmittelkontrollen. In den Abbildungen 1 und 2 ist die Anordnung auf den Platten für Prüfreihe zur Ermittlung der Agonisten- bzw. Antagonisten-Aktivität dargestellt.
15. Jede Verdünnung der Referenzstandards, der Prüfchemikalien und aller Lösungsmittelkontrollen sowie alle Positiv- und alle Negativkontrollen sollten jeweils

dreimal untersucht werden. Jede der drei Untersuchungen sollte die in den Tabellen 3A und 4A genannten Anforderungen erfüllen.

16. Bei allen Prüfreihe wird jeweils auf der ersten Platte eine vollständige Verdünnungsreihe des Referenzstandards (17 β -Estradiol für Agonisten und Tamoxifen für Antagonisten) gemessen. Um die Ergebnisse der Untersuchungen der übrigen 5 Mikrotiterplatten mit den Ergebnissen der ersten Mikrotiterplatte mit der vollständigen Konzentrations-Reaktions-Kurve des Referenzstandards vergleichen zu können, sollten alle Platten 3 Kontrollproben enthalten: die Lösungsmittelkontrolle, die höchste geprüfte Konzentration des Referenzstandards und die ungefähre EC₅₀- (Agonisten) bzw. IC₅₀-Konzentration (Antagonisten) des Referenzstandards. Das Verhältnis der durchschnittlichen Kontrollproben auf der ersten Platte und den übrigen 5 Platten sollte die Anforderungen in Tabelle 3C (Agonisten) bzw. in Tabelle 4C (Antagonisten) erfüllen.
17. Für jede der Mikrotiterplatten einer Prüfreihe wird der z-Faktor berechnet (10). Die Berechnung des z-Faktors ist anhand der Reaktionen bei der höchsten und bei der niedrigsten Konzentration des Referenzstandards vorzunehmen. Eine Mikrotiterplatte ist dann gültig, wenn sie die Anforderungen in Tabelle 3C (Agonisten) bzw. in Tabelle 4C (Antagonisten) erfüllt.
18. Die Dosis-Reaktions-Kurve des Referenzstandards muss sigmoidal verlaufen. Die aus der Reaktion der Verdünnungsreihe des Referenzstandards abgeleiteten EC₅₀- bzw. IC₅₀-Werte sollten die Anforderungen in Tabelle 3C (Agonisten) bzw. Tabelle 4C (Antagonisten) erfüllen.
19. Jede Prüfreihe sollte mindestens eine Positivkontrollprobe und eine Negativkontrollprobe enthalten. Die berechnete relative Induktion der Positiv- und der Negativkontrollprobe sollte die Anforderungen in Tabelle 3C (Agonisten) bzw. in Tabelle 4C (Antagonisten) erfüllen.
20. Bei allen Messungen wird der Induktionsfaktor der höchsten Konzentration des Referenzstandards gemessen, indem der höchste mittlere RLU-Wert des 17 β -Estradiol-Referenzstandards durch den mittleren RLU-Wert der Referenz-Lösungsmittelkontrolle geteilt wird. Dieser Induktionsfaktor sollte die Mindestanforderungen für die n-fache Induktion in Tabelle 3C (Agonisten) bzw. in Tabelle 4C (Antagonisten) erfüllen.
21. Nur Mikrotiterplatten, die alle oben genannten Akzeptanzkriterien erfüllen, werden als gültig betrachtet und können zur Bewertung der Reaktion der Prüfchemikalien berücksichtigt werden.
22. Die Akzeptanzkriterien gelten sowohl für Vorversuche als auch für die Hauptversuche.

Tabelle 1: Konzentrationen des Referenzstandards, der Positivkontrolle (PK) und der Negativkontrolle (NK) beim CALUX-Antagonisten-Bioassay

	Stoff	CAS-Nr.	Prüfbereich (M)
Referenzstandard	17 β -Estradiol	50-28-2	1,0*10 ⁻¹³ - 1,0*10 ⁻¹⁰
Positivkontrolle (PK)	17 α -Methyltestosteron	58-18-4	3,0*10 ⁻⁰⁶
Negativkontrolle (NK)	Corticosteron	50-22-6	1,0*10 ⁻⁰⁸

Tabelle 2: Konzentrationen des Referenzstandards, der Positivkontrolle (PK) und der Negativkontrolle (NK) beim CALUX-Agonisten-Bioassay

	Stoff	CAS-Nr.	Prüfbereich (M)
Referenzstandard	Tamoxifen	10540-29-1	3,0*10 ⁻⁰⁹ - 1,0*10 ⁻⁵
Positivkontrolle (PK)	4-Hydroxytamoxifen	68047-06-3	1,0*10 ⁻⁹
Negativkontrolle (NK)	Resveratrol	501-36-0	1,0*10 ⁻⁵

Tabelle 3: Akzeptanzkriterien des ER α -CALUX-Agonisten-Bioassays

A – einzelne Proben auf einer Platte		Kriterium
1	Maximale %SD bei 3 Wells (NK und PK sowie alle Verdünnungen der Prüfchemikalie und des Referenzstandards außer C0)	< 15 %
2	Maximale %SD bei 3 Wells (Referenzstandard und Lösungsmittelkontrollen der Prüfchemikalie (C0, SC))	< 30 %
3	Maximale LDH-Freisetzung als Maß der Zytotoxizität	< 120 %
B – innerhalb einer einzelnen Mikrotiterplatte		
4	Verhältnis der Lösungsmittelkontrolle des Referenzstandards (C0, Platte 1) und der Lösungsmittelkontrolle der Prüfchemikalie (SC, Platten 2 bis x)	0,5 bis 2,0
5	Verhältnis zwischen der ungefähren EC ₅₀ und den höchsten Konzentrationen des Referenzstandards auf Platte 1 und der ungefähren EC ₅₀ und den höchsten Konzentrationen des Referenzstandards auf den Platten 2 bis x (C4, C8)	0,70 bis 1,30
6	z-Faktor der einzelnen Platten	> 0,6

C – innerhalb einer Untersuchungsreihe (alle Platten einer Reihe)

7	Sigmoidkurve des Referenzstandards	Ja (17 β -Estradiol)
8	EC50-Bereich des Referenzstandards 17 β -Estradiol	4*10 ⁻¹² – 4*10 ⁻¹¹ M
9	Geringste n-fache Induktion der höchsten 17 β -Estradiol-Konzentration bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle des Referenzstandards	5
10	Relative Induktion (%) PK	> 30 %
11	Relative Induktion (%) NK	< 10 %

PK: Positivkontrolle; NK: Negativkontrolle; SC: Lösungsmittelkontrolle der Prüfchemikalie; C0: Lösungsmittelkontrolle des Referenzstandards; SD: Standardabweichung; LDH: Laktatdehydrogenase

Tabelle 4: Akzeptanzkriterien des ER α -CALUX-Antagonisten-Bioassays

A – einzelne Proben auf einer Platte		Kriterium
1	Maximale %SD bei 3 Wells (NK und PK sowie alle Verdünnungen der Prüfchemikalie und des Referenzstandards, Lösungsmittelkontrolle (C0))	< 15 %
2	Maximale %SD bei 3 Wells (Vehikelkontrolle (VK) und höchste Konzentration des Referenzstandards (C8))	< 30 %
3	Maximale LDH-Freisetzung als Maß der Zytotoxizität	< 120 %
B – innerhalb einer einzelnen Mikrotiterplatte		
4	Verhältnis der Lösungsmittelkontrolle des Referenzstandards (C0, Platte 1) und der Lösungsmittelkontrolle der Prüfchemikalie (SC, Platten 2 bis x)	0,70 bis 1,30
5	Verhältnis zwischen der ungefähren IC ₅₀ -Konzentrationen des Referenzstandards auf Platte 1 und den ungefähren IC ₅₀ -Konzentrationen des Referenzstandards auf den Platten 2 bis x (C8)	0,70 bis 1,30
6	Verhältnis der höchsten Konzentrationen des Referenzstandards auf Platte 1 und den höchsten Konzentrationen des Referenzstandards auf den Platten 2 bis x (C8)	0,50 bis 2,0
7	z-Faktor der einzelnen Platten	> 0,6

C – innerhalb einer Untersuchungsreihe (alle Platten einer Reihe)

8	Sigmoidkurve des Referenzstandards	Ja (Tamoxifen)
9	IC ₅₀ -Bereich des Referenzstandards (Tamoxifen)	1*10 ⁻⁸ - 1*10 ⁻⁷ M
10	Niedrigste n-fache Induktion der Lösungsmittelkontrolle des Referenzstandards in Bezug auf die höchste Tamoxifen-Konzentration	2,5
11	Relative Induktion (%) PK	< 70%
12	Relative Induktion (%) NK	< 85 %

PK: Positivkontrolle; NK: Negativkontrolle; VK: Vehikelkontrolle (Lösungsmittelkontrolle ohne feste Konzentration des Agonisten-Referenzstandards); SC: Lösungsmittelkontrolle der Prüfchemikalie; C0: Lösungsmittelkontrolle des Referenzstandards; SD: Standardabweichung; LDH: Laktatdehydrogenase

Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle, Referenzstandards, Positivkontrollen, Negativkontrollen

23. Sowohl für den Vorversuch als auch für die Hauptversuche sollten die gleichen Lösungsmittel-/Vehikelkontrollen, Referenzstandards, Positivkontrollen und Negativkontrollen verwendet werden. Außerdem sollte die Konzentration von Referenzstandards, Positivkontrollen und Negativkontrollen identisch sein.

Lösungsmittelkontrolle

24. Das zur Auflösung einer Prüfchemikalie verwendete Lösungsmittel sollte als Lösungsmittelkontrolle geprüft werden. Bei der Validierung des ER α -CALUX-Bioassays wurde Dimethylsulfoxid (DMSO, 1 % (v/v); CASRN 67-68-5) als Vehikel verwendet. Wenn ein anderes Vehikel als DMSO verwendet wird, sollten alle Referenzstandards, Kontrollen und Prüfchemikalien mit diesem Vehikel geprüft werden. Dabei ist zu beachten, dass die Lösungsmittelkontrolle bei den Agonisten-Untersuchungen den Agonisten-Referenzstandard 17 β -Estradiol in einer bestimmten Konzentration (etwa EC₅₀) enthält. Zur Untersuchung des bei Antagonisten-Assays zu verwendenden Lösungsmittels sollte eine Vehikelkontrolle zubereitet und geprüft werden.

Vehikelkontrolle (Antagonisten)

25. Dabei ist zu beachten, dass zum Assay-Medium der Agonisten-Referenzstandard 17 β -Estradiol in einer bestimmten Konzentration (etwa EC₅₀) hinzugegeben wurde. Um das zur Lösung der Prüfchemikalien für Antagonisten zu verwendende Lösungsmittel zu prüfen, ist ein Assay-Medium ohne bestimmte Konzentration des Agonisten-Referenzstandards 17 β -Estradiol zuzubereiten. Diese Kontrollprobe wird als Vehikelkontrolle bezeichnet. Bei der Validierung des ER α -CALUX-Bioassays wurde Dimethylsulfoxid (DMSO, 1 % (v/v);

CASRN 67-68-5) als Vehikel verwendet. Wenn ein anderes Vehikel als DMSO verwendet wird, sollten alle Referenzstandards, Kontrollen und Prüfchemikalien mit diesem Vehikel geprüft werden.

Referenzstandards

26. Der Referenzstandard für Agonisten ist 17 β -Estradiol (Tabelle 1). Die Referenzstandards umfassen eine Verdünnungsreihe mit 17 β -Estradiol in acht Konzentrationen ($1,0 \cdot 10^{-13}$, $3,0 \cdot 10^{-13}$, $1,0 \cdot 10^{-12}$, $3,0 \cdot 10^{-12}$, $6,0 \cdot 10^{-12}$, $1,0 \cdot 10^{-11}$, $3,0 \cdot 10^{-11}$ und $1,0 \cdot 10^{-10}$ M).
27. Der Referenzstandard für Antagonisten ist Tamoxifen (Tabelle 2). Die Referenzstandards umfassen eine Verdünnungsreihe mit Tamoxifen in acht Konzentrationen ($3,0 \cdot 10^{-9}$, $1,0 \cdot 10^{-8}$, $3,0 \cdot 10^{-8}$, $1,0 \cdot 10^{-7}$, $3,0 \cdot 10^{-7}$, $1,0 \cdot 10^{-6}$, $3,0 \cdot 10^{-6}$ und $1,0 \cdot 10^{-5}$ M). Jede der Konzentrationen des Antagonisten-Referenzstandards wird parallel mit einer bestimmten Konzentration des Agonisten-Referenzstandards 17 β -Estradiol ($3,0 \cdot 10^{-12}$ M) inkubiert.

Positivkontrolle

28. Als Positivkontrolle für Agonisten-Assays wird 17 α -Methyltestosteron verwendet (Tabelle 1).
29. Die Positivkontrolle für Antagonisten-Assays besteht aus 4-Hydroxytamoxifen (Tabelle 2). Die Antagonisten-Positivkontrolle wird parallel mit einer bestimmten Konzentration des Agonisten-Referenzstandards 17 β -Estradiol ($3,0 \cdot 10^{-12}$ M) inkubiert.

Negativkontrolle

30. Als Negativkontrolle für Agonisten-Assays wird Corticosteron verwendet (Tabelle 1).
31. Die Negativkontrolle für Antagonisten-Assays besteht aus Resveratrol (Tabelle 2). Die Antagonisten-Negativkontrolle wird parallel mit einer bestimmten Konzentration des Agonisten-Referenzstandards 17 β -Estradiol ($3,0 \cdot 10^{-12}$ M) inkubiert.

Zum Nachweis der Eignung des Labors siehe Nummer 14 und Tabellen 3 und 4 im Abschnitt „ELEMENTE DES ER-TA-ASSAYS“ bei dieser Prüfmethode.

Vehikel

32. Das Vehikel zur Lösung von Prüfchemikalien sollte die Prüfchemikalien vollständig auflösen und sich mit dem Zellmedium mischen. Geeignete Lösungsmittel sind DMSO, Wasser und Ethanol (mit einer Reinheit 95-100 %). Wenn DMSO als Lösungsmittel verwendet wird, sollte die maximale DMSO-Konzentration nicht mehr als 1 % (v/v) betragen. Vor der Verwendung sollte in einer Prüfung sichergestellt werden, dass das Lösungsmittel nicht zytotoxisch wirkt und die Durchführung des Assays nicht beeinflusst.

Zubereitung der Referenzstandards, Positivkontrollen, Negativkontrollen und Prüfchemikalien

33. Referenzstandards, Positivkontrollen, Negativkontrollen und Prüfchemikalien werden in 100 % DMSO (oder einem sonstigen geeigneten Lösungsmittel) gelöst. Anschließend werden von diesem Lösungsmittel geeignete (serielle) Verdünnungen zubereitet. Vor der Lösung sollten sich alle Stoffe an die Raumtemperatur anpassen können. Frisch zubereitete Vorratslösungen der Referenzstandards, der Positivkontrollen, der Negativkontrollen und der Prüfchemikalien sollten keine erkennbaren Niederschläge oder Trübungen aufweisen. Vorräte des Referenzstandards und der Kontrollen können in größeren Mengen zubereitet werden. Vorratslösungen der Prüfchemikalien sollten für jeden Versuch frisch zubereitet werden. Endverdünnungen von Referenzstandards, Positivkontrollen, Negativkontrollen und Prüfchemikalien sollten für jeden Versuch frisch zubereitet und innerhalb von 24 Stunden nach der Zubereitung verwendet werden.

Löslichkeit, Zytotoxizität und Dosisfindung

34. Beim Vorversuch wird die Löslichkeit der Prüfchemikalien im gewählten Lösungsmittel bestimmt. Für den Versuch wird eine Vorratslösung mit einer Konzentration von maximal 0,1 M zubereitet. Bei Lösungsproblemen bei dieser Konzentration sollten Vorratslösungen mit niedrigeren Konzentrationen zubereitet werden, bis die Prüfchemikalien vollständig gelöst sind. Beim Vorversuch werden serielle Verdünnungen der Prüfchemikalie im Verhältnis 1:10 untersucht. Bei der Prüfung von Agonisten und Antagonisten liegt die maximale Assay-Konzentration bei 1 mM. Nach dem Vorversuch wird ein geeigneter angepasster Konzentrationsbereich für die Prüfchemikalien ermittelt, der dann bei den Hauptversuchen zu untersuchen ist. Für Hauptversuche sollten folgende Verdünnungen verwendet werden: 1x, 3x, 10x, 30x, 100x, 300x, 1000x und 3000x.
35. Im Protokoll des Agonisten- und des Antagonisten-Assays ist eine Zytotoxizitätsprüfung vorgesehen (11). Die Zytotoxizitätsprüfung ist Bestandteil sowohl des Vorversuchs als auch der Hauptversuche. Bei der Validierung des ER α -CALUX-Bioassays wurde die Zytotoxizität nach der Exposition gegenüber den Prüfchemikalien anhand einer Untersuchung auf freigesetzte Laktatdehydrogenase (LDH) in Verbindung mit einer qualitativen visuellen Prüfung der Zellen (siehe Anlage 4.1) bewertet. Andere quantitative Methoden zur Bestimmung der Zytotoxizität (z. B. eine auf Tetrazolium beruhende kolorimetrische (MTT-)Prüfung oder ein CALUX-Bioassay zur Zytotoxizitätsprüfung) können aber ebenfalls zur Anwendung kommen. Im Allgemeinen werden Konzentrationen von Prüfchemikalien, die die Zellviabilität um mehr als 20 % beeinträchtigen, als zytotoxisch betrachtet und können bei der Auswertung der Daten daher nicht berücksichtigt werden. Bei der Untersuchung auf freigesetztes LDH ist die jeweilige Konzentration der Prüfchemikalie dann als zytotoxisch zu betrachten, wenn der Anteil des freigesetzten LDH mehr als 120 % beträgt.

Prüfung der chemischen Exposition und Anordnung auf der Assay-Platte

36. Nach der Trypsinierung eines Fläschchens konfluenter kultivierter Zellen werden die Zellen mit einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml in einem östrogenfreien Assay-Medium resuspendiert. 100 µl resuspendierte Zellen werden in die inneren Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte resuspendiert. In die äußeren Wells werden 200 µl Phosphatpuffer (PBS) gegeben (siehe Abbildungen 1 und 2). Die plattierten Zellen werden 24 Stunden in einem CO₂-Inkubator (5 % CO₂, 37 °C, 100 % Luftfeuchtigkeit) vorinkubiert.
37. Nach der Vorinkubierung werden die Platten auf sichtbare Anzeichen von Zytotoxizität (siehe Anlage 4.1) sowie auf Kontaminationen und auf Konfluenz untersucht. Nur Platten ohne sichtbare Anzeichen für eine Zytotoxizität und für Kontaminationen sowie Platten mit einer Konfluenz von mindestens 85 % werden für die Versuche verwendet. Das Medium aus den inneren Wells wird vorsichtig entnommen und durch 200 µl östrogenfreies Assay-Medium mit geeigneten seriellen Verdünnungen von Referenzstandards, Prüfchemikalien, Positivkontrollen, Negativkontrollen und Lösungsmittelkontrollen ersetzt (Tabelle 5: Agonisten-Assays; Tabelle 6: Antagonisten-Assays). Alle Referenzstandards, Prüfchemikalien, Positivkontrollen, Negativkontrollen und Lösungsmittelkontrollen werden dreimal geprüft. In Abbildung 1 ist die Anordnung auf der Platte bei Agonisten-Assays dargestellt. Abbildung 2 ist die Anordnung auf der Platte bei Antagonisten-Assays zu entnehmen. Die Anordnung auf den Platten beim Vorversuch und beim Hauptversuch ist identisch. Bei der Untersuchung von Agonisten enthalten alle inneren Wells mit Ausnahme der Wells mit der Vehikelkontrolle (VK) auch eine bestimmte Konzentration des Agonisten-Referenzstandards 17β-Estradiol (3.0×10^{-12} M). Auf alle Platten mit der Prüfchemikalie (TC) sollten auch die Referenzstandards C8 und C4 gegeben werden.
38. Nachdem die Zellen allen Chemikalien ausgesetzt wurden, werden die 96-Well-Mikrotiterplatten weitere 24 Stunden in einem CO₂-Inkubator (5 % CO₂, 37 °C, 100 % Luftfeuchtigkeit) inkubiert.

Abbildung 1: Anordnung auf der 96-Well-Mikrotiterplatte für Vorversuche und für die endgültige Bewertung der Agonisten-Wirkung

Platte 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PK	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PK	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PK	
E		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NK:	
F		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NK:	
G		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NK:	
H												

Folgende Platten

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC ₅₀)	
F		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC ₅₀)	
G		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC ₅₀)	
H												

C0 = Lösungsmittel Referenzstandard

C(1-8) = Verdünnungsreihe (1-8, niedrige bis hohe Konzentrationen) des Referenzstandards

PK = Positivkontrolle

NK = Negativkontrolle

TCx-(1-8) = Verdünnungen (1-8, niedrige bis hohe Konzentrationen) der Prüfchemikalie für den Vorversuch und für die Bewertung der Agonisten-Wirkung der Prüfchemikalie x.

SC = Lösungsmittelkontrolle der Prüfchemikalie (möglichst desselben Lösungsmittels wie bei C0, wobei dies aber aus einer anderen Charge stammen kann)

Graue Zellen: = Äußere Wells, aufgefüllt mit 200 µl PBS

Abbildung 2: Anordnung auf der 96-Well-Mikrotiterplatte für Vor- und Hauptversuche zur Bewertung der Antagonisten-Wirkung

Platte 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VK	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VK	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VK	
E		NK:	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PK	
F		NK:	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-		
G		NK:	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PK	
H												

Folgende Platten

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		SC	TC2-1									
E		C4 (IC ₅₀)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
F		C4 (IC ₅₀)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
G		C4 (IC ₅₀)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
H												

C0 = Lösungsmittel Referenzstandard

C(1-8) = Verdünnungsreihe (1-8, niedrige bis hohe Konzentrationen) des Referenzstandards

NK = Negativkontrolle

- PK = Positivkontrolle
- TCx-(1-8) = Verdünnungen (1-8, niedrige bis hohe Konzentrationen) der Prüfchemikalie für den Vorversuch und für die Bewertung der Agonisten-Wirkung der Prüfchemikalie x.
- SC = Lösungsmittelkontrolle der Prüfchemikalie (möglichst desselben Lösungsmittels wie bei C0, wobei dies aber aus einer anderen Charge stammen kann)
- VK = Vehikelkontrolle (Lösungsmittelkontrolle ohne feste Konzentration des Agonisten-Referenzstandards 17 β -Estradiol).
- Graue Zellen: = Äußere Wells, aufgefüllt mit 200 μ l PBS
- Hinweis: Die inneren Wells mit Ausnahme der Wells mit der Vehikelkontrolle (VK) enthalten alle auch eine bestimmte Konzentration des Agonisten-Referenzstandards 17 β -Estradiol ($3,0 \cdot 10^{-12}$ M).

Messung der Luminiszenz

39. Die Messung der Luminiszenz wird im Protokoll zum Agonisten- und zum Antagonisten-Assay (10) eingehend beschrieben. Das Medium wird aus den Wells entnommen. Nach 24-stündiger Inkubation werden die Zellen lysiert, um die Zellmembran aufzuschließen und die Luciferase-Aktivität messen zu können.
40. Zur Messung der Luminiszenz wird für dieses Verfahren ein Luminometer mit zwei Injektoren benötigt. Die Luciferase-Reaktion wird durch Injektion des Luciferinsubstrats induziert. Durch Zugabe von 0,2 M NaOH wird die Reaktion gestoppt. Dadurch werden Luminiszenzübertragungen zwischen den Wells verhindert.
41. Das von den einzelnen Wells emittierte Licht wird in RLU (relativen Lichteinheiten) pro Well ausgedrückt.

Vorversuch

42. Anhand der Vorversuche wird ein optimierter Konzentrationsbereich der Prüfchemikalien für den Hauptversuch ermittelt. Die Auswertung der Ergebnisse des Vorversuchs und die Ermittlung des optimierten Konzentrationsbereichs der Prüfchemikalien für den Hauptversuch werden eingehend im Protokoll zum Agonisten- und zum Antagonisten-Assay (10) beschrieben. Im Folgenden werden die Verfahren zur Ermittlung des Konzentrationsbereichs der Prüfchemikalien für die Agonisten- und die Antagonisten-Prüfung beschrieben. Informationen zur Gestaltung der Verdünnungsreihen sind den Tabellen 5 und 6 zu entnehmen.

Auswahl von Konzentrationen zur Bewertung agonistischer Wirkungen

43. Im Vorversuch sollten die Prüfchemikalien mit den in den Tabellen 5 (Agonisten) und 6 (Antagonisten) genannten Verdünnungen geprüft werden. Alle Konzentrationen sind in drei Wells zu prüfen, die auf den Platten angeordnet werden, wie in Abbildung 1 (Agonisten) bzw. Abbildung 2 (Antagonisten) beschrieben.
44. Nur Untersuchungsergebnisse, die die in Tabelle 3 genannten Akzeptanzkriterien erfüllen, werden als gültig betrachtet und können zur Bewertung der Reaktion der Prüfchemikalien

berücksichtigt werden. Wenn bei einer Untersuchung eine oder mehrere Mikrotiterplatten die Akzeptanzkriterien nicht erfüllen, sollten die betreffenden Mikrotiterplatten nochmals geprüft werden. Erfüllt die erste Platte mit der vollständigen Verdünnungsreihe des Referenzstandards die Akzeptanzkriterien nicht, muss die gesamte Prüfreihe (6 Platten) neu geprüft werden.

45. In folgenden Fällen sollten die Ausgangskonzentrationsbereiche der Prüfchemikalien angepasst und der Vorversuch wiederholt werden:
- In der Prüfung wurde eine zytotoxische Wirkung festgestellt. Der Vorversuch sollte mit niedrigeren nicht zytotoxischen Konzentrationen der Prüfchemikalie wiederholt werden.
 - Im Vorversuch mit der Prüfchemikalie wurde keine vollständige Dosis-Reaktions-Kurve ermittelt, weil bei den geprüften Konzentrationen bereits die maximale Induktion erreicht wird. Der Vorversuch sollte mit niedrigeren Konzentrationen der Prüfchemikalie wiederholt werden.
46. Wenn eine gültige dosisabhängige Reaktion festgestellt wird, sollte die (niedrigste) Konzentration mit maximaler Induktion, aber ohne Anzeichen einer Zytotoxizität, gewählt werden. Die in den Hauptversuchen zu prüfende höchste Konzentration der Prüfchemikalie wird dreimal mit dieser gewählten Konzentration geprüft.
47. Beginnend mit der oben ermittelten maximalen Konzentration wird eine vollständige optimierte Verdünnungsreihe der Prüfchemikalie mit den in Tabelle 5 angegebenen Verdünnungsschritten zubereitet.
48. Prüfchemikalien, bei denen keine agonistische Wirkung festgestellt wurde, werden in den Hauptversuchen beginnend mit der im Vorversuch ermittelten maximalen nicht zytotoxischen Konzentration geprüft.

Auswahl von Konzentrationen zur Bewertung antagonistischer Wirkungen

49. Nur Untersuchungsergebnisse, die die in Tabelle 4 genannten Akzeptanzkriterien erfüllen, werden als gültig betrachtet und können zur Bewertung der Reaktion der Prüfchemikalien berücksichtigt werden. Wenn bei einer Untersuchung eine oder mehrere Mikrotiterplatten die Akzeptanzkriterien nicht erfüllen, sollten die betreffenden Mikrotiterplatten nochmals geprüft werden. Erfüllt die erste Platte mit der vollständigen Verdünnungsreihe des Referenzstandards die Akzeptanzkriterien nicht, muss die gesamte Prüfreihe (6 Platten) neu geprüft werden.
50. In folgenden Fällen sollten die Ausgangskonzentrationsbereiche der Prüfchemikalien angepasst und der Vorversuch wiederholt werden:
- In der Prüfung wurde eine zytotoxische Wirkung festgestellt. Der Vorversuch sollte mit niedrigeren nicht zytotoxischen Konzentrationen der Prüfchemikalie wiederholt werden.

- Im Vorversuch mit der Prüfchemikalie wurde keine vollständige Dosis-Reaktions-Kurve ermittelt, weil bei den geprüften Konzentrationen bereits die maximale Hemmung erreicht wird. Der Vorversuch sollte mit niedrigeren Konzentrationen der Prüfchemikalie wiederholt werden.
51. Wenn eine gültige dosisabhängige Reaktion festgestellt wird, sollte die (niedrigste) Konzentration mit maximaler Hemmung, aber ohne Anzeichen einer Zytotoxizität, gewählt werden. Die in den Hauptversuchen zu prüfende höchste Konzentration der Prüfchemikalie wird dreimal mit dieser gewählten Konzentration geprüft.
 52. Beginnend mit der oben ermittelten maximalen Konzentration wird eine vollständige optimierte Verdünnungsreihe der Prüfchemikalie mit den in Tabelle 6 angegebenen Verdünnungsschritten zubereitet.
 53. Prüfchemikalien, bei denen keine antagonistische Wirkung festgestellt wurde, werden in den Hauptversuchen beginnend mit der im Vorversuch geprüften maximalen nicht zytotoxischen Konzentration geprüft.

Hauptversuche

54. Nach der Bestimmung der optimalen Konzentrationsbereiche sollten die Prüfchemikalien mit den in den Tabellen 5 (Agonisten) und 6 (Antagonisten) genannten Verdünnungen geprüft werden. Alle Konzentrationen sind in drei Wells zu prüfen, die auf den Platten angeordnet werden, wie in Abbildung 1 (Agonisten) bzw. Abbildung 2 (Antagonisten) beschrieben.
55. Nur Untersuchungsergebnisse, die die in den Tabellen 3 und 4 genannten Akzeptanzkriterien erfüllen, werden als gültig betrachtet und können zur Bewertung der Reaktion der Prüfchemikalien berücksichtigt werden. Wenn bei einer Untersuchung eine oder mehrere Mikrotiterplatten die Akzeptanzkriterien nicht erfüllen, sollten die betreffenden Mikrotiterplatten nochmals geprüft werden. Erfüllt die erste Platte mit der vollständigen Verdünnungsreihe des Referenzstandards die Akzeptanzkriterien nicht, muss die gesamte Prüfreihe (6 Platten) neu geprüft werden.

Tabelle 5: Konzentrationen und Verdünnungen von Referenzstandards, Kontrollen und Prüfchemikalien für die Agonisten-Prüfung

Referenzstandard 17 β -Estradiol Konz. (M)		TCx – Vorversuch Verdünnung		TCx – Vorversuch Verdünnung		Kontrollen Konz. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3000 x	PK	3,0*10 ⁻⁶
C1	1,0*10 ⁻¹³	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1000 x	NC	1,0*10 ⁻⁸
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	1000 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*10 ⁻¹¹	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x		
C8	1,0*10 ⁻¹⁰						

TCx – Prüfchemikalie x

PK – Positivkontrolle (17 α -Methyltestosteron)

NK – Negativkontrolle (Corticosteron)

C0 – Lösungsmittelkontrolle Referenzstandard

SC – Lösungsmittelkontrolle Prüfchemikalie

Tabelle 6: Konzentrationen und Verdünnungen von Referenzstandards, Kontrollen und Prüfchemikalien für die Antagonisten-Prüfung

Referenzstandard Tamoxifen Konz. (M)		TCx – Vorversuch Verdünnung		TCx – Vorversuch Verdünnung		Kontrollen Konz. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3000 x	PK	1,0*10 ⁻⁹
C1	3,0*10 ⁻⁹	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1000 x	NK	1,0*10 ⁻⁵
C2	1,0*10 ⁻⁸	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	3,0*10 ⁻⁸	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	1,0*10 ⁻⁷	TCx-5	1000 x	TCx-5	30 x	Hinzugegebener Agonist Konz. (M)	
C5	3,0*10 ⁻⁷	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x		
C6	1,0*10 ⁻⁶	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x		
C7	3,0*10 ⁻⁶	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x	17 β - Estradiol	3,0*10 ⁻¹²
C8	1,0*10 ⁻⁵						

TCx – Prüfchemikalie x

PK – Positivkontrolle (4-Hydroxytamoxifen)

NK – Negativkontrolle (Resveratrol)

C0 – Lösungsmittelkontrolle Referenzstandard

SC – Lösungsmittelkontrolle Prüfchemikalie

VK – Vehikelkontrolle (enthält keine bestimmte Konzentration des Agonisten-Referenzstandards 17 β -Estradiol (3,0*10⁻¹² M))

Erfassung und Auswertung der Daten

56. Nach dem Vorversuch und dem Hauptversuch sollten EC₁₀, EC₅₀, PC₁₀, PC₅₀ und die maximale Induktion (TCx_{max}) der Prüfchemikalien für Agonisten-Prüfungen ermittelt werden. Bei Antagonisten-Prüfungen sollten IC₂₀, IC₅₀, PC₈₀, PC₅₀ und die niedrigste Induktion (TCx_{min}) berechnet werden. In den Abbildungen 3 (Agonisten) und 4 (Antagonisten) werden diese Parameter grafisch dargestellt. Die benötigten Parameter werden ausgehend von der relativen Induktion der einzelnen Prüfchemikalien (bezogen auf die maximale Induktion des Referenzstandards (= 100 %) berechnet. Zur Auswertung der Daten wird eine nicht lineare Regression (variable Steigung, 4 Parameter) mit der folgenden Formel vorgenommen.

$$Y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{(1 + 10^{((lgEC_{50} - X) * Hill\ Slope)})}$$

Dabei gilt:

X = Logarithmus der Dosis bzw. Konzentration

Y = Reaktion (relative Induktion (%))

Top = Maximale Induktion (%)

Bottom = Niedrigste Induktion (%)

LogEC₅₀ = Logarithmus der Konzentration, bei der 50 % der maximalen Reaktion beobachtet werden

Hillslope = Steigungsfaktor der Kurve

57. Die Rohdaten des Luminometers in RLU (relative Lichteinheiten) werden in die Tabelle zur Analyse der Daten der Vorversuche und der Hauptversuche übertragen. Die Rohdaten sollten die in den Tabellen 3A und 3B (Agonisten) und 4A und 4B (Antagonisten) genannten Akzeptanzkriterien erfüllen. Wenn die Rohdaten die Akzeptanzkriterien erfüllen, werden mit den folgenden Schritten die benötigten Parameter berechnet:

Agonisten

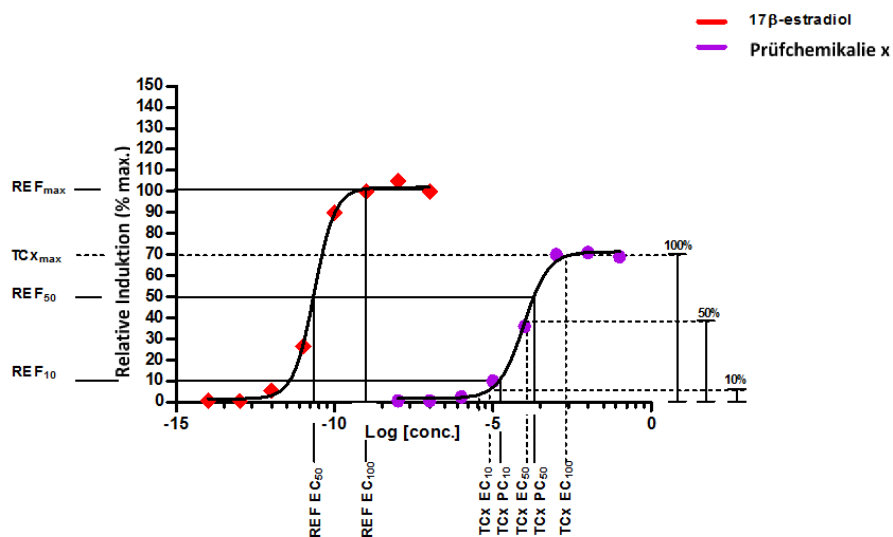
- Die durchschnittlichen RLU der Lösungsmittelkontrolle des Referenzstandards werden von den Rohdaten der Untersuchung der Referenzstandards abgezogen.
- Die durchschnittlichen RLU der Lösungsmittelkontrolle der Prüfchemikalie werden von den Rohdaten der Untersuchung der Prüfchemikalien abgezogen.
- Die relative Induktion der einzelnen Konzentrationen des Referenzstandards wird berechnet. Die Induktion der höchsten Konzentration des Referenzstandards wird als 100 % angenommen.
- Die relative Induktion der einzelnen Konzentrationen der Prüfchemikalie wird in Bezug zur höchsten Konzentration des als 100 % angenommenen Referenzstandards gesetzt.
- Die Untersuchungsergebnisse werden durch nicht lineare Regression (variable Steigung, 4 Parameter) berechnet.
- EC₅₀ und EC₁₀ des Referenzstandards werden berechnet.
- EC₅₀ und EC₁₀ der Prüfchemikalien werden berechnet.
- Die maximale relative Induktion der Prüfchemikalie (TC_{max}) wird berechnet.
- PC₁₀ und PC₅₀ der Prüfchemikalien werden berechnet.

Bei Prüfchemikalien kann infolge einer bestehenden Zytotoxizität oder aufgrund von Löslichkeitsproblemen möglicherweise nicht immer eine vollständige Dosis-Reaktions-Kurve dargestellt werden. In diesen Fällen können EC₅₀, EC₁₀ und PC₅₀ nicht bestimmt werden, und die Darstellung beschränkt sich auf PC₁₀ und TC_{max}.

Antagonisten

- Die durchschnittlichen RLU der höchsten Konzentration des Referenzstandards werden von den Rohdaten der Untersuchung der Referenzstandards abgezogen.
- Die durchschnittlichen RLU der höchsten Konzentration des Referenzstandards werden von den Rohdaten der Untersuchung der Prüfchemikalien abgezogen.
- Die relative Induktion der einzelnen Konzentrationen des Referenzstandards wird berechnet. Die Induktion der niedrigsten Konzentration des Referenzstandards wird als 100 % angenommen.
- Die relative Induktion der einzelnen Konzentrationen der Prüfchemikalie wird in Bezug zur niedrigsten Konzentration des als 100 % angenommenen Referenzstandards gesetzt.
- Die Untersuchungsergebnisse werden durch nicht lineare Regression (variable Steigung, 4 Parameter) berechnet.
- IC_{50} und IC_{20} des Referenzstandards werden berechnet.
- IC_{50} und IC_{20} der Prüfchemikalien werden berechnet.
- Die niedrigste relative Induktion der Prüfchemikalie (TC_{max}) wird berechnet.
- PC_{80} und PC_{50} der Prüfchemikalien werden berechnet.

Abbildung 3: Im Agonisten-Assay bestimmte Parameter

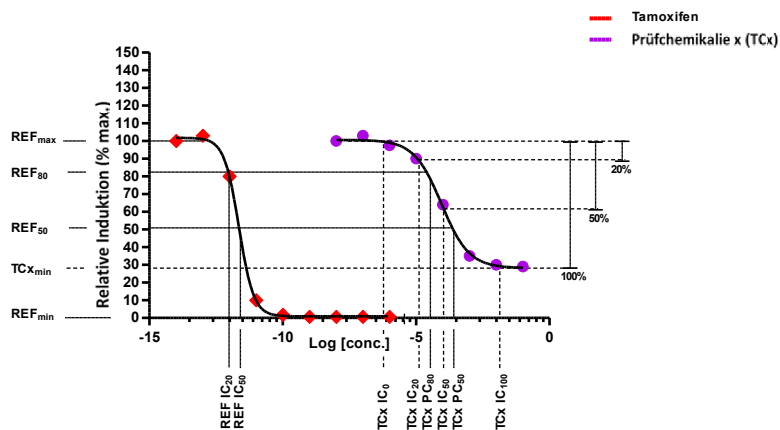


- EC_{10} = Konzentration eines Stoffs, bei der 10 % seiner maximalen Reaktion beobachtet werden
 EC_{50} = Konzentration eines Stoffs, bei der 50 % seiner maximalen Reaktion beobachtet werden
 PC_{10} = Konzentration einer Prüfchemikalie, bei der deren Reaktion EC_{10} des Referenzstandards entspricht
 PC_{50} = Konzentration einer Prüfchemikalie, bei der deren Reaktion EC_{50} des Referenzstandards

entspricht

TCx_{max} = maximale relative Induktion der Prüfchemikalie

Abbildung 4: Im Antagonisten-Assay bestimmte Parameter



IC_{20} = Konzentration eines Stoffs, bei der 80 % seiner maximalen Reaktion (Hemmung 20 %) beobachtet werden

IC_{50} = Konzentration eines Stoffs, bei der 50 % seiner maximalen Reaktion (Hemmung 50 %) beobachtet werden

PC_{80} = Konzentration einer Prüfchemikalie, bei der deren Reaktion IC_{20} des Referenzstandards entspricht

PC_{50} = Konzentration einer Prüfchemikalie, bei der deren Reaktion IC_{50} des Referenzstandards entspricht

TCx_{min} = niedrigste relative Induktion der Prüfchemikalie

Bei Prüfchemikalien kann infolge einer bestehenden Zytotoxizität oder aufgrund von Löslichkeitsproblemen möglicherweise nicht immer eine vollständige Dosis-Reaktions-Kurve dargestellt werden. In diesen Fällen können IC_{50} , IC_{20} und PC_{50} nicht bestimmt werden, und die Darstellung beschränkt sich auf PC_{20} und TC_{min} .

58. Die Ergebnisse sollten auf zwei (oder drei) unabhängigen Prüfläufen beruhen. Wenn bei zwei Prüfläufen vergleichbare und daher auch reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden, ist ein dritter Prüflauf nicht erforderlich. Ergebnisse können dann akzeptiert werden, wenn die folgenden Anforderungen erfüllt sind:

- Die Ergebnisse erfüllen die Akzeptanzkriterien (Nummern 14-22)
- und sind reproduzierbar.

Kriterien für die Auswertung von Daten

59. Bei der Auswertung der Daten und der Einstufung einer Prüfchemikalie als positiv oder negativ sind die folgenden Kriterien zu berücksichtigen:

Agonisten

Bei jedem Hauptversuch wird eine Prüfchemikalie als **positiv** betrachtet, wenn die folgenden Bedingungen erfüllt sind:

- 1 TC_{max} ist größer oder gleich 10 % der maximalen Reaktion des Referenzstandards (REF_{10}).
- 2 Mindestens 2 aufeinander folgende Konzentrationen der Prüfchemikalie sind größer oder gleich REF_{10} .

Bei jedem Hauptversuch wird eine Prüfchemikalie als **negativ** betrachtet, wenn die folgenden Bedingungen erfüllt sind:

- 1 TC_{max} beträgt nicht mehr als 10 % der maximalen Reaktion des Referenzstandards (REF_{10}).
- 2 Weniger als 2 aufeinander folgende Konzentrationen der Prüfchemikalie sind größer oder gleich REF_{10} .

Antagonisten

Bei jedem Hauptversuch wird eine Prüfchemikalie als **positiv** betrachtet, wenn die folgenden Bedingungen erfüllt sind:

- 1 TC_{min} ist kleiner oder gleich 80 % der maximalen Reaktion des Referenzstandards (REF_{80} = Hemmung 20 %).
- 2 Mindestens 2 aufeinander folgende Konzentrationen der Prüfchemikalie sind kleiner oder gleich REF_{80} .

Bei jedem Hauptversuch wird eine Prüfchemikalie als **negativ** betrachtet, wenn die folgenden Bedingungen erfüllt sind:

- 1 TC_{min} ist größer als 80 % der maximalen Reaktion des Referenzstandards (REF_{80} = Hemmung 20 %).
- 2 Weniger als 2 aufeinander folgende Konzentrationen der Prüfchemikalie sind kleiner oder gleich REF_{80} .

60. Zur Beschreibung der Wirkung der positiven Reaktion einer Prüfchemikalie sollten die Wirkstärke (Agonisten: TC_{max} ; Antagonisten: TC_{min}) und die Konzentration angegeben werden, bei der die Wirkung eintritt (Agonisten: EC_{10} , EC_{50} , PC_{10} , PC_{50} ; Antagonisten: IC_{20} , IC_{50} , PC_{80} , PC_{50}).

PRÜFBERICHT

61. Siehe Nummer 20 im Abschnitt „ELEMENTE DES ER-TA-ASSAYS“.

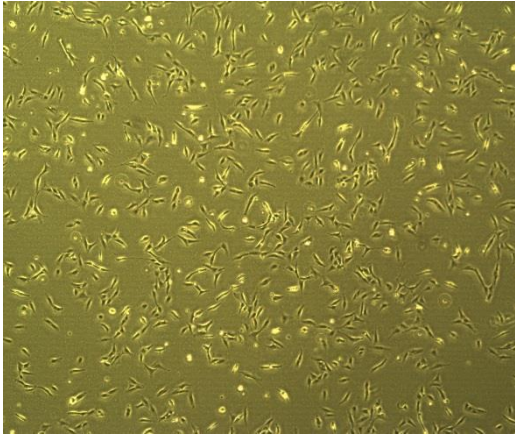
LITERATUR

- (108) 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). Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (109) Sonneveld, E., Jansen, H.J., Riteco, J.A., 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.
- (110) Quaedackers, M.E., van den Brink, C.E., Wissink, S., Schreurs, R.H.M.M., Gustafsson, J.A., van der Saag, P.T. und 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.
- (111) Thorne, N, Inglese, J. und Auld, D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, *Chemistry and Biology* 17(6):646-657.
- (112) Escande, A., Pillon, A., Servant, N., Cravedi, J.P., Larrea, F., Muhn, P., Nicolas, J.C., Cavallès, V. und Balaguer, P.. (2006). Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta. *Biochem. Pharmacol.*, 71, 1459-1469.
- (113) Kuiper, G.G., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton, J.C., Safe, S.H., van der Saag, P.T., van der Burg, B. und Gustafsson, J.A. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinol.*, 139, 4252-4263.
- (114) Sotoca, A.M., Bovee, T.F.H., Brand, W., Velikova, N., Boeren, S., Murk, A.J., Vervoort, J., Rietjens, I.M.C.M. (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.
- (115) Sonneveld, E., Riteco, J.A.C., Jansen, H.J., Pieterse, B., Brouwer, A., Schoonen, W.G. und 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.
- (116) Kobayashi, H., Yamamoto, K., Eguchi, M., Kubo, M., Nakagami, S., Wakisaka, S., Kaizuka, M. und Ishii, H. (1995). Rapid detection of

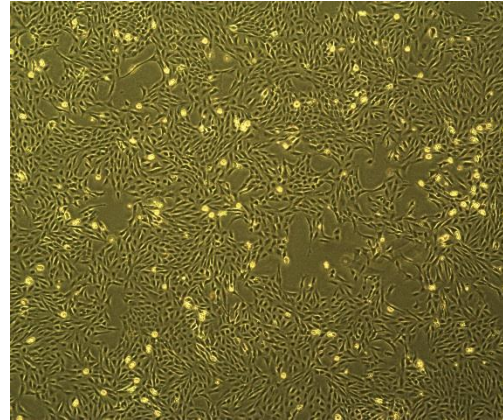
mycoplasma contamination in cell cultures by enzymatic detection of polymerase chain reaction (PCR) products. *J. Vet. Med. Sci.*, 57(4), 769-771.

- (117) Zhang, J.-H., Chung, T.D.Y. und Oldenburg, K.R. (1999). A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J. Biomol. Sci.*, 4, 67-73.
- (118) Besselink, H., Middelhof, I. und Felzel, E. (2014). Transactivation assay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential using ER α CALUX cells. BioDetection Systems BV (BDS). Amsterdam, Niederlande.

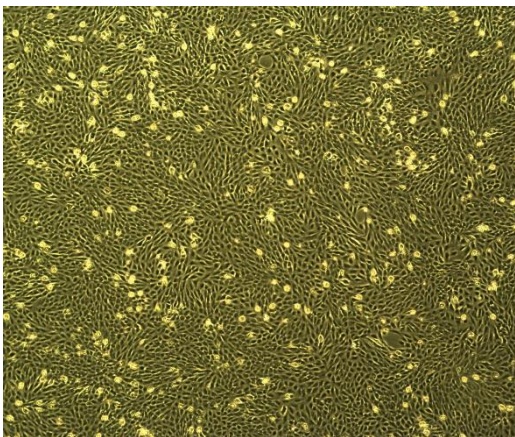
Anlage 4.1: Visuelle Prüfung der Zellviabilität



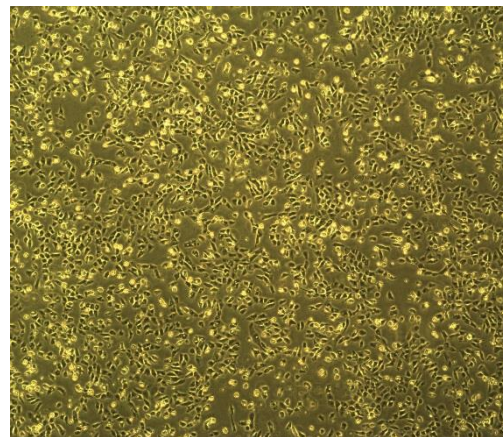
<5 % Konfluenz Die Zellen wurden gerade geimpft. Zellviabilität 100 %
Einstufung: „Keine Zytotoxizität“



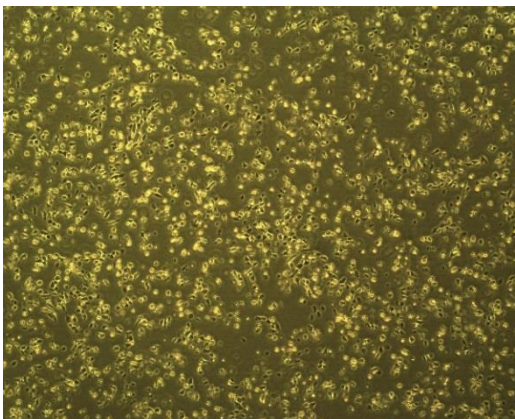
Konfluenz > 85 % In diesem Stadium erfolgt die Exposition der Zellen gegenüber der Prüfchemikalie. Zellviabilität > 95 %
Einstufung: „Keine Zytotoxizität“



Konfluenz > 95 % Die Zellen sind dicht gepackt und beginnen zu überwachsen. Zellviabilität > 95 %
Einstufung: „Keine Zytotoxizität“



Zellviabilität < 25 % Die Zellen lösen sich, und der Kontakt zwischen den Zellen wird geringer. Die Zellen runden sich ab.
Einstufung: „Zytotoxizität“



Zellviabilität < 5 %. Die Zellen sind vollständig abgelöst, und der Kontakt zwischen den Zellen ist unterbrochen. Die Zellen runden sich ab.
Einstufung: „Zytotoxizität“

B.67 *IN-VITRO*-GENMUTATIONSPRÜFUNG AN SÄUGETIERZELLEN ANHAND DES THYMIDINKINASE-GENS

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode (PM) entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 490 (2016). Die Prüfmethode werden regelmäßig geprüft und überarbeitet, um dem wissenschaftlichen Fortschritt, den rechtlichen Anforderungen und den Belangen des Tierschutzes gerecht zu werden. Der Maus-Lymphom-Assay (MLA) und die TK6-Prüfung mit dem Thymidinkinase-Lokus (TK-Lokus) waren ursprünglich Bestandteil der Prüfmethode B.17. Die MLA Expert Workgroup des Internationalen Workshops für Genotoxizitätsprüfungen (International Workshop on Genotoxicity Testing, IWGT) hat später jedoch international harmonisierte Empfehlungen zu Akzeptanzkriterien für den Assay und zur Auswertung der Daten des MLA entwickelt (1) (2) (3) (4) (5). Diese Empfehlungen wurden in dieser neuen Prüfmethode B.67 berücksichtigt. Diese Prüfmethode wurde für den MLA sowie (da dabei ebenfalls der TK-Lokus verwendet wird) für die TK6-Prüfung entwickelt. Der MLA ist für rechtliche Zwecke allgemein üblich. Die TK6-Prüfung hingegen ist erheblich weniger verbreitet. Ungeachtet der Ähnlichkeit der Endpunkte sind die beiden Zelllinien allerdings nicht austauschbar, und in rechtlichen Vorgaben kann im Zusammenhang mit einem bestimmten rechtlichen Zweck durchaus eine Präferenz für die eine oder andere Zelllinie zum Ausdruck gebracht werden. Beispielsweise wurde mit der Validierung des MLA nachgewiesen, dass mit dem Assay nicht nur Genmutationen erkannt werden können, sondern dass auch die Fähigkeit einer Prüfchemikalie zur Induzierung struktureller Chromosomenschäden festgestellt werden kann. Diese Prüfmethode ist Bestandteil einer Reihe von Prüfmethoden zur genetischen Toxikologie. Die OECD hat ein Dokument erstellt, das kurz gefasste und hilfreiche Informationen zu Untersuchungen zur genetischen Toxikologie sowie eine Übersicht über die jüngsten Änderungen der OECD-Prüfrichtlinien zur genetischen Toxikologie enthält (6).
2. Die *In-vitro*-Genmutationsprüfungen an Säugetierzellen werden zum Nachweis chemisch induzierter Genmutationen verwendet. Mit den in diesen Prüfungen verwendeten Zelllinien können Vorwärtsmutationen an Reporter-Genen, insbesondere am endogenen Thymidinkinase-Gen (*TK* bei menschlichen Zellen und *Tk* bei Nagerzellen, bei dieser Prüfmethode gemeinsam als *TK* bezeichnet) gemessen werden. Diese Prüfmethode ist zur Verwendung mit zwei Zelllinien vorgesehen: der Maus-Lymphom-Zelllinie L5178Y TK^{+/}-3.7.2C (im Allgemeinen als L5178Y-Zelllinie bezeichnet) und der humanen Lymphoblastoid-Zelllinie TK6 (allgemein als TK6-Zelllinie bezeichnet). Die beiden Zelllinien unterscheiden sich zwar u. a. in Bezug auf ihre Herkunft, das Zellwachstum und den p53-Status. Die *TK*-

Genmutationsprüfungen können jedoch bei beiden Zelltypen ähnlich durchgeführt werden, wie in dieser Prüfmethode beschrieben.

3. Die autosomale und heterozygote Beschaffenheit des Thymidin-Kinase-Gens ermöglicht die Erkennung lebensfähiger Kolonien von Zellen, denen infolge einer Mutation von $TK^{+/-}$ nach $TK^{-/-}$ das Enzym Thymidin-Kinase fehlt. Das Fehlen des Enzyms kann auf genetische Prozesse zurückzuführen sein, die das TK -Gen beeinträchtigen (u. a. auf Genmutationen (Punktmutationen, Frame-Shift-Mutationen, kleine Deletionen usw.) und auf Chromosomenveränderungen (große Deletionen, Chromosomen-Rearrangements und mitotische Rekombinationen)). Letztere äußern sich in einem Verlust der Heterozygotie, der bei der humanen Tumorgenese häufig mit einer genetischen Veränderung von Tumorsuppressorgenen einhergeht. Theoretisch *kann* der Verlust des gesamten Chromosoms mit dem TK -Gen infolge der Hemmung der Spindelfaserbildung und/oder durch mitotische Non-disjunction mit dem MLA nachgewiesen werden. Eine kombinierte zytogenetische und molekulare Untersuchung zeigt tatsächlich eindeutig, dass einige MLA-TK-Mutanten auf eine Non-disjunction zurückzuführen sind. Mit TK -Genmutationsprüfungen werden Aneugene durch die Berücksichtigung von Standardkriterien zur Feststellung einer Zytotoxizität (wie bei dieser Prüfmethode beschrieben) jedoch nachweislich nicht zuverlässig erkannt. Daher sind diese Prüfungen zum Nachweis von Aneugenem nicht geeignet (7) (8) (9).
4. Bei den TK -Genmutationsprüfungen werden zwei verschiedene Phänotypklassen von TK -Mutanten erzeugt: die normal wachsenden Mutanten, die so schnell wachsen wie die heterozygoten TK -Zellen, und die langsam wachsenden Mutanten mit längeren Verdopplungszeiten. Die normal und die langsam wachsenden Mutanten werden beim MLA als Mutanten mit starker bzw. geringer Koloniebildung und bei der TK6-Prüfung als Mutanten mit früh bzw. spät auftretender Koloniebildung festgestellt. Die molekulare und zellgenetische Beschaffenheit von MLA-Mutanten mit starker bzw. geringer Koloniebildung wurde eingehend untersucht (8) (10) (11) (12) (13). Die molekulare und zellgenetische Beschaffenheit der früh und der spät auftretenden TK6-Mutanten wurde ebenfalls eingehend untersucht (14) (15) (16) (17). Langsam wachsende Mutanten bei beiden Zelltypen entwickelten genetische Schäden (einschließlich möglicherweise wachstumsregulierender Gene in der Nähe des TK -Locus), die zu längeren Verdopplungszeiten und zur späteren Bildung kleinerer Kolonien führen (18). Eine Induzierung langsam wachsender Mutanten erfolgt vor allem bei Chemikalien, die erhebliche strukturelle Änderungen auf der Chromosomenebene hervorrufen. Zellen, bei denen die Schäden die möglicherweise wachstumsregulierenden Gene in der Nähe des TK -Locus nicht betreffen, teilen sich ähnlich schnell wie die Elternzellen und entwickeln sich zu normal wachsenden Mutanten. Eine Induzierung normal wachsender Mutanten erfolgt bei Chemikalien, die hauptsächlich als Punktmutagene wirken. Daher ist entscheidend, dass sowohl

langsam als auch normal wachsende Mutanten gezählt werden, um alle Mutanten zu erfassen und Aufschluss über den Typ (die Typen) der Schäden (Mutagene vs. Klastogene) zu erhalten, die durch die Prüfchemikalie induziert werden (10) (12) (18) (19).

5. Die Prüfrichtlinie wurde so gestaltet, dass sie allgemeine Informationen sowohl beim MLA als auch bei der TK6-Prüfung liefert. Außerdem enthält sie spezifische Hinweise zur Durchführung der einzelnen Prüfungen.
6. Es gelten die Begriffsbestimmungen in Anlage 1.

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN UND BEGRENZUNGEN

7. *In vitro* durchgeführte Prüfungen erfordern in der Regel die Verwendung eines exogenen Fremdstoff-Metabolisierungssystems. Mit diesem exogenen Stoffwechselaktivierungssystem lassen sich die *In-vivo*-Bedingungen jedoch nicht gänzlich nachvollziehen.
8. Bedingungen, die zu künstlich verursachten Positivergebnissen führen könnten (d. h. mögliche Wechselwirkungen mit dem Prüfsystem), die nicht von einer Interaktion zwischen der Prüfchemikalie und dem genetischen Material der Zelle herrühren, sind unbedingt zu vermeiden; zu solchen Bedingungen gehören Veränderungen des pH-Wertes bzw. der Osmolalität, eine Interaktion mit einzelnen Komponenten des Mediums (20) (21) oder eine hochgradige Zytotoxizität (22) (23) (24). Zytotoxizitätswerte, die die empfohlenen Höchstwerte nach Nummer 28 überschreiten, werden für den MLA und TK6-Prüfung als zu hoch betrachtet. Außerdem ist zu beachten, dass Prüfchemikalien, bei denen es sich um Thymidin-Nachbildungen handelt oder die sich wie Thymidin-Nachbildungen verhalten, bei der Behandlung der Zellen infolge der selektiven Vermehrung der spontanen Hintergrundmutationen die Mutantenhäufigkeit erhöhen und Untersuchungen mit weiteren Prüfmethoden erforderlich machen können, um eine angemessene Auswertung zu ermöglichen (25).
9. Für hergestellte Nanomaterialien sind möglicherweise spezielle Anpassungen dieser Prüfmethode erforderlich, die an dieser Stelle jedoch nicht beschrieben werden.
10. Bevor die Prüfmethode zur Untersuchung eines Gemischs für die Generierung von Daten für einen bestimmten Regulierungszweck verwendet wird, ist zu prüfen, ob sie für den beabsichtigten Zweck angemessene Ergebnisse liefern kann und, wenn dem so ist, warum. Solche Erwägungen entfallen, wenn die Prüfung des Gemischs rechtlich vorgeschrieben ist.
11. Mutantenzellen, die infolge der Mutation von $TK^{+/-}$ zu $TK^{-/-}$ keine Aktivität des Enzyms Thymidinkinase (TK) entwickeln, sind gegenüber der zytotoxischen Wirkung des Pyrimidinanalogons Trifluorthymidin (TFT) resistent. Bei Anwesenheit von TK

sind Zellen hingegen empfindlich gegenüber TFT, das die Hemmung des Zellstoffwechsels verursacht und eine weitere Zellteilung verhindert. Somit können Mutantenzellen sich in Anwesenheit von TFT vermehren und erkennbare Kolonien bilden. Zellen, die das Enzym TK enthalten, sind dazu nicht in der Lage.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

12. Zellen in Suspensionskultur werden über einen angemessenen Zeitraum (Nummer 19) mit und ohne exogenes Fremdstoff-Metabolisierungssystem (Nummer 33) mit der Prüfchemikalie behandelt und anschließend subkultiviert, um die Zytotoxizität zu bestimmen und vor der Mutantenselektion die Expression des Phänotyps zu ermöglichen. Die Zytotoxizität wird anhand des relativen Gesamtwachstums (RTG) (Nummer 25) beim MLA bzw. anhand der relativen Überlebensrate (RS) (Nummer 26) bei der TK6-Prüfung ermittelt. Die behandelten Kulturen werden für einen ausreichenden Zeitraum, der für den jeweils gewählten Zelltyp charakteristisch ist (Nummer 37), in einem Wachstumsmedium gehalten, um eine annähernd optimale Expression des Phänotyps der induzierten Mutationen zu ermöglichen. Nach der Expression des Phänotyps wird die Mutantenhäufigkeit bestimmt, indem eine bekannte Anzahl von Zellen auf ein Medium mit dem selektierenden Agens zur Bestimmung der Mutantenkolonien und auf ein Medium ohne selektierendes Agens zur Bestimmung der Klonierungseffizienz (Lebensfähigkeit) geimpft wird. Nach einer geeigneten Inkubationszeit werden die Kolonien gezählt. Die Mutantenhäufigkeit wird anhand der entsprechend der Klonierungseffizienz bei der Mutantenselektion bereinigten Anzahl der Mutantenkolonien berechnet.

BESCHREIBUNG DER METHODE

Vorbereitungen

Zellen

13. MLA: Da der MLA mit der $TK^{+/-}$ -3.7.2C-Zelllinie als Unterzelllinie der L5178Y-Zelllinie entwickelt und beschrieben wurde, ist für den MLA diese spezielle Unterzelllinie zu verwenden. Die L5178Y-Zelllinie wurde aus einem durch Methylcholanthren induzierten Thymuslymphom einer DBA-2-Maus abgeleitet (26). Clive u. a. behandelten L5178Y-Zellen (von Clive als $TK^{+/+}$ -3 bezeichnet) mit Ethylmethansulfonat und isolierten einen $TK^{-/-}$ -Klon (bezeichnet als $TK^{-/-}$ -3.7-Klon) mit Bromodeoxyuridin als selektierendes Agens. Aus dem $TK^{-/-}$ -Klon wurden ein spontaner $TK^{+/-}$ -Klon (als $TK^{+/-}$ -3.7.2. bezeichnet) und ein Subklon (bezeichnet als $TK^{+/-}$ -3.7.2C) zur Verwendung im MLA isoliert und charakterisiert (27). Der Karyotyp der Zelllinie wurde veröffentlicht (28) (29) (30) (31). Der Modalwert der Chromosomen beträgt 40. Das metazentrische Chromosom (t12;13) ist als ein Chromosom zu zählen. Der *TK*-Locus bei Mäusen befindet sich am distalen Ende des

Chromosoms 11. Die Zelllinie L5178Y $TK^{+/-}$ -3.7.2C hat Mutationen auf den p53-Allelen und erzeugt mutantes p53-Protein (32) (33). Der p53-Status der $TK^{+/-}$ -3.7.2C-Zelllinie ist wahrscheinlich die Ursache dafür, dass mit der Prüfung größere Schäden erkannt werden können (17).

14. TK6: TK6 ist eine humane lymphoblastoide Zelllinie. Die Elternzelllinie ist eine mit dem Epstein-Barr-Virus transformierte Zelllinie (WI-L2), die ursprünglich von einem 5-jährigen Jungen mit hereditärer Sphärozytose abgeleitet wurde. Der erste isolierte Klon (HH4) wurde mit ICR191 mutagenisiert; dabei wurde eine heterozygote TK -Zelllinie (TK6) erzeugt (34). TK6-Zellen sind annähernd diploid; der entsprechende Karyotyp ist 47, XY, 13+, t(14; 20), t(3; 21) (35). Der TK -Locus beim Menschen befindet sich am langen Arm des Chromosoms 17. TK6 ist eine p53-kompetente Zelllinie, da sie auf beiden Allelen eine Wildtyp-p53-Sequenz aufweist und ausschließlich Wildtyp-p53-Protein exprimiert (36).
15. Sowohl beim MLA als auch bei der TK6-Prüfung empfiehlt sich, dass das Prüflabor beim erstmaligen Herstellen oder beim Auffüllen der Master-Zellenbestände sicherstellt, dass keine *Mycoplasma*-Kontamination vorliegt, sowie dass es den Karyotyp der Zellen bestimmt oder die Chromosomen markiert, auf denen sich der TK -Locus befindet, und dass es die Zeiten für die Verdopplung der Populationen ermittelt. Die normale Dauer des Zellzyklus sollte bei den im Prüflabor verwendeten Zellen bekannt sein und mit veröffentlichten Zellcharakteristiken übereinstimmen (16) (19) (37). Dieser Master-Zellenbestand sollte bei -150 °C (oder noch niedrigeren Temperaturen) aufbewahrt und zur Herstellung aller Arbeitsstämme verwendet werden.
16. Entweder vor der Herstellung einer großen Anzahl an kryokonservierten Arbeitsstämmen oder unmittelbar vor der Verwendung in einem Versuch müssen die Zellkulturen möglicherweise von noch vorhandenen Mutanten gereinigt werden [wenn die Mutantenhäufigkeit (MF) der Lösungsmittelkontrolle nicht bereits im akzeptablen Bereich liegt – für MLA siehe Tabelle 2]. Dazu wird Methotrexat (Aminopterin) zur Selektion von Zellen ohne TK verwendet und Thymidin, Hypoxanthin und Glycin (L5178Y) bzw. 2'-Deoxycytidin (TK6) zur Kultur hinzugegeben, um ein optimales Wachstum der TK-kompetenten Zellen sicherzustellen (19) (38) (39) bzw. (40) für TK6. Allgemeine Hinweise zu bewährten Verfahren bei der Haltung von Zellkulturen sowie spezifische Hinweise zu L5178Y- und TK6-Zellen siehe (19) (31) (37) (39) und (41). Für Labors, die Master-Zellenbestände als Ausgangszellen für den MLA oder die TK6-Prüfung benötigen, sowie allgemein, wenn neue Master-Zellenbestände benötigt werden, ist ein Zellendepot mit gut charakterisierten Zellen verfügbar (37).

Medien und Kulturbedingungen

17. Bei beiden Prüfungen erfordert die Kultivierung geeignete Kulturmedien und Inkubationsbedingungen (z. B. Kulturgefäße, eine befeuchtete Atmosphäre mit einer CO₂-Konzentration von 5 % und eine Inkubationstemperatur von 37 °C). Die Zellkulturen sollten immer unter Bedingungen gehalten werden, bei denen das Wachstum in der Log-Phase sichergestellt ist. Vor allem ist für Medien- und Kulturbedingungen zu sorgen, die ein optimales Zellwachstum während der Expressionszeit und der Klonierung der mutierenden und nichtmutierenden Zellen gewährleisten. Für den MLA und die TK6-Prüfung ist ferner wichtig, dass die Kulturlösungen ein optimales Wachstum sowohl der großen Kolonien bzw. frühzeitig auftretender TK-Mutanten als auch der kleinen Kolonien bzw. spät auftretender TK-Mutanten gewährleisten. Nähere Informationen zur Haltung der Kulturen einschließlich der Notwendigkeit der Inaktivierung von Pferdeserum durch angemessene Erwärmung (wenn bei der Mutantenselektion RPMI-Medium verwendet wird) siehe (19) (31) (38) (39) (40) und (42).

Vorbereitung der Kulturen

18. Die Zellen werden aus Stammkulturen gewonnen und im Kulturmedium in einer solchen Dichte überimpft, dass die Suspensionskulturen während der Behandlung und der Expressionszeit weiterhin exponentiell wachsen.

Stoffwechselaktivierung

19. Bei der Verwendung von L5178Y- und TK6-Zellen sollten exogene metabolisierende Systeme verwendet werden, da diese Zellen eine unzulängliche endogene Stoffwechselkapazität entwickeln. Das gängigste und – sofern nicht anders begründet – standardmäßig empfohlene System, ist eine durch Ko-Faktoren ergänzte post-mitochondriale Fraktion (S9) aus der Leber von Nagetieren (in der Regel Ratten), die mit enzyminduzierenden Agenzien wie Aroclor 1254 (43) (44) (45) oder einer Kombination aus Phenobarbiton und β -Naphthoflavon (46) (47) (48) (49) (50) (51) vorbehandelt wurde. Die letztgenannte Kombination verstößt nicht gegen das Stockholmer Übereinkommen über persistente organische Schadstoffe (52) und hat sich für die Induktion von Multifunktionsoxidasen als ebenso wirksam wie Aroclor 1254 erwiesen (45) (46) (47) (48) (49). Die S9-Fraktion wird im Endmedium in der Regel in Konzentrationen von 1-2 % verwendet, kann jedoch auf 10 % v/v erhöht werden. Die Wahl der Art und Konzentration des exogenen Metabolisierungssystems oder metabolischen Agens ist möglicherweise von der Klasse der Prüfchemikalien abhängig.

Vorbereitung der Prüfchemikalie

20. Feste Prüfchemikalien sollten vor der Behandlung der Zellen in geeigneten Lösungsmitteln gelöst und ggf. verdünnt werden (Nummer 21). Flüssige Prüfchemikalien können vor der Behandlung direkt zum Versuchssystem gegeben und/oder verdünnt werden. Gasförmige oder flüchtige Prüfchemikalien sind durch entsprechende Modifikationen der Standardprotokolle zu prüfen, z. B. durch Behandlung in hermetisch verschlossenen Kulturgefäßen (53) (54) (55). Zubereitungen der Prüfchemikalie sollten kurz vor der Behandlung hergestellt werden, es sei denn, die Stabilität der Chemikalie bei der Lagerung wird nachgewiesen.

PRÜFBEDINGUNGEN

Lösungsmittel

21. Das Lösungsmittel sollte so gewählt werden, dass zum einen eine optimale Löslichkeit der Prüfchemikalie gewährleistet ist, zum anderen aber die Durchführung der Prüfung nicht beeinträchtigt wird, z. B. durch Veränderung des Zellwachstums, Beeinträchtigung der Integrität der Prüfchemikalie, Reaktion mit Kulturgefäßen oder Behinderung des Metabolisierungssystems. Als erste Wahl ist möglichst die Verwendung eines wässrigen Lösungsmittels (oder Kulturmediums) zu empfehlen. Gründlich erprobte Lösungsmittel sind Wasser oder Dimethylsulfoxid. Organische Lösungsmittel sollten 1 % (v/v) und wässrige Lösungsmittel (Kochsalzlösung oder Wasser) 10 % (v/v) im Endmedium möglichst nicht überschreiten. Kommen weniger gründlich erprobte Lösungsmittel zum Einsatz (z. B. Ethanol oder Aceton), ist deren Verwendung anhand von Daten zu begründen, die ihre Verträglichkeit mit den Prüfchemikalien und dem Versuchssystem und ihre nicht gentoxische Wirkung in der verwendeten Konzentration belegen. Sind keine entsprechenden Belege verfügbar, sollten unbedingt unbehandelte Kontrollen (siehe Anlage 1, Begriffsbestimmungen) einbezogen werden, um nachzuweisen, dass durch die gewählten Lösungsmittel keine schädlichen oder mutagenen Wirkungen ausgelöst werden.

MESSUNG DER ZYTOTOXIZITÄT UND AUSWAHL DER BEHANDLUNGSKONZENTRATIONEN

22. Bei der Bestimmung der höchsten Konzentration der Prüfchemikalie sind Konzentrationen zu vermeiden, die zu künstlich positiven Reaktionen führen können, z. B. zu übermäßiger Zytotoxizität (Nummer 28), Niederschlag (Nummer 29) oder ausgeprägten Veränderungen des pH-Werts oder der Osmolalität (Nummer 8). Wenn die Prüfchemikalie zum Zeitpunkt der Zugabe den pH-Wert des Mediums erheblich verändert, lässt sich der pH-Wert auch durch Anwendung eines Puffers im

Endmedium einstellen, damit künstlich positive Reaktionen vermieden und geeignete Kulturbedingungen aufrechterhalten werden.

23. Die Konzentrationen werden u. a. nach der Zytotoxizität ausgewählt (Nummern 27-30). Wenngleich die Bewertung der Zytotoxizität im Rahmen eines Vorversuchs nützlich sein kann, um die im Hauptversuch verwendeten Konzentrationen besser bestimmen zu können, ist ein Vorversuch nicht erforderlich. Auch wenn die anfängliche Zytotoxizität bewertet wird, ist im Hauptversuch die Zytotoxizität jeder einzelnen Kultur zu messen. Wenn ein Dosisfindungsversuch durchgeführt wird, sollte dieser ein breites Spektrum an Konzentrationen abdecken. Der Dosisfindungsversuch kann entweder an Tag 1 nach der Behandlung abgebrochen werden oder über die 2-tägige Expression bis zur Mutantenselektion fortgesetzt werden (wenn sich die verwendeten Konzentrationen als geeignet erweisen sollten).
24. Die Zytotoxizität sollte für jede Prüfkultur und für jede Kontrollkultur separat ermittelt werden. Hinsichtlich der Methoden für den MLA (2) und die TK6-Prüfung (15) ist die international anerkannte Praxis maßgeblich.
25. Für die Durchführung des MLA mit der Agar- und der Microwell-Methode gilt: Die Zytotoxizität sollte anhand des relativen Gesamtwachstums (RTG) ermittelt werden (erstmalig im Jahr 1975 von Clive und Spector beschrieben (2)). Dieser Parameter beinhaltet das relative Suspensionswachstum (RSG: Prüfkultur vs. Lösungsmittelkontrolle) während der Behandlung der Zellen, die Expressionszeit und die relative Klonierungseffizienz (RCE: Prüfkultur vs. Lösungsmittelkontrolle) zum Zeitpunkt der Mutantenselektion (2). Das RSG beinhaltet alle Zellverluste in der Prüfkultur während der Behandlung (Formel siehe Anlage 2).
26. Für die TK6-Prüfung gilt: Die Zytotoxizität sollte anhand der relativen Überlebensrate (RS) (d. h. der Klonierungseffizienz von unmittelbar nach der Behandlung ausplattierten Zellen) ermittelt werden; dabei ist eine Bereinigung um Zellverluste während der Behandlung auf der Grundlage der Zellzahl im Vergleich zur Negativkontrolle (mit einer Überlebensrate von 100 %) vorzunehmen (Formel siehe Anlage 2).
27. Es sollten mindestens vier Prüfkonzentrationen (ausgenommen das Lösungsmittel und Positivkontrollen) ausgewertet werden, die die Akzeptanzkriterien erfüllen (geeignete Zytotoxizität, Anzahl der Zellen usw.). Die Verwendung von Zweifachkulturen ist zu empfehlen, doch können für jede überprüfte Konzentration auch Replikat- oder Einfachkulturen herangezogen werden. Die Ergebnisse aus Replikatkulturen bei einer gegebenen Konzentration sollten getrennt angegeben werden, können zu Datenanalysezwecken aber auch gepoolt werden (55). Bei Prüfchemikalien mit geringer Zytotoxizität oder ohne zytotoxische Wirkung sind in der Regel Konzentrationsintervalle mit zwei- bis dreifacher Konzentration geeignet. Wenn Zytotoxizität auftritt, sollten die Konzentrationen einen Zytotoxizitätsbereich

ausgehend vom Wert, bei dem Zytotoxizität auftritt (siehe Beschreibung unter Nummer 28), bis zu Konzentrationen mit mäßiger oder geringer oder nicht vorhandener Toxizität umfassen. Viele Prüfchemikalien zeigen steile Konzentrations-Reaktions-Kurven. Um Daten zu mäßiger oder geringer Toxizität zu erhalten oder um die Dosis-Reaktions-Beziehungen im Einzelnen auszuwerten, kann es daher erforderlich sein, Konzentrationen mit kleineren Abständen und/oder mehr als vier Konzentrationen zu verwenden, insbesondere in Fällen, in denen ein Wiederholungsversuch erforderlich ist (Nummer 70). Die Verwendung von mehr als 4 Konzentrationen kann besonders bei Einfachkulturen wichtig sein.

28. Wenn die Höchstkonzentration auf der Zytotoxizität beruht, sollte bei der Höchstkonzentration beim MLA ein relatives Gesamtwachstum von 10-20 % und bei der TK6-Prüfung eine relative Überlebensrate von 10 % erreicht werden (Nummer 67).
29. Im Falle schwer löslicher Chemikalien, die bei Konzentrationen unterhalb der niedrigsten unlöslichen Konzentration nicht zytotoxisch sind, sollte die höchste analysierte Konzentration am Ende der Behandlung mit der Prüfchemikalie eine Trübung oder eine mit bloßem Auge oder mithilfe eines Inversmikroskops erkennbare Ausfällung bewirken. Auch wenn Zytotoxizität oberhalb der niedrigsten unlöslichen Konzentration auftritt, ist es ratsam, nur eine Konzentration zu testen, bei der es zu einer Trübung oder sichtbaren Ausfällung kommt, da infolge dieser Ausfällungen künstliche Wirkungen auftreten können. Da beim MLA und bei der TK6-Prüfung Suspensionskulturen verwendet werden, ist bei der Konzentration, bei der es zu einer Ausfällung kommt, unbedingt sicherzustellen, dass die Ausfällung nicht die Durchführung des Versuchs beeinträchtigt. Unter Umständen empfiehlt es sich, die Löslichkeit im Kulturmedium vor dem Versuch zu bestimmen.
30. Wird keine Ausfällung bzw. keine grenzwertige Zytotoxizität beobachtet, sollte die höchste Versuchskonzentration 10 mM, 2 mg/ml oder 2 µl/ml entsprechen, je nachdem, welcher Wert der niedrigere ist (57) (58). Wenn die Zusammensetzung der Prüfchemikalie nicht genau definiert ist (bei Stoffen mit unbekannter oder schwankender Zusammensetzung, komplexen Reaktionsprodukten oder biologischen Materialien (UVCB), Umweltextrakten usw.), muss die höchste Konzentration möglicherweise höher angesetzt werden (z. B. 5 mg/ml), sofern keine ausreichende Zytotoxizität vorhanden ist, um die Konzentration der einzelnen Bestandteile zu erhöhen. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass diese Anforderungen sich von denen für Humanpharmazeutika unterscheiden können (59).

Kontrollen

31. Bei allen Versuchsbedingungen sind jeweils gleichzeitige Negativkontrollen (Nummer 21) anzulegen, bei denen das Behandlungsmedium lediglich Lösungsmittel

enthält, die ansonsten aber auf die gleiche Weise behandelt wurden wie die Behandlungskulturen.

32. Die Eignung des Labors zum Nachweis von Mutagenen unter den Bedingungen des verwendeten Prüfprotokolls und (ggf.) die Wirksamkeit des exogenen Stoffwechselaktivierungssystems sowie eine angemessene Erkennung sowohl kleiner/spät auftretender als auch großer/früh auftretender *TK*-Mutanten sind anhand gleichzeitiger Positivkontrollen nachzuweisen. Beispiele für Positivkontrollen sind Tabelle 1 zu entnehmen. In begründeten Fällen können andere geeignete Positivkontrollstoffe verwendet werden. Da *In-vitro*-Tests auf Genotoxizität in Säugetierzellen für die gleichzeitigen Kurzzeitbehandlungen (3-4 Stunden) mit und ohne Zusatz eines Stoffwechselaktivierungssystems über die gleiche Behandlungsdauer ausreichend standardisiert sind, kann sich die Hinzuziehung von Positivkontrollen auf ein Mutagen beschränken, das eine Stoffwechselaktivierung erfordert. In diesem Fall wird durch die Reaktion einer einzelnen Positivkontrolle sowohl die Aktivität des Stoffwechselaktivierungssystems als auch die Empfindlichkeit des Prüfsystems nachgewiesen. Im Falle einer Langzeitbehandlung (d. h. 24 Stunden ohne S9) sollte jedoch eine gesonderte Positivkontrolle erfolgen, da der Versuch mit Stoffwechselaktivierung eine andere Behandlungsdauer hat. Jede Positivkontrolle sollte bei einer oder mehreren Konzentrationen durchgeführt werden, die voraussichtlich eine reproduzierbare und erkennbare Zunahme gegenüber dem Hintergrund ergeben (womit sich die Empfindlichkeit des Versuchssystems nachweisen lässt), und die Wirkung sollte nicht durch einen Zytotoxizitätswert beeinträchtigt werden, der die in dieser Prüfmethode vorgegebenen Grenzen überschreitet (Nummer 28).

Tabelle 1: Zur Beurteilung der Eignung des Labors und zur Wahl der Positivkontrollen empfohlene Referenzstoffe

Kategorie	Stoff	CAS-Nr.
1. Mutagene, die ohne Stoffwechselaktivierung wirken		
Methylmethansulfonat	66-27-3	
Mitomycin C	50-07-7	
4-Nitroquinolin-N-oxid	56-57-5	
2. Mutagene, die eine Stoffwechselaktivierung erfordern		
Benzo(a)pyren	50-32-8	
Cyclophosphamid(monohydrat)	50-18-0 (6055-19-2)	
7,12-Dimethylbenzanthracen	57-97-6	
3-Methylcholanthren	56-49-5	

VERFAHREN

Behandlung mit der Prüfchemikalie

33. Proliferierende Zellen werden mit und ohne Stoffwechselaktivierungssystem mit der Prüfchemikalie behandelt. Die Exposition sollte über einen geeigneten Zeitraum (gewöhnlich 3-4 Stunden) erfolgen. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass diese Anforderungen sich von denen für Humanpharmazeutika unterscheiden können (59). Wenn die Kurzzeit-Behandlung zu negativen Ergebnissen führt und verfügbare Informationen eine längere Behandlung als erforderlich erscheinen lassen [z. B. bei Nucleosidanalogen oder schlecht löslichen Chemikalien (5) (59)], ist beim MLA die Durchführung der Prüfung mit längeren Behandlungszeiten (d. h. 24 Stunden ohne S9) in Erwägung zu ziehen.
34. Wie viele Zellen für jede Prüfung und für jedes Stadium der Prüfung (Kontrolle und behandelte Kultur) mindestens zu verwenden sind, hängt von der Spontanmutationshäufigkeit ab. Als Faustregel gilt, dass in jeder Versuchskultur ausreichend Zellen behandelt werden sollten und eine hinreichende Passagenanzahl erreicht werden sollte, um in allen Stadien der Prüfung (Behandlung, Expression des Phänotyps und Mutantenselektion) mindestens 10 bzw. im Idealfall 100 Spontanmutationen zu erhalten (56).
35. Beim MLA liegt eine annehmbare Spontanmutationshäufigkeit bei $35-140 \times 10^{-6}$ (Agar-Methode) bzw. bei $50-170 \times 10^{-6}$ (Microwell-Methode) (siehe Tabelle 2). Um pro Prüfkultur mindestens 10 und im Idealfall 100 Spontanmutationen zu erhalten, die die Behandlung überleben, müssen mindestens 6×10^6 Zellen behandelt werden. Die Behandlung dieser Anzahl an Zellen und der Erhalt einer hinreichenden Anzahl an Zellen während der Expression und beim Klonen für die Mutantenselektion führt in allen Phasen des Versuchs zu einer hinreichenden Anzahl an Spontanmutationen (mindestens 10) – selbst bei Kulturen, die mit Konzentrationen behandelt wurden, bei denen sich eine Zytotoxizität von 90 % ergibt (nachgewiesen anhand eines RTG von 10 %) (19) (38) (39).
36. Die Spontanmutationshäufigkeit liegt bei Tk6 in der Regel zwischen 2 und 10×10^{-6} . Um pro Prüfkultur mindestens 10 Spontanmutationen zu erhalten, die die Behandlung überleben, müssen in jeder Kultur mindestens 20×10^6 Zellen behandelt werden. Die Behandlung dieser Anzahl an Zellen führt selbst bei Kulturen, die mit Konzentrationen behandelt wurden, bei denen sich eine Zytotoxizität von 90 % (RS 10 %) ergibt, zu einer hinreichenden Anzahl an Spontanmutationen (mindestens 10). Außerdem muss während der Expressionszeit eine hinreichende Anzahl an Zellen kultiviert und zur Mutantenselektion plattiert werden (60).

Expressionszeit des Phänotyps und Messung der Zytotoxizität und der Mutantenhäufigkeit

37. Im Anschluss an die Behandlungsphase werden die Zellen über einen bestimmten Zeitraum kultiviert, um für jede Zelllinie eine annähernd optimale spezifische Expression des Phänotyps neu induzierter Mutanten zu ermöglichen. Beim MLA beträgt die Expressionszeit des Phänotyps 2 Tage. Bei der TK6-Prüfung dauert die Expression des Phänotyps 3-4 Tage. Bei einer 24-stündigen Behandlung beginnt die Expressionszeit am Ende der Behandlung.
38. Während der Expressionszeit des Phänotyps werden die Zellen täglich gezählt. Beim MLA wird anhand der täglichen Zellzählungen das tägliche Suspensionswachstum (SG) berechnet. Nach der 2-tägigen Expressionszeit werden die Zellen mit und ohne selektierendes Agens zur Bestimmung der Mutantenzahl (Selektionsplatten) bzw. der Klonierungseffizienz (Viabilitätsplatten) im Medium suspendiert. Beim MLA sind zwei Methoden zum Klonen für die Mutantenselektion annehmbar: die Soft-Agar-Methode und die Methode mit dem flüssigen Medium in 96-Well-Platten (19) (38) (39). Die Klonierung bei der TK6-Prüfung erfolgt mit flüssigen Medien und einer 96-Well-Platte (16).
39. Als selektierendes Agens für *TK*-Mutanten wird ausschließlich Trifluorothymidin (TFT) empfohlen (61).
40. Beim MLA werden die Agar- und die Microwell-Platten nach 10- bis 12-tägiger Inkubation gezählt. Bei der TK6-Prüfung werden die Kolonien der früh auftretenden Mutanten auf den Microwell-Platten nach 10-14 Tagen gezählt. Zur Rückgewinnung der langsam wachsenden (spät auftretenden) TK6-Mutanten müssen die Zellen nach dem Zählen der früh auftretenden Mutanten nochmals mit dem Wachstumsmedium versorgt und mit TFT behandelt werden. Anschließend werden die Platten weitere 7-10 Tage inkubiert (62). Hinweise zur Zählung langsam und normal wachsender *TK*-Mutanten siehe Nummern 42 und 44.
41. Die Berechnungen bei den beiden Untersuchungen mit den beiden Methoden (Agar- und Microwell-Methode) beim MLA werden in Anlage 2 erläutert. Beim MLA mit der Agar-Methode werden die Kolonien gezählt, und die Anzahl der Mutantenkolonien wird entsprechend der Klonierungseffizienz bereinigt, um die Mutantenhäufigkeit (MF) zu berechnen. Beim MLA mit der Microwell-Methode und bei der TK6-Prüfung wird die Klonierungseffizienz sowohl der Platten zur Selektion als auch der Platten zur Bestimmung der Klonierungseffizienz nach der Poisson-Verteilung bestimmt (63). Aufgrund der jeweils ermittelten Klonierungseffizienz wird die MF berechnet.

Charakterisierung der Mutantenkolonien

42. Wenn die Prüfchemikalie beim MLA einen positiven Befund ergibt (Nummern 62 und 63), sollte die Charakterisierung nach Größe und Wachstumsentwicklung der Kolonien zumindest bei einer der Prüfkulturen (im Allgemeinen der mit der höchsten positiven Konzentration) sowie bei den Negativ- und den Positivkontrollen erfolgen. Ergibt sich bei der Prüfchemikalie ein negativer Befund (Nummer 64), so ist eine Charakterisierung der Mutantenkolonien bei den Negativ- und Positivkontrollen vorzunehmen. Beim MLA mit der Microwell-Methode werden Mutantenkolonien als klein betrachtet, die weniger als 25 % des Durchmessers eines Wells bedecken. Als groß gelten Mutantenkolonien, die mehr als 25 % des Well-Durchmessers bedecken. Bei der Agar-Methode werden die Mutantenkolonien und die Koloniegrößen mit einem automatischen Kolonienzähler bestimmt. Die Ansätze zur Bestimmung von Koloniegrößen werden in der Fachliteratur erläutert (19) (38) (40). Die Charakterisierung der Kolonien auf der Negativ- und der Positivkontrolle wird als Nachweis dafür benötigt, dass die Untersuchungen ordnungsgemäß durchgeführt wurden.
43. Für eine Prüfchemikalie kann kein negativer Befund festgestellt werden, wenn in der Positivkontrolle weder große noch kleine Mutantenkolonien angemessen nachgewiesen werden können. Die Charakterisierung der Kolonien kann allgemein Aufschluss darüber geben, ob eine Prüfchemikalie Punktmutationen und/oder Chromosomenveränderungen auslösen kann (Nummer 4).
44. TK6: Normal und langsam wachsende Mutanten unterscheiden sich durch die Inkubationszeit (Nummer 40). Bei der TK6-Prüfung werden sowohl früh als auch spät auftretende Mutanten bei allen Kulturen einschließlich der Negativ- und der Positivkontrollen bewertet. Die Charakterisierung der Kolonien der Negativ- und der Positivkontrolle wird als Nachweis dafür benötigt, dass die Untersuchungen ordnungsgemäß durchgeführt wurden. Für eine Prüfchemikalie kann kein negativer Befund festgestellt werden, wenn in der Positivkontrolle weder früh noch spät auftretende Mutantenkolonien angemessen nachgewiesen werden können. Die Charakterisierung der Kolonien kann allgemein Aufschluss darüber geben, ob eine Prüfchemikalie Punktmutationen und/oder Chromosomenveränderungen auslösen kann (Nummer 4).

Kompetenz des Labors

45. Um ausreichende Erfahrungen mit der Prüfung nachzuweisen, bevor routinemäßige Prüfungen erfolgen, sollte das Labor eine Reihe von Versuchen mit positiven Referenzstoffen durchgeführt haben, die sich unterschiedlicher Mechanismen (mindestens ein aktiver Mechanismus mit und ein aktiver Mechanismus ohne Stoffwechselaktivierung, ausgewählt aus den in Tabelle 1 aufgeführten Stoffen) und verschiedener Negativkontrollen (unter Verwendung verschiedener

Lösungsmittel/Vehikel) bedienen. Die Reaktionen dieser Positiv- und Negativkontrollen sollten mit der Literatur im Einklang stehen. Dies gilt nicht für erfahrene Laboratorien, d. h. für Laboratorien, die über eine historische Datenbank im Sinne der Nummern 47-50 verfügen. Bei der MLA sollten die für die Positiv- und die Negativkontrollen ermittelten Werte im Einklang mit den IWGT-Empfehlungen stehen (siehe Tabelle 2).

46. Bei kurzer Behandlungsdauer sowie dann, wenn keine Stoffwechselaktivierung erfolgt ist, sollte eine Auswahl von Positivkontrollstoffen (siehe Tabelle 1) mit kurzer und (bei längeren Behandlungen) mit langer Behandlungsdauer untersucht werden, um die Fähigkeit zur Erkennung mutagener Chemikalien nachzuweisen und die Wirksamkeit des Stoffwechselaktivierungssystems zu ermitteln und zum einen die Eignung der Bedingungen für das Zellwachstum während der Behandlung sowie für die phänotypische Expression und für die Mutantenselektion und zum anderen die Eignung der Auswertungsverfahren zu belegen. Zum Nachweis der Empfindlichkeit und dynamischen Bandbreite des Versuchssystems sollte eine Spanne der Konzentrationen der ausgewählten Stoffe festgelegt werden, um reproduzierbare und konzentrationsabhängige Zunahmen gegenüber dem Hintergrund zu erhalten.

Historische Kontrolldaten

47. Das Labor sollte Folgendes bestimmen:

- den Bereich und die Verteilung historischer Positivkontrollen und
- den Bereich und die Verteilung historischer Negativkontrollen (unbehandelt, Lösungsmittel).

48. Bei der erstmaligen Erfassung von Daten zur Verteilung einer historischen Negativkontrolle sollten gleichzeitige Negativkontrollen veröffentlichten Negativkontrolldaten entsprechen. Werden weitere Versuchsdaten zur Verteilung der Kontrollen hinzugefügt, sollten gleichzeitige Negativkontrollen idealerweise innerhalb der Kontrollgrenzen von 95 % der gewählten Verteilung liegen (64) (65).

49. Die Datenbank des Labors zu historischen Negativkontrollen sollte zunächst mit mindestens 10 Versuchen angelegt werden. Vorzugsweise sollte sie jedoch aus mindestens 20 Versuchen bestehen, die unter vergleichbaren Versuchsbedingungen durchgeführt wurden. Labors sollten Qualitätskontrollverfahren anwenden, wie z. B. Qualitätsregelkarten (z. B. C-Karten oder X-Bar-Karten) (65), um zu ermitteln, wie variabel ihre Positiv- und Negativkontrolldaten sind, und um nachzuweisen, dass die Methodik in ihrem Labor kontrolliert wird (66). Nähere Informationen und Empfehlungen zum Sammeln und zur Verwendung historischer Daten sind der Fachliteratur zu entnehmen (64).

50. Negativkontrolldaten sollten die Mutantenhäufigkeit aus einer Einzelkultur oder vorzugsweise aus Replikatkulturen erfassen, wie in Nummer 27 beschrieben. Gleichzeitige Negativkontrollen sollten idealerweise innerhalb der Kontrollgrenzen von 95 % der Verteilung in der Datenbank des Labors zu historischen Negativkontrollen liegen. Sofern Negativkontrolldaten außerhalb der Kontrollgrenze von 95 % liegen, ist es zulässig, sie in die historische Kontrollverteilung aufzunehmen, solange es sich bei den Daten nicht um „extreme Ausreißer“ handelt und nachgewiesen werden kann, dass das Prüfsystem kontrolliert wird (Nummer 49) und dass kein technisches oder menschliches Versagen vorliegt.
51. Sämtliche Änderungen am Versuchsprotokoll sind auf Übereinstimmung mit den bereits vorhandenen historischen Kontrolldaten zu prüfen. Bei größeren Inkonsistenzen sollte eine neue Datenbank historischer Kontrolldaten erstellt werden.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Darstellung der Prüfergebnisse

52. Die Darstellung der Daten des MLA und der TK6-Prüfung sollte für behandelte Kulturen und für Kontrollkulturen die erforderlichen Daten für die Berechnung der Zytotoxizität (RTG bzw. RS) und die Mutantenhäufigkeit beinhalten wie im Folgenden beschrieben.
53. Beim MLA sollten für die jeweiligen Kulturen das RSG und das RTG, die Kolonierungseffizienz zum Zeitpunkt der Mutantenselektion und die Anzahl der Mutantenkolonien (Agar-Methode) bzw. die Anzahl der leeren Wells (Microwell-Methode) angegeben werden. Unter der Mutantenhäufigkeit ist der zahlenmäßige Anteil der Mutantenzellen pro Million überlebender Zellen zu verstehen. Bei einer positiven Reaktion sollten die Mutantenhäufigkeiten kleiner und großer Kolonien (und/oder die Prozentanteile der Gesamtmutationshäufigkeit) für mindestens eine Konzentration der Prüfchemikalie (im Allgemeinen die höchste Konzentration mit positivem Befund) sowie für die Negativ- und die Positivkontrolle angegeben werden. Bei einer negativen Reaktion sollte die Mutantenhäufigkeit für die Negativ- und für die Positivkontrolle angegeben werden.
54. Bei der TK6-Prüfung sollten für die einzelnen Kulturen jeweils die relative Überlebensrate (RS), die Klonierungseffizienz zum Zeitpunkt der Mutantenselektion und die Anzahl der leeren Wells bei früh und bei spät auftretenden Mutanten angegeben werden. Die MF sollte als Anzahl der Mutantenzellen bezogen auf die Anzahl der überlebenden Zellen angegeben werden und die Gesamtmutationshäufigkeit sowie die Mutantenhäufigkeit (und/oder den Prozentanteil der Gesamtmutationshäufigkeit) der früh und der spät auftretenden Mutanten beinhalten.

Akzeptanzkriterien

55. Beim MLA und bei der TK6-Prüfung sollten die folgenden Anforderungen erfüllt sein, bevor die Gesamtergebnisse einer Prüfchemikalie ermittelt werden.

- Beide Versuchsanordnungen (kurzzeitige Behandlung mit und ohne Stoffwechselaktivierung – siehe Nummer 33) wurden geprüft, sofern nicht bereits mit einer Versuchsanordnung ein positiver Befund ermittelt wurde.
- Für die Untersuchung ist eine angemessene Anzahl an Zellen und Konzentrationen verfügbar (Nummern 27 und 34-36).
- Die Kriterien für die Auswahl der höchsten Konzentration entsprechen den Kriterien unter den Nummern 28-30.

Akzeptanzkriterien für Positiv- und Negativkontrollen

56. Die von der IWGT Expert MLA Workgroup durchgeführte Untersuchung umfangreicher MLA-Daten führte zu einem internationalen Konsens in Bezug auf bestimmte Akzeptanzkriterien für den MLA (1) (2) (3) (4) (5). Daher enthält die Prüfmethode spezifische Empfehlungen für die Akzeptanz negativer und positiver Kontrollen und für die Bewertung der Ergebnisse einzelner Stoffe beim MLA. Bei der TK6-Prüfung ist die Datenbasis erheblich kleiner, und die verfügbaren Daten wurden nicht von der Arbeitsgruppe evaluiert.

57. Beim MLA sollte bei jedem Versuch geprüft werden, ob die nicht behandelte Kultur/Lösungsmittelkontrolle die Akzeptanzkriterien der IWGT MLA Workgroup ((4) und folgende Tabelle 2) in Bezug auf die folgenden Punkte erfüllt: (1) MF (wobei zu beachten ist, dass die IWGT beim MLA je nach Verwendung der Agar- oder der Microwell-Methode unterschiedliche MFs ansetzt), (2) Klonierungseffizienz (CE) zum Zeitpunkt der Mutantenselektion und (3) Suspensionswachstum (SG) der Lösungsmittelkontrolle (Formel siehe Anlage 2).

Tabelle 2: Akzeptanzkriterien des MLA

Parameter	Soft-Agar-Methode	Microwell-Methode
Mutantenhäufigkeit	35-140 x 10 ⁻⁶	50-170 x10 ⁻⁶
Klonierungseffizienz	65-120 %	65-120 %
Suspensionswachstum	8- bis 32-fach (3- bis 4-stündige Behandlung) 32- bis 180-fach (24-stündige Behandlung, wenn durchgeführt)	8- bis 32-fach (3- bis 4-stündige Behandlung) 32- bis 180-fach (24-stündige Behandlung, wenn durchgeführt)

58. Beim MLA sollte bei jeder Prüfung auch bewertet werden, ob die Positivkontrolle/n mindestens eines der beiden folgenden von der IWGT-Arbeitsgruppe entwickelten Akzeptanzkriterien erfüllt/erfüllen:
- Bei der Positivkontrolle ist eine absolute Zunahme der Gesamtmutationshäufigkeit (d. h. eine Zunahme über die Häufigkeit der spontanen Hintergrundmutationen hinaus [eine induzierte MF (IMF)] von mindestens 300×10^{-6}) festzustellen. Mindestens 40 % der IMF sollten sich in der Häufigkeit kleiner Mutantenkolonien widerspiegeln.
 - Die Positivkontrolle führt zu einer Zunahme der Häufigkeit kleiner Mutantenkolonien um mindestens 150×10^{-6} gegenüber der Häufigkeit bei der gleichzeitigen unbehandelten Kontrolle/Lösungsmittelkontrolle (eine induzierte Häufigkeit kleiner Mutantenkolonien von 150×10^{-6}).
59. Bei der TK-Prüfung gilt eine Untersuchung als annehmbar, wenn die gleichzeitige Negativkontrolle als zulässig für die Aufnahme in die Datenbank des Labors mit historischen Negativkontrolldaten betrachtet wird (Nummern 48 und 49). Außerdem sollten die gleichzeitigen Positivkontrollen (Nummer 32) Reaktionen hervorrufen, die mit den Reaktionen kompatibel sind, die in der Datenbank für historische Positivkontrollen erzeugt werden, und gegenüber den gleichzeitigen Negativkontrollen eine statistisch signifikante Zunahme aufweisen.
60. Bei beiden Prüfungen sollte der obere Grenzwert der bei der Positivkontrolle festgestellten Zytotoxizität identisch mit dem Wert der Versuchskulturen sein. Das RTG bzw. die RS darf nicht weniger als 10 % betragen. Die Verwendung einer einzelnen Konzentration (bzw. einer der Konzentrationen der Positivkontrollkulturen, wenn mehrere Konzentrationen verwendet werden) ist hinreichend für den Nachweis, dass die Akzeptanzkriterien der Positivkontrolle erfüllt wurden. Außerdem muss die MF der Positivkontrolle im für das Labor festgestellten annehmbaren Bereich liegen.

Beurteilung und Auswertung der Ergebnisse

61. Im Zusammenhang mit der MLA hat die Mauslymphom-Sachverständigengruppe (Mouse Lymphoma Expert Workgroup) der IWGT umfangreiche Arbeiten zur biologischen Relevanz und zu den Kriterien für eine positive Reaktion durchgeführt (4). Daher enthält diese Prüfmethode spezifische Empfehlungen für die Auswertung der mit dem MLA ermittelten Ergebnisse der Prüfchemikalien (Nummern 62-64). Bei der TK6-Prüfung ist die Datenbasis erheblich kleiner, und die verfügbaren Daten wurden nicht von der Arbeitsgruppe evaluiert. Daher sind die Empfehlungen zur Auswertung der Daten bei der TK6-Prüfung allgemeiner gehalten (Nummern 65 und 66). Weitere Empfehlungen gelten für beide Prüfungen (Nummern 67-71).

MLA

62. Ein Ansatz zur Festlegung positiver und negativer Reaktionen wird empfohlen, um sicherzustellen, dass die erhöhte MF biologisch relevant ist. Anstelle der bei anderen Prüfungen üblichen statistischen Analysen wird bei dieser Prüfung von der Verwendung einer festgelegten induzierten Mutantenhäufigkeit (d. h. einer Zunahme der MF gegenüber der gleichzeitigen Kontrolle) ausgegangen; dieser globale Bewertungsfaktor (GEF) beruht auf der Analyse der Verteilung der MF-Daten der Negativkontrolle der beteiligten Labors (4). Beim MLA unter Verwendung der Agar-Methode beträgt der GEF 90×10^{-6} , und bei der Microwell-Methode wird ein GEF von 126×10^{-6} angenommen.
63. Unter der Voraussetzung, dass alle Akzeptanzkriterien erfüllt sind, gilt eine Prüfchemikalie als eindeutig positiv, wenn bei einer der getesteten Versuchsbedingungen (Nummer 33) die über den gleichzeitigen Hintergrund hinausgehende MF-Zunahme den GEF überschreitet und die Zunahme konzentrationsabhängig ist. (Dies wird beispielsweise mit einem Trendtest festgestellt.) Es wird dann davon ausgegangen, dass die Prüfchemikalie Mutationen in diesem Versuchssystem auslösen kann.
64. Sofern alle Akzeptanzkriterien erfüllt sind, wird eine Prüfchemikalie als eindeutig negativ bewertet, wenn bei allen geprüften Versuchsbedingungen (Nummer 33) keine konzentrationsabhängige Reaktion festgestellt wurde bzw. – wenn eine Zunahme der MF zu verzeichnen ist – wenn die Zunahme der MF den GEF nicht überschreitet. Es wird dann davon ausgegangen, dass die Prüfchemikalie keine Mutationen in diesem Versuchssystem auslösen kann.

TK6

65. Unter der Voraussetzung, dass alle Akzeptanzkriterien erfüllt sind, gilt eine Prüfchemikalie als eindeutig positiv, wenn bei einer der getesteten Versuchsbedingungen (siehe Nummer 33):
- mindestens eine der Versuchskonzentrationen weist gegenüber der gleichzeitigen Negativkontrolle eine statistisch signifikante Zunahme auf,
 - ein geeigneter Trendtest zeigt, dass die Zunahme konzentrationsabhängig ist (Nummer 33),
 - Ergebnisse liegen außerhalb der Verteilung der historischen Negativkontrolldaten (z. B. auf einer Poisson-Verteilung beruhende Kontrollgrenze von 95 %, siehe Nummer 48).

Sind all diese Kriterien erfüllt, wird davon ausgegangen, dass die Prüfchemikalie in diesem Versuchssystem Mutationen auslösen kann. Für Empfehlungen zu den am besten geeigneten statistischen Methoden siehe Literaturhinweise (66) (67).

66. Unter der Voraussetzung, dass alle Akzeptanzkriterien erfüllt sind, gilt eine Prüfchemikalie als eindeutig negativ, wenn in allen getesteten Versuchsbedingungen (siehe Punkt 33):

- keine der Versuchskonzentrationen eine statistisch signifikante Zunahme gegenüber der gleichzeitigen Negativkontrolle aufweist,
- die Bewertung anhand einer geeigneten Trendprüfung keine konzentrationsabhängige Zunahme ergibt,
- alle Ergebnisse innerhalb der Verteilung der historischen Negativkontrolldaten liegen (z. B. auf einer Poisson-Verteilung beruhende Kontrollgrenze von 95 %, siehe Nummer 48).

Es wird dann davon ausgegangen, dass die Prüfchemikalie keine Mutationen in diesem Versuchssystem auslösen kann.

MLA und TK6:

67. Wenn die Höchstkonzentration auf der Zytotoxizität beruht, sollte bei der Höchstkonzentration ein relatives Gesamtwachstum bzw. eine relative Überlebensrate von 10-20 % erreicht werden. Allgemeiner Konsens ist, dass bei der Auswertung positiver Ergebnisse ausschließlich mit RTG- bzw. RS-Werten im Bereich zwischen 10 und 20 % Vorsicht geboten ist und dass Ergebnisse dann nicht als positiv zu bewerten sind, wenn die Zunahme der MF ausschließlich im Umfang von höchstens eines RTG- bzw. RS-Werts von 10 % (wenn ermittelt) erfolgt (2) (59).
68. In einigen Fällen können zusätzliche Informationen bei der Feststellung hilfreich sein, dass eine Prüfchemikalie nicht mutagen wirkt, wenn keine Kultur vorliegt, bei der ein RTG-Wert im Bereich von 10-20 % der RTG-/RS-Werte ermittelt wird. Dies gilt für folgende Fälle: (1) Es gibt bei einer Reihe von Datenpunkten im Bereich von 20-100 % der RTG-/RS-Werte keine Anzeichen für eine Mutagenität (z. B. keine Dosis-Reaktion, keine Mutantenhäufigkeiten über die in der gleichzeitigen Negativkontrolle oder die historisch ermittelten Häufigkeiten hinaus), und mindestens ein Datenpunkt liegt im Bereich von 20-25 % der RTG-/RS-Werte. (2) Es gibt bei einer Reihe von Datenpunkten im Bereich von 25-100 % der RTG-/RS-Werte keine Anzeichen für eine Mutagenität (z. B. keine Dosis-Reaktion, keine Mutantenhäufigkeiten über die in der gleichzeitigen Negativkontrolle festgestellten Häufigkeiten oder über die historisch ermittelten Häufigkeiten hinaus) und einen negativen Datenpunkt geringfügig unter 10 % der RTG-/RS-Werte. In beiden Fällen kann für die Prüfchemikalie ein negativer Befund festgestellt werden.
69. Bei einer eindeutig positiven oder negativen Reaktion ist eine Verifizierung nicht erforderlich.

70. In den Fällen, in denen die Reaktion, wie oben beschrieben, weder eindeutig negativ noch eindeutig positiv ist, und/oder um die biologische Relevanz eines Ergebnisses zu untermauern, sollten die Daten durch eine fachkundige Beurteilung und/oder anhand weiterer Untersuchungen bewertet werden. Die Durchführung eines Wiederholungsversuchs, möglicherweise unter veränderten Versuchsbedingungen [z. B. Abstände der Konzentrationen, um die Wahrscheinlichkeit der Ermittlung von Datenpunkten im RTG-/RS-Bereich von 10-20 % zu erhöhen, sowie die Verwendung anderer Stoffwechselaktivierungsbedingungen (d. h. Konzentration oder Herkunft von S9) und eine Änderung der Behandlungsdauer], könnte hilfreich sein.
71. In seltenen Fällen erlaubt der Datensatz selbst nach weiteren Untersuchungen keine definitive Aussage zu positiven oder negativen Ergebnissen. Daher sollte die Reaktion der Prüfchemikalie als nicht eindeutig eingestuft werden (d. h. für ein positives und für ein negatives Ergebnis besteht die gleiche Wahrscheinlichkeit).

PRÜFBERICHT

72. Der Prüfbericht sollte folgende Angaben enthalten:

Prüfchemikalie:

- Herkunft, Partienummer, ggf. begrenztes Verwendungsdatum;
- Stabilität der Prüfchemikalie, falls bekannt;
- Löslichkeit und Stabilität der Prüfchemikalie im Lösungsmittel, falls bekannt;
- Messung des pH-Werts, der Osmolalität und ggf. des Niederschlags im Kulturmedium, dem die Prüfchemikalie zugegeben wurde.

Einkomponentiger Stoff:

- physikalisches Erscheinungsbild, Wasserlöslichkeit und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften;
- chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS-Bezeichnung, CAS-Nummer, SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel, Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.

Mehrkomponentiger Stoff, UVCB-Stoffe und Gemische:

- So weit wie möglich Charakterisierung durch die chemische Zusammensetzung (siehe oben), das quantitative Vorkommen und die relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften der einzelnen Komponenten.

Lösungsmittel:

- Begründung der Auswahl des Lösungsmittels;

- Anteil des Lösungsmittels im endgültigen Kulturmedium.

Zellen:

Bei Labor-Masterkulturen:

- Art und Herkunft der Zellen und Historie des Prüflabors;
- Karyotypmerkmale und/oder Modalzahl der Chromosomen;
- zum Erhalt der Zellkultur verwendete Verfahren;
- Nichtvorhandensein von Mycoplasma;
- Verdopplungszeit der Zellen.

Prüfbedingungen:

- Begründung der Wahl der Konzentrationen und der Anzahl der Zellkulturen darunter z. B. Angaben zur Zytotoxizität und Löslichkeitsgrenze;
- Medienzusammensetzung, CO₂-Konzentration, Feuchtigkeit;
- Konzentration der Prüfchemikalie, ausgedrückt als Endkonzentration im Kulturmedium (z. B. µg oder mg/ml oder mM des Kulturmediums);
- Konzentration (und/oder Volumen) des Lösungsmittels und der beigegebenen Prüfchemikalie;
- Inkubationstemperatur;
- Inkubationszeit;
- Behandlungsdauer;
- Zelldichte während der Behandlung;
- Art und Zusammensetzung des Stoffwechselaktivierungssystems (Herkunft von S9, Zubereitungsmethode des S9-Gemisches, Konzentration oder Volumen des S9-Gemisches und S9 im Endmedium, Qualitätskontrollen von S9);
- Positiv- und Negativkontrollstoffe, Endkonzentrationen für die jeweiligen Behandlungsbedingungen;
- Dauer der Expressionszeit (ggf. einschließlich Anzahl der überimpften Zellen, Subkulturen und Medienwechsel);
- Bezeichnung und Konzentration des selektierenden Agens;
- beim MLA verwendete Methode (Agar oder Microwell);
- Akzeptanzkriterien für die Prüfungen;
- Methoden zur Zählung der lebensfähigen und mutierten Zellen;

- Methoden zur Bestimmung der Zytotoxizität;
- evtl. zusätzliche Angaben zur Zytotoxizität und zum verwendeten Verfahren;
- Inkubationszeiten nach dem Plattieren;
- Angaben zur Berücksichtigung der Kolonien nach Größe und Typ (ggf. einschließlich Kriterien für „kleine“ und „große“ Kolonien);
- Kriterien zur Einstufung der Studien als positiv, negativ oder nicht eindeutig;
- Methoden zur Bestimmung des pH-Werts, der Osmolalität (wenn durchgeführt) und des Niederschlags (wenn relevant).

Ergebnisse:

- Anzahl der behandelten Zellen und Anzahl der subkultivierten Zellen der einzelnen Kulturen;
- Toxizitätsparameter (RTG beim MLA und RS bei der TK6-Prüfung);
- Anzeichen für Ausfällungen und Bestimmungszeit;
- Anzahl der plattierten Zellen im selektierenden und im nicht selektierenden Medium
- Anzahl der Kolonien im nicht selektierenden Medium und Anzahl der resistenten Kolonien im selektierenden Medium sowie entsprechende Mutantenhäufigkeiten;
- Koloniegröße bei Negativ- und Positivkontrollen und die Angabe, ob die Prüfchemikalie zumindest in einer Konzentration positiv ist, sowie die entsprechenden Mutantenhäufigkeiten;
- nach Möglichkeit Dosis-Reaktions-Verhältnis;
- Daten zu gleichzeitigen Negativkontrollen (Lösungsmittelkontrollen) und Positivkontrollen (Konzentrationen und Lösungsmittel);
- historische Daten zu Negativkontrollen (Lösungsmittelkontrollen) und Positivkontrollen (Konzentrationen und Lösungsmittel) mit Bereichen, Mittelwerten und Standardabweichungen; Anzahl der Prüfungen, auf denen die historischen Kontrollen beruhen;
- statistische Analysen (für einzelne Kulturen und (ggf.) für gepoolte Replikatkulturen) sowie ggf. p-Werte; beim MLA zusätzlich die GEF-Bewertung.

Erörterung der Ergebnisse.

Schlussfolgerung.

LITERATUR

- (119) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J. (Berichterstatter), 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. und 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.
- (120) 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. und 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.
- (121) 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. und 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.
- (122) 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. und 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.
- (123) 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. und 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.

- (124) 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.
- (125) Fellows M.D., Luker, T., Cooper, A. und 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.
- (126) Honma, M., Momose, M., Sakamoto, H., Sofuni, T. und Hayashi, M. (2001). Spindol Poisons Induce Allelic Loss in Mouse Lymphoma Cells Through Mitotic Non-Disjunction. *Mutation Res.*, 493 (1-2): 101-114.
- (127) Wang, J., Sawyer, J.R., Chen, L., Chen, T., Honma, M., Mei, N. und Moore, M.M. (2009). The Mouse Lymphoma Assay Detects Recombination, Deletion, and Aneuploidy, *Toxicol. Sci.*, 109 (1): 96-105.
- (128) Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A. und 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.
- (129) Hozier, J., Sawyer, J., Moore, M., Howard, B. und Clive, D. (1981). Cytogenetic Analysis of the L5178Y/TK^{+/-} Leads to TK^{-/-} Mouse Lymphoma Mutagenesis Assay System, *Mutation Res.*, 84 (1): 169-181.
- (130) Hozier, J., Sawyer, J., Clive, D. und Moore, M.M. (1985). Chromosome 11 Aberrations in Small Colony L5178Y TK^{-/-} Mutants Early in their Clonal History, *Mutation Res.*, 147 (5): 237-242.
- (131) Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. und Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFTr) Mutants of L5178Y/TK^{+/-} Mouse Lymphoma Cells. *Mutation Res.*, 151 (1): 161-174.
- (132) Liber, H.L., Call, K.M. und 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.
- (133) Li, C.Y., Yandell, D.W. und 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.

- (134) Honma, M., Hayashi, M. und 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.
- (135) Honma, M., Momose, M., Tanabe, H., Sakamoto, H., Yu, Y., Little, J.B., Sofuni, T. und Hayashi, M. (2000). Requirement of Wild-Type P53 Protein for Maintenance of Chromosomal Integrity. *Mol. Carcinogen.*, 28 (4): 203-214.
- (136) Amundson, S.A. und 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.
- (137) Schisler, M.R., Moore, M.M. und Gollapudi, B.B. (2013). *In Vitro* Mouse Lymphoma (L5178Y TK^{+/+}-3.7.2C) Forward Mutation Assay. In *Protocols in Genotoxicity Assessment* A. Dhawan and M. Bajpayee (Eds.), Springer Protocols, Humana Press: 27-50.
- (138) Long, L.H., Kirkland, D., Whitwell, J. und 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.
- (139) Nesslany, F., Simar-Meintieres, S., Watzinger, M., Talahari, I. und Marzin, D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. *Environ. Mol. Mutagen.*, 49 (6): 439-452.
- (140) 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.
- (141) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. und Okumura, K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. *Mutation Res.*, 268 (2): 297-305.
- (142) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M.Jr, Brusick, D., Ashby, J. und Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Res.*, 257: 147-204.
- (143) Wang, J., Heflich, R.H. und 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.
- (144) Fischer, G.A. (1958). Studies on the Culture of Leukemic Cells *In Vitro*. *Ann. N.Y. Academy Sci.*, 76: 673-680.

- (145) Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson, A.G. und Brown, M.M.M. (1979). Validation and Characterization of the L5178Y/TK^{+/-} - Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. *Mutation Res.*, 59(1): 61-108.
- (146) Sawyer, J., Moore, M.M., Clive, D. und Hozier, J. (1985). Cytogenetic Characterization of the L5178Y TK^{+/-} 3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, *Mutation Res.*, 147 (5): 243-253.
- (147) Sawyer, J.R., Moore, M.M. und Hozier, J.C. (1989). High-Resolution Cytogenetic Characterization of the L5178Y TK^{+/-} Mouse Lymphoma Cell Line, *Mutation Res.*, 214 (2): 181-193.
- (148) Sawyer, J.R., Binz, R.L., Wang, J. und 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.
- (149) Fellows, M.D., McDermott, A., Clare, K.R., Doherty, A. und 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.
- (150) Storer, R.D., Jraynak, A.R., McKelvey, T.W., Elia, M.C., Goodrow, T.L. und 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.
- (151) Clark, L.S., Harrington-Brock, K., Wang, J., Sargent, L., Lowry, D., Reynolds, S.H. und 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.
- (152) Skopek, T.R., Liber, H.L., Penman, B.W. und 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.
- (153) 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.
- (154) Xia, F., Wang, X., Wang, Y.H., Tsang, N.M., Yandell, D.W., Kelsey, K.T. und 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.

- (155) 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 in Vorbereitung).
- (156) Lloyd, M. und Kidd, D. (2012). The Mouse Lymphoma Assay. Springer Protocols: Methods in Molecular Biology 817, Genetic Toxicology Principles and Methods, Hrsg. Parry and Parry, Humana Press. ISBN, 978-1-61779-420-9, 35-54.
- (157) Mei, N., Guo, X. und 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, und Caldwell (Hrsg.) , 2nd Edition, GW; Humana Press, Totowa, NJ.
- (158) Liber, H.L. und Thilly, W.G. (1982). Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploidhuman Lymphoblasts. *Mutation Res.*, 94 (2): 467-485.
- (159) Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Hay, R., Merten, OW., Price, A., Schechtman, L., Stacey, G. und 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.
- (160) Moore, M.M. und 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.
- (161) Ames, B.N., McCann, J. und Yamasaki, E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 31 (6): 347-364.
- (162) Maron, D.M. und Ames, B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 113 (3-4): 173-215.
- (163) Natarajan, , A.T., Tate, , A.D, Van Buul, , P.P.W., Meijers, M. und 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.

- (164) Matsuoka, A., Hayashi, M. und Ishidate, M. Jr. (1979). Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*. *Mutation Res.*, 66 (3): 277-290.
- (165) Ong, T.M., u. a. (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
- (166) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. und 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.
- (167) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. und 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., u. a., Hrsg., Elsevier, North-Holland, S. 85-88.
- (168) Galloway, S.M., u. a. (1994). Report from Working Group on *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations. *Mutation Res.*, 312 (3): 241-261.
- (169) Johnson, T.E., Umbenhauer, D.R. und 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.
- (170) UNEP (2001). Stockholmer Übereinkommen über persistente organische Schadstoffe, Umweltprogramm der Vereinten Nationen (UNEP).
- (171) Krahn, D.F., Barsky, F.C. und 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. und Schaich K.M. (Hrsg.). New York, Plenum, S. 91-103.
- (172) Zamora, , P.O., Benson, , J.M., Li, , A.P. und 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.
- (173) Asakura, M., Sasaki, T., Sugiyama, T., Arito, H., Fukushima, S. und 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.

- (174) Arlett, C.F., u. a. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Hrsg.), Cambridge University Press, S. 66-101.
- (175) Morita, T., Honma, M. und 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.
- (176) Brookmire, L., Chen, J.J. und Levy, D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay. *Environ. Mol. Mutagen.*, 54 (1): 36-43.
- (177) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Abrufbar unter: [<https://www.federalregister.gov/a/2012-13774>].
- (178) Honma, M. und 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.
- (179) Moore-Brown, M.M., Clive, D., Howard, B.E., Batson, A.G. und 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.
- (180) Liber, H.L., Yandell, D.W. und 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.
- (181) Furth, E.E., Thilly, W.G., Penman, B.W., Liber, H.L. und Rand, W.M. (1981). Quantitative Assay for Mutation in Diploid Human Lymphoblasts Using Microtiter Plates. *Anal. Biochem.*, 110 (1): 1-8.
- (182) Hayashi, M, Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H. J. und Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, *Mutation Res.*, 723 (2): 87-90.
- (183) Ryan, T.P. (2000). Statistical Methods for Quality Improvement. John Wiley and Sons, New York 2nd Edition.

- (184) 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (185) Fleiss, J.L., Levin, B. und Paik, M.C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

Anlage 1

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

Aneugen: Eine Chemikalie oder ein Prozess, die/der durch Wechselwirkung mit den Komponenten des mitotischen oder meiotischen Zellteilungszyklus zu Aneuploidie in Zellen oder Organismen führt.

Aneuploidie: Eine Abweichung von der normalen diploiden (oder haploiden) Chromosomenzahl durch ein einziges Chromosom oder mehr, nicht aber durch einen ganzen (oder mehrere) Chromosomensatz/-sätze (Polyploidie).

Basenpaaraustauschmutagene: Chemikalien, die den Austausch von Basenpaaren in der DNA verursachen.

Chemikalie: Ein Stoff oder ein Gemisch.

Expressionszeit des Phänotyps: Die Zeit nach der Behandlung, in der sich die genetische Alteration im Genom ausprägt und bereits vorhandene Genprodukte so weit abgebaut werden, dass die phänotypischen Eigenschaften verändert werden.

Genotoxisch: Ein allgemeiner Begriff, der alle Typen von DNA- oder Chromosomenschädigungen umfasst, einschließlich DNA-Brüchen, Addukt-Neubildungen, Mutationen, Chromosomenaberrationen sowie Aneuploidie. Nicht alle genotoxischen Effekte führen zu Mutationen oder stabilen Chromosomenschäden.

Klastogen: Chemikalie oder Prozess, die/der strukturelle Chromosomenaberrationen in Zell- oder Organismenpopulationen verursacht.

Klonierungseffizienz: Der Prozentanteil der mit einer niedrigen Dichte plattierten Zellen, die sich zu einer zählbaren Kolonie entwickeln können.

Lösungsmittelkontrolle: Veränderung der Chromosomenstruktur, nachweisbar durch mikroskopische Untersuchung des Metaphase-Stadiums der Zellteilung, äußert sich in Form von Deletionen und Fragmenten, intrachromosomalen oder reziproken Translokationen.

Mitotische Rekombination: Während der Mitose Rekombination homologer Chromatiden, die zur Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen oder einem Verlust der Heterozygotie führen kann.

Mutagen: Auslöser einer Erbgutveränderung der DNA-Basenpaarsequenz(en) in Genen oder in der Chromosomenstruktur (Chromosomenaberrationen).

Mutantenhäufigkeit (MF): Verhältnis der Anzahl der mutierten Zellen zur Anzahl der lebensfähigen Zellen.

Prüfchemikalie: Stoff oder Gemisch, der/das mit dieser Prüfmethode untersucht wird.

Rasterschubmutagene: Chemikalien, die die Addition oder Deletion eines oder

mehrerer Basenpaare im DNA-Molekül verursachen.

Relative Überlebensrate (RS): Die relative Überlebensrate wird als Maßstab für die behandlungsbedingte Zytotoxizität bei der TK6 angenommen. Dabei handelt es sich um die relative Klonierungseffizienz (CE) von unmittelbar nach der Behandlung ausplattierten Zellen bereinigt um Zellverluste während der Behandlung bezogen auf die Klonierungseffizienz der Negativkontrolle.

Relatives Gesamtwachstum (RTG): Das relative Gesamtwachstum ist ein Maß der behandlungsbedingten Zytotoxizität beim MLA. Das RTG ist ein Maß für das relative (auf die Vehikelkontrolle bezogene) Wachstum der Prüfkulturen während der Behandlung, der zweitägigen Expression und der Klonierung der selektionierten Mutanten im Laufe der Prüfung. Das RSG der einzelnen Prüfkulturen wird mit der relativen Klonierungseffizienz der Prüfkultur zum Zeitpunkt der Mutantenselektion multipliziert und bezogen auf die Klonierungseffizienz der Negativkontrolle/Lösungsmittelkontrolle ausgedrückt (Clive und Spector, 1975).

Relatives Suspensionswachstum (RSG): Beim MLA das innerhalb von zwei Tagen zu verzeichnende relative Gesamtwachstum der Suspension der Prüfkultur bezogen auf das Gesamtwachstum der Suspension der Negativkontrolle/Lösungsmittelkontrolle in zwei Tagen (Clive und Spector, 1975). Das RSG sollte das relative Wachstum der Prüfkultur bezogen auf die Negativkontrolle/Lösungsmittelkontrolle während der Behandlungszeit beinhalten.

S9-Gemisch: Gemisch aus der S9-Leberfraktion und für die metabolische Enzymaktivität notwendigen Ko-Faktoren.

S9-Leberfraktion: Überstand des Leberhomogenats nach Zentrifugieren mit 9000 g, d. h. Rohleberextrakt.

Suspensionswachstum (SG): Die n-fache Zunahme der Anzahl der Zellen im Laufe der Behandlung und der Expression während des MLA. Das SG wird durch Multiplikation der n-fachen Zunahme an Tag 1 mit der n-fachen Zunahme an Tag 2 bei der kurzzeitigen (3- bis 4-stündigen) Behandlung berechnet. Bei einer 24-stündigen Behandlung ist das SG die n-fache Zunahme während der 24-stündigen Behandlung multipliziert mit den n-fachen Zunahmen an den Expressionstagen 1 und 2.

Unbehandelte Kontrollen: Kulturen, die nicht behandelt werden (d. h. weder mit der Prüfchemikalie noch mit Lösungsmittel), jedoch in gleicher Weise aufgearbeitet werden wie die Kulturen, die mit der Prüfchemikalie behandelt werden.

Vorwärtsmutation: Genmutation vom Elterntyp zur mutierten Form, die eine Veränderung oder den Ausfall der Enzymaktivität oder der Funktion des kodierten Proteins bewirkt.

Zytotoxizität: Bei den Assays im Rahmen dieser Prüfmethode wird die Zytotoxizität als Reduzierung des relativen Gesamtwachstums (RTG) beim MLA bzw. der relativen Überlebensrate (RS) bei der TK6-Prüfung bezeichnet.

Anlage 2

FORMELN

Relative Populationsverdopplung (RPD)

Für die Durchführung des MLA mit der Agar- und der Microwell-Methode gilt:

Zytotoxizität ist das relative Gesamtwachstum (RTG); dieses beinhaltet das relative Suspensionswachstum (RSG) während der zweitägigen Expressionszeit und die zum Zeitpunkt der Mutantenselektion ermittelte relative Klonierungseffizienz (RCE). RTG, RSG und RCE werden in Prozent ausgedrückt.

Berechnung des RSG: Als Suspensionswachstum 1 (SG₁) wird das Wachstum zwischen Tag 0 und Tag 1 bezeichnet (Zellkonzentration an Tag 1 / Zellkonzentration an Tag 0). Suspensionswachstum 2 (SG₂) ist das Wachstum zwischen Tag 1 und Tag 2 (Zellkonzentration an Tag 2 / Zellkonzentration an Tag 1). Als RSG wird das Gesamtwachstum der Suspension (SG₁ x SG₂) der behandelten Kultur bezogen auf die unbehandelte Kontrolle / Lösungsmittelkontrolle bezeichnet. Dabei gilt: $RSG = [SG_{1(test)} \times SG_{2(test)}] / [SG_{1(control)} \times SG_{2(control)}]$ SG₁ sollte anhand der Ausgangszellkonzentration bei Beginn der Behandlung berechnet werden. Dabei werden unterschiedliche Zytotoxizitätswirkungen in der Prüfkultur / den Prüfkulturen während der Behandlung berücksichtigt.

Als RCE wird die relative Klonierungseffizienz der Prüfkultur bezogen auf die relative Klonierungseffizienz der unbehandelten Kontrolle / Lösungsmittelkontrolle zum Zeitpunkt der Mutantenselektion bezeichnet.

Relatives Gesamtwachstum (RTG): $RTG = RSG \times RCE$

TK6

Relative Überlebensrate (RS):

Die Zytotoxizität wird anhand der relativen Überlebensrate ermittelt, d. h. anhand der Klonierungseffizienz (CE) von Zellen, die nach der Behandlung umgehend plattiert werden; dabei ist eine Bereinigung um Zellverluste während der Behandlung im Vergleich zur Klonierungseffizienz bei Negativkontrollen (mit einer Überlebensrate von 100 %) vorzunehmen. Die Bereinigung um Zellverluste bei der Behandlung kann wie folgt vorgenommen werden:

$$\text{Bereinigte CE} = CE \times \frac{\text{Anzahl der Zellen am Ende der Behandlung}}{\text{Anzahl der Zellen bei Beginn der Behandlung}}$$

Die RS einer mit einer Prüfchemikalie behandelten RS wird wie folgt berechnet:

$$RS = \frac{\text{Bereinigte CE der behandelten Kultur}}{\text{Bereinigte CE der Lösungsmittelkontrolle}} \times 100$$

Mutantenhäufigkeit bei MLA und TK6

Als Mutantenhäufigkeit (MF) wird die Klonierungseffizienz von Mutantenkolonien im selektierenden Medium (CE_M) bereinigt um die Klonierungseffizienz im nicht selektierenden Medium zum Zeitpunkt der Mutantenselektion (CE_V) bezeichnet (d. h. $MF = CE_M/CE_V$). Im Folgenden wird die Berechnung der Klonierungseffizienz-Werte beim Klonieren mit der Agar-Methode und der Microwell-Methode beschrieben.

MLA mit der Agar-Methode: Beim MLA mit der Soft-Agar-Methode werden die Anzahl der Kolonien auf der Platte zur Mutantenselektion (C_M) und die Anzahl der Kolonien auf der Platte, die nicht zur Selektion von Mutanten, sondern zur Bestimmung der Klonierungseffizienz (Anzahl der lebensfähigen Klone) (C_V) vorgesehen ist, unmittelbar durch Zählen der Klone ermittelt. Wenn 600 Zellen zur Bestimmung der Klonierungseffizienz (CE) auf der Platte zur Mutantenselektion (CE_M) und auf der Platte, die nicht zur Selektion von Mutanten, sondern zur Bestimmung der Klonierungseffizienz (Anzahl der lebensfähigen Klone) (CE_V) vorgesehen ist, ausplattiert wurden, werden 3×10^6 Zellen zur Mutantenselektion verwendet.

$$CE_M = C_M / (3 \times 10^6) = (C_M / 3) \times 10^{-6}$$

$$CE_V = C_V / 600$$

MLA und TK6 – Microwell-Methode: Wenn der MLA mit der Microwell-Methode durchgeführt wird, werden C_M und C_V als Produkt der Gesamtzahl der Microwells (TW) und der wahrscheinlichen Anzahl der Kolonien pro Well (P) auf den Microwell-Platten ermittelt.

$$C_M = P_M \times TW_M$$

$$C_V = P_V \times TW_V$$

Beim Null-Term der Poisson-Verteilung (Furth u. a., 1981) wird P wie folgt berechnet:

$$P = -\ln(EW / TW)$$

Wobei gilt: EW = leere Wells und TW = Gesamtzahl der Wells. Daher ist

$$CE_M = C_M / T_M = (P_M \times TW_M) / T_M$$

$$CE_V = C_V / T_V = (P_V \times TW_V) / T_V$$

Bei Durchführung des MLA mit der Microwell-Methode wird die Mutantenhäufigkeit (kleine und große Kolonien) für kleine und große Kolonien auf die gleiche Weise jeweils anhand der Anzahl leerer Wells berechnet.

Bei der TK6-Prüfung wird die Mutantenhäufigkeit (kleine und große Kolonien) danach bestimmt, ob die Mutanten früh oder später auftreten.

B.68 *IN-VITRO*-PRÜFMETHODE MIT KURZZEITEXPOSITION ZUR ERMITTLUNG VON i) CHEMIKALIEN, DIE SCHWERE AUGENSCHÄDEN VERURSACHEN, UND ii) CHEMIKALIEN, DIE KEINE EINSTUFUNG ALS AUGENREIZEND ODER SCHWER AUGENSCHÄDIGEND ERFORDERN

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode (PM) entspricht der OECD-Prüfrichtlinie 491 (2017). Die Prüfmethode zur Untersuchung unter Kurzzeiteexposition ist eine *In-Vitro*-Methode, die unter bestimmten Umständen und mit bestimmten Einschränkungen zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien (Stoffen und Gemischen) verwendet werden kann, die schwere Augenschädigungen bzw. Augenreizungen im Sinne des GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals = Global harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung) (UN) (1) und der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen (CLP-Verordnung)¹ induzieren.
2. Über viele Jahre wurde das augengefährdende Potenzial von Chemikalien in erster Linie mit einem *In-vivo*-Kaninchenaugentest (PM B.5 (8), entsprechend OECD TG 405) geprüft. Es herrscht allgemeiner Konsens darüber, dass der *In-vivo*-Kaninchenaugentest in absehbarer Zukunft nicht in vollem Umfang durch eine einzelne alternative *In-vitro*-Prüfung ersetzt werden kann, die geeignet wäre, das gesamte Spektrum augenreizender bzw. schwer augenschädigender Reaktionen auf unterschiedliche Chemikalienklassen vorherzusagen. Unter Umständen könnte der Kaninchenaugentest jedoch durch strategische Kombinationen mehrerer alternativer Prüfmethoden im Rahmen einer (gestuften) Prüfstrategie vollständig ersetzt werden (2). Der Top-down-Ansatz ist zur Prüfung von Chemikalien ausgelegt, bei denen nach verfügbaren Informationen davon ausgegangen werden kann, dass sie stark reizend wirken oder schwere Augenschäden hervorrufen können. Mit dem Bottom-up-Ansatz werden Chemikalien geprüft, bei denen ausgehend von verfügbaren Informationen angenommen werden kann, dass sie keine Augenreizungen in einem Umfang induzieren, der eine Einstufung erfordern würde. Die Kurzzeit-Prüfmethode wird nicht als geeignet betrachtet, den *In-vivo*-Kaninchenaugentest vollständig zu ersetzen. Sie kann jedoch im Rahmen einer gestuften Prüfstrategie zu gesetzgeberischen Einstufungs- und

¹ Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen, zur Änderung und Aufhebung der Richtlinien 67/548/EWG und 1999/45/EG und zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 (ABl. L 353 vom 31.12.2008, S. 1).

Kennzeichnungszwecken verwendet werden (beispielsweise mit dem Top-down-/Bottom-up-Ansatz), um (i) Chemikalien, die schwere Augenschädigungen (UN-GHS-/CLP-Kategorie 1) induzieren, und (ii) Chemikalien (außer stark flüchtigen Stoffen und allen festen Chemikalien mit Ausnahme von Tensiden), die keine Einstufung als augenreizend oder schwer augenschädigend (UN-GHS-/CLP-Kategorie Keine Einstufung) erfordern, ohne weitere Prüfungen zu erkennen (1) (2). Bei Chemikalien, für die aufgrund der Kurzzeit-Prüfmethode weder eine schwer augenschädigende Wirkung (UN-GHS-/CLP-Kategorie 1) vorhergesagt noch erwartet wird, dass sie Augenreizungen oder schwere Augenschädigungen induzieren (UN-GHS-/CLP-Kategorie Keine Einstufung), müssen weitere Prüfungen durchgeführt werden, um eine endgültige Einstufung vornehmen zu können. Außerdem sollten die zuständigen Regulierungsbehörden konsultiert werden, bevor die Kurzzeitprüfung mit einem Bottom-Up-Ansatz unter Berücksichtigung einer anderen Klassifizierungsregelung als der des UN GHS bzw. der CLP-Verordnung durchgeführt wird. Die Auswahl der am besten geeigneten Prüfmethode und die Anwendung dieser Prüfmethode sollten unter Berücksichtigung des OECD-Leitliniendokuments über integrierte Prüfungs- und Bewertungsansätze (IATA = Integrated Approaches to Testing and Assessment) zur Untersuchung von schweren Augenschädigungen und von Augenreizungen (14) erfolgen.

3. Diese Prüfmethode beschreibt die Verfahrensschritte zur Beurteilung des augengefährdenden Potenzials einer Prüfchemikalie anhand ihrer Fähigkeit, in der Kurzzeitprüfung eine zytotoxische Wirkung hervorzurufen. Die zytotoxische Wirkung von Chemikalien auf Hornhaut-Epithelzellen ist eine erhebliche Wirkungsweise, die zu Schädigungen des Hornhautepithels und zu Augenreizungen führt. Die Zellviabilität wird bei der Kurzzeit-Prüfmethode durch Enzymkonversion des Vitalfarbstoffs MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid, auch als Thiazolyl-Blau-Tetrazoliumbromid bezeichnet) zu einem blauen Formazan-Salz gemessen, das nach seiner Extraktion aus Geweben quantifiziert wird (3). Die ermittelte Zellviabilität wird mit der Lösungsmittelkontrolle verglichen (relative Viabilität) und zur Abschätzung der potenziellen Augengefährdung durch die Prüfchemikalie verwendet. Prüfchemikalien sind dann als UN-GHS-/CLP-Kategorie 1 einzustufen, wenn sowohl die 5- als auch die 0,05 %ige Konzentration zu einer Zellviabilität von kleiner oder gleich ($\leq$) 70 % führt. Die UN-GHS-/CLP-Kategorie Keine Einstufung ist für Prüfchemikalien anzunehmen, bei denen sowohl die 5- als auch die 0,05 %ige Konzentration eine Zellviabilität von mehr als ($>$) 70 % ergibt.
4. Der Begriff „Prüfchemikalie“ bezeichnet bei dieser Prüfmethode das, was untersucht wird, und bezieht sich nicht auf die Anwendbarkeit der Kurzzeit-Prüfmethode zur Prüfung von Stoffen und/oder Gemischen. Es gelten die Begriffsbestimmungen der Anlage.

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN UND BEGRENZUNGEN

5. Diese Prüfmethode beruht auf einem von der Kao Corporation entwickelten Protokoll (4), das zwei getrennten Validierungsstudien unterzogen wurde: einer durch den Validierungsausschuss der Japanischen Gesellschaft für Alternativen zu Tierversuchen (JSAAE = Japanese Society for Alternative to Animal Experiments) (5) und einer durch das Japanische Zentrum zur Validierung alternativer Methoden (JaCVAM = Japanese Center for the Validation of Alternative Methods) (6). Das NICEATM und der ICCVAM haben ausgehend von den Berichten über die Validierungsstudien und von Background Review Documents zur Prüfmethode einen Peer-Review durchgeführt (7).
6. Bei der Ermittlung von Chemikalien (Stoffen und Gemischen), die schwere Augenschädigungen hervorrufen (UN-GHS-/CLP-Kategorie 1) (1), ergaben sich für die mit der Kurzzeit-Prüfmethode an 125 Chemikalien (sowohl Stoffe als auch Gemische) ermittelten Daten eine Gesamtgenauigkeit von 83 % (104/125), eine Falsch-positiv-Rate von 1 % (1/86) und eine Falsch-negativ-Rate von 51 % (20/39) im Vergleich zum *In-vivo*-Kaninchenaugentest (7). Die ermittelte Falsch-negativ-Rate ist in diesem Zusammenhang nicht maßgeblich, da alle Prüfchemikalien, bei denen eine Zellviabilität von ≤ 70 % bei einer Konzentration von 5 % und von > 70 % bei einer Konzentration von 0,05 % gemessen wird, anschließend je nach rechtlichen Anforderungen und gemäß der sequenziellen Prüfstrategie und den gegenwärtig empfohlenen evidenzbasierten Bewertungsansätzen (weight-of-evidence approach) ohnehin mit anderen angemessen validierten *In-vitro*-Prüfmethoden bzw. – als letzte Möglichkeit – mit dem *In-vivo*-Kaninchenaugentest geprüft werden (1) (8). Hauptsächlich wurden einkomponentige Stoffe geprüft; begrenzte Daten liegen jedoch auch über die Prüfung von Gemischen vor. Die Prüfmethode ist dennoch für die Prüfung von mehrkomponentigen Stoffen und Gemischen technisch geeignet. Bevor diese Prüfmethode jedoch für die Generierung von Daten für einen bestimmten Regelungszweck verwendet wird, sollte geprüft werden, ob sie für den beabsichtigten Zweck angemessene Ergebnisse liefert, und wenn dem so ist, warum. Solche Erwägungen entfallen, wenn die Prüfung des Gemischs gesetzlich vorgeschrieben ist. Im Hinblick auf die Eignung der Kurzzeit-Prüfmethode zur Entscheidung über die Einstufung von Prüfchemikalien in die UN-GHS-/CLP-Kategorie 1 wurden keine sonstigen spezifischen Defizite festgestellt. Prüfer können diese Prüfmethode für Prüfchemikalien einsetzen, und eine Zellviabilität von ≤ 70 % bei Konzentrationen von 5 % und von 0,05 % sollte als Indikator für eine schwer augenschädigende Wirkung betrachtet werden, nach der ohne weitere Prüfungen eine Einstufung in die UN-GHS-/CLP-Kategorie 1 vorzunehmen ist.
7. Bei der Ermittlung von Chemikalien (Stoffen und Gemischen), bei denen eine Einstufung aufgrund von Augenreizungen und schweren Augenschädigungen nicht

erforderlich ist (UN-GHS-/CLP-Kategorie Keine Einstufung), ergaben sich für die mit der Kurzzeit-Prüfmethode an 130 Chemikalien (sowohl Stoffe als auch Gemische) ermittelten Daten eine Gesamtgenauigkeit von 85 % (110/130), eine Falsch-negativ-Rate von 12 % (9/73) und eine Falsch-positiv-Rate von 19 % (11/57) im Vergleich zum *In-vivo*-Kaninchenaugentest (7). Wenn stark flüchtige Stoffe und feste Stoffe (außer Tensiden) aus dem Datensatz ausgeschlossen werden, erhöht sich die Gesamtgenauigkeit auf 90 % (92/102), die Falsch-negativ-Rate sinkt auf 2 % (1/54), und die Falsch-positiv-Rate bleibt bei 19 % (9/48) (7). Insoweit bestehen die potenziellen Defizite der Kurzzeit-Prüfmethode bei der Ermittlung von Prüfchemikalien, bei denen im Hinblick auf die Augenreizungen und schwere Augenschädigungen keine Einstufung vorzunehmen ist (UN-GHS-/CLP-Kategorie Keine Einstufung) in einer hohen Falsch-negativ-Rate bei i) stark flüchtigen Stoffen mit Dampfdrücken über 6 kPa und ii) festen Chemikalien (Stoffen und Gemischen) mit Ausnahme von Tensiden und Gemischen, die ausschließlich Tenside beinhalten. Bei diesen Chemikalien ist die Kurzzeit-Prüfmethode nicht anzuwenden (7).

8. Zusätzlich zu den in den Nummern 6 und 7 genannten Chemikalien enthält der mit der Kurzzeit-Prüfmethode generierte Datensatz auch interne Daten zu 40 Gemischen, mit denen sich im Vergleich zum *In-vivo*-Draize-Augentest eine Genauigkeit von 88 % (35/40), eine Falsch-positiv-Rate von 50 % (5/10) und eine Falsch-negativ-Rate von 0 % (0/30) bei den Vorhersagen für Gemische ergaben und bei denen eine Einstufung nach dem UN GHS bzw. der CLP-Verordnung nicht erforderlich ist (9). Daher kann die Kurzzeit-Prüfmethode nicht nur bei festen Stoffen, sondern auch bei Gemischen (außer bei festen Gemischen mit Ausnahme von Gemischen, die ausschließlich Tenside enthalten) verwendet werden, um zu ermitteln, ob eine Einstufung nicht erforderlich ist (UN-GHS-/CLP-Kategorie Keine Einstufung). Auch Gemische mit Stoffen mit Dampfdrücken von über 6 kPa sollten mit besonderer Sorgfalt untersucht werden, damit Gefahren nicht unterschätzt werden. Ob die Verwendung der Kurzzeit-Prüfmethode in Betracht kommt, sollte daher auf Einzelfallbasis entschieden werden.
9. Da die Wirkung einer erheblichen Anzahl von in die UN-GHS-/CLP-Kategorie 1 einzustufenden Chemikalien unterschätzt wurde und die Chemikalien fälschlich in die Kategorien 2, 2A oder 2B eingestuft wurden bzw. da die Wirkung einer erheblichen Anzahl von Chemikalien, für die eine Einstufung nicht erforderlich ist (UN-GHS-/CLP-Kategorie Keine Einstufung), überschätzt wurde und die Chemikalien fälschlich in die Kategorien 2, 2A oder 2B eingestuft wurden, ist die Kurzzeit-Prüfmethode nicht zur Ermittlung von Prüfchemikalien geeignet, die in die UN-GHS-/CLP-Kategorie 2 oder in die UN-GHS-Kategorien 2A (augenreizend) oder 2B (leicht augenreizend) einzustufen sind (7). Bei diesen Chemikalien können weitere Prüfungen mit einer anderen geeigneten Methode erforderlich sein.

10. Die Kurzzeit-Prüfmethode ist für Prüfchemikalien geeignet, die gelöst oder mindestens 5 Minuten in physiologischer Kochsalzlösung, in 5 % Dimethylsulfoxid (DMSO) in Kochsalz oder in Mineralöl gleichmäßig suspendiert wurden. Für nicht lösliche Prüfchemikalien und für Prüfchemikalien, die nicht mindestens 5 Minuten gleichmäßig in physiologischer Kochsalzlösung, 5 % DMSO in Kochsalz oder in Mineralöl suspendiert werden können, ist die Kurzzeit-Prüfmethode nicht geeignet. In Anbetracht der kurzzeitigen Exposition kann bei der Kurzzeit-Prüfung Mineralöl verwendet werden. Daher ist die Kurzzeit-Prüfmethode für die Vorhersage des augengefährdenden Potenzials wasserunlöslicher Prüfchemikalien (z. B. langkettiger Fettalkohole oder Ketone) geeignet, sofern die Chemikalien in mindestens einem der drei oben genannten Lösungsmittel gemischt werden können (4).
11. Der Begriff „Prüfchemikalie“ bezeichnet bei dieser Prüfmethode das, was untersucht wird,¹¹ und bezieht sich nicht auf die Anwendbarkeit der Kurzzeit-Prüfmethode zur Prüfung von Stoffen und/oder Gemischen.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

12. Die Kurzzeit-Prüfmethode ist ein zytotoxizitätsbasierter *In-vitro*-Assay, der an einem konfluenten Monolayer von SRIC-Zellen (Kaninchen-Corneazellen des Statens Serum Institut) durchgeführt wird, die auf einer Polycarbonat-Mikrotiterplatte mit 96 Wells kultiviert wurden (4). Nach einer fünfminütigen Exposition gegenüber einer Prüfchemikalie wird die relative Viabilität von SIRC-Zellen mit der MTT-Prüfung gemessen (4). Eine reduzierte Zellviabilität ist ein Indikator für potenzielle schädliche Wirkungen, die zu Augenschäden führen können.
13. Es wurde berichtet, dass 80 % einer auf ein Kaninchenauge applizierten Lösung innerhalb von drei bis vier Minuten bzw. beim Menschen sogar mehr als 80 % innerhalb von einer bis zwei Minuten über den Bindehautsack ausgeschieden werden (10). Bei der Kurzzeit-Prüfmethode wird versucht, diese Expositionszeiten in etwa einzuhalten; dabei wird die Zytotoxizität als Endpunkt für die Beurteilung der Schädigung der SIRC-Zellen nach einer fünfminütigen Exposition gegenüber der Prüfchemikalie angenommen.

NACHWEIS DER LEISTUNGSFÄHIGKEIT

¹ Im Juni 2013 kam die Gemeinsame Tagung überein, dass der Begriff „Prüfchemikalie“ zur Beschreibung des Prüfgegenstandes bei neuen und aktualisierten Prüfmethoden einheitlicher verwendet werden sollte.

14. Vor der routinemäßigen Anwendung der Kurzzeitprüfung nach dieser Prüfmethode sollten Labors die erforderliche technische Befähigung durch eine ordnungsgemäße Einstufung der elf in Tabelle 1 empfohlenen Stoffe nachweisen. Diese Stoffe wurden als repräsentativ für das gesamte Spektrum an Reaktionen mit schweren Augenschädigungen oder Augenreizungen nach den Ergebnissen von *In-vivo*-Kaninchenaugentests (TG 405) und nach der UN-GHS-/CLP-Klassifizierung ausgewählt (1). Weitere Auswahlkriterien waren die Verfügbarkeit der Stoffe im Handel sowie das Vorliegen hochwertiger *In-vivo*-Referenzdaten und hochwertiger *In-vitro*-Daten, die mit der Kurzzeit-Prüfmethode ermittelt wurden (3). Wenn ein dort genannter Stoff nicht verfügbar ist bzw. wenn dies gerechtfertigt ist, kann ein anderer Stoff verwendet werden, für den geeignete *In-vivo*- und *In-vitro*-Referenzdaten verfügbar sind, sofern die hier beschriebenen Auswahlkriterien berücksichtigt werden.

Tabelle 1: Liste der Leistungsstoffe

Stoff	CAS-Nr.	Chemikalien- klasse ¹	Aggregat- zustand	<i>In-vivo</i> -UN- GHS-/CLP- Kat. ²	Lösungs- mittel in der Kurzzeit- prüfung	UN-GHS- /CLP-Kat. nach Kurzzeit- exposition
Benzalkonium- chlorid (10 %, wässrig)	8001-54-5	Onium- verbindung	Flüssigkeit	Kategorie 1	Kochsalz- lösung	Kategorie 1
Triton X-100 (100 %)	9002-93-1	Ether	Flüssigkeit	Kategorie 1	Kochsalz- lösung	Kategorie 1
Acid Red 92	18472-87-2	Hetero- cyclische Verbindung, Bromverbin- dung, Chlor- verbindung	Feststoff	Kategorie 1	Kochsalz- lösung	Kategorie 1
Natriumhydroxid	1310-73-2	Lauge, anorganische Chemikalie	Feststoff	Kategorie 1 ³	Kochsalz- lösung	Kategorie 1
Butyrolacton	96-48-0	Lacton, hetero- cyclische Verbindung	Flüssigkeit	Kategorie 2A (nach CLP Kategorie 2)	Kochsalz- lösung	Keine Vorhersage möglich
1-Octanol	111-87-5	Alkohol	Flüssigkeit	Kategorie 2A/B ⁴ (nach CLP Kategorie 2)	Mineralöl	Keine Vorhersage möglich
Cyclopentanol	96-41-3	Alkohol, Kohlenwasser- stoff, cyclisch	Flüssigkeit	Kategorie 2A/B ⁵ (nach CLP Kategorie 2)	Kochsalz- lösung	Keine Vorhersage möglich
2-Ethoxyethylacetat	111-15-9	Alkohol, Ether	Flüssigkeit	Keine Einstufung	Kochsalz- lösung	Keine Einstufung

Dodecan	112-40-3	Kohlenwasserstoff (acyclisch)	Flüssigkeit	Keine Einstufung	Mineralöl	Keine Einstufung
Methylisobutylketon	108-10-1	Keton	Flüssigkeit	Keine Einstufung	Mineralöl	Keine Einstufung
n,n-Dimethylguanidinsulfat	598-65-2	Amidin, Schwefelverbindung	Feststoff	Keine Einstufung	Kochsalzlösung	Keine Einstufung

Abkürzungen: CAS-Nr. = Registernummer des Chemical Abstracts Service

¹ Chemikalienklassen wurden anhand von Informationen aus früheren NICEATM-Veröffentlichungen bzw., wenn diese nicht verfügbar waren, nach den Medical Subject Headings (MeSH®) der National Library of Medicine (über ChemIDplus® [National Library of Medicine], siehe <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>) und nach Strukturbestimmungen des NICEATM vorgenommen.

² Gestützt auf Ergebnisse aus dem In-vivo-Kaninchenaugentest (OECD TG 405) unter Berücksichtigung der UN-GHS-Klassifizierung (1).

³ Die Einstufung als Kategorie 1 beruht auf dem Hautreizungspotenzial von 100 % Natriumhydroxid (geführt als Leistungschemikalie mit Hautverätzungspotenzial in der OECD TG 435) und dem Kriterium für die Einstufung in die UN-GHS-/CLP-Kategorie 1 (1).

⁴ Die Einstufung in die Kategorien 2A oder 2B ist von der Auswertung der Kriterien des UN-GHS zur Unterscheidung zwischen diesen beiden Kategorien abhängig, d. h. für eine Einstufung in die Kategorie 2A müssen an 2 von 6 gegenüber 4 von 6 Tieren Wirkungen an Tag 7 beobachtet werden. Der *In-vivo*-Datensatz umfasste 2 Untersuchungen mit jeweils 3 Versuchstieren. Bei einem Versuch zeigten sich bei zwei von drei Tieren Wirkungen an Tag 7, die eine Einstufung in Kategorie 2A rechtfertigten (11). Bei der zweiten Untersuchung gingen alle Endpunkte bei allen drei Tieren bis Tag 7 auf einen Wert von null zurück; daher wurde eine Einstufung in Kategorie 2B vorgenommen (12).

⁵ Die Einstufung in die Kategorie 2A oder 2B ist von der Auswertung der Kriterien des UN-GHS zur Unterscheidung zwischen diesen beiden Kategorien abhängig, d. h. für eine Einstufung in die Kategorie 2A müssen an 1 von 3 gegenüber 2 von 3 Tieren Wirkungen an Tag 7 beobachtet werden. Die *In-vivo*-Studie umfasste drei Tiere. Alle Endpunkte mit Ausnahme einer Hornhauttrübung und einer Bindehautrötung bei einem Tier, gingen bis Tag 7 oder früher auf einen Wert von null zurück. Bei dem einen Tier, das sich bis Tag 7 nicht vollständig regeneriert hatte, wurden die Hornhauttrübung und die Bindehautrötung (an Tag 7) jeweils mit 1 bewertet. An Tag 11 waren die Trübung und die Rötung vollständig verschwunden.

PRÜFVERFAHREN

Vorbereitung des Zellmonolayers

15. Die Kurzzeitprüfung sollte mit SRIC-Zellen (Kaninchen-Corneazellen des Statens Serum Institut) durchgeführt werden. Die SIRC-Zellen sollten aus einer gut qualifizierten Zellbank bezogen werden (z. B. American Type Culture Collection (ATCC), CCL 60).
16. SIRC-Zellen werden bei 37 °C in 5 % CO₂ in befeuchteter Atmosphäre in einem Kulturkolben mit einem Kulturmedium (d. h. Eagle's MEM) kultiviert, das mit 10 % fetalem Rinderserum (FBS), 2 mM L-Glutamin, 50-100 Einheiten/ml Penicillin und 50-100 µg/ml Streptomycin versetzt wurde. Zellen, die sich im Kulturkolben konfluent entwickelt haben, sollten mit Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure-Lösung (ggf. unter Verwendung eines Zellschabers) abgenommen werden. Bevor sie für Routineprüfungen verwendet werden, sind die Zellen in einem Kulturkolben zu

propagieren (z. B. mit 2 bis 3 Passagen); nach dem Auftauen sollten nicht mehr als 25 Passagen erfolgen.

17. Die für die Kurzzeitprüfung zu verwendende Zellen werden dann mit geeigneter Dichte präpariert und in 96-Well-Platten ausgesät. Zum Aussäen in einem Kulturvolumen von 200 µl wird eine Zelldichte von $6,0 \times 10^3$ Zellen pro Well empfohlen, wenn die Zellen vier Tage nach dem Aussäen verwendet werden, bzw. $3,0 \times 10^3$ Zellen bei Verwendung der Zellen fünf Tage nach dem Aussäen. Zellen, die zur Kurzzeitprüfung mit angemessener Dichte in ein Kulturmedium ausgesät wurden, erreichen zum Zeitpunkt der Prüfung (d. h. vier oder fünf Tage nach dem Aussäen) eine Konfluenz von mehr als 80 %.

Applikation der Prüfchemikalien und Kontrollstoffe

18. Erste Wahl als Lösungsmittel zum Auflösen oder Suspendieren von Prüfchemikalien ist physiologische Kochsalzlösung. Wenn eine Prüfchemikalie nur schwach oder überhaupt nicht löslich ist oder in Kochsalzlösung nicht mindestens fünf Minuten gleichmäßig suspendiert wird, ist als zweite Wahl 5 % DMSO (CAS-Nr. 67-68-5) in Kochsalzlösung als Lösungsmittel zu verwenden. Bei Prüfchemikalien, die in Kochsalzlösung oder in 5 % DMSO in Kochsalzlösung nicht gelöst oder mindestens fünf Minuten gleichmäßig suspendiert werden, wird als dritte Wahl Mineralöl (CAS-Nr. 8042-47-5) als Lösungsmittel verwendet.
19. Die Prüfchemikalien werden im jeweils ausgewählten Lösungsmittel in einer Konzentration von 5 % (w/w) gelöst oder gleichmäßig suspendiert und anschließend in Verdünnungsreihen mit jeweils 10 Verdünnungen auf Konzentrationen von 0,5 % und 0,05 % verdünnt. Jede einzelne Prüfchemikalie ist in beiden Konzentrationen (5 % und 0,05 %) zu untersuchen. In der 96-Well-Platte kultivierte Zellen werden bei Raumtemperatur fünf Minuten pro Well mit 200 µl der Prüfchemikalienlösung (bzw. der Suspension) in Konzentrationen von 5 bzw. 0,05 % behandelt. Prüfchemikalien (einkomponentige oder mehrkomponentige Stoffe oder Gemische) werden je nach Methode unabhängig von ihrer tatsächlichen Reinheit als reine Stoffe betrachtet und verdünnt bzw. suspendiert.
20. Das in Nummer 16 beschriebene Kulturmedium wird bei jeder einzelnen Replikatplatte als Mediumkontrolle verwendet. Außerdem werden die Zellen auf jeder einzelnen Replikatplatte mit Proben der Lösungsmittelkontrolle behandelt. Für die in Nummer 18 genannten Lösungsmittel wurde bestätigt, dass die Viabilität von SRIC-Zellen nicht beeinträchtigt wird.
21. Bei der Kurzzeit-Prüfmethode ist bei allen Replikatplatten 0,01 % Natriumlaurylsulfat (SLS) in Kochsalzlösung als Positivkontrolle zu verwenden. Zur Berechnung der Zellviabilität der Positivkontrolle muss jede Replikatplatte auch eine Kochsalzlösung als Kontrolle beinhalten.

22. Zur Bestimmung des Ausgleichs der optischen Dichte wird eine Blindkontrolle benötigt. Die Blindkontrolle ist in Wells zu prüfen, die ausschließlich calcium- und magnesiumfreien Phosphatpuffer oder Zellen enthalten.
23. Jede Probe (die Prüfchemikalie in Konzentrationen von >5 % und 0,05 %, die Mediumkontrolle, die Lösungsmittelkontrolle und die Positivkontrolle) sollte bei jeder Wiederholung jeweils dreimal geprüft werden, indem die Zellen fünf Minuten bei Raumtemperatur mit 200 µl der betreffenden Prüf- bzw. Kontrollchemikalie behandelt werden.
24. Referenzstoffe erleichtern die Evaluierung des augenreizenden Potenzials unbekannter Chemikalien einer bestimmten Chemikalien- oder Produktklasse und die Evaluierung des relativen Reizpotenzials eines Augenreizstoffes innerhalb einer spezifischen Spanne von Reizwirkungen.

Messung der Zellviabilität

25. Nach der Behandlung werden die Zellen zweimal mit 200 µl PBS gewaschen; anschließend werden 200 µl MTT-Lösung (0,5 mg MTT/ml Kulturmedium) zugesetzt. Nach einer zweistündigen Reaktionszeit in einem Inkubator (37 °C, 5 % CO₂) wird die MTT-Lösung dekantiert. Danach wird das MTT-Formazan unter Zugabe von 200 µl 0,04 n Salzsäure/Isopropanol 60 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur extrahiert. Darauf wird mit einem Platten-Lesegerät die Absorption der MTT-Formazan-Lösung bei 570 nm gemessen. Bei der MTT-Prüfung treten Interferenzen durch die Prüfchemikalien (aufgrund von Farbstoffen oder durch direkte MTT-Reduktionsmittel) nur dann auf, wenn nach dem Waschen im Anschluss an die Behandlung eine Prüfchemikalie noch in erheblichem Umfang im Prüfsystem enthalten ist. Dies ist etwa bei rekonstruiertem humanem 3D-Hornhaut- oder Epidermisgewebe der Fall. Für die bei der Kurzzeit-Prüfmethode verwendeten 2D-Zellkulturen sind diese Interferenzen jedoch nicht von Bedeutung.

Auswertung der Ergebnisse und Prädiktionsmodell

26. Die für jede Prüfchemikalie ermittelten OD-Werte (OD = optische Dichte) werden anschließend zur Berechnung der prozentualen Viabilität im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle herangezogen, die gleich 100 % gesetzt wird. Die relative Zellviabilität wird als Prozentanteil ausgedrückt. Dieser Prozentanteil wird durch Division der OD der Prüfchemikalie durch die OD der Lösungsmittelkontrolle ermittelt, nachdem von beiden Werten jeweils die OD der Blindkontrolle abgezogen wurde.

$$\text{Zellviabilität (\%)} = \frac{(OD_{570} \text{ Prüfchemikalie}) - (OD_{570} \text{ Blindkontrolle})}{(OD_{570} \text{ Lösungsmittelkontr.}) - (OD_{570} \text{ Blindk.})} \times 100$$

Ähnlich wird die relative Zellviabilität der einzelnen Lösungsmittelkontrollen als

Prozentanteil ausgedrückt. Dieser Prozentanteil wird durch Division der OD der einzelnen Lösungsmittelkontrollen durch die OD der einzelnen Mediumkontrollen ermittelt, nachdem von beiden Werten jeweils die OD der Blindkontrolle abgezogen wurde.

27. Bei der Prüfung sollten drei unabhängige Wiederholungen jeweils mit drei Replikat-Wells (d. h. $n = 9$) durchgeführt werden. Das arithmetische Mittel der relativen Zellviabilität wird anhand des arithmetischen Mittels der drei Wells jeder einzelnen Prüfchemikalie und jeder einzelnen Lösungsmittelkontrolle der einzelnen unabhängigen Wiederholungen ermittelt. Das endgültige arithmetische Mittel der Zellviabilität wird anhand der drei unabhängigen Wiederholungen berechnet.
28. Die Schwellenwerte der Zellviabilität zur Identifizierung von schwer augenschädigenden Chemikalien (UN-GHS-/CLP-Kategorie 1) und von Chemikalien, die keine Einstufung als Augenreizend oder schwer augenschädigend erfordern (keine Einstufung nach UN GHS/CLP), sind nachfolgend aufgeführt:

Tabelle 2: Vorhersagemodell der Kurzzeit-Prüfmethode

Zellviabilität		UN-GHS-/CLP-Kategorie	Anwendbarkeit
5 %	0,05 %		
> 70 %	> 70 %	Keine Einstufung	Stoffe und Gemische außer i) stark flüchtigen Stoffen mit Dampfdrücken über 6 kPa ¹ und ii) festen Chemikalien (Stoffen und Gemischen) mit Ausnahme von Tensiden und Gemischen, die ausschließlich Tenside enthalten
> 70 %	> 70 %	Keine Vorhersage möglich	Nicht anwendbar
> 70 %	> 70 %	Kategorie 1	Stoffe und Gemische ²

¹ Gemische mit Stoffen mit Dampfdrücken von über 6 kPa sollten mit besonderer Sorgfalt untersucht werden, damit Gefahren nicht unterschätzt werden. Ob die Verwendung der Kurzzeit-Prüfmethode in Betracht kommt, sollte daher auf Einzelfallbasis entschieden werden.

² Je nach den vorwiegend mit einkomponentigen Stoffen ermittelten Ergebnissen, wenn auch begrenzte Daten zur Prüfung von Gemischen verfügbar sind. Die Prüfmethode ist dennoch für die Prüfung von mehrkomponentigen Stoffen und Gemischen technisch geeignet. Bevor diese Prüfmethode bei einem Gemisch angewendet wird, um zu rechtlichen Zwecken Daten zu gewinnen, sollte geprüft werden, ob, und falls ja, warum sie für diesen Zweck geeignete Ergebnisse liefert. Solche Erwägungen entfallen, wenn die Prüfung des Gemischs von Rechts wegen vorgeschrieben ist.

Akzeptanzkriterien

29. Die Prüfergebnisse sind annehmbar, wenn die folgenden Kriterien vollständig erfüllt sind:

- a) Die optische Dichte der (mit dem Kulturmedium behandelten) Mediumkontrolle nach Abzug der optischen Dichte der Blindkontrolle beträgt mindestens 0,3.
- b) Die Viabilität der Lösungsmittelkontrolle liegt bei mindestens 80 % der Viabilität der Mediumkontrolle. Wenn bei den Wiederholungen jeweils mehrere Lösungsmittelkontrollen verwendet werden, sind die Prüfchemikalien zur Untersuchung mit den betreffenden Lösungsmitteln nur dann geeignet, wenn die Zellviabilität der Lösungsmittelkontrollen jeweils mehr als 80 % beträgt.
- c) Die Zellviabilität der Positivkontrolle (0,01 % SLS) liegt im Bereich von zwei Standardabweichungen vom historischen Mittelwert. Die obere und die untere Akzeptanzgrenze der Positivkontrolle werden häufig aktualisiert (d. h. alle drei Monate bzw. in Labors, in denen die Prüfungen seltener durchgeführt werden (weniger als einmal pro Monat), immer dann, wenn eine akzeptable Prüfung durchgeführt wurde). Wenn Versuche in einem Labor nicht in hinreichender Anzahl durchgeführt werden, um eine statistisch robuste Verteilung der Positivkontrollen zu ermitteln, kann unter Berücksichtigung der vom Entwickler der Prüfmethode festgelegten oberen und unteren Grenzwerte (d. h. 21,1 % und 62,3 %, je nach den historischen Daten des betreffenden Labors) nach den ersten routinemäßigen Prüfungen eine interne Verteilung ermittelt werden.
- d) Die Standardabweichung der aus drei unabhängigen Wiederholungen ermittelten endgültigen Zellviabilität beträgt bei beiden Konzentrationen der Prüfchemikalie (5 % und 0,05 %) weniger als 15 %.

Wenn mindestens eines dieser Kriterien nicht erfüllt ist, sollten die Ergebnisse nicht berücksichtigt werden. In diesem Fall sind drei weitere unabhängige Wiederholungen durchzuführen.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Daten

30. Die Daten der einzelnen Wells (z. B. die Werte der Zellviabilität) der jeweiligen Wiederholungen sowie der Gesamtmittelwert, die Standardabweichung und die Einstufung sind anzugeben.

Prüfbericht

31. Der Prüfbericht sollte folgende Angaben enthalten:

Prüfchemikalien und Kontrollstoffe

- Einkomponentige Stoffe: Chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS-Bezeichnung(en), CAS-Nummer(n), SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel und/oder andere Kennungen;

- mehrkomponentige Stoffe, UVCB-Stoffe und Gemische: Charakterisierung, so weit wie möglich, z. B. durch die chemische Zusammensetzung (siehe oben), Reinheit, das quantitative Vorkommen und die relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften (siehe oben) der einzelnen Elemente, soweit verfügbar;
- Aggregatzustand, Flüchtigkeit, pH-Wert, log P, Molekulargewicht, Chemikalienklasse und weitere für die Untersuchung relevante physikalische und chemische Eigenschaften, soweit verfügbar;
- Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.;
- Behandlung vor der Untersuchung, sofern relevant (z. B. Erwärmen, Mahlen);
- Lagerbedingungen und Stabilität, soweit verfügbar.

Prüfbedingungen und -verfahren

- Name und Anschrift des Auftraggebers, der Prüfanstalt und des Studienleiters;
- Identifikation der verwendeten Prüfmethode;
- verwendete Zelllinie, Herkunft, Passagenzahl und Konfluenz der für die Untersuchung verwendeten Zellen;
- Details des angewandten Prüfverfahrens;
- Anzahl der Wiederholungen und verwendeten Replikate
- Konzentrationen der verwendeten Prüfchemikalie (falls von den Empfehlungen abweichend);
- Begründung der Auswahl des Lösungsmittels für jede Prüfchemikalie;
- Dauer der Exposition gegenüber der Prüfchemikalie (falls von den Empfehlungen abweichend);
- Beschreibung etwaiger Änderungen am Prüfverfahren;
- Beschreibung der angewandten Bewertungs- und Entscheidungskriterien;
- Angabe des historischen Mittelwerts der Kontrollgruppe und der Standardabweichung (SD);
- Nachweis der Leistungsfähigkeit des Labors hinsichtlich der Durchführung der Prüfmethode (z. B. durch Prüfen von Leistungsstoffen) oder zum Nachweis der reproduzierbaren Durchführung der Prüfmethode im Zeitverlauf.

Ergebnisse

- Für alle Prüfchemikalien und Kontrollstoffe sowie für jede geprüfte Konzentration sind die einzelnen OD-Werte pro Replikat-Well, das arithmetische Mittel der OD-

Werte der einzelnen unabhängigen Wiederholungen, die Zellviabilität der einzelnen unabhängigen Wiederholungen in % und das endgültige arithmetische Mittel der Zellviabilität in % sowie die Standardabweichung bei drei Wiederholung in einer Tabelle anzugeben;

- Ergebnisse der Medium-, der Lösungsmittel- und der Positivkontrolle als Nachweis für die Erfüllung geeigneter Akzeptanzkriterien;
- Beschreibung anderer beobachteter Wirkungen;
- insgesamt abgeleitete Einstufung mit Bezug auf das Vorhersagemodell und/oder angewandte Entscheidungskriterien.

Erörterung der Ergebnisse.

Schlussfolgerungen

LITERATUR

- (186) Vereinte Nationen (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals = Global harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung) (GHS): fünfte überarbeitete Auflage, New York und Genf: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Abrufbar unter: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.
- (187) Scott, L, u. a. (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.
- (188) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to 7 Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
- (189) Takahashi, Y., u. a. (2008). Development of the Short Time Exposure (STE) Test: an *In Vitro* Eye Irritation Test Using SIRC Cells. *Toxicol. In Vitro* 22,760-770.
- (190) Sakaguchi, H., u. a. (2011). Validation Study of the Short Time Exposure (STE) Test to Assess the Eye Irritation Potential of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 25,796-809.
- (191) Kojima, H., u. a. (2013). Second-Phase Validation of Short Time Exposure Tests for Assessment of Eye Irritation Potency of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 27, S. 1855-1869.
- (192) ICCVAM (2013). Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document, NIH. Abrufbar unter: [\[http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf\]](http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf).
- (193) Kapitel B.5 dieses Anhangs, Akute Augenreizung/-verätzung.
- (194) Saito, K, u. a. (2015). Predictive Performance of the Short Time Exposure Test for Identifying Eye Irritation Potential of Chemical Mixtures.
- (195) Mikkelsen, T.J., Chrai, S.S., und Robinson. J.R. (1973). Altered Bioavailability of Drugs in the Eye Due to Drug-Protein Interaction. *J. Pharm. Sci.* 1648-1653.
- (196) ECETOC (1998). Eye Irritation Reference Chemicals Data Bank. Technical Report (No 48. (2)), Brüssel, Belgien.

- (197) Gautheron, P., u. a. (1992). Bovine Corneal Opacity and Permeability Test: an *In Vitro* Assay of Ocular Irritancy. *Fundam. Appl. Toxicol.* 18, 442–449.
- (198) 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (199) 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.

Anlage

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

Augenreizung: Erzeugen von Veränderungen am Auge nach Applikation einer Prüfchemikalie auf die Oberfläche des Auges, die innerhalb von 21 Tagen nach der Applikation vollständig reversibel sind. Synonym zu den Einstufungen „reversible Wirkungen am Auge“ und „UN-GHS-/CLP-Kategorie 2“.

Bottom-up-Ansatz: Schrittweiser Ansatz für eine Prüfchemikalie, von der vermutet wird, dass sie keine Einstufung als augenreizend oder schwer augenschädigend erfordert. Dabei werden zunächst Chemikalien, die keine Einstufung erfordern (negatives Ergebnis), von anderen Chemikalien (positives Ergebnis) unterschieden.

Chemikalie: Ein Stoff oder Gemisch.

Einkomponentiger Stoff: Ein nach seiner quantitativen Zusammensetzung definierter Stoff, bei dem mehr als ein Hauptbestandteil in einer Konzentration von mindestens 80 % w/w vorliegt.

Falsch-Negativ-Rate: Der Anteil aller positiven Chemikalien, die mit einer Prüfmethode fälschlicherweise als negativ identifiziert werden. Die Falsch-Negativ-Rate ist ein Indikator für die Leistungsfähigkeit einer Prüfmethode.

Falsch-Positiv-Rate: Der Anteil aller negativen Chemikalien, die mit einer Prüfmethode fälschlicherweise als positiv identifiziert werden. Die Falsch-Positiv-Rate ist ein Indikator für die Leistungsfähigkeit einer Prüfmethode.

Gefahr: Inhärente Eigenschaft eines Stoffes oder eines Umfelds mit dem Potenzial, einen Organismus, ein System oder eine (Sub)population bei Exposition gegenüber diesem Stoff zu schädigen.

Gemisch: Ein Gemisch oder eine Lösung, die aus zwei oder mehr Stoffen besteht.

Genauigkeit: Der Grad an Übereinstimmung zwischen Testergebnissen und akzeptierten Referenzwerten. Die Genauigkeit ist ein Maß der Leistung der Prüfmethode und ein Aspekt der Relevanz. Der Begriff wird oft im Sinne von „Übereinstimmung“ verwendet und bezeichnet den Anteil der korrekten Ergebnisse einer Prüfmethode (13).

Gestufte Prüfstrategie: Eine schrittweise Prüfstrategie, bei der alle vorhandenen Informationen über eine Prüfchemikalie in einer vorgegebenen Reihenfolge überprüft werden, wobei auf jeder Stufe nach dem evidenzbasierten Bewertungsansatz (weight-of-evidence) vorgegangen wird, um feststellen zu können, ob genügend Informationen für eine Gefahreneinstufung vorliegen, bevor zur nächsten Stufe übergegangen wird. Wenn das Reizpotenzial einer Prüfchemikalie auf Basis der vorliegenden Informationen ermittelt werden kann, sind keine weiteren Untersuchungen erforderlich. Ist dies nicht der Fall, müssen schrittweise sequenzielle Tierversuche durchgeführt

werden, bis eine eindeutige Einstufung vorgenommen werden kann.

Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle: Eine unbehandelte Probe, die alle Elemente eines Prüfsystems enthält, einschließlich des mit der Prüfchemikalie behandelten Lösungsmittels oder Vehikels und anderer Kontrollproben, und die verwendet wird, um die Referenzreaktion für die mit der Prüfchemikalie behandelten Proben zu bestimmen, die im selben Lösungsmittel oder Vehikel aufgelöst wurden. Bei der Prüfung mit einer gleichzeitigen Negativkontrolle zeigt diese Probe außerdem an, ob das Lösungsmittel oder Vehikel mit dem Prüfsystem interagiert.

Mediumkontrolle: Ein unbehandeltes Replikat, das alle Elemente eines Prüfsystems enthält. Diese Probe wird mit einer Prüfchemikalie behandelten Proben und anderen Kontrollproben mitgeführt, um festzustellen, ob das Lösungsmittel mit dem Prüfsystem interagiert.

Mehrkomponentiger Stoff: Ein nach seiner quantitativen Zusammensetzung definierter Stoff, bei dem mehr als ein Hauptbestandteil in einer Konzentration von mindestens $\geq 10\%$ w/w und $< 80\%$ w/w vorhanden ist. Ein mehrkomponentiger Stoff ist das Ergebnis eines Herstellungsprozesses. Der Unterschied zwischen einem Gemisch und einem mehrkomponentigen Stoff besteht darin, dass ein Gemisch durch die Mischung von zwei oder mehr Stoffen ohne chemische Reaktion entsteht. Ein mehrkomponentiger Stoff wird durch eine chemische Reaktion gebildet.

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid; Thiazolyl-Blau-Tetrazoliumbromid.

OD: Optische Dichte.

Positivkontrolle: Ein Replikat, das alle Elemente eines Prüfsystems enthält und mit einem Stoff behandelt wird, der bekanntermaßen eine positive Reaktion hervorruft. Um sicherzustellen, dass Abweichungen bei Positivkontrollreaktion im Zeitverlauf bewertet werden können, sollte die Reaktion nicht zu heftig sein.

Prüfchemikalie: Stoff oder Gemisch, der/das mit dieser Prüfmethode untersucht wird.

Referenzstoff: Ein zum Vergleich mit einer Prüfchemikalie verwendeter Stoff. Referenzstoffe sollten die folgenden Eigenschaften haben: (i) einheitliche und zuverlässige Herkunft; (ii) strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit mit der Klasse der zu prüfenden Stoffe; (iii) bekannte physikalisch-chemische Eigenschaften; (iv) unterstützende Daten zu bekannten Wirkungen und (v) bekannte Wirksamkeit im Bereich der erwünschten Reaktion.

Relevanz: Dieser Begriff bezieht sich auf das Verhältnis zwischen der Prüfmethode und der betreffenden Wirkung und auf die Frage, ob er aussagekräftig und nützlich für einen bestimmten Zweck ist. Er beschreibt das Ausmaß, in dem mit einer Prüfung die untersuchte biologische Wirkung korrekt gemessen oder vorhersagt wird. Die Relevanz schließt eine Beurteilung der Genauigkeit (Übereinstimmung) einer Prüfmethode ein (10).

Schwere Augenschädigung: Erzeugen von Gewebeschäden im Auge oder eine schwerwiegende Verschlechterung des Sehvermögens nach Applikation einer Prüfchemikalie auf die Oberfläche des Auges, die innerhalb von 21 Tagen nach der Applikation nicht vollständig reversibel sind. Synonym zu den Einstufungen „irreversible Wirkungen am Auge“ und „UN-GHS-/CLP-Kategorie 1“.

Sensitivität: Der Anteil aller positiven/wirkenden Chemikalien, die durch die Prüfung korrekt eingestuft werden. Die Sensitivität ist ein Maß der Genauigkeit einer Prüfmethode mit kategorialen Ergebnissen und ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung ihrer Relevanz (10).

Spezifität: Der Anteil aller negativen/wirkungslosen Chemikalien, die durch die Prüfung korrekt eingestuft werden. Die Spezifität ist ein Maß der Genauigkeit einer Prüfmethode mit kategorialen Ergebnissen und ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung ihrer Relevanz (13).

Stoff: Ein chemisches Element und seine Verbindungen in natürlicher Form oder gewonnen durch ein Herstellungsverfahren, einschließlich der zur Wahrung seiner Stabilität notwendigen Zusatzstoffe und der durch das angewandte Verfahren bedingten Verunreinigungen, aber mit Ausnahme von Lösungsmitteln, die von dem Stoff ohne Beeinträchtigung seiner Stabilität und ohne Änderung seiner Zusammensetzung abgetrennt werden können.

Tensid: Auch als oberflächenaktiver Stoff bezeichnet; Stoffe, wie waschaktive Stoffe (Detergenzien), die die Oberflächenspannung einer Flüssigkeit herabsetzen und so die Bildung von Schaum oder das Eindringen in feste Stoffe ermöglichen; auch bekannt als Netzmittel.

Top-down-Ansatz: Schrittweiser Ansatz bei einer Chemikalie, von der vermutet wird, dass sie schwere Augenschäden verursacht. Dabei werden zunächst Chemikalien, die schwere Augenschäden verursachen (positives Ergebnis), von anderen Chemikalien (negatives Ergebnis) unterschieden.

UN GHS (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals = Global harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung der Vereinten Nationen): Ein System zur Klassifizierung von Chemikalien (Stoffen und Gemischen) nach standardisierten Typen und Stufen physikalischer, gesundheitlicher und ökologischer Gefahren und zur entsprechenden Kennzeichnung durch Piktogramme, Signalwörter, Gefahrenhinweise, Sicherheitshinweise und Sicherheitsdatenbögen, um zum Schutz des Menschen (einschließlich Arbeitgeber, Arbeiter, Spediteure, Verbraucher und Notfall-Einsatzkräfte) und der Umwelt Informationen über die schädlichen Wirkungen der betreffenden Chemikalien zu verbreiten (1).

UN-GHS/CLP-Kategorie 1: Siehe „Schwere Augenschädigung“.

UN-GHS/CLP-Kategorie 2: Siehe „Augenreizung“.

UN-GHS-/CLP-Kategorie Keine Einstufung: Chemikalien, die nicht in die UN-GHS-/CLP-Kategorien 1 oder 2 (oder die UN-GHS-Kategorien 2A oder 2B) eingestuft wurden.

UVCB: Stoffe mit unbekannter oder schwankender Zusammensetzung, komplexe Reaktionsprodukte oder biologische Materialien.

Zuverlässigkeit: Maß der Reproduzierbarkeit einer Prüfmethode innerhalb von und zwischen Laboratorien über einen längeren Zeitraum und bei einheitlichem Protokoll. Die Zuverlässigkeit wird durch Berechnung der Intra- und Interlabor-Reproduzierbarkeit bewertet (13).

B.69 PRÜFMETHODE UNTER VERWENDUNG VON REKONSTRUIERTEM MENSCHLICHEM HORNHAUTARTIGEM EPITHEL (RhCE) ZUR ERMITTLUNG VON CHEMIKALIEN, BEI DENEN EINE EINSTUFUNG UND KENNZEICHNUNG ALS AUGENREIZEND ODER SCHWER AUGENSCHÄDIGEND NICHT ERFORDERLICH IST

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode (PM) entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 492 (2017). Als *schwere Augenschädigung* werden nach dem Global harmonisierten System (UN GHS) zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien der Vereinten Nationen (1) und nach Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen (CLP-Verordnung)¹ das Erzeugen von Gewebeschäden im Auge oder schwerwiegende Verschlechterungen des Sehvermögens nach Applikation eines Prüfstoffes auf die Oberfläche des Auges bezeichnet, die innerhalb von 21 Tagen nach Applikation nicht vollständig reversibel sind. Ebenfalls nach dem UN GHS und der CLP-Verordnung bezeichnet *Augenreizung* das Erzeugen von Veränderungen am Auge nach Applikation eines Prüfstoffes auf die Oberfläche des Auges, die innerhalb von 21 Tagen nach der Applikation vollständig reversibel sind. Prüfchemikalien, die schwere Augenschädigungen auslösen, werden als UN-GHS-/CLP-Kategorie 1 eingestuft. Chemikalien die Augenreizungen hervorrufen, werden als UN-GHS-/CLP-Kategorie 2 eingestuft. Prüfchemikalien, die nicht als augenreizende oder schwer augenschädigende Stoffe eingestuft werden, sind als Stoffe definiert, bei denen die Kriterien für eine Einstufung in die UN-GHS-/CLP-Kategorien 1 oder 2 (2A oder 2B) nicht erfüllt sind, d. h. sie werden als Stoffe der UN-GHS-/CLP-Kategorie Keine Einstufung bezeichnet.
2. Zur Beurteilung von schweren Augenschädigungen bzw. Augenreizungen wurden bislang in der Regel Labortiere verwendet (PM B.5 (2)). Die Auswahl der am besten geeigneten Prüfmethode und die Anwendung dieser Prüfmethode sollten unter Berücksichtigung des OECD-Leitliniendokuments über integrierte Prüfungs- und Bewertungsansätze (IATA = Integrated Approaches to Testing and Assessment) zur Untersuchung von schweren Augenschädigungen und von Augenreizungen (39) erfolgen.

¹ Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen, zur Änderung und Aufhebung der Richtlinien 67/548/EWG und 1999/45/EG und zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 (ABl. L 353 vom 31.12.2008, S. 1).

3. Die Prüfmethode beschreibt ein *In-vitro*-Verfahren zur Ermittlung von Chemikalien (Stoffen und Gemischen), die keine Einstufung und Kennzeichnung als augenreizend oder schwer augenschädigend nach dem UN GHS und der CLP-Verordnung erfordern. Für diese Prüfmethode wird rekonstruiertes menschliches hornhautartiges Epithel (RhCE) verwendet, das die histologischen, morphologischen, biochemischen und physiologischen Eigenschaften des menschlichen Hornhautepithels weitgehend widerspiegelt. Vier weitere *In-vitro*-Prüfmethoden wurden validiert, als wissenschaftlich fundiert bewertet und als PM B.47 (3), B.48 (4), B.61 (5) und B.68 (6) zur Bewertung der Endpunkte für schwere Augenschädigungen bzw. für Augenreizungen beim Menschen angenommen.
4. Bei dieser Prüfmethode kommen zwei validierte im Handel erhältliche RhCE-Modelle zum Einsatz. Zur Beurteilung von Augenreizungen / schweren Augenschädigungen anhand des EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) und des SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT) wurden Validierungsstudien durchgeführt (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13). Bei diesen Prüfungen wurden jeweils im Handel erhältliche RhCE-Gewebemodelle als Prüfsystem verwendet. Diese Prüfungen werden im Folgenden die validierten Referenzmethoden (VRM 1 bzw. VRM 2) genannt. Aufgrund dieser Validierungsstudien und nach dem unabhängigen Peer-Review dieser Studien (9) (12) wurde festgestellt, dass Chemikalien (Stoffe und Gemische), die keine Einstufung und Kennzeichnung als augenreizend bzw. schwer augenschädigend nach dem UN GHS erfordern, mit dem EpiOcular™ EIT und dem SkinEthic™ HCE EIT korrekt ermittelt werden. Daher wurden diese Prüfungen für diesen Zweck als wissenschaftlich fundiert empfohlen (13).
5. Gegenwärtig herrscht allgemeiner Konsens darüber, dass der *In-vivo*-Draize-Augentest in absehbarer Zukunft nicht in vollem Umfang durch eine einzelne *In-vitro*-Prüfmethode ersetzt werden kann (2) (14), die geeignet wäre, das gesamte Spektrum augenreizender bzw. schwer augenschädigender Reaktionen auf unterschiedliche Chemikalienklassen vorherzusagen. Unter Umständen ist es jedoch möglich, den Draize-Augentest durch strategische Kombinationen mehrerer alternativer Prüfmethoden im Rahmen (gestufter) Prüfstrategien (z. B. des Bottom-up- oder des Top-down-Ansatzes) vollständig zu ersetzen (15). Der Bottom-up-Ansatz (15) wird verwendet, wenn auf Basis der vorliegenden Informationen davon auszugehen ist, dass eine Chemikalie Augenreizungen nicht in einem Umfang auslöst, der eine Einstufung erfordern würde. Umgekehrt wird der Top-down-Ansatz (15) verwendet, wenn nach den vorliegenden Informationen davon auszugehen ist, dass eine Chemikalie schwere Augenschädigungen hervorruft. Der EpiOcular™ EIT und der SkinEthic™ HCE EIT werden empfohlen, um im Rahmen einer Prüfstrategie (z. B. des von Scott u. a. empfohlenen Bottom-up- oder Top-down-Ansatzes) etwa in einem ersten Schritt bei einem Bottom-up-Ansatz oder in einem der letzten Schritte

bei einem Top-down-Ansatz ohne weitere Prüfung Chemikalien zu ermitteln, bei denen eine Einstufung als augenreizend oder schwer augenschädigend nach dem UN GHS bzw. der CLP-Verordnung nicht erforderlich ist (Keine Einstufung) (15). Zur Unterscheidung zwischen der UN-GHS-/CLP-Kategorie 1 (schwere Augenschädigung) und der UN-GHS-/CLP-Kategorie 2 (Augenreizung) sind der EpiOcular™ EIT und der SkinEthic™ HCE EIT jedoch nicht vorgesehen. Diese Unterscheidung muss in einem weiteren Schritt einer Prüfstrategie vorgenommen werden (15). Eine Prüfchemikalie, bei der die Durchführung des EpiOcular™ EIT oder SkinEthic™ HCE EIT zur Einstufung als augenreizend oder schwer augenschädigend als erforderlich betrachtet wird, muss daher einer weiteren Untersuchung (*in vitro* und/oder *in vivo*) unterzogen werden (z. B. durch die PM B.47, B.48, B.61 oder B.68), um zu einem endgültigen Ergebnis (UN-GHS-/CLP-Kategorie Keine Einstufung, UN-GHS-/CLP-Kategorie 2 oder UN-GHS-/CLP-Kategorie 1) zu gelangen.

6. Diese Prüfmethode beschreibt das Verfahren zur Beurteilung des augengefährdenden Potenzials einer Prüfchemikalie anhand ihrer mit der MTT-Prüfung (16) (Nummer 21) gemessenen Fähigkeit, bei einem RhCE-Gewebemodell eine zytotoxische Wirkung hervorzurufen. Die Viabilität des RhCE-Gewebes nach Behandlung mit einer Prüfchemikalie wird im Vergleich zu Geweben ermittelt, die mit dem Negativkontrollstoff behandelt wurde (Viabilität in %). Nach dieser Viabilität wird das Augengefährdungspotenzial der Prüfchemikalie angegeben.
7. Verfügbare Leistungsstandards (17) erleichtern die Validierung neuer oder modifizierter *In-vitro*-Prüfungen unter Verwendung von RhCE ähnlich dem EpiOcular™ EIT und dem SkinEthic™ HCE EIT nach den Grundsätzen von OECD Guidance Document Nr. 34 (18) und ermöglichen eine frühzeitige Änderung der OECD TG 492 zur entsprechenden Berücksichtigung. Die gegenseitige Anerkennung der Daten gemäß dem OECD-Übereinkommen wird nur für Prüfungen garantiert, die gemäß diesen Leistungsnormen validiert wurden, sofern diese Prüfungen von der OECD überprüft und in die entsprechende Prüfrichtlinie aufgenommen wurden.

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

8. Es gelten die Begriffsbestimmungen in Anlage 1.

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN UND BEGRENZUNGEN

9. Diese Prüfmethode beruht auf im Handel erhältlichen dreidimensionalen RhCE-Gewebemodellen, die entweder mit primären humanen epidermalen Keratinozyten (d. h. EpiOcular™ OCL-200) oder mit humanen immortalisierten Hornhaut-Epithelzellen (d. h. SkinEthic™ HCE/S) hergestellt wurden. Die RhCE-

Gewebemodelle EpiOcular™ OCL-200 und SkinEthic™ HCE/S spiegeln das dreidimensionale *In-vivo*-Hornhaut-Epithelgewebe wider und werden aus Zellen der zu untersuchenden Spezies hergestellt (19) (20). Mit den Prüfungen werden die Zytotoxizität infolge der Durchdringung der Hornhaut durch die Chemikalien und die Induzierung von Zell- und Gewebeschäden direkt gemessen. Die gemessene zytotoxische Reaktion gibt dann Aufschluss über den Gesamtumfang der *in vivo* auftretenden Augenreizungen bzw. schweren Augenschädigungen. Zellschädigungen können aufgrund unterschiedlicher Wirkungsweisen auftreten (Nummer 20). Der Zytotoxizität kommt jedoch eine wichtige, wenn nicht gar die entscheidende, grundlegende Bedeutung bei der Ermittlung des Gesamtumfangs der schweren Augenschädigungen bzw. der Augenreizungen aufgrund der Wirkung einer Chemikalie zu, die sich unabhängig von den den Gewebeschädigungen zugrunde liegenden physikalisch-chemischen Prozessen *in vivo* in einer Hornhauttrübung, einer Iritis, einer Bindehautrötung und/oder einem Bindehautödem (Chemose) äußert.

10. In der dieser Prüfmethode zugrunde liegenden Validierungsstudie wurden vielfältige Chemikalien sowie zahlreiche unterschiedliche Chemikalientypen, Chemikalienklassen, Molekulargewichte, log-P-Werte, chemische Strukturen usw. berücksichtigt. Die Validierungsdatenbank für den EpiOcular™ EIT enthielt insgesamt 113 Chemikalien, darunter 95 verschiedene organische Funktionsgruppen entsprechend einer Analyse mit der QSAR-Toolbox der OECD (8). Bei diesen Chemikalien handelte es sich meist um einkomponentige Stoffe; in der Studie wurden aber auch mehrere mehrkomponentige Stoffe berücksichtigt (darunter 3 Homopolymere, 5 Copolymere und 10 Quasipolymere). Hinsichtlich des Aggregatzustands und der UN-GHS-/CLP-Kategorien verteilten sich die 113 Prüfchemikalien wie folgt: 13 Flüssigkeiten der Kategorie 1, 15 Feststoffe der Kategorie 1, 6 Flüssigkeiten der Kategorie 2A, 10 Feststoffe der Kategorie 2A, 7 Flüssigkeiten der Kategorie 2B, 7 Feststoffe der Kategorie 2B, 27 Flüssigkeiten der Kategorie Keine Einstufung und 28 Feststoffe der Kategorie Keine Einstufung (8). Die Validierungsdatenbank für den SkinEthic™ HCE EIT enthielt insgesamt 200 Chemikalien, darunter 165 verschiedene organische Funktionsgruppen (8) (10) (11). Bei diesen Chemikalien handelte es sich meist um einkomponentige Stoffe; in der Studie wurden aber auch mehrere mehrkomponentige Stoffe berücksichtigt (darunter 10 Polymere). Hinsichtlich des Aggregatzustands und der UN-GHS-/CLP-Kategorien verteilten sich die 200 Prüfchemikalien wie folgt: 27 Flüssigkeiten der Kategorie 1, 24 Feststoffe der Kategorie 1, 19 Flüssigkeiten der Kategorie 2A, 10 Feststoffe der Kategorie 2A, 9 Flüssigkeiten der 2B, 8 Feststoffe der Kategorie 2B, 50 Flüssigkeiten der Kategorie Keine Einstufung und 53 Feststoffe der Kategorie Keine Einstufung (10) (11).
11. Diese Prüfmethode ist bei Stoffen und Gemischen sowie bei Feststoffen, Flüssigkeiten, halbfesten Stoffen und Wachsen anwendbar. Flüssigkeiten können

wässrig oder nicht wässrig sein, Feststoffe in Wasser löslich oder unlöslich. Sofern möglich, sollten Feststoffe vor der Applikation zu Feinpulver gemahlen werden; eine weitere Behandlung der Probe ist nicht nötig. In den Validierungsstudien wurden keine Gase und Aerosole bewertet. Obwohl deren Prüfung mit der RhCE-Technologie prinzipiell vorstellbar ist, erlaubt die vorliegende Prüfmethode das Untersuchen von Gasen und Aerosolen nicht.

12. Prüfchemikalien, die Licht im selben Spektrum absorbieren können wie MTT-Formazan (natürlich oder nach einer Behandlung), und Prüfchemikalien, die in der Lage sind, den lebenswichtigen Farbstoff MTT zu reduzieren (zu MTT-Formazan), können die Messungen der Gewebeviabilität stören und erfordern die Verwendung geeigneter Kontrollen zur Korrektur. Die Art der möglicherweise erforderlichen geeigneten Kontrollen hängt von der Art der durch die Prüfchemikalie ausgelösten Interferenzen und vom Verfahren zur Quantifizierung von MTT-Formazan ab (Nummern 36-42).
13. Die Ergebnisse von Vorvalidierungsstudien (21) (22) und von umfassenden Validierungsstudien (8) (10) (11) haben gezeigt, dass sowohl der EpiOcular™ EIT als auch der SkinEthic™ HCE EIT auch in Labors durchgeführt werden können, die noch nicht über Erfahrungen mit der Durchführung dieser Assays verfügen, und dass die Ergebnisse sowohl innerhalb der Labors als auch zwischen den Labors reproduzierbar sind. Diesen Studien zufolge liegt die zu erwartende Reproduzierbarkeit hinsichtlich der Übereinstimmung der Vorhersagen beim EpiOcular™ EIT mit Daten zu 113 Chemikalien bei 95 % (innerhalb von Labors) bzw. 93 % (zwischen Labors). Die zu erwartende Reproduzierbarkeit hinsichtlich der Übereinstimmung der Vorhersagen beim SkinEthic™ HCE EIT mit Daten zu 120 Chemikalien beträgt 92 % (innerhalb von Labors) bzw. 95 % (zwischen Labors).
14. Der EpiOcular™ EIT kann auch zur Identifizierung von Chemikalien angewendet werden, die keine Einstufung als augenreizend oder schwer augenschädigend gemäß dem UN GHS und der CLP-Verordnung erfordern. Aufgrund der in der Validierungsstudie ermittelten Daten (8) ergeben sich für den EpiOcular™ EIT eine Gesamtgenauigkeit von 80 % (bei 112 Chemikalien), eine Sensitivität von 96 % (bei 57 Chemikalien), eine Falsch-negativ-Rate von 4 % (bei 57 Chemikalien), eine Spezifität von 63 % (bei 55 Chemikalien) und eine Falsch-negativ-Rate von 37 % (bei 55 Chemikalien) im Vergleich zu den Daten des *In-vivo*-Kaninchenaugentests (PM B.5) (2) (14) bei Einstufung nach dem UN GHS und der CLP-Verordnung. In einer Studie, in der 97 flüssige agrochemische Zubereitungen mit dem EpiOcular™ EIT geprüft wurden, wurde für diese Art von Gemischen eine ähnliche Leistungsfähigkeit der Prüfmethode festgestellt wie in der Validierungsstudie (23). Die 97 Zubereitungen verteilten sich wie folgt: 21 Kategorie 1, 19 Kategorie 2A, 14 Kategorie 2B und 43 Keine Einstufung bei Einstufung nach dem UN GHS bezogen auf Referenzdaten des *In-vivo*-Kaninchenaugentests (PM B.5) (2) (14). Folgende

Werte wurden ermittelt: Gesamtgenauigkeit 82 % (97 Zubereitungen), Sensitivität 91 % (54 Zubereitungen), Falsch-negativ-Rate 9 % (54 Zubereitungen), Spezifität 72 % (43 Zubereitungen) und Falsch-positiv-Rate 28 % (43 Zubereitungen) (23).

15. Der SkinEthic™ HCE EIT kann auch zur Identifizierung von Chemikalien angewendet werden, die keine Einstufung als augenreizend oder schwer augenschädigend gemäß dem UN GHS und der CLP-Verordnung erfordern. Aufgrund der in der Validierungsstudie ermittelten Daten (10) (11) ergeben sich für den SkinEthic™ HCE EIT eine Gesamtgenauigkeit von 84 % (bei 200 Chemikalien), eine Sensitivität von 95 % (bei 97 Chemikalien), eine Falsch-negativ-Rate von 5 % (bei 97 Chemikalien), eine Spezifität von 72 % (bei 103 Chemikalien) und eine Falsch-negativ-Rate von 28 % (bei 103 Chemikalien) im Vergleich zu den Daten des *In-vivo*-Kaninchenaugentests (PM B.5) (2) (14) bei Einstufung nach dem UN GHS und der CLP-Verordnung.
16. Die mit beiden RhCE-Prüfungen mit Stoffen oder Gemischen ermittelten Falsch-negativ-Raten liegen bei 12 % der Gesamtwahrscheinlichkeit, dass Chemikalien im *In-vivo*-Draize-Augentest bei wiederholten Prüfungen entweder als UN-GHS-/CLP-Kategorie 2 oder als UN-GHS-/CLP-Kategorie Keine Einstufung ermittelt werden; dies ist auf die prüfungsimmanente Variabilität der Methode zurückzuführen (24). Die mit beiden RhCE-Prüfmethoden sowohl bei Stoffen als auch bei Gemischen ermittelten Falsch-positiv-Raten sind bei dieser Prüfmethode nicht kritisch, da alle Prüfchemikalien, für die sich eine Gewebeviabilität von kleiner oder gleich den festgelegten Grenzwerten ergibt (Nummer 44), je nach den rechtlichen Anforderungen im Rahmen einer sequenziellen Prüfstrategie nach einem evidenzbasierten Ansatz weiteren *In-vitro*-Prüfmethoden bzw. als letzte Möglichkeit Kaninchentests unterzogen werden müssen. Diese Prüfmethoden können für alle Arten von Chemikalien eingesetzt werden, wobei ein Negativergebnis als Indikator dafür akzeptiert werden sollte, dass die betreffenden Chemikalien nicht als augenreizend oder schwer augenschädigend einzustufen sind (UN-GHS-/CLP-Kategorie Keine Einstufung). Außerdem sollten die zuständigen Regulierungsbehörden konsultiert werden, bevor die Kurzzeitprüfung mit dem EpiOcular™ EIT und dem SkinEthic™ HCE EIT unter Berücksichtigung einer anderen Klassifizierungsregelung als der des UN GHS bzw. der CLP-Verordnung durchgeführt wird.
17. Eine Einschränkung besteht bei dieser Prüfmethode darin, dass nicht zwischen Augenreizungen / reversiblen Wirkungen am Auge (Kategorie 2) und schweren Augenschädigungen / irreversiblen Wirkungen am Auge (Kategorie 1) im Sinne des UN GHS und der CLP-Verordnung und nicht zwischen einer augenreizenden Wirkung (optionale Kategorie 2A) und einer schwach augenreizenden Wirkung (optionale Kategorie 2B) im Sinne des UN GHS unterschieden werden kann (1). Um

diese Unterscheidungen vornehmen zu können, müssen weitere Untersuchungen mit anderen *In-vitro*-Prüfmethoden vorgenommen werden.

18. Der Begriff „Prüfchemikalie“ bezeichnet bei dieser Prüfmethode das, was geprüft wird,¹ und bezieht sich nicht auf die Anwendbarkeit der RhCE-Prüfmethode zur Prüfung von Stoffen und/oder Gemischen.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

19. Die Prüfchemikalie wird oberflächlich auf zwei dreidimensionale RhE-Modelle appliziert. Nach der Exposition und der Inkubation im Anschluss an die Behandlung wird die Gewebeviabilität gemessen. Die RhCE-Gewebe werden aus primären humanen epidermalen Keratinozyten oder humanen immortalisierten Hornhaut-Epithelzellen rekonstruiert, die mehrere Tage bis zur Bildung eines geschichteten Plattenepithels mit ausgeprägter Differenzierung kultiviert wurden, das das menschliche Hornhaut-Epithel widerspiegelt. Das RhCE-Gewebemodell des EpiOcular™ EIT besteht aus mindestens drei lebensfähigen Zellschichten mit nicht verhornter Oberfläche mit hornhautartiger Struktur entsprechend der *In-vivo*-Struktur. Das RhCE-Gewebemodell des SkinEthic™ HCE EIT umfasst mindestens vier lebensfähige Zellschichten mit säulenartigen Basalzellen, Flügelzellen (Übergangszellen) und oberflächlichen Plattenepithelzellen ähnlich dem normalen menschlichen Hornhaut-Epithel (20) (26).
20. Chemisch induzierte Augenreizungen bzw. schwere Augenschädigungen, die sich *in vivo* vorwiegend in einer Hornhauttrübung, Irititis, Bindehautrötung und/oder einem Bindehautödem (Chemose) äußern, sind auf eine Kaskade von Ereignissen zurückzuführen, an deren Beginn das Eindringen der Chemikalien in die Hornhaut und/oder die Bindehaut und die Schädigung von Zellen stehen. Zellschädigungen können aufgrund unterschiedlicher Wirkungsweisen entstehen, darunter eine Lyse der Zellmembran (z. B. durch Tenside oder organische Lösungsmittel), die Koagulation von Makromolekülen (insbesondere Proteinen) (z. B. durch Tenside, organische Lösungsmittel, Laugen und Säuren), die Verseifung von Lipiden (z. B. durch Laugen) und Alkylierungen oder sonstige kovalente Wechselwirkungen mit Makromolekülen (z. B. durch Bleichmittel, Peroxide und Alkylierungsmittel) (15) (27) (28). Allerdings wurde nicht nachgewiesen, dass die Zytotoxizität unabhängig von den der Gewebeschädigung zugrunde liegenden physikalisch-chemischen Prozessen eine

¹ Im Juni 2013 kam die Gemeinsame Tagung der OECD überein, dass der Begriff „Prüfchemikalie“ zur Beschreibung des Prüfgegenstandes bei neuen und aktualisierten OCED-Prüfrichtlinien einheitlicher verwendet werden sollte.

wichtige, wenn nicht die primäre, ursächliche Rolle bei der Ermittlung der Gesamtreaktion im Hinblick auf Augenreizungen bzw. schwere Augenschädigungen durch eine Chemikalie spielt (29) (30). Das Potenzial einer Chemikalie, eine Augenreizung oder eine schwere Augenschädigung zu verursachen, hängt vom Umfang der Ausgangsverletzung (31) ab, der mit dem Umfang, in dem Zellen absterben, (29) und mit dem Umfang der anschließenden Reaktionen und der endgültigen Ergebnisse (32) korreliert. Leichte Reizungen betreffen daher gewöhnlich nur das oberflächliche Hornhaut-Epithel, geringe und mäßige Reizungen schädigen hauptsächlich das Epithel und das oberflächliche Stroma, und schwere Reizungen führen zu Schädigungen des Epithels, des tiefen Stromas und gelegentlich des Hornhaut-Endothels (30) (33). Die Messung der Viabilität des RhCE-Gewebemodells nach der oberflächlichen Applikation einer Prüfchemikalie zur Ermittlung von Chemikalien, bei denen eine Einstufung als augenreizend oder schwer augenschädigend nicht erforderlich ist (UN-GHS-/CLP-Kategorie Keine Einstufung), beruht auf der Annahme, dass alle Chemikalien, die Augenreizungen oder schwere Augenschädigungen verursachen, im Hornhaut-Epithel und/oder in der Bindehaut eine zytotxische Wirkung induzieren.

21. Die Viabilität des RhCE-Gewebes wird gewöhnlich anhand der durch die lebensfähigen Zellen des Gewebes bewirkten Enzymkonversion des Vitalfarbstoffs MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid, Thiazolyl-Blau-Tetrazoliumbromid; CAS-Nummer 298-93-1] zu einem blauen MTT-Formazan-Salz gemessen, das nach seiner Extraktion aus Geweben quantifiziert wird (16). Chemikalien, bei denen eine Einstufung und Kennzeichnung nach dem UN GHS bzw. der CLP-Verordnung nicht erforderlich ist (Kategorie Keine Einstufung), sind die Chemikalien, bei denen die Viabilität des Gewebes eine festgelegte Grenze nicht unterschreitet (d. h. Gewebeviabilität > 60 % beim EpiOcular™ EIT und beim SkinEthic™ HCE EITL¹ und > 50 % beim SkinEthic™ HCE EITS²) (Nummer 44).

NACHWEIS DER LEISTUNGSFÄHIGKEIT

22. Vor der routinemäßigen Durchführung von RhCE-Prüfungen für rechtliche Zwecke sollten Labors die erforderliche technische Befähigung durch eine ordnungsgemäße Einstufung der 15 in Tabelle 1 genannten Chemikalien nachweisen. Diese Chemikalien wurden unter den in den Validierungsstudien der VRM verwendeten

¹ EITL: SkinEthic™ HCE EIT bei Flüssigkeiten.

² EITS: SkinEthic™ HCE EIT bei Feststoffen.

Chemikalien ausgewählt (8) (10) (11). Die Auswahl beinhaltet nach Möglichkeit Chemikalien, die (i) verschiedene Aggregatzustände abdecken, (ii) das gesamte Spektrum an *in vivo* auftretenden Augenreizungen bzw. schweren Augenschädigungen nach hochwertigen Ergebnissen des *In-vivo*-Kaninchenaugen-Referenztests (PM B.5) (2) (14) sowie nach dem UN GHS (d. h. Kategorien 1, 2A, 2B und Keine Einstufung) (1) und nach der CLP-Verordnung (d. h. Kategorien 1 oder 2 bzw. Keine Einstufung) abdecken, (iii) die verschiedenen *In-vivo*-Einstufungsparameter abdecken (24) (25), (iv) repräsentativ für die in der Validierungsstudie verwendeten Chemikalienklassen sind (8) (10) (11), (v) organische Funktionsgruppen gut und umfassend repräsentieren (8) (10) (11), (vi) gut definierte chemische Strukturen aufweisen (8) (10) (11), (vii) farbige und/oder direkte MTT-Reduktionsmittel sind, (viii) bei der Validierung zu reproduzierbaren Ergebnissen geführt haben, (ix) mit RhCE-Prüfmethoden in den jeweiligen Validierungsstudien korrekt vorhergesagt wurden, (x) das gesamte Spektrum an *In-vitro*-Reaktionen abdecken, das mit hochwertigen RhCE-Prüfmethoden ermittelt wurde (Viabilität 0-100 %), (xi) im Handel erhältlich sind und (xii) nicht mit untragbar hohen Beschaffungs- und/oder Entsorgungskosten verbunden sind. Wenn eine genannte Chemikalie nicht erhältlich ist oder aus sonstigen berechtigten Gründen nicht verwendet werden kann, kann eine andere Chemikalie eingesetzt werden, die die oben beschriebenen Anforderungen erfüllt (z. B. eine bei der Validierung der VRM verwendete Chemikalie). Solche Abweichungen sollten nur in gerechtfertigten Fällen vorkommen.

Tabelle 1: Liste der Leistungskemikalien

Chemische Bezeichnung	CAS-Nr.	Organische Funktionsgruppe ¹	Aggregatzustand	Viabilität VRM 1 (%) ²	Viabilität VRM 2 (%) ³	Vorhersage VRM	MTT-Reduktionsmittel	Farbinterf.
<i>In-vivo-Kategorie 1⁴</i>								
Methylmercaptoacetat (Methylthioglykolat)	2365-48-2	Carbonsäureester, Thioalkohol	L	10,9 ± 6,4	5,5 ± 7,4	Keine Vorhersage möglich	J (stark)	N
Hydroxyethylacrylat	818-61-1	Acrylat, Alkohol	L	7,5 ± 4,7 ⁵	1,6 ± 1,0	Keine Vorhersage möglich	N	N
2,5-Dimethyl-2,5-hexanediol	110-03-2	Alkohol	S	2,3 ± 0,2	0,2 ± 0,1	Keine Vorhersage möglich	N	N
Natriumoxalat	62-76-0	Oxocarbonsäure	S	29,0 ± 1,2	5,3 ± 4,1	Keine Vorhersage möglich	N	N
<i>In-vivo-Kategorie 2A⁴</i>								
2,4,11,13-Tetraazatetradecandiimidamid, N,N"-Bis(4-Chlorphenyl)-3,12-diimino-, di-D-gluconat (20 %, wässrig) ⁶	18472-51-0	Aromatisches heterozyklisches Halogenid, Aryl-Halogenid, Dihydroxyl-Gruppe, Guanidin	L	4,0 ± 1,1	1,3 ± 0,6	Keine Vorhersage möglich	N	J (schwach)
Natriumbenzoat	532-32-1	Aryl, Carboxylsäure	S	3,5 ± 2,6	0,6 ± 0,1	Keine Vorhersage möglich	N	N
<i>In-vivo-Kategorie 2B⁴</i>								
Diethyltoluamid	134-62-3	Benzamid	L	15,6 ± 6,3	2,8 ± 0,9	Keine Vorhersage möglich	N	N

Chemische Bezeichnung	CAS-Nr.	Organische Funktionsgruppe ¹	Aggregatzustand	Viabilität VRM 1 (%) ²	Viabilität VRM 2 (%) ³	Vorhersage VRM	MTT-Reduktionsmittel	Farbinterf.
2,2-Dimethyl-3-methylenbicyclo[2.2.1]-heptan;	79-92-5	Alkan, verzweigt mit tertiärem Kohlenstoff; Alken; Bicycloheptan; Kohlenstoffzyklen mit Brückenbindung; Cycloalkan	S	4,7 ± 1,5	15,8 ± 1,1	Keine Vorhersage möglich	N	N
<i>In Vivo Keine Einstufung⁴</i>								
1-Ethyl-3-methylimidazolium-ethylsulfat	342573-75-5	Alkoxy, Ammoniumsalz, Aryl; Imidazol, Sulfat	L	79,9 ± 6,4	79,4 ± 6,2	Keine Einst.	N	N
Dicaprylylether	629-82-3	Alkoxy, Ether	L	97,8 ± 4,3	95,2 ± 3,0	Keine Einst.	N	N
Piperonylbutoxid	51-03-6	Alkoxy, Benzodioxol, Benzyl, Ether	L	104,2 ± 4,2	96,5 ± 3,5	Keine Einst.	N	N
Polyethylenglycol (PEG-40) hydriertes Rizinusöl	61788-85-0	Acylal, Alkohol, Allyl, Ether	Viskose Flüssigkeit	77,6 ± 5,4	89,1 ± 2,9	Keine Einst.	N	N
1-(4-Chlorphenyl)-3-(3,4-dichlorphenyl)-harnstoff	101-20-2	Aromatisches heterozyklisches Halogenid, Aryl-Halogenid, Harnstoffderivate	S	106,7 ± 5,3	101,9 ± 6,6	Keine Einst.	N	N
2,2'-Methylen-bis-(6-(2H-benzotriazol-2-yl)-4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenol)	103597-45-1	Alkan verzweigt mit quartärem Kohlenstoff, kondensierte carbocyclische aromatische Verbindungen, kondensierte gesättigte Heterocyclen, Vorläuferchemikalien quinoider Verbindungen, tert-Butyl	S	102,7 ± 13,4	97,7 ± 5,6	Keine Einst.	N	N
Kaliumtetrafluoroborat	14075-53-7	Anorganische Salze	S	88,6 ± 3,3	92,9 ± 5,1	Keine Einst.	N	N

Abkürzungen: CASRN = Registernummern des Chemical Abstracts Service.; UN GHS = United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (1); VRM 1 = validierte Referenzmethode, EpiOcular™ EIT; VRM 2 = validierte Referenzmethode, SkinEthic™ HCE EIT; Farbinterf. = Farbinterferenz mit der Standardabsorption (optische Dichte (OD)) Messung von MTT-Formazan.

¹ Organische Funktionsgruppe, zugewiesen aufgrund einer Nested Analysis der OECD Toolbox 3.1 (8).

² Nach den Ergebnissen eines EpiOcular™ EIT in der EURL ECVAM/Cosmetics Europe Eye Irritation Validation Study (EIVS) (8).

³ Nach den Ergebnissen des SkinEthic™ HCE EIT in der Validierungsstudie (10) (11).

⁴ Nach den Ergebnissen des *In-vivo*-Kaninchenaugentests (PM B.5/OECD TG 405) (2) (14) unter Berücksichtigung des UN GHS.

⁵ Nach den Ergebnissen der Studie des CEFIC Consortium for *in vitro* Eye Irritation testing strategy (CON4EI).

⁶ Die Einstufung in die Kategorie 2A oder 2B ist von der Auswertung der Kriterien des UN-GHS zur Unterscheidung zwischen diesen beiden Kategorien abhängig, d. h. für eine Einstufung in die Kategorie 2A müssen an 1 von 3 gegenüber 2 von 3 Tieren Wirkungen an Tag 7 beobachtet werden. Die *In-vivo*-Studie umfasste drei Tiere. Alle Endpunkte mit Ausnahme einer Hornhauttrübung bei einem Tier, gingen bis Tag 7 oder früher auf einen Wert von null zurück. Das eine Tier, das sich bis Tag 7 nicht vollständig regeneriert hatte, wies (an Tag 7) einen Hornhauttrübungswert von 1 auf, der an Tag 9 ganz zurückgegangen war.

23. Im Rahmen des Nachweises der Leistungsfähigkeit sollten die Benutzer die vom Hersteller des RhCE-Gewebemodells spezifizierten Barriereigenschaften der Gewebe nach Erhalt überprüfen (Nummern 25, 27 und 30). Dies ist besonders dann wichtig, wenn die Gewebe über große Entfernungen/Zeiträume transportiert werden. Sobald eine Prüfung erfolgreich etabliert und ihre Leistungsfähigkeit festgestellt und nachgewiesen wurde, ist diese Überprüfung nicht mehr routinemäßig erforderlich. Allerdings empfiehlt es sich auch bei routinemäßig durchgeführten Prüfungen, die Barriereigenschaften in regelmäßigen Abständen zu kontrollieren.

PRÜFVERFAHREN

24. Gegenwärtig entsprechen der EpiOcular™ EIT und der SkinEthic™ HCE EIT als wissenschaftlich fundierte Prüfungen dieser Prüfmethode (9) (12) (13); diese Prüfungen werden auch als validierte Referenzmethoden (VRM 1 bzw. VRM 2) bezeichnet. Für die RhCE-Prüfmethoden liegen Standardarbeitsanweisungen vor, die bei der Umsetzung und Verwendung dieser Prüfmethoden im Labor angewendet werden sollten (34) (35). In den folgenden Abschnitten sowie in Anlage 2 werden die wesentlichen Elemente und Verfahren der RhCE-Prüfungen beschrieben.

ELEMENTE DER RHCE-PRÜFMETHODE

Allgemeine Bedingungen

25. Zur Rekonstruktion des aus progressiv geschichteten, aber nicht verhornten Zellen bestehenden dreidimensionalen hornhautartigen Epithelgewebes sind die betreffenden menschlichen Zellen zu verwenden. Das RhCE-Gewebemodell wird in Einsätzen mit einer porösen synthetischen Membran konstruiert, durch die Nährstoffe in die Zellen gelangen können. Das rekonstruierte hornhautartige Epithel sollte mehrere Schichten lebensfähiger nicht verhornter Epithelzellen enthalten. Beim RhCE-Gewebemodell sollte die Epitheloberfläche unmittelbar mit der Luft in Berührung kommen, damit eine oberflächliche Exposition gegenüber den Prüfchemikalien ähnlich wie *in vivo* beim natürlichen Hornhaut-Epithel erfolgen kann. Das RhCE-Gewebemodell sollte eine funktionsfähige Barriere bilden, die so robust ist, dass sie eine rasche Durchdringung zytotoxischer Referenzstoffe (z. B. Triton X-100 oder Natriumdodecylsulfat (SDS)) verhindert. Die Barrierefunktion sollte nachgewiesen werden. Zur Beurteilung der Barrierewirkung kann entweder die Expositionszeit, bei der nach Applikation eines Referenzstoffs in einer bestimmten festgelegten Konzentration (z. B. 100 µl 0,3 % (v/v) Triton X-100) die Viabilität eines Gewebes um 50 % reduziert wird (ET₅₀), oder die Konzentration bestimmt werden, bei der ein Referenzstoff nach einer bestimmten Expositionszeit (z. B. nach 30-minütiger Behandlung mit 50 µl SDS) die Viabilität der Gewebe um 50 % reduziert (IC₅₀)

(Nummer 30). Die Rückhalteeigenschaften des RhCE-Gewebemodells müssen ausschließen, dass die Prüfchemikalie rund um die Hornschicht in lebensfähiges Gewebe eindringt und die Modellierung der Hornhautexposition beeinträchtigt. Die zur Herstellung des RhCE-Gewebemodells verwendeten menschlichen Zellen müssen frei von Verunreinigungen durch Bakterien, Viren, Mycoplasma und Pilze sein. Der Hersteller prüft die Sterilität des Gewebemodells und stellt sicher, dass das Modell nicht durch Pilze oder Bakterien verunreinigt ist.

Funktionale Bedingungen

Viabilität

26. Die Größenordnung der Viabilität der Gewebe wird mit der MTT-Prüfung bestimmt (16). Die lebensfähigen Zellen des RhCE-Gewebemodells reduzieren den lebenswichtigen Farbstoff MTT zu einem blauen MTT-Formazan-Niederschlag, der dann mit Isopropanol (oder einem ähnlichen Lösungsmittel) aus dem Gewebe extrahiert wird. Das extrahierte MTT-Formazan kann durch eine Standard-(OD)-Absorptionsmessung oder mit einem HPLC/UPLC-Spektrometrieverfahren (OD = optische Dichte) (36) quantifiziert werden. Die optische Dichte (OD) des reinen Extraktionslösungsmittels sollte ausreichend gering sein, d. h. $OD < 0,1$. Das RhCE-Gewebemodell sollte sicherstellen, dass jede Charge des verwendeten RhCE-Gewebemodells die vorgegebenen Kriterien für die Negativkontrolle erfüllt. Die Akzeptanzspannen der OD-Werte der Negativkontrolle für die VRM sind Tabelle 2 zu entnehmen. Bei Durchführung einer HPLC/UPLC-Spektrophotometrie sollten die in Tabelle 2 genannten OD-Spannen der Negativkontrolle als Akzeptanzkriterium für die Negativkontrolle angenommen werden. Im Prüfbericht sollte dokumentiert werden, dass die mit dem Negativkontrollstoff behandelten Gewebe über den gesamten Expositionszeitraum stabil bleiben (bzw. dass eine vergleichbare Gewebeviabilität gemessen wird). Entsprechend verfährt der Hersteller des Gewebes im Rahmen der Qualitätskontrolle zur Freigabe der Gewebecharge. Dabei können allerdings andere als die in Tabelle 2 genannten Akzeptanzkriterien maßgeblich sein. Der Entwickler/Hersteller des RhCE-Gewebemodells sollte eine Akzeptanzspanne (oberer und unterer Grenzwert) für die OD-Werte der Negativkontrolle (unter den Bedingungen bei der Qualitätskontrolle der Prüfmethode) festlegen.

Tabelle 2: Akzeptanzspannen für OD-Werte der Negativkontrolle zur Kontrolle der Chargenqualität (für die Anwender der Prüfung)

Prüfung	Untere Akzeptanzgrenze	Obere Akzeptanzgrenze
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM 1 (Protokolle für Flüssigkeiten und für Feststoffe)	$> 0,8^1$	$< 2,5$

SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM 2 (Protokolle für Flüssigkeiten und für Feststoffe)	> 1,0	≤ 2,5

¹ Diese Akzeptanzgrenze trägt der Möglichkeit längerer Versand- oder Lagerzeiten (z. B. > 4 Tage) Rechnung, die nachweislich keine Auswirkungen auf die Leistungsfähigkeit der Prüfmethode haben (37).

Barrierefunktion

27. Das RhCE-Gewebemodell sollte so dick und robust sein, dass es ein rasches Eindringen der zytotoxischen Referenzstoffe verhindert; als Maßstab sind die Werte z. B. für ET₅₀ (Triton X-100) oder IC₅₀ (SDS) (Tabelle 3) anzunehmen. Die Barrierefunktion der einzelnen Chargen des verwendeten RhCE-Gewebemodells sollte nach der Lieferung der Gewebe an den Endverwender vom Entwickler/Hersteller des RhCE-Gewebemodells nachgewiesen werden (Nummer 30).

Morphologie

28. Anhand einer histologischen Untersuchung des RhCE-Gewebemodells sollte die Ähnlichkeit des Epithelgewebes mit der menschlichen Hornhaut (bei mindestens 3 Schichten lebensfähiger Epithelzellen und nicht verhornter Oberfläche) nachgewiesen werden. Für die VRM hat der Entwickler/Hersteller eine geeignete Morphologie nachgewiesen. Daher brauchen die Anwender der Prüfmethode diesen Nachweis nicht für jede einzelne verwendete Gewebecharge neu zu führen.

Reproduzierbarkeit

29. Die Ergebnisse der Positivkontrolle und der Negativkontrollen der Prüfmethode sollen die Reproduzierbarkeit über längere Zeit belegen.

Qualitätskontrolle (QK)

30. Das RhCE-Gewebemodell sollte nur dann verwendet werden, wenn der Entwickler/Hersteller nachweist, dass jede Charge des verwendeten RhCE-Gewebemodells bestimmten Freigabekriterien genügt, von denen die Kriterien der Viabilität (Nummer 26) und der Barrierefunktion (Nummer 27) die wichtigsten sind. Der Entwickler/Hersteller des RhCE-Gewebemodells legt eine Akzeptanzspanne (oberer und unterer Grenzwert) für die Barrierefunktionen anhand der Werte für ET₅₀ oder IC₅₀ (Nummern 25 und 26) fest. Die vom Entwickler/Hersteller der RhCE-Gewebemodelle bei der Qualitätskontrolle für die Freigabe einer Charge angenommenen (und für die VRM verwendeten) Akzeptanzspannen für ET₅₀ und IC₅₀ sind Tabelle 3 zu entnehmen. Der Entwickler/Hersteller des RhCE-Gewebemodells stellt den Anwendern der Prüfmethode Daten zur Verfügung, die die Erfüllung sämtlicher Freigabekriterien belegen, damit die Anwender die betreffenden Informationen im Prüfbericht berücksichtigen können. Für die zuverlässige Vorhersage, dass Chemikalien eine Einstufung und Kennzeichnung im Hinblick auf eine augenreizende oder schwer augenschädigende Wirkung nach dem UN GHS bzw.

der CLP-Verordnung nicht erfordern, können ausschließlich Ergebnisse akzeptiert werden, die mit Geweben ermittelt wurden, die diese Freigabekriterien vollständig erfüllen.

Tabelle 3: Chargenfreigabekriterien im Rahmen der Qualitätskontrolle

Prüfung	Untere Akzeptanzgrenze	Obere Akzeptanzgrenze
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM 1 (100 µl 0,3 % (v/v) Triton X-100)	ET ₅₀ = 12,2 min	ET ₅₀ = 37,5 min
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM 2 (30-minütige Behandlung mit 50 µl SDS)	IC ₅₀ = 1 mg/ml	IC ₅₀ = 3,2 mg/ml

Applikation der Prüfchemikalie und der Kontrollstoffe

31. Für jede Prüfchemikalie und für jeden Prüfstoff sollten bei jedem Prüflauf mindestens zwei Gewebereplikate verwendet werden. Zwei unterschiedliche Behandlungsprotokolle werden verwendet (jeweils eines für flüssige und eines für feste Prüfchemikalien) (34) (35). Bei beiden Methoden und Protokollen ist die Oberfläche des Gewebemodells vor der Applikation von Prüfchemikalien mit calcium- und magnesiumfreiem Dulbecco-Phosphatpuffer (Ca²⁺/Mg²⁺-freiem DPBS) zu befeuchten, um eine Feuchtigkeit ähnlich wie am menschlichen Auge herzustellen. Die Behandlung der Gewebe beginnt mit der Exposition gegenüber den Prüfchemikalien und den Kontrollstoffen. Nach den beiden Behandlungsprotokollen der beiden VRM sind die Prüfchemikalien und Kontrollstoffe so ausreichend aufzutragen, dass die gesamte Epitheloberfläche gleichmäßig bedeckt, eine unklare Dosierung jedoch vermieden wird (Nummern 32 und 33) (Anlage 2).
32. Prüfchemikalien, die bei höchstens 37 °C pipettiert werden können (erforderlichenfalls mit einer Direktverdränger-Pipette), werden in den VRM als Flüssigkeiten behandelt; ansonsten sind die Prüfchemikalien als Feststoffe zu betrachten (Nummer 33). Bei den VRM wird die flüssige Prüfchemikalie gleichmäßig auf die Gewebeoberfläche aufgetragen (mindestens 60 µl/cm²) (siehe Anlage 2, (33) (34)). Kapillareffekte (Wirkungen der Oberflächenspannung), die aufgrund der geringen Volumina der in den Einsatz (auf die Gewebeoberfläche) aufgetragenen Chemikalien auftreten könnten, sollten möglichst vermieden werden, um eine korrekte Dosierung bei der Behandlung des Gewebes sicherzustellen. Mit flüssigen Prüfchemikalien behandelte Gewebe werden 30 Minuten bei Standard-Kulturbedingungen (37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO₂, ≥95 % relative Luftfeuchtigkeit) inkubiert. Am Ende des Expositionszeitraums werden die flüssige Prüfchemikalie und die Kontrollstoffe unter gründlichem Waschen mit Ca²⁺/Mg²⁺-freiem DPBS bei Raumtemperatur vorsichtig von der Gewebeoberfläche entfernt. Nach der Behandlung und nach dem Waschen erfolgt eine Immersion des Gewebes bei Raumtemperatur für einen bestimmten, je nach VRM unterschiedlichen Zeitraum in ein frisches Medium,

um im Gewebe absorbierte Rückstände der Prüfchemikalien zu entfernen. Nur bei VRM 1 werden die Zellen nach der Exposition und vor der Durchführung der MTT-Prüfung in einem frischen Medium bei Standard-Kulturbedingungen inkubiert (siehe Anlage 2, (34) (35)).

33. Prüfchemikalien, die bei Temperaturen bis zu 37 °C nicht pipettiert werden können, werden in den VRM als Feststoffe behandelt. Die Prüfchemikalie sollte in ausreichender Menge aufgetragen werden, um die gesamte Oberfläche des Gewebes zu bedecken (d. h. mindestens 60 mg/cm² (Anlage 2)). Feststoffe sollten nach Möglichkeit als Feinpulver geprüft werden. Mit festen Prüfchemikalien behandelte Gewebe werden über einen festgelegten Zeitraum (je nach VRM) bei Standard-Kulturbedingungen inkubiert (siehe Anlage 2, (34) (35)). Am Ende des Expositionszeitraums werden die feste Prüfchemikalie und die Kontrollstoffe unter gründlichem Waschen mit Ca²⁺/Mg²⁺-freiem DPBS bei Raumtemperatur vorsichtig von der Gewebeoberfläche entfernt. Nach der Behandlung und nach dem Waschen erfolgt eine Immersion des Gewebes bei Raumtemperatur für einen bestimmten, je nach VRM unterschiedlichen, Zeitraum in ein frisches Medium, um im Gewebe absorbierte Rückstände der Prüfchemikalien zu entfernen. Nach der Exposition und vor der Durchführung der MTT-Prüfung werden die Zellen in frischem Medium bei Standard-Kulturbedingungen inkubiert (siehe Anlage 2, (34) (35)).
34. Bei jedem Prüflauf sind gleichzeitige Negativ- und Positivkontrollen zu berücksichtigen, um nachzuweisen, dass die Werte für die Viabilität (mit der Negativkontrolle ermittelt) und die Sensitivität (mit der Positivkontrolle ermittelt) der Gewebe innerhalb der anhand historischer Daten festgelegten Akzeptanzspannen liegen. Die gleichzeitige Negativkontrolle dient auch als Referenzwert (Gewebeviabilität 100 %) zur Berechnung der relativen Viabilität der mit der Prüfchemikalie behandelten Gewebe (% Viabilität_{Prüfung}). Der für die VRM empfohlene Positivkontrollstoff ist reines Methylacetat (CAS-Nr. 79-20-9, im Handel erhältlich beispielsweise von Sigma-Aldrich, Bestellnr. 45997, flüssig). Als Negativkontrollstoffe für VRM 1 und VRM 2 werden ultrareines H₂O bzw. Ca²⁺/Mg²⁺-freier DPBS empfohlen. Diese Kontrollstoffe wurden in den Studien zur Validierung der VRM verwendet und für diese Kontrollstoffe liegen die umfangreichsten historischen Daten vor. Die Verwendung geeigneter alternativer Positiv- oder Negativkontrollstoffe sollte wissenschaftlich begründet und angemessen gerechtfertigt sein. Negativ- und Positivkontrollen sollten mit denselben Protokollen wie die im jeweiligen Prüflauf (d. h. für Flüssigkeiten und/oder Feststoffe) verwendeten Prüfchemikalien geprüft werden. Vor der Durchführung der MTT-Prüfung (Nummer 35) ist hinsichtlich der Exposition und ggf. der Immersion nach der Behandlung das Protokoll so einzuhalten, wie für die gleichzeitig durchgeführten Kontrollen bei flüssigen Prüfchemikalien (Nummer 32) bzw. bei festen Prüfchemikalien (Nummer 33) beschrieben (34) (35). Eine einzelne Gruppe von

Negativ- und Positivkontrollen ist für alle in einem Prüflauf berücksichtigten Prüfchemikalien jeweils eines Aggregatzustands (flüssig oder fest) ausreichend.

Messungen der Gewebeviabilität

35. Die MTT-Prüfung ist eine standardisierte quantitative Methode (16), die zur Messung der Gewebeviabilität nach dieser Prüfmethode angewandt werden sollte. Sie ist zur Anwendung in einem dreidimensionalen Gewebemodell geeignet. Die MTT-Prüfung wird unmittelbar im Anschluss an die Inkubation nach der Behandlung durchgeführt. Bei den VRM wird die Probe des RhCE-Gewebemodells 180 ± 15 Minuten bei Standard-Kulturbedingungen in 0,3 ml MTT-Lösung (1 mg/ml) gegeben. Der Vitalfarbstoff MTT wird durch die lebensfähigen Zellen des RhCE-Gewebemodells zu einem blauen MTT-Formazan-Niederschlag reduziert. Der blaue MTT-Formazan-Niederschlag wird dann mit einer geeigneten Menge Isopropanol (oder einem ähnlichen Lösungsmittel) aus dem Gewebe extrahiert (34) (35). Mit flüssigen Prüfchemikalien geprüfte Gewebe sind sowohl oben als auch unten aus dem Gewebe zu extrahieren. Mit festen Prüfchemikalien und mit gefärbten Flüssigkeiten geprüfte Gewebe dagegen sind ausschließlich aus dem unteren Bereich zu extrahieren (um die Gefahr einer Verunreinigung der Isopropanol-Extraktionslösung durch möglicherweise im Gewebe verbliebene Prüfchemikalien zu minimieren). Bei Geweben, die mit flüssigen Prüfchemikalien geprüft wurden, die nicht ohne Weiteres auswaschbar sind, muss die Extraktion unter Umständen ebenfalls ausschließlich aus dem unteren Bereich des Gewebes erfolgen. Die gleichzeitig geprüften Negativ- und Positivkontrollstoffe sind wie die geprüfte Chemikalie zu behandeln. Das extrahierte MTT-Formazan kann entweder durch eine Standardabsorptions-(OD-)Messung bei 570 nm innerhalb einer Filter-Bandbreite von maximal ± 30 nm oder mit einem HPLC/UPLC-Spektrophotometrieverfahren gemessen werden (Nummer 42) (11) (36).
36. Die optischen Eigenschaften der Prüfchemikalie bzw. ihre chemische Wirkung auf das MTT können die MTT-Formazan-Messung beeinträchtigen und dazu führen, dass die Gewebeviabilität falsch eingeschätzt wird. Prüfchemikalien können die MTT-Formazan-Messung durch direkte Reduzierung des MTT zu blauem MTT-Formazan und/oder durch Farbinterferenzen stören, wenn die Prüfchemikalie an sich oder infolge von Behandlungsverfahren in demselben OD-Bereich wie das MTT-Formazan (570 nm) absorbiert. Vor der eigentlichen Prüfung sind Vorprüfungen durchzuführen, um direkt wirkende potenzielle MTT-Reduziermittel und/oder Chemikalien zu ermitteln, die Farbinterferenzen verursachen können. Außerdem sollten weitere Kontrollen verwendet werden, um potenzielle Interferenzen aufgrund dieser Prüfchemikalien erkennen und korrigieren zu können (Nummern 37-41). Dies ist besonders dann wichtig, wenn eine bestimmte Prüfchemikalie nicht vollständig aus dem RhCE-Gewebemodell ausgewaschen wurde oder das hornhautartige Epithel durchdringt und daher bei Durchführung der MTT-Prüfung auch in den RhCE-

Gewebemodellen enthalten ist. Bei Prüfchemikalien, die (an sich oder nach einer Behandlung) Licht im selben Bereich wie MTT-Formazan absorbieren und wegen übermäßiger Interferenzen (d. h. einer Absorption bei 570 ± 30 nm) nicht mit der Standardabsorptions-(OD-)Messung bei MTT-Formazan im Einklang stehen, kann eine MTT-Formazan-Messung mit einem HPLC/UPLC-Spektrophotometrieverfahren vorgenommen werden (Nummern 41 und 42) (11) (36). Eine genaue Beschreibung der Vorgehensweise zur Erkennung und Korrektur einer direkten MTT-Reduktion sowie von Interferenzen durch Färbemittel ist den Standardarbeitsanweisungen für die VRM zu entnehmen (34) (35). Die Flussdiagramme in den Anhängen III und IV veranschaulichen die Vorgehensweise zur Erkennung und Behandlung von direkt wirkenden MTT-Reduktionsmitteln und von Farbbinterferenzen verursachenden Chemikalien für die VRM 1 und 2.

37. Um potenzielle Interferenzen durch Prüfchemikalien zu ermitteln, die (an sich oder nach einer Behandlung) Licht im selben Spektrum wie MTT-Formazan absorbieren, und um entscheiden zu können, ob weitere Kontrollen erforderlich sind, wird die Prüfchemikalie zu Wasser und/oder Isopropanol hinzugegeben und über einen angemessenen Zeitraum bei Raumtemperatur inkubiert (siehe Anlage 2, (34) (35)). Wenn die Prüfchemikalie bei VRM 1 in Wasser und/oder Isopropanol ausreichend Licht im Bereich von 570 ± 20 nm absorbiert (siehe Anlage 3), oder wenn bei VRM 2 eine farbige Lösung entsteht, wenn die Prüfchemikalie mit Wasser gemischt wird (siehe Anlage 4), ist anzunehmen, dass die Prüfchemikalie bei der Standardabsorptions-(OD-)Messung von MTT-Formazan Interferenzen verursacht; in diesem Fall sind weitere Farbkontrollen oder eine HPLC/UPLC-Spektrophotometrie vorzunehmen. Die betreffenden Kontrollen werden dann nicht benötigt (Nummern 41 und 42 sowie Anhänge III und IV) (34) (35). Bei Durchführung der Standardabsorptions-(OD-)Messung wird jede interferierende Prüfchemikalie auf mindestens zwei lebensfähige Gewebereplikate aufgetragen; diese Replikate werden dem vollständigen Prüfverfahren unterzogen, aber während der MTT-Inkubation nicht mit der MTT-Lösung, sondern mit einem Medium inkubiert, um in lebendem Gewebe eine nicht spezifische Farbe (NSC_{lebend}) zu erzeugen (34) (35). Die NSC_{lebend} -Kontrolle muss gleichzeitig mit der Untersuchung des Prüffarbstoffs durchgeführt werden, und bei mehreren Prüfungen ist wegen der inhärenten biologischen Variabilität lebender Gewebe für jede durchgeführte Prüfung (bei jedem Prüflauf) eine unabhängige NSC_{lebend} -Kontrolle zu prüfen. Die tatsächliche Viabilität des Gewebes wird als Prozentanteil der ermittelten Viabilität bei lebendem Gewebe nach der Exposition gegenüber der interferierenden Prüfchemikalie und nach Inkubation mit der MTT-Lösung (% Viabilität_{Prüfung}) abzüglich des Prozentanteils der nicht spezifischen Farbe berechnet, die bei gleichzeitig mit der zu korrigierenden Prüfung untersuchten lebenden Geweben nach Exposition gegenüber der interferierenden Prüfchemikalie und nach Inkubation mit einem Medium ohne MTT entstanden ist

(% NSC_{lebend}), d. h. tatsächliche Gewebeviabilität = [% Viabilität_{Prüfung}] - [% NSC_{lebend}].

38. Um direkte MTT-Reduktionsmittel zu identifizieren, sollten die Prüfchemikalien jeweils zu frisch hergestellter MTT-Lösung hinzugegeben werden. Eine geeignete Menge einer Prüfchemikalie wird zu einer MTT-Lösung hinzugegeben und etwa 3 Stunden unter Standard-Kulturbedingungen inkubiert (siehe Anhänge III und IV) (34) (35). Wenn sich das MTT-Gemisch mit der Prüfchemikalie (bzw. die Suspension bei nicht lösliche Prüfchemikalien) blau/violett färbt, ist davon auszugehen, dass die Prüfchemikalie das MTT direkt reduziert; anschließend sollte unabhängig von der Durchführung der Standardabsorptions-(OD-)Messung oder einer HPLC/UPLC-Spektrophotometrie eine weitere Funktionsprüfung der nicht lebensfähigen RhCE-Gewebemodelle vorgenommen werden. Bei dieser zusätzlichen Funktionsprüfung werden abgetötete Gewebe mit nur noch residualer metabolischer Aktivität eingesetzt, die die Prüfchemikalie in ähnlicher Weise wie lebensfähige Gewebe absorbieren und binden. Bei der VRM 1 werden Gewebe abgetötet, indem sie einer niedrigen Temperatur ausgesetzt werden („durch Gefrieren abgetötet“). Bei der VRM 2 werden Gewebe abgetötet, indem sie über einen längeren Zeitraum (z. B. mindestens 24 ± 1 Std.) in Wasser inkubiert und anschließend bei einer niedrigen Temperatur aufbewahrt werden („in Wasser abgetötet“). Jede MTT reduzierende Prüfchemikalie wird auf mindestens zwei abgetötete Gewebereplikate aufgetragen, die dem gesamten Prüfverfahren unterzogen werden, um eine nicht spezifische MTT-Reduktionskontrolle (NSMTT-Reduktion) herzustellen (34) (35). Pro Prüfchemikalie ist unabhängig von der Anzahl der durchgeführten unabhängigen Prüfungen/Prüfläufe eine einzelne NSMTT-Kontrolle ausreichend. Anschließend wird die tatsächliche Viabilität des Gewebes als Prozentanteil der bei lebenden Geweben nach Exposition gegenüber dem MTT-Reduktionsmittel gemessenen Viabilität (% Viabilität_{Prüfung}) abzüglich des Prozentanteils der nicht spezifischen MTT-Reduktion durch dasselbe MTT-Reduktionsmittel bei abgetöteten Geweben bezogen auf die gleichzeitig mit der zu korrigierenden Prüfung untersuchte Negativkontrolle (% NSMTT), d. h. tatsächliche Gewebeviabilität = [% Viabilität_{Prüfung}] - [% NSMTT], berechnet.
39. Bei Prüfchemikalien, die sowohl Farbinterferenzen (Nummer 37) als auch eine direkte MTT-Reduktion (Nummer 38) verursachen, wird für die Standardabsorptions-(OD-)Messung außer der NSMTT-Kontrolle und der NSC_{lebend}-Kontrolle (siehe vorstehende Abschnitte) eine dritte Gruppe von Kontrollen benötigt. Dies ist gewöhnlich bei dunklen Prüfchemikalien der Fall, die beim MTT-Versuch Licht im Bereich von 570 ± 30 nm (z. B. blau, violett oder schwarz) absorbieren, weil deren Fähigkeit zur direkten MTT-Reduktion durch die inhärente Farbqualität dieser Chemikalien beeinträchtigt wird (Nummer 38). In diesen Fällen sind zusammen mit den NSC_{lebend}-Kontrollen regelmäßig NSMTT-Kontrollen zu verwenden. Prüfchemikalien, bei denen sowohl NSMTT-Kontrollen als auch NSC_{lebend}-Kontrollen

untersucht wurden, können von lebenden und von abgetöteten Geweben absorbiert und gebunden werden. Daher kann in diesen Fällen bei der NSMTT-Kontrolle eine Korrektur nicht nur der potentiellen direkten MTT-Reduktion durch die Prüfchemikalie, sondern auch der Farbinterferenz infolge der Absorption und der Bindung der Prüfchemikalie an abgetötete Gewebe erfolgen. Dies kann eine doppelte Korrektur der Farbinterferenz zur Folge haben, da mit der NSC_{lebend}-Kontrolle bereits eine Korrektur der Farbinterferenz aufgrund der Absorption und der Bindung der Prüfchemikalie durch lebende Gewebe erfolgt. Um eine mögliche doppelte Korrektur von Farbinterferenzen zu vermeiden, muss eine dritte Kontrolle mit nicht spezifischen Farben mit abgetöteten Geweben (NSC_{abgetötet}) untersucht werden (siehe Anhänge III und IV) (34) (35). Bei dieser zusätzlichen Kontrolle wird die Prüfchemikalie auf mindestens zwei abgetötete Gewebereplikate aufgetragen, die dem vollständigen Prüfverfahren zu unterziehen sind, wobei die Gewebe jedoch während der MTT-Inkubation nicht mit der MTT-Lösung, sondern mit einem Medium inkubiert werden. Unabhängig von der Anzahl der durchgeführten unabhängigen Prüfungen/Prüfläufe ist pro Prüfchemikalie eine einzige NSC_{abgetötet}-Kontrolle hinreichend. Diese Kontrolle sollte jedoch gleichzeitig mit der NSMTT-Kontrolle sowie mit derselben Gewebecharge untersucht werden. Die tatsächliche Viabilität des Gewebes wird dann als Prozentanteil der ermittelten Viabilität bei lebendem Gewebe nach der Exposition gegenüber der Prüfchemikalie (% Viabilität_{Prüfung}) abzüglich % NSMTT und abzüglich % NSC_{lebend} zuzüglich des Prozentanteils der nicht spezifischen Farbe berechnet, die nach Exposition der abgetöteten Gewebe gegenüber der interferierenden Prüfchemikalie und nach Inkubation mit einem Medium ohne MTT entstanden ist; dieser Prozentanteil wird bezogen auf die gleichzeitig mit der zu korrigierenden Prüfung untersuchte Negativkontrolle (% NSC_{abgetötet}), d. h. tatsächliche Gewebeviabilität = [% Viabilität_{Prüfung}] - [% NSMTT] - [% NSC_{lebend}] + [% NSC_{abgetötet}], ermittelt.

40. Wichtig ist, dass eine nicht spezifische MTT-Reduktion und nicht spezifische Farbinterferenzen die optische Dichte (bei Standard-Absorptionsmessungen) und die Peak-Flächen für MTT-Formazan (bei HPLC/UPLC-Spektrophotometriemessungen) der Gewebeextrakte über die Linearitätsspanne des Spektrophotometers hinaus verstärken bzw. vergrößern können. Daher muss jedes Labor vor der Untersuchung von Prüfchemikalien für rechtliche Zwecke die Linearitätsspanne der OD/Peak-Fläche seines Spektrophotometers mit im Handel (z. B. bei Sigma-Aldrich (Bestellnr. M2003) erhältlichem MTT-Formazan (CAS-Nr. 57360-69-7) ermitteln.
41. Die Standardabsorptions-(OD-)Messung mit einem Spektrophotometer ist zur Beurteilung von Prüfchemikalien geeignet, die als direkte MTT-Reduktionsmittel wirken bzw. Farbinterferenzen verursachen, sofern die bei der MTT-Formazan-Messung beobachtete Interferenz nicht zu stark ausgeprägt ist (d. h. wenn die OD-Werte der Gewebeextrakte mit der Prüfchemikalie ohne Korrektur für eine direkte

MTT-Reduktion und/oder Farbinterferenzen innerhalb der Linearitätsspanne des Spektrophotometers liegen). Ergebnisse bei Prüfchemikalien mit % NSMTT und/oder % NSC_{lebend} ≥ 60 % (VRM 1 sowie VRM 2 beim Protokoll für Flüssigkeiten) bzw. 50 % (VRM 2 beim Protokoll für Feststoffe) der Negativkontrolle sind jedoch mit Sorgfalt zu bewerten, da dies die festgelegten und in den VRM verwendeten Schwellenwerte sind, nach denen darüber entschieden wird, ob bei Chemikalien eine Einstufung erforderlich ist (Nummer 44). Die Standardabsorption (OD) kann bei übermäßiger Interferenz mit der MTT-Formazan-Messung (d. h. wenn die Interferenz dazu führt, dass nicht korrigierte OD-Werte der Prüfgewebeextrakte außerhalb der Linearitätsspanne des Spektrophotometers liegen) jedoch nicht gemessen werden. Prüffarbstoffe, die sich bei Kontakt mit Wasser oder Isopropanol färben und die Standardabsorptions-(OD-)Messung von MTT-Formazan übermäßig beeinträchtigen, können durch HPLC/UPLC-Spektrophotometrie gemessen werden (siehe Anhänge III und IV). Eine Messung durch HPLC/UPLC-Spektrophotometrie ist deshalb möglich, weil bei der HPLC/UPLC-Spektrophotometrie das MTT-Formazan vor der Quantifizierung von der Prüfchemikalie getrennt werden kann (36). Daher werden unabhängig von der zu prüfenden Chemikalie keine NSC_{lebend}- oder NSC_{abgetötet}-Kontrollen benötigt, wenn eine HPLC/UPLC-Spektrophotometrie vorgenommen wird. Allerdings sollten NSMTT-Kontrollen verwendet werden, wenn vermutet wird, dass eine Prüfchemikalie MTT direkt reduziert (Verfahren wie in Nummer 38 beschrieben). NSMTT-Kontrollen sollten jedoch auch bei Prüfchemikalien mit Färbungen (an sich oder in Wasser auftretend) verwendet werden, wenn vermutet wird, dass eine Prüfchemikalie MTT direkt reduziert oder wenn die Farbe einer Prüfchemikalie die Beurteilung ihrer Fähigkeit zur direkten MTT-Reduktion beeinträchtigt (Nummer 38). Wenn MTT-Formazan durch HPLC/UPLC-Spektrophotometrie gemessen wird, ist der Prozentanteil der Viabilität des Gewebes als Prozentanteil der MTT-Formazan-Peak-Fläche, die mit lebenden Geweben nach Exposition gegenüber der Prüfchemikalie ermittelt wurde, bezogen auf die MTT-Formazan-Peak-Fläche der gleichzeitigen Negativkontrolle zu berechnen. Bei Prüfchemikalien, die MTT direkt reduzieren können, wird die tatsächliche Gewebeviabilität wie folgt berechnet: % Viabilität_{Prüfung} abzüglich % NSMTT, wie in Nummer 38 im letzten Satz beschrieben. Und schließlich ist festzustellen, dass direkte MTT-Reduktionsmittel sowie auch Farbinterferenzen verursachende direkte MTT-Reduktionsmittel, die nach der Behandlung in den Geweben gebunden sein und MTT so stark reduzieren können, dass es (bei Standard-OD-Messungen) zu OD-Werten oder (bei der Untersuchung der Gewebeextrakte durch UPLC-/HPLC-Spektrophotometrie) zu Peak-Flächen außerhalb der Linearitätsspanne des Spektrophotometers und zu Farbinterferenzen kommen kann, mit Prüfmethoden unter Verwendung von RhCE nicht bewertet werden können. Solche Fälle sind allerdings sehr selten.

42. MTT-Formazan-Messungen können bei allen Arten von Prüfchemikalien (gefärbt, nicht gefärbt, MTT-Reduktionsmittel und Mittel, die keine MTT-Reduktion bewirken) durch HPLC/UPLC-Spektrophotometrie vorgenommen werden (11) (36). Aufgrund der Vielfalt der HPLC/UPLC-Spektrophotometriesysteme können nicht für alle Systeme exakt identische Bedingungen festgelegt werden. Daher sollte die Eignung des jeweiligen HPLC/UPLC-Spektrophotometriesystems vor der Verwendung zur Quantifizierung von MTT-Formazan in Gewebextrakten durch Erfüllung der Akzeptanzkriterien für eine Reihe von Standard-Qualifikationsparametern auf der Grundlage der Branchenleitlinien der US-amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) für die Validierung bioanalytischer Methoden nachgewiesen werden (36) (38). Diese Schlüsselparameter sowie die jeweiligen Akzeptanzkriterien sind Anlage 5 zu entnehmen. Wenn die in Anlage 5 beschriebenen Akzeptanzkriterien erfüllt sind, wird das betreffende HPLC/UPLC-Spektrophotometriesystem als geeignet für die Messung von MTT-Formazan unter den in dieser Prüfmethode beschriebenen Versuchsbedingungen betrachtet.

Akzeptanzkriterien

43. Bei allen Prüfläufen mit RhCE-Gewebechargen, die die Anforderungen der Qualitätskontrolle erfüllen, (Nummer 30) müssen alle mit dem Negativkontrollstoff behandelten Gewebe OD-Werte aufweisen, die der Qualität der Gewebe nach der Lieferung sowie nach Durchführung aller Schritte und aller im Protokoll vorgesehenen Prozesse entsprechen und nicht außerhalb der in Tabelle 2 genannten historisch ermittelten Grenzen liegen (Nummer 26). Die mittlere Gewebeviabilität von mit dem Positivkontrollstoff (d. h. mit Methylacetat) behandelten Geweben muss bei Anwendung der Protokolle für Flüssigkeiten oder für Feststoffe $< 50 \%$ der Negativkontrolle bei der VRM 1 und $\leq 30 \%$ (beim Protokoll für Flüssigkeiten) bzw. $\leq 20 \%$ (beim Protokoll für Feststoffe) der Negativkontrolle bei der VRM 2 sein und damit belegen, dass die Gewebe unter den Bedingungen der Prüfmethode auf eine reizende Prüfchemikalie reagieren können (34) (35). Die Variabilität zwischen Gewebereplikaten bei Prüfchemikalien und Kontrollstoffen muss innerhalb der akzeptierten Grenzen liegen (d. h. die Viabilität von zwei Gewebereplikaten muss unter 20% liegen, bzw. bei drei Gewebereplikaten darf die Standardabweichung (SD) höchstens 18% betragen). Wenn die Negativ- oder die Positivkontrolle bei einem Prüflauf Werte außerhalb der akzeptierten Spannen ergibt, ist der Prüflauf als nicht geeignet zu betrachten und sollte wiederholt werden. Liegt die Variabilität zwischen Gewebereplikaten bei einer Prüfchemikalie außerhalb der akzeptierten Spanne, ist die Prüfung als nicht geeignet zu betrachten und die Prüfchemikalie erneut zu prüfen.

Auswertung der Ergebnisse und Prädiktionsmodell

44. Die OD-Werte/Peak-Flächen der Replikatgewebe-Extrakte für die einzelnen Prüfchemikalien werden zur Berechnung der mittleren Gewebeviabilität in Prozent (Mittelwert der Gewebereplikate) bezogen auf die mit 100 % angesetzte Negativkontrolle verwendet. Der prozentuale Grenzwert der Gewebeviabilität bei der Ermittlung von Prüfchemikalien, bei denen eine Einstufung als augenreizend oder schwer augenschädigend (UN-GHS-/CLP-Kategorie Keine Einstufung) nicht erforderlich ist, sind Tabelle 4 zu entnehmen. Die Ergebnisse sind wie folgt zu bewerten:

- Bei einer Prüfchemikalie sind eine Einstufung und Kennzeichnung nach dem UN GHS bzw. der CLP-Verordnung nicht erforderlich (Keine Einstufung), wenn die mittlere prozentuale Gewebeviabilität nach der Exposition und nach der Inkubation im Anschluss an die Exposition den in Tabelle 4 genannten Grenzwert der Gewebeviabilität in Prozent überschreitet (>). In diesem Fall sind weitere Untersuchungen mit anderen Prüfmethode nicht erforderlich.
- Ist die mittlere prozentuale Gewebeviabilität nach der Exposition und nach der Inkubation im Anschluss an die Exposition kleiner oder gleich ($\leq$) dem in Tabelle 4 genannten Grenzwert der Gewebeviabilität in Prozent, kann keine Vorhersage getroffen werden. In diesem Fall sind weitere Untersuchungen mit anderen Prüfmethode vorzunehmen, weil bei den Prüfmethode unter Verwendung von RhCE ein bestimmter Anteil falsch positiver Ergebnisse ermittelt wird (Nummern 14 und 15) und nicht zwischen den UN-GHS-/CLP-Kategorien 1 und 2 unterschieden werden kann (Nummer 17).

Tabelle 4: Vorhersagemodelle nach dem UN-GHS und der CLP-Verordnung

VRM	Keine Einstufung	Keine Vorhersage möglich
VRM 1 – EpiOcular™ EIT (beide Protokolle)	Mittlere Gewebeviabilität > 60 %	Mittlere Gewebeviabilität $\leq$ 60 %
VRM 2 – SkinEthic™ HCE EIT (Protokoll für Flüssigkeiten)	Mittlere Gewebeviabilität > 60 %	Mittlere Gewebeviabilität $\leq$ 60 %
VRM 2 – SkinEthic™ HCE EIT (Protokoll für Feststoffe)	Mittlere Gewebeviabilität > 50 %	Mittlere Gewebeviabilität $\leq$ 50 %

45. Kann eine eindeutige Klassifizierung vorgenommen werden, so ist eine einzige, Prüfung mit mindestens zwei Geweben ausreichend. Bei Grenzergebnissen, wie z. B. nicht übereinstimmenden Replikatmessungen und/oder einer mittleren prozentualen Gewebeviabilität von 60 ± 5 % (VRM 1 sowie VRM 2 beim Protokoll für Flüssigkeiten) bzw. 50 ± 5 % (VRM 2 beim Protokoll für Feststoffe), sollte eine zweite bzw. bei abweichenden Ergebnissen der ersten beiden Prüfungen eine dritte Prüfung in Betracht gezogen werden.

46. Wenn angemessen und begründet, können bei bestimmten Arten von Gemischen für Prüfchemikalien, bei denen eine Einstufung vorgenommen wurde, und für Prüfchemikalien, bei denen eine Einstufung nicht erforderlich ist, unterschiedliche prozentuale Grenzwerte für die Gewebeviabilität angenommen werden, um die Leistungsfähigkeit der Prüfmethode für die betreffende Art von Gemischen insgesamt zu erhöhen (Nummer 14). Referenzchemikalien können die Beurteilung des augenreizenden bzw. schwer augenschädigenden Potenzials unbekannter Prüfchemikalien oder Produktklassen und die Bewertung des relativen augmentoxischen Potenzials einer klassifizierten Chemikalie innerhalb einer bestimmten Spanne positiver Reaktionen erleichtern.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Daten

47. Die Daten einzelner Replikatgewebe eines Prüflaufs (z. B. OD-Werte/MTT-Formazan-Peak-Flächen und berechnete prozentuale Daten der Gewebeviabilität für die Prüfchemikalie und für Kontrollen sowie die endgültige Vorhersage mit der RhCE-Prüfmethode) sind für jede Prüfchemikalie (ggf. einschließlich der Daten von Wiederholungsprüfungen) tabellarisch darzustellen. Außerdem sind für jede einzelne Prüfchemikalie und für alle Kontrollen die mittlere prozentuale Gewebeviabilität und der Unterschied der Viabilität zwischen zwei Gewebereplikaten (bei $n = 2$ Replikatgewebe) bzw. die Standardabweichung (SD) (bei $n \geq 3$ Replikatgeweben) anzugeben. Wenn bei einer Prüfchemikalie bei der Messung von MTT-Formazan anhand der direkten MTT-Reduktion eine Interferenz festgestellt wird und/oder eine farbliche Interferenz auftritt, ist dies für jede einzelne geprüfte Chemikalie anzugeben.

Prüfbericht

48. Der Prüfbericht enthält die folgenden Angaben:

Prüfstoff

Einkomponentiger Stoff:

- Chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS-Bezeichnung(en), CAS-Registriernummer(n), SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel und/oder andere Kennungen;
- Aggregatzustand, Flüchtigkeit, pH-Wert, log P, Molekulargewicht, Chemikalienklasse und weitere für die Untersuchung relevante physikalische und chemische Eigenschaften, soweit verfügbar;

- Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.;
- Behandlung vor der Untersuchung, sofern relevant (z. B. Erwärmen, Mahlen);
- Lagerbedingungen und Stabilität, soweit verfügbar;

mehrkomponentige Stoffe, UVCB-Stoffe und Gemische:

- Charakterisierung, so weit wie möglich, z. B. durch die chemische Zusammensetzung (siehe oben), Reinheit, das quantitative Vorkommen und die relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften (siehe oben) der einzelnen Elemente, soweit verfügbar;
- Aggregatzustand sowie weitere für die Untersuchung relevante physikalische und chemische Eigenschaften, soweit verfügbar;
- Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.;
- Behandlung vor der Untersuchung, sofern relevant (z. B. Erwärmen, Mahlen);
- Lagerbedingungen und Stabilität, soweit verfügbar.

Positiv- und Negativkontrollstoffe

- Chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS-Bezeichnung(en), CAS-Registriernummer(n), SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel und/oder andere Kennungen;
- Aggregatzustand, Flüchtigkeit, Molekulargewicht, Chemikalienklasse und weitere für die Untersuchung relevante physikalische und chemische Eigenschaften, soweit verfügbar;
- Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.;
- Behandlung vor der Prüfung, soweit zutreffend (z. B. Erwärmung, Zerkleinerung);
- Lagerbedingungen und Stabilität, soweit verfügbar;
- ggf. Begründung für die Verwendung einer anderen Negativkontrolle als ultrareines H₂O oder Ca²⁺/Mg²⁺-freier DPBS;
- ggf. Begründung der Verwendung einer anderen Positivkontrolle als reines Methylacetat;
- Verweis auf historische Ergebnisse von Positiv- und Negativkontrollen, die geeignete Akzeptanzkriterien für einen Prüfdurchlauf dokumentieren.

Informationen zu Auftraggeber und Prüfanstalt

- Name und Anschrift des Auftraggebers, der Prüfanstalt und des Studienleiters.

RhCE-Gewebemodell und verwendetes Protokoll (ggf. mit Begründung für die getroffene Auswahl)

Bedingungen der Prüfmethode

- Verwendetes RhCE-Gewebemodell einschließlich Chargennummer;
- Wellenlänge und Bandbreite (wenn relevant) für die Quantifizierung von MTT-Formazan und die Linearitätsspanne des Messgeräts (z. B. eines Spektrophotometers);
- Beschreibung der verwendeten Methode zur Quantifizierung von MTT-Formazan;
- Beschreibung des HPLC/UPLC-Spektrophotometriesystems (wenn relevant);
- umfassende Begleitdokumentation für das betreffende RhCE-Gewebemodell, einschließlich seiner Leistung. Diese sollte unter anderem die folgenden Elemente und Angaben beinhalten:
 - i) Qualitätskontrolle der Viabilität (Hersteller)
 - ii) Viabilität unter den Bedingungen der Prüfmethode (Anwender);
 - iii) Qualitätskontrolle der Barrierefunktion;
 - iv) ggf. Morphologie;
 - v) Reproduzierbarkeit und Vorhersagefähigkeit;
 - vi) ggf. sonstige Qualitätskontrollen des RhCE-Gewebemodells;
- Verweis auf historische Daten zum RhCE-Gewebemodell. Unter anderem sollte die Akzeptierbarkeit der QK-Daten auf der Grundlage historischer Chargendaten spezifiziert werden;
- Erklärung, dass die Prüfeinrichtung ihre Befähigung zur Durchführung der Prüfmethode vor der regelmäßigen Untersuchung der Leistungschemikalien nachgewiesen hat.

Akzeptanzkriterien für Prüfläufe und Prüfungen

- Mittelwerte und Akzeptanzspannen der Positiv- und der Negativkontrollen auf der Grundlage historischer Daten;
- akzeptable Variabilität zwischen Gewebereplikaten für Positiv- und Negativkontrollen;
- akzeptable Variabilität zwischen Gewebereplikaten für die Prüfchemikalie.

Prüfverfahren

- Einzelheiten der angewandten Methode;
- Dosierungen der verwendeten Prüfchemikalien und Kontrollstoffe;
- Expositionszeitraum und -temperatur, Dauer der Immersion nach der Exposition und Inkubationszeit nach der Exposition (wenn relevant);

- Beschreibung etwaiger Änderungen am Prüfverfahren;
- Angabe verwendeter Kontrollen für direkte MTT-Reduktionsmittel und/oder Prüffarbstoffe (wenn relevant);
- Anzahl der pro Prüfchemikalie und pro Kontrolle (PK, Negativkontrolle und NSMTT, NSC_{lebend} und NSC_{abgetötet}, wenn relevant) verwendeten Gewebereplikate.

Ergebnisse

- Tabellarische Darstellung der Daten für die einzelnen Prüfchemikalien und Kontrollstoffe für die einzelnen Prüfläufe (ggf. einschließlich Wiederholungsprüfungen) und Replikatmessungen einschließlich der OD-Werte bzw. der MTT-Formazan-Peak-Flächen, der prozentualen Gewebeviabilität, der mittleren prozentualen Gewebeviabilität, Unterschieden zwischen Gewebereplikaten bzw. der Standardabweichung und der endgültigen Vorhersagen;
- gegebenenfalls Ergebnisse verwendeter Kontrollen für direkte MTT-Reduktionsmittel und/oder Prüffarbstoffe einschließlich OD-Werten oder MTT-Formazan-Peak-Flächen, % NSMTT, % NSC_{lebend}, % NSC_{abgetötet}, Unterschieden zwischen Gewebereplikaten bzw. der Standardabweichung, der endgültigen korrekten prozentualen Gewebeviabilität und der endgültigen Vorhersagen;
- mit der Prüfchemikalie (den Prüfchemikalien) und den Kontrollstoffen ermittelte Ergebnisse bezogen auf die definierten Akzeptanzkriterien für Prüfläufe und Prüfungen;
- Beschreibung weiterer festgestellter Wirkungen (z. B. Verfärbung der Gewebe durch Prüffarbstoffe).

Erörterung der Ergebnisse.

Schlussfolgerung.

LITERATUR

- (200) UN (2015). GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals = Global harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung) der Vereinten Nationen, ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sechste überarbeitete Auflage, New York und Genf: Vereinte Nationen. Abrufbar unter:
http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.
- (201) Kapitel B.5 dieses Anhangs, Akute Augenreizung/-verätzung.
- (202) Kapitel B.47 dieses Anhangs, Trübungs- und Durchlässigkeitstest an der Rinderhornhaut zwecks Identifizierung von i) Chemikalien, die schwere Augenschäden verursachen, und ii) Chemikalien, die keine Einstufung als augenreizend oder schwer augenschädigend erfordern.
- (203) Kapitel B.48 dieses Anhangs, Test am isolierten Hühnerauge zur Identifizierung von i) Chemikalien, die schwere Augenschäden verursachen, und ii) Chemikalien, die keine Einstufung erfordern.
- (204) Kapitel B.61 dieses Anhangs Fluorescein-Leckage-Prüfmethode zur Identifizierung von Stoffen mit augenverätzender und stark augenreizender Wirkung
- (205) Kapitel B.68 dieses Anhangs, *In-vitro*-Prüfmethode mit Kurzzeiteexposition zur Ermittlung von i) Chemikalien, die schwere Augenschäden verursachen, und ii) Chemikalien, die keine Einstufung als augenreizend oder schwer augenschädigend erfordern.
- (206) 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.
- (207) EC EURL ECVAM (2014). The EURL ECVAM – Cosmetics Europe prospective validation study of Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE)-based test methods for identifying chemicals not requiring classification and labelling for serious eye damage/eye irritation: Validation Study Report. EUR 28125 EN; doi:10.2787/41680. Abrufbar unter: <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC100280>.
- (208) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2014). ESAC Opinion on the EURL ECVAM Eye Irritation Validation Study (EIVS) on EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE and a related Cosmetics Europe study on HPLC/UPLC-spectrophotometry as an alternative endpoint

detection system for MTT-formazan. ESAC Opinion No 2014-03, 17. November 2014; EUR 28173 EN; doi: 10.2787/043697. Abrufbar unter: <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103702>.

- (209) 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.
- (210) 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.
- (211) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2016). ESAC Opinion on the SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). ESAC Opinion No 2016-02, 24. Juni 2016; EUR 28175 EN; doi: 10.2787/390390. Abrufbar unter: <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103704>.
- (212) 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 in Vorbereitung).
- (213) 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.
- (214) 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.
- (215) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

- (216) 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (217) 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (218) 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.
- (219) 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. (Hrsg.), *Alternative Toxicological Methods*, CRC Press, S. 147-159.
- (220) 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.
- (221) 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.
- (222) 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.
- (223) 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.

- (224) 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.
- (225) 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.
- (226) Hackett, R.B., McDonald, T.O. (1991). Eye Irritation. In *Advances in Modern Toxicology: Dermatoxicology* Marzulli, F.N., und Maibach, H.I. (Hrsg.), 4. Auflage, S. 749–815. Washington, DC, USA: Hemisphere Publishing Corporation.
- (227) 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.), 7. Auflage, S. 665–697. Withby, O.N., Kanada: McGraw-Hill Ryerson.
- (228) 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.
- (229) 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. Toxicol.* 36, 106-117.
- (230) 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.
- (231) 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.
- (232) 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.

- (233) EpiOcular™ EIT SOP, Version 8 (5. März 2013). EpiOcular™ EIT for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Abrufbar unter: [\[https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index\]](https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index).
- (234) SkinEthic™ HCE EIT SOP, Version 1. (20. Juli 2015). SkinEthic™ HCE Eye Irritation Test (EITL for Liquids, EITS for Solids) for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Abrufbar unter: <https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index>.
- (235) 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.
- (236) 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.
- (237) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Mai 2001. Abrufbar unter: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>.
- (238) 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.

Anlage 1

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

Augenreizung: Erzeugen von Veränderungen am Auge nach Applikation einer Prüfchemikalie auf die Oberfläche des Auges, die innerhalb von 21 Tagen nach der Applikation vollständig reversibel sind. Synonym zu den Einstufungen „reversible Wirkungen am Auge“ und „UN-GHS-/CLP-Kategorie 2“.

Bottom-up-Ansatz: Schrittweiser Ansatz für eine Prüfchemikalie, von der vermutet wird, dass sie keine Einstufung und Kennzeichnung als augenreizend oder schwer augenschädigend erfordert. Dabei werden zunächst Chemikalien, die keine Einstufung und Kennzeichnung erfordern (negatives Ergebnis), von anderen Chemikalien (positives Ergebnis) unterschieden.

Chemikalie: Ein Stoff oder Gemisch.

Dev: Abweichung

Einkomponentiger Stoff: Ein nach seiner quantitativen Zusammensetzung definierter Stoff, bei dem mehr als ein Hauptbestandteil in einer Konzentration von mindestens 80 % w/w vorliegt.

EIT: Eye Irritation Test (Prüfung auf Augenreizung).

Ersatzprüfung: Eine Prüfung, die eine routinemäßig angewandte Prüfung zur Identifikation von Gefahren und/oder zur Risikobewertung ersetzen soll, und die im Vergleich zur akzeptierten Prüfung nachweislich in allen möglichen Prüfsituationen und mit allen Stoffen einen gleichwertigen oder besseren Schutz der Gesundheit von Mensch oder Tier bzw. der Umwelt gewährleistet (18).

ET₅₀: Expositionszeit, die erforderlich ist, um die Gewebeviabilität bei Anwendung einer Referenzchemikalie in einer vorgegebenen festen Konzentration um 50 % zu reduzieren.

EURL ECVAM: Referenzlabor der Europäischen Union für alternative Methoden zu Tierversuchen.

Evidenzbasierte Bewertung: Prüfung der Stärken und Schwächen verschiedener Informationen, um über das Gefahrenpotenzial einer Prüfchemikalie entscheiden zu können und diese Entscheidung zu untermauern.

Falsch-Negativ-Rate: Der Anteil aller Positivstoffe, die mit einer Prüfmethode fälschlicherweise als Negativstoffe identifiziert werden. Die Falsch-Negativ-Rate ist ein Indikator für die Leistungsfähigkeit einer Prüfmethode.

Falsch-Positiv-Rate: Der Anteil aller Negativstoffe, die mit einer Prüfmethode fälschlicherweise als Positivstoffe identifiziert werden. Die Falsch-Positiv-Rate ist ein Indikator für die Leistungsfähigkeit einer Prüfmethode.

Gefahr: Inhärente Eigenschaft eines Stoffes oder eines Umfelds mit dem Potenzial, einen Organismus, ein System oder eine (Sub)population bei Exposition gegenüber diesem Stoff zu schädigen.

Gemisch: Ein Gemisch oder eine Lösung, die aus zwei oder mehr Stoffen besteht.

Genauigkeit: Der Grad an Übereinstimmung zwischen Testergebnissen und akzeptierten Referenzwerten. Die Genauigkeit ist ein Maß der Leistung der Prüfmethode und ein Aspekt der Relevanz. Der Begriff wird oft im Sinne von „Übereinstimmung“ verwendet und bezeichnet den Anteil der korrekten Ergebnisse einer Prüfmethode (18).

Gestufte Prüfstrategie: Eine schrittweise Prüfstrategie, bei der alle vorhandenen Informationen über eine Prüfchemikalie in einer vorgegebenen Reihenfolge überprüft werden, wobei auf jeder Stufe nach dem evidenzbasierten Bewertungsansatz (weight-of-evidence) vorgegangen wird, um feststellen zu können, ob genügend Informationen für eine Gefahreneinstufung vorliegen, bevor zur nächsten Stufe der Strategie übergegangen wird. Wenn das Gefahrenpotenzial/die gefahrenrelevante Wirksamkeit einer Prüfchemikalie auf Basis der vorliegenden Informationen ermittelt werden kann, sind keine weiteren Untersuchungen erforderlich (18).

Gewebeviabilität: Parameter zur Messung der Gesamtaktivität einer Zellenpopulation (bei einem rekonstruierten Gewebe die Fähigkeit, den Vitalfarbstoff zu reduzieren), der je nach gemessenem Endpunkt und verwendetem Testaufbau mit der Gesamtzahl und/oder Vitalität lebender Zellen korreliert.

Gültige Prüfmethode: Eine Prüfmethode, die eine ausreichende Relevanz und Zuverlässigkeit für einen bestimmten Zweck aufweist und auf wissenschaftlich fundierten Grundsätzen beruht. Eine Prüfmethode ist nie im absoluten Sinn, sondern nur in Bezug auf einen definierten Zweck gültig (18).

HCE: Menschliches Hornhautepithel SkinEthic™.

Hornhaut: Der Iris und Pupille überdeckende transparente vordere Teil des Augapfels, über den Licht ins Augeninnere übertragen wird.

HPLC: Hochleistungs-Flüssigkeitschromatografie.

IC₅₀: Konzentration, bei der eine Referenzchemikalie die Viabilität der Gewebe nach einer vorgegebenen Expositionsdauer um 50 % verringert (z. B. nach einer 30-minütigen Behandlung mit SDS).

Irreversible Wirkungen am Auge: Siehe „Schwere Augenschädigung“.

Keine Einstufung: Chemikalien, die nicht als augenreizend (UN-GHS-/CLP-Kategorie 2, UN-GHS-/Kategorien 2A oder 2B) oder schwer augenschädigend (UN-GHS-/CLP-Kategorie 1) eingestuft werden. Synonym zu „UN-GHS-/CLP-Kategorie Keine Einstufung“.

Leistungsstandards: Auf einer validierten und als wissenschaftlich fundiert betrachteten Prüfmethode beruhende Normen, auf deren Grundlage die Vergleichbarkeit einer vorgeschlagenen, mechanistisch und funktionell ähnlichen Prüfmethode bewertet werden kann. Sie umfassen (i) wesentliche Elemente der Prüfmethode; (ii) ein Mindestverzeichnis von Referenzchemikalien, ausgewählt aus den Chemikalien, die zum Nachweis der akzeptablen Leistung der validierten Referenzmethode verwendet werden; und (iii) je nach den für die validierte Referenzmethode erzielten Ergebnissen die vergleichbaren Genauigkeits- und Zuverlässigkeitswerte, die die vorgeschlagene Prüfmethode bei der Bewertung anhand des Mindestverzeichnisses von Referenzchemikalien erreichen sollte (18).

LLOQ: Untere Quantifizierungsgrenze.

log P: Logarithmus des Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten.

Mehrkomponentiger Stoff: Ein nach seiner quantitativen Zusammensetzung definierter Stoff, bei dem mehr als ein Hauptbestandteil in einer Konzentration von mindestens $\geq 10\%$ w/w und $< 80\%$ w/w vorhanden ist. Ein mehrkomponentiger Stoff ist das Ergebnis eines Herstellungsprozesses. Der Unterschied zwischen einem Gemisch und einem mehrkomponentigen Stoff besteht darin, dass ein Gemisch durch die Mischung von zwei oder mehr Stoffen ohne chemische Reaktion entsteht. Ein mehrkomponentiger Stoff wird durch eine chemische Reaktion gebildet.

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid; Thiazolyl-Blau-Tetrazoliumbromid.

Negativkontrolle: Eine Probe, die alle Elemente eines Prüfsystems enthält und mit einem Stoff behandelt wird, der bekanntermaßen eine positive Reaktion hervorruft. Diese Probe wird mit Proben, die mit einer Prüfchemikalie behandelt wurden, und mit anderen Kontrollproben mitgeführt, um eine Gewebeviabilität von 100 % zu ermitteln.

NSC_{abgetötet}: Nicht spezifische Farbe bei abgetöteten Geweben.

NSC_{lebend}: Nicht spezifische Farbe bei lebenden Geweben.

NSMTT: Nicht spezifische MTT-Reduktion.

OD: Optische Dichte.

Positivkontrolle: Eine Probe, die alle Elemente eines Prüfsystems enthält und mit einem Stoff behandelt wird, der im Prüfsystem bekanntermaßen eine positive Reaktion hervorruft. Diese Probe wird mit Proben, die mit einer Prüfchemikalie behandelt wurden, und mit anderen Kontrollproben mitgeführt. Um sicherzustellen, dass Abweichungen der Positivkontrollreaktion im Zeitverlauf bewertet werden können, sollte die Reaktion nicht zu heftig sein.

Prüfchemikalie: Stoff oder Gemisch, der/das mit dieser Prüfmethode untersucht wird.

Prüflauf: Ein Prüflauf besteht aus einer oder mehreren Prüfchemikalien, die gleichzeitig mit einer Negativ- und einer Positivkontrolle geprüft werden.

Prüfung: Eine einzelne Prüfchemikalie, die gleichzeitig an mindestens zwei Gewebereplikaten im Sinne der jeweiligen Standardarbeitsanweisungen geprüft wird.

Referenzchemikalie: Eine zum Vergleich mit einer Prüfchemikalie verwendete Chemikalie. Eine Referenzchemikalie sollte die folgenden Eigenschaften aufweisen: (i) einheitliche und zuverlässige Herkunft; (ii) strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit mit der Klasse der zu prüfenden Stoffe; (iii) bekannte physikalisch-chemische Eigenschaften; (iv) unterstützende Daten zu bekannten Wirkungen und (v) bekannte Wirksamkeit im Bereich der erwünschten Reaktion.

Relevanz: Dieser Begriff bezieht sich auf das Verhältnis zwischen der Prüfmethode und der betreffenden Wirkung und auf die Frage, ob dieses Verhältnis aussagekräftig und nützlich für einen bestimmten Zweck ist. Er beschreibt das Ausmaß, in dem mit einer Prüfung die untersuchte biologische Wirkung korrekt gemessen oder vorhersagt wird. Die Relevanz schließt eine Beurteilung der Genauigkeit (Übereinstimmung) einer Prüfmethode ein (18).

Reproduzierbarkeit: Die Übereinstimmung von Ergebnissen, die mit wiederholten Prüfungen derselben Prüfchemikalie nach demselben Prüfprotokoll ermittelt wurde (siehe „Zuverlässigkeit“) (18).

Reversible Wirkungen am Auge: Siehe „Augenreizung“.

RhCE: Rekonstruiertes menschliches hornhautartiges Epithel.

Schwere Augenschädigung: Erzeugen von Gewebeschäden im Auge oder eine schwerwiegende Verschlechterung des Sehvermögens nach Applikation eines Prüfstoffs auf die Oberfläche des Auges, die innerhalb von 21 Tagen nach der Applikation nicht vollständig reversibel sind. Synonym zu den Einstufungen „irreversible Wirkungen am Auge“ und „UN-GHS-/CLP-Kategorie 1“.

SD: Standardabweichung

Sensitivität: Der Anteil aller positiven/wirkenden Prüfchemikalien, die durch die Prüfung korrekt eingestuft werden. Die Sensitivität ist ein Maß der Genauigkeit einer Prüfmethode mit kategorialen Ergebnissen und ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung ihrer Relevanz (18).

Spezifität: Der Anteil aller negativen/wirkungslosen Prüfchemikalien, die durch die Prüfung korrekt eingestuft werden. Die Spezifität ist ein Maß der Genauigkeit einer Prüfmethode mit kategorialen Ergebnissen und ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung ihrer Relevanz (18).

Standardarbeitsanweisungen: Förmliche, schriftliche Verfahrensbeschreibungen, in denen detailliert erläutert wird, wie bestimmte regelmäßige und prüfungsspezifische Tätigkeiten im Labor durchgeführt werden sollten. Standardarbeitsanweisungen sind nach guter

Laborpraxis (GLP) vorgeschrieben.

Stoff: Ein chemisches Element und seine Verbindungen in natürlicher Form oder gewonnen durch ein Herstellungsverfahren, einschließlich der zur Wahrung seiner Stabilität notwendigen Zusatzstoffe und der durch das angewandte Verfahren bedingten Verunreinigungen, aber mit Ausnahme von Lösungsmitteln, die von dem Stoff ohne Beeinträchtigung seiner Stabilität und ohne Änderung seiner Zusammensetzung abgetrennt werden können.

Top-down-Ansatz: Schrittweiser Ansatz bei einer Chemikalie, von der vermutet wird, dass sie schwere Augenschäden verursacht. Dabei werden zunächst Chemikalien, die schwere Augenschäden verursachen (positives Ergebnis), von anderen Chemikalien (negatives Ergebnis) unterschieden.

Übereinstimmung: Siehe „Genauigkeit“.

Überschüssige Dosis: Die Menge der auf das RhCE-Gewebemodell aufgetragenen Prüfchemikalie, die über die zur vollständigen und gleichmäßigen Bedeckung der Hautoberfläche erforderliche Menge hinausgeht.

ULOQ: Obere Quantifizierungsgrenze.

UN GHS (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals = Global harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung der Vereinten Nationen): Ein System zur Klassifizierung von Chemikalien (Stoffen und Gemischen) nach standardisierten Typen und Stufen physikalischer, gesundheitlicher und ökologischer Gefahren und zur entsprechenden Kennzeichnung durch Piktogramme, Signalwörter, Gefahrenhinweise, Sicherheitshinweise und Sicherheitsdatenbögen, um zum Schutz des Menschen (einschließlich Arbeitgeber, Arbeiter, Spediteure, Verbraucher und Notfall-Einsatzkräfte) und der Umwelt Informationen über die schädlichen Wirkungen der betreffenden Chemikalien zu verbreiten (1).

UN-GHS/CLP-Kategorie 1: Siehe „Schwere Augenschädigung“.

UN-GHS/CLP-Kategorie 2: Siehe „Augenreizung“.

UN-GHS-/CLP-Kategorie Keine Einstufung: Chemikalien, die die Anforderungen für eine Einstufung in die UN-GHS-/CLP-Kategorien 1 oder 2 (oder die UN-GHS-Kategorien 2A oder 2B) nicht erfüllen. Entspricht der Kategorie „Keine Einstufung“.

UPLC: Ultra-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatografie.

UVCB: Stoffe mit unbekannter oder schwankender Zusammensetzung, komplexe Reaktionsprodukte oder biologische Materialien.

Validierte Prüfmethode: Eine Prüfmethode, für die zwecks Bestimmung ihrer Relevanz (einschließlich Genauigkeit) und Zuverlässigkeit für einen bestimmten Zweck Validierungsstudien abgeschlossen wurden. Es wird darauf hingewiesen, dass eine validierte

Prüfmethode möglicherweise nicht genau und zuverlässig genug ist, um für den vorgeschlagenen Zweck akzeptiert zu werden (18).

VK: Variationskoeffizient.

VRM 1: Der EpiOcular™ EIT wird als validierte Referenzmethode 1 bezeichnet.

VRM 2: Der SkinEthic™ HCE EIT wird als validierte Referenzmethode 2 bezeichnet.

VRM: Validierte Referenzmethode.

Zuverlässigkeit: Maß der Reproduzierbarkeit einer Prüfmethode innerhalb von und zwischen Laboratorien über einen längeren Zeitraum und bei einheitlichem Protokoll. Die Zuverlässigkeit wird durch Berechnung der Intra- und Interlabor-Reproduzierbarkeit bewertet (18).

Anlage 2

WESENTLICHE ELEMENTE DER PRÜFMETHODE UNTER VERWENDUNG VON REKONSTRUIERTEM MENSCHLICHEM HORNHAUTARTIGEM EPITHEL (RhCE) ZUR ERMITTLUNG VON CHEMIKALIEN, BEI DENEN EINE EINSTUFUNG UND KENNZEICHNUNG ALS AUGENREIZEND ODER SCHWER AUGENSCHÄDIGEND NICHT ERFORDERLICH IST

Elemente des Prüfmodells	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
	Flüssigkeiten (15 Minuten bei Temperaturen von höchstens 37 ± 1 °C pipettierbar)	Feststoffe (nicht pipettierbar)	Flüssigkeiten und viskose Flüssigkeiten: (pipettierbar)	Feststoffe (nicht pipettierbar)
Protokolle				
Modelloberfläche	0,6 cm ²	0,6 cm ²	0,5 cm ²	0,5 cm ²
Anzahl der Gewebe- replikate	Mindestens 2	Mindestens 2	Mindestens 2	Mindestens 2

Elemente des Prüfmodells	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Vorabprüfung auf Farbbinterferenzen	50 µl + 1 ml H₂O 60 min bei 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO₂, ≥95 % relative Luftfeuchtigkeit (nicht farbige Prüfchemikalien) bzw. 50 µl + 2 ml Isopropanol 2-3 h bei Raumtemperatur gemischt (Prüffarbstoffe) → Wenn die OD der Prüfchemikalie bei 570 ± 20 nM nach Subtraktion der OD von Isopropanol oder Wasser > 0,08 ist (was etwa 5 % der mittleren OD der Negativkontrolle entspricht), sollten Prüfungen an geeigneten lebenden Kontrollen durchgeführt werden.	50 mg + 1 ml H₂O 60 min bei 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO₂, ≥95 % relative Luftfeuchtigkeit (nicht farbige Prüfchemikalien) und/oder 50 mg + 2 ml Isopropanol 2-3 h bei Raumtemperatur gemischt (Prüffarbstoffe und nicht farbige Prüfchemikalien) → Wenn die OD der Prüfchemikalie bei 570 ± 20 nM nach Subtraktion der OD von Isopropanol oder Wasser > 0,08 ist (was etwa 5 % der mittleren OD der Negativkontrolle entspricht), sollten Prüfungen an geeigneten lebenden Kontrollen durchgeführt werden.	10 µl + 90 µl H₂O 30 ± 2 min bei Raumtemperatur (RT) gemischt (RT = 18-28 °C) → Wenn sich die Prüfchemikalie färbt, sollten Prüfungen an geeigneten lebenden Kontrollen durchgeführt werden.	10 mg + 90 µl H₂O 30 ± 2 min gemischt bei Raumtemperatur → Wenn sich die Prüfchemikalie färbt, sollten Prüfungen an geeigneten lebenden Kontrollen durchgeführt werden.
Vorabprüfung auf direkte MTT-Reduktion	50 µl + 1 ml MTT 1 mg/ml Lösung, 180 ± 15 min bei 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO₂, ≥ 95 % relative Luftfeuchtigkeit → wenn sich die Lösung blau/violett färbt, sollten geeignete durch Gefrieren abgetötete Kontrollen geprüft werden (Negativkontrolle = 50 µl steriles entionisiertes Wasser in MTT-Lösung).	50 mg + 1 ml MTT 1 mg/ml Lösung, 180 ± 15 min bei 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO₂, ≥ 95 % relative Luftfeuchtigkeit → Wenn die Lösung sich blau/violett färbt, sollten durch Gefrieren abgetötete Kontrollen untersucht werden (Negativkontrolle = 50 µl steriles entionisiertes Wasser in MTT-Lösung).	30 µl + 300 µl MTT 1 mg/ml Lösung, 180 ± 15 min bei 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO₂, ≥95 % relative Luftfeuchtigkeit → Wenn die Lösung sich blau/violett färbt, sollten geeignete in Wasser abgetötete Kontrollen untersucht werden (Negativkontrolle = 30 µl steriles entionisiertes Wasser in MTT-Lösung).	30 mg + 300 µl MTT 1 mg/ml Lösung, 180 ± 15 min bei 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO₂, ≥95 % relative Luftfeuchtigkeit → Wenn die Lösung sich blau/violett färbt, sollten geeignete in Wasser abgetötete Kontrollen untersucht werden (Negativkontrolle = 30 µl steriles entionisiertes Wasser in MTT-Lösung).

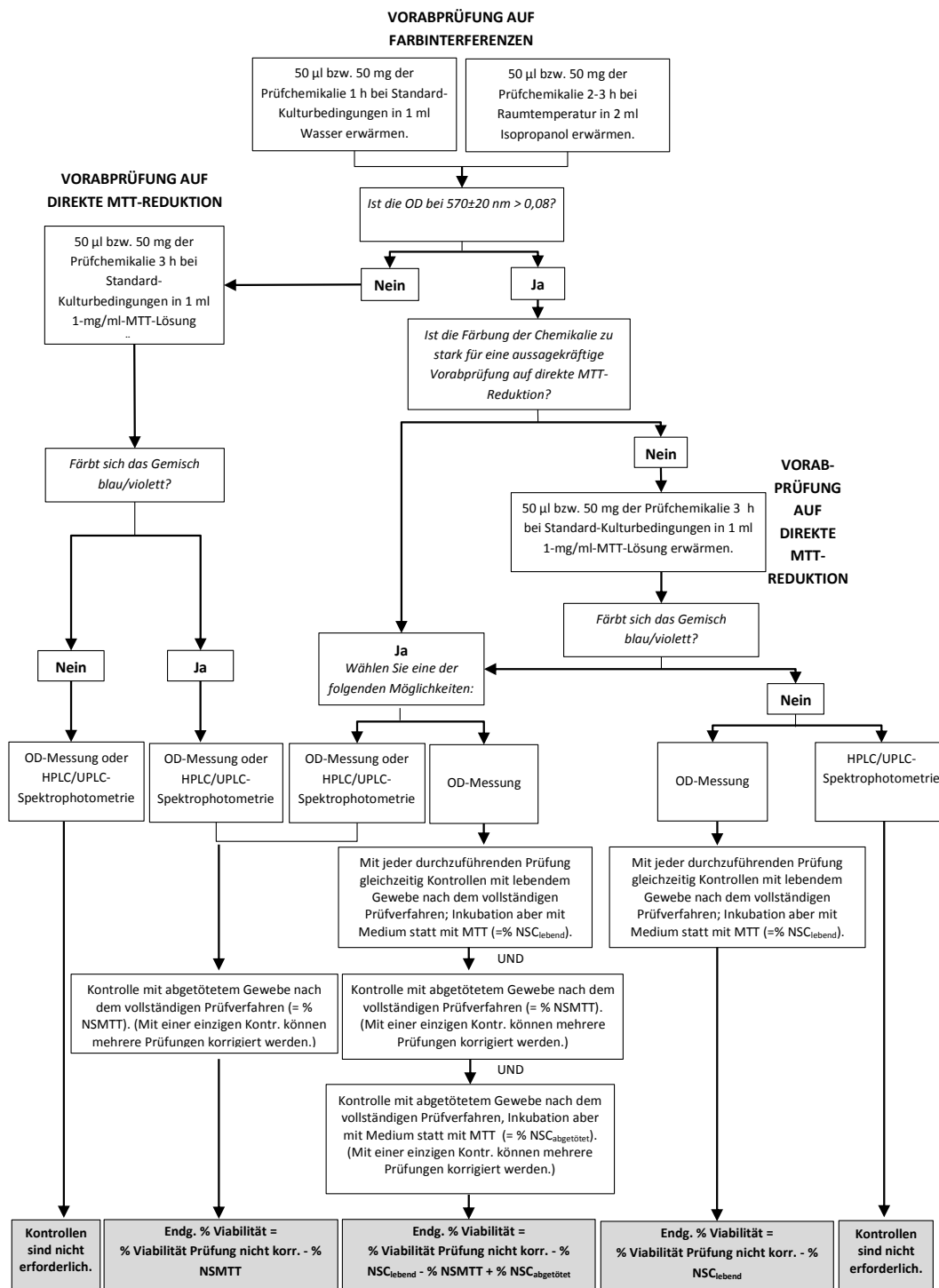
Elemente des Prüfmodells	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Vorbehandlung	20 µl Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -freier DPBS 30 ± 2 min bei 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥95 % relative Luftfeuchtigkeit, lichtgeschützt.	20 µl Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -freier DPBS 30 ± 2 min bei 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥95 % relative Luftfeuchtigkeit, lichtgeschützt.	–	–
Behandlungsdosierungen und Auftragung	50 µl (83,3 µl/cm ²)	50 mg (83,3 mg/cm ²) mit einem geeichten Werkzeug (z. B. einem gestrichenen Löffel, der 50 mg Natriumchlorid fasst).	10 µl Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -freier DPBS + 30 ± 2 µl (60 µl/cm ²) Bei viskosen Flüssigkeiten ist ein Nylon-Maschenfilter zu verwenden.	30 µl Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -freier DPBS + 30 ± 2 mg (60 mg/cm ²)
Expositionszeitraum und -temperatur	30 min (± 2 min) im Kulturmedium bei 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % relative Luftfeuchtigkeit	6 h (± 0,25 h) im Kulturmedium bei 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % relative Luftfeuchtigkeit	30 min (± 2 min) im Kulturmedium bei 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % relative Luftfeuchtigkeit	4 h (± 0,1 h) im Kulturmedium bei 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % relative Luftfeuchtigkeit
Waschen bei Raumtemperatur	Dreimal in 100 ml Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -freiem DPBS	Dreimal in 100 ml Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -freiem DPBS	20 µl Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -freiem DPBS	25 µl Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -freiem DPBS
Immersion nach der Exposition	12 min (± 2 min) bei Raumtemperatur im Kulturmedium	25 min (± 2 min) bei Raumtemperatur im Kulturmedium	30 min (± 2 min) bei 37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % relative Luftfeuchtigkeit im Kulturmedium	30 min (± 2 min) bei Raumtemperatur im Kulturmedium
Inkubation nach der Exposition	120 min (± 15 min) im Kulturmedium bei 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥95 % relative Luftfeuchtigkeit	18 h (± 0,25 h) im Kulturmedium bei 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥95 % relative Luftfeuchtigkeit	–	18 h (± 0,5 h) im Kulturmedium bei 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥95 % relative Luftfeuchtigkeit
Negativkontrolle	50 µl H ₂ O Gleichzeitig geprüft	50 µl H ₂ O Gleichzeitig geprüft	30 ± 2 µl Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -freier DPBS Gleichzeitig geprüft	30 ± 2 µl Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -freier DPBS Gleichzeitig geprüft
Positivkontrolle	50 µl Methylacetat Gleichzeitig geprüft	50 µl Methylacetat Gleichzeitig geprüft	30 ± 2 µl Methylacetat Gleichzeitig geprüft	30 ± 2 µl Methylacetat Gleichzeitig geprüft

Elemente des Prüfmodells	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
MTT-Lösung	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
MTT Inkubationszeit und -temperatur	180 min (± 15 min) im Kulturmedium bei 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥95 % relative Luftfeuchtigkeit	180 min (± 15 min) im Kulturmedium bei 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥95 % relative Luftfeuchtigkeit	180 min (± 15 min) im Kulturmedium bei 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥95 % relative Luftfeuchtigkeit	180 min (± 15 min) im Kulturmedium bei 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥95 % relative Luftfeuchtigkeit
Extraktionslösung	2 ml Isopropanol (Extraktion oben und unten aus dem Einsatz unter Durchstechen des Gewebes)	2 ml Isopropanol (Extraktion unten aus dem Einsatz unter Durchstechen des Gewebes)	1,5 ml Isopropanol (Extraktion oben und unten aus dem Einsatz)	1,5 ml Isopropanol (Extraktion unten aus dem Einsatz)
Expositionszeitraum und -temperatur	2-3 h unter Schütteln (~120 rpm) bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4-10 °C	2-3 h unter Schütteln (~120 rpm) bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4-10 °C	4 h unter Schütteln (~120 rpm) bei Raumtemperatur oder über mindestens Nacht ohne Schütteln bei 4-10 °C	Mindestens 2 h unter Schütteln (~120 rpm) bei Raumtemperatur
OD-Anzeige	570 nM (550 - 590 nM) ohne Referenzfilter	570 nM (550-590 nM) ohne Referenzfilter	570 nM (540 - 600 nM) ohne Referenzfilter	570 nM (540 - 600 nM) ohne Referenzfilter
Kontrolle der Gewebequalität	Behandlung mit 100 µl 0,3 % (v/v) Triton X-100 12,2 min ≤ ET ₅₀ ≤ 37,5 min	Behandlung mit 100 µl 0,3 % (v/v) Triton X-100 12,2 min ≤ ET ₅₀ ≤ 37,5 min	30-minütige Behandlung mit SDS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC ₅₀ ≤ 3,5 mg/ml	30-minütige Behandlung mit SDS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC ₅₀ ≤ 3,2 mg/ml

Elemente des Prüfmodells	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Akzeptanzkriterien	1. Die mittlere OD der mit der Negativkontrolle behandelten Gewebereplikate sollte $\geq 0,8$ und $\leq 2,5$ sein. 2. Die mittlere Viabilität der Gewebereplikate nach 30-minütiger Exposition gegenüber der Positivkontrolle, ausgedrückt in % der Negativkontrolle, sollte < 50 % sein. 3. Die Viabilität zweier Gewebereplikate sollte sich um weniger als 20 % unterscheiden.	1. Die mittlere OD der mit der Negativkontrolle behandelten Gewebereplikate sollte $\geq 0,8$ und $\leq 2,5$ sein. 2. Die mittlere Viabilität der Gewebereplikate nach 6-stündiger Exposition gegenüber der Positivkontrolle, ausgedrückt in % der Negativkontrolle, sollte < 50 % sein. 3. Die Viabilität zweier Gewebereplikate sollte sich um weniger als 20 % unterscheiden.	1. Die mittlere OD der mit der Negativkontrolle behandelten Gewebereplikate sollte $> 1,0$ und $\leq 2,5$ sein. 2. Die mittlere Viabilität der Gewebereplikate nach 30-minütiger Exposition gegenüber der Positivkontrolle, ausgedrückt in % der Negativkontrolle, sollte < 30 % sein. 3. Die Viabilität zweier Gewebereplikate sollte sich um weniger als 20 % unterscheiden.	1. Die mittlere OD der mit der Negativkontrolle behandelten Gewebereplikate sollte $> 1,0$ und $\leq 2,5$ sein. 2. Die mittlere Viabilität der Gewebereplikate nach 4-stündiger Exposition gegenüber der Positivkontrolle, ausgedrückt in % der Negativkontrolle, sollte ≤ 20 % sein. 3. Die Viabilität zweier Gewebereplikate sollte sich um weniger als 20 % unterscheiden.

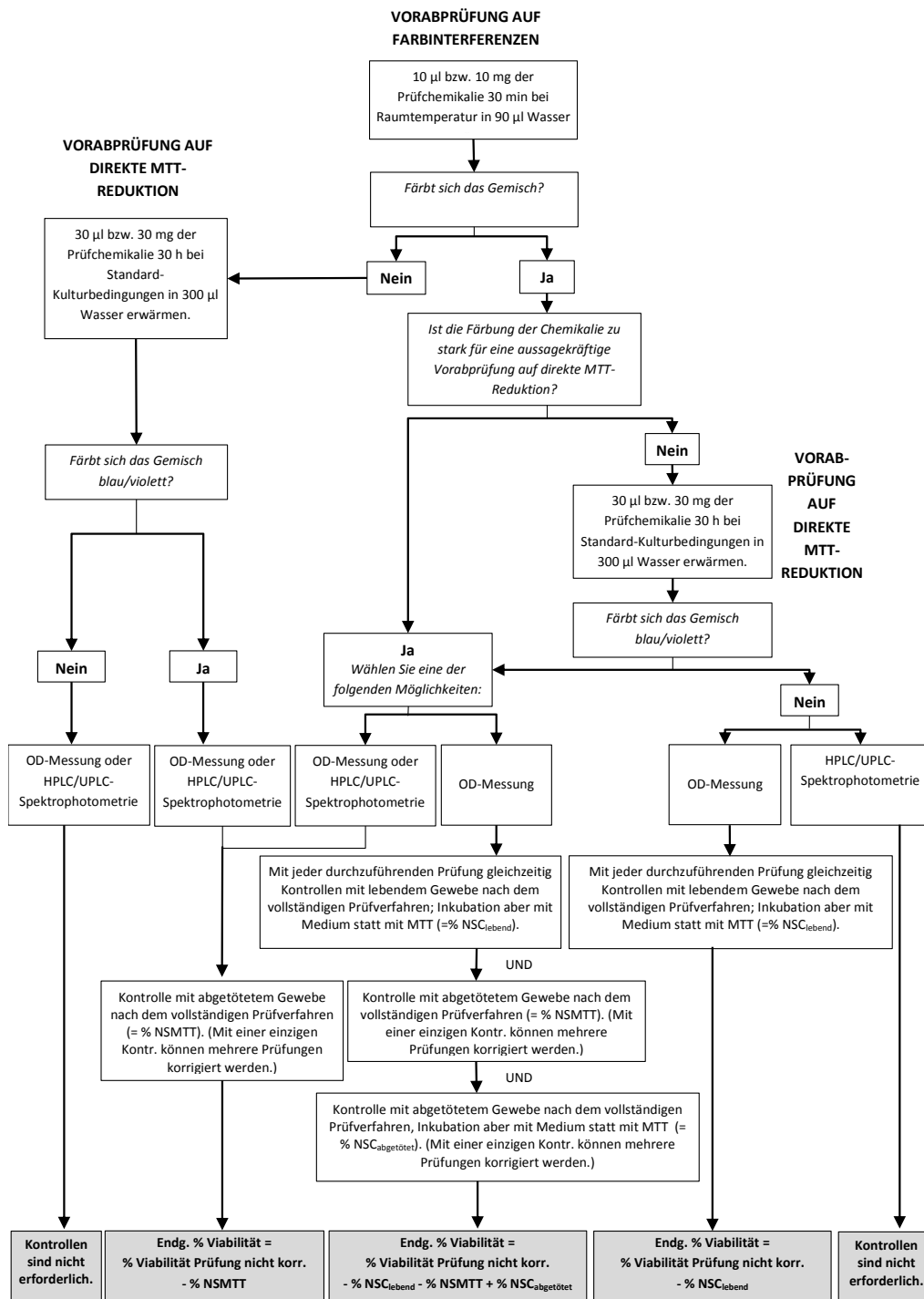
Anlage 3

FLUSSDIAGRAMM ZUR VERANSCHAULICHUNG DER ERMITTLUNG UND BEHANDLUNG VON DIREKTEN MTT-REDUKTIONSMITTELN UND/ODER VON CHEMIKALIEN, DIE FARBINTERFERENZEN VERURSACHEN, NACH DEN STANDARDARBEITSANWEISUNGEN DER VRM 1



Anlage 4

FLUSSDIAGRAMM ZUR VERANSCHAULICHUNG DER ERMITTLUNG UND BEHANDLUNG VON DIREKTEN MTT-REDUKTIONSMITTELN UND/ODER VON CHEMIKALIEN, DIE FARBINTERFERENZEN VERURSACHEN, NACH DEN STANDARDARBEITSANWEISUNGEN DER VRM 2



Anlage 5

SCHLÜSSELPARAMETER UND AKZEPTANZKRITERIEN FÜR DIE QUALIFIZIERUNG EINES HPLC/UPLC-SPEKTROPHOTOMETRIESYSTEMS ZUR MESSUNG VON AUS RhCE-GEWEBEMODELLEN EXTRAHIERTEM MTT-FORMAZAN

Parameter	Protokoll abgeleitet aus FDA-Leitlinie (36) (38)	Akzeptanzkriterien
Selektivität	Analyse von Isopropanol, Blindkontrolle lebend (Isopropanol-Extrakt aus lebenden RhCE-Gewebemodellen ohne Behandlung), Blindkontrolle abgetötet (Isopropanol-Extrakt aus abgetöteten RhCE-Gewebemodellen ohne Behandlung) und einem Farbstoff (z. B. Methylenblau)	$\text{Fläche}_{\text{Interferenz}} \leq 20 \% \text{ Fläche}_{\text{LLOQ}}^1$
Präzision	Qualitätskontrollen (d. h. MTT-Formazan bei 1,6 µg/ml, 16 µg/ml und 160 µg/ml) in Isopropanol (n=5)	$\text{VK} \leq 15 \% \text{ bzw. } \leq 20 \% \text{ für LLOQ}$
Genauigkeit	Qualitätskontrollen mit Isopropanol (n=5)	$\% \text{ Abw. } \leq 15 \% \text{ bzw. } \leq 20 \% \text{ für LLOQ}$
Matrixeffekt	Qualitätskontrollen mit Blindkontrolle lebend (n=5)	$85 \% \leq \text{Matrixeffekt } \% \leq 115 \%$
Übertragung	Analyse Isopropanol nach einem ULOQ ² -Standard	$\text{Fläche}_{\text{Interferenz}} \leq 20 \% \text{ Fläche}_{\text{LLOQ}}$
Reproduzierbarkeit (innerhalb eines Tages)	3 unabhängige Eichkurven (aufgrund von 6 aufeinander folgenden Verdünnungen von MTT-Formazan in Isopropanol im Verhältnis 1:3 beginnend mit der ULOQ, d. h. 200 µg/ml); Qualitätskontrollen mit Isopropanol (n=5)	Eichkurven: $\% \text{ Abw. } \leq 15 \% \text{ bzw. } \leq 20 \% \text{ für LLOQ}$
Reproduzierbarkeit (innerhalb eines Tages)	Tag 1: 1 Eichkurve und Qualitätskontrollen in Isopropanol (n=3) Tag 2: 1 Eichkurve und Qualitätskontrollen in Isopropanol (n=3) Tag 3: 1 Eichkurve und Qualitätskontrollen in Isopropanol (n=3)	Qualitätskontrollen: $\% \text{ Abw. } \leq 15 \% \text{ und VK } \leq 15 \%$
Kurzzeitstabilität von MTT-Formazan in RhCE-Gewebeextrakt	Qualitätskontrollen in Blindkontrollen lebend (n=3), die am Tag der Vorbereitung sowie nach 24-stündiger Lagerung bei Raumtemperatur analysiert wurden.	$\% \text{ Abw. } \leq 15 \%$
Langzeitstabilität von MTT-Formazan in RhCE-Gewebeextrakt (erforderlichenfalls)	Qualitätskontrollen in Blindkontrollen lebend (n=3), die am Tag der Vorbereitung sowie nach mehrtägiger Lagerung bei -20 °C analysiert wurden.	$\% \text{ Abw. } \leq 15 \%$

¹ LLOQ: Untere Quantifizierungsgrenze, definiert als Gewebeviabilität von 1-2 %, d. h. 0,8 µg/ml.

² ULOQ: Obere Quantifizierungsgrenze, definiert als mindestens zweimal so hoch wie die erwartete MTT-Formazan-Konzentration in Isopropanol-Extrakten aus Negativkontrollen (~70 µg/ml bei der VRM), d. h. 200 µg/ml.

B.70 *IN-VITRO*-ASSAYS MIT EINEM HUMANEN REKOMBINANTEN ÖSTROGENREZEPTOR (hrER) ZUR ERMITTLUNG VON CHEMIKALIEN MIT ER-BINDUNGS-AFFINITÄT

ALLGEMEINE EINLEITUNG

Leistungsbezogene OECD-Prüfrichtlinie

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 493 (2015). TG 493 ist eine leistungsbezogene Prüfrichtlinie (PBTG), die die Methode für *In-vitro*-Assays unter Verwendung eines humanen rekombinanten Östrogenrezeptors zur Ermittlung von Stoffen mit Bindungsaffinität für Östrogenrezeptoren (hrER-Bindungsassays) beschreibt. Sie umfasst zwei mechanistisch und funktionell ähnliche Assays zum Nachweis von Östrogenrezeptor-Bindern (d. h. ER α -Bindern) und sollte die Entwicklung neuer ähnlicher oder modifizierter Prüfmethoden nach den Validierungsgrundsätzen im OECD Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment erleichtern (1). Die folgenden vollständig validierten Referenzprüfmethoden (Anlagen 2 und 3) sind Grundlage dieser PBTG:
 - der Freyberger-Wilson-(FW-)*In-vitro*-Östrogenrezeptor-(ER-)Bindungsassay mit dem in voller Länge rekombinanten humanen ER α (2) und
 - der vom Chemical Evaluation and Research Institute (CERI) beschriebene *In-vitro*-Östrogenrezeptor-Bindungsassay mit einem Ligandenbindungs-Domänen-Protein des humanen rekombinanten ER α (2).

Leistungsstandards (PS) (3) sollen die Entwicklung und die Validierung ähnlicher Prüfmethoden für denselben Gefahren-Endpunkt erleichtern und eine rechtzeitige Änderung der PBTG 493 ermöglichen, damit ähnliche Assays in einer aktualisierten PBTG berücksichtigt werden können. Ähnliche Assays werden jedoch erst dann berücksichtigt, wenn die OECD die Assays geprüft und die Erfüllung der Leistungsstandards bestätigt hat. Die in TG 493 aufgenommenen Assays erfüllen die Anforderungen der OECD-Mitgliedstaaten an Prüfergebnisse bei Östrogenrezeptor-Bindungen alle gleichermaßen und ermöglichen die gegenseitige Anerkennung der Daten gemäß dem OECD-Übereinkommen.

Hintergrund und Grundsätze der in diese Prüfmethode aufgenommenen Assays

2. Die OECD leitete 1998 mit hoher Priorität die Überarbeitung bestehender Prüfrichtlinien für Screening-Prüfungen und Untersuchungen potenziell endokriner Disruptoren und die Entwicklung neuer Prüfrichtlinien ein. Der „OECD Conceptual Framework (CF) for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals“ wurde 2012 überarbeitet. Die ursprünglichen und überarbeiteten CFs wurden dem Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (4) als Anhänge beigelegt. Der CF umfasst fünf Ebenen mit jeweils eigener biologischer Komplexität. Die

in dieser Prüfmethode beschriebenen ER-Bindungsassays sind Ebene 2 (*In-vitro-Assays zur Ermittlung von Daten über ausgewählte endokrine Mechanismen/Wirkungspfade*) zuzuordnen. Diese Prüfmethode betrifft *In-vitro*-Rezeptor-Bindungsassays zur Ermittlung von Liganden für den humanen Östrogenrezeptor alpha (ER α).

3. Die Relevanz des *In-vitro*-ER-Bindungsassays für biologische Funktionen wurde eindeutig nachgewiesen. ER-Bindungsassays sind zur Ermittlung von Chemikalien vorgesehen, die den Östrogen-Hormonweg unterbrechen können. Sie wurden in den letzten beiden Jahrzehnten in großem Umfang zur Charakterisierung der Verteilung von ER in Geweben und zur Identifizierung von ER-Agonisten/-Antagonisten durchgeführt. Diese Assays spiegeln das Zusammenwirken zwischen Liganden und Rezeptoren als ersten Schritt des Östrogen-Signalwegs wider und sind bei allen Wirbeltieren wesentlich für die Reproduktionsfunktion.
4. Das Zusammenwirken von Östrogenen mit ER kann die Transkription von Genen beeinträchtigen, die durch Östrogene gesteuert werden, und nicht genomische Wirkungen induzieren. Dadurch können Zellprozesse ausgelöst oder gehemmt werden (u. a. für die Zellproliferation, für die normale fetale Entwicklung und für die Reproduktion erforderliche Prozesse) (5) (6) (7). Störungen normaler östrogenen Systeme können Beeinträchtigungen der normalen Entwicklung (Ontogenese), der reproduktiven Gesundheit und des Reproduktionssystems auslösen. Eine unangemessene Übertragung von ER-Signalen kann beispielsweise das Risiko einer hormonbedingten Krebserkrankung erhöhen, die Fruchtbarkeit beeinträchtigen und das Wachstum und die Entwicklung von Föten beeinflussen (8).
5. *In-vitro*-Bindungsassays beruhen auf einer unmittelbaren Wechselwirkung eines Stoffs mit einer spezifischen Rezeptorliganden-Bindungsstelle, die die Transkription eines Reporter-Genprodukts steuert. Wesentliches Element des hrER α -Bindungsassays (hrER α = humaner rekombinanter Östrogenrezeptor alpha) ist die Fähigkeit eines radioaktiv markierten Liganden ([³H]-17 β -Estradiol), bei zunehmenden Konzentrationen einer Prüfchemikalie (z. B. eines Bindungskonkurrenten) eine Bindung mit dem ER einzugehen. Prüfchemikalien mit einer starken ER-Affinität konkurrieren mit dem radioaktiv markierten Liganden bei einer niedrigeren Konzentration als Chemikalien mit einer geringeren Affinität für diesen Rezeptor. Dieser Assay beinhaltet zwei wesentliche Elemente: einen Versuch zur Ermittlung von Sättigungsbindungen zur Charakterisierung der Parameter der Wechselwirkung zwischen Rezeptoren und Liganden und zur Dokumentation der ER-Spezifität und einen anschließenden Versuch zur Ermittlung konkurrierender Bindungen, mit dem die Konkurrenz zwischen einer Prüfchemikalie und einem radioaktiv markierten Liganden im Hinblick auf die Bindung an den ER beschrieben wird.
6. In Studien zur Validierung der CERi- und der FW-Bindungsassays wurden die Relevanz und die Zuverlässigkeit im Hinblick auf die vorgesehene Verwendung nachgewiesen (2).

7. Die in der vorliegenden Prüfmethode verwendeten Begriffe und Abkürzungen werden in Anlage 1 erläutert.

Anwendungsbereich und Einschränkungen der Rezeptor-Bindungsassays

8. Diese Assays werden für Screening- und Priorisierungszwecke vorgeschlagen, können aber auch Aufschluss über molekulare Auslösungsereignisse (MIE = Molecular Initiation Events) geben. Die betreffenden Informationen können im Rahmen von Beweiskraftermittlungen verwendet werden. Die Assays beruhen auf der chemischen Bindung an die Ligandenbindungs-Domäne des ER α in einem *In-vitro*-System. Daher sollten Ergebnisse nicht unmittelbar für die komplexen Signal- und Steuerungswirkungen des intakten endokrinen *In-vivo*-Systems extrapoliert werden.
9. Die Bindung des natürlichen Liganden 17 β -Estradiol ist das erste einer Reihe molekularer Ereignisse, die die Transkription von Zielgenen aktivieren und schließlich zu einer physiologischen Veränderung führen (9). Die Bindung an die Ligandenbindungs-Domäne des ER α ist also als einer der Schlüsselmechanismen einer durch ER vermittelten endokrinen Störung (ED = Endocrine Disruption) zu betrachten; allerdings können ED auch infolge anderer Mechanismen auftreten, darunter (i) Wechselwirkungen mit anderen ER-Bindungsstellen α als die Liganden-Bindungstasche, (ii) Wechselwirkungen mit anderen für die Übertragung von Östrogensignalen relevanten Rezeptoren, ER- β und G-Protein-gekoppelten Östrogenrezeptoren, sonstigen Rezeptoren und Enzymsystem innerhalb des Hormonsystems, (iii) die Hormonsynthese, (iv) die metabolische Aktivierung/Deaktivierung von Hormonen, (v) die Verteilung von Hormonen an Zielgewebe und (vi) die Beseitigung von Hormonen im Körper. Keiner der Assays im Rahmen dieser Prüfmethode hat diese Wirkungsweisen zum Gegenstand.
10. Gegenstand dieser Prüfmethode ist die Fähigkeit von Stoffen, Bindungen mit dem humanen ER α einzugehen. Dabei wird nicht zwischen ER α -Agonisten und ER α -Antagonisten unterschieden. Nachgelagerte Ereignisse wie Gentranskriptionen oder physiologische Veränderungen werden bei diesen Assays nicht berücksichtigt. Da bei der Validierung nur einzelne einkomponentige Stoffe verwendet wurden, wurde die Eignung für Prüfgemische nicht untersucht. Dennoch sind die Assays theoretisch auch für die Prüfung von mehrkomponentigen Stoffen und Gemischen geeignet. Bevor die Prüfmethode für die Generierung von Daten für einen bestimmten rechtlichen Zweck verwendet wird, ist zu prüfen, ob sie für den beabsichtigten Zweck angemessene Ergebnisse liefern kann und, wenn dem so ist, warum. Solche Erwägungen entfallen, wenn die Prüfung des Gemischs von Rechts wegen vorgeschrieben ist.
11. Die zellfreien Rezeptorsysteme können an sich keine Stoffwechselaktivität entwickeln und wurden in Verbindung mit metabolischen Enzymsystemen nicht validiert. Eine Stoffwechselaktivität könnte bei der Auslegung einer Studie berücksichtigt werden. Dazu wären jedoch weitere Validierungsarbeiten erforderlich.

12. Chemikalien, die in der Lage sind, das Protein (d. h. das Rezeptor-Protein) zu denaturieren (beispielsweise ein Tensid oder Chemikalien, die den pH-Wert des Assay-Puffers verändern können), können nicht bzw. nur in Konzentrationen geprüft werden, bei denen diese Wechselwirkungen nicht auftreten. Ansonsten beschränkt sich der Konzentrationsbereich, der mit diesen Assays geprüft werden kann, auf die Löslichkeit der betreffenden Prüfchemikalie im Assay-Puffer.
13. Tabelle 1 enthält eine Übersicht über die Ergebnisse der 24 Stoffe, die mit den beiden in dieser Prüfmethode beschriebenen vollständig validierten Assays untersucht wurden. Von diesen Stoffen wurden nach veröffentlichten Berichten (u. a. aufgrund von *In-vitro*-Assays zur Prüfung auf transkriptionelle ER-Aktivierung und/oder aufgrund des Uterotrophen Bioassays) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) 17 Stoffe als ER-Binder eingestuft; 6 Stoffe wurden als Nicht-Binder eingestuft. Nach den in Tabelle 1 zusammengefassten Daten ergab sich hinsichtlich der Einstufungen aller Stoffe bis zu 10^{-4} M beim Antagonisten-Assay eine nahezu 100%ige Übereinstimmung zwischen den beiden Assays, und alle Stoffe wurden zutreffend als ER-Binder bzw. als Nicht-Binder eingestuft. Ergänzende Informationen über diese Gruppe von Stoffen sowie über weitere Stoffe, die im Rahmen der Validierungsstudien mit den ER-Bindungsassays untersucht wurden, sind den Leistungsstandards für den hrER-Bindungsassay (3), Anlage 2 (Tabellen 1, 2 und 3), zu entnehmen.

Tabelle 1: Einstufung von Stoffen als ER-Binder oder -Nicht-Binder nach der erwarteten Reaktion bei Prüfung mit dem FW- und dem CERi-hrER-Bindungsassay

	Bezeichnung des Stoffs	CAS-Nr.	Erwartete Reaktion	FW-Assay		CERi-Assay		MeSH-Chemikalie Klasse	Produktklasse
				Konzentrationsbereich (M)	Einstufung	Konzentrationsbereich (M)	Einstufung		
1	17 β -Estradiol	50-28-2	<i>Binder</i>	1x10 ⁻¹¹ – 1x10 ⁻⁶	Binder	1x10 ⁻¹¹ – 1x10 ⁻⁶	Binder	Steroid	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärmedizinisches Agens
2	Norethynodrel	68-23-5	<i>Binder</i>	3x10 ⁻⁹ – 30x10 ⁻⁴	Binder	3x10 ⁻⁹ – 30x10 ⁻⁴	Binder	Steroid	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärmedizinisches Agens
3	Norethindron	68-22-4	<i>Binder</i>	3x10 ⁻⁹ – 30x10 ⁻⁴	Binder	3x10 ⁻⁹ – 30x10 ⁻⁴	Binder	Steroid	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärmedizinisches Agens
4	Di- <i>n</i> -butylphthalat	84-74-2	<i>Nicht-Binder*</i>	1x10 ⁻¹⁰ – 1x10 ⁻⁴	Nicht-Binder*†	1x10 ⁻¹⁰ – 1x10 ⁻⁴	Nicht-Binder*†	Kohlenwasserstoff (cyclisch), Ester	Weichmacher, chemisches Zwischenprodukt
5	DES	56-53-1	<i>Binder</i>	1x10 ⁻¹⁰ – 1x10 ⁻³	Binder	1x10 ⁻¹⁰ – 1x10 ⁻³	Binder	Kohlenwasserstoff (cyclisch), Phenol	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärmedizinisches Agens
6	17 α -Ethinyl-estradiol	57-63-6	<i>Binder</i>	1x10 ⁻¹⁰ – 1x10 ⁻³	Binder	1x10 ⁻¹⁰ – 1x10 ⁻³	Binder	Steroid	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärmedizinisches Agens
7	meso-Hexestrol	84-16-2	<i>Binder</i>	1x10 ⁻¹⁰ – 1x10 ⁻³	Binder	1x10 ⁻¹⁰ – 1x10 ⁻³	Binder	Kohlenwasserstoff (cyclisch), Phenol	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärmedizinisches Agens
8	Genistein	446-72-0	<i>Binder</i>	1x10 ⁻¹⁰ – 1x10 ⁻³	Binder	1x10 ⁻¹⁰ – 1x10 ⁻³	Binder	Kohlenwasserstoff (heterocyclisch), Flavonoid	Naturprodukt
9	Equol	531-95-3	<i>Binder</i>	1x10 ⁻¹⁰ – 1x10 ⁻³	Binder	1x10 ⁻¹⁰ – 1x10 ⁻³	Binder	Phytoestrogen-Metabolit	Naturprodukt
10	Butylparaben (<i>n</i> -Butyl-4-hydroxybenzoat)	94-26-8	<i>Binder</i>	1x10 ⁻¹⁰ – 1x10 ⁻³	Binder	1x10 ⁻¹⁰ – 1x10 ⁻³	Binder	Paraben	Konservierungsmittel
11	Nonylphenol (Gemisch)	84852-15-3	<i>Binder</i>	1x10 ⁻¹⁰ – 1x10 ⁻³	Binder	1x10 ⁻¹⁰ – 1x10 ⁻³	Binder	Alkylphenol	Zwischenproduktverbindung
12	<i>o,p'</i> -DDT	789-02-6	<i>Binder</i>	1x10 ⁻¹⁰ – 1x10 ⁻³	Binder	1x10 ⁻¹⁰ – 1x10 ⁻³	Binder	chlororganisches	Insektizid
13	Corticosteron	50-22-6	<i>Nicht-Binder*</i>	1x10 ⁻¹⁰ – 1x10 ⁻⁴	Nicht-Binder	1x10 ⁻¹⁰ – 1x10 ⁻⁴	Nicht-Binder	Steroid	Naturprodukt
14	Zearalenon	17924-92-4	<i>Binder</i>	1x10 ⁻¹⁰ – 1x10 ⁻³	Binder	1x10 ⁻¹⁰ – 1x10 ⁻³	Binder	Kohlenwasserstoff (heterocyclisch), Lacton	Naturprodukt
15	Tamoxifen	10540-29-1	<i>Binder</i>	1x10 ⁻¹⁰ – 1x10 ⁻³	Binder	1x10 ⁻¹⁰ – 1x10 ⁻³	Binder	Kohlenwasserstoff (cyclisch)	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärmedizinisches Agens
16	5 α -Dihydro-testosteron	521-18-6	<i>Binder</i>	1x10 ⁻¹⁰ – 1x10 ⁻³	Binder	1x10 ⁻¹⁰ – 1x10 ⁻³	Binder	Steroid, nicht phenolisch	Naturprodukt
17	Bisphenol A	80-05-7	<i>Binder</i>	1x10 ⁻¹⁰ – 1x10 ⁻³	Binder	1x10 ⁻¹⁰ – 1x10 ⁻³	Binder	Phenol	Chemisches Zwischenprodukt

18	4- <i>n</i> -Heptylphenol	1987-50-4	<i>Binder</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Nicht eindeutig ^a	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	Alkylphenol	Zwischendrehzahl
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	Kohlenwasserstoff (halogeniert)	Pestizid
20	Benz(a)-anthracen	56-55-3	<i>Nicht-Binder</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Nicht-Binder ^b	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Nicht-Binder ^b	Aromatischer Kohlenwasserstoff	Zwischenprodukt
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	Phytoestrogen	Naturprodukt
22	Progesteron	57-83-0	<i>Nicht-Binder*</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Nicht-Binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Nicht-Binder	Steroid	Naturprodukt
23	Octyltriethoxysilan	2943-75-1	<i>Nicht-Binder</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Nicht-Binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Nicht-Binder	Silan	Oberflächen-Modifizierungsmittel
24	Atrazin	1912-24-9	<i>Nicht-Binder*</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Nicht-Binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Nicht-Binder	Heterocyclische Verbindung	Herbizid

* Löslichkeitsgrenze < 1×10^{-4} M.

* Die Verwendung und die Einstufung von Di-*n*-butylphthalat (DBP) als Nicht-Binder beruht auf der Prüfung von bis zu 10^{-4} M, da einige Labors bei den Prävalidierungsstudien bei 10^{-3} M keine Löslichkeit von DBP (z. B. eine Trübung) festgestellt hatten.

† In der Validierungsstudie wurde Di-*n*-butylphthalat (DBP) als kodierter Prüfstoff bei Konzentrationen von bis zu 10^{-3} M untersucht. Unter diesen Bedingungen stellten einige Labors einen Rückgang der Radioliganden-Bindung bei der höchsten Konzentration (10^{-3} M) und/oder eine nicht eindeutige Kurvenanpassung fest. Bei diesen Prüfläufen wurde DBP in drei von fünf Labors mit dem CERi-Assay und von fünf von sechs Labors mit dem FW-Assay (siehe (2)), Abschnitte IV.B.3a,b und VI.A) als „nicht eindeutig“ oder als „Binder“ eingestuft.

^a Die Einstufung deckte sich nicht mit der erwarteten Einstufung. Die Einstufung von 4-*n*-Heptylphenol als „nicht eindeutig“ oder als „Nicht-Binder“ durch drei von fünf Labors führte zu einer durchschnittlichen Einstufung als nicht eindeutig. Eine nähere Untersuchung ergab, dass dies auf eine begrenzte chemische Löslichkeit zurückzuführen war, die die Ausprägung einer vollständigen Bindungskurve verhinderte.

^b In der Validierungsstudie wurde Benz(a)anthracen aufgrund der veröffentlichten Literatur, nach der die für diesen Stoff berichtete *In-vitro*-Östrogenaktivität(16) primär von seiner metabolischen Aktivierung abhängt, neu eingestuft (17) (18). Die enzymatische metabolische Aktivierung des Stoffs wurde mit den in dieser vergleichenden Validierungsstudie durchgeführten zellfreien hrER-Bindungsassays nicht vorhergesagt. Unter den Versuchsbedingungen des FW- und des CERi-Assays ist der Stoff also tatsächlich als Nicht-Binder einzustufen.

ELEMENTE DES hrER-BINDUNGSASSAYS

Wesentliche Elemente des Assays

14. Diese Prüfmethode gilt für Assays mit einem ER-Rezeptor und einem ausreichend starken Liganden für diesen Rezeptor, der als Marker/Tracer für den Assay verwendet und durch zunehmende Konzentrationen einer Prüfchemikalie verdrängt werden kann. Die Bindungsassays beinhalten die beiden folgenden wesentlichen Elemente: 1) einen Versuch zur Ermittlung von Sättigungsbindungen und 2) einen Versuch zur Ermittlung konkurrierender Bindungen. Mit dem Assay zur Ermittlung von Sättigungsbindungen werden die Spezifität und die Aktivität der Rezeptor-Zubereitungen bestätigt. Mit der Untersuchung zur Ermittlung konkurrierender Bindungen wird die Fähigkeit einer Prüfchemikalie zur Bindung an den hrER beurteilt.

Kontrollen

15. Die Grundlage der vorgeschlagenen gleichzeitig geprüften Referenzöstrogens und der Kontrollen sollte erläutert werden. Gegebenenfalls dienen gleichzeitige Kontrollen (Lösungsmittel- (Vehikel-), Positiv- (ER-Binder; starke und geringe Affinität) und Negativkontrollen (Nicht-Binder)) als Nachweis dafür, dass der Assay unter den Prüfbedingungen funktioniert; außerdem bilden sie eine Grundlage für versuchsübergreifende Vergleiche. In der Regel sind sie Bestandteil der Akzeptanzkriterien für die Versuche (1). Bei jedem Prüflauf sollten auf jeweils einer Platte vollständige Konzentrationskurven des Referenzöstrogens und der Kontrollen (d. h. schwache Binder und Nicht-Binder) verwendet werden. Alle anderen Platten sollten Folgendes enthalten: 1) eine hohe (etwa vollständige Verdrängung des radioaktiv markierten Liganden) und eine mittlere Konzentration (etwa IC_{50}) sowohl von E2 als auch des schwachen Binders, jeweils dreifach, und 2) eine Lösungsmittelkontrolle und einen nicht spezifischen Binder, ebenfalls jeweils dreifach.

Standard-Qualitätskontrollverfahren

16. Standard-Qualitätskontrollverfahren sollten wie für den jeweiligen Assay beschrieben durchgeführt werden, um gewährleisten zu können, dass aktive Rezeptoren, die korrekten Chemikalienkonzentrationen und auch über mehrere Wiederholungen stabile Toleranzgrenzen verwendet werden und sichergestellt ist, dass die erwarteten ER-Bindungsreaktionen im Zeitverlauf festgestellt werden können.

Nachweis der Eignung des Labors

17. Vor der Prüfung unbekannter Chemikalien mit einem der Assays dieser Prüfmethode sollte jedes Labor nachweisen, dass es in der Lage ist, den betreffenden Assay durchzuführen. Dazu sind Sättigungsprüfungen zur Bestätigung der Spezifität und der Aktivität der ER-Zubereitung sowie Assays zur Ermittlung konkurrierender Bindungen mit dem Referenzöstragen und den Kontrollen (schwacher Binder und Nicht-Binder) durchzuführen. Das Labor sollte eine historische Datenbank mit Ergebnissen des Referenzöstrogens und der Kontrollen aufgrund von 3-5 unabhängigen Versuchen an unterschiedlichen Tagen erstellen. Die betreffenden Versuche bilden die Grundlage für das Referenzöstragen und die historischen Kontrollen des Labors und werden zur partiellen Beurteilung der Akzeptierbarkeit des Assays bei künftigen Prüfläufen berücksichtigt.
18. Die Reaktionsfähigkeit des Prüfsystems wird auch durch eine Prüfung der in Tabelle 2 genannten Leistungsstoffe bestätigt. Die Liste der Leistungsstoffe ist eine Untergruppe der Referenzstoffe der Leistungsstandards für die ER-Bindungsassays (3). Diese Stoffe sind im Handel erhältlich und entsprechen den Chemikalienklassen, bei denen gewöhnlich eine ER-Bindungsaktivität zu verzeichnen ist. Außerdem zeigen sie ein geeignetes Wirkungsspektrum (d. h. stark bis schwach) für ER-Bindungen und für Nicht-Binder (d. h. Negativstoffe). Bei allen Leistungsstoffen sollten die zu geprüften Konzentrationen den gesamten in Tabelle 2 genannten Bereich abdecken. Für jeden Stoff sollten mindestens drei Versuche durchgeführt

werden, und die Ergebnisse sollten mit der erwarteten chemischen Aktivität in Einklang stehen. Jeder Versuch sollte unabhängig (d. h. mit frischen Verdünnungen des Rezeptors, der Chemikalien und des Reagens) und mit drei Wiederholungen pro Konzentration durchgeführt werden. Die Leistungsfähigkeit wird durch die ordnungsgemäße Einstufung (positiv/negativ) der einzelnen Leistungsstoffe nachgewiesen. Beim Erlernen der Assays sollte die Eignungsprüfung von jedem einzelnen Labortechniker durchgeführt werden.

Tabelle 2: Liste der Kontroll- und der Leistungsstoffe für die Assays zur Prüfung auf konkurrierende hrER-Bindungen¹

Nr.	Bezeichnung des Stoffs	CAS-Nr. ²	Erwartete Reaktion ^{3,4}	Prüfkonzentrationsbereich (M)	MeSH-Chemikalienklasse ⁵	Produktklasse ⁶
Kontrollen (Referenzöstrogen, schwacher Binder, Nicht-Binder)						
1	17-Εστραδιολ	50-28-2	Binder	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Steroid	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärmedizinisches Agens
2	Norethynodrel (oder) Norethindron	68-23-5 (oder) 68-22-4	Binder	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-6}$	Steroid	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärmedizinisches Agens
3	Octyltriethoxysilan	2943-75-1	Nicht-Binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Silan	Oberflächen-Modifizierungsmittel
Leistungsstoffe⁶						
4	Diethylstilbestrol	56-53-1	Binder	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Kohlenwasserstoff (cyclisch), Phenol	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärmedizinisches Agens
5	17α-Ethinylestradiol	57-63-6	Binder	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Steroid	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärmedizinisches Agens
6	meso-Hexestrol	84-16-2	Binder	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Kohlenwasserstoff (cyclisch), Phenol	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärmedizinisches Agens
7	Tamoxifen	10540-29-1	Binder	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Kohlenwasserstoff (cyclisch)	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärmedizinisches Agens
8	Genistein	446-72-0	Binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Heterocyclische Verbindung, Flavonoid	Naturprodukt
9	Bisphenol A	80-05-7	Binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Phenol	Chemisches Zwischenprodukt
10	Zearalenon	17924-92-4	Binder	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-3}$	Heterocyclische Verbindung, Lacton	Naturprodukt

11	Butylparaben	94-26-8	Binder	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-3}$	Carboxylsäure, Phenol	Konservierungsmittel
12	Atrazin	1912-24-9	Nicht-Binder	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Heterocyclische Verbindung	Herbizid
13	Di-n-butylphthalat (DBP) ⁷	84-74-2	Nicht-Binder ⁸	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Kohlenwasserstoff (cyclisch), Ester	Weichmacher, chemisches Zwischenprodukt
14	Corticosteron	50-22-6	Nicht-Binder	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-4}$	Steroid	Naturprodukt

1 Wenn ein Leistungsstoff nicht mehr im Handel erhältlich ist, kann ein Stoff derselben ER-Bindungsklassifikation und mit vergleichbarer Wirksamkeit und Klassifizierung verwendet werden.

2 Abkürzungen: CAS-Nr. = Registernummer des Chemical Abstracts Service.

3 Einstufung als ER α -Binder bzw. -Nicht-Binder in der Validierungsstudie des CERi- und des FW-hrER-Bindungsassays (2).

⁴ Die Einstufung der ER-Bindungsaktivität beruhte auf den ICCVAM Background Review Documents (BRD) zu Assays zur Prüfung der ER-Bindung und zu TA-Assays (9) sowie auf empirischen Daten und anderen Informationen aus veröffentlichten und geprüften Untersuchungen (10) (11) (12) (13) (14) (15).

⁵ Die Stoffe wurden nach den Medical Subject Headings (MeSH) der U.S. National Library of Medicine, einem international anerkannten standardisierten Klassifizierungssystem, (siehe <http://www.nlm.nih.gov/mesh>) einer oder mehreren Chemikalienklassen zugeordnet.

⁶ Die Stoffe wurden nach der Gefahrstoff-Datenbank der U.S. National Library of Medicine (siehe <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>) einer oder mehreren Chemikalienklassen zugeordnet.

⁷ DPB kann als alternative Nicht-Binder-Kontrolle mit einer Konzentration von maximal 10^{-4} M geprüft werden.

⁸ Die Löslichkeitsgrenze liegt bei diesem Stoff bei 10^{-4} M. Die Verwendung und die Einstufung von Di-n-butylphthalat (DBP) als Nicht-Binder beruht auf der Prüfung von bis zu 10^{-4} M, da einige Labors bei den Prävalidierungsstudien bei 10^{-3} M keine Löslichkeit von DBP (z. B. eine Trübung) festgestellt hatten.

Löslichkeitsprüfungen und Dosisfindungsversuche für die Prüfchemikalien

19. In einem Vorversuch sollten die Löslichkeitsgrenze der einzelnen Prüfchemikalien ermittelt und der jeweils geeignete Konzentrationsbereich für die Prüfung bestimmt werden. Die Löslichkeitsgrenze der einzelnen Prüfchemikalien wird zunächst im Lösungsmittel bestimmt und anschließend unter den Bedingungen des Assays bestätigt. Die im Assay geprüfte Endkonzentration sollte höchstens bei 1 mM liegen. Für die Dosisfindungsprüfung werden eine Lösungsmittelkontrolle sowie acht logarithmische serielle Verdünnungen ausgehend von der maximal akzeptierbaren Konzentration (z. B. 1 mM oder weniger, je nach Löslichkeitsgrenze) verwendet. Das Auftreten einer Trübung oder die Bildung eines Niederschlags werden protokolliert. Die Konzentrationen beim zweiten und beim dritten Versuch sollten ggf. angepasst werden, um die Konzentrations-Reaktionskurve besser zu beschreiben.

Akzeptanzkriterien für Prüfläufe

20. Ob ein Prüflauf akzeptiert wird, hängt von der Bewertung der Ergebnisse mit dem jeweils verwendeten Referenzöstrogen und den Kontrollen ab. Zunächst sollten für Platte 1 die vollständigen Konzentrationskurven der Referenzkontrollen jedes einzelnen Versuchs mit den Werten der Leistungsmessungen bei den Parametern für die Kurvenanpassung (z. B. IC_{50} und Hillslope) übereinstimmen; der Vergleich erfolgt anhand der für die Protokolle des CERi- und des FW-Assays angegebenen Werte (Anlagen 2 und 3) und der historischen Kontrolldaten des Labors, das die Prüfungen durchführt. Bei allen Versuchen sollten alle Kontrollen (Referenzöstrogen, schwacher Binder und Nicht-Binder) korrekt eingestuft werden. Anschließend sind die Kontrollen auf allen folgenden Platten auf Übereinstimmung mit Platte 1 zu prüfen. Um den Höchstwert der Kurve der konkurrierenden Bindungen eindeutig zu ermitteln, sollte ein ausreichendes Spektrum an Konzentrationen der Prüfchemikalie berücksichtigt werden. Die Variabilität zwischen Wiederholungen bei den einzelnen Konzentrationen der Prüfchemikalie sowie zwischen den drei unabhängigen Prüfläufen sollte angemessen und wissenschaftlich vertretbar sein. Die Fähigkeit zur konsistenten Durchführung der Assays sollte durch den Aufbau und die Pflege einer historischen Datenbank für das Referenzöstrogen und die Kontrollen nachgewiesen werden. Standardabweichungen (SD) oder Variationskoeffizienten (VK) der Mittelwerte von Parametern zur Anpassung der Kurven für das Referenzöstrogen und die Kontrolle mit dem schwachen Binder aus mehreren Versuchen können als Maßstab für die Reproduzierbarkeit innerhalb eines Labors herangezogen werden. Die Ergebnisse der Kontrollen auf den Platten der einzelnen Prüfläufe sowie die Ergebnisse für die einzelnen Prüfchemikalien sind einer qualifizierten fachlichen Beurteilung zu unterziehen.

Darüber hinaus sollten für Akzeptanzkriterien die folgenden Grundsätze gelten:

- Die Daten sollten für eine quantitative Bewertung der ER-Bindung ausreichen.

- Die geprüften Konzentrationen sollten im Löslichkeitsbereich der Prüfchemikalien bleiben.

Analyse der Daten

21. Das beschriebene Verfahren zur Analyse der Daten zur Sättigung und zu konkurrierenden Bindungen sollte unter Berücksichtigung der wesentlichen Grundsätze der Charakterisierung von Wechselwirkungen zwischen Rezeptoren und Liganden durchgeführt werden. In der Regel werden Daten zur Sättigungsbindung mit einem nicht linearen Regressionsmodell analysiert, das die Bindungswirkung insgesamt ebenso wie nicht spezifische Bindungen berücksichtigt. Bei der Bestimmung von $B_{\max}$ und K_d ist möglicherweise eine Korrektur für den Abbau von Liganden (z. B. Swillens, 1995 (19)) vorzunehmen. Daten aus Untersuchungen zur Ermittlung konkurrierender Bindungen werden gewöhnlich umgewandelt (z. B. spezifische Bindung in Prozent und Konzentration der Prüfchemikalie ($\log M$)). Mit einer geeigneten Software zur nicht linearen Kurvenanpassung sollten die Schätzwerte für $\log (IC_{50})$ für die einzelnen Prüfchemikalien zur Verwendung in einer Hill-Gleichung mit vier Parametern ermittelt werden. Nach einer ersten Analyse sollten die Parameter zur Kurvenanpassung geprüft werden; außerdem sollte geprüft werden, in welchem Umfang die Bindungsdaten mit der erzeugten Kurve der konkurrierenden Bindungen übereinstimmen. Manchmal müssen weitere Analysen vorgenommen werden, um die optimale Kurvenanpassung zu ermitteln (z. B. indem Höchst- und/oder Mindestwerte für die Kurve festgelegt werden oder die 10-%-Regel angewendet wird (siehe Anlage 4 und (2) (Abschnitt III.A.2)).
22. Die Erfüllung der Akzeptanzkriterien (Nummer 20) deutet darauf hin, dass ein Assaysystem ordnungsgemäß funktioniert. Dies gewährleistet jedoch nicht, dass eine bestimmte Prüfung tatsächlich exakte Daten ergibt. Die Wiederholung der korrekten Ergebnisse der ersten Prüfung ist die beste Bestätigung dafür, dass exakte Daten ermittelt wurden.

Allgemeine Kriterien für die Auswertung von Daten

23. Zurzeit besteht keine allgemein anerkannte Methode zur Auswertung der Daten aus ER-Bindungsassays. Allerdings sollten qualitative (z. B. Binder/Nicht-Binder) und/oder quantitative (IC_{50} , relative Bindungsaffinität (RBA) usw.) Bewertungen einer durch hrER vermittelten Aktivität auf empirischen Daten und fundierten wissenschaftlichen Beurteilungen beruhen.

Prüfbericht

24. Der Prüfbericht sollte folgende Angaben enthalten:

Assay

- durchgeführter Assay.

Kontrolle/Referenz/Prüfchemikalie

- Herkunft, Partienummer, ggf. begrenztes Verwendungsdatum;
- Stabilität der Prüfchemikalie, falls bekannt;
- Löslichkeit und Stabilität der Prüfchemikalie in Lösungsmittel, falls bekannt;
- Messung des pH-Werts, der Osmolalität und ggf. des Niederschlags im Kulturmedium, dem die Prüfchemikalie zugegeben wurde;

einkomponentiger Stoff

- physikalisches Erscheinungsbild, Wasserlöslichkeit und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften;
- chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS-Bezeichnung, CAS-Nummer, SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel, Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.;

mehrkomponentiger Stoff, UVCB-Stoffe und Gemische:

- So weit wie möglich Charakterisierung durch die chemische Zusammensetzung (siehe oben), das quantitative Vorkommen und die relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften der einzelnen Elemente.

Lösungsmittel/Vehikel

- Beschreibung (Art, Lieferant und Charge);
- Begründung der Auswahl des Lösungsmittels/Vehikels;
- Löslichkeit und Stabilität der Prüfchemikalie in Lösungsmittel/in einem Vehikel, falls bekannt.

Rezeptoren

- Herkunft der Rezeptoren (Hersteller, Bestellnummer, Charge, Art des Rezeptors, vom Hersteller gelieferte aktive Rezeptorkonzentration, Zertifizierung des Herstellers);
- Beschreibung der Rezeptoren (einschl. ermittelte Sättigungsbindungen): K_d , B_{max} ;
- Lagerung der Rezeptoren;
- radioaktiv markierter Ligand;
- Hersteller, Bestellnummer, Charge, spezifische Aktivität.

Prüfbedingungen

- Einschränkungen hinsichtlich der Löslichkeit unter Assay-Bedingungen;
- Zusammensetzung des Bindungspuffers;
- Konzentration des Rezeptors;

- Konzentration des Tracers (d. h. des radioaktiv markierten Liganden);
- Konzentrationen der Prüfchemikalie;
- Prozentanteil des Vehikels im endgültigen Assay;
- Inkubationstemperatur und -dauer;
- Methode zur Trennung von gebundenen/nicht gebundenen Chemikalien;
- positive und negative Kontrollen/Referenzstandards;
- Kriterien zur Einstufung der Prüfungen als positiv, negativ oder nicht eindeutig.

Akzeptanzprüfung

- tatsächliche IC_{50} - und Hillslope-Werte für gleichzeitige Positivkontrollen/Referenzstoffe.

Ergebnisse

- Rohdaten und Daten zu gebundenen/nicht gebundenen Chemikalien;
- ggf. Bestätigung durch Prüfung der Denaturierung;
- wenn vorhanden, niedrigste Wirkungskonzentration (LEC);
- RBA- und/oder IC_{50} -Werte;
- nach Möglichkeit Dosis-Reaktions-Verhältnis;
- wenn vorhanden, statistische Analysen sowie Messabweichung und Konfidenzwerte (z. B. SEM, SD, VK oder 95 % CI) sowie Angaben dazu, wie diese Werte ermittelt wurden.

Erörterung der Ergebnisse

- Anwendung der 10-%-Regel.

Schlussfolgerung.

LITERATUR

- (239) 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (240) 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (241) 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 für Wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (242) OECD (2012). 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (243) Cavailles, V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept, *Climacteric*, 5 Suppl 2: S. 20-26.
- (244) Welboren, W.J., u. a. (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and How are they Regulated? *Endocr. Relat. Cancer*, 16(4): S. 1073-1089.
- (245) Younes, M., und Honma, N. (2011). Estrogen Receptor Beta, *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 135(1): S. 63-66.
- (246) Diamanti-Kandarakis u. a. (2009). Endocrine-Disrupting Chemicals: an Endocrine Society Sci. Statement, *Endo Rev* 30(4):293-342.
- (247) 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.
- (248) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.
- (249) ICCVAM (2006). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

- (250) Akahori, Y., u. a. (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.
- (251) 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (252) 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.
- (253) 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.
- (254) Kummer, V.; Maskova, J; Zrally, 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.
- (255) Gozgit, J.M.; Nestor, K.M.; Fasco, M.J.; Pentecost, B.T.; Arcaro, K.F. 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.
- (256) Santodonato, J. (1997). Review of the Estrogenic and Antiestrogenic Activity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Relationship to Carcinogenicity. *Chemosphere*, 34: 835-848.
- (257) Swillens S (1995). Interpretation of Binding Curves Obtained with High Receptor Concentrations: Practical Aid for Computer Analysis, *Mol Pharmacol* 47(6):1197-1203.

Anlage 1

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN UND ABKÜRZUNGEN

10-%-Regel: Bei den Analysen Möglichkeit des Ausschlusses von Datenpunkten, wenn bei Wiederholungen der Mittelwert der prozentualen spezifischen [³H]-17β-Estradiol-Bindung mindestens 10 % über dem beobachteten Mittelwert bei einer geringeren Konzentration liegt (siehe Anlage 4).

Akzeptanzkriterien: Mindeststandards für Kontrollen und Referenzstandards. Damit ein Versuch als gültig betrachtet werden kann, sollten alle Akzeptanzkriterien erfüllt sein.

CF: OECD Conceptual Framework for the Testing and Evaluation of Endocrine Disrupters.

Chemikalie: Ein Stoff oder ein Gemisch.

E2: 17β-Estradiol

ED: Endokrine Störung.

Eignung: Die nachgewiesene Fähigkeit zur ordnungsgemäßen Durchführung eines Assays vor der Prüfung unbekannter Stoffe.

ER: Östrogenrezeptor.

Genauigkeit (Übereinstimmung): Der Grad an Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen eines Assays und akzeptierten Referenzwerten. Die Genauigkeit ist ein Maß der Leistung eines Assays und ein Aspekt der Relevanz. Der Begriff wird oft im Sinne von „Übereinstimmung“ verwendet und bezeichnet den Anteil der korrekten Ergebnisse eines Assays (1).

hERα: Humaner Östrogenrezeptor α.

IC₅₀: Die Hälfte der maximalen Wirkungskonzentration einer Prüfchemikalie mit hemmender Wirkung.

ICCVAM: Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (das US-amerikanische Validierungszentrum).

Inter-Labor-Reproduzierbarkeit: Das Ausmaß, in dem unterschiedliche qualifizierte Labors, die dasselbe Protokoll verwenden und dieselben Prüfstoffe untersuchen, qualitativ und quantitativ vergleichbare Ergebnisse erzielen können. Die Inter-Labor-Reproduzierbarkeit wird während der Prävalidierungs- und Validierungsverfahren ermittelt und zeigt das Maß an, in dem ein Assay erfolgreich zwischen Labors übertragen werden kann (1).

Intra-Labor-Reproduzierbarkeit: Das Ausmaß, in dem qualifizierte Personen innerhalb desselben Labors, die dasselbe spezifische Protokoll zu unterschiedlichen Zeiten verwenden, erfolgreich dieselben Ergebnisse replizieren können. Auch als „laborinterne Reproduzierbarkeit“ bezeichnet (1).

LEC: Als niedrigste Wirkungskonzentration (Lowest Effective Concentration) wird die niedrigste

Konzentration einer Prüfchemikalie bezeichnet, die eine Wirkung hervorruft (d. h. die niedrigste Konzentration einer Prüfchemikalie, bei der die n-fache Induktion sich statistisch von der gleichzeitigen Vehikelkontrolle unterscheidet).

Leistungsstandards: Auf einer validierten Prüfmethode beruhende Normen, auf deren Grundlage die Vergleichbarkeit einem vorgeschlagenen, mechanistisch und funktionell ähnlichen Assay bewertet werden kann. Sie umfassen (1) wesentliche Elemente des Assays; (2) ein Mindestverzeichnis von Referenzchemikalien, ausgewählt aus den Chemikalien, die zum Nachweis der akzeptablen Leistung der validierten Referenzmethode verwendet werden, und (3) je nach den für die validierte Referenzmethode erzielten Ergebnissen die vergleichbaren Genauigkeits- und Zuverlässigkeitswerte, die der vorgeschlagene Assay bei der Bewertung anhand des Mindestverzeichnisses von Referenzchemikalien ergeben sollte (1).

Leistungsstoffe: Eine Untergruppe der in die Leistungsstandards einbezogenen Referenzstoffe, die von Labors bei standardisierten Assays zum Nachweis der fachlichen Kompetenz eingesetzt werden können. Auswahlkriterien für diese Stoffe sind u. a., dass sie den Reaktionsbereich abdecken und im Handel erhältlich sein müssen und dass für diese Stoffe hochwertige Referenzdaten verfügbar sein müssen.

Me-Too-Prüfung: [Im englischen Sprachraum gemeinsprachliche] Bezeichnung einer Prüfmethode, die strukturell und funktionell mit einer validierten und akzeptierten Referenzprüfmethode vergleichbar ist. Gleichbedeutend mit „vergleichbare Prüfmethode“ verwendet.

Östrogenaktivität: Die Fähigkeit einer Chemikalie, die Bindung von Östrogenrezeptoren durch 17 β -Estradiol nachzubilden. Mit dieser Prüfmethode kann die Bindung an den hER α festgestellt werden.

PBTG: Leistungsbezogene Prüfrichtlinie.

Prüfchemikalie: Stoff oder Gemisch, der/das mit dieser Prüfmethode untersucht wird.

RBA: Relative Bindungsaffinität. Die RBA eines Stoffs wird als Prozentanteil von log (IC₅₀) des Stoffs im Vergleich zu log (IC₅₀) bei 17 β -Estradiol berechnet.

Referenzöstrogen: 17 β -Estradiol (E2 [oder E₂], CAS 50-28-2).

Referenzprüfmethode: Die Assays, auf denen die PBTG 493 beruht.

Relevanz: Dieser Begriff bezieht sich auf das Verhältnis zwischen dem Assay und der betreffenden Wirkung und auf die Frage, ob er aussagekräftig und nützlich für einen bestimmten Zweck ist. Er beschreibt das Ausmaß, in dem der Assay die untersuchte biologische Wirkung korrekt misst oder vorhersagt. Die Relevanz schließt eine Beurteilung der Genauigkeit (Übereinstimmung) eines Assays ein (1).

SD: Standardabweichung.

Validierte Prüfmethode: Eine Prüfmethode, für die zwecks Bestimmung ihrer Relevanz (einschließlich Genauigkeit) und Zuverlässigkeit für einen bestimmten Zweck Validierungsstudien abgeschlossen wurden. Es wird darauf hingewiesen, dass eine validierte Prüfmethode

möglicherweise nicht genau und zuverlässig genug ist, um für den vorgeschlagenen Zweck akzeptiert zu werden (1).

Validierung: Prozess, mit dem die Zuverlässigkeit und die Relevanz eines bestimmten Ansatzes, einer Methode, eines Assays, eines Prozesses oder einer Bewertung für einen bestimmten Zweck festgestellt wird (1).

VK: Variationskoeffizient.

Zuverlässigkeit: Maß der Reproduzierbarkeit einer Prüfmethode innerhalb von und zwischen Laboratorien über einen längeren Zeitraum und bei einheitlichem Protokoll. Sie wird durch Berechnung der Intra- und Inter-Labor-Reproduzierbarkeit bewertet (13).

Anlage 2

DER FREYBERGER-WILSON-*IN-VITRO*-ÖSTROGENREZEPTOR-(ER α -)BINDUNGSASSAY MIT IN VOLLER LÄNGE REKOMBINANTEM ER α ZUR ERMITTLUNG VON SÄTTIGUNGSBINDUNGEN UND KONKURRIERENDEN BINDUNGEN

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN UND BEGRENZUNGEN (SIEHE AUCH ALLGEMEINE EINLEITUNG)

1. Bei diesem *In-vitro*-Östrogenrezeptor-(ER α)-Bindungsassay zur Ermittlung von Sättigungsbindungen und konkurrierenden Bindungen wird der in voller Länge rekombinante humane ER α (hrER α) verwendet. Dieser Östrogenrezeptor wird in mit einem Baculovirus infizierten Insektenzellen erzeugt und aus diesen Zellen isoliert. Das von Freyberger und Wilson entwickelte Protokoll wurde einer internationalen Validierungsstudie durch mehrere Labors unterzogen (2). Dabei wurden die Relevanz und die Zuverlässigkeit des Protokolls für den vorgesehenen Zweck des Assays nachgewiesen.
2. Der Assay besteht in einem Prüfverfahren zur Ermittlung von Stoffen, die eine Bindung mit dem hrER α über die volle Länge eingehen können. Mit dem Assay kann untersucht werden, ob eine Prüfchemikalie mit 17 β -Estradiol um Bindungen an den hrER α konkurrieren kann. Als quantitative Ergebnisse können mit dem Assay u. a. die Werte für IC₅₀ (als Maßstab für die zur Verdrängung der Hälfte des [³H]-17 β -Estradiols vom hrER α durch eine Prüfchemikalie erforderliche Konzentration) und die relative Affinität von Prüfchemikalien für Bindungen an den hrER α im Vergleich zu 17 β -Estradiol ermittelt werden. Mit Blick auf die Verwendung zur Prüfung von Chemikalien kann ein akzeptables qualitatives Ergebnis des Assays auch darin bestehen, dass Prüfchemikalien nach ihrer Bindung an den hrER α und nach den genannten Kriterien für die Bindungskurven als Binder, Nicht-Binder oder nicht eindeutig eingestuft werden.
3. Da bei diesem Assay ein radioaktiver Ligand verwendet wird, benötigen die Labors eine Genehmigung für die Verwendung von radioaktivem Material. Bei allen Verfahren unter Verwendung von Radioisotopen und von gefährlichen Chemikalien sind die nach den nationalen Rechtsvorschriften geltenden Bestimmungen und die dort vorgesehenen Verfahren einzuhalten.
4. Vor der Verwendung dieses Assays für rechtliche Zwecke sollten die Abschnitte „ALLGEMEINE EINLEITUNG“ und „ELEMENTE DES hrER-BINDUNGSASSAYS“ gelesen werden. Die in dieser Prüfrichtlinie verwendeten Begriffe und Abkürzungen werden in Anlage 1 erläutert.

PRINZIPIEN DES ASSAYS (SIEHE AUCH ALLGEMEINE EINLEITUNG)

5. Mit dem hrER α -Bindungsassay wird die Fähigkeit eines radioaktiv markierten Liganden ($[^3\text{H}]$ -17 β -Estradiol) gemessen, bei zunehmenden Konzentrationen einer Prüfchemikalie (z. B. eines Bindungskonkurrenten) eine Bindung mit dem ER einzugehen. Prüfchemikalien mit einer starken ER-Affinität konkurrieren mit dem radioaktiv markierten Liganden bei einer niedrigen Konzentration als Chemikalien mit einer geringeren Affinität für diesen Rezeptor.
6. Dieser Assay beinhaltet zwei wesentliche Elemente: einen Versuch zur Ermittlung von Sättigungsbindungen zur Charakterisierung der Parameter der Wechselwirkung zwischen Rezeptor und Ligand und einen anschließenden Versuch zur Ermittlung konkurrierender Bindungen, mit dem die Konkurrenz zwischen einer Prüfchemikalie und einem radioaktiv markierten Liganden im Hinblick auf die Bindung an den ER beschrieben wird.
7. Zur Vorbereitung der Prüfung konkurrierender Bindungen soll anhand einer Ermittlung der Sättigungsbindung eine bestimmte Rezeptorcharge hinsichtlich ihrer Bindungsaffinität geprüft und quantitativ bewertet werden. Mit der Prüfung konkurrierender Bindungen werden unter Gleichgewichtsbedingungen die Affinität einer bestimmten Konzentration des Östrogenrezeptors für seinen natürlichen Liganden (ausgedrückt durch die Dissoziationskonstante K_d) und die Konzentration der aktiven Rezeptor-Bindungsstellen (B_{max}) gemessen.
8. Mit der Prüfung konkurrierender Bindungen wird die Affinität eines Stoffs für Bindungen an den ER im Hinblick auf die Konkurrenz mit $[^3\text{H}]$ -17 β -Estradiol bewertet. Die Affinität wird anhand der Konzentration der Prüfchemikalie quantifiziert, die unter Gleichgewichtsbedingungen 50 % der spezifischen Bindung von $[^3\text{H}]$ -17 β -Estradiol hemmt („Hemmkonzentration 50 %“ oder IC_{50}). Diese Affinität kann auch anhand der relativen Bindungsaffinität (RBA, bezogen auf IC_{50} Estradiol, im selben Prüflauf getrennt gemessen) beurteilt werden. Bei der Prüfung konkurrierender Bindungen wird die Bindung von $[^3\text{H}]$ -17 β -Estradiol in einer bestimmten Konzentration an zahlreiche (acht Größenordnungen) Konzentrationen einer Prüfchemikalie gemessen. Die ermittelten Daten werden dann möglichst entsprechend der Hill-Gleichung (Hill, 1910) angepasst, die die Verdrängung des Radioliganden durch einen für eine bestimmte Bindungsstelle spezifischen konkurrierenden Binder beschreibt. Anhand des Umfangs der Verdrängung des radioaktiv markierten Estradiols bei Gleichgewichtsbedingungen wird die Prüfchemikalie als Binder, Nicht-Binder oder nicht eindeutig eingestuft.

PRÜFVERFAHREN

Nachweis einer akzeptablen Leistungsfähigkeit bei Untersuchungen des hrER α -Proteins

9. Vor der regelmäßigen Durchführung der Assays zur Ermittlung von Sättigungsbindungen und konkurrierenden Bindungen ist jeweils mit einer neuen Charge des hrER α

nachzuweisen, dass in dem Labor, in dem der Rezeptor verwendet wird, korrekte Ergebnisse ermittelt werden. Die Leistungsfähigkeit sollte in zwei Schritten nachgewiesen werden:

- Durchführung des [^3H]-17 β -Estradiol-Bindungsassays zum Nachweis der Spezifität und der Sättigung für den hrER α ; anhand einer nicht linearen Regressionsanalyse der ermittelten Daten (z. B. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) und des anschließenden Scatchard-Diagramms sollten die Bindungsaffinität des [^3H]-17 β -Estradiols (K_d) für den hrER α und die Anzahl der Rezeptoren (B_{max}) der einzelnen hrER α -Chargen dokumentiert werden;
- Durchführung eines Assays zur Prüfung konkurrierender Bindungen mit Kontrollstoffen (Referenzöstrogen (17 β -Estradiol), einem schwachen Binder (z. B. Norethynodrel oder Norethindron) und einem Nicht-Binder (Octyltriethoxysilan, OTES). Jedes Labor sollte eine historische Datenbank zum Nachweis der Konsistenz der IC $_{50}$ -Werte und sonstiger relevanter Werte zwischen den einzelnen Versuchen sowie zwischen den einzelnen hrER α -Chargen bei Versuchen mit dem Referenzöstrogen und einem schwachen Binder aufbauen. Die Parameter der Kurven der konkurrierenden Bindungen bei den Kontrollstoffen sollten innerhalb des 95-%-Konfidenzintervalls liegen (siehe Tabelle 1), das anhand von Daten von an der Validierungsstudie zu diesem Assay beteiligten Labors festgelegt wurde (2).

Tabelle 1: Leistungskriterien für das Referenzöstrogen und den schwachen Binder, FW-hrER-Bindungsassay

Stoff	Parameter	Mittelwert ^a	Standard-abweichung (n)	95-%-Konfidenzintervalle ^b	
				Untere Grenze	Obere Grenze
17β-Estradiol	Höchstwert (%)	100,44	10,84 (67)	97,8	103,1
	Mindestwert (%)	0,29	1,25 (67)	-0,01	0,60
	Hillslope	-1,06	0,20 (67)	-1,11	-1,02
	Log IC ₅₀ (M)	-8,92 ^c	0,18 (67)	-8,97	-8,88
Norethynodrel	Höchstwert (%)	99,42	8,90 (68)	97,27	101,60
	Mindestwert (%)	2,02	3,42 (68)	1,19	2,84
	Hillslope	-1,01	0,38 (68)	-1,10	-0,92
	IC ₅₀ (M)	-6,39	0,27 (68)	-6,46	-6,33
Norethindron^c	Höchstwert (%)	96,14	8,44 (27)	92,80	99,48
	Mindestwert (%)	2,38	5,02 (27)	0,40	4,37
	Hillslope	-1,41	0,32 (27)	-1,53	-1,28
	Log IC ₅₀ (M)	-5,73	0,27 (27)	-5,84	-5,62

^a Der Mittelwert (n) $\pm$ Standardabweichung (SD) wurde anhand der Parameterschätzungen für die Kurvenanpassung (Hill-Gleichung mit 4 Parametern) für Prüfläufe in vier Labors im Rahmen der Validierungsstudie berechnet (siehe (2), Anlage N).

^b Die 95-%-Konfidenzintervalle dienen zur Orientierung für die Akzeptanzkriterien.

^c In der Validierung war die Prüfung von Norethindron optional für Unteraufgabe 4 vorgesehen (siehe (2), siehe Unteraufgabe 4). Die Mittelwerte $\pm$ SD (n) wurden also anhand der Schätzungen für die Kurvenanpassung (Hill-Gleichung mit 4 Parametern) für in zwei Labors durchgeführte Kontrollprüfungen berechnet.

Der Bereich für IC₅₀ hängt von der K_d der Rezeptorzubereitung und von der Konzentration des radioaktiv markierten Liganden in den einzelnen Labors ab. Eine geeignete Anpassung des Bereichs für IC₅₀ je nach den Bedingungen bei der Durchführung des Assays ist akzeptabel.

Nachweis der Eignung des Labors

10. Siehe Nummern 17 und 18 sowie Tabelle 2 im Abschnitt „ELEMENTE DES hrER-BINDUNGSASSAYS“ für diese Prüfmethode. Die Assays (zur Ermittlung von Sättigungsbindungen und konkurrierenden Bindungen) sollten jeweils drei unabhängige Prüfläufe (d. h. mit frischen Rezeptor-, Chemikalien- und Reagenzienverdünnungen) an unterschiedlichen Tagen jeweils mit drei Wiederholungen umfassen.

Ermittlung der Rezeptorkonzentration (hrER α)

11. Die Konzentration des aktiven Rezeptors ist je nach Charge und Lagerungsbedingungen leicht unterschiedlich. Daher sollte die Konzentration des vom Hersteller gelieferten aktiven Rezeptors bestimmt werden. Daraus ergibt sich die geeignete Konzentration des aktiven Rezeptors beim Prüflauf.
12. Unter den Bedingungen bei der konkurrierenden Bindung (d. h. 1 nM [³H]-Estradiol) werden Nennkonzentrationen von 0,25, 0,5, 0,75 und 1 nM Rezeptor einmal ohne (Gesamtbindung) und einmal mit (nicht spezifische Bindung) 1 μ M nicht markiertem

Estradiol inkubiert. Die spezifische Bindung wird berechnet als Differenz zwischen der Gesamtbindung und der nicht spezifischen Bindung bezogen auf die Rezeptor-Nennkonzentration in einem Diagramm dargestellt. Die Rezeptorkonzentration, bei der sich spezifische Bindungswerte entsprechend einem Anteil von 20 % des zugesetzten radioaktiven Liganden ergeben, wird auf die entsprechende Rezeptor-Nennkonzentration bezogen; diese Rezeptorkonzentration ist bei den Versuchen zur Ermittlung von Sättigungsbindungen und konkurrierenden Bindungen zu verwenden. Diese Anforderung wird häufig mit einer endgültigen hrER-Konzentration von 0,5 nM erfüllt.

13. Wenn das 20-%-Kriterium mehrfach nicht erfüllt werden kann, sollte der Versuchsaufbau auf mögliche Fehlerquellen geprüft werden. Dass das 20-%-Kriterium nicht erfüllt werden kann, deutet möglicherweise auch darauf hin, dass die rekombinante Charge den aktiven Rezeptor nur in einem sehr geringen Anteil enthält. In diesem Fall sollte die Verwendung einer anderen Rezeptor-Charge in Betracht gezogen werden.

Assay zur Ermittlung der Sättigungsbindung

14. Acht zunehmende [³H]-17β-Estradiol-Konzentrationen sollten jeweils dreifach unter den drei folgenden Bedingungen geprüft werden (siehe Tabelle 2):

- ohne nicht markiertes 17β-Estradiol und mit dem ER, um anhand einer Messung der Radioaktivität der Wells, die ausschließlich [³H]-17β-Estradiol enthalten, die Gesamtbindung zu ermitteln;
- bei einer 1000-mal höheren Konzentration des nicht markierten 17β-Estradiols im Vergleich zum markierten 17β-Estradiol und zu Prüfungen mit dem ER; dadurch sollen die aktiven Bindungsstellen mit nicht markiertem 17β-Estradiol gesättigt werden, um anhand einer Messung der Radioaktivität in den Wells die nicht spezifische Bindung zu bestimmen. Verbleibendes warmes Estradiol, das Bindungen mit dem Rezeptor eingehen kann, wird als Bindung an eine nicht spezifischen Bindungsstelle betrachtet, da das kalte Estradiol in einer derart hohen Konzentration vorliegen sollte, dass es an allen verfügbaren spezifischen Bindungsstellen des Rezeptors gebunden ist;
- ohne nicht markiertes 17β-Estradiol und ohne den ER (Ermittlung der Gesamt-Radioaktivität).

Zubereitung der Lösungen mit [³H]-17β-Estradiol und mit nicht markiertem 17β-Estradiol

15. Unter Zugabe eines Assay-Puffers zu einer 12-nM-Vorratslösung [³H]-17β-Estradiol wird [³H]-17β-Estradiol auf Konzentrationen von anfänglich 0,12 nM bis 12 nM verdünnt. Durch Zugabe von 40 µl dieser Lösungen in die jeweiligen Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte (mit einem Endvolumen von 160 µl) werden die endgültigen Assay-Konzentrationen von 0,03-3,0 nM hergestellt. Die Zubereitung des Assay-Puffers, der [³H]-17β-Estradiol-Vorratslösung und der Verdünnungen sowie die Bestimmung der Konzentrationen werden im FW-Protokoll eingehend beschrieben (2).

16. Die Ethanol-17 β -Estradiol-Lösungen sind unter Zugabe des Assay-Puffers so zu verdünnen, dass sich acht zunehmende Ausgangskonzentrationen von 0,06-6 μ M ergeben. Durch Zugabe von 80 μ l dieser Lösungen in die jeweiligen Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte (mit einem Endvolumen von 160 μ l) werden die endgültigen Assay-Konzentrationen von 0,03-3,0 μ M hergestellt. Die Endkonzentrationen des nicht markierten 17 β -Estradiols in den einzelnen Assays zur Ermittlung der nicht spezifischen Bindung sollten das 1000-Fache der markierten [^{3} H]-17 β -Estradiol-Konzentration betragen. Die Zubereitung der nicht markierten 17 β -Estradiol-Lösungen wird eingehend im FW-Protokoll beschrieben (2).
17. Für die Versuche ist die Nennkonzentration des Rezeptors zu verwenden, bei der sich eine spezifische Bindung von 20 ± 5 % ergibt (Nummern 12 und 13). Die hrER α -Lösung ist unmittelbar vor Gebrauch zuzubereiten.
18. Die 96-Well-Mikrotiterplatten werden mit 3 Wiederholungen pro Konzentration vorbereitet, wie in Tabelle 2 dargestellt. Anlage 2.2 enthält ein Beispiel für die Anordnung der Konzentrationen und der Volumina von [^{3} H]-17 β -Estradiol, nicht markiertem 17 β -Estradiol, des Puffers und des Rezeptors.

Tabelle 2: Anordnung auf der Mikrotiterplatte beim Assay zur Ermittlung der Sättigungsbindung

	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			Gesamt- bindung (Lösungs- mittel)
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			Nicht spezifische Bindung
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													
H													

[^{3} H] E₂: [^{3} H]-17 β -Estradiol

ER = Östrogenrezeptor.

E₂: nicht markiertes 17 β -Estradiol

19. Die für den Assay verwendeten Mikrotiterplatten werden 16-20 Stunden bei 2-8 °C auf einem Karussell inkubiert.

Messung des an den hrER α gebundenen [^3H]-17 β -Estradiols

20. Das an den hrER α gebundene [^3H]-17 β -Estradiol ist von dem nicht gebundenen [^3H]-17 β -Estradiol zu trennen. Dazu werden in jedes Well 80 μl kalte DCC-Suspension gegeben; anschließend werden die Mikrotiterplatten 10 Minuten geschüttelt und danach 10 Minuten mit etwa 2500 rpm zentrifugiert. Um bei diesem Prozess eine Dissoziation des gebundenen [^3H]-17 β -Estradiols vom hrER α zu minimieren, ist von entscheidender Bedeutung, dass bei den Puffer- und den Assay-Wells eine Temperatur von 2-8 $^{\circ}\text{C}$ aufrechterhalten wird und dass alle Schritte rasch durchgeführt werden. Für eine effiziente und rasche Behandlung der Platten wird eine Schüttelvorrichtung für Mikrotiterplatten benötigt.
21. 50 μl des Überstands des an den hrER α gebundenen [^3H]-17 β -Estradiols sind anschließend mit äußerster Sorgfalt zu entnehmen, damit Verunreinigungen der Wells durch Berührung mit der DCC-Lösung verhindert werden. Der Überstand wird auf eine zweite Mikrotiterplatte gegeben.
22. Danach werden in jedes Well (A1-B12 und D1-E12) 200 μl einer Szintillationsflüssigkeit gegeben, die die kinetische Energie radioaktiver Emissionen in Lichtenergie umwandeln kann. Die Wells G1-H12 (= DPM gesamt) enthalten serielle Verdünnungen des [^3H]-17 β -Estradiols (40 μl), die unmittelbar in die Szintillationsflüssigkeit in den Wells der Messplatte zu geben sind, wie in Tabelle 3 angegeben (d. h. die Wells enthalten jeweils nur 200 μl Szintillationsflüssigkeit und [^3H]-17 β -Estradiol in der jeweiligen Verdünnung). Anhand der Zerfallsereignisse pro Minute (DPM) wird so nachgewiesen, wie viel [^3H]-17 β -Estradiol jeweils in die Wells zur Ermittlung der Gesamtbindung und der nicht spezifischen Bindung gegeben wurde.

Tabelle 3: Anordnung auf der Mikrotiterplatte beim Assay zur Ermittlung der Sättigungsbindung, Messung der Radioaktivität

	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			Gesamtbindung (Lösungsmittel)
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			Nicht spezifische Bindung
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 + ER (DPM gesamt)			0,06 nM [³ H] E ₂ + ER			0,08 nM [³ H] E ₂ + ER			0,10 nM [³ H] E ₂ + ER			DPM gesamt*
H	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			

[³H] E₂: [³H]-17β-Estradiol

ER: Östrogenrezeptor.

E₂: nicht markiertes 17β-Estradiol

DPM: Zerfallsereignisse pro Minute

*Die warmen seriellen Verdünnungen des markierten [³H]-Estradiols werden unmittelbar in die 200 µl Szintillationsflüssigkeit in den Wells G1-H12 gegeben.

23. Die Messungen werden mit einer Verzögerung von mindestens zwei Stunden durchgeführt; die Zählung sollte 40 Minuten pro Well andauern. Zur Bestimmung der DPM-Werte pro Well ist ein Mikrotiterplatten-Szintillationszähler mit Querempfindlichkeitskorrektur zu verwenden. Wenn kein Szintillationszähler für Mikrotiterplatten verfügbar ist, können die Proben auch mit einem sonstigen Zähler gemessen werden. In diesem Fall kann die Dauer der Zählung reduziert werden.

Assay zur Ermittlung konkurrierender Bindungen

24. Mit dem Assay zur Ermittlung konkurrierender Bindungen wird die Bindung von [³H]-17β-Estradiol einer einzelnen Konzentration bei zunehmenden Konzentrationen einer Prüfchemikalie gemessen. Bei jedem Prüflauf sind für jede Konzentration drei gleichzeitige Replikate zu verwenden. Außerdem werden für jede zu prüfende Chemikalie drei nicht gleichzeitige Prüfläufe durchgeführt. Der Assay ist auf zwei oder mehr 96-Well-Mikrotiterplatten durchzuführen.

Kontrollen

25. Bei der Durchführung des Assays sind die Lösungsmittelkontrolle und die sonstigen Kontrollen (d. h. die Kontrollen mit dem Referenzöstrogen, dem schwachen Binder und dem Nicht-Binder) gleichzeitig zu prüfen. Bei jedem Prüflauf sollten auf jeweils einer Platte vollständige Konzentrationskurven des Referenzöstrogens und der Kontrollen (d. h. schwache Binder und Nicht-Binder) verwendet werden. Alle anderen Platten sollten Folgendes enthalten: (i) eine hohe Konzentration (maximale Verdrängung) und eine mittlere Konzentration (etwa IC₅₀) sowohl von E₂ als auch des schwachen Binders jeweils dreifach, (ii) eine Lösungsmittelkontrolle und einen nicht spezifischen Binder, ebenfalls jeweils mindestens dreifach. Die Verfahren für die Zubereitung des Assay-Puffers, der Kontrollen, des [³H]-17β-Estradiols, des hrERα und der Prüfchemikalienlösungen werden in (2) (Anlage K, siehe Protokoll zum FW-Assay) beschrieben.

Lösungsmittelkontrolle

26. Die Lösungsmittelkontrolle bestätigt, dass das Lösungsmittel nicht mit dem Prüfsystem reagiert und die Gesamtbindung (TB) misst. Bevorzugtes Lösungsmittel ist Ethanol. Wenn die höchste Konzentration der Prüfchemikalie in Ethanol nicht löslich ist, kann alternativ DMSO verwendet werden. Die Ethanol- bzw. ggf. die DMSO-Konzentration in den endgültigen Assay-Wells sollte bei 1,5 % liegen und darf höchstens 2 % betragen.

Pufferkontrolle

27. Die Pufferkontrolle (PK) darf weder Lösungsmittel noch die Prüfchemikalie, jedoch alle sonstigen im Assay verwendeten Elemente enthalten. Die Ergebnisse der Pufferkontrolle werden mit der Lösungsmittelkontrolle verglichen, um sicherzustellen, dass das verwendete Lösungsmittel das Assay-System nicht beeinträchtigt.

Starker Binder (Referenzöstrogen)

28. 17 β -Estradiol (CAS 50-28-2) bindet sich als endogener Ligand mit hoher Affinität an den ER Untertyp alpha. Für jeden hrER α -Assay zur Ermittlung konkurrierender Bindungen wird eine Standardkurve mit nicht markiertem 17 β -Estradiol erstellt, damit die Variabilität bei Durchführung des Assays in einem Labor im Zeitverlauf beurteilt werden kann. Aus nicht markiertem 17 β -Estradiol werden acht Lösungen in Ethanol hergestellt. Das Spektrum der Konzentrationen in den Assay-Wells reicht von 100 nM – 10 pM (-7[log M] bis -11[log M]) mit den folgenden Einzelkonzentrationen: (-7[log M], -8[log M], -8,5[log M], -9[log M], -9,5[log M], -10[log M], -11[log M]). Die höchste Konzentration des nicht markierten 17 β -Estradiols (1 μ M) dient auch als nicht spezifischer Bindungsindikator. In Tabelle 4 wird diese Konzentration als „NSB“ bezeichnet, obwohl sie Teil der Standardkurve ist.

Schwacher Binder

29. Um die Empfindlichkeit der einzelnen Versuche nachzuweisen und um die Variabilität bei der Durchführung des Assays im Laufe der Zeit beurteilen zu können, sollte ein schwacher Binder (Norethynodrel (CAS 68-23-5) oder Norethindron (CAS 68-22-4)) einbezogen werden. Aus dem schwachen Binder werden acht Lösungen in Ethanol hergestellt. Das Spektrum der Konzentrationen in den Assay-Wells reicht von 3 nM – 30 pM (-8,5[log M] bis -4,5[log M]) mit den folgenden Einzelkonzentrationen: -4,5[log M], -5[log M], -5,5[log M], -6[log M], -6,5[log M], -7[log M], -7,5[log M], -8,5[log M].

Nicht-Binder

30. Als Negativkontrolle (Nicht-Binder) wird Octyltriethoxysilan (OTES, CAS 2943-75-1) verwendet. Die Negativkontrolle gewährleistet, dass mit dem Assay unter den gegebenen Bedingungen erkannt wird, wenn Prüfchemikalien sich nicht an den hrER α binden. Aus dem Nicht-Binder werden acht Lösungen in Ethanol hergestellt. Das Spektrum der Konzentrationen in den Assay-Wells reicht von 0,1 nM – 1000 pM (-10[log M] bis -3[log M]) in logarithmischen Schritten. Als Nicht-Binder kann zur Kontrolle alternativ auch Di-*n*-butylphthalat (DBP) verwendet werden. Die maximale Löslichkeit wurde für -4[log M] ermittelt.

hrER α -Konzentration

31. Für die Versuche ist die Menge des Rezeptors zu verwenden, bei der sich eine spezifische Bindung von 20 ± 5 % bezogen auf 1 nM des Radioliganden ergibt (Nummern 12 und 13 in Anlage 2). Die hrER α -Lösung ist unmittelbar vor Gebrauch zuzubereiten.

[³H]-17β-Estradiol

32. In den Assay-Wells ist [³H]-17β-Estradiol in einer Konzentration von 1,0 nM zu verwenden.

Prüfchemikalien

33. Zunächst muss anhand einer Löslichkeitsprüfung die Löslichkeitsgrenze der einzelnen Prüfchemikalien ermittelt und ein geeigneter Konzentrationsbereich für die Durchführung des Prüfprotokolls bestimmt werden. Die Löslichkeitsgrenze der einzelnen Prüfchemikalien wird zunächst im Lösungsmittel bestimmt und anschließend unter den Bedingungen des Assays bestätigt. Mit dem Assay sind Endkonzentrationen höchstens bis zu 1 mM zu prüfen. Der Vorversuch zur Dosisfindung wird mit einer Lösungsmittelkontrolle und 8 logarithmischen seriellen Verdünnungen beginnend mit der maximal akzeptierbaren Konzentration (z. B. 1 mM oder weniger, je nach Löslichkeitsgrenze) durchgeführt; dabei ist das Auftreten einer Trübung oder eines Niederschlags zu protokollieren (Nummer 35). Die Prüfchemikalie wird anhand der Kurven für 8 im Vorversuch ermittelte logarithmische Konzentrationskurven untersucht. Die Konzentrationen im zweiten und im dritten Versuch sind ggf. so anzupassen, dass die Konzentrations-Reaktionskurve besser charakterisiert wird.
34. Verdünnungen der Prüfchemikalien werden mit dem jeweils geeigneten Lösungsmittel hergestellt (Nummer 26 in Anlage 2). Wenn die höchste Konzentration der Prüfchemikalie weder in Ethanol noch in DMSO löslich ist und die Zugabe von weiterem Lösungsmittel dazu führen würde, dass die Lösungsmittelkonzentration im letzten Röhrchen die Akzeptanzgrenze überschreiten würde, kann die nächstgeringere Konzentration als höchste Konzentration angenommen werden. In diesem Fall kann am unteren Ende der Konzentrationsreihe eine weitere Konzentration eingefügt werden. Die übrigen Konzentrationen der Reihe bleiben unverändert.
35. Die Lösungen mit der Prüfchemikalie werden beim Einbringen in die Assay-Wells sorgfältig beobachtet, da die Prüfchemikalien nach dem Einbringen in die Assay-Wells einen Niederschlag bilden können. Die Daten aller Wells mit einem Niederschlag werden bei der Kurvenanpassung nicht berücksichtigt. Der Grund für den Ausschluss der betreffenden Wells ist zu vermerken.
36. Wenn bereits Informationen aus anderen Quellen mit einem log (IC₅₀) für eine Prüfchemikalie verfügbar sind, können geometrische Verdünnungsstufen (in 0,5-log-Einheiten um den erwarteten log (IC₅₀)) angemessen sein. Am Ende sollte ein ausreichender Abstand der Konzentrationen auf beiden Seiten von log (IC₅₀) einschließlich der höchsten und der niedrigsten Konzentration erreicht sein, damit die Bindungskurve angemessen beschrieben werden kann.

Vorbereitung der Assay-Platte

37. Mit Etiketten versehene Mikrotiterplatten werden für sechs Inkubationen mit Codes für die Lösungsmittelkontrolle, die höchste Konzentration des Referenzöstrogens (die auch als

Indikator für die nicht spezifische Bindung (NSB) dient) und die Pufferkontrolle vorbereitet; außerdem werden für drei Inkubationen Etiketten mit Codes für jede einzelne der acht Konzentrationen der Nicht-Binder-Kontrolle (Octyltriethoxysilan) und für die 7 geringeren Konzentrationen des Referenzöstrogens, die 8 Konzentrationen des schwachen Binders und die 8 Konzentrationen der einzelnen Prüfchemikalien (TC) vorbereitet. Ein Beispiel für die Gestaltung des Plattendiagramms für die vollständigen Konzentrationskurven des Referenzöstrogens und der Kontrolle ist Tabelle 4 zu entnehmen. Für die Prüfchemikalien werden weitere Mikrotiterplatten verwendet; diese Platten sollten Plattenkontrollen, d. h. 1) eine hohe (maximale Verdrängung) und eine mittlere Konzentration (etwa die IC_{50} -Konzentration) von E2 sowie des schwachen Binders (dreifach) und 2) eine Lösungsmittelkontrolle und eine nicht spezifische Bindung (jeweils sechsfach) umfassen (Tabelle 5). Ein Beispiel für die Anordnung auf einer Mikrotiterplatte für einen Assay zur Untersuchung konkurrierender Bindungen mit drei unbekannten Prüfchemikalien ist Anlage 2.3 zu entnehmen. Die in den Tabellen 4 und 5 genannten Konzentrationen sind die Endkonzentrationen des Assays. Die maximale E2-Konzentration beträgt 1×10^{-7} M. Für den schwachen Binder ist die höchste Konzentration zu verwenden, auch für den schwachen Binder auf Platte 1 verwendet wurde. Die IC_{50} -Konzentration wird vom Labor anhand der Datenbank mit historischen Kontrollen des Labors bestimmt. Dieser Wert sollte sich in etwa mit dem in der Validierungsstudie ermittelten Wert decken (siehe Tabelle 1).

Tabelle 4: Anordnung der Mikrotiterplatte für einen Assay zur Untersuchung konkurrierender Bindungen, vollständige Konzentrationskurven für das Referenzöstrogen und die Kontrollen (Platte 1).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (nur Lösungsmittel)			TB (nur Lösungsmittel)			NSB			NSB		
B	E2 (1×10^{-7})			E2 (1×10^{-8})			E2 ($1 \times 10^{-8,5}$)			E2 (1×10^{-9})		
C	E2 ($1 \times 10^{-9,5}$)			E2 (1×10^{-10})			E2 (1×10^{-11})			Blindkontrolle*		
D	NE ($1 \times 10^{-4,5}$)			NE (1×10^{-5})			NE ($1 \times 10^{-5,5}$)			NE (1×10^{-6})		
E	NE ($1 \times 10^{-6,5}$)			NE (1×10^{-7})			NE ($1 \times 10^{-7,5}$)			NE ($1 \times 10^{-8,5}$)		
F	OTES (1×10^{-3})			OTES (1×10^{-4})			OTES (1×10^{-5})			OTES (1×10^{-6})		
G	OTES (1×10^{-7})			OTES (1×10^{-8})			OTES (1×10^{-9})			OTES (1×10^{-10})		
H	Blindkontrolle (für warme Wells)**			Blindkontrolle (für warme Wells)**			Pufferkontrolle			Pufferkontrolle		

Bei diesem Beispiel wird Norethinodrel (NE) als schwacher Binder verwendet.

* Leer, Well nicht verwendet.

** Blindkontrolle bei der Inkubation nicht verwendet; Verwendung aber zur Bestätigung der insgesamt zugesetzten Radioaktivität.

Tabelle 5: Anordnung der Mikrotiterplatte für einen Assay zur Untersuchung konkurrierender Bindungen, vollständige Konzentrationskurven für die Prüfchemikalien und die Plattenkontrollen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (nur Lösungsmittel)			TB (nur Lösungsmittel)			NSB			NSB		
B	TC1 (1×10^{-3})			TC1 (1×10^{-4})			TC1 (1×10^{-5})			TC1 (1×10^{-6})		
C	TC1 (1×10^{-7})			TC1 (1×10^{-8})			TC1 (1×10^{-9})			TC1 (1×10^{-10})		
D	TC2 (1×10^{-3})			TC2 (1×10^{-4})			TC2 (1×10^{-5})			TC2 (1×10^{-6})		
E	TC2 (1×10^{-7})			TC2 (1×10^{-8})			TC2 (1×10^{-9})			TC2 (1×10^{-10})		
F	TC3 (1×10^{-3})			TC3 (1×10^{-4})			TC3 (1×10^{-5})			TC3 (1×10^{-6})		
G	TC3 (1×10^{-7})			TC3 (1×10^{-8})			TC3 (1×10^{-9})			TC3 (1×10^{-10})		
H	NE (IC ₅₀)			NE ($1 \times 10^{-4,5}$)			E2 (IC ₅₀)			E2 (1×10^{-7})		

Bei diesem Beispiel wird Norethinodrel (NE) als schwacher Binder verwendet.

Abschluss des Assays zur Ermittlung konkurrierender Bindungen

38. Wie in Tabelle 6 dargestellt, werden 80 µl der Lösungsmittelkontrolle, der Pufferkontrolle, des Referenzöstrogens, des schwachen Binders, des Nicht-Binders und der im Assay-Puffer zubereiteten Prüfchemikalien in die Wells gegeben. Anschließend werden in jeden Well 40 µl einer Lösung mit 4 nM [³H]-17β-Estradiol gegeben. Nach sanftem Drehen über einen Zeitraum von 10-15 Minuten bei Temperaturen zwischen 2 und 8 °C werden 40 µl der hrERα-Lösung hinzugegeben. Die für den Assay verwendeten Mikrotiterplatten werden 16-20 Stunden bei 2-8 °C auf einem Karussell inkubiert.

Tabelle 6: Volumina der Elemente des hrER-Assays zur Ermittlung konkurrierender Bindungen auf den Mikrotiterplatten

Volumen (µl)	Element
80	Nicht markiertes 17β-Estradiol, Norethynodrel, OTES, Prüfchemikalien, Lösungsmittel oder Puffer
40	4 nM [³ H]-17β-Estradiol-Lösung
40	hrERα-Lösung, Konzentration wie ermittelt
160	Gesamtvolumen in den einzelnen Assay-Wells

39. Nach der Trennung des an den hrERα gebundenen [³H]-17β-Estradiols von dem freien [³H]-17β-Estradiol durch Zugabe von 80 µl kalter DCC-Suspension zu jedem einzelnen Well (wie in den Nummern 20-23 für den Assay zur Ermittlung der Sättigungsbindung beschrieben) wird die Bindung von [³H]-17β-Estradiol an den hrERα quantifiziert.
40. Die Wells H1-6 (in Tabelle 4 als Blindkontrollen (für warme Wells) gekennzeichnet) geben Aufschluss über die Zerfallsereignisse pro Minute (DPM) des markierten [³H]-Estradiols in einer Aliquote von 40 µl. Die Aliquote von 40 µl wird unmittelbar in die Szintillationsflüssigkeit in den Wells H1-H6 gegeben.

Akzeptanzkriterien

Assay zur Ermittlung der Sättigungsbindung

41. Die spezifische Bindungskurve sollte mit zunehmenden Konzentrationen des [^3H]-17 β -Estradiols (soweit verwendet) ein Plateau erreichen. Dieses Plateau zeigt, dass der hrER α mit dem Liganden gesättigt wurde.
42. Die spezifische Bindung bei 1 nM [^3H]-17 β -Estradiol sollte im akzeptablen Bereich von 15-25 % des Durchschnitts der insgesamt gemessenen Radioaktivität liegen, um die sich die Radioaktivität in allen Prüfläufen erhöht hat. Gelegentliche geringfügige Über- oder Unterschreitungen dieses Bereichs sind akzeptabel. Wenn Prüfläufe aber durchgängig außerhalb dieses Bereichs liegen bzw. ein bestimmter Prüflauf erheblich außerhalb dieses Bereichs liegt, sollte die Proteinkonzentration angepasst und der Assay zur Ermittlung der Sättigungsbindung wiederholt werden.
43. Aus den Daten sollte sich ein lineares Scatchard-Diagramm ergeben.
44. Die nicht spezifische Bindung sollte nicht überhöht sein. In der Regel sollte der Wert der nicht spezifischen Bindung weniger als 35 % der Gesamtbindung betragen. Diese Grenze kann jedoch in Einzelfällen überschritten werden, wenn bei der niedrigsten Konzentration des geprüften 17 β -Estradiols sehr wenige Zerfallsereignisse pro Minute gemessen werden.

Assay zur Ermittlung konkurrierender Bindungen

45. Zunehmende Konzentrationen nicht markierten 17 β -Estradiols sollten [^3H]-17 β -Estradiol aus dem Rezeptor verdrängen; die Verdrängung sollte im Einklang mit einer konkurrierenden Bindung an einer einzigen Bindungsstelle stehen.
46. Der IC₅₀-Wert des Referenzöstrogens (17 β -Estradiol) sollte in etwa mit der molaren Konzentration von [^3H]-17 β -Estradiol zuzüglich der im Assay zur Ermittlung der Sättigungsbindung berechneten Dissoziationskonstante (K_d) übereinstimmen.
47. Die spezifische Gesamtbindung sollte einheitlich im akzeptablen Bereich von 20 ± 5 % liegen, wenn die gemessene durchschnittliche Konzentration, um die sich die Radioaktivität in jedem einzelnen Well erhöht hat, im Verlauf der Prüfläufe bei 1 nM lag. Gelegentliche geringfügige Über- oder Unterschreitungen dieses Bereichs sind akzeptabel. Wenn Prüfläufe aber durchgängig außerhalb dieses Bereichs liegen bzw. ein bestimmter Prüflauf erheblich außerhalb dieses Bereichs liegt, sollte die Proteinkonzentration angepasst werden.
48. Das Lösungsmittel darf keinen Einfluss auf die Empfindlichkeit oder die Reproduzierbarkeit des Assays haben. Die Ergebnisse der Lösungsmittelkontrolle werden mit der Pufferkontrolle verglichen, um sicherzustellen, dass das verwendete Lösungsmittel das Assay-System nicht beeinträchtigt. Die Ergebnisse für die Gesamtbindung (TB) und die Pufferkontrolle sollten vergleichbar sein, wenn das Lösungsmittel den Assay nicht beeinflusst.

49. Bei Prüfungen mit bis zu 10^{-3} M (OTES) bzw. 10^{-4} M (DBP) darf der Nicht-Binder nicht mehr als 25 % des [^{3} H]-17 β -Estradiols vom hrER α verdrängen.
50. Aufgrund von Daten der Studie zur Validierung des FW-Bindungsassays mit hrER wurden Leistungskriterien für das Referenzöstrogen und zwei schwache Binder (z. B. Norethynodrel und Norethindron) entwickelt (Anhang N in (2)). Für den Mittelwert (n) $\pm$ SD aller Kontrolldurchläufe in den an der Validierungsstudie beteiligten Labors werden 95-%-Konfidenzintervalle angegeben. 95-%-Konfidenzintervalle wurden für die Parameter zur Kurvenanpassung (Höchstwert, Mindestwert, Hillslope und log IC₅₀) für das Referenzöstrogen und für schwache Binder sowie für log₁₀ RBA der schwachen Binder bezogen auf das Referenzöstrogen berechnet. Die Konfidenzintervalle werden als Leistungskriterien für die Positivkontrollen angegeben. Tabelle 1 enthält die erwarteten Spannen der Kurvenanpassungsparameter, die als Leistungskriterien verwendet werden können. In der Praxis kann die IC₅₀-Spanne je nach K_d der Rezeptorzubereitung und der Ligandenkonzentration leicht variieren.
51. In Anbetracht der großen Anzahl potenzieller Prüfchemikalien und der Unterschiede hinsichtlich der potenziellen Affinitäten und Ergebnisse (vollständige Kurve, Teilkurve, keine Kurvenanpassung usw.) wurden keine Leistungskriterien für die Kurvenanpassungsparameter der Prüfchemikalien entwickelt. Die Ergebnisse der einzelnen Prüfläufe sowie die Ergebnisse für die einzelnen Prüfchemikalien sind jedoch einer fachlich qualifizierten Beurteilung zu unterziehen. Um den Höchstwert der Kurve der konkurrierenden Bindungen (z. B. eine Bindungsquote von 90-100 %) eindeutig zu ermitteln, sollte ein ausreichendes Spektrum an Konzentrationen der Prüfchemikalie berücksichtigt werden. Die Variabilität zwischen Wiederholungen bei den einzelnen Konzentrationen der Prüfchemikalie sowie zwischen den drei nicht gleichzeitigen Prüfläufen sollte angemessen und wissenschaftlich vertretbar sein. Die Kontrollen der einzelnen Prüfläufe einer Prüfchemikalie sollten sich im Bereich der Messungen der für diesen FW-Assay angegebenen Leistungen bewegen und mit historischen Kontrolldaten der jeweiligen Labors übereinstimmen.

ANALYSE DER DATEN

Assay zur Ermittlung der Sättigungsbindung

52. Gemessen werden sowohl die Gesamtbindung als auch die nicht spezifische Bindung. Aufgrund dieser Werte wird die spezifische Bindung bei zunehmenden Konzentrationen von [^{3} H]-17 β -Estradiol unter Gleichgewichtsbedingungen ermittelt, indem die nicht spezifische Bindung von der Gesamtbindung abgezogen wird. In der grafischen Darstellung der spezifischen Bindung im Vergleich zur Konzentration von [^{3} H]-17 β -Estradiol sollte sich bei der maximalen spezifischen Konzentration ein Plateau als Bestätigung für die erfolgte Sättigung des hrER α mit [^{3} H]-17 β -Estradiol ergeben. Außerdem sollte in der Analyse der Daten die Bindung des [^{3} H]-17 β -Estradiols an eine einzelne Bindungsstelle mit hoher Affinität dokumentiert werden. Die nicht spezifische Bindung, die Gesamtbindung

und die spezifische Bindung sind auf einer Sättigungskurve darzustellen. Darüber hinaus sollte eine nicht lineare Regressionsanalyse (z. B. mit BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) vorgenommen werden. Die ermittelten Daten sind in einem endgültigen Scatchard-Diagramm darzustellen.

53. Bei der Analyse sind $B_{\max}$ und K_d ausschließlich anhand der Daten zur Gesamtbindung zu ermitteln. Dabei ist von einem linearen Verlauf der nicht spezifischen Bindung auszugehen. Eine anderweitige Vorgehensweise ist zu begründen. Ferner sollte eine robuste Regression zur Ermittlung der Best-Fit-Werte vorgenommen werden, sofern nicht eine Begründung für ein anderweitiges Vorgehen angegeben wird. Die gewählte Methode für die Durchführung der robusten Regression ist anzugeben. Bei der Ermittlung von $B_{\max}$ und K_d aufgrund von Daten zur Sättigungsbindung ist immer eine Korrektur aufgrund des Ligandenabbaus vorzunehmen (z. B. nach der Methode von Swillens 1995).

Assay zur Ermittlung konkurrierender Bindungen

54. Die Kurve zur Darstellung konkurrierender Bindungen wird als spezifische Bindung von [^3H]-17 β -Estradiol im Vergleich zur Konzentration ($\log_{10}$ -Stufen) des Bindungskonkurrenten dargestellt. Die Konzentration der Prüfchemikalie, die die maximale spezifische Bindung von [^3H]-17 β -Estradiol um 50 % hemmt, wird als IC_{50} -Wert bezeichnet.
55. Schätzungen der $\log(\text{IC}_{50})$ -Werte der positiven Kontrollen (z. B. Referenzöstrogen und ein schwacher Binder) sollten mit einer geeigneten Software zur nicht linearen Kurvenanpassung für eine Hill-Gleichung mit 4 Parametern (z. B. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) vorgenommen werden. Die Höchstwerte, die Mindestwerte, die Hillslope-Werte und die $\log(\text{IC}_{50})$ -Werte sollten bei der Anpassung dieser Kurven allgemein nicht beschränkt werden. Zur Ermittlung der Best-Fit-Werte sollte eine robuste Regression vorgenommen werden, sofern nicht eine Begründung für ein anderweitiges Vorgehen angegeben wird. Eine Korrektur aufgrund des Ligandenabbaus sollte nicht vorgenommen werden. Nach der Ausgangsanalyse sollte jede einzelne Bindungskurve nochmals geprüft werden, um eine angemessene Anpassung an das Modell sicherzustellen. Die relative Bindungsaffinität (RBA) des schwachen Binders sollte als Prozentanteil von $\log(\text{IC}_{50})$ für den schwachen Binder bezogen auf $\log(\text{IC}_{50})$ für 17 β -Estradiol berechnet werden. Die Ergebnisse der Positivkontrollen und der Nicht-Binder-Kontrolle sind anhand der Kriterien für die Leistungsfähigkeit des Assays (Nummern 45-50 in Anlage 2) zu bewerten.
56. Die Daten aller Prüfchemikalien werden schrittweise analysiert, um eine angemessene Vorgehensweise und eine korrekte Einstufung der einzelnen Kurven zum konkurrierenden Bindungsverhalten sicherzustellen. Für jeden Prüflauf einer Prüfchemikalie sollte zunächst eine standardisierte Datenanalyse nach dem Verfahren vorgenommen werden, das auch zur Analyse der Kontrollen mit dem Referenzöstrogen und dem schwachen Binder durchgeführt wird (Nummer 55). Nach dieser Analyse sollten die Parameter zur Kurvenanpassung fachlich geprüft werden; außerdem sollte geprüft werden, in welchem

Umfang die Daten mit der erzeugten Kurve der konkurrierenden Bindungen übereinstimmen. Bei dieser fachlichen Prüfung sind die Feststellung eines konzentrationsabhängigen Rückgangs der prozentualen spezifischen Bindung von [³H]-17β-Estradiol, eine geringe Variabilität der technischen Wiederholungen bei den einzelnen Chemikalienkonzentrationen und die Konsistenz der Anpassungsparameter bei den drei Prüfläufen gute Indikatoren für die ordnungsgemäße Durchführung des Assays und der Datenanalysen.

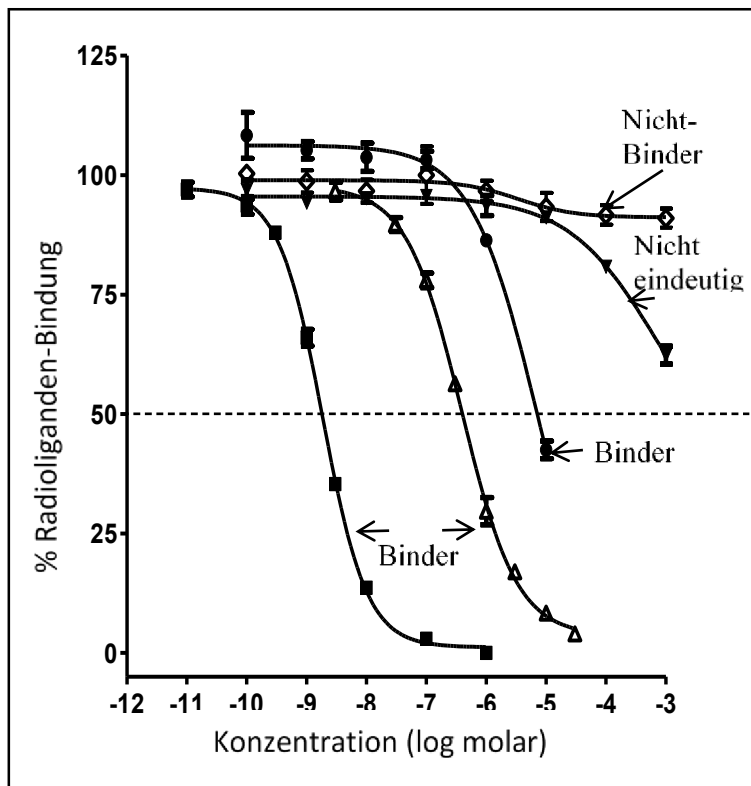
Datenauswertung

57. Sofern alle Akzeptanzkriterien erfüllt sind, wird eine Prüfchemikalie als Binder für den hrERα betrachtet, wenn eine Bindungskurve angepasst werden kann und der niedrigste Punkt auf der Reaktionskurve im Datenbereich weniger als 50 % beträgt (Abbildung 1).
58. Unter der Voraussetzung, dass alle Akzeptanzkriterien erfüllt sind, gilt eine Prüfchemikalie als Nicht-Binder für den hrERα, wenn die folgenden Bedingungen gegeben sind:
- Eine Bindungskurve kann angepasst werden, und der niedrigste Punkt auf der angepassten Reaktionskurve innerhalb des Datenbereichs liegt über 75 %, oder
 - es kann keine Anpassung der Bindungskurve vorgenommen werden, und der niedrigste nicht korrigierte Durchschnittswert der prozentualen Bindung der Konzentrationsgruppen im Datenbereich liegt über 75 %.
59. Prüfchemikalien werden als nicht eindeutig betrachtet, wenn keine der genannten Bedingungen erfüllt ist (z. B. wenn der niedrigste Punkt auf der angepassten Reaktionskurve zwischen 76 und 51 % liegt).

Tabelle 7: Kriterien für eine Einstufung nach der Kurve des konkurrierenden Bindungsverhaltens bei einer Prüfchemikalie

Einstufung	Kriterien
Binder ^a	Eine Bindungskurve kann angepasst werden. Der niedrigste Punkt auf der Reaktionskurve im Datenbereich liegt bei weniger als 50 %.
Nicht-Binder ^b	Wenn eine Bindungskurve angepasst werden kann: Der niedrigste Punkt auf der angepassten Reaktionskurve im Datenbereich liegt über 75 %. Wenn keine Bindungskurve angepasst werden kann: Der niedrigste nicht korrigierte Durchschnittswert der prozentualen Bindung der Konzentrationsgruppen im Datenbereich liegt über 75 %.
Nicht eindeutig ^c	Alle analysierbaren Prüfläufe, bei denen die Prüfchemikalie weder als Binder noch als Nicht-Binder eingestuft wird (beispielsweise wenn der niedrigste Punkt auf der angepassten Reaktionskurve zwischen 76 und 51 % liegt).

Abbildung 1: Beispiele für die Einstufung von Prüfchemikalien anhand der Kurve der konkurrierenden Bindungen



60. Mehrere in einem Labor mit einer Prüfchemikalie durchgeführte Prüfläufe werden unter Zuweisung von numerischen Werten zu den einzelnen Prüfläufen und unter Ermittlung des Durchschnitts der Prüfläufe durchgeführt (siehe Tabelle 8). Die Ergebnisse der kombinierten Prüfläufe in den einzelnen Labors werden mit der erwarteten Einstufung der einzelnen Prüfchemikalien verglichen.

Tabelle 8: Methode zur Einstufung von Prüfchemikalien aufgrund mehrerer Prüfläufe in einem Labor

Zuweisung eines Wertes zu den einzelnen Prüfläufen:	
Einstufung	Numerischer Wert
Binder	2
Nicht eindeutig	1
Nicht-Binder	0
Einstufung des durchschnittlichen numerischen Werts für mehrere Prüfläufe:	
Einstufung	Numerischer Wert
Binder	Durchschnitt $\geq 1,5$
Nicht eindeutig	$0,5 \leq \text{Durchschnitt} < 1,5$
Nicht-Binder	Durchschnitt $\geq 0,5$

PRÜFBERICHT

61. Siehe Nummer 24 im Abschnitt „**ELEMENTE DES hrER-BINDUNGSASSAYS**“ für diese Prüfmethode.

Anlage 2.1

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

[³H]E2: 17β-Estradiol mit Tritium radioaktiv markiert.

Assay-Puffer: 10 mM Tris, 10 mg Rinderserumalbumin/ml, 2 mM DTT, 10 % Glycerin, 0,2 mM Leupeptin, pH 7,5.

DCC: Dextranbeschichtete Aktivkohle.

E2: Nicht markiertes 17β-Estradiol (inert).

hrERα: Humaner rekombinanter Östrogenrezeptor alpha (Ligandenbindungs-Domäne).

Prüflauf: Eine vollständige Reihe gleichzeitig zu prüfender Mikrotiterplatten-Wells, denen alle Informationen zu entnehmen sind, die zur Charakterisierung der Bindung einer Prüfchemikalie an den hrERα benötigt werden (d. h. insgesamt zum Well hinzugegebenes [³H]-17β-Estradiol, maximale Bindung von [³H]-17β-Estradiol an den hrERα, nicht spezifische Bindung und Gesamtbindung bei verschiedenen Konzentrationen der Prüfchemikalie). Ein Prüflauf kann bereits aus einem einzigen Well (d. h. einer einzigen Wiederholung) pro Konzentration bestehen. Da nach diesem Protokoll jedoch eine dreifache Untersuchung vorzunehmen ist, umfasst ein Prüflauf drei Wells pro Konzentration. Außerdem sind nach diesem Protokoll drei unabhängige (d. h. nicht gleichzeitige) Prüfläufe pro Chemikalie vorzunehmen.

Wiederholung (Replikat): Eines von mehreren Wells mit denselben Inhalten in denselben Konzentrationen, die in einem einzelnen Prüflauf gleichzeitig untersucht werden. Bei diesem Protokoll wird jede Konzentration der Prüfchemikalie dreimal geprüft, d. h. je Konzentration der Prüfchemikalie werden drei Wiederholungen gleichzeitig untersucht.

Anlage 2.2

TYPISCHER ASSAY ZUR ERMITTLUNG DER SÄTTIGUNGSBINDUNG MIT [³H]-17B-ESTRADIOL MIT DREI REPLIKAT-WELLS

Typischer Assay zur Ermittlung der Sättigungsbindung mit [³ H]-17β-Estradiol mit drei Replikat-Wells											
Position	Replikat	Well-Typ-Code	Ausgangskonzentration warmes E2 (nM)	Volumen warmes E2 (µl)	Endkonzentration warmes E2 (nM)	Ausgangskonzentration kaltes E2 (nM)	Volumen kaltes E2 (µl)	Ausgangskonzentration kaltes E2 (nM)	Puffer-Volumen (µl)	Rezeptor-Volumen (µl)	Ausgangsvolumen in Wells
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

Typischer Assay zur Ermittlung der Sättigungsbindung mit [³ H]-17β-Estradiol mit drei Replikat-Wells											
Position	Replikat	Well-Typ-Code	Ausgangs- konzentration warmes E2 (nM)	Volumen warmes E2 (μl)	Endkonzentration warmes E2 (nM)	Ausgangs- konzentration kaltes E2 (μM)	Volumen kaltes E2 (μl)	Ausgangs- konzentration kaltes E2 (μM)	Puffer-Volumen (μl)	Rezeptor- Volumen (μl)	Ausgangs- volumen in Wells
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	Warm	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G2	2	Warm	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G3	3	Warm	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G4	1	Warm	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G5	2	Warm	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G6	3	Warm	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G7	1	Warm	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G8	2	Warm	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G9	3	Warm	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G10	1	Warm	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G11	2	Warm	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G12	3	Warm	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
H1	1	Warm	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H2	2	Warm	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H3	3	Warm	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H4	1	Warm	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H5	2	Warm	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H6	3	Warm	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H7	1	Warm	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H8	2	Warm	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H9	3	Warm	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H10	1	Warm	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H11	2	Warm	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H12	3	Warm	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40

Die „warmen“ Wells sind bei der Inkubation leer. Die 40 μl werden nur für die Szintillationszählung hinzugegeben.

**Anlage 2.3: Anordnung der Wells beim
Assay zur Ermittlung konkurrierender Bindungen**

Platte	Position	Replikat	Well-Typ	Well-Code	Konzentrations- code	Ausgangs- konzentration des Bindungs- konkurrenten (M)	hrER- Vorratslösung (µl)	Puffer-Volumen (µl)	Tracer-Volumen (warmes E2) (µl)	Volumen der Verdünnungs- platte (µl)	Endvolumen (µl)	Endkonzentration des Bindungs- konkurrenten (M)
S	A1	1	Gesamtbindung	TB	TB1	–	40		40	80	160	–
S	A2	2	Gesamtbindung	TB	TB2	–	40		40	80	160	–
S	A3	3	Gesamtbindung	TB	TB3	–	40		40	80	160	–
S	A4	1	Gesamtbindung	TB	TB4	–	40		40	80	160	–
S	A5	2	Gesamtbindung	TB	TB5	–	40		40	80	160	–
S	A6	3	Gesamtbindung	TB	TB6	–	40		40	80	160	–
S	A7	1	kaltes E2 (hoch)	NSB	S0	2,0E ⁻⁶	40	–	40	80	160	1,0E ⁻⁶
S	A8	2	kaltes E2 (hoch)	NSB	S0	2,0E ⁻⁶	40	–	40	80	160	1,0E ⁻⁶
S	A9	3	kaltes E2 (hoch)	NSB	S0	2,0E ⁻⁶	40	–	40	80	160	1,0E ⁻⁶
S	A10	1	kaltes E2 (hoch)	NSB	S0	2,0E ⁻⁶	40	–	40	80	160	1,0E ⁻⁶
S	A11	2	kaltes E2 (hoch)	NSB	S0	2,0E ⁻⁶	40	–	40	80	160	1,0E ⁻⁶
S	A12	3	kaltes E2 (hoch)	NSB	S0	2,0E ⁻⁶	40	–	40	80	160	1,0E ⁻⁶
S	B1	1	kaltes E2	S	S1	2,0E ⁻⁷	40	–	40	80	160	1,0E ⁻⁷
S	B2	2	kaltes E2	S	S1	2,0E ⁻⁷	40	–	40	80	160	1,0E ⁻⁷
S	B3	3	kaltes E2	S	S1	2,0E ⁻⁷	40	–	40	80	160	1,0E ⁻⁷
S	B4	1	kaltes E2	S	S2	2,0E ⁻⁸	40	–	40	80	160	1,0E ⁻⁸
S	B5	2	kaltes E2	S	S2	2,0E ⁻⁸	40	–	40	80	160	1,0E ⁻⁸
S	B6	3	kaltes E2	S	S2	2,0E ⁻⁸	40	–	40	80	160	1,0E ⁻⁸
S	B7	1	kaltes E2	S	S3	6,0E ⁻⁹	40	–	40	80	160	3,0E ⁻⁹
S	B8	2	kaltes E2	S	S3	6,0E ⁻⁹	40	–	40	80	160	3,0E ⁻⁹
S	B9	3	kaltes E2	S	S3	6,0E ⁻⁹	40	–	40	80	160	3,0E ⁻⁹
S	B10	1	kaltes E2	S	S4	2,0E ⁻⁹	40	–	40	80	160	1,0E ⁻⁹
S	B11	2	kaltes E2	S	S4	2,0E ⁻⁹	40	–	40	80	160	1,0E ⁻⁹
S	B12	3	kaltes E2	S	S4	2,0E ⁻⁹	40	–	40	80	160	1,0E ⁻⁹
S	C1	1	kaltes E2	S	S5	6,0E ⁻¹⁰	40	–	40	80	160	3,0E ⁻¹⁰
S	C2	2	kaltes E2	S	S5	6,0E ⁻¹⁰	40	–	40	80	160	3,0E ⁻¹⁰
S	C3	3	kaltes E2	S	S5	6,0E ⁻¹⁰	40	–	40	80	160	3,0E ⁻¹⁰
S	C4	1	kaltes E2	S	S6	2,0E ⁻¹⁰	40	–	40	80	160	1,0E ⁻¹⁰
S	C5	2	kaltes E2	S	S6	2,0E ⁻¹⁰	40	–	40	80	160	1,0E ⁻¹⁰
S	C6	3	kaltes E2	S	S6	2,0E ⁻¹⁰	40	–	40	80	160	1,0E ⁻¹⁰
S	C7	1	kaltes E2	S	S7	2,0E ⁻¹¹	40	–	40	80	160	1,0E ⁻¹¹
S	C8	2	kaltes E2	S	S7	2,0E ⁻¹¹	40	–	40	80	160	1,0E ⁻¹¹
S	C9	3	kaltes E2	S	S7	2,0E ⁻¹¹	40	–	40	80	160	1,0E ⁻¹¹
S	C10	1	Blindkontrolle	Blindkontrolle	B1	–	–	160	–	–	160	–
S	C11	2	Blindkontrolle	Blindkontrolle	B2	–	–	160	–	–	160	–
S	C12	3	Blindkontrolle	Blindkontrolle	B3	–	–	160	–	–	160	–
S	D1	1	Norethynodrel	NE	WP1	6,0E ⁻⁵	40	–	40	80	160	3,0E ⁻⁵
S	D2	1	Norethynodrel	NE	WP1	6,0E ⁻⁵	40	–	40	80	160	3,0E ⁻⁵
S	D3	1	Norethynodrel	NE	WP1	6,0E ⁻⁵	40	–	40	80	160	3,0E ⁻⁵
S	D4	1	Norethynodrel	NE	WP2	2,0E ⁻⁵	40	–	40	80	160	1,0E ⁻⁵
S	D5	1	Norethynodrel	NE	WP2	2,0E ⁻⁵	40	–	40	80	160	1,0E ⁻⁵
S	D6	1	Norethynodrel	NE	WP2	2,0E ⁻⁵	40	–	40	80	160	1,0E ⁻⁵
S	D7	1	Norethynodrel	NE	WP3	6,0E ⁻⁶	40	–	40	80	160	3,0E ⁻⁶
S	D8	1	Norethynodrel	NE	WP3	6,0E ⁻⁶	40	–	40	80	160	3,0E ⁻⁶
S	D9	1	Norethynodrel	NE	WP3	6,0E ⁻⁶	40	–	40	80	160	3,0E ⁻⁶
S	D10	1	Norethynodrel	NE	WP4	2,0E ⁻⁶	40	–	40	80	160	1,0E ⁻⁶
S	D11	1	Norethynodrel	NE	WP4	2,0E ⁻⁶	40	–	40	80	160	1,0E ⁻⁶
S	D12	1	Norethynodrel	NE	WP4	2,0E ⁻⁶	40	–	40	80	160	1,0E ⁻⁶

Anordnung der Wells beim Assay zur Ermittlung konkurrierender Bindungen												
Platte	Position	Replikat	Well-Typ	Well-Code	Konzentrations-code	Ausgangskonzentration des Bindungskurrenten (M)	hrER-Vorratslösung (µl)	Puffer-Vol. (µl)	Tracer-Volumen (warmes E2) (µl)	Volumen der Verdünnungsplatte (µl)	Endvolumen (µl)	Endkonzentration des Bindungskurrenten (M)
S	E1	1	Norethynodrel	NE	WP	6,0E ⁻⁷	40		40	80	160	3,0E ⁻⁷
S	E2	2	Norethynodrel	NE	WP	6,0E ⁻⁷	40		40	80	160	3,0E ⁻⁷
S	E3	3	Norethynodrel	NE	WP	6,0E ⁻⁷	40		40	80	160	3,0E ⁻⁷
S	E4	1	Norethynodrel	NE	WP	2,0E ⁻⁷	40		40	80	160	1,0E ⁻⁷
S	E5	2	Norethynodrel	NE	WP	2,0E ⁻⁷	40		40	80	160	1,0E ⁻⁷
S	E6	3	Norethynodrel	NE	WP	2,0E ⁻⁷	40		40	80	160	1,0E ⁻⁷
S	E7	1	Norethynodrel	NE	WP	6,0 E ⁻⁸	40	–	40	80	160	3,0E ⁻⁸
S	E8	2	Norethynodrel	NE	WP	6,0E ⁻⁸	40	–	40	80	160	3,0E ⁻⁸
S	E9	3	Norethynodrel	NE	WP	6,0E ⁻⁸	40	–	40	80	160	3,0E ⁻⁸
S	E10	1	Norethynodrel	NE	WP	6,0E ⁻⁹	40	–	40	80	160	3,0E ⁻⁹
S	E11	2	Norethynodrel	NE	WP	6,0E ⁻⁹	40	–	40	80	160	3,0E ⁻⁹
S	E12	3	Norethynodrel	NE	WP	6,0E ⁻⁹	40	–	40	80	160	3,0E ⁻⁹
S	F1	1	OTES	N	OTES	2,0E ⁻³	40	–	40	80	160	1,0E ⁻³
S	F2	2	OTES	N	OTES	2,0E ⁻³	40	–	40	80	160	1,0E ⁻³
S	F3	3	OTES	N	OTES	2,0E ⁻³	40	–	40	80	160	1,0E ⁻³
S	F4	1	OTES	N	OTES	2,0E ⁻⁴	40	–	40	80	160	1,0E ⁻⁴
S	F5	2	OTES	N	OTES	2,0E ⁻⁴	40	–	40	80	160	1,0E ⁻⁴
S	F6	3	OTES	N	OTES	2,0E ⁻⁴	40	–	40	80	160	1,0E ⁻⁴
S	F7	1	OTES	N	OTES	2,0E ⁻⁵	40	–	40	80	160	3,0E ⁻⁵
S	F8	2	OTES	N	OTES	2,0E ⁻⁵	40	–	40	80	160	3,0E ⁻⁵
S	F9	3	OTES	N	OTES	2,0E ⁻⁵	40	–	40	80	160	3,0E ⁻⁵
S	F10	1	OTES	N	OTES	2,0E ⁻⁶	40	–	40	80	160	1,0E ⁻⁶
S	F11	2	OTES	N	OTES	2,0E ⁻⁶	40	–	40	80	160	1,0E ⁻⁶
S	F12	3	OTES	N	OTES	2,0E ⁻⁶	40	–	40	80	160	1,0E ⁻⁶
S	G1	1	OTES	N	OTES	2,0E ⁻⁷	40	–	40	80	160	3,0E ⁻⁷
S	G2	2	OTES	N	OTES	2,0E ⁻⁷	40	–	40	80	160	3,0E ⁻⁷
S	G3	3	OTES	N	OTES	2,0E ⁻⁷	40	–	40	80	160	3,0E ⁻⁷
S	G4	1	OTES	N	OTES	2,0E ⁻⁸	40	–	40	80	160	1,0E ⁻⁸
S	G5	2	OTES	N	OTES	2,0E ⁻⁸	40	–	40	80	160	1,0E ⁻⁸
S	G6	3	OTES	N	OTES	2,0E ⁻⁸	40	–	40	80	160	1,0E ⁻⁸
S	G7	1	OTES	N	OTES	2,0E ⁻⁹	40	–	40	80	160	1,0E ⁻⁹
S	G8	2	OTES	N	OTES	2,0E ⁻⁹	40	–	40	80	160	1,0E ⁻⁹
S	G9	3	OTES	N	OTES	2,0E ⁻⁹	40	–	40	80	160	1,0E ⁻⁹
S	G10	1	OTES	N	OTES	2,0E ⁻¹⁰	40	–	40	–	160	1,0E ⁻¹⁰
S	G11	2	OTES	N	OTES	2,0E ⁻¹⁰	40	–	40	–	160	1,0E ⁻¹⁰
S	G12	3	OTES	N	OTES	2,0E ⁻¹⁰	40	–	40	–	160	1,0E ⁻¹⁰
S	H1	1	Warm	H	H	–	–	–	40	–	40	–
S	H2	1	Warm	H	H	–	–	–	40	–	40	–
S	H3	1	Warm	H	H	–	–	–	40	–	40	–
S	H4	1	Warm	H	H	–	–	–	40	–	40	–
S	H5	1	Warm	H	H	–	–	–	40	–	40	–
S	H6	1	Warm	H	H	–	–	–	40	–	40	–
S	H7	1	Pufferkontrolle	PK	PK	–	40	80	40	–	160	–
S	H8	1	Pufferkontrolle	PK	PK	–	40	80	40	–	160	–
S	H9	1	Pufferkontrolle	PK	PK	–	40	80	40	–	160	–
S	H10	1	Pufferkontrolle	PK	PK	–	40	80	40	–	160	–
S	H11	1	Pufferkontrolle	PK	PK	–	40	80	40	–	160	–
S	H12	1	Pufferkontrolle	PK	PK	–	40	80	40	–	160	–

Die „warmen“ Wells sind bei der Inkubation leer. Die 40 µl werden nur für die Szintillationszählung hinzugegeben.

Anordnung der Wells beim Assay zur Ermittlung konkurrierender Bindungen												
Platte	Position	Replikat	Well-Typ	Well-Code	Konzentrations-code	Ausgangskonzentration des Bindungskonkurrenten (M)	hrER-Vorratslösung (µl)	Puffer-Vol. (µl)	Tracer-Volumen (warmes E2) (µl)	Volumen der Verdünnungsplatte (µl)	Endvolumen (µl)	Endkonzentration des Bindungskonkurrenten (M)
P1	A1	1	Gesamtbindung	TB	TBB1B1	–	40	–	40	80	160	–
P1	A2	2	Gesamtbindung	TB	TB2	–	40	–	40	80	160	–
P1	A3	3	Gesamtbindung	TB	TB3	–	40	–	40	80	160	–
P1	A4	1	Gesamtbindung	TB	TB4	–	40	–	40	80	160	–
P1	A5	2	Gesamtbindung	TB	TB5	–	40	–	40	80	160	–
P1	A6	3	Gesamtbindung	TB	TB6	–	40	–	40	80	160	–
P1	A7	1	kaltes E2 (hoch)	NSB	S0	2,0E ⁻⁶	40	–	40	80	160	1,0E ⁻⁶
P1	A8	2	kaltes E2 (hoch)	NSB	S0	2,0E ⁻⁶	40	–	40	80	160	1,0E ⁻⁶
P1	A9	3	kaltes E2 (hoch)	NSB	S0	2,0E ⁻⁶	40	–	40	80	160	1,0E ⁻⁶
P1	A10	1	kaltes E2 (hoch)	NSB	S0	2,0E ⁻⁶	40	–	40	80	160	1,0E ⁻⁶
P1	A11	2	kaltes E2 (hoch)	NSB	S0	2,0E ⁻⁶	40	–	40	80	160	1,0E ⁻⁶
P1	A12	3	kaltes E2 (hoch)	NSB	S0	2,0E ⁻⁶	40	–	40	80	160	1,0E ⁻⁶
P1	B1	1	Prüfchemikalie 1	TC1	1	2,0E ⁻³	40	0	40	80	160	1,0E ⁻³
P1	B2	2	Prüfchemikalie 1	TC1	1	2,0E ⁻³	40	0	40	80	160	1,0E ⁻³
P1	B3	3	Prüfchemikalie 1	TC1	1	2,0E ⁻³	40	0	40	80	160	1,0E ⁻³
P1	B4	1	Prüfchemikalie 1	TC1	2	2,0E ⁻⁴	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁴
P1	B5	2	Prüfchemikalie 1	TC1	2	2,0E ⁻⁴	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁴
P1	B6	3	Prüfchemikalie 1	TC1	2	2,0E ⁻⁴	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁴
P1	B7	1	Prüfchemikalie 1	TC1	3	2,0E ⁻⁵	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁵
P1	B8	2	Prüfchemikalie 1	TC1	3	2,0E ⁻⁵	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁵
P1	B9	3	Prüfchemikalie 1	TC1	3	2,0E ⁻⁵	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁵
P1	B10	1	Prüfchemikalie 1	TC1	4	2,0E ⁻⁶	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁶
P1	B11	2	Prüfchemikalie 1	TC1	4	2,0E ⁻⁶	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁶
P1	B12	3	Prüfchemikalie 1	TC1	4	2,0E ⁻⁶	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁶
P1	C1	1	Prüfchemikalie 1	TC1	5	2,0E ⁻⁷	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁷
P1	C2	2	Prüfchemikalie 1	TC1	5	2,0E ⁻⁷	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁷
P1	C3	3	Prüfchemikalie 1	TC1	5	2,0E ⁻⁷	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁷
P1	C4	1	Prüfchemikalie 1	TC1	6	2,0E ⁻⁸	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁸
P1	C5	2	Prüfchemikalie 1	TC1	6	2,0E ⁻⁸	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁸
P1	C6	3	Prüfchemikalie 1	TC1	6	2,0E ⁻⁸	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁸
P1	C7	1	Prüfchemikalie 1	TC1	7	2,0E ⁻⁹	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁹
P1	C8	2	Prüfchemikalie 1	TC1	7	2,0E ⁻⁹	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁹
P1	C9	3	Prüfchemikalie 1	TC1	7	2,0E ⁻⁹	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁹
P1	C10	1	Prüfchemikalie 1	TC1	8	2,0E ⁻¹⁰	40	0	40	80	160	1,0E ⁻¹⁰
P1	C11	2	Prüfchemikalie 1	TC1	8	2,0E ⁻¹⁰	40	0	40	80	160	1,0E ⁻¹⁰
P1	C12	3	Prüfchemikalie 1	TC1	8	2,0E ⁻¹⁰	40	0	40	80	160	1,0E ⁻¹⁰
P1	D1	1	Prüfchemikalie 2	TC2	1	2,0E ⁻³	40	0	40	80	160	1,0E ⁻³
P1	D2	2	Prüfchemikalie 2	TC2	1	2,0E ⁻³	40	0	40	80	160	1,0E ⁻³
P1	D3	3	Prüfchemikalie 2	TC2	1	2,0E ⁻³	40	0	40	80	160	1,0E ⁻³
P1	D4	1	Prüfchemikalie 2	TC2	2	2,0E ⁻⁴	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁴
P1	D5	2	Prüfchemikalie 2	TC2	2	2,0E ⁻⁴	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁴
P1	D6	3	Prüfchemikalie 2	TC2	2	2,0E ⁻⁴	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁴
P1	D7	1	Prüfchemikalie 2	TC2	3	2,0E ⁻⁵	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁵
P1	D8	2	Prüfchemikalie 2	TC2	3	2,0E ⁻⁵	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁵
P1	D9	3	Prüfchemikalie 2	TC2	3	2,0E ⁻⁵	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁵
P1	D10	1	Prüfchemikalie 2	TC2	4	2,0E ⁻⁶	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁶
P1	D11	2	Prüfchemikalie 2	TC2	4	2,0E ⁻⁶	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁶
P1	D12	3	Prüfchemikalie 2	TC2	4	2,0E ⁻⁶	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁶
P1	E1	1	Prüfchemikalie 2	TC2	5	2,0E ⁻⁷	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁷
P1	E2	2	Prüfchemikalie 2	TC2	5	2,0E ⁻⁷	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁷
P1	E3	3	Prüfchemikalie 2	TC2	5	2,0E ⁻⁷	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁷

Anordnung der Wells beim Assay zur Ermittlung konkurrierender Bindungen												
Platte	Position	Replik	Well-Typ	Well-Code	Konzentrations-code	Ausgangskonzentration des Bindungskurrenten (M)	hrER-Vorratslösung (µl)	Puffer-Vol. (µl)	Tracer-Volumen (warmes E2) (µl)	Volumen der Verdünnungsplatte (µl)	Endvolumen (µl)	Endkonzentration des Bindungskurrenten (M)
P1	E4	1	Prüfchemikalie 2	TC2	6	–	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁸
P1	E5	2	Prüfchemikalie 2	TC2	6	–	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁸
P1	E6	3	Prüfchemikalie 2	TC2	6	–	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁸
P1	E7	1	Prüfchemikalie 2	TC2	7	2,0E ⁻⁶	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁹
P1	E8	2	Prüfchemikalie 2	TC2	7	2,0E ⁻⁶	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁹
P1	E9	3	Prüfchemikalie 2	TC2	7	2,0E ⁻⁶	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁹
P1	E10	1	Prüfchemikalie 2	TC2	8	2,0E ⁻⁶	40	0	40	80	160	1,0E ⁻¹⁰
P1	E11	2	Prüfchemikalie 2	TC2	8	2,0E ⁻⁶	40	0	40	80	160	1,0E ⁻¹⁰
P1	E12	3	Prüfchemikalie 2	TC2	8	2,0E ⁻⁶	40	0	40	80	160	1,0E ⁻¹⁰
P1	F1	1	Prüfchemikalie 3	TC3	1	2,0E ⁻³	40	0	40	80	160	1,0E ⁻³
P1	F2	2	Prüfchemikalie 3	TC3	1	2,0E ⁻³	40	0	40	80	160	1,0E ⁻³
P1	F3	3	Prüfchemikalie 3	TC3	1	2,0E ⁻³	40	0	40	80	160	1,0E ⁻³
P1	F4	1	Prüfchemikalie 3	TC3	2	2,0E ⁻⁴	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁴
P1	F5	2	Prüfchemikalie 3	TC3	2	2,0E ⁻⁴	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁴
P1	F6	3	Prüfchemikalie 3	TC3	2	2,0E ⁻⁴	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁴
P1	F7	1	Prüfchemikalie 3	TC3	3	2,0E ⁻⁵	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁵
P1	F8	2	Prüfchemikalie 3	TC3	3	2,0E ⁻⁵	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁵
P1	F9	3	Prüfchemikalie 3	TC3	3	2,0E ⁻⁵	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁵
P1	F10	1	Prüfchemikalie 3	TC3	4	2,0E ⁻⁶	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁶
P1	F11	2	Prüfchemikalie 3	TC3	4	2,0E ⁻⁶	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁶
P1	F12	3	Prüfchemikalie 3	TC3	4	2,0E ⁻⁶	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁶
P1	G1	1	Prüfchemikalie 3	TC3	5	2,0E ⁻⁷	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁷
P1	G2	2	Prüfchemikalie 3	TC3	5	2,0E ⁻⁷	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁷
P1	G3	3	Prüfchemikalie 3	TC3	5	2,0E ⁻⁷	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁷
P1	G4	1	Prüfchemikalie 3	TC3	6	2,0E ⁻⁸	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁸
P1	G5	2	Prüfchemikalie 3	TC3	6	2,0E ⁻⁸	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁸
P1	G6	3	Prüfchemikalie 3	TC3	6	2,0E ⁻⁸	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁸
P1	G7	1	Prüfchemikalie 3	TC3	7	2,0E ⁻⁹	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁹
P1	G8	2	Prüfchemikalie 3	TC3	7	2,0E ⁻⁹	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁹
P1	G9	3	Prüfchemikalie 3	TC3	7	2,0E ⁻⁹	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁹
P1	G10	1	Prüfchemikalie 3	TC3	8	2,0E ⁻¹⁰	40	0	40	80	160	1,0E ⁻¹⁰
P1	G11	2	Prüfchemikalie 3	TC3	8	2,0E ⁻¹⁰	40	0	40	80	160	1,0E ⁻¹⁰
P1	G12	3	Prüfchemikalie 3	TC3	8	2,0E ⁻¹⁰	40	0	40	80	160	1,0E ⁻¹⁰
P1	H1	1	Norethynodrel	NE		IC ₅₀	40	0	40	80	160	
P1	H2	2	Norethynodrel	NE		IC ₅₀	40	0	40	80	160	
P1	H3	3	Norethynodrel	NE		IC ₅₀	40	0	40	80	160	
P1	H4	1	Norethynodrel	NE		1,0E ^{-4,5}	40	0	40	80	160	
P1	H5	2	Norethynodrel	NE		1,0E ^{-4,5}	40	0	40	80	160	
P1	H6	3	Norethynodrel	NE		1,0E ^{-4,5}	40	0	40	80	160	
P1	H7	1	kaltes E2 S			IC ₅₀	40	0	40	80	160	
P1	H8	2	kaltes E2 S			IC ₅₀	40	0	40	80	160	
P1	H9	3	kaltes E2 S			IC ₅₀	40	0	40	80	160	
P1	H10	1	kaltes E2 S			1,0E ⁻⁷	40	0	40	80	160	
P1	H11	2	kaltes E2 S			1,0E ⁻⁷	40	0	40	80	160	
P1	H12	3	kaltes E2 S			1,0E ⁻⁷	40	0	40	80	160	

Anlage 3

DER *IN-VITRO*-ÖSTROGENREZEPTOR-BINDUNGSASSAY DES CHEMICAL EVALUATION AND RESEARCH INSTITUTE (CERI) MIT EINEM LIGANDENBINDUNGS-DOMÄNEN-PROTEIN DES HUMANEN REKOMBINANTEN ERA

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN UND BEGRENZUNGEN (SIEHE AUCH ALLGEMEINE EINLEITUNG)

1. Bei diesem *In-vitro*-Assay zur Ermittlung der Sättigung mit dem Östrogenrezeptor ER α und zur Ermittlung konkurrierender Bindungen wird eine Ligandenbindungs-Domäne (LBD) des humanen ER α (hrER α) verwendet. Dieses Proteinmodell wurde vom Chemicals Evaluation Research Institute (CERI), Japan, hergestellt und wird als GST-Fusionsprotein (GST = Glutathion-S-transferase) in *E. coli* exprimiert. Das CERI-Protokoll wurde einer internationalen Validierungsstudie durch mehrere Labors unterzogen (2). Dabei wurden die Relevanz und die Zuverlässigkeit des Protokolls für den vorgesehenen Zweck des Assays nachgewiesen.
2. Der Assay besteht in einem Prüfverfahren zur Ermittlung von Stoffen, die eine Bindung mit dem hrER α eingehen können. Mit dem Assay kann untersucht werden, ob eine Prüfchemikalie mit 17 β -Estradiol um Bindungen an die hrER α -LBD konkurrieren kann. Als quantitative Ergebnisse können mit dem Assay u. a. die Werte für IC₅₀ (als Maßstab für die zur Verdrängung der Hälfte des [³H]-17 β -Estradiols vom hrER α durch eine Prüfchemikalie) und die relative Affinität von Prüfchemikalien für Bindungen an den hrER α im Vergleich zu 17 β -Estradiol ermittelt werden. Mit Blick auf die Verwendung zur Prüfung von Chemikalien kann ein akzeptables qualitatives Ergebnis des Assays auch darin bestehen, dass Prüfchemikalien nach ihrer Bindung an den hrER α und nach den genannten Kriterien für die Bindungskurven als Binder, Nicht-Binder oder nicht eindeutig eingestuft werden.
3. Da bei diesem Assay ein radioaktiver Ligand verwendet wird, benötigen die Labors eine Genehmigung für die Verwendung von radioaktivem Material. Bei allen Verfahren unter Verwendung von Radioisotopen und von gefährlichen Chemikalien sind die nach den nationalen Rechtsvorschriften geltenden Bestimmungen und die dort vorgesehenen Verfahren einzuhalten.
4. Vor der Verwendung dieses Assays für rechtliche Zwecke sollten die Abschnitte „ALLGEMEINE EINLEITUNG“ und „ELEMENTE DES hrER-BINDUNGSASSAYS“ gelesen werden. Die in dieser Prüfrichtlinie verwendeten Begriffe und Abkürzungen werden in Anlage 1 erläutert.

PRINZIPIEN DES ASSAYS (SIEHE AUCH ALLGEMEINE EINLEITUNG)

5. Mit dem hrER α -Bindungsassay wird die Fähigkeit eines radioaktiv markierten Liganden ([³H]-17 β -Estradiol) gemessen, bei zunehmenden Konzentrationen einer Prüfchemikalie

(z. B. eines Bindungskonkurrenten) eine Bindung mit dem ER einzugehen. Prüfchemikalien mit einer starken ER-Affinität konkurrieren mit dem radioaktiv markierten Liganden bei einer niedrigeren Konzentration als Chemikalien mit einer geringeren Affinität für diesen Rezeptor.

6. Dieser Assay beinhaltet zwei wesentliche Elemente: einen Versuch zur Ermittlung von Sättigungsbindungen zur Charakterisierung der Parameter der Wechselwirkung zwischen Rezeptor und Ligand und einen anschließenden Versuch zur Ermittlung konkurrierender Bindungen, mit dem die Konkurrenz zwischen einer Prüfchemikalie und einem radioaktiv markierten Liganden im Hinblick auf die Bindung an den ER beschrieben wird.
7. Zur Vorbereitung der Prüfung konkurrierender Bindungen soll anhand einer Ermittlung der Sättigungsbindung eine bestimmte Rezeptorcharge hinsichtlich ihrer Bindungsaffinität geprüft und quantitativ bewertet werden. Mit der Prüfung konkurrierender Bindungen werden unter Gleichgewichtsbedingungen die Affinität einer bestimmten Konzentration des Östrogenrezeptors für seinen natürlichen Liganden (ausgedrückt durch die Dissoziationskonstante K_d) und die Konzentration der aktiven Rezeptor-Bindungsstellen (B_{max}) gemessen.
8. Ferner wird mit der Prüfung konkurrierender Bindungen die Affinität eines Stoffs für Bindungen an den ER im Hinblick auf die Konkurrenz mit [^{3}]17 β -Estradiol bewertet. Die Affinität wird anhand der Konzentration der Prüfchemikalie quantifiziert, die unter Gleichgewichtsbedingungen 50 % der spezifischen Bindung von [^{3}]17 β -Estradiol („Hemmkonzentration 50 %“ oder IC_{50}) hemmt. Diese Affinität kann auch anhand der relativen Bindungsaffinität (RBA, bezogen auf IC_{50} Estradiol, im selben Prüflauf getrennt gemessen) beurteilt werden. Bei der Prüfung konkurrierender Bindungen wird die Bindung von [^{3} H]-17 β -Estradiol in einer bestimmten Konzentration an zahlreiche (acht Größenordnungen) Konzentrationen einer Prüfchemikalie gemessen. Die ermittelten Daten werden dann möglichst entsprechend der Hill-Gleichung (Hill, 1910) angepasst, die die Verdrängung des Radioliganden durch einen für eine bestimmte Bindungsstelle spezifischen konkurrierenden Binder beschreibt. Anhand des Umfangs der Verdrängung des radioaktiv markierten Estradiols bei Gleichgewichtsbedingungen wird die Prüfchemikalie als Binder, Nicht-Binder oder nicht eindeutig eingestuft.

PRÜFVERFAHREN

Nachweis einer akzeptablen Leistungsfähigkeit bei Untersuchungen des hrER α -Proteins

9. Vor der regelmäßigen Durchführung der Assays zur Ermittlung von Sättigungsbindungen und konkurrierenden Bindungen ist jeweils mit einer neuen Charge des hrER α nachzuweisen, dass in dem Labor, in dem der Rezeptor verwendet wird, korrekte Ergebnisse ermittelt werden. Die Leistungsfähigkeit sollte in zwei Schritten nachgewiesen werden:
 - Durchführung des [^{3} H]-17 β -Estradiol-Bindungsassays zum Nachweis der Spezifität und der Sättigung für den hrER α ; anhand einer nicht linearen Regressionsanalyse der

ermittelten Daten (z. B. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) und des anschließenden Scatchard-Diagramms sollten die Bindungsaffinität des [^3H]-17 β -Estradiols (K_d) für den hrER α und die Anzahl der Rezeptoren (B_{max}) einer bestimmten hrER α -Charge dokumentiert werden;

- Durchführung eines Assays zur Prüfung konkurrierender Bindungen mit Kontrollstoffen (Referenzöstrogen (17 β -Estradiol), einem schwachen Binder (z. B. Norethynodrel oder Norethindron) und einem Nicht-Binder (Octyltriethoxysilan, OTES). Jedes Labor sollte eine historische Datenbank zum Nachweis der versuchs- und hrER α -Chargen-übergreifenden Konsistenz der IC50-Werte und der relevanten Werte aus den Versuchen mit dem Referenzöstrogen und einem schwachen Binder aufbauen. Außerdem sollten die Parameter der Kurven der konkurrierenden Bindungen bei den Kontrollstoffen innerhalb des 95-%-Konfidenzintervalls liegen (siehe Tabelle 1), das anhand von Daten von an der Validierungsstudie zu diesem Assay beteiligten Labors festgelegt wurde (2).

Tabelle 1: Leistungskriterien für das Referenzöstrogen und den schwachen Binder beim hrER-Bindungsassay des CERI

Stoff	Parameter	Mittelwert ^a	Standard-abweichung (en)	95-%-Konfidenzintervalle ^b	
				Obere Grenze	Untere Grenze
17β-Estradiol	Höchstwert	104,74	13,12 (70)	101,6	107,9
	Mindestwert	0,85	2,41 (70)	0,28	1,43
	Hillslope	-1,22	0,20 (70)	-1,27	-1,17
	log IC ₅₀	-8,93	0,23 (70)	-8,98	-8,87
Norethynodrel	Höchstwert	101,31	10,55 (68)	98,76	103,90
	Mindestwert	2,39	5,01 (68)	1,18	3,60
	Hillslope	-1,04	0,21 (68)	-1,09	-0,99
	log IC ₅₀	-6,19	0,40 (68)	-6,29	-6,10
Norethindron^c	Höchstwert	92,27	7,79 (23)	88,90	95,63
	Mindestwert	16,52	10,59 (23)	11,94	21,10
	Hillslope	-1,18	0,32 (23)	-1,31	-1,04
	log IC ₅₀	-6,01	0,54 (23)	-6,25	-5,78

^a Der Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (SD) bei der Probengröße n wurde anhand der Parameterschätzungen für die Kurvenanpassung (Hill-Gleichung mit 4 Parametern) für Prüfläufe in vier Labors im Rahmen der Validierungsstudie berechnet (siehe (2) Anlage N).

^b Das 95-%-Konfidenzintervall dient zur Orientierung für die Akzeptanzkriterien.

^c In der Validierung war die Prüfung von Norethindron optional für Unteraufgabe 4 vorgesehen (siehe (2), siehe Unteraufgabe 4). Die Mittelwerte $\pm$ SD (n) wurden also anhand der Schätzungen für die Kurvenanpassung (Hill-Gleichung mit 4 Parametern) für in zwei Labors durchgeführte Kontrollprüfungen berechnet.

Der Bereich für IC₅₀ hängt von der K_d der Rezeptorzubereitung und von der Konzentration des radioaktiv markierten Liganden in den einzelnen Labors ab. Eine geeignete Anpassung des Bereichs für IC₅₀ je nach den Bedingungen bei der Durchführung des Assays ist akzeptabel.

Nachweis der Eignung des Labors

10. Siehe Nummern 17 und 18 sowie Tabelle 2 im Abschnitt „**ELEMENTE DES hrER-BINDUNGSASSAYS**“ für diese Prüfmethode. Die Assays (zur Ermittlung von Sättigungsbindungen und konkurrierenden Bindungen) sollten jeweils drei unabhängige Prüfläufe (d. h. mit frischen Rezeptor-, Chemikalien- und Reagenzienverdünnungen) an unterschiedlichen Tagen jeweils mit drei Wiederholungen umfassen.

Ermittlung der Rezeptorkonzentration (hrER α)

11. Die Konzentration des aktiven Rezeptors ist je nach Charge und Lagerungsbedingungen leicht unterschiedlich. Daher sollte die Konzentration des vom Hersteller gelieferten aktiven Rezeptors bestimmt werden. Daraus ergibt sich die geeignete Konzentration des aktiven Rezeptors beim Prüflauf.
12. Unter den Bedingungen bei der konkurrierenden Bindung (d. h. 0,5 nM [³H]-Estradiol) werden Nennkonzentrationen von 0,1, 0,2, 0,4 und 0,6 nM Rezeptor einmal ohne (Gesamtbindung) und einmal mit (nicht spezifische Bindung) 1 μ M nicht markiertem Estradiol inkubiert. Die spezifische Bindung wird berechnet als Differenz zwischen der

Gesamtbindung und der nicht spezifischen Bindung bezogen auf die Rezeptor-Nennkonzentration in einem Diagramm dargestellt. Die Konzentration des Rezeptors, bei der sich spezifische Bindungswerte entsprechend einem Anteil von 40 % des zugesetzten radioaktiven Liganden ergeben, wird auf die entsprechende Rezeptor-Konzentration bezogen; diese Rezeptorkonzentration ist bei den Versuchen zur Ermittlung von Sättigungsbindungen und konkurrierenden Bindungen zu verwenden. Diese Anforderung wird häufig mit einer hrER-Endkonzentration von 0,2 nM erfüllt.

13. Wenn das 40-%-Kriterium mehrfach nicht erfüllt werden kann, sollte der Versuchsaufbau auf mögliche Fehlerquellen geprüft werden. Dass das 40-%-Kriterium nicht erfüllt werden kann, deutet möglicherweise auch darauf hin, dass die rekombinante Charge den aktiven Rezeptor nur in einem sehr geringen Anteil enthält. In diesem Fall sollte die Verwendung einer anderen Rezeptor-Charge in Betracht gezogen werden.

Assay zur Ermittlung der Sättigungsbindung

14. Acht zunehmende [^3H]-17 β -Estradiol-Konzentrationen sollten jeweils dreifach unter den drei folgenden Bedingungen geprüft werden (siehe Tabelle 2):
 - a. ohne nicht markiertes 17 β -Estradiol und mit dem ER, um anhand einer Messung der Radioaktivität der Wells, die ausschließlich [^3H]-17 β -Estradiol enthalten, die Gesamtbindung zu ermitteln;
 - b. bei einer 2000-mal höheren Konzentration des nicht markierten 17 β -Estradiols im Vergleich zum markierten 17 β -Estradiol und zu Prüfungen mit dem ER; dadurch sollen die aktiven Bindungsstellen mit nicht markiertem 17 β -Estradiol gesättigt werden, um anhand einer Messung der Radioaktivität in den Wells die nicht spezifische Bindung zu bestimmen. Verbleibendes warmes Estradiol, das Bindungen mit dem Rezeptor eingehen kann, wird als Bindung an eine nicht spezifischen Bindungsstelle betrachtet, da das kalte Estradiol in einer derart hohen Konzentration vorliegen sollte, dass es an allen verfügbaren spezifischen Bindungsstellen des Rezeptors gebunden ist;
 - c. ohne nicht markiertes 17 β -Estradiol und ohne den ER (Ermittlung der Gesamt-Radioaktivität).

Zubereitung der Lösungen mit [^3H]-17 β -Estradiol und mit nicht markiertem 17 β -Estradiol und dem hrER α

15. Aus einer Vorratslösung mit 1 μM [^3H]-17 β -Estradiol in DMSO wird unter Zugabe von DMSO (zur Herstellung von 200 nM) und des Assay-Puffers (zur Herstellung von 40 nM) bei Raumtemperatur eine Lösung mit einer molaren Masse von 40 nM [^3H]-17 β -Estradiol hergestellt. Mit dieser Lösung mit einer Konzentration von 40 nM werden mit dem Assay-Puffer bei Raumtemperatur serielle Verdünnungen von [^3H]-17 β -Estradiol im Bereich von 0,313 nM bis 40 nM hergestellt (siehe Zeile 12 in Tabelle 2). Um die endgültigen Assay-Konzentrationen von 0,0313-4,0 nM herzustellen, werden 10 μl dieser Lösungen in die Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte gegeben (siehe Tabellen 2 und 3). Die Zubereitung

des Assay-Puffers, die Berechnung der Ausgangskonzentration der [³H]-17β-Estradiol-Vorratslösung und der Verdünnungen sowie die Bestimmung der Konzentrationen werden im CERI-Protokoll eingehend beschrieben (2).

16. Die nicht markierten 17β-Estradiol-Lösungen werden aus einer 1-nM-17β-Estradiol-Vorratslösung unter Zugabe des Assay-Puffers so verdünnt, dass sich acht zunehmende Ausgangskonzentrationen von 0,625-80 μM ergeben. Um die endgültigen Assay-Konzentrationen von 0,0625-8 μM herzustellen, werden 10 μl dieser Lösungen in die Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte zur Messung nicht spezifischer Bindungen gegeben (siehe Tabellen 2 und 3). Die Zubereitung der nicht markierten 17β-Estradiol-Lösungen wird eingehend im CERI-Protokoll beschrieben (2).
17. Für die Versuche ist die Rezeptorkonzentration zu verwenden, bei der sich eine spezifische Bindung von 40 ± 10 % ergibt (Nummern 12 und 13). Die hrERα-Lösung wird mit eiskaltem Assay-Puffer unmittelbar vor der Verwendung hergestellt, d. h. nachdem alle Wells zur Ermittlung der Gesamtbindung, der nicht spezifischen Bindung und der warmen Liganden vorbereitet wurden.
18. Die 96-Well-Mikrotiterplatten werden mit 2-3 Wiederholungen pro Konzentration des [³H]-17β-Estradiols vorbereitet, wie in Tabelle 2 dargestellt. Die Anordnung der Volumina von [³H]-17β-Estradiol, nicht markiertem 17β-Estradiol, des Puffers und des Rezeptors ist Tabelle 3 zu entnehmen.

Tabelle 2: Anordnung auf der Mikrotiterplatte beim Assay zur Ermittlung der Sättigungsbindung

	1*	2*	3*	4*	5*	6*	7*	8*	9*	10	11**	12**
	Zur Messung der TB			Zur Messung der NSB			Zur Ermittlung nur des warmen Liganden				Nicht markierte E2-Verdünnungen für die Plattenreihen 4-6.	[³ H]E2-Verdünnungen für die Plattenreihen 1-9
A	0,0313 nM [³ H] E ₂ + ER			0,0313 nM [³ H] E ₂ + 0,0625 μM E ₂ + ER			0,0313 nM				0,625 μM	0,313 nM
B	0,0625 nM [³ H] E ₂ + ER			0,0625 nM [³ H] E ₂ + 0,125 μM E ₂ + ER			0,0625 nM				1,25 μM	0,625 nM
C	30,125 nM [³ H] E ₂ + ER			0,125 nM [³ H] E ₂ + 0,25 μM E ₂ + ER			0,125 nM				2,5 μM	1,25 nM
D	0,250 nM [³ H] E ₂ + ER			0,250 nM [³ H] E ₂ + 0,5 μM E ₂ + ER			0,250 nM				5 μM	2,5 nM
E	0,50 nM [³ H] E ₂ + ER			0,50 nM [³ H] E ₂ + 1 μM E ₂ + ER			0,50 nM				10 μM	5 nM

F	1,00 nM [³ H] E ₂ + ER	1,00 nM [³ H] E ₂ + 2 µM E ₂ + ER	1,00 nM		20 µM	10 nM
G	2,00 nM [³ H] E ₂ + ER	2,00 nM [³ H] E ₂ + 4 µM E ₂ + ER	2,00 nM		40 µM	20 nM
H	4,00 nM [³ H] E ₂ + ER	4,00 nM [³ H] E ₂ + 8 µM E ₂ + ER	4,00 nM		80 µM	40 nM

TB: Gesamtbindung

NSB: Nicht spezifische Bindung

[³H] E₂: [³H]-17β-Estradiol

E₂: nicht markiertes 17β-Estradiol

* Die hier angegebenen Konzentrationen sind die Endkonzentrationen in den einzelnen Wells.

** Die Verdünnungen von nicht markiertem E₂ und [³H]E₂ können auf einer anderen Platte hergestellt werden.

Tabelle 3: Volumina der Reagenzien auf der Mikrotiterplatte zur Ermittlung der Sättigungsbindung

Plattenreihe		1	2	3	4	5	6	7*	8*	9*
Vorbereitungsschritte		TB-Wells			NSB-Wells			Nur warme Liganden		
Volumen der Bestandteile für die genannten Reaktions-Wells und Reihenfolge der Zugabe des ...	... Puffers	60 µl			50 µl			90 µl		
	... nicht markierten E2 aus Reihe 11 in Tabelle 2	–			10 µl			–		
	...[³ H]E2 aus Reihe 12 in Tabelle 2	10 µl			10 µl			10 µl		
	... hrERα	30 µl			30 µl			–		
Gesamtreaktionsvolumen		100 µl			100 µl			100 µl		
Inkubation		REAKTION NACH 2-STÜNDIGER INKUBATION						Quantifizierung der Radioaktivität unmittelbar nach der Vorbereitung Keine Inkubation		
Behandlung mit 0,4 % DCC		Ja			Ja			Nein		
Volumen 0,4 % DCC		100 µl			100 µl			–		
Filtration		Ja			Ja			Nein		
MESSUNG DER DPM										
Quantifizierung des dem Szintillationscocktail zuzusetzenden Volumens		100 µl**			100 µl**			50 µl		

* Wenn zur Messung der DPM ein Flüssigszintillationszähler für Mikroplatten verwendet wird, ist eine Vorbereitung nur des warmen Liganden auf der Assay-Platte, auf der sich auch die Wells zur Bestimmung von TB und NSB befinden, nicht angemessen. Die Wells, die ausschließlich den warmen Liganden enthalten, sind auf einer anderen Platte vorzubereiten.

** Wenn die Trennung von der DCC durch Zentrifugieren erfolgt, sind die 50 µl Überstand durch Flüssigszintillationszählung zu messen, um Verunreinigungen der DCC zu vermeiden.

19. Assay-Mikrotiterplatten zur Ermittlung der Gesamtbindung und der nicht spezifischen Bindung werden zwei Stunden bei Raumtemperatur (22-28 °C) inkubiert.

Messung des an den hrER α gebundenen [^{3} H]-17 β -Estradiols

20. Nach der 2-stündigen Inkubationszeit wird das an den hrER α gebundene [^{3} H]-17 β -Estradiol unter Zugabe von 100 μ l einer eiskalten Suspension mit 0,4 % DCC zu den Wells vom freien [^{3} H]-17 β -Estradiol getrennt. Danach werden die Platten 10 Minuten auf Eis gelegt. Um das DCC zu entfernen, werden das Reaktionsgemisch und die DCC-Suspension durch Übertragung auf einen Mikrotiterplatten-Filter gefiltert. 100 μ l des Filtrats werden zur Szintillationsflüssigkeit in Flüssigszintillationsfläschchen hinzugegeben, um anhand von Flüssigkeitsszintillationszählungen den Abbau pro Minute (DPM) pro Fläschchen zu ermitteln.
21. Wenn kein Mikrotiterplatten-Filter verfügbar ist, kann das DCC auch durch Zentrifugieren entfernt werden. 50 μ l des Überstands des an den hrER α gebundenen [^{3} H]-17 β -Estradiols sind anschließend mit äußerster Sorgfalt zu entnehmen, damit Verunreinigungen der Wells durch Berührung mit der DCC-Lösung vermieden werden. Der Überstand wird zur Szintillationszählung verwendet.
22. Anhand der Wells, die ausschließlich den warmen Liganden enthalten, wird der Zerfall des zu den Assay-Wells hinzugegebenen [^{3} H]-17 β -Estradiols (DPM = Zerfallsereignisse pro Minute) bestimmt. Die Radioaktivität wird erst nach der Zubereitung ermittelt. Die betreffenden Wells werden nicht inkubiert und nicht mit der DCC-Suspension behandelt; ihr Inhalt wird direkt in die Szintillationsflüssigkeit gegeben. Anhand der Zerfallsereignisse pro Minute (DPM) wird so nachgewiesen, wieviel [^{3} H]-17 β -Estradiol jeweils in die Wells zur Ermittlung der Gesamtbindung und der nicht spezifischen Bindung gegeben wurde.

Assay zur Ermittlung konkurrierender Bindungen

23. Mit dem Assay zur Ermittlung konkurrierender Bindungen wird die Bindung von [^{3} H]-17 β -Estradiol einer einzelnen Konzentration bei zunehmenden Konzentrationen einer Prüfchemikalie gemessen. Bei jedem Prüflauf sind für jede Konzentration drei gleichzeitige Replikate zu verwenden. Außerdem werden für jede zu prüfende Chemikalie drei nicht gleichzeitige Prüfläufe durchgeführt. Der Assay ist auf zwei oder mehr 96-Well-Mikrotiterplatten durchzuführen.

Kontrollen

24. Bei der Durchführung des Assays sind die Lösungsmittelkontrolle und die sonstigen Kontrollen (d. h. die Kontrollen mit dem Referenzöstrogen, dem schwachen Binder und dem Nicht-Binder) gleichzeitig zu prüfen. Bei jedem Prüflauf sollten auf jeweils einer Platte vollständige Konzentrationskurven des Referenzöstrogens und der Kontrollen (d. h. schwache Binder und Nicht-Binder) verwendet werden. Alle anderen Platten sollten Folgendes enthalten: (i) eine hohe Konzentration (maximale Verdrängung, d. h. etwa die Konzentration, bei der der radioaktiv markierte Ligand vollständig verdrängt wird) und eine mittlere Konzentration (etwa IC₅₀) sowohl von E2 als auch des schwachen Binders jeweils

dreifach, (ii) eine Lösungsmittelkontrolle und einen nicht spezifischen Binder, ebenfalls jeweils dreifach. Die Verfahren für die Zubereitung des Assay-Puffers, des [³H]-17β-Estradiols, des hrERα und der Prüfchemikalienlösungen werden im CERI-Protokoll eingehend beschrieben (2).

Lösungsmittelkontrolle

25. Die Lösungsmittelkontrolle bestätigt, dass das Lösungsmittel nicht mit dem Prüfsystem reagiert und die Gesamtbindung (TB) misst. Bevorzugtes Lösungsmittel ist DMSO. Wenn die höchste Konzentration der Prüfchemikalie in DMSO nicht löslich ist, kann alternativ Ethanol verwendet werden. Die DMSO-Konzentration in den endgültigen Assay-Wells sollte 2,05 % betragen und kann auf bis zu 2,5 % erhöht werden, wenn sich die Prüfchemikalie nicht löst. DMSO-Konzentrationen über 2,5 % sollten nicht verwendet werden, da der Assay durch höhere Lösungsmittelkonzentrationen beeinträchtigt werden kann. Bei Prüfchemikalien, die in DMSO nicht löslich sind, sich aber in Ethanol lösen, kann der Assay ohne Beeinträchtigungen mit Höchstkonzentrationen von bis zu 2 % Ethanol durchgeführt werden.

Pufferkontrolle

26. Die Pufferkontrolle (PK) darf weder Lösungsmittel noch die Prüfchemikalie, jedoch alle sonstigen im Assay verwendeten Elemente enthalten. Die Ergebnisse der Pufferkontrolle werden mit der Lösungsmittelkontrolle verglichen, um sicherzustellen, dass das verwendete Lösungsmittel das Assay-System nicht beeinträchtigt.

Starker Binder (Referenzöstrogen)

27. 17β-Estradiol (CAS 50-28-2) bindet sich als endogener Ligand mit hoher Affinität an den ER Untertyp alpha. Für jeden hrERα-Assay zur Ermittlung konkurrierender Bindungen wird eine Standardkurve mit nicht markiertem 17β-Estradiol erstellt, damit die Variabilität bei Durchführung des Assays in einem Labor im Laufe der Zeit beurteilt werden kann. In DMSO und im Assay-Puffer werden acht Lösungen mit nicht markiertem 17β-Estradiol mit den folgenden Endkonzentrationen in den Assay-Wells für die Erstellung der Standardkurve hergestellt: 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸, 10^{-8,5}, 10⁻⁹, 10^{-9,5}, 10⁻¹⁰ und 10⁻¹¹ M. Die höchste Konzentration mit nicht markiertem 17β-Estradiol (1 μM) sollte als Indikator für nicht spezifische Bindungen verwendet werden. In Tabelle 4 wird diese Konzentration als „NSB“ bezeichnet, obwohl sie Teil der Standardkurve ist.

Schwacher Binder

28. Um die Empfindlichkeit der einzelnen Versuche nachzuweisen und um die Variabilität bei der Durchführung des Assays im Laufe der Zeit beurteilen zu können, sollte ein schwacher Binder (Norethynodrel (CAS68-23-5) oder Norethindron (CAS 68-22-4)) einbezogen werden. In DMSO und im Assay-Puffer werden acht Lösungen des schwachen Binders mit den folgenden Endkonzentrationen hergestellt: 10^{-4,5}, 10^{-5,5}, 10⁻⁶, 10^{-6,5}, 10⁻⁷, 10^{-7,5}, 10⁻⁸ und 10⁻⁹ M.

Nicht-Binder

29. Als Negativkontrolle (Nicht-Binder) wird Octyltriethoxysilan (OTES, CAS 2943-75-1) verwendet. Die Negativkontrolle gewährleistet, dass mit dem Assay unter den gegebenen Bedingungen erkannt wird, wenn Prüfchemikalien sich nicht an den hrER α binden. In DMSO und im Assay-Puffer werden acht Lösungen des Nicht-Binders mit den folgenden Endkonzentrationen hergestellt: 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} und 10^{-10} M. Als alternativer Nicht-Binder kann Di-n-butylphthalat (DBP, CAS 84-72-2) verwendet werden, das allerdings nur bei Konzentrationen bis zu höchstens 10^{-4} M zu prüfen ist. Die maximale Löslichkeit von DBP wurde im Assay bei einer Konzentration von 10^{-4} M festgestellt.

hrER α -Konzentration

30. Für die Versuche ist die Menge des Rezeptors zu verwenden, bei der sich eine spezifische Bindung von 40 ± 10 % ergibt (Nummern 12 und 13 in Anlage 3). Die hrER α -Lösung ist unmittelbar vor der Verwendung durch Verdünnung des funktionalen hrER α in eiskaltem Assay-Puffer herzustellen.

[^{3} H]-17 β -Estradiol

31. In den Assay-Wells ist [^{3} H]-17 β -Estradiol in einer Endkonzentration von 0,5 nM zu verwenden.

Prüfchemikalien

32. Zunächst muss anhand einer Löslichkeitsprüfung die Löslichkeitsgrenze der einzelnen Prüfchemikalien ermittelt und ein geeigneter Konzentrationsbereich für die Durchführung des Prüfprotokolls bestimmt werden. Die Löslichkeitsgrenze der einzelnen Prüfchemikalien wird zunächst im Lösungsmittel bestimmt und anschließend unter den Bedingungen des Assays bestätigt. Mit dem Assay sind Endkonzentrationen höchstens bis zu 1 mM zu prüfen. Der Vorversuch zur Dosisfindung wird mit einer Lösungsmittelkontrolle und mindestens 8 logarithmischen seriellen Verdünnungen beginnend mit der maximal akzeptierbaren Konzentration (z. B. 1 mM oder weniger, je nach Löslichkeitsgrenze) durchgeführt; dabei ist das Auftreten einer Trübung oder eines Niederschlags zu protokollieren (Nummer 35 in Anlage 3). Nachdem der Konzentrationsbereich für die Prüfungen ermittelt wurde, sollte eine Prüfchemikalie mit 8 im Vorversuch ermittelten logarithmischen Konzentrationen geprüft werden. Die im zweiten und im dritten Versuch geprüften Konzentrationen sind ggf. so anzupassen, dass die Konzentrations-Reaktionskurve ggf. besser charakterisiert wird.
33. Verdünnungen der Prüfchemikalien werden mit dem jeweils geeigneten Lösungsmittel hergestellt (Nummer 25 in Anlage 3). Wenn die höchste Konzentration der Prüfchemikalie weder in DMSO noch in Ethanol löslich ist und die Zugabe von weiterem Lösungsmittel dazu führen würde, dass die Lösungsmittelkonzentration im letzten Röhrchen die Akzeptanzgrenze überschreiten würde, kann die nächstgeringere Konzentration als höchste Konzentration angenommen werden. In diesem Fall kann am unteren Ende der Konzentrationsreihe eine weitere Konzentration eingefügt werden. Die übrigen Konzentrationen der Reihe bleiben unverändert.

34. Die Lösungen mit der Prüfchemikalie werden beim Einbringen in die Assay-Wells sorgfältig beobachtet, da die Prüfchemikalien nach dem Einbringen in die Assay-Wells einen Niederschlag bilden können. Die Daten aller Wells mit einem Niederschlag werden bei der Kurvenanpassung nicht berücksichtigt. Der Grund für den Ausschluss der betreffenden Wells ist zu vermerken.
35. Wenn bereits Informationen aus anderen Quellen mit einem log (IC₅₀) für eine Prüfchemikalie verfügbar sind, können geometrische Verdünnungsstufen enger um den erwarteten log (IC₅₀) (in 0,5 log-Einheiten) angemessen sein. Am Ende sollte ein ausreichender Abstand der Konzentrationen auf beiden Seiten von log (IC₅₀) einschließlich der höchsten und der niedrigsten Konzentration erreicht sein, damit die Bindungskurve angemessen beschrieben werden kann.

Vorbereitung der Assay-Platte

36. Mit Etiketten versehene Mikrotiterplatten werden für sechs Inkubationen für die Lösungsmittelkontrolle, die höchste Konzentration des Referenzöstrogens (E2) (die auch als Indikator für die nicht spezifische Bindung (NSB) dient), die Pufferkontrolle, die acht Konzentrationen der Nicht-Binder-Kontrolle (Octyltriethoxysilan), die 7 geringeren Konzentrationen des Referenzöstrogens (E2), die 8 Konzentrationen des schwachen Binders und die 8 Konzentrationen der einzelnen Prüfchemikalien (TC) vorbereitet. Ein Beispiel für die Gestaltung des Plattendiagramms für die vollständigen Konzentrationskurven des Referenzöstrogens und die Kontrollen ist Tabelle 4 zu entnehmen. Für die Prüfchemikalie werden weitere Mikrotiterplatten verwendet; diese Platten sollten Plattenkontrollen, d. h. (i) eine hohe (maximale Verdrängung) und eine mittlere Konzentration (etwa die IC₅₀-Konzentration) von E2 sowie des schwachen Binders (dreifach) und (ii) eine Lösungsmittelkontrolle (als Gesamtbindung) und eine nicht spezifische Bindung (jeweils sechsfach), umfassen (Tabelle 5). Ein Beispiel für die Anordnung auf einer Mikrotiterplatte für einen Assay zur Untersuchung konkurrierender Bindungen mit drei unbekannten Prüfchemikalien ist Anlage 3.3 zu entnehmen. Die auf dem Arbeitsblatt und in den Tabellen 4 und 5 genannten Konzentrationen sind die Endkonzentrationen in den jeweiligen Assay-Wells. Die maximale E2-Konzentration beträgt 1×10^{-7} M. Für den schwachen Binder ist die höchste Konzentration zu verwenden, die auch für den schwachen Binder auf Platte 1 verwendet wurde. Die IC₅₀-Konzentration wird vom Labor anhand der Datenbank mit historischen Kontrollen des Labors bestimmt. Dieser Wert sollte sich in etwa mit dem in der Validierungsstudie ermittelten Wert decken (siehe Tabelle 1).

Tabelle 4: Anordnung der Mikrotiterplatte für einen Assay zur Untersuchung konkurrierender Bindungen,^{1,2} vollständige Konzentrationskurven für das Referenzöstrogen und die Kontrollen (Platte 1).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Pufferkontrolle und Positivkontrolle (E2)			Schwach positiv (Norethynodrel)			Negativkontrolle (OTES)			TB und NSB		

A	Blindkontrolle*	1×10^{-9} M	1×10^{-10} M	TB (Lösungsmittelkontrolle) (2,05 % DMSO)
B	E2 (1×10^{-11} M)	1×10^{-8} M	1×10^{-9} M	
C	E2 (1×10^{-10} M)	$1 \times 10^{-7,5}$ M	1×10^{-8} M	NSB (10^{-6} M E2)
D	E2 ($1 \times 10^{-9,5}$ M)	1×10^{-7} M	1×10^{-7} M	
E	E2 (1×10^{-9} M)	$1 \times 10^{-6,5}$ M	1×10^{-6} M	Pufferkontrolle
F	E2 ($1 \times 10^{-8,5}$ M)	1×10^{-6} M	1×10^{-5} M	
G	E2 (1×10^{-8} M)	$1 \times 10^{-5,5}$ M	1×10^{-4} M	Blindkontrolle (für warme Wells)**
H	E2 (1×10^{-7} M)	$1 \times 10^{-4,5}$ M	1×10^{-3} M	

¹ Probe für die bei jedem Versuch mitzuführende Standard-Mikrotiterplatte.

² Diese Mikrotiterplatte wird mit den für die Standards in den vorstehenden Abschnitten beschriebenen Verdünnungen auf der Verdünnungsplatte vorbereitet.

Bei diesem Beispiel wird Norethinodrel (NE) als schwacher Binder verwendet.

* Leer, Well nicht verwendet.

** Blindkontrolle bei der Inkubation nicht verwendet; Verwendung aber zur Bestätigung der insgesamt zugesetzten Radioaktivität.

Tabelle 5: Anordnung der Mikrotiterplatte für einen Assay zur Untersuchung konkurrierender Bindungen, weitre Platten für Prüfchemikalien (TC) und Plattenkontrollen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Prüfchemikalie 1 (TC-1)			Prüfchemikalie 2 (TC-2)			Prüfchemikalie 3 (TC-3)			Kontrollen		
A	TC-1 (1×10 ⁻¹⁰ M)			TC-2 (1×10 ⁻¹⁰ M)			TC-3 (1×10 ⁻¹⁰ M)			E2 (1×10 ⁻⁷ M)		
B	TC-1 (1×10 ⁻⁹ M)			TC-2 (1×10 ⁻⁹ M)			TC-3 (1×10 ⁻⁹ M)			E ₂ (IC ₅₀)		
C	TC-1 (1×10 ⁻⁸ M)			TC-2 (1×10 ⁻⁸ M)			TC-3 (1×10 ⁻⁸ M)			NE (1×10 ^{-4,5})		
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 (Lösungsmittelkontrolle)		
H	TC-1 (1×10 ⁻³ M)			TC-2 (1×10 ⁻³ M)			TC-3 (1×10 ⁻³ M)					

Bei diesem Beispiel wird Norethinodrel (NE) als schwacher Binder verwendet.

Abschluss des Assays zur Ermittlung konkurrierender Bindungen

37. Mit Ausnahme der Wells zur Ermittlung der Gesamtbindung und zur Prüfung der Blindkontrollen (für warme Wells) (siehe Tabelle 6) sollten in jedes Well 50 µl des Assay-

Puffer:s gegeben und mit 10 µl der Lösungsmittelkontrolle, des Referenzöstrogens (E2), des schwachen Binders, des Nicht-Binders und der Prüfchemikalien bzw. mit 10 µl einer 5-nM-[³H]-17β-Estradiollösung gemischt werden. Anschließend werden 30 µl der eiskalten Rezeptorlösung zu den Platten gegeben und vorsichtig gemischt. Als letztes Reagens ist die hrERα-Lösung hinzuzugeben. Die Assay-Mikrotiterplatten sollten 2 Stunden bei Raumtemperatur (22-28 °C) inkubiert werden.

Tabelle 6: Volumina der Elemente des hrER-Assays zur Ermittlung konkurrierender Bindungen auf den Mikrotiterplatten

<i>Schritte zur Vorbereitung der Plattenreihen</i>		Wells mit Ausnahme der TB-Wells	TB-Wells	Blindkontrolle (für warme Wells)
Volumen der Bestandteile für die genannten Reaktions-Wells und Reihenfolge der Zugabe des ...	... Assay-Puffers bei Raumtemperatur	50 µl	60 µl	90 µl
	... nicht markierten E2, des schwachen Binders, des Nicht-Binders, des Lösungsmittels und der Prüfchemikalien*	10 µl	–	–
	... [³ H]-17β-Estradiols zur Herstellung einer Endkonzentration von 0,5 nM (d. h. 5 nM)	10 µl	10 µl	10 µl
	... der ermittelten hrERα-Konzentration (Nummern 12 und 13)	30 µl	30 µl	–
Gesamtvolumen in den einzelnen Assay-Wells		100 µl	100 µl	100 µl

* Ordnungsgemäß so zubereitet, dass sich eine Endkonzentration im Bereich der akzeptablen Lösungsmittelkonzentration ergibt.

38. Nach der Trennung des an den hrERα gebundenen [³H]-17β-Estradiols von dem freien [³H]-17β-Estradiol durch Zugabe von 100 µl kalter DCC-Suspension zu jedem einzelnen Well wie in den Nummern 21-23 in Anlage 3 für den Assay zur Ermittlung der Sättigungsbindung beschrieben, wird anschließend die Bindung von [³H]-17β-Estradiol an den hrERα quantifiziert.

39. Die Wells G10-12 und H10-12 (in Tabelle 4 als Blindkontrollen (für warme Wells) gekennzeichnet) geben Aufschluss über die Zerfallereignisse pro Minute (DPM) des markierten [³H]-Estradiols in einer Aliquote von 10 µl. Die Aliquote von 10 µl wird unmittelbar in die Szintillationsflüssigkeit gegeben.

Akzeptanzkriterien

Assay zur Ermittlung der Sättigungsbindung

40. Die spezifische Bindungskurve sollte mit zunehmenden Konzentrationen des [³H]-17β-Estradiols (soweit verwendet) ein Plateau erreichen. Dieses Plateau zeigt, dass der hrERα mit dem Liganden gesättigt wurde.

41. Die spezifische Bindung bei 0,5 nM [³H]-17β-Estradiol sollte im akzeptablen Bereich von 30-50 % des Durchschnitts der insgesamt gemessenen Radioaktivität liegen, um die sich die Radioaktivität in allen Prüfläufen erhöht hat. Gelegentliche geringfügige Über- oder Unterschreitungen dieses Bereichs sind akzeptabel. Wenn Prüfläufe aber durchgängig außerhalb dieses Bereichs liegen bzw. wenn ein bestimmter Prüflauf erheblich außerhalb dieses Bereichs liegt, sollte die Proteinkonzentration angepasst und der Assay zur Ermittlung der Sättigungsbindung wiederholt werden.
42. Aus den Daten sollte sich ein lineares Scatchard-Diagramm ergeben.
43. Die nicht spezifische Bindung sollte nicht überhöht sein. In der Regel sollte der Wert der nicht spezifischen Bindung weniger als 35 % der Gesamtbinding betragen. Diese Grenze kann jedoch in Einzelfällen überschritten werden, wenn bei der niedrigsten Konzentration des geprüften 17β-Estradiols sehr wenige Zerfallsereignisse pro Minute gemessen werden.

Assay zur Ermittlung konkurrierender Bindungen

44. Zunehmende Konzentrationen nicht markierten 17β-Estradiols sollten [³H]-17β-Estradiol aus dem Rezeptor verdrängen; die Verdrängung sollte im Einklang mit einer konkurrierenden Bindung an einer einzigen Bindungsstelle stehen.
45. Der IC₅₀-Wert des Referenzöstrogens (17β-Estradiol) sollte in etwa mit der molaren Konzentration von [³H]-17β-Estradiol zuzüglich der im Assay zur Ermittlung der Sättigungsbindung berechneten Dissoziationskonstante (K_d) übereinstimmen.
46. Die spezifische Gesamtbinding sollte einheitlich im akzeptablen Bereich von 40 ± 10 % liegen, wenn die gemessene durchschnittliche Konzentration, um die sich die Radioaktivität in jedem einzelnen Well erhöht hat, im Verlauf der Prüfläufe bei 0,5 nM lag. Gelegentliche geringfügige Über- oder Unterschreitungen dieses Bereichs sind akzeptabel. Wenn Prüfläufe aber durchgängig außerhalb dieses Bereichs liegen bzw. wenn ein bestimmter Prüflauf erheblich außerhalb dieses Bereichs liegt, sollte die Proteinkonzentration angepasst werden.
47. Das Lösungsmittel darf keinen Einfluss auf die Empfindlichkeit oder die Reproduzierbarkeit des Assays haben. Die Ergebnisse der Lösungsmittelkontrolle werden mit der Pufferkontrolle verglichen, um sicherzustellen, dass das verwendete Lösungsmittel das Assay-System nicht beeinträchtigt. Die Ergebnisse für die Gesamtbinding (TB) und die Pufferkontrolle sollten vergleichbar sein, wenn das Lösungsmittel den Assay nicht beeinflusst.
48. Bei Prüfungen mit bis zu 10⁻³ M (OTES) bzw. 10⁻⁴ M (DBP) darf der Nicht-Binder nicht mehr als 25 % des [³H]-17β-Estradiols vom hrERα verdrängen.
49. Aufgrund von Daten der Studie zur Validierung des CERi-Bindungsassays mit hrER wurden Leistungskriterien für das Referenzöstrogen und zwei schwache Binder (z. B. Norethynodrel und Norethindron) entwickelt (Anhang N in (2)). Für den Mittelwert ± SD (n) aller Kontrolldurchläufe in den vier an der Validierungsstudie beteiligten Labors werden 95-%-Konfidenzintervalle angegeben. 95-%-Konfidenzintervalle wurden für die Parameter

zur Kurvenanpassung (Höchstwert, Mindestwert, Hillslope und $\log IC_{50}$) für das Referenzöstrogen und für schwache Binder sowie für $\log_{10}$ RBA der schwachen Binder bezogen auf das Referenzöstrogen berechnet. Tabelle 1 enthält die erwarteten Spannen der Kurvenanpassungsparameter, die als Leistungskriterien verwendet werden können. In der Praxis kann die IC_{50} -Spanne je nach der im Versuch ermittelten K_d der Rezeptorzubereitung und der Ligandenkonzentration für den Assay leicht variieren.

50. In Anbetracht der großen Anzahl potenzieller Prüfchemikalien und der Unterschiede hinsichtlich der potenziellen Affinitäten und Ergebnisse (vollständige Kurve, Teilkurve, keine Kurvenanpassung usw.) wurden keine Leistungskriterien für die Kurvenanpassungsparameter der Prüfchemikalien entwickelt. Die Ergebnisse der einzelnen Prüfläufe sowie die Ergebnisse für die einzelnen Prüfchemikalien sind jedoch einer fachlich qualifizierten Beurteilung zu unterziehen. Um den Höchstwert der Kurve der konkurrierenden Bindungen (z. B. eine Bindungsquote von 90-100 %) eindeutig zu ermitteln, sollte ein ausreichendes Spektrum an Konzentrationen der Prüfchemikalie berücksichtigt werden. Die Variabilität zwischen Wiederholungen bei den einzelnen Konzentrationen der Prüfchemikalie sowie zwischen den drei nicht gleichzeitigen Prüfläufen sollte angemessen und wissenschaftlich vertretbar sein. Die Kontrollen der einzelnen Prüfläufe einer Prüfchemikalie sollten sich im Bereich der Messungen der für diesen CERi-Assay angegebenen Leistungen bewegen und mit historischen Kontrolldaten der jeweiligen Labors übereinstimmen.

ANALYSE DER DATEN

Assay zur Ermittlung der Sättigungsbindung

51. Gemessen werden sowohl die Gesamtbindung als auch die nicht spezifische Bindung. Aufgrund dieser Werte wird die spezifische Bindung bei zunehmenden Konzentrationen von $[^3H]$ -17 β -Estradiol unter Gleichgewichtsbedingungen ermittelt, indem die nicht spezifische Bindung von der Gesamtbindung abgezogen wird. In der grafischen Darstellung der spezifischen Bindung im Vergleich zur Konzentration von $[^3H]$ -17 β -Estradiol sollte sich bei der maximalen spezifischen Konzentration ein Plateau als Bestätigung für die erfolgte Sättigung des hrER α mit $[^3H]$ -17 β -Estradiol ergeben. Außerdem sollte in der Analyse der Daten die Bindung des $[^3H]$ -17 β -Estradiols an eine einzelne Bindungsstelle mit hoher Affinität dokumentiert werden. Die nicht spezifische Bindung, die Gesamtbindung und die spezifische Bindung sind auf einer Sättigungskurve darzustellen. Darüber hinaus sollte eine nicht lineare Regressionsanalyse (z. B. mit BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) vorgenommen werden. Die ermittelten Daten sind in einem endgültigen Scatchard-Diagramm darzustellen.
52. Bei der Analyse sind B_{max} und K_d ausschließlich anhand der Daten zur Gesamtbindung zu ermitteln. Dabei ist von einem linearen Verlauf der nicht spezifischen Bindung auszugehen. Ansonsten ist eine Begründung für eine anderweitige Vorgehensweise anzugeben. Ferner sollte eine robuste Regression zur Ermittlung der Best-Fit-Werte vorgenommen werden, sofern nicht eine Begründung für ein anderweitiges Vorgehen angegeben wird. Die

gewählte Methode für die Durchführung der robusten Regression ist anzugeben. Bei der Ermittlung von $B_{\max}$ und K_d aufgrund von Daten zur Sättigungsbindung ist immer eine Korrektur aufgrund des Ligandenabbaus vorzunehmen (z. B. nach der Methode von Swillens 1995).

Assay zur Ermittlung konkurrierender Bindungen

53. Die Kurve zur Darstellung konkurrierender Bindungen wird als spezifische Bindung von [^3H]-17 β -Estradiol im Vergleich zur Konzentration ($\log_{10}$ -Stufen) des Bindungskonkurrenten dargestellt. Die Konzentration der Prüfchemikalie, die die maximale spezifische Bindung von [^3H]-17 β -Estradiol um 50 % hemmt, wird als IC_{50} -Wert bezeichnet.
54. Schätzungen der $\log(\text{IC}_{50})$ -Werte der positiven Kontrollen (z. B. Referenzöstrogen und ein schwacher Binder) sollten mit einer geeigneten Software zur nicht linearen Kurvenanpassung für eine Hill-Gleichung mit 4 Parametern (z. B. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) vorgenommen werden. Die Höchstwerte, die Mindestwerte, die Hillslope-Werte und die $\log(\text{IC}_{50})$ -Werte sollten bei der Anpassung dieser Kurven allgemein nicht beschränkt werden. Zur Ermittlung der Best-Fit-Werte sollte eine robuste Regression vorgenommen werden, sofern nicht eine Begründung für ein anderweitiges Vorgehen angegeben wird. Eine Korrektur aufgrund des Ligandenabbaus sollte nicht vorgenommen werden. Nach der Ausgangsanalyse sollte jede einzelne Bindungskurve nochmals geprüft werden, um eine angemessene Anpassung an das Modell sicherzustellen. Die relative Bindungsaffinität (RBA) des schwachen Binders sollte als Prozentanteil von $\log(\text{IC}_{50})$ für den schwachen Binder bezogen auf $\log(\text{IC}_{50})$ für 17 β -Estradiol berechnet werden. Die Ergebnisse der Positivkontrollen und der Nicht-Binder-Kontrolle sind anhand der Kriterien für die Leistungsfähigkeit des Assays (Nummern 44-49 in Anlage 3) zu bewerten.
55. Die Daten aller Prüfchemikalien werden schrittweise analysiert, um eine angemessene Vorgehensweise und eine korrekte Einstufung der einzelnen Kurven zum konkurrierenden Bindungsverhalten sicherzustellen. Für jeden Prüflauf einer Prüfchemikalie sollte zunächst eine standardisierte Datenanalyse nach dem Verfahren vorgenommen werden, das auch zur Analyse der Kontrollen mit dem Referenzöstrogen und dem schwachen Binder durchgeführt wird (Nummer 54 in Anlage 3). Nach dieser Analyse sollten die Parameter zur Kurvenanpassung fachlich geprüft werden; außerdem sollte geprüft werden, in welchem Umfang die Daten mit der erzeugten Kurve der konkurrierenden Bindungen übereinstimmen. Bei dieser fachlichen Prüfung sind die Feststellung eines konzentrationsabhängigen Rückgangs der prozentualen spezifischen Bindung von [^3H]-17 β -Estradiol, eine geringe Variabilität der technischen Wiederholungen bei den einzelnen Prüfchemikalienkonzentrationen und die Konsistenz der Anpassungsparameter bei den drei Prüfläufen gute Indikatoren für die ordnungsgemäße Durchführung des Assays und der Datenanalysen.

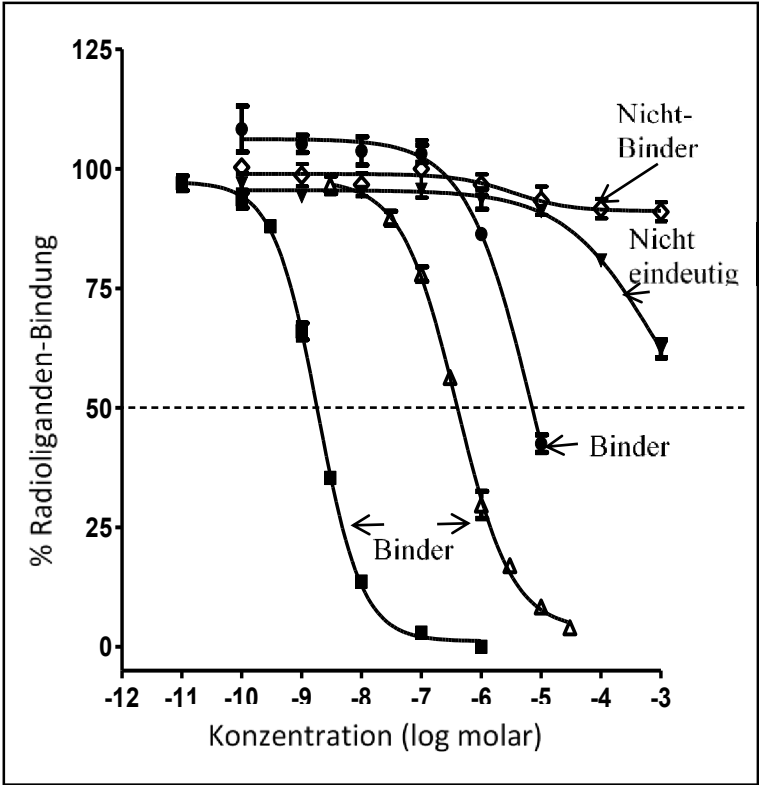
Datenauswertung

56. Sofern alle Akzeptanzkriterien erfüllt sind, wird eine Prüfchemikalie als Binder für den hrER α betrachtet, wenn eine Bindungskurve angepasst werden kann und der niedrigste Punkt auf der Reaktionskurve im Datenbereich bei weniger als 50 % liegt (Abbildung 1).
57. Unter der Voraussetzung, dass alle Akzeptanzkriterien erfüllt sind, gilt eine Prüfchemikalie als Nicht-Binder für den hrER α , wenn die folgenden Bedingungen gegeben sind:
- Eine Bindungskurve kann angepasst werden, und der niedrigste Punkt auf der angepassten Reaktionskurve innerhalb des Datenbereichs liegt über 75 %, oder
 - es kann keine Anpassung der Bindungskurve vorgenommen werden, und der niedrigste nicht korrigierte Durchschnittswert der prozentualen Bindung der Konzentrationsgruppen im Datenbereich liegt über 75 %.
58. Prüfchemikalien werden als nicht eindeutig betrachtet, wenn keine der genannten Bedingungen erfüllt ist (z. B. wenn der niedrigste Punkt auf der angepassten Reaktionskurve zwischen 76 und 51 % liegt).

Tabelle 7: Kriterien für eine Einstufung nach der Kurve des konkurrierenden Bindungsverhaltens bei einer Prüfchemikalie

Einstufung	Kriterien
Binder ^a	Eine Bindungskurve kann angepasst werden. • Der niedrigste Punkt auf der Reaktionskurve im Datenbereich liegt bei weniger als 50 %.
Nicht-Binder ^b	Wenn eine Bindungskurve angepasst werden kann: • Der niedrigste Punkt auf der angepassten Reaktionskurve im Datenbereich liegt über 75 %. Wenn keine Bindungskurve angepasst werden kann: • Der niedrigste nicht korrigierte Durchschnittswert der prozentualen Bindung der Konzentrationsgruppen im Datenbereich liegt über 75 %.
Nicht eindeutig ^c	Alle analysierbaren Prüfläufe, bei denen die Prüfchemikalie weder als Binder noch als Nicht-Binder eingestuft wird (beispielsweise wenn der niedrigste Punkt auf der angepassten Reaktionskurve zwischen 76 und 51 % liegt).

Abbildung 1: Beispiele für die Einstufung von Prüfchemikalien anhand der Kurve der konkurrierenden Bindungen



59. Mehrere in einem Labor mit einer Prüfchemikalie durchgeführte Prüfläufe werden unter Zuweisung von numerischen Werten zu den einzelnen Prüfläufen und unter Ermittlung des Durchschnitts der Prüfläufe durchgeführt (siehe Tabelle 8). Die Ergebnisse der kombinierten Prüfläufe in den einzelnen Labors werden mit der erwarteten Einstufung der einzelnen Prüfchemikalien verglichen.

Tabelle 8: Methode zur Einstufung von Prüfchemikalien aufgrund mehrerer Prüfläufe in einem Labor

Zuweisung eines Wertes zu einem Prüflauf:	
Einstufung	Numerischer Wert
Binder	2
Nicht eindeutig	1
Nicht-Binder	0
Einstufung des durchschnittlichen numerischen Werts für mehrere Prüfläufe:	
Einstufung	Numerischer Wert
Binder	Durchschnitt $\geq 1,5$
Nicht eindeutig	$0,5 \leq \text{Durchschnitt} < 1,5$
Nicht-Binder	Durchschnitt $\geq 0,5$

PRÜFBERICHT

60. Siehe Nummer 24 im Abschnitt „ELEMENTE DES hrER-BINDUNGSASSAYS“ für diese Prüfmethode.

Anlage 3.1

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

[³H]E₂: 17 β -Estradiol mit Tritium radioaktiv markiert.

Assay-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, mit 1 mM EDTA, 1mM EGTA, 1 mM NaVO₃, 10 % Glycerin, 0,2 mM Leupeptin, 1 mM Dithiothreitol und 10 mg/ml Rinderseriumalbumin.

DCC: Dextranbeschichtete Aktivkohle.

E₂: Nicht markiertes 17 β -Estradiol (inert).

hrER α : Humaner rekombinanter Östrogenrezeptor alpha (Ligandenbindungs-Domäne).

Prüflauf: Eine vollständige Reihe gleichzeitig zu prüfender Mikrotiterplatten-Wells, denen alle Informationen zu entnehmen sind, die zur Charakterisierung der Bindung einer Prüfchemikalie an den hrER α benötigt werden (d. h. insgesamt zum Well hinzugegebenes [³H]-17 β -Estradiol, maximale Bindung von [³H]-17 β -Estradiol an den hrER α , nicht spezifische Bindung und Gesamtbindung bei verschiedenen Konzentrationen der Prüfchemikalie). Ein Prüflauf kann bereits aus einem einzigen Well (d. h. einer einzigen Wiederholung) pro Konzentration bestehen. Da nach diesem Protokoll jedoch eine dreifache Untersuchung vorzunehmen ist, umfasst ein Prüflauf drei Wells pro Konzentration. Außerdem sind nach diesem Protokoll drei unabhängige (d. h. nicht gleichzeitige) Prüfläufe pro Chemikalie vorzunehmen.

Wiederholung (Replikat): Eines von mehreren Wells mit denselben Inhalten in denselben Konzentrationen, die in einem einzelnen Prüflauf gleichzeitig untersucht werden. Bei diesem Protokoll wird jede Konzentration der Prüfchemikalie dreimal geprüft, d. h. je Konzentration der Prüfchemikalie werden drei Wiederholungen gleichzeitig untersucht.

Anlage 3.2

ANORDNUNG DER WELLS BEIM ASSAY ZUR ERMITTLUNG KONKURRIERENDER BINDUNGEN

Platte	Position	Replikat	Well-Typ	Well-Code	Konzentrations-code	Ausgangskonzentration des Bindungskur- renten (M)	hrER-Vorrats- lösung (µl)	Puffer-Vol. (µl)	Tracer-Volumen (warmes E2) (µl)	Volumen der Verdünnungs- platte (µl)	Endvolumen (µl)	Endkonzen- tration des Bindungskon- kurrenten (M)
S	A1	1	Blindkontrolle	BK	BK1	—	—	—	—	—	—	—
S	A2	2	Blindkontrolle	BK	BK2	—	—	—	—	—	—	—
S	A3	3	Blindkontrolle	BK	BK3	—	—	—	—	—	—	—
S	B1	1	kaltes E2	S	S1	1,0E ⁻¹⁰	30	50	10	10	100	1,0E ⁻¹¹
S	B2	2	kaltes E2	S	S1	1,0E ⁻¹⁰	30	50	10	10	100	1,0E ⁻¹¹
S	B3	3	kaltes E2	S	S1	1,0E ⁻¹⁰	30	50	10	10	100	1,0E ⁻¹¹
S	C1	1	kaltes E2	S	S2	1,0E ⁻⁹	30	50	10	10	100	1,0E ⁻¹⁰
S	C2	2	kaltes E2	S	S2	1,0E ⁻⁹	30	50	10	10	100	1,0E ⁻¹⁰
S	C3	3	kaltes E2	S	S2	1,0E ⁻⁹	30	50	10	10	100	1,0E ⁻¹⁰
S	D1	1	kaltes E2	S	S3	3,16E ⁻⁹	30	50	10	10	100	3,2E ⁻¹⁰
S	D2	2	kaltes E2	S	S3	3,16E ⁻⁹	30	50	10	10	100	3,2E ⁻¹⁰
S	D3	3	kaltes E2	S	S3	3,16E ⁻⁹	30	50	10	10	100	3,2E ⁻¹⁰
S	E1	1	kaltes E2	S	S4	1,0E ⁻⁸	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁹
S	E2	2	kaltes E2	S	S4	1,0E ⁻⁸	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁹
S	E3	3	kaltes E2	S	S4	1,0E ⁻⁸	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁹
S	F1	1	kaltes E2	S	S5	3,16E ⁻⁸	30	50	10	10	100	3,2E ⁻⁹
S	F2	2	kaltes E2	S	S5	3,16E ⁻⁸	30	50	10	10	100	3,2E ⁻⁹
S	F3	3	kaltes E2	S	S5	3,16E ⁻⁸	30	50	10	10	100	3,2E ⁻⁹
S	G1	1	kaltes E2	S	S6	1,0E ⁻⁷	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁸
S	G2	2	kaltes E2	S	S6	1,0E ⁻⁷	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁸
S	G3	3	kaltes E2	S	S6	1,0E ⁻⁷	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁸
S	H1	1	kaltes E2	S	S7	1,0E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁷
S	H2	2	kaltes E2	S	S7	1,0E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁷
S	H3	3	kaltes E2	S	S7	1,0E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁷
S	A4	1	Norethynodrel	NE	WP1	1,0E ⁻⁸	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁹
S	A5	2	Norethynodrel	NE	WP1	1,0E ⁻⁸	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁹
S	A6	3	Norethynodrel	NE	WP1	1,0E ⁻⁸	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁹
S	B4	1	Norethynodrel	NE	WP2	1,0E ⁻⁷	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁸
S	B5	2	Norethynodrel	NE	WP2	1,0E ⁻⁷	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁸
S	B6	3	Norethynodrel	NE	WP2	1,0E ⁻⁷	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁸
S	C4	1	Norethynodrel	NE	WP3	3,16E ⁻⁷	30	50	10	10	100	3,2E ⁻⁸
S	C5	2	Norethynodrel	NE	WP3	3,16E ⁻⁷	30	50	10	10	100	3,2E ⁻⁸
S	C6	3	Norethynodrel	NE	WP3	3,16E ⁻⁷	30	50	10	10	100	3,2E ⁻⁸
S	D4	1	Norethynodrel	NE	WP4	1,0E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁷
S	D5	2	Norethynodrel	NE	WP4	1,0E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁷
S	D6	3	Norethynodrel	NE	WP4	1,0E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁷
S	E4	1	Norethynodrel	NE	WP5	3,16E ⁻⁶	30	50	10	10	100	3,2E ⁻⁷
S	E5	2	Norethynodrel	NE	WP5	3,16E ⁻⁶	30	50	10	10	100	3,2E ⁻⁷
S	E6	3	Norethynodrel	NE	WP5	3,16E ⁻⁶	30	50	10	10	100	3,2E ⁻⁷
S	F4	1	Norethynodrel	NE	WP6	1,0E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
S	F5	2	Norethynodrel	NE	WP6	1,0E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
S	F6	3	Norethynodrel	NE	WP6	1,0E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
S	G4	1	Norethynodrel	NE	WP7	3,16E ⁻⁵	30	50	10	10	100	3,2E ⁻⁶
S	G5	2	Norethynodrel	NE	WP7	3,16E ⁻⁵	30	50	10	10	100	3,2E ⁻⁶
S	G6	3	Norethynodrel	NE	WP7	3,16E ⁻⁵	30	50	10	10	100	3,2E ⁻⁶

Anordnung der Wells beim Assay zur Ermittlung konkurrierender Bindungen												
Platte	Position	Replikat	Well-Typ	Well-Code	Konzentrationsode	Ausgangskonzentration des Bindungskonkurrenten (M)	hrER-Vorratslösung (µl)	Puffer-Vol. (µl)	Tracer-Volumen (warmes E2) (µl)	Volumen der Verdünnungsplatte (µl)	Endvolumen (µl)	Endkonzentration des Bindungskonkurrenten (M)
S	H4	1	Norethynodrel	NE	WP8	$3,16E^{-4}$	30	50	10	10	100	$3,2E^{-5}$
S	H5	2	Norethynodrel	NE	WP8	$3,16E^{-4}$	30	50	10	10	100	$3,2E^{-5}$
S	H6	3	Norethynodrel	NE	WP8	$3,16E^{-4}$	30	50	10	10	100	$3,2E^{-5}$
S	A7	1	OTES	N	OTES1	$1,0E^{-9}$	30	50	10	10	100	$1,0E^{-10}$
S	A8	2	OTES	N	OTES1	$1,0E^{-9}$	30	50	10	10	100	$1,0E^{-10}$
S	A9	3	OTES	N	OTES1	$1,0E^{-9}$	30	50	10	10	100	$1,0E^{-10}$
S	B7	1	OTES	N	OTES2	$1,0E^{-8}$	30	50	10	10	100	$1,0E^{-9}$
S	B8	2	OTES	N	OTES2	$1,0E^{-8}$	30	50	10	10	100	$1,0E^{-9}$
S	B9	3	OTES	N	OTES2	$1,0E^{-8}$	30	50	10	10	100	$1,0E^{-9}$
S	C7	1	OTES	N	OTES3	$1,0E^{-7}$	30	50	10	10	100	$1,0E^{-8}$
S	C8	2	OTES	N	OTES3	$1,0E^{-7}$	30	50	10	10	100	$1,0E^{-8}$
S	C9	3	OTES	N	OTES3	$1,0E^{-7}$	30	50	10	10	100	$1,0E^{-8}$
S	D7	1	OTES	N	OTES4	$1,0E^{-6}$	30	50	10	10	100	$1,0E^{-7}$
S	D8	2	OTES	N	OTES4	$1,0E^{-6}$	30	50	10	10	100	$1,0E^{-7}$
S	D9	3	OTES	N	OTES4	$1,0E^{-6}$	30	50	10	10	100	$1,0E^{-7}$
S	E7	1	OTES	N	OTES5	$1,0E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1,0E^{-6}$
S	E8	2	OTES	N	OTES5	$1,0E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1,0E^{-6}$
S	E9	3	OTES	N	OTES5	$1,0E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1,0E^{-6}$
S	F7	1	OTES	N	OTES6	$1,0E^{-4}$	30	50	10	10	100	$1,0E^{-5}$
S	F8	2	OTES	N	OTES6	$1,0E^{-4}$	30	50	10	10	100	$1,0E^{-5}$
S	F9	3	OTES	N	OTES6	$1,0E^{-4}$	30	50	10	10	100	$1,0E^{-5}$
S	G7	1	OTES	N	OTES7	$1,0E^{-3}$	30	50	10	10	100	$1,0E^{-4}$
S	G8	2	OTES	N	OTES7	$1,0E^{-3}$	30	50	10	10	100	$1,0E^{-4}$
S	G9	3	OTES	N	OTES7	$1,0E^{-3}$	30	50	10	10	100	$1,0E^{-4}$
S	H7	1	OTES	N	OTES8DBP7	$1,0E^{-2}$	30	50	10	10	100	$1,0E^{-3}$
S	H8	2	OTES	N	OTES8	$1,0E^{-2}$	30	50	10	10	100	$1,0E^{-3}$
S	H9	3	OTES	N	OTES8	$1,0E^{-2}$	30	50	10	10	100	$1,0E^{-3}$
S	A10	1	Gesamtbindung	TB	TB1	–	30	60	10	–	100	–
S	A11	2	Gesamtbindung	TB	TB2	–	30	60	10	–	100	–
S	A12	3	Gesamtbindung	TB	TB3	–	30	60	10	–	100	–
S	B10	4	Gesamtbindung	TB	TB4	–	30	60	10	–	100	–
S	B11	5	Gesamtbindung	TB	TB5	–	30	60	10	–	100	–
S	B12	6	Gesamtbindung	TB	TB6	–	30	60	10	–	100	–
S	C10	1	kaltes E2 (hoch)	NSB	S1	$1,0E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1,0E^{-6}$
S	C11	2	kaltes E2 (hoch)	NSB	S2	$1,0E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1,0E^{-6}$
S	C12	3	kaltes E2 (hoch)	NSB	S3	$1,0E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1,0E^{-6}$
S	D10	4	kaltes E2 (hoch)	NSB	S4	$1,0E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1,0E^{-6}$
S	D11	5	kaltes E2 (hoch)	NSB	S5	$1,0E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1,0E^{-6}$
S	D12	6	kaltes E2 (hoch)	NSB	S6	$1,0E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1,0E^{-6}$
S	E10	1	Pufferkontrolle	PK	PK1	–	–	100	–	–	100	–
S	E11	2	Pufferkontrolle	PK	PK2	–	–	100	–	–	100	–
S	E12	3	Pufferkontrolle	PK	PK3	–	–	100	–	–	100	–
S	F10	4	Pufferkontrolle	PK	PK4	–	–	100	–	–	100	–
S	F11	5	Pufferkontrolle	PK	PK5	–	–	100	–	–	100	–
S	F12	6	Pufferkontrolle	PK	PK6	–	–	100	–	–	100	–
S	G10*	1	Blindkontrolle (für	Warm	H1	–	90	–	10	–	100	–
S	G11*	2	Blindkontrolle (für	Warm	H2	–	90	–	10	–	100	–
S	G12*	3	Blindkontrolle (für	Warm	H3	–	90	–	10	–	100	–
S	H10*	4	Blindkontrolle (für	Warm	H4	–	90	–	10	–	100	–
S	H11*	5	Blindkontrolle (für	Warm	H5	–	90	–	10	–	100	–
S	H12	6	Blindkontrolle (für	Warm	H6	–	90	–	10	–	100	–

*: Die „warmen“ Wells sind bei der Inkubation leer. Die 10 µl werden nur für die Szintillationszählung hinzugegeben.

Anordnung der Wells beim Assay zur Ermittlung konkurrierender Bindungen												
Platte	Position	Replikat	Well-Typ	Well-Code	Konzentrations-code	Ausgangskonzentration des Bindungskurrenten (M)	hrER-Vorratslösung (µl)	Puffer-Vol. (µl)	Tracer-Volumen (warmes E2) (µl)	Volumen der Verdünnungsplatte (µl)	Endvolumen (µl)	Endkonzentration des Bindungskurrenten (M)
P1	A1	1	Unbekannt 1	U1	1	1,0E ⁻⁹	30	50	10	10	100	1,0E ⁻¹⁰
P1	A2	2	Unbekannt 1	U1	1	1,0E ⁻⁹	30	50	10	10	100	1,0E ⁻¹⁰
P1	A3	3	Unbekannt 1	U1	1	1,0E ⁻⁹	30	50	10	10	100	1,0E ⁻¹⁰
P1	B1	1	Unbekannt 1	U1	2	1,0E ⁻⁸	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁹
P1	B2	2	Unbekannt 1	U1	2	1,0E ⁻⁸	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁹
P1	B3	3	Unbekannt 1	U1	2	1,0E ⁻⁸	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁹
P1	C1	1	Unbekannt 1	U1	3	1,0E ⁻⁷	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁸
P1	C2	2	Unbekannt 1	U1	3	1,0E ⁻⁷	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁸
P1	C3	3	Unbekannt 1	U1	3	1,0E ⁻⁷	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁸
P1	D1	1	Unbekannt 1	U1	4	1,0E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁷
P1	D2	2	Unbekannt 1	U1	4	1,0E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁷
P1	D3	3	Unbekannt 1	U1	4	1,0E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁷
P1	E1	1	Unbekannt 1	U1	5	1,0E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
P1	E2	2	Unbekannt 1	U1	5	1,0E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
P1	E3	3	Unbekannt 1	U1	5	1,0E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
P1	F1	1	Unbekannt 1	U1	6	1,0E ⁻⁴	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁵
P1	F2	2	Unbekannt 1	U1	6	1,0E ⁻⁴	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁵
P1	F3	3	Unbekannt 1	U1	6	1,0E ⁻⁴	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁵
P1	G1	1	Unbekannt 1	U1	7	1,0E ⁻³	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁴
P1	G2	2	Unbekannt 1	U1	7	1,0E ⁻³	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁴
P1	G3	3	Unbekannt 1	U1	7	1,0E ⁻³	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁴
P1	H1	1	Unbekannt 1	U1	8	1,0E ⁻²	30	50	10	10	100	1,0E ⁻³
P1	H2	2	Unbekannt 1	U1	8	1,0E ⁻²	30	50	10	10	100	1,0E ⁻³
P1	H3	3	Unbekannt 1	U1	8	1,0E ⁻²	30	50	10	10	100	1,0E ⁻³
P1	A4	1	Unbekannt 2	U2	1	1,0E ⁻⁹	30	50	10	10	100	1,0E ⁻¹⁰
P1	A5	2	Unbekannt 2	U2	1	1,0E ⁻⁹	30	50	10	10	100	1,0E ⁻¹⁰
P1	A6	3	Unbekannt 2	U2	1	1,0E ⁻⁹	30	50	10	10	100	1,0E ⁻¹⁰
P1	B4	1	Unbekannt 2	U2	2	1,0E ⁻⁸	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁹
P1	B5	2	Unbekannt 2	U2	2	1,0E ⁻⁸	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁹
P1	B6	3	Unbekannt 2	U2	2	1,0E ⁻⁸	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁹
P1	C4	1	Unbekannt 2	U2	3	1,0E ⁻⁷	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁸
P1	C5	2	Unbekannt 2	U2	3	1,0E ⁻⁷	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁸
P1	C6	3	Unbekannt 2	U2	3	1,0E ⁻⁷	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁸
P1	D4	1	Unbekannt 2	U2	4	1,0E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁷
P1	D5	2	Unbekannt 2	U2	4	1,0E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁷
P1	D6	3	Unbekannt 2	U2	4	1,0E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁷
P1	E4	1	Unbekannt 2	U2	5	1,0E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
P1	E5	2	Unbekannt 2	U2	5	1,0E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
P1	E6	3	Unbekannt 2	U2	5	1,0E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
P1	F4	1	Unbekannt 2	U2	6	1,0E ⁻⁴	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁵
P1	F5	2	Unbekannt 2	U2	6	1,0E ⁻⁴	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁵
P1	F6	3	Unbekannt 2	U2	6	1,0E ⁻⁴	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁵
P1	G4	1	Unbekannt 2	U2	7	1,0E ⁻³	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁴
P1	G5	2	Unbekannt 2	U2	7	1,0E ⁻³	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁴
P1	G6	3	Unbekannt 2	U2	7	1,0E ⁻³	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁴
P1	H4	1	Unbekannt 2	U2	8	1,0E ⁻²	30	50	10	10	100	1,0E ⁻³
P1	H5	2	Unbekannt 2	U2	8	1,0E ⁻²	30	50	10	10	100	1,0E ⁻³
P1	H6	3	Unbekannt 2	U2	8	1,0E ⁻²	30	50	10	10	100	1,0E ⁻³

Anordnung der Wells beim Assay zur Ermittlung konkurrierender Bindungen												
Platte	Position	Replik	Well-Typ	Well-Code	Konzentrations-code	Ausgangskonzentration des Bindungskurrenten (M)	hrER-Vorratslösung (µl)	Puffer-Vol. (µl)	Tracer-Volumen (warmes E2) (µl)	Volumen der Verdünnungsplatte (µl)	Endvolumen (µl)	Endkonzentration des Bindungskurrenten (M)
P1	A7	1	Unbekannt 3	U3	1	1,0E ⁻⁹	30	50	10	10	100	1,0E ⁻¹⁰
P1	A8	2	Unbekannt 3	U3	1	1,0E ⁻⁹	30	50	10	10	100	1,0E ⁻¹⁰
P1	A9	3	Unbekannt 3	U3	1	1,0E ⁻⁹	30	50	10	10	100	1,0E ⁻¹⁰
P1	B7	1	Unbekannt 3	U3	2	1,0E ⁻⁸	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁹
P1	B8	2	Unbekannt 3	U3	2	1,0E ⁻⁸	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁹
P1	B9	3	Unbekannt 3	U3	2	1,0E ⁻⁸	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁹
P1	C7	1	Unbekannt 3	U3	3	1,0E ⁻⁷	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁸
P1	C8	2	Unbekannt 3	U3	3	1,0E ⁻⁷	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁸
P1	C9	3	Unbekannt 3	U3	3	1,0E ⁻⁷	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁸
P1	D7	1	Unbekannt 3	U3	4	1,0E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁷
P1	D8	2	Unbekannt 3	U3	4	1,0E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁷
P1	D9	3	Unbekannt 3	U3	4	1,0E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁷
P1	E7	1	Unbekannt 3	U3	5	1,0E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
P1	E8	2	Unbekannt 3	U3	5	1,0E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
P1	E9	3	Unbekannt 3	U3	5	1,0E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
P1	F7	1	Unbekannt 3	U3	6	1,0E ⁻⁴	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁵
P1	F8	2	Unbekannt 3	U3	6	1,0E ⁻⁴	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁵
P1	F9	3	Unbekannt 3	U3	6	1,0E ⁻⁴	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁵
P1	G7	1	Unbekannt 3	U3	7	1,0E ⁻³	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁴
P1	G8	2	Unbekannt 3	U3	7	1,0E ⁻³	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁴
P1	G9	3	Unbekannt 3	U3	7	1,0E ⁻³	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁴
P1	H7	1	Unbekannt 3	U3	8	1,0E ⁻²	30	50	10	10	100	1,0E ⁻³
P1	H8	2	Unbekannt 3	U3	8	1,0E ⁻²	30	50	10	10	100	1,0E ⁻³
P1	H9	3	Unbekannt 3	U3	8	1,0E ⁻²	30	50	10	10	100	1,0E ⁻³
P1	A10	1	Kontrolle E2	S	E2 _{max1}	1,0E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁷
P1	A11	2	Kontrolle E2	S	E2 _{max2}	1,0E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁷
P1	A12	3	Kontrolle E2	S	E2 _{max3}	1,0E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁷
P1	B10	1	Kontrolle E2	S	E2IC ₅₀₁	E2IC ₅₀ x10	30	50	10	10	100	E2IC ₅₀
P1	B11	2	Kontrolle E2	S	E2IC ₅₀₂	E2IC ₅₀ x10	30	50	10	10	100	E2IC ₅₀
P1	B12	3	Kontrolle E2	S	E2IC ₅₀₃	E2IC ₅₀ x10	30	50	10	10	100	E2IC ₅₀
P1	C10	1	Kontrolle NE	S	Ne _{max1}	1,0E ^{-3,5}	30	50	10	10	100	1,0E ^{-4,5}
P1	C11	2	Kontrolle NE	S	Ne _{max2}	1,0E ^{-3,5}	30	50	10	10	100	1,0E ^{-4,5}
P1	C12	3	Kontrolle NE	S	Ne _{max3}	1,0E ^{-3,5}	30	50	10	10	100	1,0E ^{-4,5}
P1	D10	1	Kontrolle NE	S	NEIC ₅₀₁	NEIC ₅₀ x10	30	50	10	10	100	NEIC ₅₀
P1	D11	2	Kontrolle NE	S	NEIC ₅₀₂	NEIC ₅₀ x10	30	50	10	10	100	NEIC ₅₀
P1	D12	3	Kontrolle NE	S	NEIC ₅₀₃	NEIC ₅₀ x10	30	50	10	10	100	NEIC ₅₀
P1	E10	1	kaltes E2 (hoch)	NSB	S1	1,0E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
P1	E11	2	kaltes E2 (hoch)	NSB	S2	1,0E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
P1	E12	3	kaltes E2 (hoch)	NSB	S3	1,0E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
P1	F10	4	kaltes E2 (hoch)	NSB	S4	1,0E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
P1	F11	5	kaltes E2 (hoch)	NSB	S5	1,0E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
P1	F12	6	kaltes E2 (hoch)	NSB	S6	1,0E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
P1	G10	1	Gesamtbindung	TB	TB1	–	30	60	10	–	100	–
P1	G11	2	Gesamtbindung	TB	TB2	–	30	60	10	–	100	–
P1	G12	3	Gesamtbindung	TB	TB3	–	30	60	10	–	100	–
P1	H10	4	Gesamtbindung	TB	TB4	–	30	60	10	–	100	–
P1	H11	5	Gesamtbindung	TB	TB5	–	30	60	10	–	100	–
P1	H12	6	Gesamtbindung	TB	TB6	–	30	60	10	–	100	–

Anlage 4

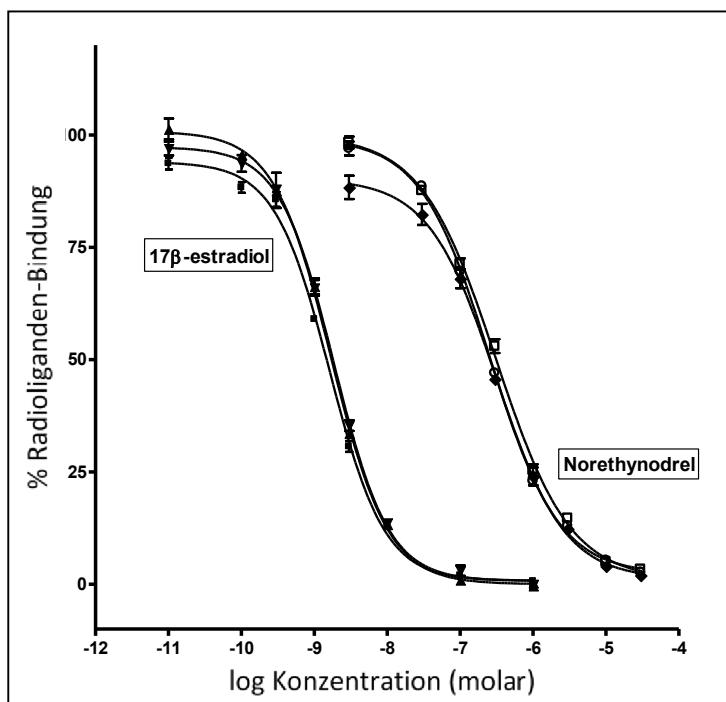
HINWEISE ZUR ANALYSE DER DATEN AUS DEM hrER-ASSAY ZUR ERMITTLUNG KONKURRIERENDER BINDUNGEN

1. Mit dem hrER α -Assay zur Ermittlung konkurrierender Bindungen wird die Bindung von [^{3} H]-17 β -Estradiol einer einzelnen Konzentration bei zunehmenden Konzentrationen einer Prüfchemikalie gemessen. Die Kurve zur Darstellung konkurrierender Bindungen wird als spezifische Bindung von [^{3} H]-17 β -Estradiol im Vergleich zur Konzentration (log₁₀-Stufen) des Bindungskonkurrenten dargestellt. Die Konzentration der Prüfchemikalie, die die maximale spezifische Bindung von [^{3} H]-17 β -Estradiol um 50 % hemmt, wird als IC₅₀ bezeichnet.

Analyse der Daten zum Referenzöstrogen und zum schwachen Binder (1)

2. Daten aus den Prüfläufen mit den Kontrollen werden für weitere Analysen umgewandelt (prozentuale [^{3} H]-17 β -Estradiol-spezifische Bindung und Log-Konzentration der Kontrollchemikalie). Schätzungen der log-(IC₅₀)-Werte der positiven Kontrollen (z. B. Referenzöstrogen und ein schwacher Binder) sollten mit einer geeigneten Software zur nicht linearen Kurvenanpassung für eine Hill-Gleichung mit 4 Parametern (z. B. BioSoft; GraphPad Prism) vorgenommen werden (2). Die Höchstwerte, die Mindestwerte, die Hillslope-Werte und die log-(IC₅₀)-Werte brauchen bei der Anpassung dieser Kurven allgemein nicht beschränkt zu werden. Zur Ermittlung der Best-Fit-Werte sollte eine robuste Regression vorgenommen werden, sofern nicht eine Begründung für ein anderweitiges Vorgehen angegeben wird. Die gewählte Methode für die Durchführung der robusten Regression ist anzugeben. Beim FW- und beim CERI-hrER-Assay waren Korrekturen für den Ligandenabbau nicht erforderlich; solche Korrekturen können aber ggf. in Betracht gezogen werden. Nach der Ausgangsanalyse sollte jede einzelne Bindungskurve nochmals geprüft werden, um eine angemessene Anpassung an das Modell sicherzustellen. Die relative Bindungsaffinität (RBA) des schwachen Binders kann als Prozentanteil von log (IC₅₀) für den schwachen Binder bezogen auf log (IC₅₀) für 17 β -Estradiol berechnet werden. Die Ergebnisse der Positivkontrollen und der Nicht-Binder-Kontrolle sollten anhand von Parametern für die Leistungsfähigkeit des Assays sowie aufgrund von Akzeptanzkriterien bewertet werden. Im Zusammenhang mit dieser Prüfmethode (Nummer 20), in Anlage 2 (FW-Assay, Nummern 41-51) und in Anlage 3 (CERI-Assay, Nummern 41-51) wurden Beispiele für solche Akzeptanzkriterien genannt. Abbildung 1 enthält Beispiele aus 3 Prüfläufen mit dem Referenzöstrogen und dem schwachen Binder.

Abbildung 1: Beispiele für Kurven konkurrierender Bindungen für das Referenzöstrogen und die Kontrolle mit dem schwachen Binder.

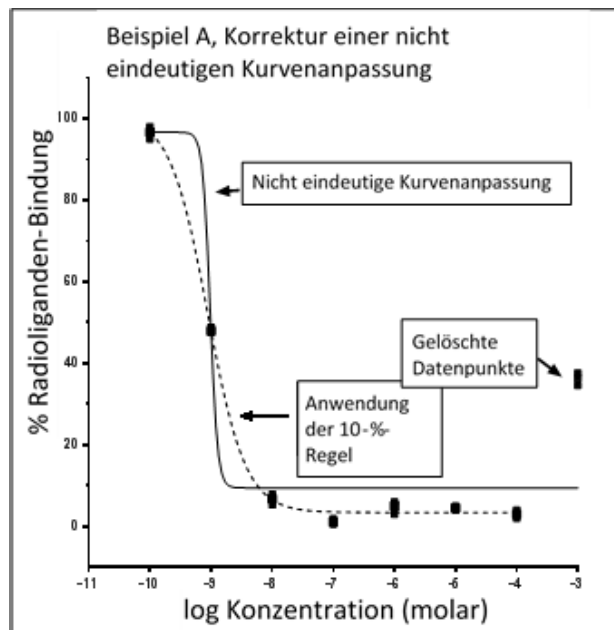


Analyse der Daten zu den Prüfchemikalien

- Die Daten aller Prüfchemikalien werden schrittweise analysiert, um eine angemessene Vorgehensweise und eine korrekte Einstufung der einzelnen Kurven zum konkurrierenden Bindungsverhalten sicherzustellen. Für jeden Prüflauf einer Prüfchemikalie sollte zunächst eine standardisierte Datenanalyse nach dem Verfahren vorgenommen werden, das auch zur Analyse der Kontrollen mit dem Referenzöstrogen und dem schwachen Binder durchgeführt wird. Nach dieser Analyse sollten die Parameter zur Kurvenanpassung fachlich geprüft werden; außerdem sollte geprüft werden, in welchem Umfang die Daten mit der erzeugten Kurve der konkurrierenden Bindungen übereinstimmen. Bei dieser fachlichen Prüfung sind die Feststellung eines konzentrationsabhängigen Rückgangs der prozentualen spezifischen Bindung von [^3H]-17β-Estradiol, eine geringe Variabilität der technischen Wiederholungen bei den einzelnen Chemikalienkonzentrationen und die Konsistenz der Anpassungsparameter bei den drei Prüfläufen gute Indikatoren für die ordnungsgemäße Durchführung des Assays und der Datenanalysen. Die Ergebnisse der einzelnen Prüfläufe mit einer Prüfchemikalie sollten einer fachlichen Bewertung unterzogen werden, und die zur Einstufung der einzelnen Prüfchemikalien als Binder oder als Nicht-Binder verwendeten Daten sollten wissenschaftlich fundiert sein.

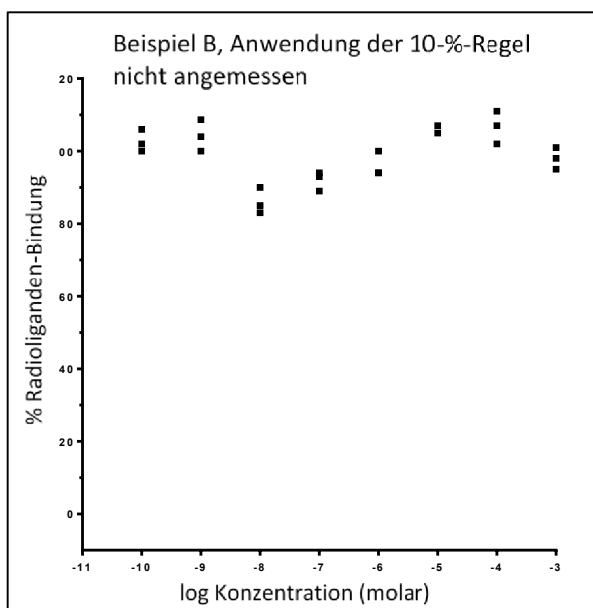
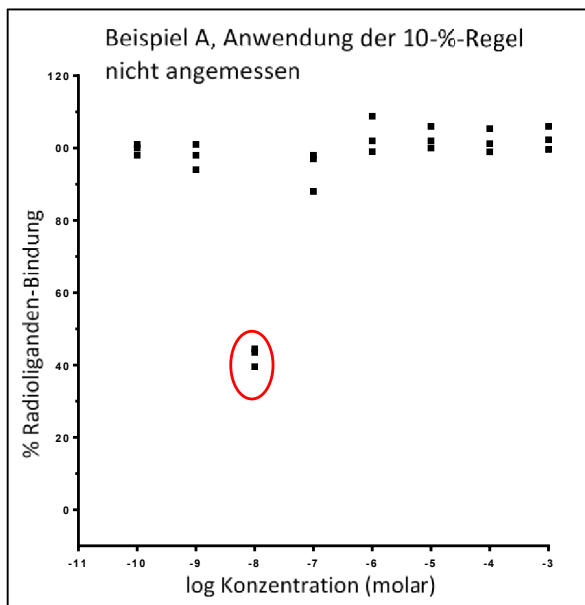
4. Gelegentlich liegen möglicherweise Daten vor, die besondere Aufmerksamkeit erfordern, wenn angemessene Analysen und Auswertungen der Daten zu hrER-Bindungen sichergestellt werden sollen. In früheren Studien wurden Fälle festgestellt, in denen die Analyse und die Auswertung von Daten zur Bindung an konkurrierende Rezeptoren durch eine Zunahme der prozentualen spezifischen Bindung bei den höchsten Konzentrationen der betreffenden Prüfchemikalien erschwert werden (Abbildung 2). Dieses Problem ist hinlänglich bekannt und wurde bei der Verwendung von Protokollen für mehrere Assays zur Untersuchung konkurrierender Rezeptorbindungen deutlich (3). In diesen Fällen wird eine konzentrationsabhängige Reaktion bei niedrigeren Konzentrationen festgestellt; wenn sich die Konzentration der Prüfchemikalie jedoch der Löslichkeitsgrenze nähert, nimmt die Verdrängung von [^3H]-17 β -Estradiol nicht mehr weiter ab. In diesen Fällen deuten die Daten bei den höheren Konzentrationen darauf hin, dass die biologische Grenze des Assays erreicht ist. Häufig hängt dieses Phänomen damit zusammen, dass Chemikalien bei hohen Konzentrationen nicht mehr löslich sind und sich niederschlagen. Außerdem kann dies darauf zurückzuführen sein, dass die Kapazität der dextranbeschichteten Aktivkohle zur Bindung des ungebundenen radioaktiv markierten Liganden während des Trennverfahrens bei den höchsten Chemikalienkonzentrationen überschritten wird. Wenn die betreffenden Datenpunkte bei der Anpassung der Daten zu konkurrierenden Bindungen an eine Sigmoidkurve beibehalten werden, kann es zu Fehleinstufungen des Potenzials der jeweiligen Chemikalien für ER-Bindungen kommen (Abbildung 2). Um dies zu vermeiden, sieht das Protokoll des FW- und des CERI-Bindungsassays mit dem hrER die Möglichkeit vor, Datenpunkte aus den Analysen auszuschließen, bei denen der Mittelwert der Wiederholungen für die prozentuale [^3H]-17 β -Estradiol-spezifische Bindung um mindestens 10 % über dem Mittelwert bei einer niedrigeren Konzentration liegt. (Diese Regel wird allgemein als 10-%-Regel bezeichnet.) Bei jeder Kurve kann diese Regel nur einmal angewendet werden. Außerdem ist eine Anwendung nur dann möglich, wenn Daten für mindestens 6 weitere Konzentrationen verbleiben, damit die Kurve korrekt eingestuft werden kann.

Abbildung 2: Beispiele für die Kurven konkurrierender Binder mit und ohne Anwendung der 10-%-Regel.



5. Ob es angemessen ist, die 10-%-Regel zur Korrektur dieser Kurven anzuwenden, sollte sorgfältig geprüft werden. Die Anwendung sollte auf die Fälle beschränkt werden, in denen starke Anhaltspunkte für das Vorliegen eines hrER-Binders vorliegen. Bei der Durchführung von Versuchen für die Studie zur Validierung des FW-hrER-Bindungsassays wurde festgestellt, dass die 10-%-Regel manchmal nicht beabsichtigte und unvorhergesehene Folgen hatte. Chemikalien, bei denen keine Wechselwirkung mit dem Rezeptor auftraten (d. h. echte Nicht-Binder), zeigten häufig eine Variabilität von mehr als 10 % über das Spektrum der geprüften Konzentrationen. Wenn der niedrigste Wert bei einer niedrigen Konzentration auftrat, konnten nach der 10-%-Regel die Daten aller höheren Konzentrationen aus der Analyse möglicherweise gelöscht werden. Allerdings konnten die Daten auch dieser Konzentrationen hilfreich für die Einstufung der betreffenden Chemikalie als Nicht-Binder sein. Abbildung 3 enthält Beispiele, bei denen die Anwendung der 10-%-Regel nicht angemessen wäre.

Abbildung 3: Beispiele für Daten konkurrierender Binder, bei denen eine Anwendung der 10%-Regel nicht angemessen wäre.



Literatur

- (258) OECD (2015). *Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα)*, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organisation für Wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (259) Motulsky, H., und 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.
- (260) Laws, S.C., Yavanhxay, S., Cooper, R.L., Eldridge, J.C. (2006). *Nature of the Binding Interaction for 50 Structurally Diverse Chemicals with Rat Estrogen Receptors*. Toxicological Sci. 94(1):46-56.