

Brüssel, 25. veebruar 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

SAATEMÄRKUSED

Saatja:	Euroopa Komisjon
Kättesaamise kuupäev:	22. veebruar 2019
Saaja:	Nõukogu peasekretariaat
Komisjoni dok nr:	Annex to D060575/02
Teema:	LISA järgmise dokumendi juurde: KOMISJONI MÄÄRUS (EL) .../..., XXX, millega muudetakse tehnika arenguga kohandamise eesmärgil määruse (EÜ) nr 440/2008 (millega kehtestatakse katsemeetodid vastavalt Euroopa Parlamendi ja nõukogu määrusele (EÜ) nr 1907/2006, mis käsitleb kemikaalide registreerimist, hindamist, autoriseerimist ja piiramist (REACH)) lisa

Käesolevaga edastatakse delegatsioonidele dokument Annex to D060575/02.

Lisatud: Annex to D060575/02

ET

LISA

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

- 1) B osas asendatakse peatükk B.4 järgmisega:

„B.4. ÄGE NAHAÄRRITUS/-SÖÖVITUS

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 404 (2015).
Kemikaalidega katsete tegemist käsitlevaid OECD katsejuhendeid vaadatakse korrapäraselt läbi eesmärgiga tagada, et need kajastaksid parimaid olemasolevaid teadusandmeid. OECD katsejuhendi nr 404 läbivaatamisel on pööratud erilist tähelepanu võimalikele muudatustele seoses loomade heaolu parandamisega ja uuritavat kemikaali käsitleva kogu olemasoleva teabe hindamisele, et ära hoida tarbetute katsete tegemist laboriloomadega. OECD katsejuhendi nr 404 (algselt vastu võetud 1981. aastal ning muudetud aastatel 1992, 2002 ja 2015) ajakohastatud versioon sisaldab viidet juhenddokumendile nahaärrituse/-söövitusega seotud katsete tegemist ja hindamist käsitleva ühtse lähenemisviisi kohta (1); nimetatud dokumendis pakutakse välja modulaarne lähenemisviis nahaärrituse ja nahasöövituse hindamiseks. Kõnealuse katsete tegemist ja hindamist käsitleva ühtse lähenemisviisi raames kirjeldatakse mitut moodulit, milles teabeallikad ja analüüsivahendid on rühmitatud, ning i) antakse suuniseid, kuidas lõimida ja kasutada olemasolevaid katse- ja muid andmeid kemikaalide võimaliku nahka ärritava ja nahka söövitava toime hindamiseks ja ii) pakutakse välja lähenemisviis juhaks, kui on vaja teha täiendavaid katseid (1). Peale selle soovitatakse kõnealuses katsejuhendis kasutada algses *in vivo* katses katseloomal vajaduse korral kolme katselappi mitte üheaegselt, vaid üksteise järel.
2. Nahaärrituse ja nahasöövituse määratlus on esitatud käesoleva katsemeetodi liites.

LÄHTEKAALUTLUSED

3. Nii usaldusväärsete teadustulemuste kui ka loomade heaolu huvides ei tohiks *in vivo* uuringuid ette võtta enne, kui kõiki kättesaadavaid andmeid uuritava kemikaali võimaliku nahka söövitava/ärritava toime kohta on hinnatud tõendite kaalukusel põhineva analüüsi teel, nagu on kirjeldatud juhenddokumendis nahaärrituse/-söövitusega seotud katsete tegemist ja hindamist käsitleva ühtse lähenemisviisi kohta, st selle juhenddokumendi

kolme osa ja neile vastavate moodulite kohaselt (1). Lühidalt kirjeldatuna vaadeldakse olemasolevaid andmeid 1. osas seitsme mooduli alusel, mis hõlmavad andmeid inimese kohta, *in vivo* andmeid, *in vitro* andmeid, füüsikalisi-keemilisi omadusi (nt pH, eelkõige tugev happelisus või aluselisus) ja katsetel mittepõhinevaid meetodeid. Teises osas viiakse läbi tõendite kaalukusel põhinev analüüs. Kui selle analüüsi tulemused on ebaselged, tuleks teha 3. osa kohased täiendavad katsed, alguses *in vitro* meetoditega ning viimase võimalusena *in vivo* katsed. Seega peaks kõnealune analüüs vähendama vajadust teha *in vivo* katseid selliste uuritavate kemikaalidega, mille puhul on muudest uuringutest saadud juba piisavalt tõendeid nende nahka söövitava/ärritava toime kohta.

IN VIVO KATSE PÕHIMÕTE

4. Uuritav kemikaal kantakse ühes annuses katselooma nahale; katselooma töötlemata nahapiirkondi kasutatakse negatiivse kontrollina. Ärrituse/söövituse ulatus registreeritakse ja seda hinnatakse kindlate ajavahemike järel ning mõju täielikuks hindamiseks lisatakse selle täiendav kirjeldus. Uuringu kestus peaks olema piisav, et hinnata täheldatud mõju pöörduvust või pöördumatust.
5. Loomad, kellel täheldatakse mis tahes katseetapis pideva tugeva stressi ja/või valu tunnuseid, tuleks humaanselt surmata ning uuritava kemikaali hindamisel tuleks seda arvesse võtta. Otsustamiskriteeriumid surmaeelses seisundis või raskelt kannatavate loomade humanseks surmamiseks on esitatud eraldi juhenddokumendis (2).

IN VIVO KATSE ETTEVALMISTAMINE

Loomaliigi valimine

6. Eelistatud laboriloom on albiinoküülik; kasutatakse noori terveid täiskasvanud küülikuid. Muude liikide kasutamisel tuleks esitada vastav põhjendus.

Loomade ettevalmistamine

7. Umbes 24 tundi enne katset tuleks loomade seljaosa karvad võimalikult lühikeseks lõigata. Tuleks vältida naha marrastamist ning kasutada tuleks üksnes terveid, terve nahaga loomi.
8. Mõnel küülikuliinil esineb tiheda karvastikuga laiike, mis on teatavatel aastaaegadel silmatorkavamad. Selliseid tiheda karvastikuga piirkondi ei tohiks katses kasutada.

Pidamis- ja söötmistingimused

9. Loomi tuleks pidada ühekaupa. Katseloomade ruumi temperatuur peaks küülikute puhul olema 20 °C ($\pm$ 3 °C). Ehkki suhteline niiskus peaks olema vähemalt 30 % ja soovitatavalt mitte üle 70 %, v.a ruumi koristamise ajal, on sobivaim vahemik 50–60 %. Tuleks kasutada tehisvalgustust valgusrežiimiga 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust. Söötmiseks võib kasutada tavapärasest laborisööta ja piiramatus koguses joogivett.

KATSE KÄIK

Uuritava kemikaali kasutamine

10. Uuritav kemikaal tuleks kanda väikesele (umbes 6 cm² suurusele) nahapinnale ning katta see marlilapiga, mida hoiab paigal nahka mitteärritav teip. Kui uuritavat kemikaali ei ole võimalik otse nahale kanda (nt vedelikud ja mõned pastad), kantakse see esmalt marlilapile, mis seejärel asetatakse nahale. Lappi hoitakse kogu kokkupuuteperioodi vältel sobiva poolläbilaskva sideme abil õrnalt vastu nahka. Kui uuritav kemikaal kantakse lapile, tuleks lapp asetada nahale nii, et kemikaal puutuks nahaga korralikult kokku ja oleks nahal ühtlaselt jaotunud. Tuleks takistada looma ligipääsu lapile ning uuritava kemikaali allaneelamist ja sissehingamist.
11. Vedelaid uuritavaid kemikaale kasutatakse üldjuhul lahjendamata kujul. Kui katses kasutatakse tahket ainet (selle võib vajaduse korral pulbristada), tuleks uuritavat kemikaali niisutada võimalikult väikese koguse veega (või vajaduse korral muu sobiva kandeainega), et tagada hea kokkupuude nahaga. Kui kasutatakse muud kandeainet kui vett, peaks kandeaine võimalik mõju uuritava kemikaali põhjustatud nahaärritusele olema minimaalne või puuduma.
12. Kokkupuuteperioodi lõppedes ehk tavaliselt nelja tunni möödudes tuleks uuritava kemikaali jäägid võimaluse korral vee või sobiva lahusti abil eemaldada, muutmata seejuures marrasknaha terviklikkust ega selles tekkinud reaktsiooni.

Annustamine

13. Katses kasutatavale pinnale kantakse 0,5 ml vedelikku või 0,5 g tahket ainet või pastat.

Algkatse (ühe loomaga *in vivo* katse nahaärrituse/-söövituse hindamiseks)

14. Kui tõendite kaalukusel põhinevast analüüsist või varasematest *in vitro* katsetest nähtub, et uuritav kemikaal on söövitav või ärritav või klassifitseerimata, ei ole täiendavate *in vivo* katsete tegemine tavaliselt vajalik. Kui aga lisaandmete kogumine osutub vajalikuks, viiakse *in vivo* katse esmalt läbi ühe loomaga ja seejuures kasutatakse järgmist lähenemisviisi. Loomale pannakse üksteise järel kuni kolm katselappi. Esimene lapp eemaldatakse kolme minuti pärast. Kui tõsist nahareaktsiooni ei täheldata, pannakse loomale teine lapp ja eemaldatakse see tunni aja pärast. Kui selles etapis tehtud vaatlustest ilmneb, et kokkupuudet võib humaanselt pikendada nelja tunnini, pannakse loomale kolmas lapp, eemaldatakse see nelja tunni pärast ja hinnatakse tekkinud reaktsiooni.
15. Kui kolmest kõnealusest järjestikusest kokkupuuteperioodist ükskõik millise järel täheldatakse söövitavat toimet, lõpetatakse katse kohe. Kui pärast viimase lapi eemaldamist ei täheldata söövitavat toimet, jälgitakse looma 14 päeva jooksul, välja arvatud juhul, kui söövitus ilmneb varem.

16. Kui uuritav kemikaal ei põhjusta eeldatavalt söövitust, kuid võib olla ärritav, tuleks ühele loomale panna üks lapp neljaks tunniks.

Kinnitav katse (täiendavate loomadega *in vivo* katse nahaärrituse hindamiseks)

17. Kui algkatses ei täheldata söövitavat toimet, tuleks ärritava toime olemasolu või puudumise kinnitamiseks kasutada veel kuni kahte looma ja iga looma puhul ühte lappi kokkupuuteperioodiga neli tundi. Kui algkatses täheldatakse ärritavat toimet, võib kinnitavas katses kasutada järjestikust hindamist või kanda kemikaali üheaegselt kahele lisaloomale. Kui erandjuhul ei ole algkatset tehtud, võib kahele või kolmele loomale asetada ühe lapi, mis eemaldatakse nelja tunni pärast. Kui kasutatakse kahte looma ja mõlemal täheldatakse sama reaktsiooni, ei ole vaja enam lisakatseid teha. Muul juhul tehakse katse ka kolmanda loomaga. Ebaselgete tulemuste hindamiseks võib olla vaja kasutada veel loomi.

Vaatlusperiood

18. Vaatlusperiood peaks olema piisavalt pikk, et võimaldada täielikult hinnata täheldatud toime pöörduvust. Siiski tuleks katse kohe lõpetada, kui loomal täheldatakse pideva tugeva valu või stressi tunnuseid. Toime pöörduvuse kindlakstegemiseks tuleks loomi jälgida kuni 14 päeva vältel pärast lapi eemaldamist. Kui pöörduvust täheldatakse enne 14 päeva möödumist, tuleks katse sel hetkel lõpetada.

Kliinilised vaatlused ja nahareaktsioonide hindamine

19. Kõikidel loomadel uuritakse nahapunetuse ja turse esinemist ning reaktsioone hinnatakse lapi eemaldamisest 60 minuti ning seejärel 24, 48 ja 72 tunni möödumisel. Ühe loomaga tehtavas algkatses vaadeldakse kokkupuutes olnud nahapinda ka vahetult pärast lapi eemaldamist. Nahareaktsioonide hindamiseks ja registreerimiseks kasutatakse allpool tabelis esitatud hindeid. Kui nahal esineb 72 tunni järel kahjustus, mis ei ole käsitatav ärrituse ega söövitusena, võib olla vaja teha vaatlusi kuni 14. päevani, et teha kindlaks toime pöörduvus. Peale ärrituse jälgimise tuleks täielikult kirjeldada kõiki paikseid mürgisuse ilminguid, näiteks naha rasvkoe kadumist, ja mis tahes süsteemseid kahjulikke toimeid (nt kliinilisi mürgisuse nähte ja mõju kehamassile) ning need registreerida. Ebaselgete tulemuste puhul tuleks kaaluda histopatoloogilise analüüsi tegemist.
20. Nahareaktsioonide hindamine on paratamatult subjektiivne. Nahareaktsioonide hindamise ühtlustamiseks ning nii katseid läbi viivate laborite kui ka vaatlusi tegevate ja vaatlustulemusi tõlgendavate isikute abistamiseks on vaja vaatluste läbiviijad kasutatava hindamissüsteemiga (vt tabelit allpool) piisavalt kurssi viia. Seejuures võib olla abi illustreeritud juhendist nahaärrituse ja muude kahjustuste hindamiseks (3).

ANDMED JA ARUANDLUS

21. Uuringutulemused tuleks esitada lõplikus katseprotokollis tabeli kujul ja need peaksid hõlmama kõiki punktis 24 loetletud üksikasju.

Tulemuste hindamine

22. Nahaärrituse hindamisel tuleks ühtlasi arvesse võtta kahjustuse laadi ja raskusastet ning selle pöörduvust või pöördumatust. Üksikud hinded ei väljenda eraldivõetuna aine ärritava toime absoluuttasest, kuna samaaegselt hinnatakse ka uuritava aine muud toimet. Selle asemel tuleks üksikuid hindeid käsitada võrdlusväärtusena, mida tuleb hinnata koos kõikide muude uuringu käigus saadud vaatlustulemustega.
23. Ärritusreaktsioonide hindamisel tuleks arvesse võtta nahakahjustuste pöörduvust. Kui sellised reaktsioonid nagu alopeetsia (piiratud alal), hüperkeratoos, hüperplaasia ja kestendamine püsivad 14-päevase vaatlusperioodi lõpuni, tuleks uuritavat kemikaali käsitada ärritava kemikaalina.

Katseprotokoll

24. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave.

In vivo uuringu tegemise põhjendus:

- olemasolevatest katseandmetest, sealhulgas järjestikuse hindamise strateegia rakendamisel saadud tulemustest lähtuv tõendite kaalukusel põhinev analüüs;
- varasematest katsetest saadud asjakohaste andmete kirjeldus;
- igas katsestrateegia kohases etapis saadud andmed;
- tehtud *in vitro* katsete kirjeldus, sealhulgas katsete üksikasjalik käik ning uuritavate ja võrdlusainetega saadud tulemused;
- *in vivo* uuringu tegemist toetav tõendite kaalukusel põhinev analüüs.

Uuritav kemikaal:

- ühest koostisosast koosnev aine: kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus, CASi number, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem, puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne;
- mitmest koostisosast koosnev aine, segu või tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal (UVCB): võimalikult täpne omaduste kirjeldus lähtuvalt koostisosade keemilisest määratlusest (vt eespool), kvantitatiivsest sisaldusest ja asjakohastest füüsikalis-keemilistest omadustest;
- füüsiline välimus, lahustuvus vees ja muud asjakohased füüsikalis-keemilised omadused;
- allikas ja partii number, kui see on olemas;

- vajaduse korral teave uuritava kemikaali / kontrollaine töötlemise kohta enne katset (näiteks soojendamine, peenestamine);
- uuritava kemikaali püsivus ja aegumiskuupäev või kordusanalüüsi tegemise tähtpäev, kui see on teada;
- säilitustingimused.

Kandeaine:

- identimisandmed, kontsentratsioon (vajaduse korral), kasutatud kogus;
- kandeaine valimise põhjendus.

Katseloom(ad):

- kasutatud loomaliik/-liin, muu(de) looma(de) kui albiinoküüliku kasutamise korral sellekohane põhjendus;
- kummastki soost loomade arv;
- iga looma kaal katse alguses ja lõpus;
- vanus katse alguses;
- looma(de) päritolu, pidamistingimused, toitumisandmed jms.

Katsetingimused:

- lapi asetuskoha ettevalmistamise meetod;
- kasutatud lapimaterjalide ja lapi asetamise meetodi üksikasjad;
- uuritava kemikaali ettevalmistamise, pealekandmise ja eemaldamise üksikasjad.

Tulemused:

- ärritus-/söövitusnähtude hindamise tulemused iga looma kohta igal mõõtmiskorral tabeli kujul;
- kõikide täheldatud kahjustuste kirjeldus;
- täheldatud ärrituse või söövituse laadi ja astme jutustav kirjeldus ja võimalikud histopatoloogilised leiud;
- nahaärritusele ja -söövitusele lisanduvate muude kahjulike paiksete (nt naha rasvkoe kadumine) ja süsteemsete toimete kirjeldus.

Tulemuste arutelu

Järeldused

KIRJANDUS

- (1) OECD (2014). Guidance Document on an Integrated Approach to Testing and Assessment (IATA) for Skin Corrosion and Irritation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 203. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (2) OECD (1998). Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances. Heaks kiidetud kemikaalikomitee ja kemikaalide töörühma 28. ühiskoosolekul novembris 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. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

TABEL. NAHAREAKTSIOONIDE HINDAMINE**Nahapunetuse ja raia tekkimine**

Nahapunetust ei esine.....	0
Väga nõrk (vaevumärgatav) nahapunetus.....	1
Selgesti nähtav nahapunetus.....	2
Mõõdukas kuni tugev nahapunetus.....	3
Tugev nahapunetus (lihapunane) kuni punetuse hindamist takistava raia esinemine.....	4
Suurim võimalik punktide arv: 4	

Turse tekkimine

Turset ei esine.....	0
Väga kerge (vaevumärgatav) turse.....	1
Kerge turse (ala servad on selgesti nähtavalt kõrgemal).....	2
Mõõdukas turse (ala on ligikaudu 1 mm kõrgemal).....	3
Tugev turse (ala on üle 1 mm kõrgemal ja levinud kokkupuutealast väljapoole).....	4
Suurim võimalik punktide arv: 4	

Ebaselgete tulemuste puhul võib teha histopatoloogilise analüüsi.

Liide

MÕISTED

Kemikaal – aine või segu.

Nahasöövitus – pöördumatu nahakahjustuse, st marrasknahast pärisnahani ulatuva nähtava nekroosi tekkimine uuritava kemikaali kuni neljaks tunniks pealekandmise tagajärjel. Tüüpilised söövitushäired on haavandid, verejooks, verised kärnad ning 14-päevase vaatlusperioodi lõpuks ilmnev värvimuutus naha valastumise tõttu, täielik alopeetsia ja armistumine. Ebaselgete kahjustuste hindamiseks tuleks kaaluda histopatoloogilise analüüsi tegemist.

Nahaärritus – pöörduva nahakahjustuse tekkimine uuritava kemikaali kuni neljaks tunniks pealekandmise tagajärjel.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.“

2) B osas asendatakse peatükk B.17 järgmisega:

**„B.17. HPRT VÕI XPRT GEENIL PÕHINEVAD *IN VITRO*
GEENIMUTATSIOONIKATSED IMETAJARAKKUDEGA**

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 476 (2016). Katsemeetodeid vaadatakse korrapäraselt läbi, et võtta arvesse teaduse arengut, muutuvaid regulatiivseid vajadusi ja loomade heaolu. Käesolevas katsemeetodi B.17 muudetud versioonis kajastuvad selle katse tegemisel saadud peaaegu kolmekümne aasta pikkused kogemused ja samuti tulemused, mis on saadud tümidiini kinaasi geenil põhineva, imetajarakkudega tehtava *in vitro* geenimutatsioonikatse jaoks uue eraldi meetodi väljatöötamise käigus. Katsemeetod B.17 kuulub geneetilise toksikoloogia katsemeetodite seeriasse. OECD on välja töötanud dokumendi, milles on esitatud kokkuvõtlik teave geneetilise toksikoloogia valdkonna katsete kohta ning ülevaade genotoksilisust käsitlevates OECD katsejuhendites tehtud viimastest muudatustest (1).
2. Käesoleva meetodi kohase imetajarakkudega läbi viidava *in vitro* geenimutatsioonikatse eesmärk on tuvastada kemikaalide põhjustatud geenimutatsioone. Kõnealustes katsetes kasutatakse rakuliine, mis võimaldavad tuvastada otsemutatsioone reportergeenides, täpsemalt endogeenses hüpoksantiini-guaaniini fosforibosüültransferaasi geenis (närliserakkudes *Hprt* ja inimese rakkudes *HPRT*; käesolevas katsemeetodis viidatakse neile koos kui geenile *Hprt* ning vastavale katsele kui HPRT-katsele) ja ksantiini-guaaniini fosforibosüültransferaasi transgeenis (*gpt*) (vastavale katsele viidatakse kui XPRT-katsele). HPRT- ja XPRT-mutatsioonikatsega tuvastatakse eri geneetilisi muutusi. Asjaolu, et transgeen *gpt* paikneb autosoomil, võimaldab tuvastada peale HPRT-katsega kindlaks tehtavate mutatsioonide (nt aluspaarivahetused, raaminihked, väikesed deletsioonid ja insertioonid) ka suurtest deletsioonidest ja võimalikust mitootilisest rekombinatsioonist põhjustatud mutatsioone, mida HPRT-katsega pole võimalik tuvastada, kuna geen *Hprt* paikneb X-kromosoomil (2, 3, 4, 5, 6, 7). XPRT-katset kasutatakse regulatiivsel eesmärgil praegu vähem kui HPRT-katset.
3. Kasutatud mõisted on esitatud 1. liites.

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

4. *In vitro* katsete puhul tuleb metabolismi aktiveerimiseks üldjuhul kasutada eksogeenset allikat. Eksogeenne metabolismi aktiveerimise süsteem ei võimalda täielikult matkida *in vivo* tingimusi.
5. Tuleks hoiduda kasutamast tingimusi, mille puhul saadakse valepositiivseid tulemusi, mis ei ole põhjustatud uuritava kemikaali vahetust interaktsioonist raku geneetilise materjaliga

(st võib esineda vastastikmõju katsesüsteemiga); sellised tingimused hõlmavad pH või osmolaalsuse muutusi (8, 9, 10), söötme koostisosadega reageerimist (11, 12) ja liiga suurt tsütotoksilisust (13). HPRT-katse puhul loetakse liiga suureks tsütotoksilisuseks punktis 19 määratletud soovitatavat suurimat tsütotoksilisuse määra ületavat tsütotoksilisust.

6. Kui soovitakse saada kavandatud regulatiivsel eesmärgil andmeid segu kohta, tuleks enne katsemeetodi kasutamist kaaluda, kas ja kuidas see võimaldab saada kõnealusele eesmärgile vastavaid asjakohaseid tulemusi. Selline kaalumise ei ole vajalik, kui asjaomase segu hindamine on regulatiivse nõudega ette nähtud.

KATSE PÕHIMÕTE

7. Mutantsed rakud, millel on HPRT-katse puhul kadunud HPRT ensümaatiline aktiivsus ja XPRT-katse puhul XPRT ensümaatiline aktiivsus, on puriini analoogi 6-tioguaaniini tsütostaatilise toime suhtes resistentsed. Rakud, kus on olemas *Hprt* (HPRT-katse puhul) või *gpt* (XPRT-katse puhul), on aga 6-tioguaaniini suhtes tundlikud ning see aine pärsib neis rakkudes ainevahetust ja peatab rakkude edasise jagunemise. Seega on mutantsed rakud võimelised 6-tioguaaniini juuresolekul paljunema, ent normaalsed rakud, kus on olemas *Hprt* (HPRT-katse puhul) või *gpt* (XPRT-katse puhul), seda ei suuda.
8. Rakususpensioon või ühekihiline rakukultuur viiakse sobivaks ajavahemikuks (3–6 tunniks) kokkupuutesse uuritava kemikaaliga – nii koos metabolismi aktiveeriva eksogeense allikaga kui ka ilma selleta (vt punkt 14) – ning seejärel külvatakse rakud ümber, et hinnata tsütotoksilisust ja võimaldada fenotüübi avaldumist enne mutantide selekteerimist (14, 15, 16, 17). Tsütotoksilisust hinnatakse suhtelise elulemuse, st kloonimistõhususe järgi, mis tehakse kindlaks kohe pärast töötlemist ja mida kohandatakse lähtuvalt rakkude arvu võimalikust vähenemisest negatiivse kontrolliga võrreldes (punkt 18 ja 2. liide). Töödeldud kultuure kasvatatakse söötmes rakutüübist sõltuva ajavahemiku vältel, mis on piisav tekkinud mutatsioonide fenotüüpide võimalikult optimaalseks avaldumiseks (tavaliselt vähemalt 7–9 päeva). Fenotüübi avaldumise järgselt külvatakse teadaolev arv rakke muteerumissageduse määramiseks nii söötmesse, mis sisaldab mutantsete kolooniate tuvastamist võimaldavat selektiivainet, kui ka selektiivaineta söötmesse, et teha kindlaks kloonimistõhusus (eluvõimelisus). Sobiva inkubatsiooniperioodi lõppedes kolooniad loendatakse. Muteerumissagedus arvutatakse mutantsete kolooniate arvu põhjal, mida on korrigeeritud lähtuvalt kloonimistõhususest mutantide selekteerimise ajal.

MEETODI KIRJELDUS

Ettevalmistused

Rakud

9. HPRT- ja XPRT-katses kasutatavate rakutüüpide puhul peaks olema tõendatud, et asjaomased rakud on keemiliste mutageenide suhtes tundlikud, nende kloonimistõhusus on suur, neil on püsiv karüotüüp ja nende spontaanse muteerumise sagedus on püsiv. HPRT-katses kõige sagedamini kasutatavate rakkude hulka kuuluvad hiina hamstri rakuliinid CHO, CHL ja V79, hiire lümfoomi rakuliin L5178Y ja inimese lümfoblastoidne rakuliin TK6 (18, 19). XPRT-katses kasutatakse rakuliinist CHO saadud liini AS52, mis sisaldab transgeeni *gpt* ja kust on eemaldatud geen *Hprt* (20, 21); AS52 rakke ei saa kasutada HPRT-katses, kuna *Hprt* on neist eemaldatud. Muude rakuliinide kasutamist tuleks põhjendada ja need peaksid olema valideeritud.
10. Rakuliine tuleks regulaarselt kontrollida, et veenduda modaalse kromosoomiarvu püsivuses ning mükoplasmasaastuse puudumises (22, 23); saastunud rakkude ja muutunud modaalse kromosoomiarvuga rakkude kasutamisest tuleks hoiduda. Tuleks kindlaks teha katseid läbi viivas laboris aluseks võetav tavapärane rakutsükli kestus, mis peaks vastama asjaomaste rakkude kohta avaldatud näitajatele. Samuti tuleks kontrollida spontaanse muteerumise sagedust rakkude tüvikultuuris ja kui muteerumissagedus on vastuvõetamatu, ei tohiks seda tüvikultuuri kasutada.
11. Enne käesoleva meetodi kohases katses kasutamist võib olla vaja puhastada kultuurid olemasolevatest mutantsetest rakkudest; selleks võib kasvatada neid HPRT-katse puhul näiteks HAT-söötmes ja XPRT-katse puhul MPA-söötmes (5, 24) (vt 1. liide). Puhastatud rakud võib krüosäilitada ja seejärel töökultuurina kasutamiseks üles sulatada. Katses võib kasutada värskest sulatatud töökultuuri pärast rakkude arvu tavapärase kahekordistumisaja saavutamist. XPRT-katse puhul tuleks AS52 rakkude tavapärasel kultiveerimisel kasutada tingimusi, millega tagatakse transgeeni *gpt* säilimine (20).

Söötmed ja kultiveerimistingimused

12. Rakukultuuride kasvatamisel tuleks kasutada sobivat söödet ja sobivaid inkubeerimistingimusi (kasvunõud, 5-protsendilise CO₂-sisaldusega niiske atmosfäär, inkubeerimistemperatuur 37 °C). Kultiveerimisel tuleks alati järgida tingimusi, millega tagatakse rakkude püsimine logaritmilises kasvufaasis. On väga oluline valida söötmed ja kasvutingimused nii, et oleks tagatud rakkude optimaalne kasv ekspressiooniperioodil ning optimaalne kloonimistõhusus nii muteerunud kui ka muteerumata rakkude puhul.

Rakukultuuride ettevalmistamine

13. Rakkude paljundamiseks tüvikultuurist külvatakse need söötmesse sellise tihedusega, et rakkude eksponentsiaalne kasv suspensioonis või ühekihilises kultuuris jätkuks kogu töötlemis- ja ekspressiooniperioodi vältel (nt tuleks ühekihiliselt kasvavate rakkude puhul ära hoida konfluentsuse teket).

Metabolismi aktiveerimine

14. Kui kasutatavate rakkude endogeenne metaboliseerimisvõime on ebapiisav, tuleks kasutada eksogeenseid metabolismisüsteeme. Kui ei ole teisiti põhjendatud, soovitatakse üldjuhul kasutada kõige sagedamini rakendatavat süsteemi, mis koosneb näriliste (tavaliselt roti) maksast valmistatud, mitokondrite eemaldamisel saadud fraktsioonist S9, millele on lisatud kofaktoreid ning mida on töödeldud selliste ensüümiinduktoritega nagu Aroclor 1254 (25, 26, 27, 28) või fenobarbitaali ja β -naftoflavooni kombinatsioon (29, 30, 31, 32). Viimati nimetatud kombinatsiooni kasutamine ei ole vastuolus püsivate orgaaniliste saasteainete Stockholmi konventsiooniga (33) ning see on osutunud monooksügenaaside induktorina sama tõhusaks kui Aroclor 1254 (29, 31). Fraktsiooni S9 kasutatakse tavaliselt kontsentratsioonis 1–2 mahuprotsenti, kuid selle kontsentratsiooni lõplikus katsesöötmes võib suurendada kuni 10 mahuprotsendini. Kasutatava eksogeense metabolismi aktiveerimise süsteemi või ensüümiinduktori liigi ja kontsentratsiooni valikut võib mõjutada uuritava aine klass (34, 35, 36).

Uuritava kemikaali ettevalmistamine

15. Enne rakkude töötlemist tuleks tahke uuritav kemikaal lahustada sobivas lahustis ja vajaduse korral tuleks saadud lahust lahjendada (vt punkt 16). Vedelat uuritavat kemikaali võib lisada otse katsesüsteemi või seda enne lisamist lahjendada. Gaasilise või lenduva kemikaali kasutamisel tuleks standardmeetodit asjakohaselt muuta, näiteks viia kemikaaliga töötlemine läbi suletud kultiveerimishõõs (37, 38). Uuritav kemikaal tuleks katseks ette valmistada vahetult enne kasutamist, välja arvatud juhul, kui püsivuse andmetest nähtub, et kemikaali säilitamine on vastuvõetav.

KATSETINGIMUSED

Lahustid

16. Lahusti tuleks valida nii, et oleks tagatud uuritava kemikaali optimaalne lahustumine, kuid lahusti ei mõjutaks samal ajal negatiivselt katse käiku näiteks rakkude kasvukiiruse või uuritava kemikaali omaduste muutmise, kultiveerimishõõsuga reageerimise või metabolismi aktiveerimise süsteemi kahjustamise teel. Esmajärjekorras soovitatakse võimaluse korral kaaluda veepõhise lahusti (või söötme) kasutamist. Tavapäraselt kasutatavad lahustid on näiteks vesi ja dimetüülsulfoksiid. Üldjuhul ei tohiks orgaanilise lahusti sisaldus töötlemiseks kasutatavas lõppsöötmes ületada 1 mahuprotsenti ja veepõhise lahusti (füsioloogilise lahuse või vee) sisaldus 10 mahuprotsenti. Kui kasutatakse tavapärasest erinevat lahustit (nt etanooli või atsetooni), tuleks esitada tõendavad andmed selle sobivuse kohta uuritava kemikaali ja katsesüsteemi puhul ning genotoksilise toime puudumise kohta kasutataval kontsentratsioonil. Selliste tõendavate andmete puudumisel on oluline lisada katsesse kemikaaliga töötlemata kontrollid (vt 1. liide), et tõendada valitud lahustist tuleneva kahjuliku või mutageense toime puudumist.

Tsütotoksilisuse mõõtmine ja kokkupuutekontsentratsioonide valimine

17. Uuritava kemikaali suurima kontsentratsiooni valimisel tuleks hoiduda valimast kontsentratsiooni, mille puhul on võimalik saada valepositiivseid tulemusi, näiteks tulenevalt liiga suurest tsütotoksilisusest (vt punkt 20), söötmes sadenemisest (vt punkt 21) või pH või osmolaalsuse olulisest muutumisest (vt punkt 5). Kui uuritav kemikaal muudab lisamise hetkel oluliselt söötme pH-d, võib pH reguleerimiseks lisada töötlemiseks kasutatavasse lõppsöötmesse puhvrit, et hoida ära valepositiivsete tulemuste saamist ja säilitada sobivad kultiveerimistingimused.
18. Kontsentratsioonide valimisel lähtutakse tsütotoksilisusest ja muudest kaalutlustest (vt punktid 20–22). Ehkki tsütotoksilisuse hindamine eelkatses võib põhikatses kasutatavate kontsentratsioonide täpsemaks kindlakstegemiseks kasulikuks osutuda, ei ole eelkatse tegemine kohustuslik. Põhikatses on tsütotoksilisuse mõõtmine igas kultuuris vajalik ka juhul, kui tsütotoksilisust on eelnevalt juba hinnatud. Tsütotoksilisuse hindamiseks tuleks kasutada suhtelist elulemust, st võrrelda vahetult pärast töötlemist välja külvatud rakkude kloonimise tõhusust, mida on kohandatud rakkude arvu võimaliku vähenemise suhtes töötlemise ajal, kloonimistõhususe kohandatud väärtusega negatiivsete kontrollide puhul, mille elulemuseks loetakse 100 % (vt valem 2. liites).
19. Kemikaali tuleks hinnata vähemalt neljal nõuetekohasuse kriteeriumidele (sobiv tsütotoksilisuse määr, rakkude arv jne) vastaval katsekontsentratsioonil (see ei hõlma lahustiga kontrolli ega positiivseid kontrole). Töötlemisel on soovitatav kasutada iga katsekontsentratsiooni puhul kahte paralleelkultuuri, ent võib kasutada ka suuremat arvu paralleelkultuure või ühteainsat kultuuri. Iga kontsentratsiooni puhul tuleks sõltumatute paralleelkultuuridega saadud tulemused esitada eraldi, kuid andmeanalüüsi jaoks võib need koondada (17). Uuritavate kemikaalide puhul, mille tsütotoksilisus on väike või millel see puudub, sobivad tavaliselt kontsentratsioonid, mis erinevad üksteisest umbes kaks kuni kolm korda. Tsütotoksilisuse esinemisel peaksid valitud katsekontsentratsioonid hõlmama vahemikku tsütotoksilisuse ilmnemise kontsentratsioonist kuni kontsentratsioonideni, mille juures täheldatakse mõõdukat ja väikest või olematut tsütotoksilisust. Paljudel uuritavatel kemikaalidel on toime kontsentratsioonist sõltuvuse kõver järsu tõusuga ning tsütotoksilisuse täieulatuslikuks iseloomustamiseks või kontsentratsioonist sõltuvuse üksikasjalikuks uurimiseks võib olla vaja kasutada üksteisest vähem erinevaid kontsentratsioone ja enam kui nelja kontsentratsiooni, eriti olukorras, kus on vaja teha korduskatse (vt punkt 43). Enam kui nelja kontsentratsiooni kasutamine võib osutuda eriti oluliseks, kui kasutatakse ühteainsat kultuuri.
20. Kui suurima kontsentratsiooni valimisel lähtutakse tsütotoksilisusest, tuleks see kontsentratsioon valida nii, et saavutataks suhteline elulemus 10–20 %. Selliste positiivsete tulemuste tõlgendamisel, mille puhul täheldatav suhteline elulemus on vaid 10 % või väiksem, tuleks olla ettevaatlik (punkt 43).

21. Raskesti lahustuva uuritava kemikaali puhul, mis ei ole tsütotoksiline kontsentratsioonidel, mis on väiksemad kui vähim kontsentratsioon, mille juures kemikaal ei lahustu, peaks suurimal analüüsitaval kontsentratsioonil olema pärast kemikaaliga töötlemise lõppemist täheldatav hägusus või silma või invertmikroskoobiga nähtav sade. Isegi kui tsütotoksilisus avaldub suuremal kontsentratsioonil kui vähim kontsentratsioon, mille juures kemikaal ei lahustu, on soovitatav teha katse ainult ühel sellisel kontsentratsioonil, mille puhul tekib hägusus või nähtav sade, sest sade võib põhjustada katsevigu. Sademe moodustumise kontsentratsiooni puhul tuleb hoolikalt veenduda, et sade ei mõjuta katse käiku. Enne katse alustamist võib olla kasulik määrata kemikaali lahustuvus söötmes.
22. Kui ei täheldata ei sadet ega liigset tsütotoksilisust, peaks suurim katsekontsentratsioon olema vähim järgmistest kontsentratsioonidest: 10 mM, 2 mg/ml või 2 µl/ml (39, 40). Kui uuritava kemikaali koostis ei ole määratav, näiteks kui see on tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal (UVCB) (41), keskkonnast saadud ekstrakt vms, võib juhul, kui ei täheldata kemikaali piisavat tsütotoksilisust, olla vaja selle iga koostisosa kontsentratsiooni suurendamiseks kasutada suuremat maksimumkontsentratsiooni (nt 5 mg/ml). Tuleks siiski märkida, et inimravimite puhul võivad need nõuded olla teistsugused (42).

Kontrollid

23. Iga katserežiimi puhul tuleks kasutada paralleelseid negatiivseid kontrolle (vt punkt 16), mille puhul töötlemiseks kasutatavale söötlele lisatakse vaid lahusti ja kultuure käideldakse muus osas samamoodi kui uuritava kemikaaliga töödeldud kultuure.
24. Paralleelsete positiivsete kontrollide kasutamine on vajalik, et tõendada labori pädevust tuvastada rakendatavale katsemeetodile vastavates tingimustes mutageene ning vajaduse korral veenduda metabolismi eksogeense aktiveerimise süsteemi tõhususes. Positiivsete kontrollide näited on esitatud allpool tabelis 1. Kui see on põhjendatud, võib positiivse kontrollina kasutada mõnda muud ainet. Kuna *in vitro* genotoksilisuse katsed imetajarakkudega on piisavalt standarditud, võib katsetes, kus kasutatakse töötlemist koos metabolismi eksogeense aktiveerimisega ja ilma selleta, kasutada üksnes sellist positiivset kontrolli, mis nõuab metabolismi aktiveerimist. Sel juhul võimaldab kõnealuse üheainsa positiivse kontrolliga saadud tulemus tõendada nii metabolismi aktiveerimise süsteemi toimimist kui ka katsesüsteemi reageerimisvõimet. Iga positiivse kontrolli puhul tuleks kasutada ühte või mitut kontsentratsiooni, mille juures võib eeldada, et saadakse taustaset reprodutseeritavalt ja tuvastatavalt ületavad tulemused, mis võimaldavad tõendada katsesüsteemi tundlikkust, ning samal ajal ei tohiks tulemused olla mõjutatud käesolevas katsemeetodis sätestatud piirmäära ületavast tsütotoksilisusest (vt punkt 20).

Tabel 1. Labori pädevuse hindamiseks ja positiivsete kontrollide valimiseks soovitatavad võrdlusained

Metabolismi aktiveerimise kasutamine	Lookus	Aine ja CASi nr
Metabolismi eksogeenset aktiveerimist ei kasutata	<i>Hprt</i>	Etüülmetaansulfonaat [CASi nr: 62-50-0] Etüülnitrosouurea [CASi nr: 759-73-9] 4-nitrokinoliin-1-oksiid [CASi nr: 56-57-5]
	<i>xprt</i>	Streptonigriin [CASi nr: 3930-19-6] Mitomütsiin C [CASi nr: 50-07-7]
Kasutatakse metabolismi eksogeenset aktiveerimist	<i>Hprt</i>	3-metüülkolantreen [CASi nr: 56-49-5] 7,12-dimetüülbensantratseen [CASi nr: 57-97-6] Benso[a]püreen [CASi nr: 50-32-8]
	<i>xprt</i>	Benso[a]püreen [CASi nr: 50-32-8]

KATSE KÄIK

Uuritava kemikaaliga töötlemine

25. Paljunevaid rakke töödeldakse uuritava kemikaaliga nii metabolismi aktiveerimise süsteemi juuresolekul kui ka ilma selleta. Kokkupuuteperiood peab olema sobiva pikkusega (tavaliselt piisab 3–6 tunnist).
26. Rakkude minimaalse arvu valimisel iga kultuuri (nii kontroll- kui ka töödeldud kultuuride) ja iga katseetapi jaoks tuleks lähtuda spontaanse muteerumise sagedusest. Üldsuunisena tuleks võtta töötlemiseks ja ümberkülvamiseks piisav hulk rakke, et tagada igas katseetapis 10 mutandi spontaanne teke igas kultuuris (17). Spontaanse muteerumise sagedus jääb üldjuhul vahemikku 5 kuni 20×10^{-6} . Kui spontaanse muteerumise sagedus on 5×10^{-6} , on piisava arvu mutantide (vähemalt 10) spontaanse teke tagamiseks ka kultuurides, mida on töödeldud kontsentratsioonil, mille juures töötlemisest tulenev tsütotoksilisus on 90 % (suhteline elulemus on 10 %), vaja võtta töötlemiseks vähemalt 20×10^6 rakku. Peale selle tuleb ekspressiooniperioodi vältel kultiveerida ja mutantide selekteerimiseks välja külvata piisaval arvul rakke (alati vähemalt kaks miljonit rakku) (17).

Fenotüübi avaldumise aeg ja muteerumissageduse mõõtmine

27. Töötlemisperioodi lõppedes kasvatatakse rakke kultuuris, et võimaldada mutantse fenotüübi avaldumist. Uute tekkinud *Hprt*- ja *xprt*-mutantide fenotüübi optimumilähedaseks avaldumiseks piisav miinimumperiood on tavaliselt 7–9 päeva (43, 44). Selle ajavahemiku vältel külvatakse rakke regulaarselt ümber, et tagada nende eksponentsiaalne kasv. Pärast fenotüübi avaldumist külvatakse rakud nii selektiivainet 6-tioguaaniini sisaldavasse kui ka ilma selektiivaineta söötmesse, et teha kindlaks vastavalt mutantide arv ja selekteerimisaegne kloonimistõhusus. Sellisel külvamisel võib ühekihiliste kultuuride puhul kasutada tase ja suspensioonina kasvavate rakkude puhul

mikroitiiterplaate. Mutantide selekteerimiseks tuleks rakud välja külvata sellisel tihedusel, millega tagatakse optimaalne mutantide tuvastamine (st metaboolne koostöö on takistatud) (17). Rakke kasvatatakse kolooniate optimaalseks kasvuks sobiva ajavahemiku vältel (nt 7–12 päeva) ning seejärel loendatakse kolooniad. Muteerumissagedus arvutatakse mutantsete kolooniate arvu põhjal, mida on korrigeeritud lähtuvalt kloonimistõhususest mutantide selekteerimise ajal (valemid on esitatud 2. liites).

Labori pädevus

28. Laboris peaks enne katsemeetodi rutiinset kasutamist olema katse läbiviimiseks piisava kogemuse omandamiseks tehtud katseseeria positiivse kontrollina kasutatud võrdlusainetega, millel on eri toimemehhanismid (tabelis 1 loetletud ainete hulgast valitud ained, millest vähemalt üks vajab toimimiseks metabolismi aktiveerimist ja vähemalt üks seda ei vaja), ning eri negatiivsete kontrollidega (eri lahustite/kandeainetega). Selliste positiivsete ja negatiivsete kontrollidega saadud tulemused peaksid olema kooskõlas kirjanduse andmetega. Seda nõuet ei kohaldata kogemusega laborite puhul, kus on olemas varasemate tulemuste andmebaas, nagu on määratletud punktides 30–33.
29. Positiivseks kontrolliks valitud aineid (vt tabel 1 punktis 25) tuleks uurida nii aktiveeritud kui ka aktiveerimata metabolismi tingimustes, et tõendada mutageensete kemikaalide tuvastamise ja metabolismi aktiveerimise süsteemi tõhususe kindlakstegemise võimekust, samuti rakkude kasvutingimuste sobivust töötlemise, fenotüübi avaldumise ja mutantide selekteerimise ajal ning kasutatavate hindamismeetodite asjakohasust. Kõnealuste valitud ainete puhul tuleb katsesüsteemi tundlikkuse ja dünaamilise kasutusulatus sobivuse tõendamiseks valida kontsentratsioonivahemikud nii, et oleks võimalik saada reprodutseeritavaid tausttaseme ületavaid kontsentratsioonist sõltuvaid tulemusi.

Varasemad andmed kontrollide kohta

30. Laboris tuleks kindlaks teha:
 - positiivse kontrolliga saadud varasemate tulemuste vahemik ja jaotus,
 - negatiivsete kontrollidega (töötlemata rakud, lahustiga kontroll) saadud varasemate tulemuste vahemik ja jaotus.
31. Kui negatiivseid kontrolle iseloomustavate tulemuste jaotuse kindlakstegemiseks kogutakse andmeid esmakordselt, peaksid paralleelsete negatiivsete kontrollidega saadud andmed olema kooskõlas kontrolle käsitlevate avaldatud andmetega (22). Kontrollidega saadud tulemuste jaotuse lähteandmetele üha uute katseandmete lisandumisel peaksid paralleelsete negatiivsete kontrollide puhul täheldatavad tulemused jääma ideaaljuhul selle jaotuse usaldusvahemikku usaldusnivool 95 % (17, 45, 46).
32. Laboris negatiivsete kontrollidega saadud varasemate tulemuste andmebaas peaks algselt hõlmama vähemalt 10 katse andmeid, kuid soovitatavalt peaks see sisaldama vähemalt 20

võrreldavates tingimustes tehtud katse andmeid. Laboris tuleks kasutada kvaliteedikontrolli meetodeid, näiteks kontrollkaarte (nt vastavuse kontrollkaardid või X-tüüpi kontrollkaardid (47)), et teha kindlaks, kui suures ulatuses positiivsete ja negatiivsete kontrollide andmed varieeruvad, ja tõendada, et laboris kasutatav meetodika on usaldusväärne (46).

Varasemate katseandmete kogumist ja kasutamist käsitlevaid täiendavaid soovitusi (varasematele andmetele uute tulemuste lisamise või lisamata jätmise kriteeriumid ja konkreetse katse andmete vastuvõetavuse kriteeriumid) võib leida kirjandusest (45).

33. Negatiivsete kontrollidega saadud andmed peaksid hõlmama muteerumissagedust ühes või soovitatavalt mitmes paralleelses kultuuris, nagu on kirjeldatud punktis 23. Paralleelsete negatiivsete kontrollidega saadud tulemused peaksid ideaaljuhul jääma laboris negatiivsete kontrollidega saadud varasemate tulemuste jaotuse usaldusvahemikku usaldusnivool 95 % (17, 45, 46). Kui paralleelsete negatiivsete kontrollidega saadud tulemused jäävad väljapoole kõnealust usaldusvahemikku usaldusnivool 95 %, võivad need olla kontrollidega saadud varasemate tulemuste jaotuses arvessevõtmiseks vastuvõetavad juhul, kui tegemist ei ole äärmuslike väärtustega ning on tõendatud, et katsesüsteem on usaldusväärne (vt eespool), ja puuduvad tõendid selle kohta, et tegemist on tehnilise vea või inimliku eksimusega.
34. Katsemeetodi mis tahes muudatuse puhul tuleks kaaluda, kas see mõjutab katseandmete vastavust laboris kontrollidega varem saadud olemasolevatele andmetele. Iga olulise mittevastavuse korral tuleks luua uus kontrollidega saadud varasemate tulemuste andmebaas.

ANDMED JA ARUANDLUS

Tulemuste esitamine

35. Esitatavad tulemused peaksid hõlmama kõiki vajalikke andmeid suhtelise elulemuse kaudu väljendatud tsütotoksilisuse arvutamiseks. Andmed nii töödeldud kultuuride kui ka kontrollkultuuride kohta peaksid hõlmama rakkude arvu töötluse lõppedes, vahetult pärast töötlemist välja külvatud rakkude arvu ja kolooniate arvu (või mikrotiiterplaadi kasutamisel nende kannude arvu, milles kolooniad puudusid). Suhteline elulemus igas kultuuris tuleks esitada protsentuaalse osakaaluna väärtusest, mis on saadud paralleelse lahustit sisaldava kontrolli puhul (mõisted on määratletud 1. liites).
36. Esitatavad tulemused peaksid samuti hõlmama kõiki vajalikke andmeid muteerumissageduse arvutamiseks. Andmed nii töödeldud kultuuride kui ka kontrollkultuuride kohta peaksid hõlmama 1) koos selektiivainega ja ilma selektiivaineta välja külvatud rakkude arvu (mutantide selekteerimiseks rakkude väljakülvamise hetkel) ning 2) selektiivaine juuresolekul ja ilma selleta kasvanud kultuurides loetletud kolooniate arvu (või mikrotiiterplaadi kasutamisel nende kannude arvu, milles kolooniad puudusid). Muteerumissagedus arvutatakse selektiivaine juuresolekul tekkinud mutantsete kolooniate

arvu põhjal, mida on korrigeeritud lähtuvalt selektiivaineta kultuurides täheldatud kloonimistõhususest. Muteerumissagedus tuleks esitada muteerunud rakkude arvuna miljoni eluvõimelise raku kohta (mõisted on määratletud 1. liites).

37. Andmed tuleks esitada iga kultuuri kohta eraldi. Peale selle tuleks kõik andmed esitada kokkuvõtlikult tabeli kujul.

Katse nõuetekohasuse kriteeriumid

38. Katse nõuetekohaseks tunnistamine põhineb järgmistel kriteeriumidel:

- paralleelse negatiivse kontrolliga saadud tulemused loetakse laboris negatiivsete kontrollidega varem saadud tulemuste andmebaasi lisamiseks vastuvõetavaks, nagu on kirjeldatud punktis 33;
- paralleelsete positiivsete kontrollidega (vt punkt 24) saadud tulemused peaksid olema võrreldavad positiivsete kontrollidega varem saadud tulemustega ning saadud väärtused peaksid paralleelset negatiivset kontrolli iseloomustavate väärtustega võrrelduna olema statistiliselt oluliselt suuremad;
- katse on tehtud kahes eri tingimuses (st metabolismi aktiveerimisega ja ilma selleta), välja arvatud juhul, kui neist ühe puhul on saadud positiivsed tulemused (vt punkt 25);
- rakkude ja kontsentratsioonide arv on analüüsimiseks piisav (punktid 25, 26 ja 19);
- suurima kontsentratsiooni valimise kriteeriumid on kooskõlas punktides 20, 21 ja 22 kirjeldatud kriteeriumidega.

Tulemuste hindamine ja tõlgendamine

39. Kui kõik katse nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, käsitatakse uuritava kemikaaliga saadud tulemust selgelt positiivsena, kui mis tahes kasutatud katsetingimustes on täidetud järgmised kriteeriumid:

- vähemalt ühel katsekontsentratsioonil täheldatakse saadud väärtuse statistiliselt olulist suurenemist paralleelse negatiivse kontrolliga võrreldes;
- sobiva trenditestiga hindamisest nähtub, et see suurenemine on kontsentratsioonist sõltuv;
- mis tahes saadud tulemus jääb väljapoole laboris negatiivsete kontrollidega varem saadud tulemuste jaotust (nt väljapoole Poissoni jaotuse usaldusvahemikku usaldusnivool 95 %; vt punkt 33).

40. Kui kõik need kriteeriumid on täidetud, käsitatakse uuritavat kemikaali võimelisena põhjustama selles katsesüsteemis geenimutatsioone kultiveeritud imetajarakkudes. Soovitused kõige asjakohasemate statistiliste meetodite kohta on esitatud kirjanduses (46, 48).

41. Kui kõik katse nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, loetakse uuritava kemikaaliga saadud tulemus selgelt negatiivseks, kui kõikides kasutatud katsetingimustes on täidetud järgmised kriteeriumid:

- ühelgi katsekontsentratsioonil ei täheldata saadud väärtuse statistiliselt olulist suurenemist paralleelse negatiivse kontrolliga võrreldes;
- sobiva trenditestiga hindamisest nähtub, et kontsentratsioonist sõltuvat väärtuse suurenemist ei esine;
- kõik tulemused jäävad laboris negatiivsete kontrollidega varem saadud tulemuste jaotusvahemikku (nt Poissoni jaotuse usaldusvahemikku usaldusnivool 95 %; vt punkt 33).

Sel juhul käsitatakse uuritavat kemikaali võimetuna põhjustama selles katsesüsteemis geenimutatsioone kultiveeritud imetajarakkudes.

42. Selgelt positiivset või negatiivset tulemust ei ole vaja üle kontrollida.

43. Juhul, kui tulemus ei ole eespool kirjeldatu kohaselt selgelt negatiivne ega selgelt positiivne või kui eesmärk on aidata kindlaks teha tulemuse bioloogiline olulisus, tuleks andmete hindamiseks kasutada eksperdihinnangut ja/või täiendavaid uuringuid. Sellises olukorras võib olla kasulik teha korduskatse ja muuta vajaduse korral katsetingimusi (nt kontsentratsiooniintervalli või metabolismi aktiveerimise tingimusi – S9 kontsentratsiooni või S9 päritolu).

44. Harvadel juhtudel ei võimalda andmed isegi pärast täiendavaid uuringuid teha järeldust selle kohta, kas tulemus on positiivne või negatiivne. Seepärast tuleks sel juhul lugeda uuritava kemikaaliga saadud tulemus ebaselgeks (seda tõlgendatakse positiivse ja negatiivse tulemuse võrdvõimalikkusena).

Katseprotokoll

45. Katseprotokollis tuleks esitada järgmine teave.

Uuritav kemikaal:

- allikas, partii number, aegumiskuupäev, kui on olemas;
- uuritava kemikaali püsivus, kui see on teada;
- uuritava kemikaali lahustuvus ja püsivus lahustis, kui see on teada;
- vastavalt vajadusele mõõtmistulemused söötme pH ja osmolaalsuse ning sademe tekke kohta pärast uuritava kemikaali lisamist;

ühest koostisosast koosnev aine:

- füüsiline välimus, lahustuvus vees ja muud asjakohased füüsikalised-keemilised omadused;

- kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus, CASi number, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem, puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne;

mitut koostisosa sisaldav aine, UVCB või segu:

- võimalikult täpne omaduste kirjeldus lähtuvalt koostisosade keemilisest määratlusest (vt eespool), kvantitatiivsest sisaldusest ja asjakohastest füüsikalise-keemilistest omadustest.

Lahusti:

- lahusti valimise põhjendus;
- lahusti protsentuaalne sisaldus lõppsöötmes.

Rakud:

labori tüvikultuuride puhul:

- rakuliinide tüüp ja päritolu;
- võimaluse korral ümberkülvide arv ja laboris rakuliinidega tehtud varasemate toimingute andmed;
- karüotüübi andmed ja/või kromosoomide modaalarv;
- rakukultuuride säilitamise meetodid;
- teave mükoplasma puudumise kohta;
- rakkude arvu kahekordistumise aeg.

Katsetingimused:

- kontsentratsioonide ja rakukultuuride arvu valiku põhjendus, sealhulgas näiteks andmed tsütotoksilisuse ja lahustuvuspiirangute kohta;
- söötme koostis, CO₂ kontsentratsioon, niiskusesisaldus;
- uuritava kemikaali kontsentratsioon, väljendatuna lõppkontsentratsioonina söötmes (nt µg/ml või mg/ml või mM);
- söötmele lisatud lahusti ja uuritava kemikaali kontsentratsioon (ja/või ruumala);
- inkubeerimistemperatuur;
- inkubeerimisaeg;
- töötamise kestus;
- rakkude tihedus töötamise ajal;

- metabolismi aktiveerimise süsteemi liik ja koostis (fraktsiooni S9 allikas, S9 segu valmistamise meetod, S9 segu ja S9 kontsentratsioon või ruumala lõppsöötmes, S9 kvaliteedikontrolli andmed);
- positiivse või negatiivse kontrollina kasutatud ained ja nende lõppkontsentratsioonid iga töötlemistingimuse puhul;
- ekspressiooniperioodi pikkus (samuti väljakülvatud rakkude arv ning vajaduse korral teave ümberkülvide ja söötmevahetusrežiimi kohta);
- selektiivaine identimisandmed ja kontsentratsioon;
- katsete nõuetekohasuse kriteeriumid;
- eluvõimeliste ja muteerunud rakkude loendamiseks kasutatud meetodid;
- tsütotoksilisuse mõõtmiseks kasutatud meetodid;
- muu täiendav asjakohane teave tsütotoksilisuse ja kasutatud meetodi kohta;
- väljakülvamisele järgneva inkubeerimise kestus;
- kriteeriumid, mille alusel uuringutulemused loetakse positiivseks, negatiivseks või ebaselgeks;
- pH, osmolaalsuse ja sademe määramiseks kasutatud meetodid.

Tulemused:

- töödeldud rakkude arv ja ümberkülvatud rakkude arv igas kultuuris;
- tsütotoksilisuse andmed ja vajaduse korral muud tähelepanekud;
- sadenemise ilmingud ja nende täheldamise aeg;
- selektiivainega ja selektiivaineta söötmesse külvatud rakkude arv;
- kolooniate arv selektiivaineta söötmes ja resistentsete kolooniate arv selektiivainega söötmes ning vastav muteerumissagedus;
- võimaluse korral andmed kontsentratsioonist sõltuvuse kohta;
- andmed paralleelsete negatiivsete (lahustiga) kontrollide ja positiivsete kontrollide kohta (kontsentratsioonid ja lahustid);
- negatiivsete (lahustiga) kontrollide ja positiivsete kontrollidega varem saadud andmed, sealhulgas väärtusevahemikud, keskvaartused, standardhälbed ja usaldusvahemikud (nt usaldusnivool 95 %), samuti andmepunktide arv;
- statistilise analüüsi tulemused (iga kultuuri kohta eraldi ja vajaduse korral paralleelkultuuride koondandmed) ja vajaduse korral p-väärtused.

Tulemuste arutelu

Järeldused

KIRJANDUS

- (1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014–2015. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 238. OECD, Pariis.
- (2) Moore, M. M., DeMarini, D. M., DeSerres, F. J., ja Tindall, K. R. (toim.) (1987). Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- (3) Chu, E. H. Y., ja Malling, H. V. (1968). Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 61: 1306–1312.
- (4) Moore, M. M., Harrington-Brock, K., Doerr, C. L., ja Dearfield, K. L. (1989). Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci. *Mutagenesis* 4: 394–403.
- (5) Aaron, C. S., ja Stankowski, L. F. Jr. (1989). Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates. *Mutat. Res.* 223: 121–128.
- (6) Aaron, C. S., Bolcsfoldi, G., Glatt, H. R., Moore, M., Nishi, Y., Stankowski, L., Theiss, J., ja Thompson, E. (1994). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. *Mutat. Res.* 312: 235–239.
- (7) Li, A. P., Gupta, R. S., Heflich, R. H., ja 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. *Mutat. Res.* 196, 17–36.
- (8) Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M., Brusick, D., Ashby, J., ja Myhr, B. C. (1991). Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutat. Res.* 257: 147–204.
- (9) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I., ja Okumura, K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. *Mutat. 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., ja Marzin, D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. *Environ. Mol. Mutagen.* 49: 439–452.
- (12) Long, L. H., Kirkland, D., Whitwell, J., ja 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. *Mutat. Res.* 634: 177–183.
- (13) Kirkland, D., Aardema, M., Henderson, L., ja 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. *Mutat. 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., ja Yang, L. L. (1987). A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay. *Mutat. Res.* 189: 135–141.
- (15) Liber, H. L., Yandell, D. W., ja 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. *Mutat. Res.* 216: 9–17.
- (16) Stankowski, L. F. Jr., Tindall, K. R., ja 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. *Mutat. Res.* 160: 133–147.
- (17) Arlett, C. F., Smith, D. M., Clarke, G. M., Green, M. H. L., Cole, J., McGregor, D. B., ja Asquith, J. C. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. Våljaandes: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Kirkland, D. J. (toim.), Cambridge University Press. Lk 66–101.
- (18) Hsie, A. W., Casciano, D. A., Couch, D. B., Krahn, D. F., O'Neill, J. P., ja 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. *Mutat. 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. *Mutat. Res.* 85: 165–175.
- (20) Tindall, K. R., Stankowski, L. F. Jr., Machanoff, R., ja 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., ja Schenley, R. L. (1986). Evidence for Reactive Oxygen Species Inducing Mutations in Mammalian Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 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., ja Kirkland, D. J. (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Pooleliolev käsikiri.)
- (23) Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Hay, R., Merten, O. W., Price, A., Schechtman, L., Stacey, G., ja Stokes, W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. *Altern. Lab. Anim.* 33: 261–287.
- (24) Rosen, M. P., San, R., H., C., ja Stich, H. F. (1980). Mutagenic Activity of Ascorbate in Mammalian Cell Cultures. *Cancer Lett.* 8: 299–305.
- (25) Natarajan, A. T., Tate, A. D., Van Buul, P. P. W., Meijers, M., ja 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. *Mutat. Res.* 37: 83–90.
- (26) Abbondandolo, A., Bonatti, S., Corti, G., Fiorio, R., Loprieno, N., ja Mazzaccaro, A. (1977). Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine. *Mutat. Res.* 46: 365–373.
- (27) Ames, B. N., McCann, J., ja Yamasaki, E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. *Mutat. Res.* 31: 347–364.
- (28) Maron, D. M., ja Ames, B. N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutat. Res.* 113: 173–215.
- (29) Elliott, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M., ja Wolf, R. C. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. *Mutagenesis* 7: 175–177.
- (30) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K., ja Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. Väljaandes: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. de Serres, F. J., Fouts, J. R., Bend, J. R., ja Philpot, R. M. (toim.), Elsevier, North-Holland. Lk 85–88.

- (31) Ong, T.-M., Mukhtar, M., Wolf, C. R., ja 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., ja 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). Püsivate orgaaniliste saasteainete Stockholmi konventsioon. Ühinenud Rahvaste Organisatsiooni Keskkonnaprogramm (UNEP). Kättesaadav aadressil [<http://www.pops.int.html>].
- (34) Tan, E.-L., ja 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. *Mutat. Res.* 84: 147–156.
- (35) O'Neill, J. P., Machanoff, R., San Sebastian, J. R., ja Hsie, A. W. (1982). Cytotoxicity and Mutagenicity of Dimethylnitrosamine in Cammalian Cells (CHO/HGPRT system): Enhancement by Calcium Phosphate. *Environ. Mutagen.* 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. Mutagen.* 6: 539–544.
- (37) Krahn, D. F., Barsky, F. C., ja McCooey, K. T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. Väljaandes: Genotoxic Effects of Airborne Agents. Tice, R. R., Costa, D. L., ja Schaich, K. M. (toim.), New York, Plenum. Lk 91–103.
- (38) Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P., ja Brooks, A. L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. *Environ. Mutagen.* 5: 795–801.
- (39) OECD (2014). Dokument, millega toetatakse OECD katsejuhendite programmi riiklike koordinaatorite tööühma otsust rakendada imetajarakkudega tehtavate *in vitro* genotoksilisuse katsete puhul (katsejuhendid nr 473, 476 ja 487) suurima kontsentratsiooni valimise muudetud kriteeriume. Taotluse korral kättesaadav Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioonist.
- (40) Brookmire, L., Chen, J. J., ja Levy, D. D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay. *Environ. Mol. Mutagen.* 54: 36–43.

- (41) USA Keskkonnakaitseameti kemikaaliohutuse ja reostuse ennetamise büroo (2011). Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances.
- (42) USA Toidu- ja Ravimiamet (2012). International Conference on Harmonisation; Guidance on S2 (R1) Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use. Kättesaadav aadressil [<https://federalregister.gov/a/2012-13774>].
- (43) O'Neill, J. P., ja Hsie, A. W. (1979). Phenotypic Expression Time of Mutagen-Induced 6-thioguanine resistance in Chinese hamster ovary cells (CHO/HGPRT system). *Mutat. Res.* 59: 109–118.
- (44) Chiewchanwit, T., Ma, H., El Zein, R., Hallberg, L., ja Au, W. W. (1995). Induction of Deletion Mutations by Methoxyacetaldehyde in Chinese Hamster Ovary (CHO)-AS52 cells. *Mutat. Res.* 1335(2): 121–128.
- (45) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H. J., ja Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data. *Mutat. Res.* 723: 87–90.
- (46) OECD (2014). Statistical Analysis Supporting the Revision of the OECD Test Guidelines on Genotoxicity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 198. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (47) Richardson, C., Williams, D. A., Allen, J. A., Amphlett, G., Chanter, D. O., ja Phillips, B. (1989). Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays. Väljaandes: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Kirkland, D. J. (toim.), Cambridge University Press, Cambridge. Lk 141–154.
- (48) Fleiss, J. L., Levin, B., ja Paik, M. C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions. Kolmas väljaanne. John Wiley & Sons, New York.

1. liide

MÕISTED

Aluspaarivahetust põhjustav mutageen – kemikaal, mis kutsub esile aluspaari vahetuse DNAs.

Fenotüübi avaldumise aeg – töötlusele järgnev aeg, mille vältel geneetiline muutus kinnistub genoomis ja mis tahes varem esinenud geeniproduktide sisaldus väheneb nii palju, et asjaomane fenotüübiline tunnus muutub.

Genotoksilisus – üldmõiste, mis hõlmab DNA ja kromosoomide mis tahes liiki kahjustusi, sealhulgas DNA-ahela katkemisi, adukte, ümberkorraldusi, mutatsioone, kromosoomiaberratsioone ja aneuploidsust. Genotoksiline mõju ei väljendu alati mutatsiooni või püsiva kromosoomikahjustusena.

HAT-sööde – sööde, mis sisaldab hüpoksantiini, aminopteriini ja tümidiini ning mida kasutatakse *Hprt*-mutantide selekteerimiseks.

Kemikaal – aine või segu.

Kloonimistõhusus – väikesel tihedusel välja külvatud rakkude hulgas esinevate selliste rakkude protsentuaalne osakaal, mis on võimelised moodustama loendatava koloonia.

Kontsentratsioon – tähistab uuritava kemikaali lõppkontsentratsiooni söötmes.

Lahustiga kontroll – üldmõiste, millega tähistatakse kontrollkultuuri, kuhu on lisatud üksnes uuritava kemikaali lahustamiseks kasutatud lahustit.

Maksafraktsioon S9 – maksahomogenaadi supernatant, mis on saadud pärast tsentrifuugimist 9000 g juures, st maksa toorekstrakt.

Mitootiline rekombinatsioon – mitoosi ajal homologsete kromatiidide vahel toimuv rekombinatsioon, millega võib kaasneda DNA kahe ahela katkemine või heterosügootsuse kadu.

MPA-sööde – sööde, mis sisaldab ksantiini, adeniini, tümidiini, aminopteriini ja mükofenoolhapet ning mida kasutatakse *xprt*-mutantide selekteerimiseks.

Mutageensus – omadus, mis põhjustab pärilikke muutusi geenide DNA aluspaaride järjestuses või kromosoomide struktuuris (kromosoomiaberratsioonid).

Muteerumissagedus – täheldatud mutantsete kolooniate arvu ja selektiivsöötmesse külvatud rakkude arvu suhe pärast selekteerimisaegse kloonimistõhususe (või elulemuse) suhtes korrigeerimist.

Päripidine mutatsioon – mutatsioon, mille puhul algne geen võtab mutantse vormi ja mille

tulemusena muutub või kaob asjaomase kodeeritud valgu ensümaatiline aktiivsus või muu funktsioon.

Raaminihet põhjustav mutageen – kemikaal, mille mõjul lisatakse DNA molekuli või eemaldatakse sealt üks või mitu aluspaari.

S9 segu – maksafraktsiooni S9 ja metaboolsete ensüümide aktiivsuse tagamiseks vajalike kofaktorite segu.

Suhteline elulemus – näitaja, mille kaudu väljendatakse töötlustest tulenevat tsütotoksilisust. Suhteline elulemus on vahetult pärast töötlemist välja külvatud rakkude kloonimise tõhusus, kohandatuna rakkude arvu võimaliku vähenemise suhtes töötlemise käigus ja võrrelduna kloonimistõhususega negatiivsete kontrollide puhul, mille elulemuseks loetakse 100 %.

Tsütotoksilisus – käesoleva katsemeetodi kohaste katsete puhul on tsütotoksilisus määratletud kui töödeldud rakkude suhtelise elulemuse vähenemine negatiivse kontrolliga võrreldes (vt asjaomane konkreetne punkt).

Töötlemata kontroll – kultuur, mida ei ole töödeldud (st ei uuritava kemikaali ega lahustiga), kuid mida käideldakse samal viisil kui uuritava kemikaaliga töödeldud kultuure ning nendega samaaegselt.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

UVCB – tundmatu või muutuva koostisega kemikaal, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal.

2. liide**VALEMID TSÜTOTOKSILISUSE JA MUTEERUMISSAGEDUSE HINDAMISEKS**

Tsütotoksilisuse hindamiseks kasutatakse suhtelist elulemust, mis on määratletud kui vahetult pärast töötlemist välja külvatud rakkude kloonimise tõhusus, kohandatud rakkude arvu võimaliku vähenemise suhtes töötlemise käigus ja võrrelduna kohandatud kloonimistõhususega negatiivsete kontrollide puhul, mille elulemuseks loetakse 100 % (suhtelise elulemuse valem on esitatud allpool).

Uuritava kemikaaliga töödeldud kultuuri kohandatud kloonimistõhusus arvutatakse järgmiselt:

$$\text{kohandatud kloonimistõhusus} = \frac{\text{rakkude arv pärast töötlemist}}{\text{rakkude arv enne töötlemist}}.$$

Uuritava kemikaaliga töödeldud kultuuri suhteline elulemus arvutatakse järgmiselt:

$$\text{suhteline elulemus} = \frac{\text{kohandatud kloonimistõhusus töödeldud kultuuris}}{\text{kohandatud kloonimistõhusus lahustiga kontrollis}} \times 100.$$

Muteerumissagedus on mutantsete kolooniate kloonimistõhusus selektiivsöötmes, jagatuna sama kultuuri puhul mõõdetud selekteerimisaegse kloonimistõhususega selektiivaineta söötmes.

$$\text{Muteerumissagedus} = \frac{\text{mutantsete kolooniate kloonimistõhusus selektiivsöötmes}}{\text{kloonimistõhususega selektiivaineta söötmes}}$$

Kui kloonimistõhususe hindamiseks kasutatakse tasse, siis:

$$\text{kloonimistõhusus} = \text{kolooniate arv} / \text{välja külvatud rakkude arv}.$$

Kui kloonimistõhususe hindamiseks kasutatakse mikrotiiterplaate, siis iseloomustab kolooniate arvu mikrotiiterplaadi kannu kohta Poissoni jaotus.

$$\text{Kloonimistõhusus} = -\ln P(0) / \text{välja külvatud rakkude arv kannu kohta},$$

kus $-\ln P(0)$ on tühjade kannude tõenäoline arv külvamiseks kasutatud kannude hulgas ning on kirjeldatav valemiga

$$\ln P(0) = -\ln (\text{tühjade kannude arv} / \text{külvamiseks kasutatud kannude arv}).$$

3) B osas asendatakse peatükk B.22 järgmisega:

„B.22. DOMINANTSE LETAALSE MÕJU KATSE NÄRILISTEGA

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 478 (2016). Katsemeetodeid vaadatakse korrapäraselt läbi, et võtta arvesse teaduse arengut, muutuvaid regulatiivseid vajadusi ja loomade heaoluga seotud kaalutlusi. Käesolevas katsemeetodi muudetud versioonis kajastub selle meetodi kasutamisel saadud enam kui kolmekümne aasta pikkune kogemus, samuti annab see võimaluse lõimida või kombineerida seda meetodit muude mürgisuse hindamise meetoditega, mida kasutatakse näiteks arengu-, reproduktiiv- ja genotoksilisuse uurimiseks. Siiski on see katsemeetod sellega seotud piirangute ja suure arvu loomade kasutamise vajaduse tõttu ette nähtud kasutamiseks mitte peamise, vaid pigem täiendava katsemeetodina, mida võib kasutada üksnes juhul, kui regulatiivsetest nõuetest tulenevalt ei ole sellele alternatiivi. Mürgisuse hindamise meetodite kasutamine kombineerituna võimaldab säästa suure arvu mürgisuskatsetes kasutatavaid loomi. OECD on välja töötanud dokumendi, milles on esitatud kokkuvõtlik teave geneetilise toksikoloogia valdkonna katsete kohta ning ülevaade genotoksilisust käsitlevates OECD katsejuhendites tehtud viimastest muudatustest (1).
2. Dominantse letaalse mõju katse eesmärk on uurida, kas kemikaal põhjustab mutatsioone, mille tagajärjeks on kromosoomiaberratsioonid idurakkudes. Peale selle on kõnealune katse oluline genotoksilisuse hindamiseks, sest ehkki *in vivo* metabolismi, farmakokineetika ja DNA reparatsiooni protsessidega seotud tegurid võivad liigiti varieeruda, on need aktiivsed ja aitavad kaasa vastusreaktsiooni kujunemisele. Dominantse letaalse mutatsiooni mõju ilmnemine pärast uuritava kemikaaliga kokkupuudet osutab asjaolule, et kemikaal on mõjutanud katselooma reproduktiivkudet.
3. Dominantne letaalne mutatsioon põhjustab embrüo või loote surma. Dominantse letaalse mutatsiooni mõju ilmnemine pärast uuritava kemikaaliga kokkupuudet osutab asjaolule, et kemikaal on mõjutanud katselooma idurakke.
4. Dominantse letaalse mõju katse on kasulik *in vivo* somaatilistel lõppnäitajatel põhinevate katsete positiivsete tulemuste kinnitamiseks ning selle lõppnäitaja võimaldab asjakohaselt hinnata ohtu inimesele ja sugurakkude kaudu geneetiliste haiguste edasikandumise riski. Ent kuna see katse nõuab suure arvu loomade kasutamist ja on tömahukas, on selle läbiviimine väga kulukas ja aeganõudev. Kuna spontaansete dominantsete letaalsete mutatsioonide tekkesagedus on küllalt suur, on meetodi tundlikkus muteerumissageduse väikese tõusu tuvastamisel üldjuhul piiratud.
5. Põhimõistete määratlused on esitatud 1. liites.

LÄHTEKAALUTLUSED

6. Katse viiakse kõige sagedamini läbi hiirtega (2, 3, 4), kuid mõnel juhul, kui see on teaduslikult põhjendatud, võib olla asjakohane kasutada mõnda muud liiki, näiteks rotte (5, 6, 7, 8). Dominantset letaalist mõju põhjustavad üldjuhul suured kromosoomiaberratsioonid (struktuursed ja arvulised muutused) (9, 10, 11), ent ei saa välistada ka geenimutatsioone. Dominantne letaalne mutatsioon on mutatsioon, mis esineb juba idurakus või kinnistub pärast viljastumist varajases embrüostaadiumis ja mis ei põhjusta gameedi talitlushäireid, kuid on viljastatud munarakule või arenevale embrüole letaalne.
7. Iga isaslooma paaritatakse sobivate ajavahemike järel järgemööda varem paaritumata emasloomadega. Töötlemisjärgsete paaritamiste arv sõltub dominantse letaalse mõju katse lõppeesmärgist (punkt 23) ja peaks võimaldama tagada, et dominantset letaalist mõju hinnatakse isaslooma idurakkude küpsemise kõikide etappide lõikes (12).
8. Kui on tõendeid selle kohta, et uuritav kemikaal või selle metaboliit/metaboliidid ei jõua munandisse, ei ole käesoleva katsemeetodi kasutamine asjakohane.

KATSE PÕHIMÕTE

9. Üldpõhimõtte kohaselt viiakse isasloomad pärast sobiva kokkupuuteviisi valimist uuritava kemikaaliga kokkupuutesse ning neid paaritatakse varem paaritumata töötlemata emasloomadega. Teatava intervalliga järjestikuste paaritamiste teel on võimalik vaadelda eri tüüpi idurakke. Paaritamisele järgneva sobiva ajavahemiku möödudes surmatakse emasloomad humaanselt ning uuritakse nende emakat, et teha kindlaks pesastunud embrüote ning elus ja surnud embrüote arv. Uuritava kemikaali dominantse letaalse mõju tuvastamiseks võrreldakse pesastunud elus embrüote arvu emaslooma kohta kemikaaliga töödeldud rühmas ja kandeainega/lahustiga töödeldud kontrollide rühmas. Pesastunud surnud embrüote arvu suurenemine emaslooma kohta kemikaaliga töödeldud rühmas kontrollrühmaga võrrelduna osutab uuritavast kemikaalist põhjustatud pesastumisejärgsele embrüote kaole. Pesastumisejärgse embrüote kao arvutamiseks võrreldakse pesastunud surnud embrüote arvu ja pesastunud embrüote üldarvu suhet kemikaaliga töödeldud rühmas ja kontrollrühmas. Pesastumiseelse embrüote kao hindamiseks võib lahutada kollakehade arvust pesastunud embrüote üldarvu või võrrelda pesastunud embrüote üldarvu emaslooma kohta kemikaaliga töödeldud rühmas ja kontrollrühmas.

LABORI PÄDEVUSE TÕENDAMINE

10. Käesoleva meetodi kasutamise pädevuse kinnitamiseks tuleks tõendada võimekust reprodutseerida dominantsete letaalsete mutatsioonide esinemissageduse kohta avaldatud tulemusi (nt allikad 13, 14, 15, 16, 17, 18) nii positiivse kontrollina kasutatavate ainete,

näiteks tabelis 1 loetletud ainete (sealhulgas nõrga toime) puhul kui ka kandeainega töödeldud kontrollide puhul, samuti peaks negatiivsete kontrollide puhul täheldatud sagedus jääma vastuvõetavasse andmevahemikku (vt viited eespool) või laboris kontrollidega varem saadud tulemuste jaotusvahemikku, kui sellised tulemused on olemas.

MEETODI KIRJELDUS

Ettevalmistused

Loomaliigi valimine

11. Tuleks kasutada tavapäraste laboriliinide terveid suguküpsed loomi. Tavaliselt kasutatakse hiiri, ent võivad sobida ka rotid. Võib kasutada ka mis tahes muud sobivat imetajaliiki, kui katseprotokollis esitatakse sellekohane teaduslik põhjendus.

Loomade pidamis- ja söötmingimused

12. Näriliste puhul peaks loomapidamisruumi temperatuur olema 22 °C (± 3 °C). Suhteline niiskus peaks olema vähemalt 40 % ja soovitatavalt mitte üle 70 %, v.a ruumi koristamise ajal, ideaaljuhul aga 50–60 %. Tuleks kasutada tehisvalgustust valgusrežiimiga 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust. Söötmiseks võib kasutada tavapärasest laborisööta ja piiramatus koguses joogivett. Söödavalikut võib mõjutada vajadus tagada sööda sobivus uuritava kemikaali lisamiseks, kui kemikaali manustatakse sellisel viisil. Näriliste pidamisel tuleks enne töötlemist ja paaritamist kasutada väikesi samasooliste loomade rühmi (maksimaalselt viis looma rühmas), kui ei ole põhjust eeldada või ei täheldata agressiivset käitumist; soovitatavalt tuleks kasutada sobiva mitmekesisestatud keskkonnaga täispõhjaga puure. Loomi võib pidada eraldi, kui see on teaduslikult põhjendatud.

Loomade ettevalmistamine

13. Terved suguküpsed täiskasvanud isas- ja emasloomad jagatakse juhuvaliku alusel kontroll- ja katserühmadesse. Iga looma üheseks identimiseks kasutatakse humaanset minimaalselt invasiivset meetodit (nt rõngastamine, märgistamine, mikrokiibistamine või biomeetriline tuvastamine, kuid mitte kõrva salkamine ega varba kõndistamine) ning loomadel lastakse vähemalt viis päeva laboritingimustega kohaneda. Puurid paigutatakse nii, et puuri asukohast tingitud võimalik mõju oleks võimalikult väike. Tuleks ära hoida positiivse kontrollina kasutatava aine ja uuritava kemikaali vahelist ristasaastumist. Katse alguses peaksid loomade kehamassi erinevused olema minimaalsed ning mitte üle ± 20 % kummastki soost loomade keskmisest kehamassist.

Annuste ettevalmistamine

14. Tahke uuritav kemikaal tuleks enne loomadele annustamist lahustada või suspendeerida sobivas lahustis või kandeaines või segada sööda või joogiveega. Vedelat uuritavat kemikaali võib annustada vahetult või seda enne annustamist lahjendada. Kui kokkupuude toimub sissehingamise teel, võib uuritavat kemikaali sõltuvalt selle füüsikalise-keemilistest

omadustest manustada gaasina, auruna või tahke/vedela dispersse faasiga aerosoolina. Tuleks kasutada uuritava kemikaali värsket valmistist, välja arvatud juhul, kui kemikaali püsivusandmetest nähtub säilitamise vastuvõetavus ja on määratletud asjakohased säilitamistingimused.

Katsetingimused

Lahusti/kandeaine

15. Lahusti/kandeaine ei tohiks avaldada kasutatavate annuste puhul mürgist mõju ning ei tohiks olla kahtlust, et see võib uuritava kemikaaliga keemiliselt reageerida. Kui on valitud vähem tuntud lahusti/kandeaine, tuleks selle sobivuse tõendamiseks esitada selle kasutamist toetavad võrdlusandmed. Kui vähegi võimalik, on soovitatav esmalt kaaluda veepõhise lahusti/kandeaine kasutamist. Tavaliselt kasutatavad lahustid/kandeained on näiteks vesi, füsioloogiline lahus, metüülselluloosi lahus, karboksümetüülselluloosi naatriumisoola lahus, oliiviõli ja maisiõli.

Positiivsed kontrollid

16. Katses tuleks alati paralleelselt kasutada positiivse kontrollina kasutatava ainega töödeldud loomi, välja arvatud juhul, kui labori pädevus katse läbiviimiseks on tõendatud ja katsemeetodit on lähiminevikus (nt viimase viie aasta jooksul) korrapäraselt kasutatud. Siiski ei ole vaja manustada positiivse kontrollina kasutatavat ainet loomadele samal viisil kui uuritavat kemikaali, samuti ei ole vaja võtta proove iga paaritumisintervalli järel. Positiivse kontrollina kasutatavad ained peaksid katses kasutatavates tingimustes teadaolevalt avaldama dominantset letaalse mõju. Kontrollrühma loomi tuleks kohelda katserühma loomadega identsel viisil, välja arvatud ainega töötlemisel.
17. Positiivse kontrollina kasutatava aine annused tuleks valida nii, et positiivne dominantne letaalne mõju oleks nõrk või mõõdukas ja võimaldaks kriitiliselt hinnata meetodi töökindlust ja tundlikkust, kuid oleks samal ajal järjepidevalt tuvastatav. Positiivse kontrollina kasutatavate ainete näited ja sobivad annused on esitatud tabelis 1.

Tabel 1. Positiivse kontrollina kasutatavate ainete näited

Aine [CASi nr] (viitenumber)	Toimivate annuste vahemik (mg/kg) (näriliseliigid)	Manustamisaeg (päevades)
Trietüleenmelamiin [51-18-3] (15)	0,25 (hiired)	1
Tsüklofosfamiid [50-18-0] (19)	50–150 (hiired)	5
Tsüklofosfamiid [50-18-0] (5)	25–100 (rotid)	1
Etüülmetaansulfonaat [62-50-0] (13)	100–300 (hiired)	5

Monomeerne akrüülamiid [79-06-1] (17)	50 (hiired)	5
Kloorambutsiil [305-03-3] (14)	25 (hiired)	1

Negatiivsed kontrollid

18. Igal proovivõtukorral tuleks kasutada negatiivse kontrollina loomi, kellele on manustatud ainult lahustit või kandeainet ja keda on muidu koheldud samal viisil kui katserühma loomi (20). Valitud lahusti/kandeaine dominantse letaalse ja muu kahjuliku mõju puudumist kinnitavate varasemate laboriandmete või avaldatud kontrollandmete puudumisel tuleks igal proovivõtukorral kasutada kontrollina ka loomi, kellele ei ole midagi manustatud, et tõendada kandeainega töödeldud kontrollrühma andmete vastuvõetavust.

KATSE KÄIK

Loomade arv

19. Iga isaslooma paaritatakse eelnevalt kindlaks määratud sobivate ajavahemike järel (nt kord nädalas; punktid 21 ja 23) järjestikku soovitatavalt ühe varem paaritumata emasloomaga. Eelnevalt peaks olema kindlaks tehtud, et isasloomade arv rühmas on piisav (hinnatuna koos igal paaritumisperioodil paaritunud emasloomade arvuga), et tagada vähemalt selline statistiline võimsus, mis on vajalik dominantse letaalse mõju esinemissageduse kahekordistumise tuvastamiseks (punkt 44).
20. Samuti tuleks statistilise võimsuse arvutustega eelnevalt kindlaks teha emasloomade vajalik arv igal paaritumisperioodil, et võimaldada miinimumeesmärgina dominantse letaalse mõju esinemissageduse kahekordistumise tuvastamist (st piisav tiinete emasloomade arv, et pesastunud embrüote üldarv oleks vähemalt 400) (20, 21, 22, 23) ning eeldatavalt vähemalt ühe pesastunud surnud embrüo esinemist analüüsiühiku kohta (st igas paaritamisrühmas iga annuse puhul) (24).

Manustamisperiood ja paaritamisintervallid

21. Töötlemisjärgsete paaritamisintervallide arv sõltub manustamisrežiimist ja seejuures tuleks tagada, et dominantse letaalse mõju ilmnemist hinnatakse kõikides isaslooma idurakkude küpsemise etappides (12, 25). Ühekordsel töötlemisel, mis hõlmab kuni viie päevaannuse manustamist, tuleks pärast viimast manustamist viia ühenädalase vahega läbi 8 (hiirte puhul) või 10 (rottide puhul) paaritamist. Suurema arvu annuste manustamisel võib paaritamisintervallide arvu vähendada proportsionaalselt manustamisperioodi pikenemisega, ent jätkuvalt tuleks järgida eesmärki hinnata mõju kõikides spermatogeneesi etappides (näiteks piisab hiirte puhul spermatogeneesi igas etapis avalduva mõju hindamiseks 28 päeva pikkuse kokkupuuteperioodi järgselt neljast nädalase vahega

toimuvast paaritamisest). Kõik manustamis- ja paaritamisrežiimid peavad olema teaduslikult põhjendatud.

22. Emasloomad peaksid jääma isasloomade juurde vähemalt üheks innatsükliks (nt hiirtel ja rottidel jääb ühe nädala sisse üks innatsükkel). Emasloomi, kes ei ole nädalapikkuse perioodi jooksul paaritunud, võib kasutada mõnel järgneval paaritamisperioodil. Emasloomad võib isasloomadest eraldada ka juba pärast paaritumist, mille tõendamiseks tehakse kindlaks seemnerakkude esinemine tupes või tupekorgi esinemine.
23. Kasutatav kokkupuute- ja paaritamisrežiim sõltub dominantse letaalse mõju katse lõppeesmärgist. Kui eesmärk on teha kindlaks, kas asjaomane kemikaal üldse põhjustab dominantseid letaalseid mutatsioone, on vastuvõetav sellise meetodi kasutamine, mille puhul kokkupuute hõlmab kogu spermatogeneesitsükli (nt hiirte puhul 7 nädalat, 5–7 manustamiskorda nädalas) ja paaritamine toimub kokkupuute järgselt üks kord. Kui aga eesmärk on teha kindlaks, millist tüüpi idurakud on dominantse letaalse mõju suhtes tundlikud, siis on soovitatav kasutada nädalase intervalliga paaritamist pärast ühekordset või viie päeva pikkust kokkupuudet.

Annused

24. Kui annuste valimist hõlbustavate sobivate andmete puudumise tõttu tehakse annusevahemiku kindlakstegemiseks eeluuring, tuleks see läbi viia samas laboris, samast liigist, liinist ja soost loomadega ning sama manustamisrežiimi alusel kui põhiuuring (26). Eeluuringu eesmärk peaks olema teha kindlaks suurim talutav annus, mis on määratletud kui suurim annus, mida suudetakse uuringuperioodi jooksul taluda nii, et ei täheldata uuringu läbiviimist piirava mürgisuse nähte (näiteks ebatavalised reaktsioonid või käitumine, väike kehamassi vähenemine või tsütotoksilisus vereloomesüsteemi suhtes, mis aga ei põhjusta veel surma ega selliseid kannatusi, valu või stressi, mis nõuaksid loomade humaanset surmamist) (27).
25. Samuti ei tohi suurima talutava annuse puhul ilmned kahjulikku mõju paaritumisedukusele (21).
26. Selliste uuritavate kemikaalide puhul, millel avaldub juba väikese mittemürgise annuse juures konkreetne bioloogiline aktiivsus (näiteks hormoonid ja mitogeenid) või mille puhul esineb toksikokineetiliste omadustega seotud küllastumine, ei pruugi annuste valimise kriteeriumid olla kohaldatavad ning neid kemikaale tuleks igal konkreetsel juhul eraldi hinnata.
27. Annusest sõltuvuse kohta teabe saamiseks tehtav täielik uuring peaks hõlmama negatiivse kontrolli rühma ja vähemalt kolme eri annust, mis erinevad üksteisest üldjuhul kaks korda, ent kõige rohkem neli korda. Kui uuritav kemikaal ei ole annusevahemiku kindlakstegemise uuringus või olemasolevate andmete põhjal mürgine, peaks suurim korraga manustatav annus olema 2000 mg kehamassi kilogrammi kohta. Kui aga uuritav

kemikaal põhjustab mürgisusnähte, tuleks suurima manustatava annusena kasutada suurimat talutavat annust ning kasutatav annusevahemik peaks soovitatavalt ulatuma suurimast annusest kuni annuseni, mille puhul täheldatav mürgisus on vähene või puudub. Mittemürgiste kemikaalide puhul on piirannus 14 päeva pikkuse või pikema manustamisperioodi puhul 1000 mg kehamassi kilogrammi kohta päevas ning 14 päevast lühema manustamisperioodi puhul 2000 mg kehamassi kilogrammi kohta päevas.

Annuste manustamine

28. Katse kavandamisel tuleks silmas pidada inimese puhul eeldatavat kokkupuuteviisi. Seepärast võib vastavast põhjendusest lähtuvalt kasutada selliseid manustamisviise nagu manustamine söödaga, joogiveega, naha alla, veenisiseselt, paikselt, sissehingamise teel, suu kaudu (toitmissondiga) või implantaadiga. Igal juhul tuleks manustamisviis valida nii, et oleks tagatud sihtkoe/-kudede piisav kokkupuude uuritava kemikaaliga. Intraperitoneaalne süstimine ei ole tavaliselt soovitatav, kuna tegemist ei ole inimese puhul ette nähtud kokkupuuteviisiga, ning seda tuleks kasutada ainult juhul, kui on olemas sellekohane konkreetne teaduslik põhjendus. Kui uuritav kemikaal segatakse sööda või joogiveega, tuleks eriti üheainsa annuse manustamisel jälgida, et sööda ja vee tarbimise ning paaritumise vaheline ajavahemik oleks piisav, et võimaldada kemikaali mõju tuvastamist (punkt 31). Toitmissondi kaudu või süstimise teel korraga manustatav suurim vedelikukogus sõltub katselooma suurusest. Tavaliselt ei tohiks see kogus olla suurem kui 1 ml 100 g kehamassi kohta, välja arvatud vesilahuste puhul, mida võib kasutada koguses 2 ml 100 g kehamassi kohta. Suurema koguse kasutamist (kui see on loomade heaolu käsitlevate õigusaktide kohaselt lubatud) tuleks põhjendada. Katses kasutatava ruumala varieeruvuse minimeerimiseks tuleks muuta kemikaali kontsentratsiooni, et tagada kehamassi suhtes püsiva ruumala kasutamine kogu annusevahemiku lõikes.

Vaatlused

29. Katseloomadel tuleks teha kliinilisi vaatlusi ja registreerida kliinilised sümptomid vähemalt üks kord päevas, igal päeval soovitatavalt samal ajal, ning võtta seejuures arvesse manustamisjärgse eeldatava mõju maksimaalse avaldumise ajavahemikku. Manustamisperioodil tuleks kõiki loomi haigestumise ja surmajuhtude tuvastamiseks kontrollida vähemalt kaks korda päevas. Kõikide loomade kaal tuleks määrata uuringu alguses, korduvannustamise uuringu kestel vähemalt kord nädalas ning humaanse surmamise hetkel. Sööda tarbimist tuleks mõõta vähemalt kord nädalas. Kui uuritavat kemikaali manustatakse joogiveega, tuleks vee tarbimist mõõta iga veevahetuse ajal ja vähemalt kord nädalas. Loomad, kellel täheldatakse liigse mittesurmava mürgisuse nähte, tuleks enne katse lõppu humaanselt surmata (27).

Kudede kogumine ja töötlemine

30. Emasloomad surmatakse humaanselt tiinuse teises pooles, hiirte puhul tiinuse 13. päeval ja rottide puhul tiinuse 14.–15. päeval. Dominantse letaalse mõju tuvastamiseks uuritakse

loomade emakat, et teha kindaks pesastunud embrüote, elus ja surnud embrüote ning kollakehade arv.

31. Paljastatakse emakasarved ja munasarjad, et loendada kollakehad, ning looted eemaldatakse, loendatakse ja kaalutakse. Emakat tuleks hoolikalt uurida elus loodete varju jäävate resorbeerumiskohtade suhtes ja tagada, et kõik resorbeerumisjuhud saavad loendatud. Registreeritakse loodete suremus. Samuti registreeritakse edukalt tiinestunud emasloomade arv, pesastunud embrüote üldarv, pesastumiseelne kadu ja pesastumisjärgne suremus (sealhulgas varased ja hilised resorbeerumisjuhud). Peale selle võib nähtavaid looteid säilitada Bouini fikseerimislahuses vähemalt kaks nädalat ning seejärel uurida, kas neil esineb suuri väliseid väärenguid (28), et saada lisateavet uuritava aine mõju kohta paljunemisvõimele ja arengule.

ANDMED JA ARUANDLUS

Andmete töötlemine

32. Andmed tuleks esitada tabelina, kus on välja toodud paaritunud isasloomade arv, tiinete emasloomade arv ja tiinestumata emasloomade arv. Tuleks esitada eraldi iga paaritamise tulemused koos iga isaslooma ja emaslooma identimisandmetega. Iga emaslooma puhul tuleks esitada paaritamisintervall, isasloomadele manustatud annus ning elus ja surnud embrüote arv.
33. Pesastumisjärgse embrüote kao arvutamiseks võrreldakse pesastunud surnud embrüote arvu ja pesastunud embrüote üldarvu suhet kemikaaliga töödeldud rühmas ja lahustiga/kandeainega töödeldud kontrollrühmas.
34. Pesastumiseelse embrüote kao leidmiseks arvutatakse kollakehade arvu ja pesastunud embrüote arvu vahe või emaslooma kohta pesastunud embrüote keskmise arvu ja kontrollpaaritamisel saadud vastava näitaja erinevus. Pesastumiseelse embrüote kao hindamise korral tuleks tulemused registreerida.
35. Dominantse letaalsuse tegur leitakse järgmiselt: (pesastumisjärgsed surmajuhtumid / pesastunud embrüote üldarv emaslooma kohta) $\times 100$.
36. Tuleks esitada andmed mürgisuse ja kliiniliste sümptomite kohta (vt punkt 29).

Katse nõuetekohasuse kriteeriumid

37. Katse nõuetekohasuse kriteeriumid on järgmised:
- paralleelse negatiivse kontrolliga saadud tulemused on kooskõlas varasemaid negatiivse kontrolli andmeid käsitlevate avaldatud normidega, samuti laboris kontrollidega varem saadud tulemustega, kui need on olemas (vt punktid 10 ja 18);

- paralleelsed positiivsed kontrollid kutsuvad esile reaktsioone, mis on kooskõlas varasemaid positiivsete kontrollide andmeid käsitlevate avaldatud normidega, samuti laboris positiivsete kontrollidega varem saadud tulemustega, kui need on olemas, ning paralleelsete positiivsete kontrollidega saadud väärtused on statistiliselt oluliselt suuremad kui negatiivse kontrolliga saadud väärtused (vt punktid 17 ja 18);
- analüüsitud pesastunud embrüote üldarv ja eri annuste arv on piisav (punkt 20);
- suurima annuse valimise kriteeriumid on kooskõlas punktides 24 ja 27 kirjeldatud kriteeriumidega.

Tulemuste hindamine ja tõlgendamine

38. Annusest sõltuvuse analüüsimiseks piisavate andmete saamiseks on vaja uurida vähemalt kolme rühma, kus on töötlemiseks kasutatud eri annuseid.
39. Kui kõik katse nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, loetakse uuritava kemikaaliga saadud tulemus selgelt positiivseks, kui:
 - vähemalt ühe katses kasutatud annuse puhul täheldatakse saadud väärtuse statistiliselt olulist suurenemist paralleelse negatiivse kontrolliga võrreldes,
 - kõnealune suurenemine on sobiva testiga hindamisel vähemalt ühte tüüpi katsetingimustes (nt nädalase paaritamisintervalli puhul) annusest sõltuv ning
 - mis tahes saadud tulemus jääb väljapoole vastuvõetavat negatiivse kontrolli andmete vahemikku või laboris negatiivsete kontrollidega varem saadud tulemuste olemasolul selliste tulemuste jaotust (nt väljapoole Poissoni jaotuse usaldusvahemikku usaldusnivool 95 %).
40. Sel juhul käsitatakse uuritavat kemikaali võimelisena põhjustama katseloomade idurakkudes dominantseid letaalseid mutatsioone. Kõige asjakohasemaid statistilisi meetodeid käsitlevad soovitusel on esitatud punktis 44; kirjandusest võib leida teavet ka muude soovitatavate statistiliste lähenemisviiside kohta (20, 21, 22, 24, 29). Kasutatavate statistiliste testide puhul tuleks katseüksusena käsitada üksikisendit.
41. Kui kõik katse nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, loetakse uuritava kemikaaliga saadud tulemus selgelt negatiivseks, kui:
 - ühegi katses kasutatud annuse puhul ei täheldata saadud väärtuse statistiliselt olulist suurenemist paralleelse negatiivse kontrolliga võrreldes,
 - ühegi katsetingimuse puhul ei esine annusest sõltuvat väärtuse suurenemist ning

- kõik saadud tulemused jäävad vastuvõetavasse negatiivse kontrolli andmete vahemikku või laboris negatiivsete kontrollidega varem saadud tulemuste olemasolul selliste tulemuste jaotusvahemikku (nt Poissoni jaotuse usaldusvahemikku usaldusnivool 95 %).
42. Sel juhul käsitatakse uuritavat kemikaali võimetuna põhjustama katseloomade idurakkudes dominantseid letaalseid mutatsioone.
43. Selgelt positiivset või negatiivset tulemust ei ole vaja üle kontrollida.
44. Juhul, kui tulemus ei ole selgelt negatiivne ega selgelt positiivne ning eesmärk on aidata kindlaks teha tulemuse – näiteks vaadeldava väärtuse väikese või piiripealse suurenemise – bioloogiline olulisus, tuleks andmete hindamiseks kasutada eksperdi hinnangut ja/või olemasolevatel katseandmetel põhinevat täiendavat analüüsi, näiteks kaaluda, kas positiivne tulemus jääb väljapoole vastuvõetavat negatiivse kontrolli andmete vahemikku või laboris negatiivsete kontrollidega varem saadud tulemuste jaotust (30).
45. Harvadel juhtudel ei võimalda andmed isegi pärast täiendavat analüüsi teha järeldust selle kohta, kas tulemus on positiivne või negatiivne; sel juhul loetakse tulemus ebaselgeks.
46. Kasutatavate statistiliste testide puhul tuleks katseüksusena käsitada isaslooma. Ehkki loendamisandmed (nt pesastunud embrüote arv emaslooma kohta) võivad olla Poissoni jaotusega ja/või osakaalu andmed (nt pesastunud surnud embrüote osakaal) binoomjaotusega, iseloomustab selliseid andmeid sageli siiski ülehajuvus (31). Sellest lähtuvalt tuleks statistilise analüüsi puhul esmalt kontrollida üle- või alahajuvuse esinemist selliste hajuvustestidega nagu Cochran'i binoomjaotuse hajuvuse test (32) või Tarone'i $C(\alpha)$ -test binoomjaotuse ülehajuvuse tuvastamiseks (31, 33). Kui ei tuvastata kõrvalekallet binoomjaotusest, võib annusevahemiku lõikes täheldatavate osakaalumutuste analüüsimiseks kasutada Cochran'i-Armitage'i trenditesti (34) ja paariviisiliseks kontrollrühma andmetega võrdlemiseks Fisher-Yatesi testi (35). Samamoodi võib juhul, kui ei tuvastata kõrvalekallet Poissoni jaotusest, kasutada loendamistulemustega seotud suundumuste tuvastamiseks Poissoni regressioonimudelit (36) ja Poissoni mudeli kontekstis paariviisiliseks kontrollrühma andmetega võrdlemiseks paariviisilisi kontraste (36). Kui tuvastatakse oluline üle- või alahajuvus, soovitakse kasutada mitteparameetrilisi meetodeid (23, 31). Nende hulka kuuluvad sellised astakupõhised testid nagu Jonckheere'i-Terpstra trenditest (37) ja Manni-Whitney test (38) paariviisiliseks võrdlemiseks kandeainega/lahustiga töödeldud kontrollrühma andmetega, samuti permutatsiooni-, taasvalimis- ja *bootstrap*-testid suundumuste analüüsimiseks ja paariviisiliseks võrdlemiseks kontrollrühma andmetega (31, 39).
47. Dominantse letaalse mõju katse positiivsed tulemused on tõend uuritava kemikaali genotoksilisuse kohta katseliigi töödeldud isaslooma idurakkudes.

48. Saadud tulemuste bioloogilise olulisuse hindamisel võib juhinduda sellest, kas täheldatud väärtused jäävad laboris kontrollidega varem saadud tulemuste jaotusvahemikku või sellest väljapoole (40).

Katseprotokoll

49. Katseprotokollis tuleks esitada järgmine teave.

Kokkuvõte

Uuritav kemikaal:

- allikas, partii number, aegumiskuupäev, kui on olemas;
- uuritava kemikaali püsivus, kui see on teada;
- uuritava kemikaali lahustuvus ja püsivus lahustis, kui see on teada;
- vastavalt vajadusele mõõtmistulemused söötme pH ja osmolaalsuse ning sademe tekke kohta pärast uuritava kemikaali lisamist;

ühest koostisosast koosnev aine:

- füüsiline välimus, lahustuvus vees ja muud asjakohased füüsikalised-keemilised omadused;
- kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus, CASi number, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem, puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne;

mitut koostisosa sisaldav aine, UVCB või segu:

- võimalikult täpne omaduste kirjeldus lähtuvalt koostisosade keemilisest määratlusest (vt eespool), kvantitatiivsest sisaldusest ja asjakohastest füüsikalised-keemilistest omadustest.

Uuritava kemikaali ettevalmistamine:

- kandeaine valimise põhjendus;
- uuritava kemikaali lahustuvus ja püsivus lahustis/kandeaines, kui see on teada;
- sööda või joogiveega või sissehingamise teel manustamiseks sobiva valmistise valmistamine;
- valmistise analüüsi tulemused (nt püsivus, homogeensus, nominaalne kontsentratsioon), kui need on olemas.

Katseloomad:

- kasutatud liik/liin ja selle valimise põhjendus;
- loomade arv, vanus ja sugu;

- päritolu, pidamistingimused, söötmisandmed jne;
- loomade ühese identimise meetod;
- lühiajaliste uuringute puhul: iga isaslooma kehamass katse alguses ja lõpus; ühest nädalast pikemate uuringute puhul: iga looma kehamass uuringu vältel ja sööda tarbimise andmed. Iga rühma kohta tuleks esitada kehamasside vahemik, keskväärtnus ja standardhälve.

Katsetingimused:

- positiivse ja negatiivse (kandeainega/lahustiga) kontrolli andmed;
- annusevahemiku kindlakstegemise uuringu andmed;
- annuste valimise põhjendus;
- uuritava kemikaali ettevalmistamise üksikasjad;
- uuritava kemikaali manustamise üksikasjad;
- manustamisviisi valimise põhjendus;
- loomadel avalduva mürgisuse mõõtmise meetodid, sealhulgas andmed histopatoloogilise või hematoloogilise analüüsi kohta, kui seda on tehtud, samuti loomade vaatlemise ja kehamassi määramise sagedus;
- negatiivsete tulemuste korral meetodid selle kontrollimiseks, et uuritav kemikaal on jõudnud sihtkoesse või üldvereringesse;
- vajaduse korral tegelik annus (milligrammides kehamassi kilogrammi kohta päevas), mis arvutatakse lähtuvalt sööda/joogivee tarbimisest ja selles sisalduva uuritava kemikaali kontsentratsioonist (miljondikes);
- sööda ja vee kvaliteedi üksikasjad;
- puurikeskkonna mitmekesistamise üksikasjad;
- manustamis- ja proovivõtturežiimide üksikasjalik kirjeldus ja nende valimise põhjendus;
- valutustamismeetod;
- humaanse surmamise meetod;
- kudede eraldamise ja säilitamise meetodid;
- kõikide katsekomplektide ja reaktiivide päritolu ja partii number (vajaduse korral);
- loendamismeetodid dominantse letaalse mõju määramiseks;
- paaritamise ajakava;
- paaritumise kindlakstegemiseks kasutatud meetodid;
- humaanse surmamise aeg;

- dominantse letaalse mõju hindamise kriteeriumid, sealhulgas kollakehade, pesastunud embrüote, embrüote resorbeerumise, pesastumiseelse kao, pesastunud elus embrüote ja pesastunud surnud embrüote kindlakstegemiseks.

Tulemused:

- loomade seisund enne katset ja katseperioodi kestel, sealhulgas mürgisuse nähud;
- isasloomade kehamass manustamisperioodil ja paaritamisperioodil;
- paaritunud emasloomade arv;
- võimaluse korral andmed annusest sõltuvuse kohta;
- paralleelse negatiivse kontrolli andmed ja laboris negatiivse kontrolliga varem saadud andmed, sealhulgas tulemuste vahemikud, keskväärtused ja standardhälbed;
- paralleelse positiivse kontrolli andmed;
- tabeli kujul andmed iga tiinestunud emaslooma kohta: kollakehade arv tiinestunud emaslooma kohta; pesastunud embrüote arv tiinestunud emaslooma kohta; resorbeerunud embrüote ja enne pesastumist hävinud embrüote arv tiinestunud emaslooma kohta; pesastunud elus embrüote arv tiinestunud emaslooma kohta; pesastunud surnud embrüote arv tiinestunud emaslooma kohta; loodete kehamass;
- eespool nimetatud andmed koondatud kujul iga paaritamisperioodi ja annuse kohta koos dominantse letaalse mõju avaldumissagedusega;
- teave statistilise analüüsi ja kasutatud meetodite kohta.

Tulemuste arutelu

Järeldused

KIRJANDUS

- (1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014–2015. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 238. OECD, Pariis.
- (2) Bateman, A. J. (1977). The Dominant Lethal Assay in the Male Mouse. Väljaandes: Handbook of Mutagenicity Test Procedures. Kilbey, B. J. *et al.* (toim.), Elsevier, Amsterdam. Lk 235–334.
- (3) Ehling, U. H., Machemer, L., Buselmaier, E., Dycka, D., Frohberg, H., Kratochvilova, J., Lang, R., Lorke, D., Muller, D., Pheh, J., Rohrborn, G., Roll, R., Schulze-Schencking, M., ja Wiemann, H. (1978). Standard Protocol for the Dominant Lethal Test on Male Mice Set up by the Work Group „Dominant lethal mutations of the ad hoc Committee Chemogenetics“. *Arch. Toxicol.* 39: 173–185.
- (4) Shelby, M. D. (1996). Selecting Chemicals and Assays for Assessing Mammalian Germ Cell Mutagenicity. *Mutat. Res.* 352: 159–167.
- (5) Knudsen, I., Hansen, E. V., Meyer, O. A., ja 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. *Mutat. Res.* 48: 267–270.
- (6) Anderson, D., Hughes, J. A., Edwards, A. J., ja Brinkworth, M. H. (1998). A Comparison of Male-Mediated Effects in Rats and Mice Exposed to 1,3-Butadiene. *Mutat. Res.* 397: 77–74.
- (7) Shively, C. A., White, D., M., Blauch, J., L., ja Tarka, S. M. Jr. (1984). Dominant Lethal Testing of Theobromine in Rats. *Toxicol. Lett.* 20: 325–329.
- (8) Rao, K. S., Cobel-Geard, S. R., Young, J. T., Hanley, T. R. Jr., Hayes, W. C., John, J. A., ja 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., ja 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. *Mutat. Res.* 33: 239–249.
- (10) Marchetti, F., Bishop, J. B., Cosentino, L., Moore, D., II, ja Wyrobek, A. J. (2004). Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations in Mouse Zygotes Determine their Embryonic Fate. *Biol. Reprod.* 70: 616–624.

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

- (23) Haseman, J. K., ja Soares, E. R. (1976). The Distribution of Fetal Death in Control Mice and its Implications on Statistical Tests for Dominant Lethal Effects. *Mutat. 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. Carcin. Mut.* 1: 353–360.
- (25) Anderson, D., Hodge, M. C. E., Palmer, S., ja Purchase, I. F. H. (1981). Comparison of Dominant Lethal and Heritable Translocation Methodologies. *Mutat. 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., ja 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.
- (27) 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. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (28) Barrow, M. V., ja Taylor, W. J. (1969). A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Foetuses. *J. Morphol.* 127: 291–306.
- (29) Kirkland, D. J. (toim.) (1989). Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Cambridge University Press.
- (30) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H. J., ja Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data. *Mutat. Res.* 723: 87–90.
- (31) Lockhart, A. C., Piegorsch, W. W., ja Bishop, J. B. (1992). Assessing Over Dispersion and Dose-Response in the Male Dominant Lethal Assay. *Mutat. 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. Väljaandes: Encyclopedia of Statistical Sciences, 9. köide. Kotz, S., ja Johnson, N. L. (toim.). Lk 334–336. John Wiley & Sons, New York.

- (35) Cox, D. R. (1970). Analysis of Binary Data. Chapman and Hall, London.
- (36) Neter, J. M., Kutner, H. C., Nachtsheim, J., ja Wasserman, W. (1996). Applied Linear Statistical Models. Neljas väljaanne. 14. ja 17. peatükk. 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 & Sons, New York.
- (39) Efron, B. (1982). The Jackknife, the Bootstrap and Other Resampling Plans. Tööstus- ja Rakendusmatemaatika Ühing, Philadelphia, PA.
- (40) Fleiss, J. (1973). Statistical Methods for Rates and Proportions. John Wiley & Sons, New York.

1. liide**MÕISTED**

Dominantne letaalne mutatsioon – idurakus tekkinud või pärast viljastamist kinnistunud mutatsioon, mis kutsub esile embrüo või loote surma.

Kemikaal – aine või segu.

Kollakeha – hormoone eritav moodustis munasarja pinnal, mis tekib munaraku vabastanud folliikuli asukohas. Kollakehade arv munasarjas vastab ovuleerunud munarakkude arvule.

Paaritamisintervall – kokkupuuteperioodi lõpu ja töödeldud isasloomade paaritamise vaheline ajavahemik. Selle intervalli muutmise teel on võimalik hinnata kemikaali mõju eri tüüpi idurakkudele. Hiirtel tehakse 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ja 8 nädalat pärast kokkupuuteperioodi lõppu toimuva paaritamise teel kindlaks mõju vastavalt seemnerakkudele, kondenseerunud spermatiididele, ümaratele spermatiididele, pahhüteenis spermatotsüütidele, varajastele spermatotsüütidele, diferentseerunud spermatogoonidele, diferentseeruvatele spermatogoonidele ja spermatogoonide tüvirakkudele.

Pesastumiseelne kadu – kollakehade arvu ja pesastunud embrüote arvu vahe. Seda saab hinnata ka nii, et võrreldakse pesastunud embrüote üldarvu emaslooma kohta kemikaaliga töödeldud rühmas ja kontrollrühmas.

Pesastumisjärgne kadu – pesastunud surnud embrüote osakaal kemikaaliga töödeldud rühmas võrrelduna pesastunud surnud embrüote arvu ja pesastunud embrüote üldarvu suhtega kontrollrühmas.

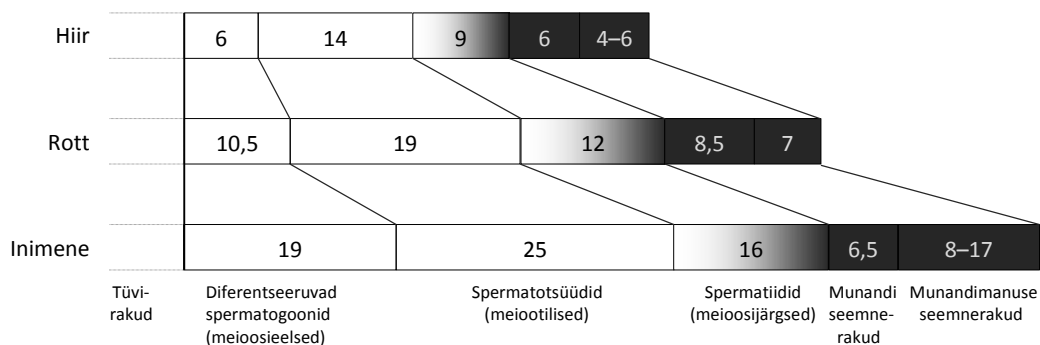
Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

UVCB – tundmatu või muutuva koostisega kemikaal, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal.

Viljakuskordaja – paaritunud tiinete emasloomade arvu ja paaritunud emasloomade arvu suhe.

2. liide

IMETAJATE SPERMATOGENEESI ETAPID



Joonis 1. Hiire ja roti isaslooma ning mehe idurakkude arenguetappide kestuse (päevades) võrdlus; varjutusega perioodidel DNA reparatsiooni ei toimu

Eespool on esitatud hiire, roti ja inimese spermatogeneesi skemaatiline joonis (allikas: Adler, 1996). Differentsseerumata spermatogoonid hõlmavad A-tüüpi ühekaupa, A-tüüpi paarikaupa ja A-tüüpi reastunud spermatogoonid (Hess ja Renato de Franca, 2008). Tõelisteks tüvirakkudeks peetakse A-tüüpi ühekaupa spermatogoonid; seepärast peab ajavahemik uuritava kemikaali viimasest manustamisest kuni paaritamiseni olema vähemalt 49 päeva (hiirtel), et võimaldada hinnata tüvirakkudele avalduvat mõju.

Viited

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

Hess, R. A., ja Renato de Franca, L. (2008). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. Väljaandes: *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*. Cheng, C. Y. (toim.), Landes Bioscience ja Springer Science+Business Media. Lk 1–15.

4) B osas asendatakse peatükk B.23 järgmisega:

„B.23. KROMOSOOMIABERRATSIOONIKATSE IMETAJATE SPERMATOGOONIDEGA

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 483 (2016). Katsemeetodeid vaadatakse korrapäraselt läbi, et võtta arvesse teaduse arengut, muutuvaid regulatiivseid vajadusi ja loomade heaoluga seotud kaalutlusi. Käesolevas katsemeetodi muudetud versioonis kajastub selle meetodi kasutamisel saadud aastatepikkune kogemus, samuti annab see võimaluse lõimida või kombineerida seda meetodit muude mürgisuse või genotoksilisuse hindamise meetoditega. Mürgisuse hindamise meetodite kasutamine kombineerituna võimaldab vähendada mürgisuskatsetes kasutatavate loomade arvu. Käesolev katsemeetod kuulub geneetilise toksikoloogia katsemeetodite seeriasse. OECD on välja töötanud dokumendi, milles on esitatud kokkuvõtlik teave geneetilise toksikoloogia valdkonna katsete kohta ning ülevaade genotoksilisust käsitlevates OECD katsejuhendites tehtud viimastest muudatustest (1).
2. Imetajate spermatogoonidega tehtava *in vivo* kromosoomiaberratsioonikatse eesmärk on teha kindlaks kemikaalid, mis põhjustavad imetajate spermatogoonides struktuurseid kromosoomiaberratsioone (2, 3, 4). Peale selle on kõnealune katse oluline genotoksilisuse hindamiseks, sest ehkki *in vivo* metabolismi, farmakokineetika ja DNA reparatsiooni protsessidega seotud tegurid võivad liigiti varieeruda, on need aktiivsed ja aitavad kaasa vastusreaktsiooni kujunemisele. Käesolev katsemeetod ei ole ette nähtud kromosoomiarvu kõrvalekallete mõõtmiseks ning seda ei kasutata regulaarselt sel eesmärgil.
3. Käesoleva meetodiga mõõdetakse struktuurseid kromosoomiaberratsioone (nii kromosoomi- kui ka kromatiidiaberratsioone) jagunevates spermatogoonides ning seepärast võimaldab see eeldatavalt ennustada pärilike mutatsioonide tekkimist nimetatud idurakkudes.
4. Põhimõistete määratlused on esitatud liites.

LÄHTEKAALUTLUSED

5. Käesoleva katsemeetodi puhul kasutatakse tavaliselt närilisi, kuid mõnel teaduslikult põhjendatud juhul võib olla asjakohane kasutada mõnda muud liiki. Näriliste munandite tavapäraste tsütogeneetiliste preparaatide puhul analüüsitakse mitoosi metafaasi (spermatogoonides) ja meioosi metafaasi (spermatotsüütides). Mitoosi ja meioosi metafaas tuvastatakse kromosoomide morfoloogia alusel (4). Käesolev *in vivo* tsütogeneetiline meetod võimaldab teha kindlaks mitoosi ajal täheldatavaid struktuurseid kromosoomiaberratsioone spermatogoonides. Käesolevat meetodit ei kasutata muude sihtkudede puhul.
6. Spermatogoonides kromatiidiaberratsioonide tuvastamiseks tuleks uurida rakkude esimest töötlemisjärgset mitootilist jagunemist, kuna nimetatud aberratsioonidest saavad rakkude

järgnevate jagunemiste käigus kromosoomiaberratsioonid. Lisateabe saamiseks analüüsitakse töödeldud spermatotsüütide kromosoomi meioosi vältel diakineesi, I metafaasi ja II metafaasi etappides struktuursete kromosoomiaberratsioonide suhtes.

7. Munandis esineb mitu spermatogoonide põlvkonda (5) ning kõnealuste eri tüüpi idurakkude tundlikkus kemikaalidega töötlemise suhtes võib olla erinev. Seega kajastavad tuvastatud aberratsioonid töödeldud spermatogoonide populatsioonidele avalduvat koondmõju. Munandipreparaatides on enamik mitoosis rakkudest B-tüüpi spermatogoonid, mille rakutsükli kestus on umbes 26 tundi (3).
8. Kui on tõendeid selle kohta, et uuritav kemikaal või selle metaboliit/metaboliidid ei jõua munandisse, ei ole käesoleva katsemeetodi kasutamine asjakohane.

KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

9. Üldpõhimõtte kohaselt viiakse loomad pärast sobiva kokkupuuteviisi valimist uuritava kemikaaliga kokkupuutesse ning sobiva ajavahemiku möödumisel töötlemisest surmatakse loomad humaanselt. Enne surmamist manustatakse loomadele ainet, mis peatab rakkude jagunemise metafaasis (nt kolhitsiin või Colcemid®). Seejärel tehakse idurakkudest kromosoomipreparaadid ja värvitakse need ning metafaasis rakke analüüsitakse kromosoomiaberratsioonide suhtes.

LABORI PÄDEVUSE TÕENDAMINE

10. Käesoleva meetodi kasutamise pädevuse kinnitamiseks tuleks tõendada võimekust reprodutseerida positiivse kontrollina kasutatavate, näiteks tabelis 1 loetletud (sealhulgas nõrga toimega) ainete saadud, spermatogoonides täheldatavate struktuursete kromosoomiaberratsioonide esinemissagedust käsitlevaid tulemusi, samuti peaks negatiivsete kontrollide puhul täheldatud sagedus jääma vastuvõetavasse kirjanduses avaldatud kontrollandmete jaotusvahemikku (nt allikad 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10) või laboris kontrollidega varem saadud tulemuste jaotusvahemikku, kui sellised tulemused on olemas.

MEETODI KIRJELDUS

Ettevalmistused

Loomaliigi valimine

11. Tuleks kasutada tavapäraste laboriliinide terveid noori täiskasvanud loomi. Tavaliselt kasutatakse isaseid hiiri; kui see on teaduslikult põhjendatud, võib siiski kasutada ka mõne muu sobiva imetajaliigi isasloomi, et käesolevat katsemeetodit oleks võimalik kasutada koos mõne muu katsemeetodiga. Teaduslik põhjendus näriliste asemel mõne muu liigi loomade kasutamise kohta tuleks esitada katseprotokollis.

Loomade pidamis- ja söötmingimused

12. Näriliste puhul peaks loomapidamisruumi temperatuur olema 22 °C (± 3 °C). Suhteline niiskus peaks olema vähemalt 40 % ja soovitatavalt mitte üle 70 %, v.a ruumi koristamise ajal, ideaaljuhul aga 50–60 %. Tuleks kasutada tehisvalgustust valgusrežiimiga 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust. Söötmiseks võib kasutada tavapärasest laborisööta ja piiramatust koguses joogivett. Söödavalikut võib mõjutada vajadus tagada sööda sobivus uuritava kemikaali lisamiseks, kui kemikaali manustatakse sellisel viisil. Näriliste pidamisel tuleks kasutada väikesi loomade rühmi (maksimaalselt viis looma puuri kohta), kui ei ole põhjust eeldada agressiivset käitumist; soovitatavalt tuleks kasutada sobiva mitmekesisistatud keskkonnaga täispõhjaga puure. Loomi võib pidada eraldi, kui see on teaduslikult põhjendatud.

Loomade ettevalmistamine

13. Tavaliselt kasutatakse terveid noori täiskasvanud (töötlemishetkeks 8–12 nädala vanuseid) loomi, kes jagatakse juhuvaliku alusel kontroll- ja katserühmadesse. Iga looma üheseks identimiseks kasutatakse humaanset minimaalselt invasiivset meetodit (nt rõngastamine, märgistamine, mikrokiibistamine või biomeetriline tuvastamine, kuid mitte kõrva sälkamine ega varba kõndistamine) ning loomadel lastakse vähemalt viis päeva laboritingimustega kohaneda. Puurid paigutatakse nii, et puuri asukohast tingitud võimalik mõju oleks võimalikult väike. Tuleks ära hoida positiivse kontrollina kasutatava aine ja uuritava kemikaali vahelist ristsaastumist. Katse alguses peaksid loomade kehamassi erinevused olema minimaalsed ning mitte üle ± 20 %.

Annuste ettevalmistamine

14. Tahke uuritav kemikaal tuleks enne loomadele annustamist lahustada või suspendeerida sobivas lahustis või kandeaines või segada sööda või joogiveega. Vedelat uuritavat kemikaali võib annustada vahetult või seda enne annustamist lahjendada. Kui kokkupuude toimub sissehingamise teel, võib uuritavat kemikaali sõltuvalt selle füüsikalis-keemilistest omadustest manustada gaasina, auruna või tahke/vedela dispersse faasiga aerosoolina. Tuleks kasutada uuritava kemikaali värsket valmistist, välja arvatud juhul, kui kemikaali püsivusandmetest nähtub säilitamise vastuvõetavus ja on määratletud asjakohased säilitamistingimused.

Katsetingimused – lahusti/kandeaine

15. Lahusti/kandeaine ei tohiks avaldada kasutatavate annuste puhul mürgist mõju ega olla võimeline uuritava kemikaaliga keemiliselt reageerima. Kui on valitud vähem tuntud lahusti/kandeaine, tuleks selle sobivuse tõendamiseks esitada selle kasutamist toetavad võrdlusandmed. Kui vähegi võimalik, on soovitatav esmalt kaaluda veepõhise lahusti/kandeaine kasutamist. Tavaliselt kasutatavad lahustid/kandeained on näiteks vesi, füsioloogiline lahus, metüülselluloosi lahus, karboksümetüülselluloosi naatriumisoola lahus, oliiviõli ja maisiõli. Valitud ebatüüpilisest lahustist/kandainest põhjustatud struktuursete kromosoomiaberratsioonide ja muu kahjuliku mõju puudumist kinnitavate varasemate laboriandmete või avaldatud kontrollandmete puudumisel tuleks teha eelkatse, et tõendada lahustiga/kandeainega töödeldud kontrollrühma andmete vastuvõetavust.

Positiivsed kontrollid

16. Katses tuleks alati paralleelselt kasutada positiivse kontrollina kasutatava ainega töödeldud loomi, välja arvatud juhul, kui labori pädevus katse läbiviimiseks on tõendatud ja katsemeetodit on lähiminevikus (nt viimase viie aasta jooksul) korrapäraselt kasutatud. Kui paralleelse positiivse kontrolli rühma ei kasutata, peaks iga katse hõlmama hindamiskontrolle (fikseeritud ja värvimata mikroskoobipreparaadid). Selleks võib uuringu raames hinnata asjakohaseid säilitatud võrdlusproove, mis on saadud positiivse kontrolliga tehtud eraldi katsest, mida viiakse uuringut tegevas laboris läbi korrapäraselt (nt iga 6–18 kuu järel), näiteks pädevuse tõendamise käigus ja seejärel regulaarselt vastavalt vajadusele.
17. Positiivse kontrollina kasutatavate ainete puhul tuvastatav struktuursete kromosoomiaberratsioonidega rakkude esinemissagedus peaks järjepidevalt olema suurem kui vastav spontaanse esinemise sagedus. Positiivse kontrolli annused tuleks valida nii, et toime oleks selgelt tuvastatav, kuid ei võimaldaks hindajal teha kohe kindlaks kodeeritud proovide identiteeti. Positiivse kontrollina kasutatavate ainete näited on esitatud tabelis 1.

Tabel 1. Positiivse kontrollina kasutatavate ainete näited

Aine [CASi nr] (viitenumber)
Tsüklofosfamiid(monohüdraat) [CASi nr: 50-18-0 (CASi nr: 6055-19-2)] (9)
Tsükloheksüülamiin [CASi nr: 108-91-8] (7)
Mitomütsiin C [CASi nr: 50-07-7] (6)
Monomeerne akrüülamiid [CASi nr: 79-06-1] (10)
Trietüleenmelamiin [CASi nr: 51-18-3] (8)

Negatiivsed kontrollid

18. Igal proovivõtukorral tuleks kasutada negatiivse kontrollina loomi, kellele on manustatud ainult lahustit või kandeainet ja keda on muidu koheldud samal viisil kui katserühma loomi. Valitud lahustist/kandeainest põhjustatud kromosoomiaberratsioonide ja muu kahjuliku mõju puudumist kinnitavate varasemate laboriandmete või avaldatud kontrollandmete puudumisel tuleks igal proovivõtukorral kasutada kontrollina ka loomi, kellele ei ole midagi manustatud, et tõendada kandeainega töödeldud kontrollrühma andmete vastuvõetavust.

KATSE KÄIK

Loomade arv

19. Uuringu alguses tuleks kindlaks määrata selline rühmade suurus, et igas rühmas oleks vähemalt viis isaslooma. Sellist loomade arvu peetakse piisavaks, et tagada küllaldane statistiline võimsus (st üldjuhul võimekus tuvastada miinimumeesmärgina kromosoomiaberratsioonide

esinemissageduse kahekordistumine 80-protsendilise tõenäosusega olulisusnivool 0,05, kui negatiivse kontrolli puhul täheldatav esinemissagedus on 1 % või suurem) (3, 11). Tüüpilisel juhul on suurim vajalik loomade arv katses, kus on kaks proovivõtuaega ning kolm eri annustele vastavat katserühma, paralleelse negatiivse kontrolli rühm ja positiivse kontrolli rühm (igas rühmas viis looma), 45 isendit.

Manustamiskava

20. Uuritavat kemikaali manustatakse tavaliselt üks kord (st ühekordse annusena); kui see on teaduslikult põhjendatud, võib kasutada ka mõnda muud annustamisrežiimi.
21. Rühmas, kus kemikaali kasutatakse suurimas annuses, võetakse manustamise järel proove kahel korral. Kuna uuritava(te) kemikaali(de) omastamiseks ja metaboliseerimiseks ning rakutsükli kineetikale mõju avaldumiseks vajalik aeg võib mõjutada kromosoomiaberratsioonide tuvastamise optimaalset aega, võetakse varasemad proovid umbes 24 tundi ja hilisemad proovid umbes 48 tundi pärast kemikaaliga töötlemist. Suurimast annusest erinevate annuste puhul tuleks proovid võtta varasemal proovivõtuajal ehk 24 tundi pärast töötlemist (see ajavahemik on lühem või sama pikk kui B-tüüpi spermatogoonide rakutsükli kestus ning esimese töötlemisjärgse metafaasi hindamise tõenäosus on seega optimaalne), välja arvatud juhul, kui mõne muu proovivõtuaja kasutamine on teadaolevalt asjakohasem ja põhjendatud.
22. Võib kasutada ka teistsuguseid proovivõtuaegu. Näiteks võib olla asjakohane kasutada S-faasist sõltumatu toimega kemikaalide puhul varasemat proovivõtuaega (st 24 tunnist lühemat ajavahemikku).
23. Võib kasutada ka korduvannustamisel põhinevat režiimi, näiteks juhul, kui katse viiakse läbi koos katsega, milles hinnatakse mõnda muud lõppnäitajat ja kus kasutatakse 28 päeva pikkust manustamisperioodi (nt vastavalt katsemeetodile B.58); sel juhul on siiski vaja kasutada erinevate proovivõtuaegade puhul täiendavaid loomade rühmi. Sellest lähtuvalt tuleb sellise manustamiskava asjakohasust igal eraldi juhul teaduslikult põhjendada.
24. Enne humaanset surmamist süstitakse loomadele intraperitoneaalselt sobivas annuses kemikaali, mis peatab rakkude jagunemise metafaasis (nt Colcemid® või kolhitsiin). Seejärel võetakse loomadelt sobiva intervalliga proove. Hiirte ja rottide puhul on see intervall umbes 3–5 tundi.

Annused

25. Kui annuste valimist hõlbustavate sobivate andmete puudumise tõttu tehakse annusevahemiku kindlakstegemiseks eeluuring, tuleks see vastavalt annusevahemiku kindlakstegemise uuringu tegemist käsitlevatele soovitudele viia läbi samas laboris, samast liigist ja liinist loomadega ning sama manustamisrežiimi alusel kui põhiuuring (12). Eeluuringu eesmärk peaks olema teha kindlaks suurim talutav annus, mis on määratletud kui annus, mille puhul täheldatakse uuringuperioodi jooksul vähest mürgist mõju (näiteks ebatavalised reaktsioonid või käitumine, väike kehamassi vähenemine või tsütotoksilisus vereloomesüsteemi suhtes), kuid mis ei

põhjusta surma ega selliseid kannatusi, valu või stressi, mis nõuaksid loomade humaanset surmamist (13).

26. Suurima annusena võib käsitada ka annust, mille puhul täheldatakse teatavaid mürgisuse ilminguid spermatogoonides (nt mitoetiliste spermatogoonide ning meioosi esimeses või teises metafaasis olevate rakkude suhtarvu vähenemine). Kõnealune vähenemine ei tohiks olla suurem kui 50 %.
27. Selliste uuritavate kemikaalide puhul, millel avaldub juba väikese mittemürgise annuse juures konkreetne bioloogiline aktiivsus (näiteks hormoonid ja mitogeenid) või mille puhul esineb toksikokineetiliste omadustega seotud küllastumine, ei pruugi annuste valimise kriteeriumid olla kohaldatavad ning neid kemikaale tuleks igal konkreetsel juhul eraldi hinnata.
28. Annusest sõltuvuse kohta teabe saamiseks tehtav täielik uuring peaks hõlmama negatiivse kontrolli rühma (punkt 18) ja vähemalt kolme eri annust, mis erinevad üksteisest üldjuhul kaks korda, ent kõige rohkem neli korda. Kui uuritav kemikaal ei ole annusevahemiku kindlakstegemise uuringus või olemasolevate andmete põhjal mürgine, peaks suurim korraga manustatav annus olema 2000 mg kehamassi kilogrammi kohta. Kui aga uuritav kemikaal põhjustab mürgisusnähte, tuleks suurima manustatava annusena kasutada suurimat talutavat annust ning kasutatav annusevahemik peaks soovitatavalt ulatuma suurimast annusest kuni annuseni, mille puhul täheldatav mürgisus on vähene või puudub. Kui mürgisust sihtkoe (st munandite) suhtes täheldatakse kõigi katses kasutatud annuste puhul, on soovitatav teha lisakatse, milles kasutatakse mittemürgiseid annuseid. Uuringutes, milles soovitakse kvantitatiivset annusest sõltuvust lähemalt iseloomustada, võib olla vaja kasutada täiendavaid annuserühmi. Teatavat liiki uuritavate kemikaalide (näiteks inimravimite) puhul, mille suhtes kohaldatakse erinõudeid, võivad asjaomased piirmäärad olla teistsugused. Kui uuritav kemikaal ei ole mürgine, tuleks kasutada piirannust ja kahte väiksemat annust (nagu on kirjeldatud eespool). Piirannus on 14 päeva pikkuse või pikema manustamisperioodi puhul 1000 mg kehamassi kilogrammi kohta päevas ning 14 päevast lühema manustamisperioodi puhul 2000 mg kehamassi kilogrammi kohta päevas.

Annuste manustamine

29. Katse kavandamisel tuleks silmas pidada inimese puhul eeldatavat kokkupuuteviisi. Seepärast võib vastavast põhjendusest lähtuvalt kasutada selliseid manustamisviise nagu manustamine söödaga, joogiveega, paiksest, naha alla, veenisiseselt, suu kaudu (toitmissondiga), sissehingamise teel või implantaadiga. Igal juhul tuleks manustamisviis valida nii, et oleks tagatud sihtkoe piisav kokkupuude uuritava kemikaaliga. Intraperitoneaalne süstimine ei ole tavaliselt soovitatav, kui see ei ole teaduslikult põhjendatud, kuna üldjuhul ei ole tegemist inimese puhul füsioloogiliselt asjakohase kokkupuuteviisiga. Kui uuritav kemikaal segatakse sööda või joogiveega, tuleks eriti üheainsa annuse manustamisel jälgida, et sööda ja vee tarbimise ning proovivõtmise vaheline ajavahemik oleks piisav, et võimaldada kemikaali mõju tuvastamist (vt punkt 33). Toitmissondi kaudu või süstimise teel korraga manustatav suurim

vedelikukogus sõltub katselooma suurusest. Tavaliselt ei tohiks see kogus olla suurem kui 1 ml 100 g kehamassi kohta, välja arvatud vesilahuste puhul, mida võib kasutada koguses 2 ml 100 g kehamassi kohta. Suurema koguse kasutamist (kui see on loomade heaolu käsitlevate õigusaktide kohaselt lubatud) tuleks põhjendada. Katses kasutatava ruumala varieeruvuse minimeerimiseks tuleks muuta kemikaali kontsentratsiooni, et tagada kehamassi suhtes püsiva ruumala kasutamine kogu annusevahemiku lõikes.

Vaatlused

30. Katseloomadel tuleks teha kliinilisi vaatlusi ja registreerida kliinilised sümptomid vähemalt üks kord päevas, igal päeval soovitatavalt samal ajal, ning võtta seejuures arvesse manustamisjärgse eeldatava mõju maksimaalse avaldumise ajavahemikku. Kõiki loomi tuleks haigestumise ja surmajuhtude tuvastamiseks kontrollida vähemalt kaks korda päevas. Kõikide loomade kaal tuleks määrata uuringu alguses, korduvannustamise uuringu kestel vähemalt kord nädalas ning humaanse surmamise hetkel. Kui uuring kestab vähemalt ühe nädala, tuleks vähemalt kord nädalas mõõta sööda tarbimist. Kui uuritavat kemikaali manustatakse joogiveega, tuleks vee tarbimist mõõta iga veevahetuse ajal ja vähemalt kord nädalas. Loomad, kellel täheldatakse liigse mittesurmava mürgisuse nähte, tuleks enne katse lõppu humaanselt surmata (13).

Kromosoomipreparaatide valmistamine

31. Kohe pärast humaanset surmamist võetakse ühest või kummastki munandist idurakususpensioon, mis viiakse hüpotoonilisse lahusesse ja fikseeritakse väljatöötatud meetodite kohaselt (nt allikad 2, 14, 15). Seejärel kantakse rakud objektiklaasi le ja värvitakse (16, 17). Kõik mikroskoobipreparaadid tuleks kodeerida, et nende identiteet ei oleks hindajale teada.

Analüüs

32. Iga looma puhul tuleks hinnata vähemalt 200 hästi väljendunud metafaasis rakku (3, 11). Kui laboris negatiivse kontrolli puhul varem täheldatud sagedus on $< 1\%$, tuleks statistilise võimsuse suurendamiseks hinnata üle 200 raku looma kohta (3). Tuleks kasutada tsentromeeri tuvastamist võimaldavaid värvimismeetodeid.
33. Kromosoomi- ja kromatiidiaberratsioonid tuleks registreerida eraldi ja liigitada need alatüübi alusel (katked, vahetused). Tuleks registreerida ka lüngad, kuid jätta need selle kindlakstegemisel, kas kemikaal põhjustab kromosoomiaberratsioonidega rakkude esinemissageduse olulist suurenemist, arvesse võtmata. Labori eeskirjadega tuleks tagada, et kromosoomiaberratsioonid analüüsivad väljaõppinud hindajad. Lähtuvalt asjaolust, et mikroskoobipreparaadi valmistamise käigus puruneb sageli osa metafaasis olevatest rakkudest ning sellega kaasneb kromosoomide kadu, peaks tsentromeeride arv hinnatavates rakkudes olema vähemalt $2n \pm 2$, kus n on liigiomane haploidne kromosoomiarv.

34. Ehkki katse eesmärk on tuvastada struktuurseid kromosoomiaberratsioone, on oluline registreerida polüploidsete rakkude ja endoreduplitseeritud kromosoomidega rakkude täheldamisel ka nende esinemissagedus (vt punkt 44).

ANDMED JA ARUANDLUS

Andmete töötlemine

35. Andmed iga looma kohta tuleks esitada tabelina. Iga looma puhul tuleks hinnata struktuurse(te) kromosoomiaberratsiooni(de)ga rakkude arvu ja kromosoomiaberratsioonide arvu raku kohta. Alatuüpidesse liigitatud kromatiidi- ja kromosoomiaberratsioonid (katked, vahetused) tuleks loetleda eraldi ning esitada nende arv ja esinemissagedus katse- ja kontrollrühmades. Lüngad registreeritakse eraldi. Lünkade esinemissagedus küll esitatakse, kuid üldjuhul ei võeta seda struktuursete kromosoomiaberratsioonide üldsageduse analüüsimisel arvesse. Polüploidsete rakkude või endoreduplitseeritud kromosoomidega rakkude esinemisel esitatakse ka nende protsentuaalne osakaal.
36. Tuleks esitada andmed mürgisuse ja kliiniliste sümptomite kohta (vt punkt 30).

Katse nõuetekohasuse kriteeriumid

37. Katse nõuetekohasuse kriteeriumid on järgmised:

- paralleelse negatiivse kontrolliga saadud tulemused on kooskõlas varasemaid negatiivse kontrolli andmeid käsitlevate avaldatud normidega, mille kohaselt on kromosoomiaberratsioonidega rakkude osakaal eeldatavalt $> 0 \%$ ja $\leq 1,5 \%$, ning samuti laboris kontrollidega varem saadud tulemustega, kui need on olemas (vt punktid 10 ja 18);
- paralleelsed positiivsed kontrollid kutsuvad esile reaktsioone, mis on kooskõlas varasemaid positiivsete kontrollide andmeid käsitlevate avaldatud normidega, samuti laboris positiivsete kontrollidega varem saadud tulemustega, kui need on olemas, ning paralleelsete positiivsete kontrollidega saadud väärtused on statistiliselt oluliselt suuremad kui negatiivse kontrolliga saadud väärtused (vt punktid 17 ja 18);
- analüüsitud rakkude ja eri annuste arv on piisav (vt punktid 28 ja 32);
- suurima annuse valimise kriteeriumid on kooskõlas punktides 25 ja 26 kirjeldatud kriteeriumidega.

38. Kui vaadeldakse nii meioosi kui ka mitoosi, tuleks tsütotoksilisuse hindamiseks teha iga töödeldud looma ja negatiivse kontrolli looma puhul kindlaks mitootiliste spermatogoonide ja meioosi esimeses või teises metafaasis olevate rakkude suhtarv proovis, kus on kokku 100 jagunevat rakku. Kui vaadeldakse üksnes mitoosi, tuleks iga looma puhul teha vähemalt 1000 raku põhjal kindlaks mitoosiindeks.

Tulemuste hindamine ja tõlgendamine

39. Annusest sõltuvuse analüüsimiseks piisavate andmete saamiseks on vaja uurida vähemalt kolme rühma, kus on töötlemiseks kasutatud eri annuseid.
40. Kui kõik katse nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, loetakse uuritava kemikaaliga saadud tulemus selgelt positiivseks, kui:
- vähemalt ühe katses kasutatud annuse puhul täheldatakse saadud väärtuse statistiliselt olulist suurenemist paralleelse negatiivse kontrolliga võrreldes,
 - kõnealune suurenemine on vähemalt ühe proovivõtuaja puhul annusest sõltuv ning
 - mis tahes saadud tulemus jääb väljapoole vastuvõetavat negatiivse kontrolli andmete vahemikku või laboris negatiivsete kontrollidega varem saadud tulemuste olemasolul selliste tulemuste jaotust (nt väljapoole Poissoni jaotuse usaldusvahemikku usaldusnivool 95 %).
41. Sel juhul käsitatakse uuritavat kemikaali võimelisena põhjustama katseloomade spermatogoonides kromosoomiaberratsioone. Soovitused kõige asjakohasemate statistiliste meetodite kohta on esitatud ka kirjanduses (11, 18). Kasutatavate statistiliste testide puhul tuleks katseüksusena käsitada üksikisendit.
42. Kui kõik katse nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, loetakse uuritava kemikaaliga saadud tulemus selgelt negatiivseks, kui:
- ühegi katses kasutatud annuse puhul ei täheldata saadud väärtuse statistiliselt olulist suurenemist paralleelse negatiivse kontrolliga võrreldes,
 - ühegi katsetingimuse puhul ei esine annusest sõltuvat väärtuse suurenemist ning
 - kõik saadud tulemused jäävad vastuvõetavasse negatiivse kontrolli andmete vahemikku või laboris negatiivsete kontrollidega varem saadud tulemuste olemasolul selliste tulemuste jaotusvahemikku (nt Poissoni jaotuse usaldusvahemikku usaldusnivool 95 %).
43. Sel juhul käsitatakse uuritavat kemikaali võimetuna põhjustama katseloomade spermatogoonides kromosoomiaberratsioone. Soovitused kõige asjakohasemate statistiliste meetodite kohta on esitatud ka kirjanduses (11, 18). Negatiivse tulemuse korral ei ole välistatud võimalus, et kemikaal põhjustab kromosoomiaberratsioone mõnes uuringuga hõlmamata hilisemas arenguetapis või kutsub esile geenimutatsioone.
44. Selgelt positiivset või negatiivset tulemust ei ole vaja üle kontrollida.
45. Juhul, kui tulemus ei ole selgelt negatiivne ega selgelt positiivne ning eesmärk on aidata kindlaks teha tulemuse – näiteks vaadeldava väärtuse väikese või piiripealse suurenemise – bioloogiline olulisus, tuleks andmete hindamiseks kasutada eksperdi hinnangut ja/või olemasolevatel katseandmetel põhinevat täiendavat analüüsi, näiteks kaaluda, kas positiivne tulemus jääb väljapoole vastuvõetavat negatiivse kontrolli andmete vahemikku või laboris negatiivsete kontrollidega varem saadud tulemuste jaotust (19).

46. Harvadel juhtudel ei võimalda andmed isegi pärast täiendavat analüüsi teha järeldust selle kohta, kas tulemus on positiivne või negatiivne; sel juhul loetakse tulemus ebaselgeks.
47. Polüploidsete rakkude arvu suurenemine võib viidata sellele, et uuritav kemikaal on võimeline pärssima mitoosiprotsesse ja põhjustama kromosoomiarvu muutusi (20). Endoreduplitseeritud kromosoomidega rakkude arvu suurenemine võib viidata sellele, et uuritav kemikaal on võimeline pärssima rakutsükli edenemist (21, 22) – see kromosoomiarvu muutusi põhjustav mehhanism erineb mitoosiprotsesside pärssimise mehhanismist (vt punkt 2). Seepärast tuleks polüploidsete rakkude ja endoreduplitseeritud kromosoomidega rakkude esinemissagedus registreerida eraldi.

Katseprotokoll

48. Katseprotokollis tuleks esitada järgmine teave.

Kokkuvõte

Uuritav kemikaal:

- allikas, partii number, aegumiskuupäev, kui on olemas;
- uuritava kemikaali püsivus, kui see on teada;
- uuritava kemikaali lahustuvus ja püsivus lahustis, kui see on teada;
- vastavalt vajadusele mõõtmistulemused söötme pH ja osmolaalsuse ning sademe tekke kohta pärast uuritava kemikaali lisamist;

Ühest koostisosast koosnev aine:

- füüsiline välimus, lahustuvus vees ja muud asjakohased füüsikalised-keemilised omadused;
- kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus, CASi number, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem, puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne;

Mitme koostisosa sisaldav aine, UVCB või segu:

- võimalikult täpne omaduste kirjeldus lähtuvalt koostisosade keemilisest määratlusest (vt eespool), kvantitatiivsest sisaldusest ja asjakohastest füüsikalised-keemilistest omadustest.

Uuritava kemikaali ettevalmistamine:

- kandeaine valimise põhjendus;
- uuritava kemikaali lahustuvus ja püsivus lahustis/kandeaines;
- sööda või joogiveega või sissehingamise teel manustamiseks sobiva valmistise valmistamine;
- valmistise analüüsi tulemused (nt püsivus, homogeensus, nominaalne kontsentratsioon), kui need on olemas.

Katseloomad:

- kasutatud liik/liin ja selle kasutamise põhjendus;
- loomade arv ja vanus;
- päritolu, pidamistingimused, söötmisandmed jne;
- loomade ühese identimise meetod;
- lühiajaliste uuringute puhul: iga looma kehamass katse alguses ja lõpus; ühest nädalast pikemate uuringute puhul: iga looma kehamass uuringu vältel ja sööda tarbimise andmed. Iga rühma kohta tuleks esitada kehamasside vahemik, keskväärtnus ja standardhälve.

Katsetingimused:

- positiivse ja negatiivse (kandeainega/lahustiga) kontrolli andmed;
- annusevahemiku kindlakstegemise uuringu andmed, kui need on olemas;
- annuste valimise põhjendus;
- manustamisviisi valimise põhjendus;
- uuritava kemikaali ettevalmistamise üksikasjad;
- uuritava kemikaali manustamise üksikasjad;
- surmamisaja valimise põhjendus;
- loomadel avalduva mürgisuse mõõtmise meetodid, sealhulgas andmed histopatoloogilise või hematoloogilise analüüsi kohta, kui seda on tehtud, samuti loomade vaatlemise ja kehamassi määramise sagedus;
- negatiivsete tulemuste korral meetodid selle kontrollimiseks, et uuritav kemikaal on jõudnud sihtkoosse või üldvereringesse;
- vajaduse korral tegelik annus (milligrammides kehamassi kilogrammi kohta päevas), mis arvutatakse lähtuvalt sööda/joogivee tarbimisest ja selles sisalduva uuritava kemikaali kontsentratsioonist (miljondikes);
- sööda ja vee kvaliteedi üksikasjad;
- manustamis- ja proovivõtturežiimide üksikasjalik kirjeldus ja nende valimise põhjendus;
- humaanse surmamise meetod;
- valutustamismeetod (kui seda kasutati);
- kudede eraldamise meetodid;
- kemikaal, mida kasutati rakkude jagunemise peatamiseks metafaasis, selle kontsentratsioon ja manustamise kestus;
- mikroskoobipreparaadi valmistamise meetodid;

- aberratsioonide hindamise kriteeriumid;
- analüüsitud rakkude arv looma kohta;
- kriteeriumid uuringutulemuse liigitamiseks positiivseks, negatiivseks või ebaselgeks.

Tulemused:

- loomade seisund enne katset ja katseperioodi kestel, sealhulgas mürgisuse nähud;
- kehamass ja organite kaal surmamishetkel (korduvmanustamise korral manustamisperioodi vältel mõõdetud kehamass);
- mürgisusnähud;
- mitoosiindeks;
- mitootiliste spermatogoonide ja meioosi esimeses või teises metafaasis olevate rakkude suhtarv või mõni muu tõend, et sihtkude on kemikaaliga kokku puutunud;
- aberratsioonitüübid ja aberratsioonide arv eraldi iga looma kohta;
- aberratsioonide üldarv rühma kohta ning vastavad keskvaartused ja standardhälbed;
- aberratsioonidega rakkude arv rühma kohta ning vastavad keskvaartused ja standardhälbed;
- võimaluse korral andmed annusest sõltuvuse kohta;
- teave statistilise analüüsi ja kasutatud meetodite kohta;
- paralleelse negatiivse kontrolli andmed;
- negatiivse kontrolliga varem saadud andmed, sealhulgas väärtusevahemikud, keskvaartused, standardhälbed ja usaldusvahemikud usaldusnivool 95 % (kui need on olemas), või varasemad avaldatud negatiivse kontrolli andmed, mida kasutati katsetulemuste vastuvõetavuse hindamiseks;
- paralleelse positiivse kontrolli andmed;
- täheldatud muutused ploidsuses, sealhulgas polüploidsete ja/või endoreduplikatsiooniga rakkude esinemissagedus.

Tulemuste arutelu

Järeldused

KIRJANDUS

- (1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014–2015. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 238. OECD, Pariis.
- (2) Adler, I.-D. (1984). Cytogenetic Tests in Mammals. Väljaandes: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. Venitt, S., ja Parry, J. M. (toim.), IRL Press, Oxford, Washington, D. C. Lk 275–306.
- (3) Adler, I.-D., Shelby, M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T., ja Tanaka, N. (1994). Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. *Mutat. Res.* 312: 313–318.
- (4) Russo, A. (2000). *In Vivo* Cytogenetics: Mammalian Germ Cells. *Mutat. Res.* 455: 167–189.
- (5) Hess, R. A., ja Renato de Franca, L. (2008). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. Väljaandes: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis. Cheng, C. Y. (toim.), Landes Bioscience ja Springer Science+Business Media. Lk 1–15.
- (6) Adler, I.-D. (1974). Comparative Cytogenetic Study after Treatment of Mouse Spermatogonia with Mitomycin C. *Mutat. Res.* 23(3): 368–379. Adler, I.-D. (1986). Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications. Väljaandes: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis. Ramel, C., Lambert, B., ja Magnusson, J. (toim.), Liss, New York. Lk. 477–484.
- (7) Cattanach, B. M., ja Pollard, C. E. (1971). Mutagenicity Tests with Cyclohexylamine in the Mouse. *Mutat. Res.* 12: 472–474.
- (8) Cattanach, B. M., ja Williams, C. E. (1971). A search for Chromosome Aberrations Induced in Mouse Spermatogonia by Chemical Mutagens. *Mutat. 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. *Mutat. Res.* 57(3): 313–324.
- (11) Adler, I.-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I., ja Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis. *Mutat. 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., ja 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. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (14) Yamamoto, K., ja Kikuchi, Y. (1978). A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes. *Mutat. Res.* 52: 207–209.
- (15) Hsu, T. C., Elder, F., ja 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., ja Ford, C. E. (1964). An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes. *Cytogenet. Cell Genet.* 3: 289–294.
- (17) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D. G., ja Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetics Assays. Väljaandes: Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Kirkland, D. J. (toim.), Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney. Lk 115–141.
- (18) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G., ja Savage, J. R. K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays. Väljaandes: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part III. Kirkland, D. J. (toim.), Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney. Lk 184–232.
- (19) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H. J., ja Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data. *Mutat. Res.* 723: 87–90.
- (20) Warr, T. J., Parry, E. M., ja 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. *Mutat. Res.* 287: 29–46.
- (21) Huang, Y., Change, C., ja 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. *Mutat. Res.* 119: 403–413.

Liide

MÕISTED

Aneuploidsus – mis tahes kõrvalekalle normaalsest diploidsest (või haploidsest) kromosoomiarvust ühe või enama kromosoomi võrra, kuid mitte terve(te) kromosoomikomplekti(de) võrra (polüploidsus).

Genotoksilisus – üldmõiste, mis hõlmab DNA ja kromosoomide mis tahes liiki kahjustusi, sealhulgas katkeid, deletsioone, adukte, nukleotiidide modifikatsioone ja sidemete teket, ümberkorraldusi, mutatsioone, kromosoomiaberratsioone ja aneuploidsust. Genotoksiline mõju ei väljendu alati mutatsiooni või püsiva kromosoomikahjustusena.

Kemikaal – aine või segu.

Klastogeen – mis tahes kemikaal, mis põhjustab rakkude või organismide populatsioonis struktuurseid kromosoomiaberratsioone.

Kromatiidiaberratsioon – struktuurne kromosoomikahjustus, mis väljendub üksikkromatiidi katkemisena või kromatiidide katkemise ja omavahelise taasühinemisena.

Kromosoomiaberratsioon – struktuurne kromosoomikahjustus, mis väljendub mõlema kromatiidi katkemisena või katkemise ja taasühinemisena samas kohas.

Kromosoomiarvu kõrvalekalle – kasutatud loomadele omase tavapärase kromosoomiarvu muutus.

Kromosoomide varieeruvus – kromosoomide kuju ja suuruse varieeruvus (nt metatsentrilised, akrotsentrilised vm kromosoomid).

Lünk – akromaatileine kahjustus, mis on väiksem kui kromatiidi laius ja millega kaasneb kromatiidi struktuuri minimaalne muutus.

Mitoos – rakutuuma jagunemise protsess, mis tavaliselt jagatakse profaasiks, prometafaasiks, metafaasiks, anafaasiks ja telofaasiks.

Mitoosiindeks – suhtarv, mis saadakse metafaasis olevate rakkude arvu jagamisel vaatlusaluse rakupopulatsiooni rakkude üldarvuga; võimaldab hinnata paljunemismäära selles rakupopulatsioonis.

Mutageensus – omadus, mis põhjustab pärilikke muutusi geenide DNA aluspaaride järjestuses või kromosoomide struktuuris (kromosoomiaberratsioonid).

Polüploidsus – haploidse kromosoomiarvu (n) kordsus, v.a diploidsus (nt $3n$, $4n$ jne).

Struktuurne aberratsioon – raku jagunemise metafaasietapis mikroskoobi abil tuvastatav kromosoomistruktuuri muutus, mis väljendub deletsioonis või fragmentide vahetuses.

Tsentromeer – kromosoomi piirkon(na)d, mille külge kinnituvad raku jagunemise ajal

kääviniidid, mis võimaldavad tütarkromosoomidel liikuda korrapäraselt tütarrakkude poolustele.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

UVCB – tundmatu või muutuva koostisega kemikaal, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal.“

5) B osas asendatakse peatükk B.40 järgmisega:

„B.40. *IN VITRO* NAHASÖÖVITUS: TRANSKUTAANSE ELEKTRITAKISTUSE (TET) MÕÕTMISEL PÕHINEV KATSEMEETOD

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 430 (2015). Nahasöövituse all mõistetakse läbi marrasknaha pärisnahani ulatuva nähtava nekroosina avalduva pöördumatu nahakahjustuse tekkimist pärast uuritava kemikaaliga töötlemist, nagu on määratletud ÜRO ühtses ülemaailmses kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteemis (GHS) (1) ning Euroopa Liidu (EL) määruses nr 1272/2008, milles käsitletakse ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist (edaspidi „CLP-määrus“)¹. Käesoleva ajakohastatud katsemeetodi B.40 näol on tegemist *in vitro* meetodiga, mis võimaldab tuvastada mittesöövitavaid ja söövitavaid aineid ja segusid kooskõlas ÜRO GHSi (1) ja CLP-määrusega.
2. Nahasöövituse hindamisel on tavapäraselt kasutatud laboriloomi (katsemeetod B.4, mis on samaväärne algselt 1981. aastal vastu võetud ning aastatel 1992, 2002 ja 2015 muudetud OECD katsejuhendiga nr 404) (2). Peale käesoleva katsemeetodi B.40 on valideeritud ja vastu võetud muudki *in vitro* katsemeetodid kemikaalide võimaliku nahka söövitava toime tuvastamiseks – näiteks katsemeetodid B.40b (samaväärne OECD katsejuhendiga nr 431) (3) ja B.65 (samaväärne OECD katsejuhendiga nr 435) (4), mis võimaldavad vajaduse korral teha kindlaks ka söövitava kemikaali alamkategoriat. Samuti on katsemeetodi B.46 (samaväärne OECD katsejuhendiga nr 439) (5) raames vastu võetud mitu valideeritud *in vitro* katsemeetodit nahaärrituse hindamiseks. OECD juhenddokumendis nahasöövituse ja -ärrituse puhul kasutatava katsete tegemist ja hindamist käsitleva ühtse lähenemisviisi kohta kirjeldatakse mitut moodulit, milles eri teabeallikad ja analüüsivahendid on rühmitatud, ning i) antakse suuniseid, kuidas lõimida ja kasutada olemasolevaid katse- ja muid andmeid kemikaalide võimaliku nahka ärritava ja nahka söövitava toime hindamiseks ja ii) pakutakse välja lähenemisviis juhaks, kui on vaja teha täiendavaid katseid (6).
3. Käesolevas katsemeetodis on käsitletud inimtervisega seotud lõppnäitajana nahasöövitust. Meetod põhineb roti naha transkutaanse elektritakistuse (TET) mõõtmisel ning selle puhul kasutatakse nahakettaid, mille abil tehakse kindlaks söövitavad ained selle järgi, kas need on

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

võimelised kahjustama normaalse sarvkihi terviklikkust ja selle toimimist kaitsekihina. Vastav OECD katsejuhend võeti algselt vastu 2004. aastal ja seda ajakohastati 2015. aastal, et lisada viide eespool nimetatud juhenddokumendile katsete tegemist ja hindamist käsitleva ühtse lähenemisviisi kohta.

4. *In vitro* nahasöövituse tuvastamise meetoodika hindamiseks regulatiivsel eesmärgil viidi läbi valideerimiseelsed uuringud (7) ja seejärel roti naha TET mõõtmisel põhineva, nahasöövituse hindamiseks kasutatava katsemeetodi ametlik valideerimisuuringu (8, 9, 10, 11). Nende uuringute tulemusena esitati soovitus, et kõnealust TET mõõtmisel põhinevat katsemeetodit, mis on määratud valideeritud standardmeetodiks (VSM), võiks kasutada regulatiivsel eesmärgil *in vivo* nahasöövituse hindamiseks (12, 13, 14).
5. Enne kui regulatiivsel eesmärgil nahasöövituse hindamiseks saab VSMi kõrval kasutada mõnda muud TET mõõtmisel põhinevat soovitud sarnast või muudetud *in vitro* katsemeetodit, tuleks teha kindlaks sellise meetodi usaldusväärsus, asjakohasus (täpsus) ja piirangud kavandatava kasutusotstarbe puhul, et tagada selle sarnasus VSMiga kooskõlas tulemuslikkuse standardites sätestatud nõuetega (15). OECD otsuse kohane andmete vastastikune tunnustamine on tagatud üksnes pärast seda, kui tulemuslikkuse standarditele vastav mis tahes välja pakutud uus või ajakohastatud katsemeetod on läbi vaadatud ja asjaomasesse OECD katsejuhendisse lisatud.

MÕISTED

6. Kasutatud mõisted on määratletud liites.

LÄHTEKAALUTLUSED

7. Valideerimisuuringu (10) ja muude avaldatud uuringute (16, 17) andmeil võimaldab roti naha TET mõõtmisel põhinev katsemeetod eristada 122 ainet sisaldavas andmebaasis esindatud teadaolevaid nahka söövitavaid aineid mittesöövitavatest ainetest üldise tundlikkusega 94 % (51/54) ja spetsiifilisusega 71 % (48/68).
8. Käesolevas katsemeetodis käsitletakse *in vitro* nahasöövitust. Meetod võimaldab teha kooskõlas ÜRO GHSi / CLP-määrusega kindlaks mittesöövitavad ja söövitavad uuritavad kemikaalid. Nagu nähtub valideerimisuuringutest (8, 9, 10, 11), piirab selle katsemeetodi kasutamist asjaolu, et see ei võimalda liigitada söövitavaid aineid ja segusid ÜRO GHSi / CLP-määruse kohastesse alamkategoriatesse. Käesoleva katsemeetodi kasutusviis määratakse kindlaks kohaldatava õigusraamistikuga. Ehkki käesolev katsemeetod ei võimalda saada piisavat teavet nahaärrituse kohta, tuleks tähele panna, et tervisemõjuna hinnatavat *in vitro* nahaärritust käsitletakse konkreetselt katsemeetodis B.46 (5). Ühekordse nahakaudse kokkupuute järel nahale avalduva lokaalse toime täielikku hindamist on kirjeldatud OECD juhenddokumendis katsete tegemist ja hindamist käsitleva ühtse lähenemisviisi kohta (6).

9. Käesoleva katsemeetodi valideerimiseks uuriti paljusid eri kemikaale, peamiselt aineid; valideerimisuuringu empiirilises andmebaasis on 60 ainet paljudest eri kemikaaliklassidest (8, 9). Kokkuvõetuna nähtub olemasolevatest andmetest, et katsemeetod on kasutatav paljude eri kemikaaliklasside ja eri füüsikalises olekus ainete, sealhulgas vedelike, pooltahkete ja tahkete ainete ning vahade puhul. Tuleks märkida, et kuna teatud kindlate füüsikaliste olekute puhul ei ole sobivate võrdlusandmetega katseained hõlpsalt kättesaadavad, on valideerimise käigus hinnatud suhteliselt väikest arvu vahasid ja tahkeid söövitavaid aineid. Vedelikud võivad olla vesilahused või muud vedelikud; tahked ained võivad olla vees lahustuvad või lahustumatud. Kui on võimalik tõendada, et katsemeetodit ei saa teatud kindla kategooria ainete puhul kasutada, tuleks hoiduda selle kasutamisest sellise kategooria ainete puhul. Peale selle saab käesolevat katsemeetodit ainete kõrval eeldatavalt kasutada ka segude puhul. Ent kuna segud kuuluvad paljudesse eri kategooriatesse ja on eri koostisega ning nende kasutamise kohta katses on praegu piiratud hulgal teavet, tuleks juhul, kui on võimalik tõendada, et katsemeetodit ei saa teatud kindla kategooria segude puhul kasutada (nt strateegia abil, mille on 2012. aastal välja pakkunud Eskes *et al.*) (18), hoiduda selle kasutamisest sellise kategooria segude puhul. Kui soovitakse saada kavandatud regulatiivsel eesmärgil andmeid segu kohta, tuleks enne katsemeetodi kasutamist kaaluda, kas ja kuidas see võimaldab saada kõnealusele eesmärgile vastavaid asjakohaseid tulemusi. Selline kaalumise ei ole vajalik, kui asjaomase segu hindamine on regulatiivse nõudega ette nähtud. Gaase ja aerosooli ei ole valideerimisuuringutes veel hinnatud (8, 9). Ehkki on võimalik, et neidki saab uurida TET mõõtmisel põhineva katsemeetodiga, ei võimalda praegune katsemeetod gaaside ega aerosoolide uurimist.

KATSE PÕHIMÕTE

10. Uuritav aine kantakse kuni 24 tunniks nahaketaste marrasknahale kahekambrilises katsesüsteemis, milles nahakettad toimivad kambritevahelise eralduskihina. Nahakettad võetakse humaanselt surmatud 28–30 päeva vanustelt rottidelt. Söövitavad kemikaalid tehakse kindlaks nende võime järgi kahjustada normaalse sarvkihi terviklikkust ja selle toimimist kaitsekihina; see ilmneb mõõdetud TET vähenemisena allapoole läviväärtust (16) (vt punkt 32). Roti naha TET läviväärtuseks on valitud 5 kΩ; selle väärtuse valimisel on lähtutud suurest hulgast andmetest paljude eri ainete kohta, millest valdava enamiku puhul on TET väärtus nimetatud väärtusest selgelt suurem (sageli > 10 kΩ) või selgelt väiksem (sageli < 3 kΩ) (16). Üldjuhul ei põhjusta uuritavad kemikaalid, mis on loomadele mitesöövitavad ning kas ärritavad või mitteärritavad, TET vähenemist kõnealusest läviväärtusest allapoole. Muude nahapreparaatide või seadmete kasutamine võib aga tingida selle läviväärtuse muutmise ning sel juhul on vajalik täiendav valideerimine.
11. Käesolev katsemeetod hõlmab värvaine sidumise etappi, et võimaldada katseliselt kinnitada TET mõõtmisel saadud positiivseid tulemusi, sealhulgas juhul, kui saadud väärtus jääb 5 kΩ lähedusse. Värvaine sidumise etapis tehakse kindlaks, kas ioonilise läbitavuse suurenemine on tingitud sarvkihi füüsilisest hävimisest. On tõendatud, et roti naha TET mõõtmisel põhineva

meetodiga saab prognoosida katsemeetodi B.4 abil hinnatavat *in vivo* söövitavat toimet küülikul (2).

PÄDEVUSE TÕENDAMINE

12. Enne käesolevale katsemeetodile vastava, roti naha TET mõõtmisel põhineva katsemeetodi regulaarset kasutamist tuleks labori tehnilise pädevuse tõendamiseks õigesti liigitada kaksteist tabelis 1 loetletud soovitatavat pädevusainet. Kui mõni loetletud ainetest ei ole kättesaadav või kui see on põhjendatav, võib kasutada mõnda muud ainet, mille kohta on olemas piisavad *in vivo* ja *in vitro* võrdlusandmed (nt võrdluskemikaalide loetelust (16) valitud ainet), ent üksnes juhul, kui kohaldatakse samu valikukriteeriume, nagu on kirjeldatud tabelis 1.

Tabel 1. Pädevusainete loetelu¹

Aine	CASi nr	Kemikaaliklass ²	ÜRO GHSi / CLP-määruse kohane <i>in vivo</i> tulemustel põhinev kategooria ³	VSMga saadud <i>in vitro</i> tulemustel põhinev kategooria	Füüsikaline olek	pH ⁴
<i>In vivo</i> söövitavad ained						
<i>N,N'</i> -dimetüüldipropüleentriamiin	10563-29-8	Orgaaniline alus	1A	6 × S	V	8,3
1,2-diaminopropaan	78-90-0	Orgaaniline alus	1A	6 × S	V	8,3
Väävelhape (10 %)	7664-93-9	Anorgaaniline hape	(1A)/1B/1C	5 × S 1 × MS	V	1,2
Kaaliumhüdroksiid (10 % vesilahus)	1310-58-3	Anorgaaniline alus	(1A)/1B/1C	6 × S	V	13,2
Oktaanhape (kaprüülhape)	124-07-2	Orgaaniline hape	1B/1C	4 × S 2 × MS	V	3,6
2- <i>tert</i> -butüülfenool	88-18-6	Fenool	1B/1C	4 × S 2 × MS	V	3,9
<i>In vivo</i> mittesöövitavad ained						
Isostearhape	2724-58-5	Orgaaniline hape	MS	6 × MS	V	3,6
4-amino-1,2,4-triasool	584-13-4	Orgaaniline alus	MS	6 × MS	T	5,5
Fenetüülbromiid	103-63-9	Elektrofiil	MS	6 × MS	V	3,6
4-(metüültio)bensaldehüüd	3446-89-7	Elektrofiil	MS	6 × MS	V	6,8
1,9-dekadien	1647-16-1	Neutraalne orgaaniline aine	MS	6 × MS	V	3,9
Tetrakloroetüleen	127-18-4	Neutraalne orgaaniline aine	MS	6 × MS	V	4,5

Lühendid: CASi nr – Chemical Abstracts Service'i registrinumber; VSM – valideeritud standardmeetod.

¹ Need pädevusained, mis on järjestatud esmalt nii, et söövitavad ained on esitatud enne mittesöövitavaid aineid, ning seejärel söövitavuse alamkategooria ja edasi kemikaaliklassi järgi, on valitud ainete hulgast, mida kasutati Alternatiivsete Meetodite Valideerimise Euroopa Keskuse (ECVAM) uuringus roti naha TET-I põhineva katsemeetodi valideerimiseks (8, 9). Kui ei ole teisiti märgitud, uuriti kõnealuseid aineid sellise puhtusastme juures, nagu need kaubanduslikust allikast osteti (8). Ainete valimisel lähtuti võimalikult suurel määral sellest, et: i) need oleksid VSMi abil mõõdetava või ennustatava eri söövitavusega (nt mittesöövitavad, nõrgalt söövitavad ja tugevalt söövitavad ained), ii) need esindaksid valideerimisuuringu kasutatud kemikaaliklasse, iii) VSMi tulemuslikkuse näitajad oleksid arvesse võetud, iv) ainetel oleks täpselt määratletud keemiline struktuur, v) need võimaldaksid saada standardse *in vivo* katsemeetodiga selgepiirilisi tulemusi, vi) need oleksid turul kättesaadavad ning vii) nende kõrvaldamise kulud ei oleks liiga suured.

² Kemikaaliklass, mille on kindlaks määranud Barratt *et al.* (8).

³ ÜRO GHSi / CLP-määruse kohastele 1A, 1B ja 1C kategooriatele vastavad ÜRO I, II ja III pakendirühm.

⁴ Need pH väärtused on avaldanud Fentem *et al.* (9) ja Barratt *et al.* (8).

KATSE KÄIK

- Standardne töökord roti naha TET-I põhineva, nahasöövituse hindamist võimaldava katsemeetodi rakendamiseks on leitud kirjandusest (19). Käesoleva katsemeetodi kohases roti naha TET mõõtmise katses peaksid olema täidetud järgmised tingimused.

Loomad

- Tuleks kasutada rotte, sest nende naha tundlikkus ainetele käesoleva katsemeetodi kasutamisel on juba tõendatud (12) ning tegemist on ainsa nahaallikaga, mis on ametlikult valideeritud (8, 9). Väga oluline on roti vanus (naha võtmise hetkel) ja päritoluliin, kuna tuleks tagada, et karvanääpsud on uinavas olekus ja täiskasvanud looma karvakasv ei ole veel alanud.
- Noorte, umbes 22 päeva vanuste (Wistari või sellega võrreldavast liinist pärit) emas- või isasrottide selja- ja küljekarv eemaldatakse hoolikalt väikeste kääridega. Seejärel pestakse loomi hoolikalt pühkimise teel ning pügatud piirkond kastetakse üleni antibiootikumilahusesse (mis sisaldab näiteks streptomütsiini, penitsilliini, klooramfenikooli ja amfoteritsiini kontsentratsioonis, mille juures bakterite kasv on pärssitud). Loomi pestakse antibiootikumidega uuesti kolmandal või neljandal päeval pärast esimest pesu ning kasutatakse kolme päeva jooksul pärast teist pesu, kui sarvkiht on karvade eemaldamisest taastunud.

Nahaketaste ettevalmistamine

- Loomad surmatakse humaanselt 28–30 päeva vanuses; see vanus on väga oluline. Seejärel eemaldatakse iga looma selja- ja küljenahk ning tõmmatakse sellelt ettevaatlikult maha liigne nahaalune rasvakiht. Lõigatakse välja nahakettad läbimõõduga umbes 20 mm. Nahka võib enne ketaste kasutamist säilitada, kui on tõendatud, et sellise naha puhul positiivse ja negatiivse kontrolliga saadud tulemused on samaväärsed värske naha kasutamisel saadud tulemustega.
- Iga nahaketas asetatakse polütetrafluoroetüleentoru (PTFE-toru) ühele otsale nii, et marrasknaha pind on toruga kontaktis. Toru otsa surutakse naha paigal hoidmiseks kummist rõngastihend ja liigne kude lõigatakse ära. Seejärel tihendatakse kummist rõngastihendi ja

PTFE-toru ühenduskoht hoolikalt vaseliiniga. Toru asetatakse vastuvõtunõusse, mis sisaldab MgSO_4 lahust (154 mM), ja kinnitatakse vedruklambriga (joonis 1). Nahaketas peaks jääma üleni MgSO_4 lahusesse. Ühe roti nahast võib saada 10–15 nahaketast. Toru ja rõngastihendi mõõtmed on esitatud joonisel 2.

18. Enne katse algust mõõdetakse iga looma naha kvaliteedi kontrollimiseks kahe nahaketta transkutaanne elektritakistus. Kummagi ketta elektritakistus peaks olema suurem kui 10 k Ω , et ülejäänud kettaid oleks võimalik katses kasutada. Kui takistus on väiksem kui 10 k Ω , tuleks kõik ülejäänud sellest nahast saadud kettad ära visata.

Uuritavate kemikaalide ja kontrollainetega töötlemine

19. Katsemudeli piisava töökindluse tõendamiseks tuleks igas mõõtmistsükli (katses) kasutada paralleelset positiivset ja negatiivset kontrolli. Igas eraldi mõõtmistsükli (katses) tuleks kasutada ühelt ja samalt loomalt saadud nahakettaid. Soovitavad positiivse ja negatiivse kontrolli ained on vastavalt 10 M soolhape ja destilleeritud vesi.
20. Vedelad uuritavad kemikaalid (150 μl) kantakse ühtlaselt toru sees olevale marrasknahale. Tahke aine uurimisel kantakse see ühtlaselt nahakettale piisavas koguses, et kogu marrasknaha pind saaks kaetud. Tahkele ainele lisatakse deioniseeritud vett (150 μl) ja toru loksutatakse ettevaatlikult. Nahaga maksimaalse kontakti saavutamiseks võib olla vaja uuritavat tahket kemikaali sulatamiseks või pehmendamiseks kuni 30 °C-ni soojendada või seda teralise materjali või pulbri saamiseks peenestada.
21. Iga uuritava kemikaali ja kontrollaine jaoks kasutatakse igas mõõtmistsükli (katses) kolme nahaketast. Uuritavat kemikaali hoitakse temperatuuril 20–23 °C nahaga kontaktis 24 tundi. Seejärel pestakse nahka uuritava kemikaali eemaldamiseks toatemperatuuril oleva või jahedama kraanivee joaga, kuni materjali enam ei eraldu.

TET mõõtmine

22. Naha impedantsi määramiseks mõõdetakse TETd madalpingel töötava Wheatstone'i vahelduvvoolusilla abil (18). Mõõtesilla üldised tehnilised näitajad on järgmised: tööpinge 1–3 V, siinus- või ristkülikvahelduvvool sagedusega 50–1000 Hz ja mõõtepiirkond vähemalt 0,1–30 k Ω . Valideerimisuuringus kasutatud mõõtesillaga mõõdeti sagedusel 100 Hz või 1 kHz induktiivsust, mahtuvust ja takistust väärtuseni vastavalt 2000 H, 2000 μF või 2 M Ω ; seejuures kasutati jada- või rööpühenduse puhul saadud näituseid. TET-põhises söövitavuskatses mõõdetakse takistust sagedusel 100 Hz ning kasutatakse jadaühenduse puhul saadud näituseid. Enne elektritakistuse mõõtmist lisatakse naha pindpinevuse vähendamiseks 70-protsendilist etanooli koguses, millest piisab marrasknaha katmiseks. Mõne sekundi pärast eemaldatakse etanool torust ja koe niisutamiseks lisatakse 3 ml MgSO_4 lahust (154 mM). Nahakettast kummalegi poole paigutatakse mõõtesilla elektroodid, et mõõta nahaketta takistust kiloomides (joonis 1). Elektroodide mõõtmed ja hammasklambrist allapoole ulatuva elektroodiosa pikkus on esitatud joonisel 2. Sisemisele elektroodile kinnitatav klamber toetatakse takistuse

mõõtmise ajaks PTFE-toru otsale, et elektrood ulatuks alati samas pikkuses MgSO_4 lahusesse. Välimine elektrood paigutatakse vastuvõtunõusse nii, et see toetub nõu põhjale. Vedruklambri ja PTFE-toru põhja vahelist kaugust hoitakse konstantsena (joonis 2), sest see kaugus mõjutab saadavat takistuse väärtust. Seega peaks vahemaa sisemise elektroodi ja nahaketta vahel olema konstantne ja minimaalne (1–2 mm).

23. Kui mõõdetud takistuse väärtus on üle 20 k Ω , võib see olla tingitud uuritava kemikaali jääkidest nahaketta marrasknaha pinnal. Võib proovida neid jääke veel kord eemaldada, näiteks sulgeda PTFE-toru kinnastatud pöidlaga ja loksutada seda umbes kümme sekundit; MgSO_4 lahus valatakse ära ja takistuse mõõtmist korratakse värske MgSO_4 lahusega.
24. Katseseadme omadused ja mõõtmised ning katse läbiviimise kord võivad mõjutada saadavaid TET väärtusi. Söövitavuse läviväärtus 5 k Ω on kehtestatud käesolevas katsemeetodis kirjeldatud konkreetse seadme ja mõõtmismeetodiga saadud andmete põhjal. Katsetingimuste muutmisel või teistsuguse seadme kasutamisel võivad lävi- ja kontrollväärtused olla teised. Seepärast on vaja selle meetodi ja takistuse läviväärtuste kalibreerimiseks teha mõõtmisi pädevusainetega, mis on valitud valideerimisuuringus kasutatud ainete hulgast (8, 9) või kemikaaliklassidest, mis on sarnased uuritavate ainete klassidega. Sobivate pädevusainete loetelu on esitatud tabelis 1.

Värvaine sidumisel põhinevad meetodid

25. Teatavate mittesöövitavate ainete kokkupuutumise tulemusena võib takistus muutuda läviväärtusest 5 k Ω väiksemaks, kuna sellised ained võimaldavad ioonidel läbi sarvkihi liikuda ja vähendavad seeläbi elektritakistust (9). Näiteks võivad pindaktiivsed neutraalsed orgaanilised ained ja kemikaalid (sealhulgas detergendid, emulgaatorid ja muud pindaktiivsed ained) eemaldada nahast lipiidid ning muuta kaitsekihi ioonidele paremini läbitavaks. Seepärast tuleks juhul, kui selliste kemikaalide puhul täheldatav TET väärtus on nahaketaste nähtavate kahjustuste puudumise korral umbes 5 k Ω või sellest väiksem, hinnata nii kontroll- kui ka katsekoe puhul värvaine imendumist, et teha kindlaks, kas saadud TET väärtus oli põhjustatud naha suurenenud läbilaskvusest või söövitusest (7, 9). Viimasel juhul tungib värvaine sulforodamiin B nahapinnale kantuna vigastatud sarvkihi kohalt kiiresti naha sisse ja põhjustab sarvkihi aluste kudede värvumise. See konkreetne värvaine on püsiv paljude kemikaalide suhtes ning seda ei mõjuta allpool kirjeldatud ekstraheerimine.

Värvaine sulforodamiin B pealekandmine ja eemaldamine

26. Pärast TET määramist valatakse magneesiumsulfaat torust välja ja nahka uuritakse hoolikalt silmanähtavate kahjustuste suhtes. Kui silmanähtavaid suuri kahjustusi (nt perforatsiooni) ei esine, kantakse iga nahaketta marrasknaha pinnale kaheks tunniks 150 μl värvaine sulforodamiin B (happeline punane 52; CI number: 45100; CASi number: 3520-42-1) 10-protsendilist (massiühikutes mahuühiku kohta) lahust destilleeritud vees. Seejärel pestakse nahakettaid toatemperatuuril oleva või jahedama kraaniveega umbes kümme sekundit liigse/seondumata värvaine eemaldamiseks. Iga nahaketas eemaldatakse ettevaatlikult PTFE-

torult ja asetatakse viaali (nt 20-milliliitrisesse klaasist stsintillatsiooniviaali), mis sisaldab deioniseeritud vett (8 ml). Viaale loksutatakse ettevaatlikult viis minutit, et eemaldada kogu seondumata värvaine. Loputamist korratakse ning seejärel eemaldatakse nahakettad ja pannakse viaalidesse, mis sisaldavad 5 ml 30-protsendilist (massiühikutes mahuühiku kohta) naatriumdodetsüülsulfaadi (SDS) lahust destilleeritud vees, ning kettaid inkubeeritakse temperatuuril 60 °C hommikuni.

27. Pärast inkubeerimist nahakettad eemaldatakse ja visatakse ära ning järelejäänud lahust tsentrifuugitakse kaheksa minutit temperatuuril 21 °C (suhtelise tsentrifugaaljõuga ~175 g). Seejärel lahjendatakse supernatandist võetud 1 ml suurust proovi mahuliselt viis korda (st 1 ml + 4 ml) 30-protsendilise (massiühikutes mahuühiku kohta) SDSi lahusega destilleeritud vees. Lahuse optilist tihedust mõõdetakse lainepikkusel 565 nm.

Värvaine sisalduse arvutamine

28. Värvaine sulforodamiin B sisaldus ketta kohta arvutatakse optilise tiheduse väärtuste alusel (9) (sulforodamiin B molaarne ekstinktsioonikoefitsient lainepikkusel 565 nm on $8,7 \times 10^4$ ja molekulmass 580). Sobiva kaliibrimiskõvera abil määratakse värvainesisaldus iga nahaketta puhul ning seejärel arvutatakse paralleelproovide keskmine värvainesisaldus.

Katse nõuetekohasuse kriteeriumid

29. Saadud TET keskvärtus on vastuvõetav, kui paralleelse positiivse ja negatiivse kontrolliga saadud väärtused jäävad katset läbi viivas laboris käesoleva meetodi kasutamise puhul vastuvõetavasse väärtusevahemikku. Vastuvõetavad takistusevahemikud eespool kirjeldatud meetoodika ja seadme puhul on esitatud järgmises tabelis.

Kontroll	Aine	Takistusevahemik (kΩ)
Positiivne	10 M soolhape	0,5–1,0
Negatiivne	Destilleeritud vesi	10–25

30. Värvaine sidumist iseloomustavad keskvärtused on vastuvõetavad tingimusel, et paralleelsete kontrollidega saadud väärtused jäävad kõnealuse meetodi puhul vastuvõetavasse vahemikku. Kontrollainete jaoks soovitatavad vastuvõetavad värvainesisalduse vahemikud on eespool kirjeldatud meetoodika ja seadme puhul järgmised.

Kontroll	Aine	Värvainesisalduse vahemik (µg ketta kohta)
Positiivne	10 M soolhape	40–100
Negatiivne	Destilleeritud vesi	15–35

Tulemuste tõlgendamine

31. TET läviväärtus, mis võimaldab eristada söövitavaid uuritavaid kemikaale mittesöövitavatest, määrati kindlaks katsemeetodi optimeerimise käigus, seda kontrolliti valideerimiseelses etapis ning selle sobivus leidis kinnitust ametlikus valideerimisuuringus.
32. Allpool on esitatud roti naha TET-l põhineva, nahasöövituse hindamist võimaldava katsemeetodi puhul kasutatav prognoosimudel (9, 19), mis on seotud ÜRO GHSi / CLP-määruse kohase klassifitseerimissüsteemiga.

Uuritav kemikaal loetakse nahka mitte söövitavaks, kui:

- i) uuritava kemikaali puhul saadud TET keskvärtus on suurem kui ($>$) 5 k Ω või
 - ii) uuritava kemikaali puhul saadud TET keskvärtus on sama suur või väiksem kui ($\leq$) 5 k Ω ning
- nahaketastel ei täheldata silmanähtavaid kahjustusi (nt perforatsiooni) ja
 - nahaketaste keskmine värvainesisaldus on väiksem kui ($<$) paralleelse positiivse kontrollina kasutatud 10 M HCl-ga töödeldud nahaketaste keskmine värvainesisaldus (positiivset kontrolli iseloomustavad väärtused on esitatud punktis 30).

Uuritav kemikaal loetakse nahka söövitavaks, kui:

- i) uuritava kemikaali puhul saadud TET keskvärtus on sama suur või väiksem kui ($\leq$) 5 k Ω ning nahakettad on silmanähtavalt kahjustatud (nt perforatsioonid) või
 - ii) uuritava kemikaali puhul saadud TET keskvärtus on sama suur või väiksem kui ($\leq$) 5 k Ω ning
- nahaketastel ei täheldata silmanähtavaid kahjustusi (nt perforatsiooni), kuid
 - nahaketaste keskmine värvainesisaldus on sama suur või suurem kui ($\geq$) paralleelse positiivse kontrollina kasutatud 10 M HCl-ga töödeldud nahaketaste keskmine värvainesisaldus (positiivset kontrolli iseloomustavad väärtused on esitatud punktis 30).

33. Ühese klassifitseerimistulemuse puhul peaks piisama ühest mõõtmistsüklist (katsest), mille käigus analüüsitakse uuritava kemikaali toimet paralleelselt vähemalt kolmele nahakettale. Ebaselgete tulemuste puhul – näiteks kui paralleelproovidega saadud mõõtmisandmed lahknevad ja/või TET keskvärtus on $5 \pm 0,5$ k Ω – tuleks kaaluda vajadust viia läbi veel üks sõltumatu mõõtmistsükkel (katse) ning esimeses kahes mõõtmistsüklis (katses) saadud tulemuste lahknevuse korral veel kolmaski mõõtmistsükkel (katse).

ANDMED JA ARUANDLUS

Andmed

34. Uuritava kemikaali ning positiivse ja negatiivse kontrolliga saadud takistuse väärtused (k Ω) ja vajaduse korral värvainesisalduse väärtused (μ g ketta kohta) tuleks esitada tabelina, millesse kantakse igas mõõtmistsüklis (katses) iga üksiku paralleelproovina kasutatud kettaga saadud andmed ning samuti keskvärtused $\pm$ standardhälve. Esitatakse kõikide korduskatsete

tulemused. Iga uuritava kemikaali puhul tuleks esitada teave nahaketastes täheldatud kahjustuste kohta.

Katseprotokoll

35. Katseprotokollis tuleks esitada järgmine teave.

Uuritav kemikaal ja kontrollained:

- ühest koostisosast koosnev aine: kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus, CASi number, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem, puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne;
- mitut koostisosa sisaldav aine, UVCB või segu: võimalikult täpne omaduste kirjeldus lähtuvalt koostisosade keemilisest määratlusest (vt eespool), kvantitatiivsest sisaldusest ja asjakohastest füüsikalis-keemilistest omadustest;
- füüsiline välimus, lahustuvus vees ja muud asjakohased füüsikalis-keemilised omadused;
- allikas ja partii number, kui see on olemas;
- vajaduse korral teave uuritava kemikaali / kontrollaine töötlemise kohta enne katset (näiteks soojendamine, peenestamine);
- uuritava kemikaali püsivus ja aegumiskuupäev või kordusanalüüsi tegemise tähtpäev, kui see on teada;
- säilitustingimused.

Katseloomad:

- kasutatud liin ja sugu;
- loomade vanus doonorloomana kasutamise hetkel;
- päritolu, pidamistingimused, söötmisandmed jne;
- naha ettevalmistamise üksikasjad.

Katsetingimused:

- katseseadme kaliibrimiskõverad;
- värvaine sidumise katset iseloomustavad kaliibrimiskõverad, optilise tiheduse mõõtmiseks kasutatud ribafiltri spektrivahemik ja vajaduse korral mõõteseadmega (nt spektrofotomeetriga) saavutatav optilise tiheduse väärtuste lineaarsusvahemik;
- TET mõõtmise meetodi üksikasjad;
- vajaduse korral üksikasjalik teave värvaine sidumise hindamiseks kasutatud meetodi kohta;
- katses kasutatud annused, kokkupuuteperioodi(de) kestus ja kokkupuutetemperatuur(id);
- kokkupuuteperioodi järgsete pesemistoimingute üksikasjad;

- iga uuritava kemikaali ja kontrollide (positiivse ja negatiivse kontrolli) puhul paralleelproovidenä kasutatud nahaketaste arv;
- kõikide katsemeetodis tehtud muudatuste kirjeldus;
- viide varasematele andmetele mudeli kohta. See hõlmab vähemalt järgmisi aspekte:
 - i) positiivse ja negatiivse kontrolliga saadud, kilo-oomides väljendatud TET väärtuste vastuvõetavus lähtuvalt positiivset ja negatiivset kontrolli iseloomustavatest takistusevahemikest;
 - ii) positiivse ja negatiivse kontrolliga saadud, nahaketta kohta mikrogrammides väljendatud värvainesisalduse väärtuste vastuvõetavus lähtuvalt positiivset ja negatiivset kontrolli iseloomustavatest värvainesisalduse vahemikest;
 - iii) katsetulemuste vastuvõetavus lähtuvalt paralleelproovidenä kasutatud nahaketastega saadud varasemate tulemuste varieeruvusest;
- kasutatud otsustuskriteeriumide/prognoosimudeli kirjeldus.

Tulemused:

- TET mõõtmise katsetes ja vajaduse korral värvaine sidumise katsetes iga uuritava kemikaali ja kontrolliga saadud, tabelina esitatavad andmed iga mõõtmistsükli (katse) ja iga paralleelproovinä kasutatud nahaketta (iga üksiku looma ja nahaproovi) kohta, samuti vastavad keskväärtused, standardhälbed ja variatsioonikordajad;
- mis tahes täheldatud toime kirjeldus;
- klassifitseerimistulemused lähtuvalt kasutatud prognoosimudelist/otsustuskriteeriumidest.

Tulemuste arutelu

Järeldused

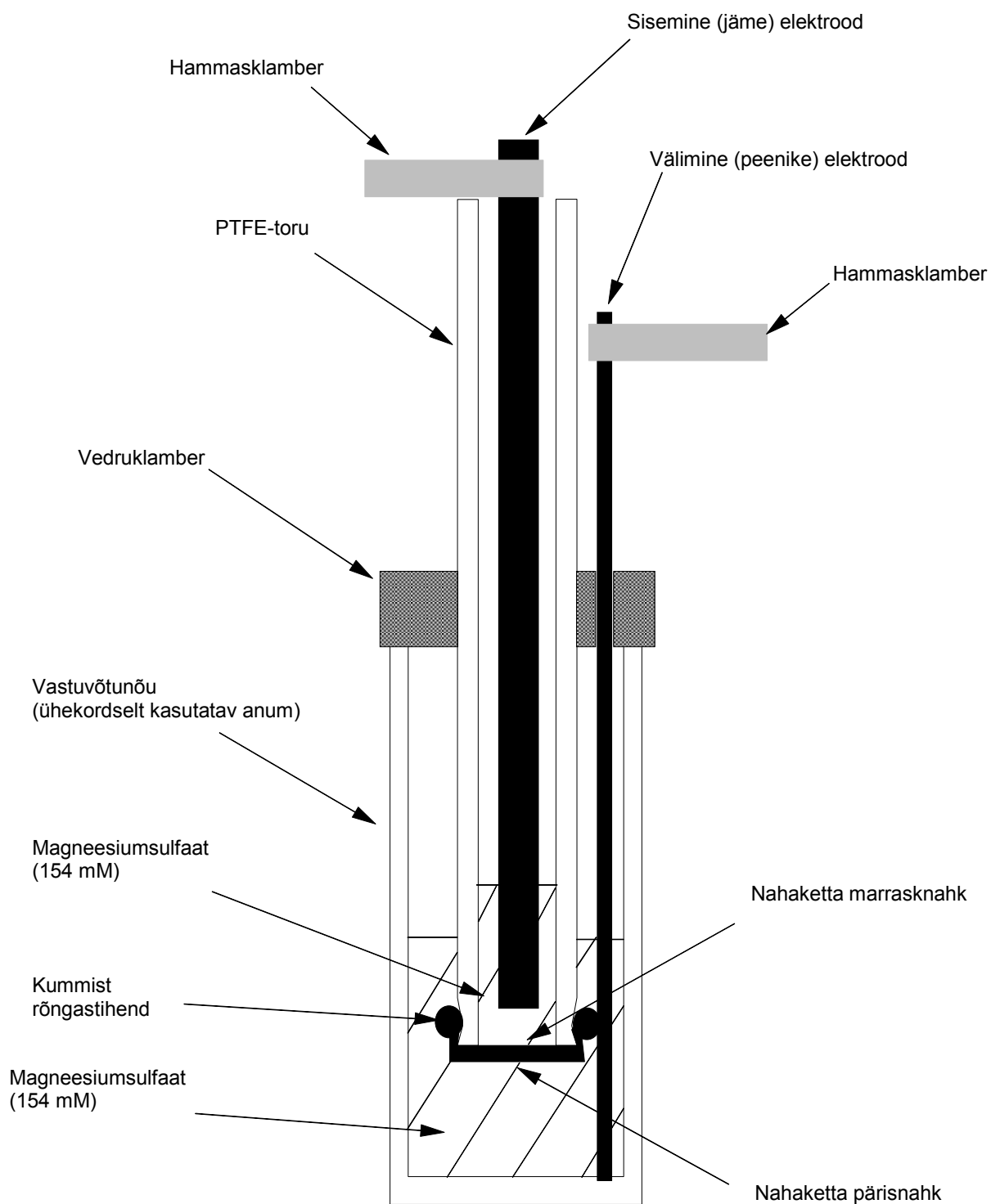
KIRJANDUS

- (1) Ühinenud Rahvaste Organisatsioon (ÜRO) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Viies, täiendatud väljaanne. ÜRO, New York ja Genf. Kättesaadav aadressil http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.
- (2) Käesoleva lisa peatükk B.4 „Äge nahaärritus/-söövitus“.
- (3) Käesoleva lisa peatükk B.40b „*In vitro* nahasöövitus: inimese rekonstrueeritud marrasknahal põhinev katsemeetod“.
- (4) Käesoleva lisa peatükk B.65 „*In vitro* membraanibarjääri katsemeetod nahasöövituse uurimiseks“.
- (5) Käesoleva lisa peatükk B.46 „*In vitro* nahaärritus: inimese rekonstrueeritud marrasknahal põhinev katsemeetod“.
- (6) OECD (2014). Guidance Document on an Integrated Approach to Testing and Assessment (IATA) for Skin Corrosion and Irritation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 203. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (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., ja 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., ja 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., ja 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) 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., ja Zucco, F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops. *ATLA* 23: 129–147.

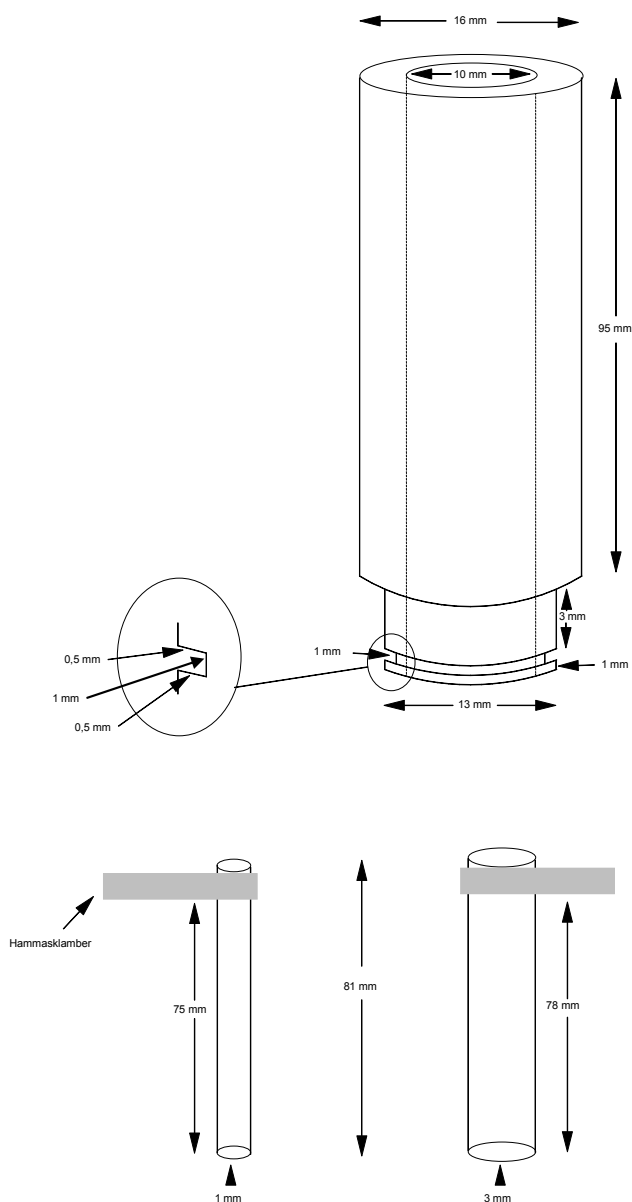
- (11) Alternatiivsete meetodite valideerimise ametitevaheline koordineerimiskomitee (ICCVAM) (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.
- (12) ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity). Koostanud ECVAMi teaduslik nõuandekomitee (ESAC10), 3. aprill 1998.
- (13) ECVAM (1998). ECVAM News & Views. *ATLA* 26: 275–280.
- (14) ICCVAM (2002). ICCVAM Evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication No. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.
- (15) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test Method for Skin Corrosion Testing as described in TG 430. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 218. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (16) Oliver, G. J. A., Pemberton, M. A., ja Rhodes, C. (1986). An *In Vitro* Skin Corrosivity Test – Modifications and Validation. *Food 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., ja 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., ja 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) TET mõõtmise standardne töökord (detsember 2008). Andmebaasi *INVITTOX* katse-eeskiri nr 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. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

JOONIS 1. ROTI NAHA TET MÕÕTMISEKS KASUTATAV SEADE



JOONIS 2. POLÜTETRAFLUOROETÜLEENTORU (PTFE-TORU) JA VASTUVÕTUNÕU NING KASUTATAVATE ELEKTROODIDE MÕÕTMED



Olulised tegurid eespool kujutatud seadme puhul:

- PTFE-toru siseläbimõõt;
- elektroodide pikkus peaks PTFE-toru ja vastuvõtunõuga võrreldes olema selline, et nahaketas ei puutuks vastu elektroode ja elektroodid oleks teatavas standardpikkuses MgSO_4 lahusega kokkupuutes;
- MgSO_4 lahuse hulk vastuvõtunõus peaks olema selline, et vedeliku sügavus võrreldes PTFE-torus oleva vedeliku tasemega vastaks joonisel 1 näidatule;

- nahaketas peaks olema kinnitatud PTFE-toru külge piisavalt hästi, et elektritakistus iseloomustaks tõeselt naha omadusi.

Liide

MÕISTED

Aine – looduslik või mis tahes tootmisprotsessi tulemusena saadud keemiline element või selle ühend koos püsivuse tagamiseks vajalike lisainete ja tootmisprotsessi käigus tekkinud lisanditega, mis ei hõlma siiski lahusteid, mida on võimalik aine püsivust mõjutamata või selle koostist muutmata ainest eraldada.

Asjakohasus – näitaja, mille abil kirjeldatakse, kuivõrd katsemeetod võimaldab uurida huvipakkuvat toimet, kas selle kasutamine on mõttekas ja kas see on konkreetse eesmärgi jaoks sobiv. Asjakohasusest nähtub, mil määral saab katsemeetodiga õigesti mõõta või ennustada huvipakkuvat bioloogilist toimet. Asjakohasuse puhul võetakse arvesse ka katsemeetodiga saavutatavat täpsust (vastavust) (20).

GHS (ÜRO ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteem) – süsteem, millega nähakse ette kemikaalide (ainete ja segude) klassifitseerimine vastavalt nende füüsilise ohtlikkuse ning kahjuliku tervise- ja keskkonnamõju standarditud liigile ja tasemele ning mis hõlmab selliseid asjaomaseid teavituselemente nagu piktogramm, märksõnad, ohulaused, hoiatuslaused ja ohutuskardid, et anda inimeste (sealhulgas tööandjate, töötajate, vedajate, tarbijate ja päästetöötajate) ning keskkonna kaitsmiseks vajalikku teavet kõnealuste kemikaalide kahjuliku toime kohta (1).

In vivo nahasöövitav – pöördumatu nahakahjustuse tekkimine, st läbi marrasknaha pärisnahani ulatava nähtava nekroosi tekkimine pärast uuritava kemikaali pealekandmist kuni neljaks tunniks. Tüüpilised söövitushäired on haavandid, verejooks, verised kärnad ning 14-päevase vaatlusperioodi lõpuks ilmnev värvimuutus naha valastumise tõttu, täielik alopeetsia ja armistumine. Ebaselgete kahjustuste hindamiseks tuleks kaaluda histopatoloogilise analüüsi tegemist.

Kemikaal – aine või segu.

Mitmest koostisosast koosnev aine – aine, mis on määratletud kvantitatiivse koostise alusel ja milles enam kui ühe põhikoostisosa sisaldus on vähemalt 10, kuid väiksem kui 80 massiprotsenti. Mitmest koostisosast koosnev aine saadakse tootmisprotsessi tulemusena. Erinevus segu ja mitmest koostisosast koosneva aine vahel seisneb selles, et segu saadakse kahe või enama aine kokkusegamise, ilma et toimuks keemilist reaktsiooni. Mitmest koostisosast koosnev aine saadakse keemilise reaktsiooni tulemusel.

MS – mittesöövitav.

(Mõõtmis)tsükkel – ühe uuritava kemikaali analüüsimine üheaegselt vähemalt kolmel paralleelproovina kasutataval nahakettal.

Positiivne kontroll – paralleelproov, mis sisaldab kõiki katsesüsteemi komponente ja mida on töödeldud ainega, millega teadaolevalt saadakse positiivne tulemus. Positiivse tulemuse väärtus ei tohiks olla liiga suur, et võimaldada hinnata positiivse kontrolliga saadud tulemuste varieeruvust ajas.

S – söövitav.

Segu – kahest või enamast aineksest koosnev segu või lahus.

Spetsiifilisus – katsemeetodiga õigesti negatiivseks/reaktsioonivõimeks liigitatud kemikaalide osakaal kõikide negatiivsete kemikaalide hulgas. Spetsiifilisus kajastab sellise katsemeetodi täpsust, millega saadakse kategoriseeritav tulemus, ning see on oluline näitaja katsemeetodi asjakohasuse hindamiseks (20).

Transkutaanne elektritakistus (TET) – naha elektrilise impedantsi näitaja, mida väljendatakse takistusena kilo-oomides. Lihtne ja töökindel meetod kaitsekihina toimimise hindamiseks Wheatstone'i sillana töötava seadme abil, millega registreeritakse nahka läbiv ioonivoog.

Tulemuslikkuse standardid – valideeritud katsemeetodil põhinevad standardid, mille alusel hinnatakse mehhanismilt ja tööpõhimõttelt sarnase kavandatud katsemeetodi võrreldavust. Need hõlmavad: i) katsemeetodi olulisi elemente, ii) valideeritud katsemeetodi vastuvõetava tulemuslikkuse tõendamiseks kasutatud kemikaalide hulgast valitud võrdluskemikaalide miinimumloetelu ja iii) võrreldavat usaldusväärsuse ja täpsuse taset, mille puhul on lähtutud valideeritud katsemeetodiga saadud tulemustest ja mis tuleks saavutada kavandatud katsemeetodi hindamisel võrdluskemikaalide miinimumloetelu kasutamise teel.

Tundlikkus – katsemeetodiga õigesti positiivseks/reaktsioonivõimeks liigitatud kemikaalide osakaal kõikide positiivsete kemikaalide hulgas. Tundlikkus kajastab sellise katsemeetodi täpsust, millega saadakse kategoriseeritav tulemus, ning see on oluline näitaja katsemeetodi asjakohasuse hindamiseks (20).

Täpsus – katsemeetodiga saadud tulemuste ja vastuvõetavate võrdlusväärtuste kooskõla määr. Täpsus näitab katsemeetodi tulemuslikkust ja on üks asjakohastest aspektidest. Seda mõistet kasutatakse sageli vastavuse tähenduses, et väljendada katsemeetodiga saadud õigete tulemuste osakaalu (20).

Usaldusväärsus – näitaja, mis iseloomustab katsemeetodiga saadud tulemuste reprodutseeritavust pikema aja jooksul samas laboris ja eri laborites, kui meetodit rakendatakse ühe ja sama katse-eeskirja alusel. Usaldusväärsuse hindamiseks arvutatakse laborisisene ja laboritevaheline reprodutseeritavus (20).

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

UVCB – tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal.

Vastavus – katsemeetodi tulemuslikkuse näitaja katsemeetodite puhul, millega saadakse kategoriseeritav tulemus; üks asjakohastest aspektidest. Seda mõistet kasutatakse mõnikord täpsuse tähenduses ja see on määratletud kui õigesti positiivseks või negatiivseks liigitatud kemikaalide osakaal kõikide uuritud kemikaalide seas. Vastavus sõltub väga suurel määral positiivsete tulemuste osakaalust uuritavale kemikaalile vastavat liiki kemikaalide hulgas (20).

Ühest koostisosast koosnev aine – aine, mis on määratletud kvantitatiivse koostise alusel ja mille ühe põhikoostisosa sisaldus on vähemalt 80 massiprotsenti.“

6) B osas asendatakse peatükk B.40b järgmisega:

„B.40b. *IN VITRO* NAHASÖÖVITUS: INIMESE REKONSTRUEERITUD MARRASKNAHAL PÕHINEV KATSEMEETOD

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 431 (2016). Nahasöövituse all mõistetakse läbi marrasknaha pärisnahani ulatuva nähtava nekroosina avalduva pöördumatu nahakahjustuse tekkimist pärast uuritava kemikaaliga töötlemist, nagu on määratletud ÜRO ühtses ülemaailmses kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteemis (GHS) (1) ning Euroopa Liidu (EL) määruses nr 1272/2008, milles käsitletakse ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist (edaspidi „CLP-määrus“)¹. Käesoleva ajakohastatud katsemeetodi B.40b näol on tegemist *in vitro* meetodiga, mis võimaldab tuvastada mittesöövitavaid ja söövitavaid aineid ja segusid kooskõlas ÜRO GHSi ja CLP-määrusega. Meetodiga on osaliselt võimalik liigitada söövitavaid kemikaale alamkategoriatesse.
2. Kemikaalide võimaliku nahka söövitava toime hindamisel on tavapäraselt kasutatud laboriloomi (katsemeetod B.4, mis on samaväärne algselt 1981. aastal vastu võetud ning aastatel 1992, 2002 ja 2015 muudetud OECD katsejuhendiga nr 404) (2). Peale käesoleva katsemeetodi B.40b on valideeritud ja vastu võetud veel kaks *in vitro* katsemeetodit kemikaalide võimaliku nahka söövitava toime tuvastamiseks: katsemeetodid B.40 (samaväärne OECD katsejuhendiga nr 430) (3) ja B.65 (samaväärne OECD katsejuhendiga nr 435) (4). Peale selle on vastu võetud *in vitro* katsemeetod B.46 (samaväärne OECD katsejuhendiga nr 439) (5) võimaliku nahka ärritava toime hindamiseks. OECD juhenddokumendis nahasöövituse ja -ärrituse puhul kasutatava katsete tegemist ja hindamist käsitleva ühtse lähenemisviisi kohta kirjeldatakse mitut moodulit, milles teabeallikad ja analüüsivahendid on rühmitatud, ning i) antakse suuniseid, kuidas lõimida ja kasutada olemasolevaid katse- ja muid andmeid kemikaalide võimaliku nahka ärritava ja nahka söövitava toime hindamiseks ja ii) pakutakse välja lähenemisviis juhuks, kui on vaja teha täiendavaid katseid (6).
3. Käesolevas katsemeetodis on käsitletud inimtervisega seotud lõppnäitajana nahasöövitust. Selle meetodi puhul kasutatakse inimese rekonstrueeritud marrasknahka, mille saamiseks kasutatakse inimese marrasknaha transformeerumata keratinotsüüte ja mis on oma histoloogiliste,

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

morfoloogiliste, biokeemiliste ja füsioloogiliste omaduste poolest väga sarnane inimese naha pealmiste kihtidega, st marrasknahaga. Vastavasisuline OECD katsejuhend võeti algselt vastu 2004. aastal ja seda ajakohastati 2013. aastal, et lisada täiendavad inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudelitel põhinevad katsemeetodid ning võimalus kasutada neid meetodeid selleks, et toetada söövitavate kemikaalide liigitamist alamkategoriasse, samuti 2015. aastal, et lisada viide juhenddokumendile katsete tegemist ja hindamist käsitleva ühtse lähenemisviisi kohta ning võimaldada ühe eluvõimelisuse mõõtmiseks sobiva alternatiivse meetodi kasutuselevõttu.

4. Käesolev katsemeetod hõlmab nelja turul kättesaadavat inimese rekonstrueeritud marrasknaha valideeritud katsemudelit. Neist kahe – standardmudeli (SM) EpiSkin™ ja meetodi EpiDerm™ Skin Corrosivity Test (SCT) (EPI-200) – puhul on läbi viidud nii valideerimiseelsed uuringud (7) kui ka ametlik valideerimisuurimise ring nahasöövituse hindamiseks (8, 9, 10, 11, 12) (allpool on neile osutatud kui valideeritud standardmeetoditele (VSM)). Kõnealuste uuringute tulemusena esitati soovitus, mille kohaselt võib eespool nimetatud kahte VSMi regulatiivsel eesmärgil kasutada söövitavate (S) ainete eristamiseks mittesöövitavatest (MS) ning peale selle võib mudelit EpiSkin™ kasutada selleks, et toetada söövitavate ainete liigitamist alamkategoriasse (13, 14, 15). Ülejäänud kahe turul kättesaadava inimese rekonstrueeritud marrasknahal põhineva nahasöövituse *in vitro* katsemudeliga on tulemuslikkuse standarditest lähtuval valideerimisel saadud tulemused, mis on sarnased VSMiga EpiDerm™ saadud tulemustega (16, 17, 18). Need mudelid on SkinEthic™ RHE¹ ja epiCS® (varasema nimega EST-1000) ning neid võib samuti kasutada regulatiivsel eesmärgil, et eristada söövitavaid aineid mittesöövitavatest (19, 20). Valideerimisjärgsete uuringute kohaselt, mille viisid aastatel 2012–2014 läbi inimese rekonstrueeritud marrasknahal põhinevate mudelite tootjad vastavalt täiustatud katse-eeskirjale, millega nähakse ette uuritavate kemikaalide põhjustatud mittespetsiifilisest MTT redutseerumisest tulenevad parandused, on kõnealuste meetodite tulemuslikkus nii söövitavate ja mittesöövitavate kemikaalide eristamisel kui ka söövitavate kemikaalide alamkategoriasse liigitamise toetamisel varem eeldatust suurem (21, 22). Meetodite EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE ja epiCS® puhul saadud valideerimisjärgsete andmete täiendava statistilise analüüsi teel on tehtud kindlaks alternatiivsed prognoosimudelid, mis võimaldavad suurendada nende meetodite ennustusvõimet alamkategoriasse liigitamisel (23).

¹ Mõiste „inimese rekonstrueeritud marrasknahk“ ingliskeelse vaste lühendit RhE (*Reconstructed human Epidermis*) kasutatakse kõikide inimese rekonstrueeritud marrasknaha tehnoloogial põhinevate mudelite puhul. Mudeli SkinEthic™ puhul kasutatava lühendi RHE tähendus on sama, ent kuna see on osa nimest, mille all kõnealust konkreetset katsemeetodit turustatakse, kirjutatakse see läbivalt suurtähtedega.

5. Enne kui regulatiivsel eesmärgil nahasöövituse hindamiseks saab VSMide kõrval kasutada mõnda muud inimese rekonstrueeritud marrasknahal põhinevat soovitud sarnast või muudetud *in vitro* katsemeetodit, tuleks teha kindlaks sellise meetodi usaldusväärsus, asjakohasus (täpsus) ja piirangud kavandatava kasutusotstarbe puhul, et tagada selle sarnasus VSMidega kooskõlas tulemuslikkuse standardites sätestatud nõuetega (24), mis on kehtestatud kooskõlas OECD juhenddokumendis nr 34 esitatud põhimõtetega (25). Andmete vastastikune tunnustamine on tagatud üksnes pärast seda, kui tulemuslikkuse standarditele vastav mis tahes välja pakutud uus või ajakohastatud katsemeetod on läbi vaadatud ja asjaomasesse katsejuhendisse lisatud. Kõnealusesse katsejuhendisse lisatud katsemudeleid võib kasutada *in vitro* nahasöövituse hindamise meetodiga saadavaid katsetulemusi käsitlevate siseriiklike nõuete järgimiseks ning seejuures saadakse kasu andmete vastastikusest tunnustamisest.

MÕISTED

6. Kasutatud mõisted on määratletud 1. liites.

LÄHTEKAALUTLUSED

7. Käesolev katsemeetod võimaldab tuvastada mittesöövitavaid ja söövitavaid aineid ja segusid kooskõlas ÜRO GHSi ja CLP-määrusega. Ühtlasi võimaldab katsemeetod toetada söövitavate ainete ja segude vabatahtlikku liigitamist 1A alamkategoriasse kooskõlas ÜRO GHSiga (1), samuti 1B ja 1C alamkategoriate ühiskategoriasse (21, 22, 23). Käesoleva katsemeetodi piiranguna ei võimalda see teineteisest eristada nahka söövitavaid 1B ja 1C alamkategoria kemikaale kooskõlas ÜRO GHSi ja CLP-määrusega, kuna *in vivo* nahka söövitavaid 1C alamkategoriasse kuuluvaid tuntud kemikaale on vähe. Katsemudelid EpiSkin™, EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE ja epiCS® võimaldavad liigitamist alamkategoriatesse (st 1A alamkategoriasse, 1B ja 1C ühiskategoriasse ning mittesöövitavaks).
8. Valideerimisel, mille tulemusena toetatakse käesoleva katsemeetodiga hõlmatud katsemudelite kasutamist mittesöövitavate ja söövitavate kemikaalide tuvastamiseks, uuriti paljusid eri kemikaale, peamiselt eraldi aineid; valideerimisuuringu empiirilises andmebaasis on 60 kemikaali paljudest eri kemikaaliklassidest (8, 9, 10). Katsed meetodi tundlikkuse, spetsiifilisuse ja täpsuse ning tulemuste laborisisese reprodutseeritavuse tõendamiseks alamkategoriatesse liigitamisel viisid läbi katsemeetodi väljatöötajad ning saadud tulemused vaatas läbi OECD (21, 22, 23). Kokkuvõetuna nähtub olemasolevatest andmetest, et käesolev katsemeetod on kasutatav paljude eri kemikaaliklasside ja eri füüsikalises olekus ainete, sealhulgas vedelike, pooltahkete ja tahkete ainete ning vahade puhul. Vedelikud võivad olla vesilahused või muud vedelikud; tahked ained võivad olla vees lahustuvad või lahustumatud. Võimaluse korral tuleks tahked ained enne kasutamist peeneks pulbriks jahvatada; proovi muul viisil eeltöötlemine ei ole vajalik. Kui on võimalik tõendada, et käesolevas katsemeetodis kirjeldatud katsemudeleid ei saa teatud kindla kategooria uuritavate kemikaalide puhul kasutada, tuleks hoiduda nende kasutamisest sellise kategooria uuritavate kemikaalide puhul.

Peale selle saab käesolevat katsemeetodit ainete kõrval eeldatavalt kasutada ka segude puhul. Ent kuna segud kuuluvad paljudesse eri kategooriatesse ja on eri koostisega ning nende kasutamise kohta katses on praegu piiratud hulgal teavet, tuleks juhul, kui on võimalik tõendada, et katsemeetodit ei saa teatud kindla kategooria segude puhul kasutada (nt allikas 26 välja pakutud strateegia abil), hoiduda selle kasutamisest sellise kategooria segude puhul. Kui soovitakse saada kavandatud regulatiivsel eesmärgil andmeid segu kohta, tuleks enne katsemeetodi kasutamist kaaluda, kas ja kuidas see võimaldab saada kõnealusele eesmärgile vastavaid asjakohaseid tulemusi. Selline kaalumise ei ole vajalik, kui asjaomase segu hindamine on regulatiivse nõudega ette nähtud. Gaase ja aerosooli ei ole valideerimisuuringutes veel hinnatud (8, 9, 10). Ehkki on võimalik, et neidki saab uurida inimese rekonstrueeritud marrasknaha kasutamisel põhineva tehnoloogia abil, ei võimalda praegune katsemeetod gaaside ega aerosoolide uurimist.

9. Uuritavad kemikaalid, mis neelavad valgust samas vahemikus kui MTT formasaan, ning vitaalvärvaine MTT otsest MTT formasaaniks redutseerumist põhjustada võivad uuritavad kemikaalid võivad segada kudede eluvõimelisuse mõõtmist ja tingida vajaduse kasutada tulemuste korrigeerimiseks kohandatud kontrolle. Sõltuvalt uuritava kemikaali põhjustatud kõrvalekallete laadist ja MTT formasaani mõõtmise meetodist võib olla vaja kasutada eri liiki kohandatud kontrolle (vt punktid 25–31).
10. Ehkki käesolev katsemeetod ei võimalda saada piisavat teavet nahaärrituse kohta, tuleks tähele panna, et tervisemõjuna hinnatavat *in vitro* nahaärritust käsitletakse konkreetselt katsemeetodis B.46, mis põhineb samal inimese rekonstrueeritud marrasknaha katsesüsteemil, ehkki seal kasutatakse teistsugust katse-eeskirja (5). Ühekordse nahakaudse kokkupuute järel nahale avalduva lokaalse toime täielikku hindamist on kirjeldatud OECD juhenddokumendis katsete tegemist ja hindamist käsitleva ühtse lähenemisviisi kohta (6). Nimetatud lähenemisviisiga nähakse ette, et enne elusloomadega katsete tegemise kaalumist viiakse läbi *in vitro* katsed, mille abil hinnatakse nahasöövitust (näiteks käesolevas katsemeetodis kirjeldatud viisil) ja nahaärritust. Inimese naha kasutamine toimub mõistagi kooskõlas asjaomases riigis kehtivate ja rahvusvaheliste eetiliste tõekspidamiste ja tingimustega.

KATSE PÕHIMÕTE

11. Uuritav kemikaal kantakse paikset kolmemõõtmelisele inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudelile, mis koosneb inimese marrasknaha transformeerumata keratinotsüütidest, mida on kasvatatud nii, et need moodustavad inimese mitmekihilise tugevalt diferentseerunud marrasknaha mudeli. See koosneb korrastatud basaalkihist, ogakihist ja sõmerkihist ning mitmekihilisest sarvkihist, mis sisaldab rakkudevahelisi õhukesi lipiidikihte, kus on analoogselt *in vivo* koele esindatud peamiste lipiidiklasside lipiidid.
12. Inimese rekonstrueeritud marrasknahal põhineva katsemeetodi puhul lähtutakse eeldusest, et söövitavad kemikaalid suudavad difusiooni või erosiooni teel tungida läbi sarvkihi ja on sellest allpool paiknevate kihtide rakkudele tsütotoksilised. Rakkude eluvõimelisuse hindamiseks

jälgitakse vitaalvärvaine MTT (3-(4,5-dimetüültiasool-2-üül)-2,5-difenüültetrasooliumbromiid; tiasolüülsinise tetrasooliumbromiid; CASi number: 298-93-1) ensümaatilist muundumist siniseks formasaansoolaks, mida mõõdetakse kvantitatiivselt pärast kudedest ekstraheerimist (27). Söövitavad kemikaalid tehakse kindlaks nende võime järgi vähendada rakkude eluvõimelisust nii palju, et see jääb allapoole kindlaksmääratud läviväärtust (vt punktid 35 ja 36). On tõendatud, et inimese rekonstrueeritud marrasknahal põhinev nahasöövituse hindamiseks kasutatav katsemeetod võimaldab prognoosida katsemeetodi B.4 kohaselt mõõdetavat nahka söövitavat *in vivo* toimet küülikutel (2).

PÄDEVUSE TÕENDAMINE

13. Enne käesoleva katsemeetodi kohasest neljast inimese rekonstrueeritud marrasknahal põhinevast valideeritud katsemudelitest ükskõik millise regulaarset kasutamist tuleks labori tehnilise pädevuse tõendamiseks õigesti liigitada kaksteist tabelis 1 loetletud pädevusainet. Kui asjaomast meetodit kasutatakse täpsemaks liigitamiseks, tuleks tõendada ka õigesti alamkategoriasse liigitamise võimekust. Kui mõni loetletud ainetest ei ole kättesaadav või kui see on põhjendatav, võib kasutada mõnda muud ainet, mille kohta on olemas piisavad *in vivo* ja *in vitro* võrdlusandmed (nt võrdluskemikaalide loetelust (24) valitud ainet), ent üksnes juhul, kui kohaldatakse samu valikukriteeriume, nagu on kirjeldatud tabelis 1.

Tabel 1. Pädevusainete loetelu¹

Aine	CASi nr	Kemikaaliklass ²	ÜRO GHSi / CLP-määruse kohane <i>in vivo</i> tulemustel põhinev kategooria ³	VSMga saadud <i>in vitro</i> tulemustel põhinev kategooria ⁴	MTT redutseerija ⁵	Füüsikaline olek
<i>In vivo</i> söövitavad 1A alamkategooria kemikaalid						
Bromoäädikhape	79-08-3	Orgaaniline hape	1A	(3) 1A	–	T
Boortrifluoriiddihüdraat	13319-75-0	Anorgaaniline hape	1A	(3) 1A	–	V
Fenool	108-95-2	Fenool	1A	(3) 1A	–	T
Dikloroatsetüülkloriid	79-36-7	Elektrofiil	1A	(3) 1A	–	V
<i>In vivo</i> söövitavad 1B ja 1C alamkategoriate ühiskategooria kemikaalid						
Glüoksüülhappe monohüdraat	563-96-2	Orgaaniline hape	1B/1C	(3) 1B/1C	–	T
Piimhape	598-82-3	Orgaaniline hape	1B/1C	(3) 1B/1C	–	V
Etanoolamiin	141-43-5	Orgaaniline alus	1B	(3) 1B/1C	J	Viskoosne
Soolhape (14,4 %)	7647-01-0	Anorgaaniline hape	1B/1C	(3) 1B/1C	–	V
<i>In vivo</i> mittesöövitavad kemikaalid						
Fenetüülbromiid	103-63-9	Elektrofiil	MS	(3) MS	J	V

4-amino-1,2,4-triasool	584-13-4	Orgaaniline alus	MS	(3) MS	–	T
4-(metüültio)bensaldehüüd	3446-89-7	Elektrofiil	MS	(3) MS	J	V
Lauriinhape	143-07-7	Orgaaniline hape	MS	(3) MS	–	T

Lühendid: CASi nr – Chemical Abstracts Service'i registrinumber; VSM – valideeritud standardmeetod; MS – mittesöövitav.

¹ Need pädevusained, mis on järjestatud esmalt nii, et söövitavad ained on esitatud enne mittesöövitavaid aineid, ning seejärel söövitavuse alamkategoria ja edasi kemikaaliklassi järgi, on valitud ainete hulgast, mida kasutati Alternatiivsete Meetodite Valideerimise Euroopa Keskuse (ECVAM) uuringutes mudelite EpiSkin™ ja EpiDerm™ valideerimiseks (8, 9, 10) ning valideerimisjärgsetes uuringutes vastavalt andmetele, mille on esitanud mudelite EpiSkin™ (22), EpiDerm™, SkinEthic™ ja epiCS® väljatöötajad (23). Kui ei ole teisiti märgitud, uuriti kõnealuseid aineid sellise puhtusastme juures, nagu need kaubanduslikust allikast osteti (8, 10). Ainete valimisel lähtuti võimalikult suurel määral sellest, et: i) need oleksid VSMide abil mõõdetava või ennustatava eri söövitavusega (nt mittesöövitavad, nõrgalt söövitavad ja tugevalt söövitavad ained), ii) need esindaksid valideerimisuuringutes kasutatud kemikaaliklasse, iii) ainetel oleks täpselt määratletud keemiline struktuur, iv) VSMi abil nendega saadud tulemused oleksid reprodutseeritavad, v) need võimaldaksid saada standardse *in vivo* katsemeetodiga selgepiirilisi tulemusi, vi) need oleksid turul kättesaadavad ning vii) nende kõrvaldamise kulud ei oleks liiga suured.

² Kemikaaliklass, mille on kindlaks määranud Barratt *et al.* (8).

³ ÜRO GHSi / CLP-määruse kohastele 1A, 1B ja 1C alamkategoriatele vastavad ÜRO I, II ja III pakendirühm.

⁴ Tabelis esitatud prognoos, mis põhineb *in vitro* tulemustel, on saadud katsemudelite EpiSkin™ ja EpiDerm™ (VSMid) kasutamisel valideerimisjärgsetes katsetes, mille viisid läbi kõnealuste meetodite väljatöötajad.

⁵ Nahasöövituse hindamiseks tehtud ECVAMi valideerimisuuringutes saadud eluvõimelisuse näitajaid ei ole korrigeeritud MTT otsese redutseerimise suhtes (valideerimisuuringutes ei kasutatud surmatud rakkudega kontrolle). Ent nende tabelis esitatud andmete puhul, mis on saadud katsemeetodite väljatöötajate tehtud valideerimisjärgsetest katsetest, on kasutatud kohandatud kontrolle (23).

14. Pädevuse tõendamise osana soovitatakse kasutajal pärast kudede saabumist kontrollida nende toimivust kaitsekihina vastavalt inimese rekonstrueeritud marrasknahal põhineva asjaomase mudeli tootja kirjeldusele. See on eriti oluline pärast kudede pikaajalist transporti või tarnet pika vahemaa taha. Pärast katsemeetodi edukat kasutuselevõttu ja selle kasutamise pädevuse tõendamist ei ole selline tavapärane kontrollimine enam vajalik. Meetodi regulaarse kasutamise korral soovitatakse siiski jätkata kaitsekihina toimivuse hindamist korrapäraste ajavahemike järel.

KATSE KÄIK

15. Allpool on esitatud üldine kirjeldus käesoleva katsemeetodi kohaste nahasöövituse hindamiseks kasutatavate inimese rekonstrueeritud marrasknaha katsemudelite elementide ja asjaomase katsemenetluse kohta. Käesoleva katsemeetodi raames kasutamiseks heaks kiidetud teaduslikult usaldusväärsed inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudelid EpiSkin™ (SM), EpiDerm™ (EPI-200), SkinEthic™ RHE ja epiCS® (16, 17, 19, 28, 29, 30, 31, 32, 33) on turul kättesaadavad. Standardne töökord kõnealusest neljast iga mudeli kasutamiseks on samuti kättesaadav (34, 35, 36, 37) ning meetodite põhielemendid on kokkuvõtlikult esitatud 2. liites. Ükskõik millise kõnealuse mudeli kasutuselevõtmisel ja rakendamisel laboris soovitatakse

järgida asjaomast standardset töökorda. Käesoleva katsemeetodiga hõlmatud, inimese rekonstrueeritud marrasknahal põhineva kõnealuse nelja mudeli kasutamisel peaksid olema täidetud järgmised tingimused.

INIMESE REKONSTRUEERITUD MARRASKNAHAL PÕHINEVA KATSEMEETODI ELEMENDID

Üldtingimused

16. Epiteelkoe rekonstrueerimiseks tuleks kasutada inimese transformeerumata keratinotsüüte. Talitlusvõimelise sarvkihi all peaks olema mitu kihti eluvõimelisi epiteelirakke (basaalkiht, ogakiht ja sõmerkiht). Sarvkiht peaks olema mitmekihiline ja sisaldama selliseid vajalikke lipiide, et moodustuks funktsionaalne kaitsekiht, mis suudab takistada tsütotoksiliste võrdluskemikaalide, näiteks naatriumdodetsüülsulfaadi (SDS) või Triton X-100 kiiret läbitungimist. Nimetatud kaitsekihina toimimist tuleks tõendada; selle hindamiseks võib teha kindlaks kontsentratsiooni, mille juures võrdluskemikaal vähendab kindlaksmääratud kokkupuuteaja vältel kudede eluvõimelisust 50 % võrra (IC₅₀), või määrata kokkupuuteaja, mille vältel võrdluskemikaal vähendab teatud kindla kontsentratsiooni juures kudede eluvõimelisust 50 % võrra (ET₅₀) (vt punkt 18). Kasutatav inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudel peaks olema selline, et aine ei saaks jõuda eluskoeni sarvkihti läbimata, kuna vastasel korral ei ole nahakaudse kokkupuute mudeliga saadud tulemused usaldusväärsed. Kasutatav mudel ei tohiks olla saastunud bakterite, viiruste, mükoplasma ega seentega.

Funktsionaaltingimused

Eluvõimelisus

17. Kudede eluvõimelisuse kvantifitseerimiseks kasutatakse MTT-põhist meetodit (27). Vitaalvärvaine MTT redutseeritakse inimese rekonstrueeritud marrasknaha eluvõimelistes rakkudes siniseks sadestuvaks MTT formasaaniks, mis ekstraheeritakse seejärel koest isopropanooli (või muu sarnase lahusti) abil. Ekstraheerimiseks kasutatava lahusti enda optiline tihedus peaks olema piisavalt väike, st < 0,1. Ekstraheeritud MTT formasaani kvantifitseerimiseks võib kasutada kas tavapärasest neelduvuse (optilise tiheduse) mõõtmist või HPLC/UPLC-spektrofotomeetriat (38). Inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudeli kasutajad peaksid tagama, et mudeli iga kasutatav partii vastab negatiivse kontrolli kindlaksmääratud kriteeriumidele. Inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudeli väljatootaja/tarnija peaks kindlaks määrama negatiivse kontrolli optilise tiheduse väärtuste lubatud vahemiku (ülem- ja alampiiri). Käesoleva katsemeetodiga hõlmatud, inimese rekonstrueeritud marrasknahal põhineva nelja valideeritud katsemudeli puhul lubatud väärtusevahemikud negatiivse kontrolli optilise tiheduse jaoks on esitatud tabelis 2. HPLC/UPLC-spektrofotomeetria kasutaja peaks negatiivse kontrolli vastuvõetavuse kriteeriumina kasutama tabelis 2 negatiivse kontrolli kohta esitatud optilise tiheduse väärtusevahemikku. Tuleks dokumentaalselt tõendada, et negatiivse kontrolliga töödeldud koed on kokkupuuteperioodi kestel kultuuris stabiilsed (võimaldavad saada sarnaseid optilise tiheduse väärtusi).

Tabel 2. Partii kvaliteedi kontrollimiseks kasutatav negatiivse kontrolli optilise tiheduse lubatud väärtusevahemik

	Vastuvõetavate väärtuste alampiir	Vastuvõetavate väärtuste ülempiir
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

Toimimine kaitsekihina

18. Sarvkiht ja selle lipiidne koostis peavad olema sellised, et takistada teatud kindlate tsütotoksiliste võrdluskemikaalide (nt SDSi või Triton X-100) kiiret läbitungimist; seda hinnatakse IC₅₀ või ET₅₀ alusel (tabel 3). Inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudeli väljatöötaja/müüja peaks lõppkasutajale kudede tarnimisel tõendama mudeli iga kasutatava partii puhul toimivust kaitsekihina (vt punkt 21).

Morfoloogia

19. Tuleks läbi viia inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudeli histoloogiline analüüs, et tõendada inimese marrasknahaga sarnaneva, basaal-, oga-, sõmer- ja sarvkihti sisaldava mitmekihilise struktuuri olemasolu ning inimese marrasknaha lipiidsele koostisele lähedase lipiidse koostise esinemist. Inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudeli väljatöötaja/müüja peaks lõppkasutajale kudede tarnimisel esitama mudeli iga kasutatava partii histoloogilise analüüsi tulemused, millest nähtub kudede morfoloogia nõuetekohasus (vt punkt 21).

Reprodutseeritavus

20. Katsemeetodi kasutajad peaksid tõendama meetodiga saadavate positiivseid ja negatiivseid kontrole iseloomustavate tulemuste reprodutseeritavust pikema aja jooksul. Peale selle tuleks käesolevat katsemeetodit kasutada üksnes juhul, kui inimese rekonstrueeritud marrasknaha asjaomase mudeli väljatöötaja/tarnija on esitanud andmed, millest nähtub söövitavate ja mittesöövitavate kemikaalidega, näiteks pädevusainete loetelust (tabel 1) valitud kemikaalidega saadavate tulemuste reprodutseeritavus pikema aja jooksul. Kui asjaomast meetodit kasutatakse täpsemaks liigitamiseks, tuleks tõendada tulemuste reprodutseeritavust ka alamkategooriatesse liigitamisel.

Kvaliteedikontroll

21. Asjaomast inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudelit tuleks kasutada üksnes juhul, kui selle väljatöötaja/tarnija on tõendanud, et kasutatava mudeli iga partii vastab tootele kehtestatud kvaliteedikriteeriumidele, mille hulgas kõige olulisemad on eluvõimelisuse (punkt 17), kaitsekihina toimivuse (punkt 18) ja morfoloogiaga (punkt 19) seotud kriteeriumid. Sellised andmed esitatakse meetodi kasutajatele, et nad saaksid lisada selle teabe katseprotokoll.

Söövitavate kemikaalide liigituse usaldusväärse prognoosimise eesmärgil on vastuvõetavad üksnes sellised tulemused, mis on saadud kvaliteedikontrolli edukalt läbinud koepartiidega. IC₅₀ või ET₅₀ väärtuste lubatud vahemiku (ülem- ja alampiiri) määrab kindlaks inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudeli väljatöötaja/tarnija. Kõnealuse nelja valideeritud katsemudeli puhul lubatud väärtusevahemikud on esitatud tabelis 3.

Tabel 3. Partii kvaliteedikontrolli kriteeriumid

	Vastuvõetavate väärtuste alampiir	Vastuvõetavate väärtuste ülempiir
EpiSkin™ (SM) (18-tunnine töötlus SDSiga) (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 tundi	ET ₅₀ = 8,7 tundi
SkinEthic™ RHE (1% Triton X-100) (35)	ET ₅₀ = 4,0 tundi	ET ₅₀ = 10,0 tundi
epiCS® (1% Triton X-100) (36)	ET ₅₀ = 2,0 tundi	ET ₅₀ = 7,0 tundi

Uuritava kemikaali ja kontrollkemikaalidega töötlemine

22. Iga uuritava kemikaali ja kontrolli puhul tuleks igal kokkupuuteperioodil kasutada vähemalt kahte paralleelset koeproovi. Nii vedelate kui ka tahkete kemikaalide puhul tuleks töötlemiseks kasutada piisavat kogust uuritavat kemikaali, et marrasknaha pind saaks ühtlaselt kaetud, ent seejuures tuleks hoiduda lõpmata suure annuse kasutamisest; see tähendab, et kemikaali tuleks peale kanda koguses vähemalt 70 µl/cm² või 30 mg/cm². Sõltuvalt mudelist tuleks marrasknaha pinda enne tahke kemikaali pealekandmist niisutada deioniseeritud või destilleeritud veega, et parandada uuritava kemikaali kontakti marrasknaha pinnaga (34, 35, 36, 37). Võimaluse korral tuleks tahket kemikaali kasutada peene pulbri kujul. Töötlemismeetod peaks olema uuritava kemikaali jaoks sobiv (vt nt allikad 34–37). Kokkupuuteperioodi lõppedes tuleks uuritav kemikaal veepõhise puhverlahuse või 0,9 % NaCl lahusega marrasknaha pinnalt hoolikalt maha pesta. Sõltuvalt sellest, millist kõnealusest neljast inimese rekonstrueeritud marrasknaha valideeritud katsemudelist kasutatakse, tuleb iga uuritava kemikaali puhul kasutada kahte või kolme kokkupuuteperioodi (kõigi nelja mudeli puhul kokkupuuteperioode kestusega 3 minutit ja 1 tund ning mudeli EpiSkin™ puhul täiendavat kokkupuuteperioodi kestusega 4 tundi). Kasutatavast inimese rekonstrueeritud marrasknaha katsemudelist ja konkreetsest kokkupuuteperioodist sõltuvalt võib kokkupuuteaegne inkubeerimistemperatuur varieeruda toatemperatuurist kuni 37 °C-ni.
23. Igas mõõtmistsüklis tuleks kasutada paralleelset negatiivset ja positiivset kontrolli selle tõendamiseks, et kudede eluvõimelisus (negatiivse kontrolli puhul), toimivus kaitsekihina ja

sellest sõltuv kudede tundlikkus (positiivse kontrolli puhul) jääb varasemate andmete alusel kindlaks määratud lubatud piiridesse. Soovitatav positiivseks kontrolliks sobiv kemikaal on kasutatavast inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudelist sõltuvalt jää-äädikhape või 8 N KOH. Tuleks silmas pidada, et 8 N KOH on MTT otsene redutseerija ja selle kemikaali puhul võib olla vaja kasutada kohandatud kontrolle, nagu on kirjeldatud punktides 25 ja 26. Soovitatav negatiivne kontroll on 0,9 % (massiühikutes mahuühiku kohta) NaCl või vesi.

Rakkude eluvõimelisuse mõõtmine

24. Käesoleva katsemeetodi raames tuleks rakkude eluvõimelisuse mõõtmiseks kasutada kvantitatiivset MTT-põhist meetodit (27). Koeproov asetatakse kolmeks tunniks sobiva kontsentratsiooniga (0,3 või 1 mg/ml) MTT lahusesse. Sadestunud sinine formasaan ekstraheeritakse seejärel lahusti (näiteks isopropanooli või hapestatud isopropanooli) abil ning formasaani kontsentratsiooni määramiseks mõõdetakse lahuse optiline tihedus lainepikkusel 570 nm – seejuures kasutatakse filtrit ribalaiusega kuni ± 30 nm – või rakendatakse HPLC/UPLC-spektrofotomeetriat (vt punktid 30 ja 31) (38).
25. Uuritav kemikaal võib MTT-põhise katse tulemusi moonutada tulenevalt MTT otsesest redutseerimisest siniseks formasaaniks ja/või värvuse muutmise kaudu, kui asjaomane uuritav kemikaal neelab looduslikult või töötlemisprotsessi tulemusena valgust samas vahemikus, mida kasutatakse formasaanilahuse optilise tiheduse mõõtmiseks (570 ± 30 nm; seda täheldatakse peamiselt siniste ja lillade kemikaalide puhul). Selliste uuritavate kemikaalide võimaliku segava mõju tuvastamiseks ja tulemuste korrigeerimiseks tuleks kasutada täiendavaid kontrolle, näiteks MTT mittespetsiifilist redutseerimist (NSMTT) kajastavat kontrolli ja mittespetsiifilist värvumist (NSC) kajastavat kontrolli (vt punktid 26–30). See on eriti oluline juhul, kui konkreetset uuritavat kemikaali ei saa loputamise teel koepinnalt täielikult eemaldada või kui see tungib marrasknahka ja jääb seega eluvõimelisuse MTT-põhise määramise ajaks kudedesse. Üksikasjalik kirjeldus selle kohta, kuidas korrigeerida tulemusi MTT otsese redutseerimise ja värvust muutvate ainete mõju suhtes, on esitatud asjaomast katsemudelit käsitlevas standardses töökorras (34, 35, 36, 37).
26. MTT otseste redutseerijate tuvastamiseks tuleks lisada iga uuritavat kemikaali värskest valmistatud MTT lahusesse (34, 35, 36, 37). Kui MTT lahus värvub uuritava kemikaali toimel siniseks/lillaks, siis käsitatakse asjaomast uuritavat kemikaali MTT otsese redutseerijana ning sel juhul tuleks tavapärasest neelduvuse (optilise tiheduse) mõõtmisest või HPLC/UPLC-spektrofotomeetria põhinevast määramisest sõltumatult kasutada täiendavat funktsionaalset kontrolli eluvõimetu marrasknahaga. Sellise täiendava funktsionaalse kontrolli puhul kasutatakse surmatud kudesid, mille metaboolne aktiivsus on peaaegu kadunud, kuid mis absorbeerivad uuritavat kemikaali eluvõimeliste kudedega sarnasel määral. Iga MTT-d redutseeriva kemikaaliga töödeldakse vähemalt kahte surmatud kudede paralleelproovi kokkupuuteperioodi kohta ning nende proovidega viiakse läbi täismahus nahasöövituskatse. Seejärel arvutatakse kudede tegeliku eluvõimelisuse kindlakstegemiseks asjaomase MTT redutseerijaga kokkupuutes olnud eluskudede puhul täheldatud eluvõimeliste kudede

protsentuaalne osakaal, millest lahutatakse sama MTT redutseerijaga kokkupuutes olnud surmatud kudede saadud, MTT mittespetsiifilist redutseerimist kajastav protsentuaalne osakaaluna väljendatud väärtus (NSMTT(%)); nimetatud väärtused arvutatakse korrigeeritavate andmete saamiseks kasutatud proovidega paralleelselt analüüsitud negatiivset kontrolli iseloomustava väärtuse suhtes.

27. Värviliste uuritavate kemikaalide või vee või isopropanooliga kokku puutumisel värviliseks muutuvate kemikaalide võimaliku segava mõju tuvastamiseks ja täiendavate kontrollide kasutamise vajaduse üle otsustamiseks tuleks teha uuritava kemikaali spektraalanalüüs vees (kokkupuutekeskkond) ja/või isopropanoolis (ekstraheerimislahus). Kui uuritav kemikaal neelab vees ja/või isopropanoolis valgust vahemikus 570 ± 30 nm, tuleks kasutada täiendavaid värvumiskontrolle või teise võimalusena HPLC/UPLC-spektrofotomeetriat; viimasel juhul ei ole kõnealused kontrollid vajalikud (vt punktid 30 ja 31). Tavapärasel neelduvuse (optilise tiheduse) mõõtmisel töödeldakse iga segavat mõju avaldava värvilise uuritava kemikaaliga vähemalt kahte paralleelset eluskoe proovi kokkupuuteperioodi kohta ning nende proovidega viiakse läbi täismahus nahasöövituskatse, ent MTTga inkubeerimise etapis kasutatakse MTT lahuse asemel söödet, et saada mittespetsiifilist värvumist (NSC_{elus}) kajastavad kontrollproovid. Eluskudedele iseloomulikust bioloogilisest varieeruvusest tulenevalt tuleb NSC_{elus} -kontrolli kasutada igas mõõtmistsükli iga kokkupuuteperioodi puhul samaaegselt uuritava värvilise kemikaaliga. Seejärel arvutatakse kudede tegeliku eluvõimelisuse kindlakstegemiseks asjaomase segavat mõju avaldava uuritava kemikaaliga kokkupuutes olnud ja MTT lahuses inkubeeritud eluskudede puhul täheldatud eluvõimeliste kudede protsentuaalne osakaal, millest lahutatakse kõnealuse segavat mõju avaldava uuritava kemikaaliga kokkupuutes olnud ja ilma MTT-ta söötmes inkubeeritud eluskudedega saadud, mittespetsiifilist värvumist kajastav protsentuaalne osakaaluna väljendatud väärtus ($NSC_{elus}(\%)$), mille leidmiseks kasutatud kontrollproove on käideldud korrigeeritavate andmete saamiseks kasutatud proovidega paralleelselt.
28. Selliste uuritavate kemikaalide puhul, millega saadud tulemustest nähtub nii MTT otsese redutseerimise võime (vt punkt 26) kui ka värvusest tulenev segav mõju (vt punkt 27), on tavapärasel neelduvuse (optilise tiheduse) mõõtmisel vaja kasutada eelmistes punktides kirjeldatud NSMTT-kontrolli ja NSC_{elus} -kontrolli kõrval veel kolmandat liiki kontrolli. See on tavaliselt vajalik tumedavärviliste (nt siniste, lillade ja mustade) uuritavate kemikaalide puhul, mis avaldavad MTT-põhises katses segavat mõju, kuna takistavad neile omase värvuse tõttu MTT otsese redutseerimise võime hindamist vastavalt punktis 26 kirjeldatule. Sellised uuritavad kemikaalid võivad seonduda nii eluskudede kui ka surmatud kudede ja seepärast võib juhtuda, et NSMTT-kontrolli abil korrigeeritakse tulemusi mitte üksnes uuritava kemikaali põhjustatud MTT võimaliku otsese redutseerimise suhtes, vaid ka värvusest tuleneva segava mõju suhtes, mis ilmneb uuritava kemikaali seondumisel surmatud kudede saadud. See võib kaasa tuua kahekordse korrigeerimise, kuna NSC_{elus} -kontrolli abil juba korrigeeritakse tulemusi värvusest tuleneva segava mõju suhtes, mis ilmneb uuritava kemikaali seondumisel eluskudedega. Et hoida ära võimalikku kahekordset korrigeerimist värvusest tuleneva segava

mõju suhtes, tuleb kasutada kolmandat kontrolli, mis võimaldab hinnata surmatud kudede mittespetsiifilist värvumist ($NSC_{surmatud}$). Selle täiendava kontrolli puhul töödeldakse uuritava kemikaaliga vähemalt kahte paralleelset surmatud kudede proovi kokkupuuteperioodi kohta ning nende proovidega viiakse läbi täismahus katse, ent MTTga inkubeerimise etapis kasutatakse MTT lahuse asemel söödet. Olenemata sellest, kui suur on sõltumatult läbi viidavate katsete/mõõtmistsüklite arv, piisab iga uuritava kemikaali puhul ühest $NSC_{surmatud}$ -kontrollist, ent seda tuleks käidelda samaaegselt NSMTT-kontrolliga ja võimaluse korral tuleks kasutada sama partii kudesid. Seejärel arvutatakse kudede tegeliku eluvõimelisuse kindlakstegemiseks asjaomase uuritava kemikaaliga kokkupuutes olnud eluskudede puhul täheldatud eluvõimeliste kudede protsentuaalne osakaal, millest lahutatakse NSMTT(%) ja $NSC_{elus}(\%)$ ning liidetakse kõnealuse segavat mõju avaldava uuritava kemikaaliga kokkupuutes olnud ja ilma MTT-ta söötmes inkubeeritud surmatud kudedega saadud, mittespetsiifilist värvumist kajastav protsentuaalne osakaaluna väljendatud väärtus ($NSC_{surmatud}(\%)$); nimetatud väärtused arvutatakse korrigeeritavate andmete saamiseks kasutatud proovidega paralleelselt analüüsitud negatiivset kontrolli iseloomustava väärtuse suhtes.

29. On oluline silmas pidada, et MTT mittespetsiifilise redutseerimise ja värvusest tuleneva mittespetsiifilise segava mõju tulemusena võivad koeekstraktiga saadud näidud olla suuremad kui spektrofotomeetri lineaarsusvahemikule vastavad väärtused. Sellest lähtuvalt tuleks igas laboris enne regulatiivsel eesmärgil uuritavate kemikaalidega katsete alustamist teha kaubanduslikust allikast pärit MTT formasaani (CASI nr: 57360-69-7) abil kindlaks kasutatava spektrofotomeetri lineaarsusvahemik. Eelkõige on tavapärane neelduvuse (optilise tiheduse) mõõtmine spektrofotomeetriga MTT otseste redutseerijate ja värvusest tuleneva segava mõjuga uuritavate kemikaalide puhul asjakohane juhul, kui asjaomase uuritava kemikaaliga töödeldud kudede ekstraktide optiline tihedus jääb enne MTT otsese redutseerimise ja/või värvusest tuleneva segava mõju suhtes korrigeerimist spektrofotomeetri lineaarsusvahemikku või kui uuritav kemikaal on eluvõimeliste kudede korrigeerimata protsentuaalse osakaalu alusel juba liigitatav söövitavaks (vt punktid 35 ja 36). Selliste uuritavate kemikaalide puhul, millega saadud NSMTT(%) ja/või $NSC_{elus}(\%)$ on negatiivse kontrolliga võrrelduna $> 50 \%$, tuleks siiski suhtuda tulemustesse ettevaatusega.
30. Tavapäraseks neelduvuse (optilise tiheduse) mõõtmiseks sobimatute värviliste uuritavate kemikaalide puhul, mis avaldavad MTT-põhises katses liiga tugevat segavat mõju, võib MTT formasaani määramiseks kasutada alternatiivina HPLC/UPLC-spektrofotomeetriat (vt punkt 31) (37). HPLC/UPLC-spektrofotomeetria võimaldab MTT formasaani enne selle kvantifitseerimist uuritavast kemikaalist eraldada (38). Sel põhjusel ei ole NSC_{elus} -kontroll ega $NSC_{surmatud}$ -kontroll HPLC/UPLC-spektrofotomeetria kasutamisel uuritava kemikaali omadustest sõltumata kunagi vajalikud. NSMTT-kontrolli aga tuleks siiski kasutada, kui on põhjust eeldada, et uuritav kemikaal on MTT otsene redutseerija või selle värvus takistab MTT otsese redutseerimise võime hindamist (vastavalt punktis 26 kirjeldatule). Kui MTT formasaani määramiseks kasutatakse HPLC/UPLC-spektrofotomeetriat, arvutatakse eluvõimeliste kudede protsentuaalne osakaal uuritava kemikaaliga kokku puutunud eluskudede puhul saadud MTT

formasaani piigi pindala protsentuaalse osakaaluna paralleelse negatiivse kontrolliga saadud MTT formasaani piigi pindalast. Kemikaalide puhul, mis on võimelised MTT-d otse redutseerima, arvutatakse kudede tegelik eluvõimelisus uuritava kemikaaliga kokku puutunud eluskudede puhul täheldatud eluvõimeliste kudede protsentuaalse osakaaluna, millest on lahutatud NSMTT(%). Lõpuks tuleks märkida, et selliseid MTT otseseid redutseerijaid, mis võivad avaldada ka värvusest tulenevat segavat mõju ning mis jäävad pärast töötlemist kudedesse ja redutseerivad MTT-d nii tugevalt, et analüüsitava koeekstraktide puhul täheldatud optiline tihedus (tavapärasel optilise tiheduse mõõtmisel) või piigi pindala (HPLC/UPLC-spektrofotomeetria kasutamisel) jääb väljapoole spektrofotomeetri lineaarsusvahemikku, ei ole võimalik hinnata; seda juhtub eeldatavalt siiski väga harva.

31. HPLC/UPLC-spektrofotomeetriat võib MTT formasaani määramiseks kasutada iga liiki (värviliste, värvitute, MTT-d redutseerivate ja MTT-d mitteredutseerivate) uuritavate kemikaalide puhul (38). Kuna on olemas eri HPLC/UPLC-spektrofotomeetriasüsteeme, tuleks enne sellise süsteemi kasutamist koeekstraktides sisalduva MTT formasaani määramiseks tõendada asjaomase HPLC/UPLC-spektrofotomeetriasüsteemi nõuetekohasust; selleks tõendatakse vastavust teatud standardnäitajatega seotud vastuvõetavuskriteeriumidele, mille puhul on lähtutud bioanalüüsimeetodite valideerimist käsitlevates ettevõtjatele ette nähtud USA Toidu- ja Raviameti suunistes kirjeldatud kriteeriumidest (38, 39). Kõnealused põhinäitajad ja neile vastavad vastuvõetavuskriteeriumid on esitatud 4. liites. Kui 4. liites määratletud vastuvõetavuskriteeriumid on täidetud, loetakse asjaomane HPLC/UPLC-spektrofotomeetriasüsteem nõuetekohaseks ja seda võib hakata kasutama MTT formasaani määramiseks käesolevas katsemeetodis kirjeldatud katsetingimustes.

Katse nõuetekohasuse kriteeriumid

32. Iga katsemeetodi puhul, kus kasutatakse inimese rekonstrueeritud marrasknaha nõuetekohast mudelit, peaks negatiivse kontrolliga töödeldud kudesid iseloomustav optiline tihedus kajastama kudede kvaliteeti vastavalt tabelis 2 kirjeldatule ega tohiks olla väiksem kui varasemate andmete põhjal kindlaks määratud alampiir. Positiivse kontrolliga, st jääädikhape või 8 N KOH-ga töödeldud kudedega saadud tulemused peaksid kajastama kudede võimet reageerida söövitavale kemikaalile asjaomase katsemudeli puhul kasutatavates tingimustes (vt 2. liide). Paralleelsete koeproovidega saadud tulemuste vaheline varieeruvus peaks inimese rekonstrueeritud marrasknaha iga valideeritud mudeli puhul jääma uuritava kemikaaliga ja/või kontrollkemikaaliga töötlemisel kõikide nõuete puhul vastuvõetavasse vahemikku (vt 2. liide) (näiteks ei tohiks kahe paralleelse koeprooviga saadud eluvõimelisuse näitajate vaheline erinevus olla suurem kui 30 %). Kui mõõtmistsükli kasutatud negatiivse kontrolli või positiivse kontrolliga saadud väärtus jääb väljapoole lubatud vahemikku, loetakse asjaomases mõõtmistsükli saadud tulemused kehtetuks ning mõõtmisi tuleks korrata. Kui uuritava kemikaaliga saadud väärtuste varieeruvus on suurem, kui on lubatud kindlaksmääratud vahemikus püsimiseks, tuleks sellega teha uus katse.

Tulemuste tõlgendamine ja prognoosimudel

33. Iga uuritava kemikaaliga saadud optilise tiheduse väärtuste alusel tuleks arvutada eluvõimeliste kudede protsentuaalne osakaal negatiivse kontrolli puhul saadud väärtusest, mis on võetud võrdseks 100 protsendiga. HPLC/UPLC-spektrofotomeetria kasutamise korral arvutatakse eluvõimeliste kudede protsentuaalne osakaal uuritava kemikaaliga kokku puutunud eluskudede puhul saadud MTT formasaani piigi pindala protsentuaalse osakaaluna paralleelse negatiivse kontrolliga saadud MTT formasaani piigi pindalast. Eluvõimeliste rakkude protsentuaalse osakaalu läviväärtused söövitavate uuritavate kemikaalide eristamiseks mittesöövitavatest (või söövitavate kemikaalide eri alamkategoriasse liigitamiseks) on iga käesolevas katsemeetodis käsitletud katsemudeli jaoks sätestatud allpool punktides 35 ja 36 ning tulemuste tõlgendamisel tuleks kasutada just neid väärtusi.
34. Kui uuritava kemikaali liigitamisel saadakse ühene tulemus, piisab ühest mõõtmistsüklist, kus on kasutatud vähemalt kahte paralleelset koeproovi. Ebaselgete tulemuste puhul – näiteks kui paralleelproovidega saadud mõõtmisandmed lahknevad – võib kaaluda vajadust viia läbi veel üks mõõtmistsükkel ning esimeses kahes mõõtmistsükli saadud tulemuste lahknevuse korral veel kolmaski mõõtmistsükkel.
35. Nahasöövituse katsemudeli EpiSkin™ puhul kasutatav prognoosimudel (9, 22, 34), mis on seotud ÜRO GHSi / CLP-määruse kohase klassifitseerimissüsteemiga, on esitatud tabelis 4.

Tabel 4. Mudeli EpiSkin™ puhul kasutatav prognoosimudel

Kokkupuuteperioodi (t = 3, 60 või 240 minutit) järgselt mõõdetud eluvõimelisus	Kaalutav prognoos
< 35 % pärast kokkupuuteperioodi kestusega 3 minutit	Söövitav: • vabatahtlikult kohaldatavasse 1A alamkategoriasse liigitatav*
≥ 35 % pärast kokkupuuteperioodi kestusega 3 minutit NING < 35 % pärast kokkupuuteperioodi kestusega 60 minutit VÕI ≥ 35 % pärast kokkupuuteperioodi kestusega 60 minutit NING < 35 % pärast kokkupuuteperioodi kestusega 240 minutit	Söövitav: • vabatahtlikult kohaldatavasse 1B ja 1C alamkategoriate ühiskategoriasse liigitatav
≥ 35 % pärast kokkupuuteperioodi kestusega 240 minutit	Mittesöövitav

* Andmetest, mis koguti selleks, et hinnata inimese rekonstrueeritud marrasknaha katsemudelite kasutatavust alamkategoriasse liigitamise toetamiseks, nähtub, et katsemudeliga EpiSkin™ saadud tulemuste alusel 1A alamkategoriasse liigitatud ainetest/segudest võib umbes 22 % kuuluda tegelikult 1B või 1C alamkategoriasse (st need on üleklassifitseeritud) (vt 3. liide).

36. Nahasöövituse katsemudelite EpiDerm™ SCT (10, 23, 35), SkinEthic™ RHE (17, 18, 23, 36) ja epiCS® (16, 23, 37) puhul kasutatavad prognoosimudelid, mis on seotud ÜRO GHSi / CLP-määruse kohase klassifitseerimissüsteemiga, on esitatud tabelis 5.

Tabel 5. Mudelite EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE ja epiCS® puhul kasutatavad prognoosimudelid

Kokkupuuteperioodi (t = 3 või 60 minutit) järgselt mõõdetud eluvõimelisus	Kaalutav prognoos
1. ETAPP mudelite EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE ja epiCS® puhul	
< 50 % pärast kokkupuuteperioodi kestusega 3 minutit	Söövitav
≥ 50 % pärast kokkupuuteperioodi kestusega 3 minutit NING < 15 % pärast kokkupuuteperioodi kestusega 60 minutit	Söövitav
≥ 50 % pärast kokkupuuteperioodi kestusega 3 minutit NING ≥ 15 % pärast kokkupuuteperioodi kestusega 60 minutit	Mittesöövitav
2. ETAPP mudeli EpiDerm™ SCT puhul – 1. etapis söövitavaks liigitatud ainete/segude puhul	
< 25 % pärast kokkupuuteperioodi kestusega 3 minutit	Vabatahtlikult kohaldatavasse 1A alamkategoriasse liigitatav*
≥ 25 % pärast kokkupuuteperioodi kestusega 3 minutit	Vabatahtlikult kohaldatavasse 1B ja 1C alamkategoriate ühiskategoriasse liigitatav
2. ETAPP mudeli SkinEthic™ RHE puhul – 1. etapis söövitavaks liigitatud ainete/segude puhul	
< 18 % pärast kokkupuuteperioodi kestusega 3 minutit	Vabatahtlikult kohaldatavasse 1A alamkategoriasse liigitatav*
≥ 18 % pärast kokkupuuteperioodi kestusega 3 minutit	Vabatahtlikult kohaldatavasse 1B ja 1C alamkategoriate ühiskategoriasse liigitatav
2. ETAPP mudeli epiCS® puhul – 1. etapis söövitavaks liigitatud ainete/segude puhul	
< 15 % pärast kokkupuuteperioodi kestusega 3 minutit	Vabatahtlikult kohaldatavasse 1A alamkategoriasse liigitatav*
≥ 15 % pärast kokkupuuteperioodi kestusega 3 minutit	Vabatahtlikult kohaldatavasse 1B ja 1C alamkategoriate ühiskategoriasse liigitatav

ANDMED JA ARUANDLUS

Andmed

37. Iga katse puhul tuleks esitada tabeli kujul andmed iga paralleelse koepuuri kohta (näiteks optilise tiheduse väärtused ja eluvõimeliste rakkude protsentuaalne osakaal iga uuritava

kemikaali puhul koos liigitamise tulemusega), sealhulgas vajaduse korral korduskatsete tulemused. Peale selle tuleks iga katse puhul esitada keskväärtused, eluvõimelisust kajastavate väärtuste vahemikud ja paralleelsete koeproovidega saadud andmete variatsioonikordajad. Iga asjaomase uuritava kemikaali puhul tuleks esitada andmed seoses MTT otsese redutseerija puhul täheldatud mõjuga MTT-le või värvilise uuritava kemikaali segava mõjuga.

Katseprotokoll

38. Katseprotokollis tuleks esitada järgmine teave.

Uuritav kemikaal ja kontrollkemikaalid:

- ühest koostisosast koosnev aine: kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus, CASi number, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem, puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne;
- mitut koostisosa sisaldav aine, UVCB või segu: võimalikult täpne omaduste kirjeldus lähtuvalt koostisosade keemilisest määratlusest (vt eespool), kvantitatiivsest sisaldusest ja asjakohastest füüsikalise-keemilistest omadustest;
- füüsiline välimus, lahustuvus vees ja muud asjakohased füüsikalise-keemilised omadused;
- allikas ja partii number, kui see on olemas;
- vajaduse korral teave uuritava kemikaali / kontrollaine töötlemise kohta enne katset (näiteks soojendamine, peenestamine);
- uuritava kemikaali püsivus ja aegumiskuupäev või kordusanalüüsi tegemise tähtpäev, kui see on teada;
- säilitustingimused.

Kasutatud inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudel ja katse-eeskiri ning nende valimise põhjendus (vajaduse korral)

Katsetingimused:

- kasutatud inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudel (sealhulgas partii number);
- mõõteseadme (nt spektrofotomeetri) kaliibrimisandmed, MTT formaani kvantifitseerimiseks kasutatud lainepikkus ja filtri ribalaius (vajaduse korral) ning mõõteseadme lineaarsusvahemik;
- MTT formaani kvantifitseerimiseks kasutatud meetodi kirjeldus;
- vajaduse korral HPLC/UPLC-spektrofotomeetriasüsteemi nõuetekohasuse tõendamise kirjeldus;
- kogu täiendav teave konkreetse kasutatud inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudeli, sealhulgas selle kasutamise tulemuslikkuse kohta. See hõlmab vähemalt järgmisi aspekte:
 - i) eluvõimelisus;

- ii) toimimine kaitsekihina;
 - iii) morfoloogia;
 - iv) reprodutseeritavus ja ennustusjõud;
 - v) mudeli kvaliteedi kontroll;
- viide varasematele andmetele mudeli kohta. See hõlmab vähemalt kvaliteedikontrolli andmete vastuvõetavust lähtuvalt varasematest andmetest partii kohta;
 - pädevusainetega katsete tegemine eesmärgiga tõendada katsemeetodi kasutamise pädevust enne meetodi regulaarset rakendamist.

Katse käik:

- kasutatud katse-eeskirja üksikasjalik kirjeldus (sealhulgas teave kokkupuuteperioodi järgsete pesemisetappide kohta);
- kasutatud uuritava kemikaali ja kontrollkemikaalide annused;
- kokkupuuteperioodi(de) kestus ja kokkupuutetemperatuur(id);
- MTT otseste redutseerijate ja/või värviliste uuritavate kemikaalide puhul kasutatud kontrollid;
- iga uuritava kemikaali ja iga kontrolli (positiivse ja negatiivse kontrolli ning vajaduse korral NSMTT-kontrolli, NSC_{elus}-kontrolli ja/või NSC_{sumatud}-kontrolli) puhul iga kokkupuuteperioodi jaoks kasutatud paralleelsete koeproovide arv;
- kasutatud otsustuskriteeriumide/prognoosimudeli kirjeldus lähtuvalt kasutatud inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudelist;
- kõikide katsemeetodis tehtud (sealhulgas pesemisetappidega seotud) muudatuste kirjeldus.

Mõõtmistsükliks või katses saadavate tulemuste vastuvõetavuse kriteeriumid:

- varasemate andmete kohased positiivse ja negatiivse kontrolli puhul saadud keskvaartused ja vastuvõetavate väärtuste vahemikud;
- positiivse ja negatiivse kontrolli puhul paralleelsete koeproovidega saadud tulemuste varieeruvuse vastuvõetav määr;
- uuritava kemikaali puhul paralleelsete koeproovidega saadud tulemuste varieeruvuse vastuvõetav määr.

Tulemused:

- tabeli kujul mõõtmisandmed iga uuritava kemikaali ja kontrolli kohta iga mõõtmistsükli, iga kokkupuuteperioodi ja iga paralleelproovi puhul, sealhulgas vastavalt vajadusele optilise tiheduse või MTT formasaani piigi pindala väärtused, eluvõimeliste kudede protsentuaalne osakaal ja selle näitaja keskvaartus, paralleelproovide vahelise varieeruvuse andmed, standardhälbed ja/või variatsioonikordajad;

- vajaduse korral MTT otseste redutseerijate ja/või värviliste uuritavate kemikaalide puhul kasutatud kontrollidega saadud tulemused, sealhulgas vastavalt vajadusele optilise tiheduse või MTT formaani piigi pindala väärtused, NSMTT(%), NSC_{elus}(%) ja/või NSC_{surmatud}(%), paralleelsete koeproovide vahelise varieeruvuse andmed, standardhälbed ja/või variatsioonikordajad ning eluvõimeliste kudede lõplik korrigeeritud protsentuaalne osakaal;
- uuritava(te) kemikaali(de) ja kontrollkemikaalidega saadud tulemuste vastavus mõõtmistsükli või katses saadavate tulemuste vastuvõetavuse kindlaksmääratud kriteeriumidele;
- muu täheldatud toime kirjeldus;
- klassifitseerimistulemused lähtuvalt kasutatud prognoosimudelitest/otsustuskriteeriumidest.

Tulemuste arutelu

Järeldused

KIRJANDUS

- (1) ÜRO (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Viies, täiendatud väljaanne. ÜRO, New York ja Genf.
Kättesaadav aadressil
http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.
- (2) Käesoleva lisa peatükk B.4 „Äge nahaärritus/-söövitus“.
- (3) Käesoleva lisa peatükk B.40 „*In vitro* nahasöövitus: transkutaanse elektritakistuse (TET) mõõtmisel põhinev katsemeetod“.
- (4) Käesoleva lisa peatükk B.65 „*In vitro* membraanibarjääri katsemeetod nahasöövituse uurimiseks“.
- (5) Käesoleva lisa peatükk B.46 „*In vitro* nahaärritus: inimese rekonstrueeritud marrasknahal põhinev katsemeetod“.
- (6) OECD (2014). Guidance Document on an Integrated Approach to Testing and Assessment (IATA) for Skin Corrosion and Irritation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 203.
Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (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., ja 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., ja 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., ja 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., ja 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., ja Zucco, F. (1995). Practical Aspects

of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops. *ATLA* 23: 129–147.

- (12) Alternatiivsete meetodite valideerimise ametitevaheline koordineerimiskomitee (ICCVAM) (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 (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) ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the EpiSkin™ Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity). Koostanud ECVAMi teaduslik nõuandekomitee (ESAC10), 3. aprill 1998.
- (15) ECVAM (2000). Statement on the Application of the EpiDerm™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing. Koostanud ECVAMi teaduslik nõuandekomitee (ESAC14), 21. märts 2000.
- (16) Hoffmann, J., Heisler, E., Karpinski, S., Losse, J., Thomas, D., Siefken, W., Ahr, H. J., Vohr, H. W., ja 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., ja 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., ja 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) ECVAM (2006). Statement on the Application of the SkinEthic™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing. Koostanud ECVAMi teaduslik nõuandekomitee (ESAC25), 17. november 2006.
- (20) ECVAM (2009). ESAC Statement on the Scientific Validity of an *In-Vitro* Test Method for Skin Corrosivity Testing: the EST-1000. Koostanud ECVAMi teaduslik nõuandekomitee (ESAC30), 12. juuni 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.
Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

- (22) Alépée, N., Grandidier, M. H., ja 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., ja 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 Testing as described in TG 431. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 219. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (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. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (26) Eskes, C., *et al.* (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 62: 393–403.
- (27) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65: 55–63.
- (28) Tinois, E., *et al.* (1994). The Episkin Model: Successful Reconstruction of Human Epidermis *In Vitro*. Väljaandes: *In Vitro* Skin Toxicology. Rougier, A., Goldberg, A. M., ja Maibach, H. I. (toim.). Lk 133–140.
- (29) Cannon, C. L., Neal, P. J., Southee, J. A., Kubilus, J., ja Klausner, M. (1994). New Epidermal Model for Dermal Irritancy Testing. *Toxicol. In Vitro* 8: 889–891.
- (30) Ponc, M., Boelsma, E., Weerheim, A., Mulder, A., Bouwstra, J., ja Mommaas, M. (2000). Lipid and Ultrastructural Characterization of Reconstructed Skin Models. *Int. J. Pharm.* 203: 211–225.
- (31) Tinois, E., Tiollier, J., Gaucherand, M., Dumas, H., Tardy, M., ja 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., ja Rosenberg, M. (1992). The Organotypic Culture of Human Skin Keratinocytes and Fibroblasts to Achieve Form and Function. *Cytotechnology* 9: 163–171.
- (33) Wilkins, L. M., Watson, S. R., Proskey, S. J., Meunier, S. F., ja Parenteau, N. L. (1994). Development of a Bilayered Living Skin Construct for Clinical Applications. *Biotechnol. Bioeng.* 43(8): 747–756.
- (34) Standardne töökord mudeli EpiSkin™ jaoks (detsember 2011). Andmebaasi INVITTOX katse-eeskiri nr 118 „EpiSkin™ Skin Corrosivity Test“.
- (35) Standardne töökord mudeli EpiDerm™ jaoks (veebbruar 2012). Versioon MK-24-007-0024. Katse-eeskiri „In Vitro EpiDerm™ Skin Corrosion Test (EPI-200-SCT). For Use with MatTek Corporation’s Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm™“.
- (36) Standardne töökord mudeli SkinEthic™ RHE jaoks (jaanuar 2012). Andmebaasi INVITTOX katse-eeskiri „SkinEthic™ Skin Corrosivity Test“.
- (37) Standardne töökord mudeli EpiCS® jaoks (jaanuar 2012). Versioon 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., ja McNamee, P. (2015). 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) USA Toidu- ja Ravimiamet (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. USA tervishoiu- ja sotsiaalteenuste ministeerium, Toidu- ja Ravimiamet (mai 2001). Kättesaadav aadressil <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>.

1. liide

MÕISTED

Aine – looduslik või mis tahes tootmisprotsessi tulemusena saadud keemiline element või selle ühend koos püsivuse tagamiseks vajalike lisaainete ja tootmisprotsessi käigus tekkinud lisanditega, mis ei hõlma siiski lahusteid, mida on võimalik aine püsivust mõjutamata või selle koostist muutmata ainest eraldada.

Asjakohasus – näitaja, mille abil kirjeldatakse, kuivõrd katsemeetod võimaldab uurida huvipakkuvat toimet, kas selle kasutamine on mõttekas ja kas see on konkreetse eesmärgi jaoks sobiv. Asjakohasusest nähtub, mil määral saab katsemeetodiga õigesti mõõta või ennustada huvipakkuvat bioloogilist toimet. Asjakohasuse puhul võetakse arvesse ka katsemeetodiga saavutatavat täpsust (vastavust) (25).

ET₅₀ – näitaja, mille hinnangulise väärtuse leidmiseks tehakse kindlaks kokkupuuteperiood, mille jooksul rakkude eluvõimelisus väheneb teatava kindlaksmääratud kontsentratsiooniga võrdluskemikaaliga töötlemise tagajärjel 50 % võrra; vt ka mõistet IC₅₀.

GHS (ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteem) – süsteem, millega nähakse ette kemikaalide (ainete ja segude) klassifitseerimine vastavalt nende füüsilise ohtlikkuse ning kahjuliku tervise- ja keskkonnamõju standarditud liigile ja tasemele ning mis hõlmab selliseid asjaomaseid teavituselemente nagu piktogrammid, märksõnad, ohulaused, hoiatuslaused ja ohutuskaardid, et anda inimeste (sealhulgas tööandjate, töötajate, vedajate, tarbijate ja päästetöötajate) ning keskkonna kaitsmiseks vajalikku teavet kõnealuste kemikaalide kahjuliku toime kohta (1).

HPLC – kõrgefektiivne vedelikkromatograafia.

IC₅₀ – näitaja, mille hinnangulise väärtuse leidmiseks tehakse kindlaks kontsentratsioon, mille juures võrdluskemikaal vähendab teatava kindlaksmääratud kokkupuuteperioodi jooksul kudede eluvõimelisust 50 % võrra; vt ka mõistet ET₅₀.

In vivo nahasöövit – pöördumatu nahakahjustuse tekkimine, st läbi marrasknaha pärisnahani ulatuva nähtava nekroosi tekkimine pärast uuritava kemikaali pealekandmist kuni neljaks tunniks. Tüüpilised söövitushäired on haavandid, verejooks, verised kärnad ning 14-päevase vaatlusperioodi lõpuks ilmnev värvimuutus naha valastumise tõttu, täielik alopeetsia ja armistumine. Ebaselgete kahjustuste hindamiseks tuleks kaaluda histopatoloogilise analüüsi tegemist.

Kemikaal – aine või segu.

Lõpmata suur annus – marrasknahale kantud uuritava kemikaali kogus, mis on suurem kui marrasknaha pinna täielikuks ja ühtlaseks katmiseks vajalik kogus.

Mitmest koostisosast koosnev aine – aine, mis on määratletud kvantitatiivse koostise alusel ja milles enam kui ühe põhikoostisosa sisaldus on suurem kui 10, kuid väiksem kui 80 massiprotsenti. Mitmest koostisosast koosnev aine saadakse tootmisprotsessi tulemusena. Erinevus segu ja mitmest koostisosast koosneva aine vahel seisneb selles, et segu saadakse kahe või enama aine kokkusegamisel, ilma et toimuks keemilist reaktsiooni. Mitmest koostisosast koosnev aine saadakse keemilise reaktsiooni tulemusel.

MS – mittesöövitav.

MTT – 3-(4,5-dimetüültiasool-2-üül)-2,5-difenüültetrasooliumbromiid; tiasolüülisinise tetrasooliumbromiid.

Mõõtmistsükkel – ühe või mitme uuritava kemikaali analüüsimine negatiivse ja positiivse kontrolliga paralleelselt.

NSC_{elus}-kontroll – eluskudede mittespetsiifilist värvumist kajastav kontroll.

NSC_{surmatud}-kontroll – surmatud kudede mittespetsiifilist värvumist kajastav kontroll.

NSMTT – MTT mittespetsiifiline redutseerumine.

Positiivne kontroll – paralleelproov, mis sisaldab kõiki katsesüsteemi komponente ja mida on töödeldud kemikaaliga, millega teadaolevalt saadakse positiivne tulemus. Positiivse tulemuse väärtus ei tohiks olla liiga suur, et võimaldada hinnata positiivse kontrolliga saadud tulemuste varieeruvust ajas.

Rakkude eluvõimelisus – näitaja, mis väljendab rakupopulatsiooni summaarset aktiivsust, näiteks raku mitokondri dehüdrogenaaside võimet redutseerida vitaalvärvainet MTT (3-(4,5-dimetüültiasool-2-üül)-2,5-difenüültetrasooliumbromiid; tiasolüülisinine), ning mis olenevalt mõõdetavast lõppnäitajast ja kasutatavast katseplaanist korreleerub elusrakkude üldarvu ja/või elujõulisusega.

Segu – kahest või enamast ainest koosnev segu või lahus, mille koostisained ei reageeri üksteisega.

Spetsiifilisus – katsemeetodiga õigesti negatiivseks/reaktsioonivõimetuks liigitatud kemikaalide osakaal kõikide negatiivsete kemikaalide hulgas. Spetsiifilisus kajastab sellise katsemeetodi täpsust, millega saadakse kategoriseeritav tulemus, ning see on oluline näitaja katsemeetodi asjakohasuse hindamiseks (25).

Tulemuslikkuse standardid – valideeritud katsemeetodil põhinevad standardid, mille alusel hinnatakse mehhanismilt ja tööpõhimõttelt sarnase kavandatud katsemeetodi võrreldavust. Need hõlmavad: i) katsemeetodi olulisi elemente, ii) valideeritud katsemeetodi vastuvõetava tulemuslikkuse tõendamiseks kasutatud kemikaalide hulgast valitud võrdluskemikaalide miinimumloetelu ja iii) võrreldavat usaldusväärsuse ja täpsuse taset, mille puhul on lähtutud valideeritud katsemeetodiga saadud tulemustest ja mis tuleks saavutada kavandatud

katsemeetodi hindamisel võrdluskemikaalide miinumloetelu kasutamise teel (25).

Tundlikkus – katsemeetodiga õigesti positiivseks/reaktsioonivõimeliseks liigitatud kemikaalide osakaal kõikide positiivsete kemikaalide hulgas. Tundlikkus kajastab sellise katsemeetodi täpsust, millega saadakse kategoriseeritav tulemus, ning see on oluline näitaja katsemeetodi asjakohasuse hindamiseks (25).

Täpsus – katsemeetodiga saadud tulemuste ja vastuvõetavate võrdlusväärtuste kooskõla määr. Täpsus näitab katsemeetodi tulemuslikkust ja on üks asjakohastest aspektidest. Seda mõistet kasutatakse sageli vastavuse tähenduses, et väljendada katsemeetodiga saadud õigete tulemuste osakaalu (25).

UPLC – ülikõrgefektiivne vedelikkromatograafia.

Usaldusväärsus – näitaja, mis iseloomustab katsemeetodiga saadud tulemuste reprodutseeritavust pikema aja jooksul samas laboris ja eri laborites, kui meetodit rakendatakse ühe ja sama katse-eeskirja alusel. Usaldusväärsuse hindamiseks arvutatakse laborisisene ja laboritevaheline reprodutseeritavus (25).

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

UVCB – tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal.

Vastavus – katsemeetodi tulemuslikkuse näitaja katsemeetodite puhul, millega saadakse kategoriseeritav tulemus; üks asjakohastest aspektidest. Seda mõistet kasutatakse mõnikord täpsuse tähenduses ja see on määratletud kui õigesti positiivseks või negatiivseks liigitatud kemikaalide osakaal kõikide uuritud kemikaalide seas. Vastavus sõltub väga suurel määral positiivsete tulemuste osakaalust uuritavale kemikaalile vastavat liiki kemikaalide hulgas (25).

Ühest koostisosast koosnev aine – aine, mis on määratletud kvantitatiivse koostise alusel ja mille ühe põhikoostisosa sisaldus on vähemalt 80 massiprotsenti.

2. liide

NAHASÖÖVITUSE HINDAMISEKS VALIDEERITUD INIMESE REKONSTRUEERITUD MARRASKNAHA KATSEMUDELITE PÕHIELEMENDID

Katsemudeli elemendid	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Mudeli pindala	0,38 cm ²	0,63 cm ²	0,5 cm ²	0,6 cm ²
Paralleelsete koeproovide arv	Vähemalt 2 iga kokkupuuteperioodi kohta	2–3 iga kokkupuuteperioodi kohta	Vähemalt 2 iga kokkupuuteperioodi kohta	Vähemalt 2 iga kokkupuuteperioodi kohta

Katsemudeli elemendid	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Töötlemisel kasutatavad annused ja pealekandmine	<u>Vedelikud ja viskoossed kemikaalid:</u> 50 ± 3 µl (131,6 µl/cm²) <u>Tahked kemikaalid:</u> 20 ± 2 mg (52,6 mg/cm²) + 100 ± 5µl NaCl lahust (9 g/l) <u>Vahajad/kleepuvad kemikaalid:</u> 50 ± 2 mg (131,6 mg/cm²) nailonvõrgu abil	<u>Vedelikud:</u> 50 µl (79,4 µl/cm²) nailonvõrgu abil või ilma selleta <i>Eelkatsega kontrollitakse, kas uuritav kemikaal sobib kasutamiseks koos nailonvõrguga</i> <u>Pooltahked kemikaalid:</u> 50 µl (79,4 µl/cm²) <u>Tahked kemikaalid:</u> 25 µl H₂O (või vajaduse korral rohkem) + 25 mg (39,7 mg/cm²) <u>Vahad:</u> koe pinnale, mida on niisutatud 15 µl H₂O-ga, asetatakse lame ketasjas tükk läbimõõduga umbes 8 mm	<u>Vedelikud ja viskoossed kemikaalid:</u> 40 ± 3µl (80 µl/cm²) nailonvõrgu abil <i>Eelkatsega kontrollitakse, kas uuritav kemikaal sobib kasutamiseks koos nailonvõrguga</i> <u>Tahked kemikaalid:</u> 20 ± 2µl H₂O + 20 ± 3 mg (40 mg/cm²) <u>Vahajad/kleepuvad kemikaalid:</u> 20 ± 3 mg (40 mg/cm²) nailonvõrgu abil	<u>Vedelikud:</u> 50 µl (83,3 µl/cm²) nailonvõrgu abil <i>Eelkatsega kontrollitakse, kas uuritav kemikaal sobib kasutamiseks koos nailonvõrguga</i> <u>Pooltahked kemikaalid:</u> 50 µl (83,3 µl/cm²) <u>Tahked kemikaalid:</u> 25 mg (41,7 mg/cm²) + 25 µl H₂O (või vajaduse korral rohkem) <u>Vahajad kemikaalid:</u> koe pinnale, mida on niisutatud 15 µl H₂O-ga, asetatakse lame küpsisekujuline tükk läbimõõduga umbes 8 mm

Katsemudeli elemendid	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Eelkontroll MTT otsese redutseerimise suhtes	50 µl (vedelikud) või 20 mg (tahkised) + 2 ml MTT lahust (0,3 mg/ml); inkubeeritakse 180 ± 5 minutit 37 °C juures atmosfääris, mis sisaldab 5 % CO₂ ja mille suhteline niiskus on 95 % → Kui lahus muutub siniseks/lillaks, tuleks kasutada veega surmatud kohandatud kontrollkudesid	50 µl (vedelikud) või 25 mg (tahkised) + 1 ml MTT lahust (1 mg/ml); inkubeeritakse 60 minutit 37 °C juures atmosfääris, mis sisaldab 5 % CO₂ ja mille suhteline niiskus on 95 % → Kui lahus muutub siniseks/lillaks, tuleks kasutada külmutamise teel surmatud kohandatud kontrollkudesid	40 µl (vedelikud) või 20 mg (tahkised) + 1 ml MTT lahust (1 mg/ml); inkubeeritakse 180 ± 15 minutit 37 °C juures atmosfääris, mis sisaldab 5 % CO₂ ja mille suhteline niiskus on 95 % → Kui lahus muutub siniseks/lillaks, tuleks kasutada külmutamise teel surmatud kohandatud kontrollkudesid	50 µl (vedelikud) või 25 mg (tahkised) + 1 ml MTT lahust (1 mg/ml); inkubeeritakse 60 minutit 37 °C juures atmosfääris, mis sisaldab 5 % CO₂ ja mille suhteline niiskus on 95 % → Kui lahus muutub siniseks/lillaks, tuleks kasutada külmutamise teel surmatud kohandatud kontrollkudesid
Eelkontroll värvusest tuleneva segava mõju suhtes	10 µl (vedelikud) või 10 mg (tahkised) + 90 µl H₂O; inkubeeritakse segamisega 15 minutit toatemperatuuril → Kui lahus värvub, tuleks kasutada kohandatud kontrollina eluskudesid	50 µl (vedelikud) või 25 mg (tahkised) + 300 µl H₂O; inkubeeritakse 60 minutit 37 °C juures atmosfääris, mis sisaldab 5 % CO₂ ja mille suhteline niiskus on 95 % → Kui lahus värvub, tuleks kasutada kohandatud kontrollina eluskudesid	40 µl (vedelikud) või 20 mg (tahkised) + 300 µl H₂O; inkubeeritakse segamisega 60 minutit toatemperatuuril → Kui uuritav kemikaal on värviline, tuleks kasutada kohandatud kontrollina eluskudesid	50 µl (vedelikud) või 25 mg (tahkised) + 300 µl H₂O; inkubeeritakse 60 minutit 37 °C juures atmosfääris, mis sisaldab 5 % CO₂ ja mille suhteline niiskus on 95 % → Kui lahus värvub, tuleks kasutada kohandatud kontrollina eluskudesid

Katsemudeli elemendid	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Kokkupuuteperioodid ja -temperatuurid	3 minutit, 60 minutit (± 5 minutit) ja 240 minutit (± 10 minutit) ventileeritud kapis toatemperatuuril (18–28 °C)	3 minutit toatemperatuuril ja 60 minutit 37 °C juures atmosfääris, mis sisaldab 5 % CO ₂ ja mille suhteline niiskus on 95 %	3 minutit toatemperatuuril ja 60 minutit 37 °C juures atmosfääris, mis sisaldab 5 % CO ₂ ja mille suhteline niiskus on 95 %	3 minutit toatemperatuuril ja 60 minutit 37 °C juures atmosfääris, mis sisaldab 5 % CO ₂ ja mille suhteline niiskus on 95 %
Loputamine	25 ml 1 × PBS-ga (2 ml loputuskorra kohta)	20 korda 1 × PBS-i katkematu nõrga joa all	20 korda 1 × PBS-i katkematu nõrga joa all	20 korda 1 × PBS-i katkematu nõrga joa all
Negatiivne kontroll	50 µl NaCl lahust (9 g/l) Kasutatakse iga kokkupuuteperioodi puhul	50 µl H ₂ O Kasutatakse iga kokkupuuteperioodi puhul	40 µl H ₂ O Kasutatakse iga kokkupuuteperioodi puhul	50 µl H ₂ O Kasutatakse iga kokkupuuteperioodi puhul
Positiivne kontroll	50 µl jää-äädikhapet Kasutatakse üksnes neljatunnisel inkubeerimisel	50 µl 8 N KOH Kasutatakse iga kokkupuuteperioodi puhul	40 µl 8 N KOH Kasutatakse üksnes ühetunnisel inkubeerimisel	50 µl 8 N KOH Kasutatakse iga kokkupuuteperioodi puhul
MTT lahus	2 ml kontsentratsiooniga 0,3 mg/ml	300 µl kontsentratsiooniga 1 mg/ml	300 µl kontsentratsiooniga 1 mg/ml	300 µl kontsentratsiooniga 1 mg/ml

Katsemudeli elemendid	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
MTT-ga inkubeerimise aeg ja temperatuur	180 minutit (± 15 minutit) 37 °C juures atmosfääris, mis sisaldab 5 % CO ₂ ja mille suhteline niiskus on 95 %	180 minutit 37 °C juures atmosfääris, mis sisaldab 5 % CO ₂ ja mille suhteline niiskus on 95 %	180 minutit (± 15 minutit) 37 °C juures atmosfääris, mis sisaldab 5 % CO ₂ ja mille suhteline niiskus on 95 %	180 minutit 37 °C juures atmosfääris, mis sisaldab 5 % CO ₂ ja mille suhteline niiskus on 95 %
Ekstraheerimise ahusti	500 µl hapestatud isopropanooli (0,04 N HCl isopropanoolis) (eraldatud kude on lahusega täielikult kaetud)	2 ml isopropanooli (ekstraheeritakse inserdi üla- ja alapoolelt)	1,5 ml isopropanooli (ekstraheeritakse inserdi üla- ja alapoolelt)	2 ml isopropanooli (ekstraheeritakse inserdi üla- ja alapoolelt)
Ekstraheerimis periood ja -temperatuur	Öö läbi toatemperatuuril valguse eest kaitsuna	Loksutamisetä öö läbi toatemperatuuril või loksutamisega (~120 pööret minutis) 120 minutit toatemperatuuril	Loksutamisetä öö läbi toatemperatuuril või loksutamisega (~120 pööret minutis) 120 minutit toatemperatuuril	Loksutamisetä öö läbi toatemperatuuril või loksutamisega (~120 pööret minutis) 120 minutit toatemperatuuril
Optilise tiheduse mõõtmine	570 nm (545–595 nm), võrdlusfiltrita	570 nm (või 540 nm), võrdlusfiltrita	570 nm (540–600 nm), võrdlusfiltrita	540–570 nm, võrdlusfiltrita
Kudede kvaliteedikontroll	18-tunnine töötlus SDS-ga 1,0 mg/ml ≤ IC ₅₀ ≤ 3,0 mg/ml	Töötlemine 1 % Triton X-100-ga 4,08 tundi ≤ ET ₅₀ ≤ 8,7 tundi	Töötlemine 1 % Triton X-100-ga 4,0 tundi ≤ ET ₅₀ ≤ 10,0 tundi	Töötlemine 1 % Triton X-100-ga 2,0 tundi ≤ ET ₅₀ ≤ 7,0 tundi

Katsemudeli elemendid	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Katse nõuetekohasuse kriteeriumid	1. Negatiivse kontrolliga (NaCl) töödeldud paralleelsete koeproovidega saadud optilise tiheduse keskvärtus peaks iga kokkupuuteperioodi puhul jääma vahemikku 0,6–1,5 2. Positiivse kontrolliga (jäääädikhape) 4 tunni vältel töödeldud paralleelsetes koeproovides täheldatud eluvõimelisuse keskvärtus, väljendatuna protsentuaalse osakaaluna negatiivse kontrolliga saadud väärtusest, peaks olema $\leq 20\%$ 3. Kahes paralleelses koeproovis täheldatud eluvõimelisuse erinevus ei tohiks eluvõimelisuse vahemikus 20–100 % ja optilise tiheduse väärtustel $\geq 0,3$ olla suurem kui 30 %	1. Negatiivse kontrolliga (H₂O) töödeldud paralleelsete koeproovidega saadud optilise tiheduse keskvärtus peaks iga kokkupuuteperioodi puhul jääma vahemikku 0,8–2,8 2. Positiivse kontrolliga (8 N KOH) 1 tunni vältel töödeldud paralleelsetes koeproovides täheldatud eluvõimelisuse keskvärtus, väljendatuna protsentuaalse osakaaluna negatiivse kontrolliga saadud väärtusest, peaks olema $< 15\%$ 3. Paralleelsete koeproovidega saadud tulemuste variatsioonikordaja peaks eluvõimelisuse vahemikus 20–100 % olema $\leq 30\%$	1. Negatiivse kontrolliga (H₂O) töödeldud paralleelsete koeproovidega saadud optilise tiheduse keskvärtus peaks iga kokkupuuteperioodi puhul jääma vahemikku 0,8–3,0 2. Positiivse kontrolliga (8 N KOH) 1 tunni vältel (ja vajaduse korral 4 tunni vältel) töödeldud paralleelsetes koeproovides täheldatud eluvõimelisuse keskvärtus, väljendatuna protsentuaalse osakaaluna negatiivse kontrolliga saadud väärtusest, peaks olema $< 15\%$ 3. Kahes paralleelses koeproovis täheldatud eluvõimelisuse erinevus ei tohiks eluvõimelisuse vahemikus 20–100 % ja optilise tiheduse väärtustel $\geq 0,3$ olla suurem kui 30 %	1. Negatiivse kontrolliga (H₂O) töödeldud paralleelsete koeproovidega saadud optilise tiheduse keskvärtus peaks iga kokkupuuteperioodi puhul jääma vahemikku 0,8–2,8 2. Positiivse kontrolliga (8 N KOH) 1 tunni vältel töödeldud paralleelsetes koeproovides täheldatud eluvõimelisuse keskvärtus, väljendatuna protsentuaalse osakaaluna negatiivse kontrolliga saadud väärtusest, peaks olema $< 20\%$ 3. Kahes paralleelses koeproovis täheldatud eluvõimelisuse erinevus ei tohiks eluvõimelisuse vahemikus 20–100 % ja optilise tiheduse väärtustel $\geq 0,3$ olla suurem kui 30 %

3. liide

KATSEMUDELITE USALDUSVÄÄRSUS ALAMKATEGOORIATESSE LIIGITAMISEL

Allpool tabelis on esitatud kõnealust nelja katsemudelit iseloomustavad tulemusnäitajad, mis on arvatud lähtuvalt nende mudelite väljatöötajate katseandmetest 80 analüüsitud kemikaali kohta. Arvutused on teinud OECD sekretariaat ning need on läbi vaadanud ja heaks kiitnud asjaomane ekspertide allrühm (21, 23).

Katsemudelid EpiSkin™, EpiDerm™, SkinEthic™ ja epiCS® võimaldavad liigitamist alamkategoriatesse (st 1A alamkategoriasse, 1B ja 1C ühiskategoriasse ning mitesöövitavaks).

Nimetatud nelja katsemudelit iseloomustavad tulemusnäitajad, üleklassifitseerimise ja alaklassifitseerimise määrad ning täpsus (ennustusjõud), mis põhinevad andmetel 80 kemikaali kohta, millest igahüte on iga katsemudeli puhul analüüsitud 2 või 3 mõõtmistsükliis, on järgmised.

STATISTILISED ANDMED KÕIKIDE ANALÜÜSITUD KEMIKAALIDE PUHUL TEHTUD PROGNOOSIDE KOHTA				
(80 kemikaali analüüsi mudeli epiCS® puhul 2 sõltumatus mõõtmistsükliis ning mudelite EpiDerm™ SCT, EpiSkin™ ja SkinEthic™ RHE puhul 3 sõltumatus mõõtmistsükliis, st saadi vastavalt 159* või 240 liigitamistulemust)				
* Ühte kemikaali analüüsi mudeli epiCS® puhul vaid korra, kuna see ei olnud enam kättesaadav (23)				
	EpiSkin™	EpiDerm™	SkinEthic™	epiCS®
Üleklassifitseerimine:				
1B ja 1C ühiskategoria kemikaali	21,50 %	29,0 %	31,2 %	32,8 %
MS kemikaali üleklassifitseerimine 1B ja 1C	20,7 %	23,4 %	27,0 %	28,4 %
MS kemikaali üleklassifitseerimine 1A	0,00 %	2,7 %	0,0 %	0,00 %
Söövitavaks kemikaaliks üleklassifitseerimine	20,7 %	26,1 %	27,0 %	28,4 %
Üldine üleklassifitseerimise määr (kõikide kategooriate lõikes)	17,9 %	23,3 %	24,5 %	25,8 %
Alaklassifitseerimine:				
1A alamkategoria kemikaali	16,7 %	16,7 %	16,7 %	12,5 %
1A alamkategoria kemikaali	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
1B ja 1C ühiskategoria kemikaali	2,2 %	0,00 %	7,5 %	6,6 %
Üldine alaklassifitseerimise määr (kõikide kategooriate lõikes)	3,3 %	2,5 %	5,4 %	4,4 %

Õigesti liigitamine:				
Õigesti liigitamine 1A alamkategooriasse	83,3 %	83,3 %	83,3 %	87,5 %
Õigesti liigitamine 1B ja 1C ühiskategooriasse	76,3 %	71,0 %	61,3 %	60,7 %
Õigesti liigitamine MS-ks	79,3 %	73,9 %	73,0 %	71,62 %
Üldine täpsus	78,8 %	74,2 %	70 %	69,8 %

MS – mittesöövitav

4. liide

HPLC/UPLC-spektrofotomeetriasüsteemi nõuetekohasuse kriteeriumid ja põhinäitajad inimese rekonstrueeritud marrasknahast ekstraheeritud MTT formasaani määramise võimaldamiseks

Näitaja	USA Toidu- ja Ravimiameti suunistel põhinev katse-eeskiri (37, 38)	Nõuetekohasuse kriteeriumid
Selektiivsus	Isopropanooli, eluskudede tühiproovi (isopropanooliekstrakt inimese rekombineeritud marrasknaha eluskudedest, mida ei ole ühelgi viisil töödeldud) ja surmatud kude tühiproovi (isopropanooliekstrakt inimese rekombineeritud marrasknaha surmatud kudedest, mida ei ole ühelgi viisil töödeldud) analüüsimine	Segavale signaalile vastav pindala on $\leq 20\%$ LLOQ-le ¹ vastavast pindalast
Kordustäpsus	Kvaliteedikontrolli kemikaali lahused (st MTT formasaan kontsentratsioonis 1,6 µg/ml, 16 µg/ml ja 160 µg/ml) isopropanoolis ($n = 5$)	Variatsioonikordaja on LLOQ puhul $\leq 15\%$ või $\leq 20\%$
Mõõtetäpsus	Kvaliteedikontrolli kemikaali lahused isopropanoolis ($n = 5$)	Hälve on $\leq 15\%$ või LLOQ puhul $\leq 20\%$
Maatriksiefekt	Kvaliteedikontrolli kemikaali lahused eluskude tühiproovis ($n = 5$)	$85\% \leq$ maatriksiefekt $\leq 115\%$
Ülekandumine	Isopropanooli analüüsimine pärast ULOQ ² puhul kasutatavat standardit	Segavale signaalile vastav pindala on $\leq 20\%$ LLOQ-le vastavast pindalast
Reprodutseeritavus (samal päeval)	3 sõltumatut kaliibrimiskõverat, mis põhinevad MTT formasaani kuuel järjestikusel 1 : 3 lahjendusel isopropanoolis alates ULOQ-st, st kontsentratsioonist 200 µg/ml; kvaliteedikontrolli kemikaali lahused isopropanoolis ($n = 5$)	Kaliibrimiskõverad: hälve on $\leq 15\%$ või LLOQ puhul $\leq 20\%$
Reprodutseeritavus (eri päevade lõikes)	1. päev: 1 kaliibrimiskõver ja kvaliteedikontrolli kemikaali lahused isopropanoolis ($n = 3$) 2. päev: 1 kaliibrimiskõver ja kvaliteedikontrolli kemikaali lahused isopropanoolis ($n = 3$) 3. päev: 1 kaliibrimiskõver ja kvaliteedikontrolli kemikaali lahused isopropanoolis ($n = 3$)	Kvaliteedikontrolli proovid: hälve on $\leq 15\%$ ja variatsioonikordaja $\leq 15\%$
MTT formasaani lühiajaline püsivus inimese rekonstrueeritud marrasknaha koeekstraktis	Kvaliteedikontrolli kemikaali lahused eluskude tühiproovis ($n = 3$); analüüsitakse valmistamise päeval ja pärast 24-tunnist toatemperatuuril säilitamist	Hälve on $\leq 15\%$
MTT formasaani pikaajaline püsivus inimese rekonstrueeritud marrasknaha koeekstraktis (vajaduse korral)	Kvaliteedikontrolli kemikaali lahused eluskude tühiproovis ($n = 3$); analüüsitakse valmistamise päeval ja pärast mitmepäevast säilitamist kindlaksmääratud temperatuuril (nt 4 °C, -20 °C, -80 °C)	Hälve on $\leq 15\%$

¹ LLOQ – alumine määramispiir, mis määratluse kohaselt vastab kudede eluvõimelisuse määrale 1–2 %; st 0,8 µg/ml.

² ULOQ – ülemine määramispiir, millele vastav kontsentratsioon on määratluse kohaselt vähemalt kaks korda suurem kui MTT formasaani suurim eeldatav kontsentratsioon negatiivsetest kontrollproovidest saadud isopropanooliekstraktides; st 200 µg/ml.“

7) B osas asendatakse peatükk B.46 järgmisega:

„B.46. *IN VITRO* NAHAÄRRITUS: INIMESE REKONSTRUEERITUD MARRASKNAHAL PÕHINEV KATSEMEETOD

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 439 (2015). Nahaärrituse all mõistetakse pöörduva nahakahjustuse tekkimist pärast kuni 4 tunni pikkust uuritava kemikaaliga töötlemist, nagu on määratletud ÜRO ühtses ülemaailmses kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteemis (GHS) (1) ning Euroopa Liidu (EL) määruses nr 1272/2008, milles käsitletakse ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist (edaspidi „CLP-määrus“)¹. Käesoleva katsemeetodi näol on tegemist *in vitro* meetodiga, mida võib kasutada ÜRO GHSi / CLP-määruse kohasesse 2. kategooriasse kuuluvate ärritavate kemikaalidega (ainete ja segudega) seotud ohu tuvastamiseks (2). Piirkondades, kus ei kasutata ÜRO GHSi kohast vabatahtlikult kohaldatavat 3. kategooriat (nõrgalt ärritavad kemikaalid), võib käesolevat katsemeetodit kasutada ka liigitamata kemikaalide toime kindlakstegemiseks. Sellest tulenevalt võib käesolevat katsemeetodit sõltuvalt kohaldatavast õigusraamistikust ja klassifitseerimissüsteemist kasutada kemikaalide nahka ärritava toime kindlakstegemisel kas eraldi meetodina *in vivo* nahaärrituse hindamise meetodite asendamiseks või katsestrateegia raames kohaldatava osalist asendamist võimaldava meetodina (3).
2. Nahaärrituse hindamisel on tavapäraselt kasutatud laboriloomi (katsemeetod B.4, mis on samaväärne algselt 1981. aastal vastu võetud ning aastatel 1992, 2002 ja 2015 muudetud OECD katsejuhendiga nr 404) (4). Söövitava toime hindamiseks on vastu võetud kolm valideeritud *in vitro* katsemeetodit: katsemeetodid B.40 (samaväärne OECD katsejuhendiga nr 430), B.40b (samaväärne OECD katsejuhendiga nr 431) ja B.65 (samaväärne OECD katsejuhendiga nr 435) (5, 6, 7). OECD juhenddokumendis nahasöövituse ja -ärrituse puhul kasutatava katsete tegemist ja hindamist käsitleva ühtse lähenemisviisi kohta kirjeldatakse mitut moodulit, milles teabeallikad ja analüüsivahendid on rühmitatud, ning i) antakse suuniseid, kuidas lõimida ja kasutada olemasolevaid katse- ja muid andmeid kemikaalide võimaliku nahka ärritava ja nahka söövitava toime

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

hindamiseks ja ii) pakutakse välja lähenemisviis juhuks, kui on vaja teha täiendavaid katseid (3).

3. Käesolevas katsemeetodis on käsitletud inimintervisega seotud lõppnäitajana nahaärritust. Selle meetodi puhul lähtutakse *in vitro* katsesüsteemist, mis põhineb inimese rekonstrueeritud marrasknahal, mis on oma biokeemiliste ja füsioloogiliste omaduste poolest väga sarnane inimese naha pealmiste kihtidega, st marrasknahaga. Inimese rekonstrueeritud marrasknahal põhinevas katsesüsteemis kasutatakse rakkude allikana inimese transformeerumata keratinotsüüte, mille abil luuakse representatiivsete histoloogiliste omaduste ja representatiivse rakulise ülesehitusega rekonstrueeritud marrasknaha mudel. Vastavalt OECD juhenddokumendis nr 34 sätestatud põhimõtetele on kehtestatud tulemuslikkuse standardid, mis hõlbustavad inimese rekonstrueeritud marrasknahal põhinevate sarnaste ja muudetud katsemeetodite valideerimist ja hindamist (8, 9). Vastavasisuline katsejuhend võeti algselt vastu 2010. aastal ja seda ajakohastati 2013. aastal, et lisada täiendavad inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudelid, samuti 2015. aastal, et lisada viide juhenddokumendile katsete tegemist ja hindamist käsitleva ühtse lähenemisviisi kohta ning võimaldada ühe eluvõimelisuse mõõtmiseks sobiva alternatiivse meetodi kasutuselevõttu.
4. Praeguseks on viidud läbi valideerimiseelsed, optimeerimis- ja valideerimisuuringud nelja turul kättesaadava *in vitro* katsemudeliga (10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28), mille puhul kasutatakse inimese rekonstrueeritud marrasknahal põhinevat katsesüsteemi (tundlikkus 80 %, spetsiifilisus 70 % ja täpsus 75 %). Kõnealust nelja katsemudelit on kirjeldatud käesolevas katsemeetodis ja need on loetletud 2. liites, kus on ühtlasi esitatud teave vastavate meetodite valideerimiseks kasutatud valideerimisuuringute liigi kohta. Nagu on märgitud 2. liites, on käesoleva katsemeetodi ja tulemuslikkuse standardite (8) väljatöötamiseks kasutatud valideeritud standardmeetodit (VSM).
5. OECD otsuse kohane andmete vastastikune tunnustamine on tagatud üksnes selliste katsemudelite puhul, mis on valideeritud vastavuses tulemuslikkuse standarditega (8), ning üksnes juhul, kui OECD on sellised mudelid läbi vaadanud ja vastu võtnud. *In vitro* nahaärrituse hindamise meetoditega saadavaid katsetulemusi käsitlevate siseriiklike nõuete järgimiseks võib kasutada ükskõik millist käesolevasse katsemeetodisse ja vastavasse OECD katsejuhendisse lisatud katsemudelit ning seejuures saadakse kasu andmete vastastikusest tunnustamisest.
6. Käesolevas dokumendis kasutatud mõistete määratlused on esitatud 1. liites.

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

7. Nagu nähtub inimese rekonstrueeritud marrasknahal põhinevate katsemeetodite hindamiseks ja iseloomustamiseks läbi viidud täismahus prospektiivsest valideerimisuuringust (16), on üks käesoleva katsemeetodiga seotud piirangutest see, et meetod ei võimalda liigitada kemikaale vabatahtlikult kohaldatavasse ÜRO GHSi kohasesse 3. kategooriasse (nõrgalt ärritavad kemikaalid) (1). Sellest tulenevalt määratakse käesoleva katsemeetodi kasutusviis kindlaks asjaomases liikmesriigis kohaldatava õigusraamistikuga. ELis ei ole 3. kategooriat CLP-määruses kasutusele võetud. Ühekordse nahakaudse kokkupuute järel nahale avalduva lokaalse toime täielikku hindamist on kirjeldatud OECD juhenddokumendis katsete tegemist ja hindamist käsitleva ühtse lähenemisviisi kohta (3). Inimese naha kasutamine toimub mõistagi kooskõlas asjaomases riigis kehtivate ja rahvusvaheliste eetiliste tõekspidamiste ja tingimustega.
8. Käesolevas katsemeetodis on käsitletud inimintervisega seotud lõppnäitajana nahaärritust. Ehkki käesolev katsemeetod ei võimalda saada piisavat teavet nahasöövituse kohta, tuleks tähele panna, et nahasöövitust käsitlev katsemeetod B.40b (samaväärne OECD katsejuhendiga nr 431) põhineb samal inimese rekonstrueeritud marrasknaha katsesüsteemil, ehkki seal kasutatakse teistsugust katse-eeskirja (6). Käesolev katsemeetod põhineb inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudelitel, mille puhul kasutatakse inimese keratinotsüüte ja mis seega kajastavad huvipakkuva liigi sihtelundi omadusi *in vitro*. Peale selle hõlmab see meetod otseselt *in vivo* nahaärrituse puhul täheldatava põletikukaskaadi/toimemehhanismi algetappi (raku- ja koekahjustus, mille tulemusena tekib lokaalne trauma). Käesoleva katsemeetodi valideerimiseks uuriti paljusid eri kemikaale; valideerimisuuringu andmebaasis on kokku 58 kemikaali (16, 18, 23). Meetodit saab kasutada tahkete ainete, vedelike, pooltahkete ainete ja vahade puhul. Vedelikud võivad olla vesilahused või muud vedelikud; tahked ained võivad olla vees lahustuvad või lahustumatud. Võimaluse korral tuleks tahked ained enne kasutamist peeneks pulbriks jahvatada; proovi muul viisil eeltöötlemine ei ole vajalik. Gaase ja aerosooli ei ole valideerimisuuringu raames veel hinnatud (29). Ehkki on võimalik, et neidki saab uurida inimese rekonstrueeritud marrasknaha kasutamisel põhineva tehnoloogia abil, ei võimalda praegune katsemeetod gaaside ega aerosoolide uurimist.
9. Kui soovitakse saada kavandatud regulatiivsel eesmärgil andmeid segu kohta, tuleks enne katsemeetodi kasutamist kaaluda, kas ja kuidas see võimaldab saada kõnealusele eesmärgile vastavaid asjakohaseid tulemusi. Selline kaalumine ei ole vajalik, kui asjaomase segu hindamine on regulatiivse nõudega ette nähtud. Ent kuna segud kuuluvad paljudesse eri kategooriatesse ja on eri koostisega ning nende kasutamise kohta katses on praegu piiratud hulgal teavet, tuleks juhul, kui on võimalik tõendada, et katsemeetodit ei saa teatud kindla kategooria segude puhul kasutada (nt strateegia abil, mille on 2012. aastal välja pakkunud Eskes *et al.* (30)), hoiduda selle kasutamisest sellise kategooria segude puhul. Samamoodi tuleks olla ettevaatlik, kui teatud kindlasse klassi kuuluvate või

teatavate füüsikalis-keemiliste omadustega kemikaalide puhul täheldatakse, et käesolevat katsemeetodit ei saa nende uurimiseks kohaldada.

10. Uuritavad kemikaalid, mis neelavad valgust samas vahemikus kui MTT formasaan, ning vitaalvärvaine MTT otsest MTT formasaaniks redutseerumist põhjustada võivad uuritavad kemikaalid võivad segada rakkude eluvõimelisuse mõõtmist ja tingida vajaduse kasutada tulemuste korrigeerimiseks kohandatud kontrolle (vt punktid 28–34).
11. Kui uuritava kemikaali liigitamisel saadakse ühene tulemus, piisab ühest mõõtmistsüklist, kus on kasutatud kolme paralleelset koeproovi. Ebaselgete tulemuste puhul – näiteks kui paralleelproovidega saadud mõõtmisandmed lahknevad ja/või keskmine eluvõimelisus on $50 \pm 5 \%$ – tuleks kaaluda vajadust viia läbi veel üks mõõtmistsükkel ning esimeses kahes mõõtmistsükli saadud tulemuste lahknevuse korral veel kolmaski mõõtmistsükkel.

KATSE PÕHIMÕTE

12. Uuritav kemikaal kantakse paiksest kolmemõõtmelisele inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudelile, mis koosneb inimese marrasknaha transformeerumata keratinotsüütidest, mida on kasvatatud nii, et need moodustavad inimese mitmekihilise tugevalt diferentseerunud marrasknaha mudeli. See koosneb korrastatud basaalkihist, ogakihist ja sõmerkihist ning mitmekihilisest sarvkihist, mis sisaldab rakkudevahelisi õhukesti lipiidikihte, kus on analoogselt *in vivo* koele esindatud peamiste lipiidiklasside lipiidid.
13. Kemikaali tekitatud nahaärritus, mis avaldub peamiselt punetuse ja tursena, on põhjustatud sellisest sündmuste kaskaadist, mis algab kemikaali läbitungimisega sarvkihist ning sellega kaasneda võiva sarvkihi aluste keratinotsüütide ja muude naharakkude kihtide kahjustumisega. Kahjustatud rakkudest võivad vabaneda põletikku vahendavad ained või sellised rakud võivad kutsuda esile põletikureaktsioonide kaskaadi, mis mõjutab ka pärisnaha rakke, eelkõige veresoonte strooma- ja endoteelirakke. Veresoonte laienemine ja endoteelirakkude läbilaskvuse suurenemine põhjustabki nähtava punetuse ja turse (29). Ehkki inimese rekonstrueeritud marrasknahal põhinevate katsemeetodite puhul puuduvad *in vitro* katsesüsteemis veresooned, hinnatakse nende meetoditega kõnealust kaskaadi vallandavaid sündmusi, näiteks raku- või koe kahjustust (16, 17), mille näitajana kasutatakse rakkude eluvõimelisust.
14. Inimese rekonstrueeritud marrasknahal põhinevates mudelites jälgitakse rakkude eluvõimelisuse hindamiseks vitaalvärvaine MTT (3-(4,5-dimetüültiasool-2-üül)-2,5-difenüültetrasooliumbromiid; tiasolüülsinine; CASi number: 298-93-1) ensümaatilist muundumist siniseks formasaansoolaks, mida mõõdetakse kvantitatiivselt pärast kudedest ekstraheerimist (31). Ärritavad kemikaalid tehakse kindlaks nende võime järgi vähendada rakkude eluvõimelisust nii palju, et see jääb allapoole kindlaksmääratud läviväärtust (ÜRO

GHSi / CLP-määruse kohase 2. kategooria kemikaalide puhul on see $\leq 50\%$). Kemikaalid, mille puhul rakkude eluvõimelisus on kindlaksmääratud lüüdväärtusest suurem (st $> 50\%$), võidakse olenevalt asjaomasest õigusraamistikust ja katsemeetodi kohaldatavusest tunnistada mitteärritavaks (kategoriseerimata) kemikaaliks.

PÄDEVUSE TÕENDAMINE

15. Enne käesoleva katsemeetodi kohasest neljast valideeritud katsemudelitest (2. liide) ükskõik millise regulaarset kasutamist tuleks labori tehnilise pädevuse tõendamiseks kasutada kümnet tabelis 1 loetletud pädevusainet. Kui näiteks mõni loetletud ainetest ei ole kättesaadav, võib kasutada mõnda muud ainet, mille kohta on olemas piisavad *in vivo* ja *in vitro* võrdlusandmed (nt võrdluskemikaalide loetelust (8) valitud ainet), ent üksnes juhul, kui kohaldatakse samu valikukriteeriume, nagu on kirjeldatud tabelis 1. Pädevuse tõendamiseks mõne muu aine kasutamine peaks olema põhjendatud.
16. Pädevuse tõendamise osana soovitatakse kasutajal pärast kudede saabumist kontrollida nende toimivust kaitsekihina vastavalt inimese rekonstrueeritud marrasknahal põhineva asjaomase mudeli tootja kirjeldusele. See on eriti oluline pärast kudede pikaajalist transporti või tarnet pika vahemaa taha. Pärast katsemeetodi edukat kasutuselevõttu ning selle kasutamises pädevuse omandamist ja selle tõendamist ei ole selline tavapärane kontrollimine enam vajalik. Meetodi regulaarse kasutamise korral soovitatakse siiski jätkata kaitsekihina toimivuse hindamist korrapäraste ajavahemike järel.

Tabel 1. Pädevusained¹

Aine	CASi nr	<i>In vivo</i> hindamistulemus ²	Füüsikaline olek	ÜRO GHSi kohane kategooria
KATEGORISEERIMATA AINED (ÜRO GHSi kohastesse kategooriatesse mittekuuluvad ained)				
Naftüüläädikhape	86-87-3	0	Tahkis	Kategoriseerimata
Isopropanool	67-63-0	0,3	Vedelik	Kategoriseerimata
Metüülstearaat	112-61-8	1	Tahkis	Kategoriseerimata
Heptüülbutüraat	5870-93-9	1,7	Vedelik	Kategoriseerimata (vabatahtlikult kohaldatav 3. kategooria) ³
Heksüülsalitsülaad	6259-76-3	2	Vedelik	Kategoriseerimata (vabatahtlikult kohaldatav 3. kategooria) ³
KATEGORISEERITUD AINED (ÜRO GHSi kohase 2. kategooria ained)				
3- <i>p</i> -kumenüül-2-metüülpropioonilaldehyd	103-95-7	2,3	Vedelik	2. kategooria
1-bromoheksaan	111-25-1	2,7	Vedelik	2. kategooria
Kaaliumhüdroksoid (5 % vesilahus)	1310-58-3	3	Vedelik	2. kategooria

1-metüül-3-fenüül-1-piperasiin	5271-27-2	3,3	Tahkis	2. kategooria
Heptanaal	111-71-7	3,4	Vedelik	2. kategooria

¹ Need pädevusained on valitud valideerimisuuringus kasutatud ainete hulgast järgmiste kriteeriumide alusel: i) asjaomased kemikaalid on turul kättesaadavad, ii) nendega saadud tulemused hõlmavad kogu Draize'i ärritavusskaalat (mitteärritavatest ainetest tugevalt ärritavate aineteni), iii) nende keemiline struktuur on täpselt teada, iv) need esindavad valideerimisel kasutatud kemikaalide funktsionaalklasse, v) nendega on saadud eri katsetes ja eri laborites reprodutseeritavad *in vitro* tulemused, vi) need on *in vitro* tingimustes õigesti liigitatud ning vii) need ei ole äärmiselt mürgised (nt kantserogeensed või reproduktiivtoksilised) ja nende kõrvaldamise kulud ei ole liiga suured.

² Katsemeetodiga B.4 (4) saadud *in vivo* hindamistulemus.

³ Käesoleva katsemeetodi raames käsitatakse ÜRO GHSi kohase vabatahtlikult kohaldatava 3. kategooria kemikaale (nõrgalt ärritavad kemikaalid) (1) kategoriseerimata kemikaalidena.

KATSE KÄIK

17. Allpool on esitatud inimese rekonstrueeritud marrasknahal põhineva, nahaärrituse hindamiseks kasutatava katsemeetodi elementide ja katse käigu kirjeldus (3. liites on esitatud ka iga katsemudeliga seotud parameetrid). Standardne töökord käesoleva katsemeetodi kohase nelja mudeli rakendamiseks on leitav kirjandusest (32, 33, 34, 35).

INIMESE REKONSTRUEERITUD MARRASKNAHAL PÕHINEVA KATSEMEETODI ELEMENDID

Üldtingimused

18. Epiteelkoe rekonstrueerimiseks tuleks kasutada inimese transformeerumata keratinotsüüte. Talitlusvõimelise sarvkihi all peaks olema mitu kihti eluvõimelisi epiteelirakke (basaalkiht, ogakiht ja sõmerkiht). Sarvkiht peaks olema mitmekihiline ja sisaldama selliseid vajalikke lipiide, et moodustuks funktsionaalne kaitsekiht, mis suudab takistada tsütotoksiliste võrdluskemikaalide, näiteks naatriumdodetsüülsulfaadi (SDS) või Triton X-100 kiiret läbitungimist. Nimetatud kaitsekihina toimimist tuleks tõendada; selle hindamiseks võib teha kindlaks kontsentratsiooni, mille juures võrdluskemikaal vähendab kindlaksmääratud kokkupuuteaja vältel kudede eluvõimelisust 50 % võrra (IC₅₀), või määrata kokkupuuteaja, mille vältel võrdluskemikaal vähendab teatud kindla kontsentratsiooni juures kudede eluvõimelisust 50 % võrra (ET₅₀). Kasutatav inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudel peaks olema selline, et aine ei saaks jõuda eluskoeni sarvkihti läbimata, kuna vastasel korral ei ole nahakaudse kokkupuute mudeliga saadud tulemused usaldusväärsed. Kasutatav mudel ei tohiks olla saastunud bakterite, viiruste, mükoplasma ega seentega.

Funktsionaaltingimused

Eluvõimelisus

19. Eluvõimelisuse kvantifitseerimiseks kasutatakse MTT-põhist meetodit (31). Vitaalvärvaine MTT redutseeritakse inimese rekonstrueeritud marrasknaha eluvõimelistes rakkudes siniseks sadestuvaks MTT formasaaniks, mis ekstraheeritakse seejärel koest isopropanooli (või muu sarnase lahusti) abil. Ekstraheerimiseks kasutatava lahusti enda optiline tihedus peaks olema piisavalt väike, st $< 0,1$. Ekstraheeritud MTT formasaani kvantifitseerimiseks võib kasutada kas tavapärasest neelduvuse (optilise tiheduse) mõõtmist või HPLC/UPLC-spektrofotomeetriat (36). Inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudeli kasutajad peaksid tagama, et mudeli iga kasutatav partii vastab negatiivse kontrolli kindlaksmääratud kriteeriumidele. Nahaärrituse hindamiseks kasutatava katsemeetodi kohastes tingimustes saadavate negatiivse kontrolli optilise tiheduse väärtuste lubatud vahemiku (ülem- ja alampiiri) määrab kindlaks asjaomase inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudeli väljatöötaja/tarnija. Käesoleva katsemeetodiga hõlmatud, inimese rekonstrueeritud marrasknahal põhineva nelja valideeritud katsemudeli puhul lubatud väärtusevahemikud on esitatud tabelis 2. HPLC/UPLC-spektrofotomeetria kasutaja peaks negatiivse kontrolli vastuvõetavuse kriteeriumina kasutama tabelis 2 negatiivse kontrolli kohta esitatud optilise tiheduse väärtusevahemikku. Tuleks dokumentaalselt tõendada, et negatiivse kontrolliga töödeldud koed on katses kasutatava kokkupuuteperioodi kestel kultuuris stabiilsed (nende eluvõimelisuse näitajad on sarnased).

Tabel 2. Käesoleva katsemeetodiga hõlmatud katsemudelite puhul lubatud väärtusevahemikud negatiivse kontrolli optilise tiheduse jaoks

	Vastuvõetavate väärtuste alampiir	Vastuvõetavate väärtuste ülempiir
EpiSkin™ (SM)	$\geq 0,6$	$\leq 1,5$
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	$\geq 0,8$	$\leq 2,8$
SkinEthic™ RHE	$\geq 0,8$	$\leq 3,0$
LabCyte EPI-MODEL24 SIT	$\geq 0,7$	$\leq 2,5$

Toimimine kaitsekihina

20. Sarvkiht ja selle lipiidne koostis peavad olema sellised, et takistada tsütotoksiliste võrdluskemikaalide, näiteks SDSi või Triton X-100 kiiret läbitungimist; seda hinnatakse IC₅₀ või ET₅₀ alusel (tabel 3).

Morfoloogia

21. Tuleks esitada asjaomase inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudeli histoloogilise analüüsi tulemused, et tõendada inimese marrasknahaga sarnaneva, muu hulgas mitmekihilist sarvkihti sisaldava struktuuri olemasolu.

Reprodutseeritavus

22. Tuleks tõendada katsemeetodiga saadavate positiivseid ja negatiivseid kontrolle iseloomustavate tulemuste reprodutseeritavust pikema aja jooksul.

Kvaliteedikontroll

23. Asjaomast inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudelit tuleks kasutada üksnes juhul, kui selle väljatöötaja/tarnija on tõendanud, et kasutatava mudeli iga partii vastab tootele kehtestatud kvaliteedikriteeriumidele, mille hulgas kõige olulisemad on eluvõimelisuse (punkt 19), kaitsekihina toimivuse (punkt 20) ja morfoloogiaga (punkt 21) seotud kriteeriumid. Sellised andmed tuleks esitada meetodi kasutajatele, et nad saaksid lisada selle teabe katseprotokollile. IC₅₀ või ET₅₀ väärtuste lubatud vahemiku (ülem- ja alampiiri) peaks kindlaks määrama inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudeli väljatöötaja/tarnija. Ärritavate kemikaalide liigituse usaldusväärse prognoosimise eesmärgil on vastuvõetavad üksnes sellised tulemused, mis on saadud kvaliteedikontrolli edukalt läbinud kudedega. Käesoleva katsemeetodiga hõlmatud nelja katsemudeli puhul lubatud väärtusevahemikud on esitatud tabelis 3.

Tabel 3. Käesoleva katsemeetodiga hõlmatud katsemudeleid käsitlevad partii kvaliteedikontrolli kriteeriumid

	Vastuvõetavate väärtuste alampiir	Vastuvõetavate väärtuste ülempiir
EpiSkin™ (SM) (18-tunnine töötlus SDS-ga) (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 tundi	ET ₅₀ = 8,7 tundi
SkinEthic™ RHE (1% Triton X-100) (34)	ET ₅₀ = 4,0 tundi	ET ₅₀ = 10,0 tundi
LabCyte EPI-MODEL24 SIT (18-tunnine töötlus SDS-ga) (35)	IC ₅₀ = 1,4 mg/ml	IC ₅₀ = 4,0 mg/ml

Uuritava kemikaali ja kontrollkemikaalidega töötlemine

24. Iga uuritava kemikaali ja kontrolli puhul tuleks igas mõõtmistsüklis kasutada vähemalt kolme paralleelproovi. Nii vedelate kui ka tahkete kemikaalide puhul tuleks töötlemiseks kasutada piisavat kogust uuritavat kemikaali, et marrasknaha pind saaks ühtlaselt kaetud, ent seejuures tuleks hoiduda lõpmata suure annuse kasutamisest; see tähendab, et kemikaali tuleks peale kanda koguses 26–83 µl/cm² või mg/cm² (vt 3. liide). Tahke kemikaali puhul tuleks marrasknaha pinda enne kemikaali pealekandmist niisutada deioniseeritud või destilleeritud veega, et parandada uuritava kemikaali kontakti marrasknaha pinnaga. Võimaluse korral tuleks tahket kemikaali kasutada peene pulbri kujul. Mõnel juhul võib ühtlasema jaotuse saavutamiseks kasutada nailonvõrku (vt 3. liide). Kokkupuuteperioodi lõppedes tuleks uuritav kemikaal veepõhise puhverlahuse või 0,9 % NaCl lahusega marrasknaha pinnalt hoolikalt maha pesta. Sõltuvalt kasutatavast inimese rekonstrueeritud marrasknaha katsemudelist on kokkupuuteperioodi pikkus 15–60 minutit ja inkubeerimistemperatuur 20–37 °C. Iga konkreetse katsemudeli jaoks tehakse kindlaks optimaalne kokkupuuteperiood ja -temperatuur, mis vastavad asjaomast mudelit iseloomustavatele eriomadustele (näiteks toimivus kaitsekihina) (vt 3. liide).

25. Igas mõõtmistsüklis tuleks kasutada paralleelset negatiivset ja positiivset kontrolli selle tõendamiseks, et kudede eluvõimelisus (negatiivse kontrolli puhul), toimivus kaitsekihina ja sellest sõltuv kudede tundlikkus (positiivse kontrolli puhul) jääb varasemate andmete alusel kindlaks määratud lubatud piiridesse. Soovitatav positiivne kontroll on SDSi 5 % vesilahus. Soovitatav negatiivne kontroll on vesi või fosfaadiga puhverdatud soolalahus (PBS).

Rakkude eluvõimelisuse mõõtmine

26. Vastavalt katse-eeskirjale on väga oluline, et eluvõimelisust mõõdetakse mitte vahetult pärast uuritava kemikaaliga kokku puutumist, vaid pärast töötlemisjärgset piisavalt pikaajalist puhtaks loputatud koe inkubeerimist värskes söötmes. Selline inkubeerimine võimaldab nõrgast tsütotoksilisest toimest taastuda ja selgel tsütotoksilisel toimel esile tulla. Käesoleva katsemeetodi aluseks olevatest inimese rekonstrueeritud marrasknahal põhinevatest katsemudelitest kahe puhul leiti meetodi optimeerimise käigus, et optimaalne töötlemisjärgne inkubeerimisperiood on 42 tundi (11, 12, 13, 14, 15).
27. Käesoleva katsemeetodi raames tuleks rakkude eluvõimelisuse mõõtmiseks kasutada kvantitatiivset MTT-põhist standardmeetodit. See sobib kasutamiseks kolmemõõtmelise kostruktuuri puhul. Koeproov asetatakse kolmeks tunniks sobiva kontsentratsiooniga (nt 0,3–1 mg/ml) MTT lahusesse. MTT muundatakse eluvõimelistes rakkudes siniseks formasaaniks. Sadestunud sinine formasaan ekstraheeritakse seejärel lahusti (näiteks isopropanooli või hapestatud isopropanooli) abil ning formasaani kontsentratsiooni määramiseks mõõdetakse lahuse optiline tihedus lainepikkusel 570 nm – seejuures kasutatakse filtrit ribalaiusega $kuni \pm 30 \text{ nm}$ – või rakendatakse HPLC/UPLC-spektrofotomeetriat (vt punkt 34) (36).
28. Uuritava kemikaali optilised omadused või keemiline reageerimine MTTga (näiteks võib kemikaal takistada värvuse teket või põhjustada selle kadu või hoopis selle avaldumist) võivad määramist segada ja põhjustada vigu eluvõimelisuse hindamisel. See võib juhtuda, kui uuritavat kemikaali ei ole loputamise teel koepinnalt täielikult eemaldatud või kui see on tunginud marrasknahka. Kui uuritav kemikaal reageerib otse MTTga (näiteks redutseerib MTTd), on värviline või muutub värviliseks koega kokku puutumisel, tuleks kemikaali põhjustatud, eluvõimelisuse mõõtmist segava mõju tuvastamiseks ja tulemuste korrigeerimiseks kasutada täiendavaid kontrole (vt punktid 29 ja 33). Üksikasjalik kirjeldus selle kohta, kuidas korrigeerida tulemusi MTT otsese redutseerimise ja värvust muutvate ainete mõju suhtes, on esitatud käesoleva katsemeetodiga hõlmatud nelja valideeritud mudelit käsitlevates standardse töökorra dokumentides (32, 33, 34, 35).
29. MTT otseste redutseerijate tuvastamiseks tuleks lisada iga uuritavat kemikaali värskest valmistatud MTT lahusesse. Kui MTT lahus värvub uuritava kemikaali toimel siniseks/lillaks, siis käsitatakse asjaomast uuritavat kemikaali MTT otsese redutseerijana ning sel juhul tuleks tavapärasest neelduvuse (optilise tiheduse) mõõtmisest või

HPLC/UPLC-spektrofotomeetrial põhinevast määramisest sõltumatult kasutada täiendavat funktsionaalset kontrolli inimese rekonstrueeritud marrasknaha eluvõimetute kudedega. Sellise täiendava funktsionaalse kontrolli puhul kasutatakse surmatud kudesid, mille metaboolne aktiivsus on peaaegu kadunud, kuid mis absorbeerivad uuritavat kemikaali eluvõimeliste kudedega sarnasel määral. Iga MTTd redutseeriva uuritava kemikaaliga töödeldakse vähemalt kahte paralleelset surmatud kudede proovi, millega viiakse seejärel läbi täismahus katse, et saada MTT mittespetsiifilist redutseerimist (NSMTT) kajastavad kontrollandmed (32, 33, 34, 35). Olenemata sellest, kui suur on sõltumatult läbi viidavate katsete/mõõtmistsüklite arv, piisab iga uuritava kemikaali puhul ühest NSMTT-kontrollist. Seejärel arvutatakse kudede tegeliku eluvõimelisuse kindlakstegemiseks asjaomase MTT redutseerijaga kokkupuutes olnud eluskudede puhul täheldatud eluvõimeliste kudede protsentuaalne osakaal, millest lahutatakse sama MTT redutseerijaga kokkupuutes olnud surmatud kudedega saadud, MTT mittespetsiifilist redutseerimist kajastav protsentuaalne osakaaluna väljendatud väärtus (NSMTT(%)); nimetatud väärtused arvutatakse korrigeeritavate andmete saamiseks kasutatud proovidega paralleelselt analüüsitud negatiivset kontrolli iseloomustava väärtuse suhtes.

30. Värviliste uuritavate kemikaalide või vee või isopropanooliga kokku puutumisel värviliseks muutuvate kemikaalide võimaliku segava mõju tuvastamiseks ja täiendavate kontrollide kasutamise vajaduse üle otsustamiseks tuleks teha uuritava kemikaali spektraalanalüüs vees (kokkupuutekeskkond) ja/või isopropanoolis (ekstraheerimislahus). Kui uuritav kemikaal neelab vees ja/või isopropanoolis valgust vahemikus 570 ± 30 nm, tuleks kasutada täiendavaid värvumiskontrolle või teise võimalusena HPLC/UPLC-spektrofotomeetriat; viimasel juhul ei ole kõnealused kontrollid vajalikud (vt punktid 33 ja 34). Tavapärasel neelduvuse (optilise tiheduse) mõõtmisel töödeldakse iga segavat mõju avaldava värvilise uuritava kemikaaliga vähemalt kahte paralleelset eluskoe proovi, millega viiakse seejärel läbi täismahus katse, et MTTga inkubeerimise etapis kasutatakse MTT lahuse asemel söödet, et saada mittespetsiifilist värvumist (NSC_{elus}) kajastavad kontrollproovid. Eluskudedele iseloomulikust bioloogilisest varieeruvusest tulenevalt tuleb NSC_{elus} -kontrolli kasutada samaaegselt uuritava värvilise kemikaaliga ning mitme katse tegemisel tuleb kasutada igas katses (igas mõõtmistsüklis) eraldi sõltumatut NSC_{elus} -kontrolli. Seejärel arvutatakse kudede tegeliku eluvõimelisuse kindlakstegemiseks asjaomase segavat mõju avaldava uuritava kemikaaliga kokkupuutes olnud ja MTT lahuses inkubeeritud eluskudede puhul täheldatud eluvõimeliste kudede protsentuaalne osakaal, millest lahutatakse kõnealuse segavat mõju avaldava uuritava kemikaaliga kokkupuutes olnud ja ilma MTT-ta söötmes inkubeeritud eluskudedega saadud, mittespetsiifilist värvumist kajastav protsentuaalne osakaaluna väljendatud väärtus ($NSC_{elus}(\%)$), mille leidmiseks kasutatud kontrollproove on käideldud korrigeeritavate andmete saamiseks kasutatud proovidega paralleelselt.

31. Selliste uuritavate kemikaalide puhul, millega saadud tulemustest nähtub nii MTT otsese redutseerimise võime (vt punkt 29) kui ka värvusest tulenev segav mõju (vt punkt 30), on tavapärasel neelduvuse (optilise tiheduse) mõõtmisel vaja kasutada eelmistes punktides kirjeldatud NSMTT-kontrolli ja NSC_{elus}-kontrolli kõrval veel kolmandat liiki kontrolli. See on tavaliselt vajalik tumedavärviliste (nt siniste, lillade ja mustade) uuritavate kemikaalide puhul, mis avaldavad MTT-põhises katses segavat mõju, kuna takistavad neile omase värvuse tõttu MTT otsese redutseerimise võime hindamist vastavalt punktis 29 kirjeldatule. Sellised uuritavad kemikaalid võivad seonduda nii eluskudedele kui ka surmatud kudedega ja seepärast võib juhtuda, et NSMTT-kontrolli abil korrigeeritakse tulemusi mitte üksnes uuritava kemikaali põhjustatud MTT võimaliku otsese redutseerimise suhtes, vaid ka värvusest tuleneva segava mõju suhtes, mis ilmneb uuritava kemikaali seondumisel surmatud kudedega. See võib kaasa tuua kahekordse korrigeerimise, kuna NSC_{elus}-kontrolli abil juba korrigeeritakse tulemusi värvusest tuleneva segava mõju suhtes, mis ilmneb uuritava kemikaali seondumisel eluskudedega. Et hoida ära võimalikku kahekordset korrigeerimist värvusest tuleneva segava mõju suhtes, tuleb kasutada kolmandat kontrolli, mis võimaldab hinnata surmatud kudede mittespetsiifilist värvumist (NSC_{surmatud}). Selle täiendava kontrolli puhul töödeldakse uuritava kemikaaliga vähemalt kahte paralleelset surmatud kudede proovi, millega viiakse seejärel läbi täismahus katse, et MTTga inkubeerimise etapis kasutatakse MTT lahuse asemel söödet. Olenemata sellest, kui suur on sõltumatult läbi viidavate katsete/mõõtmistsüklite arv, piisab iga uuritava kemikaali puhul ühest NSC_{surmatud}-kontrollist, et seda tuleks käidelda samaaegselt NSMTT-kontrolliga ja võimaluse korral tuleks kasutada sama partii kudesid. Seejärel arvutatakse kudede tegeliku eluvõimelisuse kindlakstegemiseks asjaomase uuritava kemikaaliga kokkupuutes olnud eluskudedele puhul täheldatud eluvõimeliste kudede protsentuaalne osakaal, millest lahutatakse NSMTT(%) ja NSC_{elus}(%) ning liidetakse kõnealuse segavat mõju avaldava uuritava kemikaaliga kokkupuutes olnud ja ilma MTT-ta söötmes inkubeeritud surmatud kudedega saadud, mittespetsiifilist värvumist kajastav protsentuaalne osakaaluna väljendatud väärtus (NSC_{surmatud}(%)); nimetatud väärtused arvutatakse korrigeeritavate andmete saamiseks kasutatud proovidega paralleelselt analüüsitud negatiivset kontrolli iseloomustava väärtuse suhtes.
32. On oluline silmas pidada, et MTT mittespetsiifilise redutseerimise ja värvusest tuleneva mittespetsiifilise segava mõju tulemusena võivad koeekstraktiga saadud näidud olla suuremad kui spektrofotomeetri lineaarsusvahemikule vastavad väärtused. Sellest lähtuvalt tuleks igas laboris enne regulatiivsel eesmärgil uuritavate kemikaalidega katsete alustamist teha kaubanduslikust allikast pärit MTT formasaani (CASI nr: 57360-69-7) abil kindlaks kasutatava spektrofotomeetri lineaarsusvahemik. Tavapärane neelduvuse (optilise tiheduse) mõõtmine spektrofotomeetriga on MTT otseste redutseerijate ja värvusest tuleneva segava mõjuga uuritavate kemikaalide puhul asjakohane juhul, kui asjaomase uuritava kemikaaliga töödeldud kudede ekstraktide optiline tihedus jääb enne MTT otsese redutseerimise ja/või värvusest tuleneva segava mõju suhtes korrigeerimist

spektrofotomeetri lineaarsusvahemikku või kui uuritava kemikaali puhul täheldatud eluvõimeliste kudede protsentuaalne osakaal on juba enne korrigeerimist $\leq 50\%$. Selliste uuritavate kemikaalide puhul, millega saadud NSMTT(%) ja/või NSC_{elus}(%) on negatiivse kontrolliga võrrelduna $\geq 50\%$, tuleks siiski suhtuda tulemustesse ettevaatusega, kuna kõnealust väärtust kasutatakse läviväärtusena, mille alusel eristatakse kategoriseeritud kemikaale kategoriseerimata kemikaalidest (vt punkt 36).

33. Tavapäraseks neelduvuse (optilise tiheduse) mõõtmiseks sobimatute värviliste uuritavate kemikaalide puhul, mis avaldavad MTT-põhises katses liiga tugevat segavat mõju, võib MTT formasaani määramiseks kasutada alternatiivina HPLC/UPLC-spektrofotomeetriat (vt punkt 34) (36). HPLC/UPLC-spektrofotomeetria võimaldab MTT formasaani enne selle kvantifitseerimist uuritavast kemikaalist eraldada (36). Sel põhjusel ei ole NSC_{elus}-kontroll ega NSC_{surmatud}-kontroll HPLC/UPLC-spektrofotomeetria kasutamisel uuritava kemikaali omadustest sõltumata kunagi vajalikud. NSMTT-kontrolli aga tuleks siiski kasutada, kui on põhjust eeldada, et uuritav kemikaal on MTT otsene redutseerija või selle värvus takistab MTT otsese redutseerimise võime hindamist (vastavalt punktis 29 kirjeldatule). Kui MTT formasaani määramiseks kasutatakse HPLC/UPLC-spektrofotomeetriat, arvutatakse eluvõimeliste kudede protsentuaalne osakaal uuritava kemikaaliga kokku puutunud eluskudede puhul saadud MTT formasaani piigi pindala protsentuaalse osakaaluna paralleelse negatiivse kontrolliga saadud MTT formasaani piigi pindalast. Kemikaalide puhul, mis on võimelised MTT-d otse redutseerima, arvutatakse kudede tegelik eluvõimelisus uuritava kemikaaliga kokku puutunud eluskudede puhul täheldatud eluvõimeliste kudede protsentuaalse osakaaluna, millest on lahutatud NSMTT(%). Lõpuks tuleks märkida, et selliseid MTT otseseid redutseerijaid, mis võivad avaldada ka värvusest tulenevat segavat mõju ning mis jäävad pärast töötlemist kudedesse ja redutseerivad MTT-d nii tugevalt, et analüüsitava koeekstraktide puhul täheldatud optiline tihedus (tavapärasel optilise tiheduse mõõtmisel) või piigi pindala (HPLC/UPLC-spektrofotomeetria kasutamisel) jääb väljapoole spektrofotomeetri lineaarsusvahemikku, ei ole võimalik hinnata; seda juhtub eeldatavalt siiski väga harva.
34. HPLC/UPLC-spektrofotomeetriat võib MTT formasaani määramiseks kasutada iga liiki (värviliste, värvitute, MTT-d redutseerivate ja MTT-d mitteredutseerivate) uuritavate kemikaalide puhul (36). Kuna on olemas eri HPLC/UPLC-spektrofotomeetriasüsteeme, tuleks enne sellise süsteemi kasutamist koeekstraktides sisalduva MTT formasaani määramiseks tõendada asjaomase HPLC/UPLC-spektrofotomeetriasüsteemi nõuetekohasust; selleks tõendatakse vastavust teatud standardnäitajatega seotud vastuvõetavuskriteeriumidele, mille puhul on lähtutud bioanalüüsimeetodite valideerimist käsitlevates ettevõtjatele ette nähtud USA Toidu- ja Raviameti suunistes kirjeldatud kriteeriumidest (36, 37). Kõnealused põhinäitajad ja neile vastavad vastuvõetavuskriteeriumid on esitatud 4. liites. Kui 4. liites määratletud vastuvõetavuskriteeriumid on täidetud, loetakse asjaomane HPLC/UPLC-

spektrofotomeetriasüsteem nõuetekohaseks ja seda võib hakata kasutama MTT formasaani määramiseks käesolevas katsemeetodis kirjeldatud katsetingimustes.

Katse nõuetekohasuse kriteeriumid

35. Iga katsemeetodi puhul, kus kasutatakse inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudeli nõuetekohaseid partiisid (vt punkt 23), peaks negatiivse kontrolliga töödeldud kudesid iseloomustav optiline tihedus kajastama kudede nõutavat kvaliteeti pärast nende tarnimist, vastuvõtmist ja kõikide katse-eeskirja kohaste töötlemistoimingute tegemist. Negatiivse kontrolli puhul täheldatav optiline tihedus ei tohiks olla väiksem kui varasemate andmete põhjal kindlaks määratud alampiir. Samuti peaksid positiivse kontrolliga, st SDSi 5 % vesilahusega töödeldud kudedega saadud tulemused kajastama kudede võimet reageerida ärritavale kemikaalile katsemeetodiga ette nähtud tingimustes (vt 3. liide; täiendav teave on esitatud käesoleva katsemeetodiga hõlmatud nelja katsemudelit käsitlevates standardse töökorra dokumentides (32, 33, 34, 35)). Nimetatud kontrollide puhul kasutatud paralleelsete koeproovidega saadud tulemuste vahelist varieeruvust iseloomustav sobiv näitaja – st standardhälve – peaks jääma kasutatud katsemudeli puhul kehtestatud vastuvõetavasse vahemikku (vt 3. liide).

Tulemuste tõlgendamine ja prognoosimudel

36. Iga uuritava kemikaaliga saadud optilise tiheduse väärtuste alusel saab arvutada eluvõimeliste kudede protsentuaalse osakaalu negatiivse kontrolli puhul saadud väärtusest, mis on võetud võrdseks 100 protsendiga. HPLC/UPLC-spektrofotomeetria kasutamise korral arvutatakse eluvõimeliste kudede protsentuaalne osakaal uuritava kemikaaliga kokku puutunud eluskudede puhul saadud MTT formasaani piigi pindala protsentuaalse osakaaluna paralleelse negatiivse kontrolliga saadud MTT formasaani piigi pindalast. Rakkude eluvõimelisuse protsentuaalse osakaalu läviväärtus, mille alusel eristatakse ärritavaid uuritavaid kemikaale kategoriseerimata uuritavatest kemikaalidest, ning tulemuste hindamiseks ja ärritavate kemikaalide tuvastamiseks kasutatav(ad) statistiline/statistilised meetod(id) peaksid olema üheselt kindlaks määratud ja dokumenteeritud ning nende sobivus peaks olema tõendatud (sellekohane teave on esitatud katsemudeleid käsitlevates standardse töökorra dokumentides). Ärritava toime prognoosimiseks kasutatavad läviväärtused on järgmised.
- Uuritavat kemikaali käsitatakse ÜRO GHSi / CLP-määruse kohaselt kategoriseerimist ja märgistamist vajava (1. või 2. kategooria) kemikaalina, kui eluvõimeliste kudede keskmine protsentuaalne osakaal pärast kemikaaliga kokkupuudet ja töötlemisjärgset inkubeerimist on 50 % või väiksem. Kuna käesoleva meetodiga hõlmatud, inimese rekonstrueeritud marrasknahal põhinevad katsemudelid ei võimalda eristada ÜRO GHSi / CLP-määruse kohase 1. kategooria kemikaale 2. kategooria kemikaalidest, on uuritava kemikaali lõplikuks kategoriseerimiseks vaja lisateavet kemikaali nahka söövitava toime kohta (vt ka OECD juhenddokument katsete tegemist ja hindamist käsitleva ühtse

lähene misviisi kohta (3)). Kui uuritav kemikaal leitakse olevat mittesöövitav (näiteks lähtuvalt katsemeetodist B.40, B.40b või B.65) ning sellega kokku puutunud kudede eluvõimelisus pärast töötlemisjärgset inkubeerimist on 50 % või väiksem, käsitatakse seda ÜRO GHSi / CLP-määruse kohaselt 2. kategooriasse kuuluva nahka ärritava kemikaalina.

- Uuritav kemikaal, millega kokku puutunud kudede eluvõimelisus pärast töötlemisjärgset inkubeerimist on suurem kui 50 %, võidakse olenevalt asjaomase liikmesriigi õigusraamistikust tunnistada nahka mitte ärritavaks, ÜRO GHSi / CLP-määruse kohaselt kategoriseerimata kemikaaliks.

ANDMED JA ARUANDLUS

Andmed

37. Iga mõõtmistsükli puhul tuleks esitada tabeli kujul andmed iga paralleelse koeproovi kohta (näiteks optilise tiheduse väärtused ja eluvõimeliste rakkude protsentuaalne osakaal iga uuritava kemikaali puhul koos liigitamise tulemusega), sealhulgas vajaduse korral korduskatsete tulemused. Peale selle tuleks esitada igas mõõtmistsükli saadud tulemuste keskväärtused koos standardhällbega. Iga asjaomase uuritava kemikaali puhul tuleks esitada andmed seoses täheldatud mõjuga MTT-le või värvilise uuritava kemikaali segava mõjuga.

Katseprotokoll

38. Katseprotokollis tuleks esitada järgmine teave.

Uuritav kemikaal ja kontrollkemikaalid:

- ühest koostisosast koosnev aine: kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus, CASi number, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem, puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne;
- mitut koostisosa sisaldav aine, UVCB või segu: võimalikult täpne omaduste kirjeldus lähtuvalt koostisosade keemilisest määratlusest (vt eespool), kvantitatiivsest sisaldusest ja asjakohastest füüsikalise-keemilistest omadustest;
- füüsiline välimus, lahustuvus vees ja muud asjakohased füüsikalise-keemilised omadused;
- allikas ja partii number, kui see on olemas;
- vajaduse korral teave uuritava kemikaali / kontrollkemikaali töötlemise kohta enne katset (näiteks soojendamine, peenestamine);
- uuritava kemikaali püsivus ja aegumiskuupäev või kordusanalüüsi tegemise tähtpäev, kui see on teada;
- säilitustingimused.

Kasutatud inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudel ja katse-eeskiri (ning vajaduse korral nende valimise põhjendus)

Katsetingimused:

- kasutatud inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudel (sealhulgas partii number);
- mõõteseadme (nt spektrofotomeetri) kaliibrimisandmed, MTT formasaani kvantifitseerimiseks kasutatud lainepikkus ja filtri ribalaius (vajaduse korral) ning mõõteseadme lineaarsusvahemik;
- MTT formasaani kvantifitseerimiseks kasutatud meetodi kirjeldus;
- vajaduse korral HPLC/UPLC-spektrofotomeetriasisüsteemi nõuetekohasuse tõendamise kirjeldus; kogu täiendav teave konkreetse kasutatud inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudeli, sealhulgas selle kasutamise tulemuslikkuse kohta. See hõlmab vähemalt järgmisi aspekte:
 - i) eluvõimelisus;
 - ii) toimimine kaitsekihina;
 - iii) morfoloogia;
 - iv) reprodutseeritavus ja ennustusjõud;
 - v) mudeli kvaliteedi kontroll;
- viide varasematele andmetele mudeli kohta. See hõlmab vähemalt kvaliteedikontrolli andmete vastuvõetavust lähtuvalt varasematest andmetest partii kohta;
- pädevusainetega katsete tegemine eesmärgiga tõendada katsemeetodi kasutamise pädevust enne meetodi regulaarset rakendamist.

Katse käik:

- kasutatud katse-eeskirja üksikasjalik kirjeldus (sealhulgas teave kokkupuuteperioodi järgsete pesemisetappide kohta);
- kasutatud uuritava kemikaali ja kontrollkemikaalide annused;
- kokkupuuteperioodi ja kokkupuutejärgse inkubeerimisperioodi kestus ja temperatuur;
- MTT otseste redutseerijate ja/või värviliste uuritavate kemikaalide puhul kasutatud kontrollid;
- iga uuritava kemikaali ja iga kontrolli (positiivse ja negatiivse kontrolli ning vajaduse korral NSMTT-kontrolli, NSC_{elus}-kontrolli ja/või NSC_{surmatud}-kontrolli) puhul kasutatud paralleelsete koeproovide arv;
- kasutatud otsustuskriteeriumide/prognoosimudeli kirjeldus lähtuvalt kasutatud inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudelist;

- kõikide katsemeetodis tehtud (sealhulgas pesemisetappidega seotud) muudatuste kirjeldus.

Mõõtmistsükli või katses saadavate tulemuste vastuvõetavuse kriteeriumid:

- varasemate andmete kohased positiivse ja negatiivse kontrolli puhul saadud keskvaartused ja vastuvõetavate väärtuste vahemikud; positiivse ja negatiivse kontrolli puhul paralleelsete koeproovidega saadud tulemuste varieeruvuse vastuvõetav määr;
- uuritava kemikaali puhul paralleelsete koeproovidega saadud tulemuste varieeruvuse vastuvõetav määr.

Tulemused:

- tabeli kujul mõõtmisandmed iga uuritava kemikaali kohta iga mõõtmistsükli ja iga paralleelproovi puhul, sealhulgas optilise tiheduse või MTT formaani piigi pindala väärtused, eluvõimeliste kudede protsentuaalne osakaal ja selle näitaja keskvaartus koos standardhälbega;
- vajaduse korral MTT otseste redutseerijate ja/või värviliste uuritavate kemikaalide puhul kasutatud kontrollidega saadud tulemused, sealhulgas optilise tiheduse või MTT formaani piigi pindala väärtused, NSMTT(%), NSC_{elus}(%) ja/või NSC_{surmatud}(%), standardhälbed ning eluvõimeliste kudede lõplik korrigeeritud protsentuaalne osakaal;
- uuritava(te) kemikaali(de) ja kontrollidega saadud tulemuste vastavus mõõtmistsükli või katses saadavate tulemuste vastuvõetavuse kindlaksmääratud kriteeriumidele;
- muu täheldatud toime kirjeldus;
- klassifitseerimistulemused lähtuvalt kasutatud prognoosimudelitest/otsustuskriteeriumidest.

Tulemuste arutelu

Järeldused

KIRJANDUS

- (1) Ühinenud Rahvaste Organisatsioon (ÜRO) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Viies, täiendatud väljaanne. ÜRO, New York ja Genf. Kättesaadav aadressil http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.
- (2) Alternatiivsete Meetodite Valideerimise Euroopa Keskus (ECVAM) (2009). Statement on the Performance Under UN GHS of Three *In-Vitro* Assays for Skin Irritation Testing and the Adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM Skin Irritation Performance Standards. Koostanud ECVAMi teaduslik nõuandekomitee (ESAC31), 9. aprill 2009. Kättesaadav aadressil https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC31_skin-irritation-statement_20090922.pdf.
- (3) OECD (2014). Guidance Document on an Integrated Approach to Testing and Assessment (IATA) for Skin Corrosion and Irritation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 203. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (4) Käesoleva lisa peatükk B.4 „Äge nahaärritus/-söövituse“.
- (5) Käesoleva lisa peatükk B.40 „*In vitro* nahasöövituse: transkutaanse elektritakistuse (TET) mõõtmisel põhinev katsemeetod“.
- (6) Käesoleva lisa peatükk B.40b „*In vitro* nahasöövituse: inimese rekonstrueeritud marrasknahal põhinev katsemeetod“.
- (7) Käesoleva lisa peatükk B.65 „*In vitro* membraanibarjääri katsemeetod nahasöövituse uurimiseks“.
- (8) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Epidermis (RhE) Test Methods for Skin Irritation Testing as described in TG 439. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 220. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (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. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (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., ja 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., ja 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., ja 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., ja 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., ja 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., ja 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., ja 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., ja 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., ja 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) ECVAM (2007). Statement on the Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation. Koostanud ECVAMi teaduslik nõuandekomitee (ESAC26), 27. aprill 2007. Kättesaadav aadressil https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC26_statement_SkinIrritation_20070525_C.pdf.
- (21) ECVAM (2007). Performance Standards for Applying Human Skin Models to *In Vitro* Skin Irritation Testing. *NB! Tegemist on algsete tulemuslikkuse standarditega, mida on kasutatud kahe katsemeetodi valideerimiseks. Neid tulemuslikkuse standardeid ei tohiks enam kasutada, kuna nüüd on kättesaadav nende ajakohastatud versioon (8).*
- (22) ECVAM (2008). Statement on the Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation Testing. Koostanud ECVAMi teaduslik nõuandekomitee (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 Test Guideline on *In Vitro* Skin Irritation Testing. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 137. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (24) Katoh, M., Hamajima, F., Ogasawara, T., ja 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., ja 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. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (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. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

- (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., ja 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., ja Schröder, K. R. (2004). *In Vitro* Skin Irritation: Fact and Future. State of the Art Review of Mechanisms and Models. *Toxicol. In Vitro* 18: 231–243.
- (30) Eskes, C., *et al.* (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 62: 393–403.
- (31) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65: 55–63.
- (32) Standardne töökord mudeli EpiSkin™ jaoks (veebuar 2009). Versioon 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) Standardne töökord mudeli EpiDerm™ jaoks (muudetud märtsis 2009). Versioon 7.0. Katse-eeskiri „*In Vitro* EpiDerm™ Skin Irritation Test (EPI-200-SIT). For Use with MatTek Corporation’s Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm™ (EPI 200-SIT)“.
- (34) Standardne töökord mudeli SkinEthic™ RHE jaoks (veebuar 2009). Versioon 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 (juuni 2011). Standardne töökord mudeli EPI-MODEL24 SIT jaoks. Versioon 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., ja 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. Pooleriolev käsikiri.
- (37) USA Toidu- ja Ravimiamet (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. USA tervishoiu- ja sotsiaalteenuste ministeerium, Toidu- ja Ravimiamet (mai 2001). Kättesaadav aadressil <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>.

- (38) Harvell, J. D., Lamminstausta, K., ja Maibach, H. I. (1995). Irritant Contact Dermatitis. Väljaandes: Practical Contact Dermatitis. Guin, J. D. (toim.), McGraw-Hill, New York. Lk 7–18.
- (39) ECVAM (2009). Performance Standards for *In Vitro* Skin Irritation Test Methods Based on Reconstructed Human Epidermis (RhE). *NB! Tegemist on ECVAMi tulemuslikkuse standardite praeguse versiooniga, mida ajakohastati 2009. aastal seoses ÜRO GHSi rakendamisega. Neid tulemuslikkuse standardeid ei tohiks enam kasutada, kuna nüüd on kättesaadav nende ajakohastatud versioon (8), mis on seotud käesoleva katsemeetodiga.*
- (40) ECVAM (2009). ESAC Statement on the Performance Standards (PS) for *In Vitro* Skin Irritation Testing Using Reconstructed Human Epidermis. Koostanud ECVAMi teaduslik nõuandekomitee (ESAC31), 8. juuli 2009.
- (41) Euroopa Komisjon (2001). Komisjoni 6. augusti 2001. aasta direktiiv 2001/59/EÜ, millega kahekümne kaheksandat korda kohandatakse tehnika arenguga nõukogu direktiivi 67/548/EMÜ ohtlike ainete liigitamist, pakendamist ja märgistamist käsitlevate õigus- ja haldusnormide ühtlustamise kohta. *Euroopa Ühenduste Teataja* L 225, lk 1–333.

1. liide

MÕISTED

Aine – looduslik või mis tahes tootmisprotsessi tulemusena saadud keemiline element või selle ühend koos püsivuse tagamiseks vajalike lisaainete ja tootmisprotsessi käigus tekkinud lisanditega, mis ei hõlma siiski lahusteid, mida on võimalik aine püsivust mõjutamata või selle koostist muutmata ainest eraldada.

Asendav meetod – katsemeetod, mis on kavandatud tavakasutuses oleva, ohu tuvastamiseks ja/või riski hindamiseks heaks kiidetud meetodi asendamiseks ning mille puhul on kindlaks tehtud, et sellega tagatakse iga võimaliku määramisolukorra ja kemikaali puhul vastavalt vajadusele inimeste või loomade tervise või keskkonna samaväärne või parem kaitse kui heakskiidetud meetodiga (9).

Asjakohasus – näitaja, mille abil kirjeldatakse, kuivõrd katsemeetod võimaldab uurida huvipakkuvat toimet, kas selle kasutamine on mõttekas ja kas see on konkreetse eesmärgi jaoks sobiv. Asjakohasusest nähtub, mil määral saab katsemeetodiga õigesti mõõta või ennustada huvipakkuvat bioloogilist toimet. Asjakohasuse puhul võetakse arvesse ka katsemeetodiga saavutatavat täpsust (vastavust) (9).

ET₅₀ – näitaja, mille hinnangulise väärtuse leidmiseks tehakse kindlaks kokkupuuteperiood, mille jooksul rakkude eluvõimelisus väheneb teatava kindlaksmääratud kontsentratsiooniga võrdluskemikaaliga töötlemise tagajärjel 50 % võrra; vt ka mõistet IC₅₀.

GHS (ÜRO ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteem) – süsteem, millega nähakse ette kemikaalide (ainete ja segude) klassifitseerimine vastavalt nende füüsilise ohtlikkuse ning kahjuliku tervise- ja keskkonnamõju standarditud liigile ja tasemele ning mis hõlmab selliseid asjaomaseid teavituselemente nagu piktogrammid, märksõnad, ohulaused, hoiatuslaused ja ohutuskaardid, et anda inimeste (sealhulgas tööandjate, töötajate, vedajate, tarbijate ja päästetöötajate) ning keskkonna kaitsmiseks vajalikku teavet kõnealuste kemikaalide kahjuliku toime kohta (1).

HPLC – kõrgefektiivne vedelikkromatograafia.

IC₅₀ – näitaja, mille hinnangulise väärtuse leidmiseks tehakse kindlaks kontsentratsioon, mille juures võrdluskemikaal vähendab teatava kindlaksmääratud kokkupuuteperioodi jooksul kudede eluvõimelisust 50 % võrra; vt ka mõistet ET₅₀.

In vivo nahaärritus – pöörduva nahakahjustuse tekkimine uuritava kemikaali kuni neljaks tunniks pealekandmise tagajärjel. Nahaärritus on mõjutatud nahakoe kohalik reaktsioon, mis tekib lühikese aja jooksul pärast kokkupuudet (38). Seda põhjustab kohalik põletikureaktsioon, milles osaleb nahakoe kaasasündinud (mittespetsiifilise) immuunsuse süsteem. Selle peamine iseloomulik tunnus on pöörduv kulg, mis hõlmab põletikureaktsiooni ja enamikku põletikuga seotud iseloomulikest kliinilistest ärritusnähtudest (punetus, turse, sügelus ja valu).

Kemikaal – aine või segu.

Lõpmata suur annus – marrasknahale kantud uuritava kemikaali kogus, mis on suurem kui marrasknaha pinna täielikuks ja ühtlaseks katmiseks vajalik kogus.

Mitmest koostisosast koosnev aine – aine, mis on määratletud kvantitatiivse koostise alusel ja milles enam kui ühe põhikoostisosa sisaldus on vähemalt 10, kuid väiksem kui 80 massiprotsenti. Mitmest koostisosast koosnev aine saadakse tootmisprotsessi tulemusena. Erinevus segu ja mitmest koostisosast koosneva aine vahel seisneb selles, et segu saadakse kahe või enama aine kokkusegamisel, ilma et toimuks keemilist reaktsiooni. Mitmest koostisosast koosnev aine saadakse keemilise reaktsiooni tulemusel.

MTT – 3-(4,5-dimetüültiasool-2-üül)-2,5-difenüültetrasooliumbromiid; tiasolüülisinise tetrasooliumbromiid.

Mõõtmistsükkel – ühe või mitme uuritava kemikaali analüüsimine negatiivse ja positiivse kontrolliga paralleelselt.

NSC_{elus} – eluskudede mittespetsiifiline värvumine.

NSC_{surmatud} – surmatud kudede mittespetsiifiline värvumine.

NSMTT – MTT mittespetsiifiline redutseerumine.

Positiivne kontroll – paralleelproov, mis sisaldab kõiki katsesüsteemi komponente ja mida on töödeldud kemikaaliga, millega teadaolevalt saadakse positiivne tulemus. Positiivse tulemuse väärtus ei tohiks olla liiga suur, et võimaldada hinnata positiivse kontrolliga saadud tulemuste varieeruvust ajas.

Rakkude eluvõimelisus – näitaja, mis väljendab rakupopulatsiooni summaarset aktiivsust, näiteks raku mitokondri dehüdrogenaaside võimet redutseerida vitaalvärvainet MTT (3-(4,5-dimetüültiasool-2-üül)-2,5-difenüültetrasooliumbromiid; tiasolüülisinine), ning mis olenevalt mõõdetavast lõppnäitajast ja kasutatavast katseplaanist korreleerub elusrakkude üldarvu ja/või elujõulisusega.

Segu – kahest või enamast ainekombinatsioonist koosnev segu või lahus.

Spetsiifilisus – katsemeetodiga õigesti negatiivseks/reaktsioonivõimetuks liigitatud uuritavate kemikaalide osakaal kõikide negatiivsete kemikaalide hulgas. Spetsiifilisus kajastab sellise katsemeetodi täpsust, millega saadakse kategoriseeritav tulemus, ning see on oluline näitaja katsemeetodi asjakohasuse hindamiseks (9).

Tulemuslikkuse standardid – valideeritud katsemeetodil põhinevad standardid, mille alusel hinnatakse mehhanismilt ja tööpõhimõttelt sarnase kavandatud katsemeetodi võrreldavust. Need hõlmavad: i) katsemeetodi olulisi elemente, ii) valideeritud katsemeetodi vastuvõetava tulemuslikkuse tõendamiseks kasutatud kemikaalide hulgast valitud võrdluskemikaalide miinimumloetelu ja iii) võrreldavat usaldusväärsuse ja täpsuse taset, mille puhul on lähtutud valideeritud katsemeetodiga saadud tulemustest ja mis tuleks

saavutada kavandatud katsemeetodi hindamisel võrdluskemikaalide miinimumloetelu kasutamise teel (9).

Tundlikkus – katsemeetodiga õigesti positiivseks/reaktsioonivõimeliseks liigitatud uuritavate kemikaalide osakaal kõikide positiivsete kemikaalide hulgas. Tundlikkus kajastab sellise katsemeetodi täpsust, millega saadakse kategoriseeritav tulemus, ning see on oluline näitaja katsemeetodi asjakohasuse hindamiseks (9).

Täpsus – katsemeetodiga saadud tulemuste ja vastuvõetavate võrdlusväärtuste kooskõla määr. Täpsus näitab katsemeetodi tulemuslikkust ja on üks asjakohastest aspektidest. Seda mõistet kasutatakse sageli vastavuse tähenduses, et väljendada katsemeetodiga saadud õigete tulemuste osakaalu (9).

UPLC – ülikõrgefektiivne vedelikkromatograafia.

Usaldusväärsus – näitaja, mis iseloomustab katsemeetodiga saadud tulemuste reprodutseeritavust pikema aja jooksul samas laboris ja eri laborites, kui meetodit rakendatakse ühe ja sama katse-eeskirja alusel. Usaldusväärsuse hindamiseks arvutatakse laborisisene ja laboritevaheline reprodutseeritavus (9).

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

UVCB – tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal.

Vastavus – tulemuslikkuse näitaja katsemudeli puhul, millega saadakse kategoriseeritav tulemus; üks asjakohastest aspektidest. Seda mõistet kasutatakse mõnikord täpsuse tähenduses ja see on määratletud kui õigesti positiivseks või negatiivseks liigitatud kemikaalide osakaal kõikide uuritud kemikaalide seas. Vastavus sõltub väga suurel määral positiivsete tulemuste osakaalust uuritavale kemikaalile vastavat liiki kemikaalide hulgas (9).

Ühest koostisosast koosnev aine – aine, mis on määratletud kvantitatiivse koostise alusel ja mille ühe põhikoostisosa sisaldus on vähemalt 80 massiprotsenti.

2. liide

KÄESOLEVA KATSEMEETODIGA HÕLMATUD KATSEMUDELID

Nr	Katsemudeli nimetus	Valideerimisuuringu liik	Allikaviited
1	EpiSkin™	Täismahus prospektiivne valideerimisuuring (2003–2007). Selle katsemudeli elemente kasutati katsemeetodi oluliste elementide määratlemiseks ECVAMi algsetes ja ajakohastatud tulemuslikkuse standardites (39, 40, 21)*. Peale selle kasutati kõnealuse meetodiga saadud andmeid, mis on seotud kategoriseerimata ainete eristamisega kategoriseeritud ainetest, peamise lähtealusena spetsiifilisuse ja tundlikkuse määrade kehtestamiseks algsetes tulemuslikkuse standardites*.	2, 10, 11, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 32, 39, 40
2	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	EpiDerm™ (<i>algversioon</i>): algselt viidi selle katsemudeliga aastatel 2003–2007 läbi täismahus prospektiivne valideerimisuuring, mis hõlmas ka mudelit nr 1. Selle katsemudeli elemente kasutati katsemeetodi oluliste elementide määratlemiseks ECVAMi algsetes ja ajakohastatud tulemuslikkuse standardites (39, 40, 21)*. EpiDerm™ SIT (EPI-200): algversioonis mudeli EpiDerm™ muudetud versioon valideeriti ECVAMi algsete tulemuslikkuse standardite (21) alusel 2008. aastal*.	2, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 23, 33, 39, 40 2, 21, 22, 23, 33
3	SkinEthiC™ RHE	ECVAMi algsetel tulemuslikkuse standarditel (21) põhinev 2008. aastal tehtud valideerimisuuring*.	2, 21, 22, 23, 31
4	LabCyte EPI-MODEL24 SIT	Valideerimisuuring (2011–2012), mille puhul lähtuti OECD katsejuhendiga nr 439 seotud tulemuslikkuse standarditest (8), mis põhinevad ECVAMi ajakohastatud tulemuslikkuse standarditel* (39, 40).	24, 25, 26, 27, 28, 35, 39, 40 ning käesoleva katsemeetodi kohased tulemuslikkuse standardid (8)*

* ECVAMi algsed tulemuslikkuse standardid (21) töötati välja 2007. aastal pärast seda, kui oli viidud lõpule prospektiivne valideerimisuuring (16), milles hinnati katsemudelite nr 1 ja 2 tulemuslikkust seoses ohtlike aineid käsitlevas kahekümne kaheksandat korda muudetud ELi direktiivis (41) kirjeldatud klassifitseerimissüsteemiga. Aastal 2008 hakati kohaldama ÜRO GHSi (1) ja ELi CLP-määrust, millega suurendati *in vivo* läviväärtust, mille alusel eristatakse kategoriseerimata aineid kategoriseeritud ainetest, väärtuselt 2,0 väärtuseni 2,3. Selle muutunud regulatiivse nõude järgimiseks ajakohastati 2009. aastal ECVAMi tulemuslikkuse standardites sätestatud täpsuse väärtusi ja võrdluskemikaalide loetelu (2, 39, 40). Samaselt algsetele tulemuslikkuse standarditele lähtuti ka ajakohastatud tulemuslikkuse standardite puhul peamiselt mudelitega nr 1 ja 2 saadud andmetest (16), ent peale selle kasutati ka mudeliga nr 3 saadud andmeid võrdluskemikaalide kohta. Aastal 2010 kasutati kõnealuseid ECVAMi ajakohastatud tulemuslikkuse standardeid käesoleva katsemeetodi kohaste tulemuslikkuse standardite sätestamiseks (8). Käesoleva katsemeetodi puhul käsitatakse VSMina meetodit EpiSkin™, kuna seda kasutati kõikide tulemuslikkuse

standardites sätestatud kriteeriumide väljatöötamiseks. Üksikasjalik teave valideerimisuuringu kohta, kogutud andmed koondatud kujul ja taustteave tulemuslikkuse standardites tehtud vajalike kohanduste kohta seoses ÜRO GHSi / CLP-määruse rakendamisega on esitatud asjaomast OECD katsejuhendit nr 439 käsitlevas ECVAMi / Saksamaa Föderalse Riskihindamise Instituudi (BfR) selgitavas taustdokumendis (23).

SIT – nahaärrituskatse.

RHE – inimese rekonstrueeritud marrasknahk.

3. liide

KATSE-EESKIRJA KOHASED SPETSIIFILISED PARAMEETRID KÄESOLEVA KATSEMEETODIGA HÕLMATUD IGA KATSEMUDELI KOHTA

Asjaomaseid inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudeleid käsitlevad katse-eeskirjad on väga sarnased; tuleb märkida, et neist kõikide puhul on töötlemisjärgse inkubatsiooniperioodi kestus 42 tundi (32, 33, 34, 35). Erinevused on seotud eelkõige järgmise kolme parameetriga, mis kajastavad katsemudelite erisusi kaitsekihina toimimisel: A) eelinkubeerimise aeg ja söötme kogus, B) uuritava kemikaaliga töötlemine ning C) söötme kogus töötlemisjärgsel inkubeerimisel.

	EpiSkin™ (SM)	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	SkinEthic™ RHE	LabCyte EPI- MODEL24 SIT
A) Eelinkubeerimine				
Inkubeerimisae g	18–24 tundi	18–24 tundi	< 2 tundi	15–30 tundi
Söötme kogus	2 ml	0,9 ml	0,3 või 1 ml	0,5 ml
B) Uuritava kemikaaliga töötlemine				
Vedelike puhul	10 µl (26 µl/cm²)	30 µl (47 µl/cm²)	16 µl (32 µl/cm²)	25 µl (83 µl/cm²)
Tahkete ainete puhul	10 mg (26 mg/cm²) + DV (5 µl)	25 mg (39 mg/cm²) + DPBS (25 µl)	16 mg (32 mg/cm²) + DV (10 µl)	25 mg (83 mg/cm²) + DV (25 µl)
Nailonvõrgu kasutamine	Ei kasutata	Vajaduse korral	Kasutatakse	Ei kasutata
Kokkupuuteper ioodi kestus	15 minutit	60 minutit	42 minutit	15 minutit
Kokkupuutete mperatuur	Toatemperatuur	a) 25 minutit toatemperatuuril b) 35 minutit 37 °C juures	Toatemperatuur	Toatemperatuur
C) Söötme kogus töötlemisjärgsel inkubeerimisel				
Söötme kogus	2 ml	0,9 ml × 2	2 ml	1 ml
D) Suurim lubatav varieeruvus				
Paralleelsete koeproovidega saadud tulemuste standardhälve (SD)	SD 18	SD 18	SD 18	SD 18

DV – destilleeritud vesi.

DPBS – fosfaadiga puhverdatud Dulbecco soolalahus.

4. liide

HPLC/UPLC-SPEKTROFOTOMEETRIASÜSTEEMI NÕUETEKOHASUSE KRITERIUMID JA PÕHINÄITAJAD INIMESE REKONSTRUEERITUD MARRASKNAHAST EKSTRAHEERITUD MTT FORMASAANI MÄÄRAMISE VÕIMALDAMISEKS

Näitaja	USA Toidu- ja Raviameti suunistel põhinev katse-eeskiri (36, 37)	Nõuetekohasuse kriteeriumid
Selektiivsus	Isopropanooli, eluskudede tühiproovi (isopropanooliekstrakt inimese rekombineeritud marrasknaha eluskudedest, mida ei ole ühelgi viisil töödeldud) ja surmatud kude tühiproovi (isopropanooliekstrakt inimese rekombineeritud marrasknaha surmatud kudedest, mida ei ole ühelgi viisil töödeldud) analüüsimine	Segavale signaalile vastav pindala on $\leq 20\%$ LLOQ-le ¹ vastavast pindalast
Kordustäpsus	Kvaliteedikontrolli kemikaali lahused (st MTT formaan kontsentratsioonis 1,6 µg/ml, 16 µg/ml ja 160 µg/ml) isopropanoolis ($n = 5$)	Variatsioonikordaja on LLOQ puhul $\leq 15\%$ või $\leq 20\%$
Mõõtetäpsus	Kvaliteedikontrolli kemikaali lahused isopropanoolis ($n = 5$)	Hälve on $\leq 15\%$ või LLOQ puhul $\leq 20\%$
Maatriksiefekt	Kvaliteedikontrolli kemikaali lahused eluskude tühiproovis ($n = 5$)	$85\% \leq$ maatriksiefekt $\leq 115\%$
Ülekandumine	Isopropanooli analüüsimine pärast ULOQ ² puhul kasutatavat standardit	Segavale signaalile vastav pindala on $\leq 20\%$ LLOQ-le vastavast pindalast
Reprodutseeritavus (samal päeval)	3 sõltumatut kaliibrimiskõverat, mis põhinevad MTT formaani kuuel järjestikusel 1 : 3 lahjendusel isopropanoolis alates ULOQ-st, st kontsentratsioonist 200 µg/ml; kvaliteedikontrolli kemikaali lahused isopropanoolis ($n = 5$)	Kaliibrimiskõverad: hälve on $\leq 15\%$ või LLOQ puhul $\leq 20\%$
Reprodutseeritavus (eri päevade lõikes)	1. päev: 1 kaliibrimiskõver ja kvaliteedikontrolli kemikaali lahused isopropanoolis ($n = 3$) 2. päev: 1 kaliibrimiskõver ja kvaliteedikontrolli kemikaali lahused isopropanoolis ($n = 3$) 3. päev: 1 kaliibrimiskõver ja kvaliteedikontrolli kemikaali lahused isopropanoolis ($n = 3$)	Kvaliteedikontrolli proovid: hälve on $\leq 15\%$ ja variatsioonikordaja $\leq 15\%$
MTT formaani lühiajaline püsivus inimese rekonstrueeritud marrasknaha koeekstraktis	Kvaliteedikontrolli kemikaali lahused eluskude tühiproovis ($n = 3$); analüüsitakse valmistamise päeval ja pärast 24-tunnist toatemperatuuril säilitamist	Hälve on $\leq 15\%$
MTT formaani pikaajaline püsivus inimese rekonstrueeritud	Kvaliteedikontrolli kemikaali lahused eluskude tühiproovis ($n = 3$); analüüsitakse valmistamise päeval ja pärast mitmepäevast säilitamist kindlaksmääratud temperatuuril (nt 4 °C, -20 °C, -80 °C)	Hälve on $\leq 15\%$

marrasknaha koeekstraktis (vajaduse korral)		

¹ LLOQ – alumine määramispiir, mis määratluse kohaselt vastab kudede eluvõimelisuse määrale 1–2 %; st 0,8 µg/ml.

² ULOQ – ülemine määramispiir, millele vastav kontsentratsioon on määratluse kohaselt vähemalt kaks korda suurem kui MTT formaani suurim eeldatav kontsentratsioon negatiivsetest kontrollproovidest saadud isopropanooliekstraktides; st 200 µg/ml.“

8) B osasse lisatakse järgmised peatükid:

„B.63. REPRODUKTIIV-/ARENGUTOKSILISUSE SÕELUURING

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 421 (2016). Kemikaalide uurimist käsitlevaid OECD katsejuhendeid vaadatakse teaduse arengu arvessevõtmiseks korrapäraselt läbi. Algne sõeluuringut käsitlev katsejuhend nr 421 võeti vastu 1995. aastal ühe esialgse reproduktiivtoksilisuse sõeluuringu katse-eeskirja põhjal, mida arutati kahel ekspertide koosolekul, mis toimusid 1990. aastal Londonis (1) ja 1992. aastal Tokyos (2).
2. Käesolevat katsemeetodit on ajakohastamise eesmärgil täiendatud endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide uurimiseks sobivate lõppnäitajatega, mis lisati järelmeetmena lähtuvalt prioriteetsest tegevussuunast, mille OECD käivitas 1998. aastal eesmärgiga vaadata läbi olemasolevad ja töötada välja uued katsejuhendid, et võimaldada sõeluuringute tegemist võimalike endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide tuvastamiseks ja selliste kemikaalide hindamist (3). Näiteks täiendati 2008. aastal OECD katsejuhendit nr 407 (käesoleva lisa peatükk B.7 „Suukaudse kordusdoosi toksilisuse 28-päevane uuring närilistel“) parameetritega, mis sobivad uuritavate kemikaalide endokriinse toime tuvastamiseks. Katsejuhendi nr 421 ajakohastamise eesmärk oli lisada sõeluuringut käsitlevasse juhendisse teatavad endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide uurimiseks sobivad lõppnäitajad, mida saab hinnata juhul, kui kokkupuuteperiood hõlmab mõnda tundlikku arenguperioodi (sünnieelset või varajast sünnijärgset perioodi).
3. Peale selle lisati katsejuhendisse nr 421 täiendavad endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide uurimiseks sobivad lõppnäitajad, mida sisaldab ka katsejuhend nr 443 (käesoleva lisa peatükk B.56 „Laiendatud ühe põlvkonna reproduktiivtoksilisuse uuring“); need lõppnäitajad valiti lähtuvalt ühest teostatavusuuringust, milles käsitletakse asjaomaste lõppnäitajate lisamisega seotud teaduslikke ja tehnilisi küsimusi, ning võimalikust vajadusest katsemeetodit nende lisamiseks kohandada (4).
4. Käesolev katsemeetod on kavandatud piiratud hulga andmete saamiseks uuritava kemikaali mõju kohta isas- ja emasloomade paljunemisvõimele, näiteks sugunäärmete talitlusele, paaritumiskäitumisele, eostumisele, sügooti arengule ja sünnitamisele. See ei ole ette nähtud kasutamiseks olemasolevate katsemeetodite B.31, B.34, B.35 või B.56 alternatiivina ega nende asendamiseks.

LÄHTEKAALUTLUSED

5. Käesolevat sõeluuringumeetodit võib kasutada paljunemisvõimele ja/või arengule avalduva võimaliku mõju kohta esialgse teabe saamiseks kas kemikaalide toksikoloogiliste

omaduste hindamise varajases etapis või probleemsete kemikaalide uurimisel. Seda võib kasutada ka osana esialgsete sõeluuringute seeriast, mille abil hinnatakse olemasolevaid kemikaale, mille kohta on vähe või ei ole üldse toksikoloogilisi andmeid, samuti ulatuslikumate paljunemisvõimet/arengut käsitlevate uuringute jaoks annusevahemiku kindlaksmääramiseks ning muudel asjakohaseks peetavatel juhtudel. Uuringu tegemisel tuleks järgida juhtpõhimõtteid ja kaalutlusi, mis on esitatud OECD juhenddokumendis nr 19, milles käsitletakse ohutuse hindamiseks kasutatavatel katseloomadel avalduvate kliiniliste tunnuste kindlakstegemist, hindamist ja kasutamist humaanse sekkumise vajadusele viitavate näitajatena (5).

6. Käesolev katsemeetod ei võimalda saada ammendavat teavet kõikide paljunemisvõime ja arenguga seotud aspektide kohta. Eelkõige lubab see tuvastada sünnieelse kokkupuute tagajärjel sünnijärgselt avalduvaid ilminguid ja sünnijärgsest kokkupuutest tulenevat mõju üksnes piiratud ulatuses. Käesoleva meetodiga ei saa koguda tõendeid, mis lubaksid lõplikult kinnitada mõju puudumist; see on muu hulgas tingitud loomade suhteliselt väikesest arvust annuserühmades, lõppnäitajate selektiivsusest ja uuringu lühikesest kestusest. Täheledatavaid positiivseid tulemusi aga on võimalik muudest reproduktiiv-/arengutoksilisuse uuringutest saadavate andmete puudumisel kasutada esialgseks ohuhindamiseks ning need aitavad teha otsuseid täiendavate uuringute tegemise vajaduse ja selliste uuringute ajastuse kohta.
7. Sisesekreetsioonisüsteemiga seotud näitajaid käsitlevaid tulemusi tuleks vaadelda endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide uurimise ja hindamise OECD kontseptuaalse raamistiku (6) kontekstis. Nimetatud kontseptuaalses raamistikus on OECD täiendatud katsejuhendi nr 421 kohast meetodit käsitatud 4. taseme *in vivo* meetodina, mis võimaldab saada andmeid sisesekreetsioonisüsteemiga seotud lõppnäitajate kaudu tuvastatava kahjuliku mõju kohta. Sisesekreetsioonisüsteemist sõltuvat signaali ei pruugita eraldi võetuna siiski pidada piisavaks tõendiks selle kohta, et uuritava kemikaali puhul on tegemist endokriinfunktsiooni kahjustava kemikaaliga.
8. Käesoleva katsemeetodi puhul eeldatakse, et uuritavat kemikaali manustatakse suu kaudu. Muu manustamisviisi kasutamise korral võib olla vaja teha meetodis muudatusi.
9. Kui soovitakse saada kavandatud regulatiivsel eesmärgil andmeid segu kohta, tuleks enne katsemeetodi kasutamist kaaluda, kas ja kuidas see võimaldab saada kõnealusele eesmärgile vastavaid asjakohaseid tulemusi. Selline kaalumine ei ole vajalik, kui asjaomase segu hindamine on regulatiivse nõudega ette nähtud.
10. Kasutatud mõisted on määratletud 1. liites.

KATSE PÕHIMÕTE

11. Uuritavat kemikaali manustatakse astmeliselt suurenevates annustes mitme rühma isas- ja emasloomadele. Isasloomade puhul peaks manustamine toimuma vähemalt nelja nädala kestel kuni kavandatud surmamispäevale eelneva päevani, sealhulgas surmamiseelset päeval (see hõlmab vähemalt kahte paaritumiseelset nädalat, paaritumisperioodi ja umbes kahte paaritumisjärgset nädalat). Kuna isasloomadel on paaritumiseelne manustamisperiood piiratud kestusega, ei pruugi viljakus olla eriti tundlik munanditele avalduva mürgisuse näitaja. Seepärast on vaja teha munandite üksikasjalik histoloogiline analüüs. Kahe nädala pikkust paaritumiseelset manustamisperioodi koos järgneva paaritumise/viljakuse jälgimisega ning manustamisperioodi üldkestusega vähemalt neli nädalat, millele järgneb isaslooma sugunäärmete üksikasjalik histopatoloogiline analüüs, peetakse enamiku isasloomal täheldatavate viljakusele ja spermatogeneesile avalduva mõju ilmingute tuvastamiseks piisavaks.
12. Emasloomade puhul peaks manustamine toimuma kogu uuringu kestel. See hõlmab kahte paaritumiseelset nädalat (eesmärk on jälgida vähemalt kahte tervet innatsükli), eostumisele eelnevat varieeruva pikkusega ajavahemikku, tiinuse kestust ja vähemalt kolmeteistkümne päeva pikkust sünnitusjärgset perioodi, mis kestab kuni kavandatud surmamispäevale eelneva päevani ja hõlmab ka surmamiseelset päeva.
13. Kohanemisperioodile ja innatsükli manustamiseelsele hindamisele järgneva uuringu kestus sõltub emasloomade seisundist ning on umbes 63 päeva (vähemalt 14 päeva pikkune paaritumiseelne periood, (kuni) 14 päeva pikkune paaritumisperiood, 22 päeva pikkune tiinusperiood ja 13 päeva pikkune imetamisperiood).
14. Manustamisperioodi jooksul jälgitakse loomi iga päev hoolikalt mürgisusnähtude suhtes. Uuringu kestel surnud või surmatud loomad lahatakse ning uuringu lõpus surmatakse ja lahatakse ka ellujäänud loomad.

MEETODI KIRJELDUS

Loomaliigi valimine

15. Käesolev katsemeetod on kavandatud kasutamiseks rotil. Kui käesolevas katsemeetodis kirjeldatud näitajaid hinnatakse mõne muu liigi närilistel, tuleks seda üksikasjalikult põhjendada. Endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide kindlakstegemise rahvusvahelises valideerimisprogrammis, mille puhul on lähtutud OECD katsejuhendist nr 407 (see vastab käesoleva lisa peatükile B.7), kasutati ainsa liigina rotte. Ei tohiks kasutada liine, kus sigivus on väike või kus teadaolevalt esineb sageli arenguhäireid. Tuleks kasutada terveid varem paaritamata loomi, keda ei ole varem katsetes kasutatud. Katseloomi tuleks iseloomustada liigi, liini, soo, kehamassi ja vanuse järgi. Uuringu alguses peaksid kasutatavate loomade kehamassi erinevused olema minimaalsed ning mitte üle 20 % kummastki soost loomade keskmisest kehamassist. Kui uuring viiakse läbi

pikaajalise või tervet põlvkonda hõlmava uuringu eeluuringuna, tuleks mõlemas uuringus soovitatavalt kasutada samast liinist ja sama päritolu loomi.

Pidamis- ja söötmistingimused

16. Kõik katsetoimingud peaksid vastama kohalikele laboriloomade hooldamise normidele. Katseloomade ruumi temperatuur peaks olema 22 °C (± 3 °C). Ehkki suhteline õhuniiskus peaks olema vähemalt 30 % ja soovitatavalt mitte üle 70 %, v.a ruumi koristamise ajal, on sobivaim vahemik 50–60 %. Tuleks kasutada tehisvalgustust valgusrežiimiga 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust. Söötmiseks võib kasutada tavapärast laborisööta ja piiramatus koguses joogivett. Söödavalikut võib mõjutada vajadus tagada sööda sobivus uuritava kemikaali lisamiseks, kui kemikaali manustatakse sellisel viisil.
17. Loomade pidamisel tuleks kasutada väikesi samasooliste isendite rühmi; loomi võib pidada eraldi, kui see on teaduslikult põhjendatud. Rühmas pidamisel ei tohiks puuris olla rohkem kui viis looma. Paaritamine peaks toimuma selleks sobivas puuris. Tiined emasloomad tuleks paigutada igaüks eraldi puuri, kus on olemas pesamaterjal. Imetavad emasloomad paigutatakse igaüks eraldi puuri koos järglaskonnaga.
18. Sööta tuleks korrapäraselt analüüsida saasteainete suhtes. Asjaomase sööda proov tuleks kuni katseprotokolli lõpliku valmimiseni alles hoida.

Loomade ettevalmistamine

19. Terved noored täiskasvanud loomad jagatakse juhuvaliku alusel kontroll- ja katserühmadesse. Puurid paigutatakse nii, et puuri asukohast tingitud võimalik mõju oleks võimalikult väike. Loomad idenditakse üheselt ja neil lastakse enne uuringu algust puuris vähemalt viis päeva laboritingimustega kohaneda.

Annuste ettevalmistamine

20. Uuritavat kemikaali on soovitatav manustada suu kaudu, välja arvatud juhul, kui mõnda muud manustamisviisi peetakse sobivamaks. Uuritava kemikaali suukaudseks manustamiseks kasutatakse tavaliselt toitmissondi; selle asemel võib siiski kasutada ka sööda või joogiveega manustamist.
21. Vajaduse korral lahustatakse või suspendeeritakse uuritav kemikaal sobivas kandeaines. Kui vähegi võimalik, on soovitatav esmalt kaaluda vesilahuse või veepõhise suspensiooni ja seejärel õlilahuse/-emulsiooni (nt maisiõli) kasutamist ning pärast seda lahustamist mõnes muus kandeaines. Muu kandeaine kui vee puhul peaksid olema teada selle mürgisusnäitajad. Tuleks teha kindlaks uuritava kemikaali püsivus ja homogeensus kandeaines.

KATSE KÄIK

Loomade arv ja sugu

22. Soovitatavalt peaks igas rühmas olema alguses vähemalt 10 isaslooma ja 12–13 emaslooma. Emasloomi hinnatakse kokkupuute eel innatsükli alusel ja loomad, kelle innatsükkel erineb tavapärasest 4–5 päeva pikkusest tsüklist, jäetakse uuringust välja; seepärast on soovitatav kasutada suuremat arvu emasloomi, et igas rühmas oleks lõpuks 10 emaslooma. Eeldatavalt tiinestub igas rühmas vähemalt 8 emaslooma – seda peetakse tavapäraselt minimaalseks vastuvõetavaks tiinestumismääraks –, välja arvatud juhul, kui ilmneb märkimisväärne mürgine mõju. Eesmärk on saada piisav arv tiineid emasloomi, et oleks võimalik usaldusväärselt hinnata uuritava kemikaali võimet mõjutada viljakust, tiinust, ema- ja imetamiskäitumist ning F₁-põlvkonna järglaste kasvu ja arengut eostamisest kuni kolmeteistkümnenda sünnijärgse päevani.

Annused

23. Üldjuhul tuleks kasutada vähemalt kolme katserühma ja ühte kontrollrühma. Annuste valimisel võib lähtuda ägeda mürgisuse hindamise katsetega saadud andmetest või korduvannustamisel põhinevate uuringute tulemustest. Kontrollrühma loomi tuleks kohelda täpselt samal viisil kui katserühma loomi; ainus erinevus seisneb uuritava kemikaali manustamata jätmises. Kui uuritava kemikaali manustamisel kasutatakse kandeainet, tuleks võrdlusrühma loomadele manustada kandeainet suurimas kasutatavas koguses.
24. Annuste valimisel tuleks võtta arvesse kõiki kättesaadavaid mürgisusandmeid ja (toksiko)kineetilisi andmeid. Samuti tuleks arvesse võtta, et tiinete ja mittetiinete loomade tundlikkus võib olla erinev. Suurim annus tuleks valida nii, et kemikaal avaldaks mürgist mõju, kuid ei põhjustaks surma ega tõsiseid kannatusi. Seejärel tuleks valida rida järkjärgult vähenevaid annuseid, mis võimaldaksid tõendada mõju sõltuvust annusest ja teha väikseima annuse põhjal kindlaks täheldatava kahjuliku toime puudumise annuse (NOAEL). Sageli on optimaalne vähenevate annuste vaheline erinevus kahe- kuni neljakordne ning üksteisest väga palju (näiteks üle 10 korra) erinevate annuste kasutamise asemel on tihti soovitatav lisada neljas katserühm.
25. Kui täheldatakse üldist mürgisust (nt kehamassi vähenemine, mõju maksale, südamele, kopsudele või neerudele jne) või muid muutusi, mis ei pruugi olla tingitud mürgisusest (nt väiksem söödatarbimine, maksa suurenemine), tuleks täheldatud mõju sisesekreetsioonisüsteemiga seotud lõppnäitajatele tõlgendada ettevaatusega.

Piirsisalduskatse

26. Kui käesoleva meetodi kohaselt läbi viidud suukaudse manustamise uuringus, milles kasutatakse ainsa annusena annust vähemalt 1000 mg kehamassi kilogrammi kohta päevas või sööda või joogiveega manustamise korral sellega samaväärset protsentuaalset sisaldust söödas või joogivees, ei täheldata mürgist mõju ja kui mürgisus ei ole uuritava kemikaaliga

struktuurilt sarnaste ainetega saadud andmete põhjal ootuspärane, ei pruugita pidada mitme eri annusega täismahus uuringu tegemist vajalikuks. Piirsisalduskatse tulemused on kohaldatavad, kui inimese kokkupuutega seotud andmed ei viita vajadusele kasutada suukaudsel manustamisel suuremat annusemäära. Muu manustamisviisi korral, näiteks sissehingamise teel või naha kaudu manustamisel võib uuritava kemikaali füüsikaliskemilistest omadustest tulenevalt olla tihti vaja kasutada suurimat saavutatavat kontsentratsiooni.

Annuste manustamine

27. Uuritavat kemikaali manustatakse loomadele seitsmel päeval nädalas. Kui manustamiseks kasutatakse toitmissondi, tuleks kemikaali loomadele manustada ühe annusena maossondi või sobiva intubeerimiskanüüli abil. Suurim korraga manustatav vedelikukogus sõltub katselooma suurusest. See kogus ei tohiks olla suurem kui 1 ml 100 g kehamassi kohta, välja arvatud vesilahuse puhul, mida võib manustada koguses 2 ml 100 g kehamassi kohta. Katses kasutatava vedelikukoguse varieeruvuse minimeerimiseks tuleks reguleerida uuritava kemikaali kontsentratsiooni nii, et lahuse maht oleks kõikide annuste puhul ühesugune; see ei ole nõutav ärritava või söövitava uuritava kemikaali puhul, mille mõju kontsentratsiooni suurenedes tavaliselt tugevneb.
28. Sööda või joogiveega manustatava uuritava kemikaali puhul on oluline tagada, et seda kasutatakse koguses, mis ei muuda tavapärast toitumise või joogivee tarbimise tasakaalu. Kui uuritavat kemikaali manustatakse söödaga, võib kasutada kas muutumatut kontsentratsiooni söödas (ppm) või looma kehamassi suhtes muutumatut annusemäära; tuleks täpsustada, kumba võimalust kasutatakse. Toitmissondi kaudu manustatava uuritava kemikaali puhul peaks manustamine toimuma igal päeval sarnasel kellaajal ning annusemäära tuleks vähemalt kord nädalas kohandada, et see püsiks looma kehamassi suhtes muutumatuna.

Katse ajakava

29. Annuste manustamist tuleks kummagi soo puhul alustada vähemalt kaks nädalat enne paaritamist pärast seda, kui loomadel on lastud vähemalt viis päeva kohaneda ja emasloomi on hinnatud lähtuvalt innatsükli tavapärasest kestusest (töötlemiseelse kahe nädala pikkuse perioodi vältel). Uuringu ajakava peaks olema selline, et innatsükli hindamist alustatakse varsti pärast seda, kui loomad on saanud täielikult suguküpseks. See aeg võib olla eri rotiliinidel ja eri laborites veidi erinev: näiteks Sprague Dawley rottidel saabub suguküpsus 10 nädala vanuses ja Wistari rottidel umbes 12 nädala vanuses. Järglastega emasloomad tuleks surmata 13. sünnitusjärgsel päeval või veidi hiljem. Sünnitamispäeva (päev, mil sünnitus lõpeb) loetakse sünnitusjärgseks 0-päevaks. Emasloomad, kellel ei täheldata paaritumise ilminguid, surmatakse 24–26 päeva pärast paaritumisperioodi viimast päeva. Paaritumisperioodi vältel jätkatakse kummaski soost loomadele kemikaali manustamist. Isasloomadele manustamist tuleks paaritumisperioodi

järgselt jätkata vähemalt seni, kuni manustamisperioodi algusest on möödunud kokku minimaalselt 28 päeva. Seejärel loomad surmatakse või teise võimalusena jätkatakse neile kemikaali manustamist, et viia võimaluse korral läbi teine paaritamine, kui seda peetakse asjakohaseks.

30. Tiinestunud emasloomade puhul tuleks igapäevast manustamist jätkata kogu tiinuse vältel ning vähemalt kuni 13. sünnitusjärgse päevani, sealhulgas nimetatud päeval, või kuni surmamiseelse päevani. Uuringute puhul, kus uuritavat kemikaali manustatakse sissehingamise teel või naha kaudu, tuleks manustamist jätkata vähemalt kuni 19. tiinuspäevani, sealhulgas nimetatud päeval, ning taasalustada seda võimalikult varakult ja mitte hiljem kui 4. sünnitusjärgsel päeval.
31. Katse skemaatiline ajakava on esitatud 2. liites.

Paaritamine

32. Käesoleva meetodi kohases uuringus tuleks üldjuhul kasutada paaritamisel suhet 1 : 1 (üks isasloom ühe emaslooma kohta). Erandi võib teha juhul, kui isasloomad juhtuvad surema. Emaslooma tuleks hoida sama isaslooma juures seni, kuni täheldatakse paaritumise ilminguid või on möödunud kaks nädalat. Emasloomi tuleks igal hommikul uurida sperma või tupekorgi esinemise suhtes. Tiinuse 0-päevaks loetakse päeva, mil paaritumise toimumine leiab kinnitust (leitakse tupekork või spermat). Kui paaritamine ebaõnnestub, võib kaaluda emaslooma uuesti paaritamist sama rühma viljakaks osutunud isasloomaga.

Pesakonna suurus

33. Neljandal sünnijärgsel päeval võib iga pesakonna suurust korrigeerida; selleks kõrvaldatakse juhuvaliku alusel üleliigsed järglased nii, et pesakonda jääks sõltuvalt kasutatava rotiliini puhul tavapärasest pesakonna suurusest võimalikult täpselt neli või viis järglast kummagi soo kohta. Üleliigsetest järglastest kahelt tuleks võtta vereproov, moodustada nendest koondproov ja kasutada seda seerumi T₄-sisalduse määramiseks. Järglaste selektiivne kõrvaldamine, näiteks kehamassi või anogenitaalse vahemaa (AGD) alusel, ei ole sobiv. Kui emaste või isaste järglaste arv ei võimalda jätta pesakonda nelja või viit järglast kummaski soost, on vastuvõetav ka osaline korrigeerimine (nt kuus isast ja neli emast). Kui pesakond jääks kõrvaldamise tagajärjel väiksemaks kui kõrvaldamisega saavutatav soovitud sihtarv (8 või 10 järglast pesakonna kohta), ei kõrvaldata ühtki järglast. Kui kõrvaldamisega saavutatava soovitud sihtarvuga võrreldes on üle ainult üks järglane, kõrvaldataksegi vaid üks järglane, kellelt võetakse vereproov võimalikuks seerumi T₄-sisalduse hindamiseks.
34. Kui pesakonna suurust ei korrigeerita, surmatakse 4. sünnijärgsel päeval igast pesakonnast kaks järglast ning neilt võetakse vereproov seerumi kilpnäärmehormoonisisalduse mõõtmiseks. Võimaluse korral peaksid kõnealused kaks järglast igast pesakonnast olema emased, et võimaldada isaste järglaste kasutamist nisade esinemise hindamiseks; see

soovitus ei kehti juhul, kui kõnealuse kahe järglase eemaldamisel ei jääks pesakonda ühtki emast, keda uuringu lõpus hinnata. Kui pesakonda jääks kõrvaldamise tagajärjel vähem kui 8 või 10 järglast (olenevalt kasutatava rotiliini puhul tavapärasest pesakonna suuruselt), ei kõrvaldata ühtki järglast. Kui pesakonna tavapärase suurusega võrreldes on üle ainult üks järglane, kõrvaldataksegi vaid üks järglane, kellelt võetakse vereproov võimalikuks seerumi T₄-sisalduse hindamiseks.

Elusloomadel tehtavad vaatlused

Kliinilised vaatlused

35. Üldisi kliinilisi vaatlusi tuleks kogu uuringuperioodi vältel teha vähemalt kord päevas ja mürgisusnähtude ilmnemisel sagedamini. Vaatlusi tuleks soovitatavalt teha igal päeval samal ajal või samadel aegadel; seejuures tuleks võtta arvesse manustamisjärgse eeldatava mõju maksimaalse avaldumise aega. Tuleks registreerida asjakohased muutused käitumises, raskele või kauakestnud sünnitusele viitavad ilmingud ja kõik mürgisusnähud, sealhulgas suremus. Registreeritavad andmed peaksid hõlmama mürgisusnähtude esinemise algusaega, ulatust ja kestust.

Kehamass ja sööda/vee tarbimine

36. Isas- ja emasloomi tuleks kaaluda esimesel manustamispäeval ning seejärel vähemalt kord nädalas, samuti surmamise ajal. Tiinuse ajal tuleks emasloomi kaaluda tiinuse 0-päeval, 7., 14. ja 20. päeval, samuti tuleks neid kaaluda 24 tunni jooksul pärast sünnitust (sünnitusjärgsel 0-päeval või 1. päeval) ning vähemalt 4. ja 13. sünnitusjärgsel päeval. Nimetatud vaatluste tulemused tuleks esitada eraldi iga täiskasvanud looma kohta.
37. Paaritumiseelsel perioodil ning tiinuse ja imetamise ajal tuleks söödatarbimist mõõta vähemalt kord nädalas. Paaritumisperioodil ei ole söödatarbimise mõõtmine kohustuslik. Kui uuritavat kemikaali manustatakse joogiveega, tuleks eelnimetatud perioodidel mõõta ka veetarbimist.

Innatsükkel

38. Enne töötlemise alustamist tuleks jälgida innatsükli ning valida selle alusel uuringusse emasloomad, kelle tsükkel on korrapärane (vt punkt 22). Tupeäideid tuleks igapäevaselt hinnata ka alates töötlemisperioodi algusest kuni paaritumise ilmingute tuvastamiseni. Kui on kahtlus, et innatsükkel võib pärast manustamise alustamist ägeda stressi mõjul muutuda, võib katseloomi laboris 2 nädala vältel uuritava kemikaaliga töödelda ning seejärel koguda paaritumiseelsel perioodil innatsükli jälgimiseks vähemalt kahe nädala jooksul iga päev tupeäideid ja jätkata jälgimist ka paaritumisperioodil, kuni täheldatakse paaritumise ilminguid. Tupe-/emakakaelarakkude võtmisel tuleks olla ettevaatlik, et mitte kahjustada limaskesta, kuna see võib põhjustada pseudotiinuse teket (7, 8).

Järglastega seotud näitajad

39. Tiinuse kestus tuleks registreerida; selle arvutamisel lähtutakse tiinuse 0-päevast. Iga pesakonda tuleks pärast sündi võimalikult varakult hinnata, et teha kindlaks järglaste arv ja sugu, surnultsünnid, elussünnid, kängunud järglaste (vastavatest kontrolljärglastest palju väiksemate järglaste) arv ja silmaga nähtavate kõrvalekallete esinemine.
40. Elus järglased tuleks loendada ja määrata nende sugu ning pesakonda tuleks kaaluda 24 tunni jooksul pärast sünnitust (sünnitusjärgsel 0-päeval või 1. päeval) ning vähemalt 4. ja 13. sünnitusjärgsel päeval. Peale punktis 35 kirjeldatud vaatluste tulemuste tuleks registreerida ka kõik järglaste ebatavalise käitumise ilmingud.
41. Kõikidel järglastel tuleks ajavahemikul sünnijärgsest 0-päevast kuni 4. sünnijärgse päevani mõõta ühel ja samal päeval AGD. Järglaste kehamassi andmed tuleks koguda AGD mõõtmise päeval ja AGD tuleks normaliseerida järglase suurust kajastava näitaja, soovitatavalt kehamassi kuupjuure suhtes (9). Isastel järglastel tuleks 12. või 13. sünnijärgsel päeval loendada nisade/areoolide arv, nagu on soovitatud OECD katsejuhendis nr 151 (10).

Kliiniline biokeemiline analüüs

42. Vereproovid võetakse kindlaksmääratud kohast järgmise kava alusel:

- igas pesakonnas vähemalt kahelt järglaselt 4. sünnijärgsel päeval, kui järglaste arv seda võimaldab (vt punktid 33–34),
- kõikidelt järglastega emasloomadelt ja igas pesakonnas vähemalt kahelt järglaselt surmamise ajal 13. päeval ning
- kõikidelt täiskasvanud isasloomadelt surmamise ajal.

Kõiki vereproove säilitatakse sobivates tingimustes. Järglastelt 13. päeval võetud vereproovides ja täiskasvanud isasloomade vereproovides analüüsitakse kilpnäärmehormoonide (T₄) sisaldust seerumis. Kui see on asjakohane, hinnatakse T₄ sisaldust ka järglastega emasloomade vereproovides ja järglastelt 4. päeval võetud vereproovides. Kui see on asjakohane, võib soovi korral mõõta ka muude hormoonide sisaldust. Järglaste vere võib kilpnäärmehormoonide analüüsimiseks pesakonnakaupa kokku koondada. Soovitatavalt tuleks mõõta kilpnäärmehormoonide (T₄ ja TSH) üldsisaldust.

43. Hormoonide määramisel võivad varieeruvust ja absoluutset kontsentratsiooni mõjutada järgmised tegurid:
- surmamise aeg tulenevalt asjaolust, et hormoonide kontsentratsioon ööpäeva jooksul muutub;
 - surmamisviis – tuleks hoiduda tekitamast loomadele tarbetut stressi, mis võib mõjutada hormoonide kontsentratsiooni;

- hormoonide määramise komplektid, milles kasutatavad standardkõverad võivad olla erinevad.

44. Konkreetset hormoonide määramiseks ette nähtud eri plasmaproovid tuleks koguda umbes samal kellaajal. Hormoonisisalduse analüüsimisel saadavad arvvaartused on müügil olevate eri katsekomplektide puhul erinevad.

Patoloogiline analüüs

Täielik lahkamine

45. Surmatud või uuringu vältel surnud täiskasvanud loomi tuleks kohe pärast surma makroskoopiliselt uurida mis tahes kõrvalekallete või patoloogiliste muutuste suhtes. Erilist tähelepanu tuleks pöörata reproduktiivsüsteemi elunditele. Tuleks registreerida pesastumiskohtade arv. Lahkamispäeva hommikul tuleks analüüsida tupeäiet, et teha kindlaks innatsükli etapp ja võimaldada korreleerimist munasarja histopatoloogilise analüüsi tulemustega.
46. Kõikide täiskasvanud isasloomade munandid ja munandimanused ning eesnääre ja seemnepõiekesed koos koagulatsiooninäärmetega tuleks vajaduse korral vabastada nende külge jäänud kudedest ja kuivamise ärahoidmiseks tuleks elundite märgmass määrata võimalikult kiiresti pärast nende väljalõikamist. Peale selle võib soovi korral kaaluda isasloomade puhul sellised elundid nagu pärakutõsturlihase ja sibulakäsnkeha-lihase kompleks, Cowperi näärmed ja sugutilukk ning emasloomade puhul munasarjade paar (märgmass) ja emakas (koos emakakaelaga); kui seda tehakse, peaks kaalumise toimuma võimalikult kiiresti pärast elundite väljalõikamist.
47. Surnud järglasi ja 13. sünnijärgsel päeval või varsti pärast seda surmatud järglasi tuleks miinimumnõudena väliselt hoolikalt uurida silmaga nähtavate kõrvalekallete suhtes. Erilist tähelepanu tuleks pöörata välistele suguelunditele, mida tuleks uurida arenguhäirete ilmingute suhtes. Kolmeteistkümnendal sünnijärgsel päeval tuleks võtta säilitamiseks kilpnääre iga pesakonna ühelt isaselt ja ühelt emaselt järglaselt.
48. Samuti tuleks säilitada kõikide täiskasvanud loomade munasarjad, munandid, suguelundid (emakas ja emakakael, munandimanused, eesnääre, seemnepõiekesed koos koagulatsiooninäärmetega), kilpnääre ja kõik makroskoopiliste kahjustustega elundid. Munandite ja munandimanuste tavapärasel analüüsil ei soovitata kasutada fikseerimist formaliiniga. Nende kudede puhul võib vastuvõetava meetodina kasutada Bouini fikseerimislahust või muudetud Davidsoni lahust (11). Fikseerimislahuse kiire sissetungimise võimaldamiseks võib elundi kummaski otsas valkjaskesta ettevaatlikult väikese sügavuseni nõelaga läbi torgata.

Histopatoloogiline analüüs

49. Suurima annusega töödeldud rühma ja kontrollrühma loomade puhul tuleks viia läbi munasarjade, munandite ja munandimanuste üksikasjalik histoloogiline uuring (seejuures tuleks pöörata erilist tähelepanu spermatogeneesi etappidele ja munandite interstitsiaalrakustruktuuri histopatoloogilisele analüüsile). Vajaduse korral võib uurida ka teisi säilitatud elundeid, sealhulgas järglastelt ja täiskasvanud loomadelt saadud kilpnääret. Kilpnäärme massi võib määrata pärast fikseerimist. Liigsed koed tuleks samuti eemaldada väga ettevaatlikult alles pärast fikseerimist, et kudesid mitte kahjustada. Koekahjustus võib mõjutada histopatoloogilise analüüsi tulemusi. Kui suurima annusega töödeldud rühmas täheldatakse muutusi, peaks analüüs hõlmama ka teiste annuserühmade loomi. Täiendav üksikasjalik teave sisesekretsioonisüsteemi kudede väljalõikamise, fikseerimise, neist lõikude tegemise ja nende histopatoloogilise analüüsi kohta on esitatud histopatoloogilise analüüsi juhendis (11).

ANDMED JA ARUANDLUS

Andmed

50. Andmed tuleks esitada iga looma kohta eraldi. Peale selle tuleks esitada kõik andmed kokkuvõtliku tabeli kujul, kus on iga katserühma puhul toodud ära loomade arv katse alguses, katse käigus surnud või humaansetel kaalutlustel surmatud loomade arv ning surma või humaanse surmamise aeg, viljakate loomade arv, tiinete emasloomade arv, mürgisusnähtudega loomade arv, mürgisusnähtude kirjeldus, sealhulgas mürgise mõju ilmnemisaeg, kestus ja tugevus, histopatoloogiliste muutuste liik ja kõik asjakohased andmed pesakonna kohta. Paljunemisele/arengule avalduva mõju hindamiseks väga kasulikuks osutunud aruandevorm kokkuvõtliku tabeli kujul on esitatud 3. liites.
51. Uuringu piiratud ulatusest tulenevalt on tulemuste olulisuse tuvastamiseks tehtava statistilise analüüsi väärtus paljude lõppnäitajate, eelkõige paljunemisega seotud lõppnäitajate puhul piiratud. Statistilise analüüsi kasutamisel tuleks valida meetod, mis on uuritava muutuja väärtuste jaotuse analüüsimiseks sobiv, ning see valik tuleks teha enne uuringu alustamist. AGD ja nisade esinemise statistiline analüüs peaks põhinema iga üksiku järglase andmetel ning seejuures tuleks arvesse võtta pesakonnas ilmnevat mõju. Vajaduse korral käsitatakse analüüsiüksusena pesakonda. Järglaste kehamassi statistiline analüüs peaks põhinema iga üksiku järglase andmetel ning seejuures tuleks arvesse võtta pesakonna suurust. Ühtlasi võib rühmade väiksusest tulenevalt olla kasulik kasutada uuringutulemuste tõlgendamise hõlbustamiseks varasemaid kontrollidega saadud andmeid (nt pesakonna suuruse kohta), kui need on olemas.

Tulemuste hindamine

52. Käesoleva meetodi kohase mürgisusuuringu tulemusi tuleks hinnata lähtuvalt täheldatud mõjust, lahkamistulemustest ja mikroskoopilistest leidudest. Hindamine hõlmab seose kindlakstegemist uuritava kemikaali annuse ja kõrvalekallete – sealhulgas silmaga

nähtavate kahjustuste, tuvastatud sihtelunditele avalduva mõju, viljatuse, kliiniliste kõrvalekallete, paljunemisvõimele ja pesakonnale avalduva mõju, kehamassi muutuste, suremusele avalduva mõju ja mis tahes muu mürgise mõju – esinemise või puudumise, esinemissageduse ja raskusastme vahel.

53. Isasloomade töötlemise lühiajalisuse tõttu tuleks isasloomade paljunemisele avalduva mõju hindamisel vaadelda munandite ja munandimanuste histopatoloogilise analüüsi tulemusi koos viljakusandmetega. Ühtlasi võib uuringutulemuste tõlgendamise hõlbustamiseks olla kasulik kasutada kontrollidega saadud varasemaid paljunemist/arengut käsitlevaid andmeid (nt pesakonna suuruse, AGD, nisade esinemise või seerumi T₄-sisalduse kohta), kui need on olemas.
54. Kvaliteedikontrolli eesmärgil on soovitatav koguda kontrollle käsitlevaid varasemaid andmeid ja arvutada arvandmete jaoks variatsioonikordajad, eriti näitajate puhul, mis on seotud endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide kindlakstegemisega. Neid andmeid võib kasutada võrdlusalusena käsiloleva uuringu tulemuste hindamiseks.

Katseprotokoll

55. Katseprotokollis tuleks esitada järgmine teave.

Uuritav kemikaal:

- allikas, partii number, aegumiskuupäev, kui on olemas;
- uuritava kemikaali püsivus, kui see on teada;

ühest koostisosast koosnev aine:

- füüsiline välimus, lahustuvus vees ja muud asjakohased füüsikalised-keemilised omadused;
- kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus, CASi number, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem, puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne;

mitut koostisosa sisaldav aine, UVCB või segu:

- võimalikult täpne omaduste kirjeldus lähtuvalt koostisosade keemilisest määratlusest (vt eespool), kvantitatiivsest sisaldusest ja asjakohastest füüsikalised-keemilistest omadustest.

Kandeaaine (vajaduse korral):

- kandeaaine valimise põhjendus, kui kandeaaine ei ole vesi.

Katseloomad:

- kasutatud liik/liin;
- loomade arv, vanus ja sugu;

- päritolu, pidamistingimused, söötmisandmed jne;
- iga looma kehamass katse alguses;
- liigi valimise põhjendus, kui katseloom ei ole rott.

Katsetingimused:

- annuste valimise põhjendus;
- üksikasjad uuritava kemikaali valmistise / söödavalmistise, saavutatud kontsentratsioonide ning valmistise püsivuse ja homogeensuse kohta;
- uuritava kemikaali manustamise üksikasjad;
- vajaduse korral andmed söödas/joogivees sisalduva uuritava kemikaali kontsentratsiooni (ppm) teisendamiseks tegelikuks annuseks (mg kehamassi kilogrammi kohta päevas);
- sööda ja vee kvaliteedi üksikasjad;
- järglaste surmamise korral üksikasjalik kirjeldus surmatavate järglaste juhusliku valimise korra kohta.

Tulemused:

- kehamass / kehamassi muutused;
- söödatarbimine ja veetarbimise andmed, kui need on olemas;
- mürgise mõju andmed kummagi soo ja iga annusemäära kohta, sealhulgas viljakusele ja tiinusele avalduva mõju ning mis tahes muude mürgisusnähtude kohta;
- tiinuse kestus;
- mürgisus või muu mõju paljunemisele, järglastele, sünnijärgsele kasvule jne;
- kliiniliste ilmingute laad, raskusaste ja kestus (nähtude pöördumus või pöördumatus);
- normaalse või ebanormaalse innatsükliga täiskasvanud emasloomade arv ja tsükli kestus;
- elussündide arv ja pesastumisjärgne kadu;
- järglaste kehamassi andmed;
- iga järglase AGD (ja kehamass AGD mõõtmise päeval);
- nisade esinemine isastel järglastel;
- kilpnäärmehormoonide sisaldus järglastelt 13. päeval võetud proovides ja täiskasvanud isasloomade proovides (ning järglastega emasloomade proovides ja järglastelt 4. päeval võetud proovides, kui seda on mõõdetud);
- silmaga nähtavate kõrvalekalletega järglaste arv, väliste suguelundite makroskoopilise hindamise tulemused, kängunud järglaste arv;

- katse vältel suremise aeg või teave selle kohta, et loomad olid kuni surmamiseni elus;
- pesastunud embrüote arv, pesakonna suurus ja pesakonna kaal mõõtmishetkel;
- andmed järglastega loomade kehamassi kohta surmamise hetkel ning selliste loomade elundite massi kohta;
- lahkamistulemused;
- histopatoloogiliste leidude üksikasjalik kirjeldus;
- andmed absorbeerumise kohta (kui on olemas);
- vajaduse korral tulemuste statistilise analüüsi andmed.

Tulemuste arutelu

Järeldused

Tulemuste tõlgendamine

56. Kirjeldatud uuring võimaldab hinnata annuste korduval manustamisel täheldatavat paljunemisele/arengule avalduvat mürgist mõju (vt punktid 5 ja 6). Saadud tulemused võivad viidata vajadusele teha täiendavaid uuringuid ja hõlbustavad järgnevate uuringute kavandamist. Paljunemise ja arenguga seotud tulemuste hõlpsamaks tõlgendamiseks tuleks tutvuda OECD juhenddokumendiga nr 43 (12). Käesoleva katsemeetodi puhul võib olla kasu närilistega tehtavate sisesekretsioonisüsteemi ja paljunemisega seotud katsete tulemuste histoloogilist hindamist käsitlevas OECD juhenddokumendis nr 106 (11) esitatud teabest (sisesekretsiooni)elundite ja tupeäiete ettevalmistamise ja hindamise kohta.

KIRJANDUS

- (1) OECD (1990). Kemikaalide töörühma ja halduskomitee 14. ühiskoosoleku koosolekudokument nr 1. Taotluse korral kättesaadav Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioonist Pariisis.
- (2) OECD (1992). Ajutise eksperdirühma esimehe aruanne reproduktiivtoksilisust käsitlevate sõeluuringumeetodite alase koosoleku kohta. Tokyo, 27.–29. oktoober 1992. Taotluse korral kättesaadav Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioonist Pariisis.
- (3) OECD (1998). Endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide uurimise ja hindamise (EDTA) OECD rakkerühma esimese koosoleku aruanne. 10.–11. märts 1998. Taotluse korral kättesaadav Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioonist Pariisis.
- (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. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (5) 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. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (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. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (7) Goldman, J. M., Murr, A. S., ja Cooper, R. L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies. *Birth Defects Res. B* 80(2): 84–97.
- (8) Sadleir, R. M. F. S. (1979). Cycles and Seasons. Väljaandes: Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization. Auston, C. R., ja Short, R. V. (toim.), Cambridge, New York.
- (9) Gallavan, R. H. Jr., Holson, J. F., Stump, D. G., Knapp, J. F., ja Reynolds, V. L. (1999). Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights. *Reprod. Toxicol.* 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. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

- (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 No. 106. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (12) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 43. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

1. liide

MÕISTED (VT KA OECD JUHENDDOKUMENT NR 150 (6))

Androgeensus – kemikaali võime toimida imetaja organismis samal viisil kui looduslik androgeen (nt testosteroon).

Annus – manustatav uuritava kemikaali kogus. Annust väljendatakse uuritava kemikaali kogusena massiühikutes katselooma kehamassi ühiku kohta päevas (näiteks milligrammides kehamassi kilogrammi kohta päevas) või kemikaali püsiva kontsentratsioonina söödas.

Annustamine – üldmõiste, mis hõlmab annust, selle manustamise sagedust ja annustamise kestust.

Antiandrogeensus – kemikaali võime pärssida imetaja organismis loodusliku androgeeni (nt testosterooni) toimet.

Antitüreoidne aktiivsus – kemikaali võime pärssida imetaja organismis loodusliku kilpnäärmehormooni (nt T₃) toimet.

Antiöstrogeensus – kemikaali võime pärssida imetaja organismis loodusliku östrogeeni (nt 17β-östradioli) toimet.

Arengutoksilisus – reproduktiivtoksilisuse ilming, mis avaldub järglaste sünnieelse, perinataalse või sünnijärgse struktuuri- või funktsioonihäirena.

Emale avalduv mürgisus – tiinele emasloomale avalduv kahjulik mõju, mis on spetsiifiline (otsene mõju) või mittespetsiifiline (kaudne mõju).

Ilmne mürgisus – üldmõiste, mille abil kirjeldatakse uuritava kemikaali manustamise järel täheldatavaid selgeid mürgisusnähte. Kõnealused nähud peaksid olema ohu hindamiseks piisavad ja sellised, et manustatava annuse suurendamisega kaasnevad eeldatavalt tõsised mürgisusnähud ja tõenäoliselt ka surm.

Kemikaal – aine või segu.

NOAEL – lühend, millega tähistatakse annusemäära, mille juures ei täheldata kahjulikku toimet. Tegemist on suurima annusega, mis ei põhjusta manustamisest tingitud kahjulikke ilminguid.

Reproduktiivtoksilisus – kahjulik mõju järglastele ja/või isas- või emasloomade paljunemiskõhale või paljunemisvõimele.

Türeoidne aktiivsus – kemikaali võime toimida imetaja organismis samal viisil kui looduslik kilpnäärmehormoon (nt T₃).

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

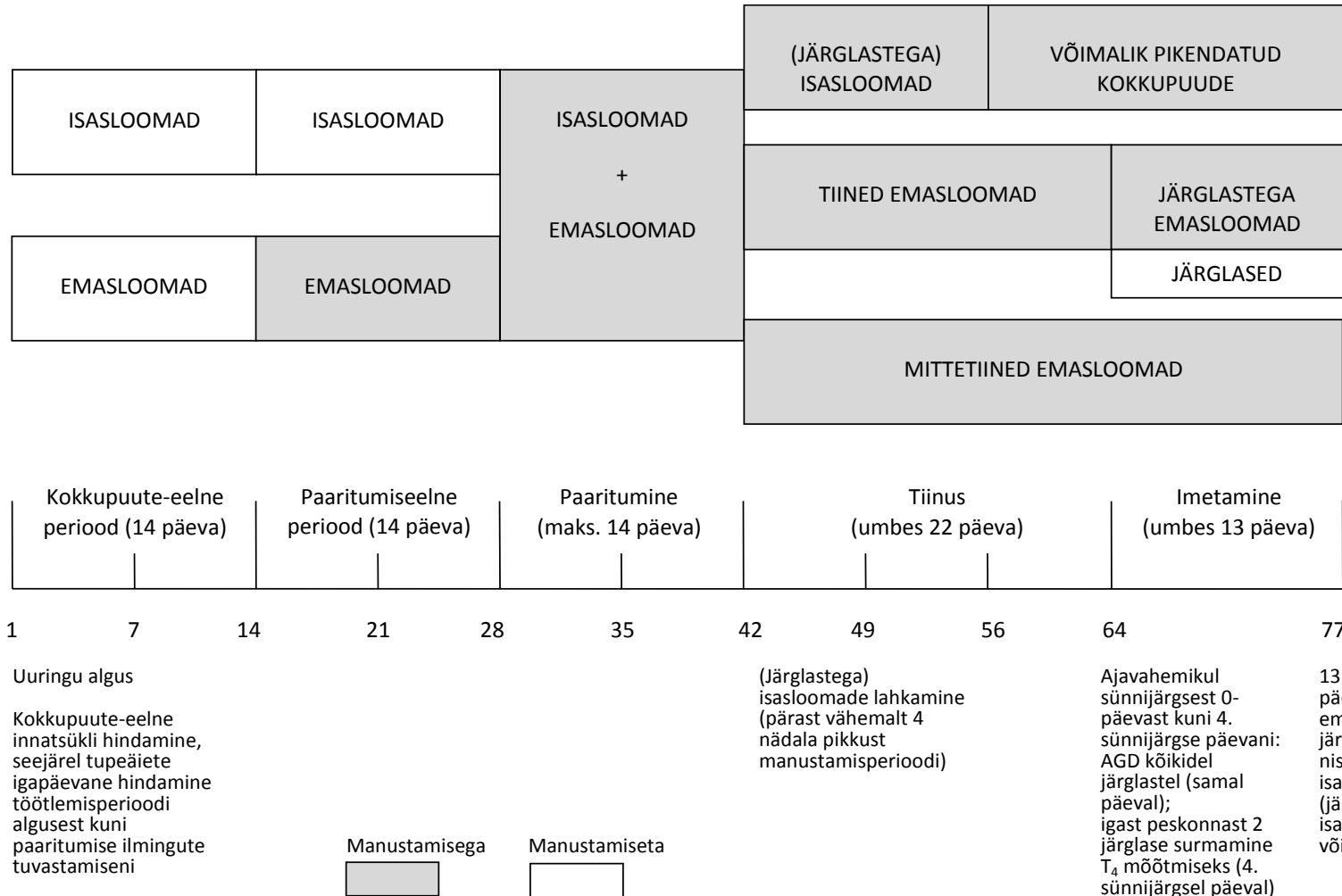
Valideerimine – teaduslik protsess, mille eesmärk on iseloomustada katsemeetodi rakendamisega seotud nõudeid ja piiranguid ning tõendada meetodi usaldusväärsust ja sobivust konkreetsel eesmärgil kasutamiseks.

Viljakuse vähenemine – isas- või emaslooma paljunemise funktsiooni häire või paljunemisvõime langus.

Östrogeensus – kemikaali võime toimida imetaja organismis samal viisil kui looduslik östrogeen (nt 17β -östradiool).

2. liide

UURINGU MAKSIMUMKESTUSELE VASTAV TÄISPIKAL 14-PÄEVASEL PAARITUMISPERIOODIL PÕHINEV KATSE SKEMAATILINE AJAKAVA



3. liide

TABELI KUJUL KOKKUVÕTLIK ARUANNE PALJUNEMISELE/ARENGULE AVALDUVA MÕJU KOHTA

VAATLUSED	VÄÄRTUSED				
Annus (ühik)	0 (kontroll)	...	...	...	...
Paaride arv katse alguses (<i>N</i>)					
Innatsükkel (vähemalt keskmine pikkus ja ebaregulaarsete tsüklite esinemissagedus)					
Emasloomad, kellel täheldatakse paaritumise ilminguid (<i>N</i>)					
Tiinestunud emasloomad (<i>N</i>)					
Eostunud 1.–5. päeval (<i>N</i>)					
Eostunud 6.–.... ⁽¹⁾ päeval (<i>N</i>)					
Tiinuse kestus ≤ 21 päeva (<i>N</i>)					
Tiinuse kestus 22 päeva (<i>N</i>)					
Tiinuse kestus ≥ 23 päeva (<i>N</i>)					
Elusalt sündinud järglastega emasloomad (<i>N</i>)					
4. sünnijärgse päevani elus püsinud järglastega emasloomad (<i>N</i>)					
Pesastunud embrüote arv tiinestunud emaslooma kohta (keskmine)					
Elussündide arv järglastega emaslooma kohta (keskmine)					
4. päevani elus püsinud järglaste arv järglastega emaslooma kohta (keskmine)					
Sugude vahekord (isased/emased) sünnihetkel (keskmine)					
Sugude vahekord (isased/emased) 4. päeval (keskmine)					
Pesakonna kaal sünnihetkel (keskmine)					

⁽¹⁾ Paaritumisperioodi viimane päev.

Pesakonna kaal 4. päeval (keskmine)					
Järglaste kehamass sünnihetkel (keskmine)					
Järglaste kehamass AGD mõõtmise hetkel (isasloomade keskmine, emasloomade keskmine)					
Järglaste AGD samal sünnijärgsel päeval ajavahemikul sündimispäevast kuni 4. päevani (isasloomade keskmine, emasloomade keskmine; märkida sünnijärgne mõõtmispäev)					
Järglaste kehamass 4. päeval (keskmine)					
Nisade esinemine isastel järglastel 13. päeval (keskmine)					
Järglaste kehamass 13. päeval (keskmine)					
KÕRVALEKALLETEGA JÄRGLASED					
Järglastega emasloomad, kellel on 0 kõrvalekalletega järglast					
Järglastega emasloomad, kellel on 1 kõrvalekalletega järglane					
Järglastega emasloomad, kellel on ≥ 2 kõrvalekalletega järglast					
JÄRGLASTE KADU					
Sünnieelne/pesastumisjärgne (pesastunud embrüote arvu ja elussündide arvu vahe)					
0 järglast kaotanud emasloomad					
1 järglast kaotanud emasloomad					
2 järglast kaotanud emasloomad					
≥ 3 järglast kaotanud emasloomad					
Sünnijärgne (elussündide arvu ja 13. sünnijärgse päevani elus püsinud järglaste arvu vahe)					
0 järglast kaotanud emasloomad					
1 järglast kaotanud emasloomad					
2 järglast kaotanud emasloomad					
≥ 3 järglast kaotanud emasloomad					

B.64. REPRODUKTIIV-/ARENGUTOKSILISUSE SÕELUURINGUT HÕLMAV KORDUVANNUSTAMISEL PÕHINEV MÜRGISUSUURING

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 422 (2016). Kemikaalide uurimist käsitlevaid OECD katsejuhendeid vaadatakse teaduse arengu arvessevõtmiseks korrapäraselt läbi. Algne sõeluuringut käsitlev katsejuhend nr 422 võeti vastu 1996. aastal ühe reprodutiiv-/arengutoksilisuse hindamist hõlmava korduvannustamisel põhineva sõeluuringu katse-eeskirja põhjal, mida arutati kahel ekspertide koosolekul, mis toimusid 1990. aastal Londonis (1) ja 1992. aastal Tokyos (2).
2. Käesoleva katsemeetodi puhul on reprodutiiv-/arengutoksilisuse sõeluuring, mis põhineb liikmesriikides suures mahus toodetavate olemasolevate kemikaalide hindamiseks kasutatud algse meetodiga omandatud ja positiivseid kontrollaineid hõlmavatest ettevalmistavatest katsetest saadud kogemustel (3, 4), ühendatud korduvannustamisel avalduva mürgisuse uuringuga, mis on kooskõlas OECD katsejuhendiga nr 407 (sellele vastab käesoleva lisa peatükk B.7 „Suukaudse kordusdoosi toksilisuse 28-päevane uuring närilistel“).
3. Käesolevat katsemeetodit on ajakohastamise eesmärgil täiendatud endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide uurimiseks sobivate lõppnäitajatega, mis lisati järeelmeetmena lähtuvalt prioriteetsest tegevussuunast, mille OECD käivitas 1998. aastal eesmärgiga vaadata läbi olemasolevad ja töötada välja uued katsejuhendid, et võimaldada sõeluuringute tegemist võimalike endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide tuvastamiseks ja selliste kemikaalide hindamist (5). Selles kontekstis täiendati 2008. aastal katsejuhendit nr 407 (sellele vastab käesoleva lisa peatükk B.7) parameetritega, mis sobivad uuritavate kemikaalide endokriinse toime tuvastamiseks. Katsejuhendi nr 422 ajakohastamise eesmärk oli lisada sõeluuringut käsitlevasse juhendisse teatavad endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide uurimiseks sobivad lõppnäitajad, mida saab hinnata juhul, kui kokkupuuteperiood hõlmab mõnda tundlikku arenguperioodi (sünnieelset või varajast sünnijärgset perioodi).
4. Peale selle lisati katsejuhendisse nr 422 täiendavad endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide uurimiseks sobivad lõppnäitajad, mida sisaldab ka katsejuhend nr 443 (sellele vastab käesoleva lisa peatükk B.56 „Laiendatud ühe põlvkonna reprodutiivtoksisuse uuring“); need lõppnäitajad valiti lähtuvalt ühest teostatavusuuringust, milles käsitletakse asjaomaste lõppnäitajate lisamisega seotud teaduslikke ja tehnilisi küsimusi, ning võimalikust vajadusest katsemeetodit nende lisamiseks kohandada (6).
5. Käesolev katsemeetod on kavandatud piiratud hulga andmete saamiseks uuritava kemikaali mõju kohta isas- ja emasloomade paljunemisvõimele, näiteks sugunäärmete talitlusele, paaritumiskäitumisele, eostumisele, sügoodi arengule ja sünnitamisele. See ei ole ette

nähtud kasutamiseks olemasolevate katsemeetodite B.31, B.34, B.35 või B.56 alternatiivina ega nende asendamiseks.

LÄHTEKAALUTLUSED

6. Uuritava kemikaali mürgisust põhjustavate omaduste kindlakstegemiseks ja hindamiseks võib teha korduval suukaudsel manustamisel avalduva mürgisuse uuringu pärast seda, kui ägeda mürgisuse katsetest on saadud esialgsed andmed kemikaali mürgisuse kohta. Käesoleva meetodi kohane uuring võimaldab saada teavet võimalike terviseohtude kohta, mis avalduvad suhteliselt piiratud ajavahemiku jooksul toimuva korduva kokkupuute tagajärjel. Käesolev meetod hõlmab lihtsat korduvannustamisel põhinevat mürgisusuuringut, mida võib kasutada kemikaalide jaoks, mille puhul 90-päevase uuringu tegemine ei ole põhjendatud (näiteks kui tootmismahd ei ületa teatavat piiri), või eeluuringuna enne pikaajalise uuringu läbiviimist. Uuringu tegemisel tuleks järgida juhtpõhimõtteid ja kaalutlusi, mis on esitatud OECD juhenddokumendis nr 19, milles käsitletakse ohutuse hindamiseks kasutatavatel katseloomadel avalduvate kliiniliste tunnuste kindlakstegemist, hindamist ja kasutamist humaanse sekkumise vajadusele viitavate näitajadena (7).
7. Peale selle hõlmab käesolev katsemeetod ka reproduktiiv-/arengutoksilisuse sõeluuringut ning seepärast saab seda ühtlasi kasutada uuritava kemikaali toksikoloogiliste omaduste hindamise varajases etapis või probleemse kemikaali uurimisel esialgse teabe saamiseks võimaliku mõju kohta isas- ja emasloomade paljunemisvõimele, näiteks sugunäärmete talitlusele, paaritumiskäitumisele, eostumisele, sügooti arengule ja sünnitamisele. Käesolev katsemeetod ei võimalda saada ammendavat teavet kõikide paljunemisvõime ja arenguga seotud aspektide kohta. Eelkõige lubab see tuvastada sünnieelse kokkupuute tagajärjel sünnijärgselt avalduvaid ilminguid ja sünnijärgsest kokkupuutest tulenevat mõju üksnes piiratud ulatuses. Käesoleva meetodiga ei saa koguda tõendeid, mis lubaksid lõplikult kinnitada paljunemisele/arengule avalduva mõju puudumist; see on muu hulgas tingitud lõppnäitajate selektiivsusest ja uuringu lühikesest kestusest. Täheldatavaid positiivseid tulemusi aga on võimalik muudest reproduktiiv-/arengutoksilisuse uuringutest saadavate andmete puudumisel kasutada esialgseks ohuhindamiseks ning need aitavad teha otsuseid täiendavate uuringute tegemise vajaduse ja selliste uuringute ajastuse kohta.
8. Sisesekreetsioonisüsteemiga seotud näitajaid käsitlevaid tulemusi tuleks vaadelda endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide uurimise ja hindamise OECD kontseptuaalse raamistiku (8) kontekstis. Nimetatud kontseptuaalses raamistikus on OECD täiendatud katsejuhendi nr 422 kohast meetodit käsitatud 4. taseme *in vivo* meetodina, mis võimaldab saada andmeid sisesekreetsioonisüsteemiga seotud lõppnäitajate kaudu tuvastatava kahjuliku mõju kohta. Sisesekreetsioonisüsteemist sõltuvat signaali ei pruugita eraldi võetuna siiski pidada piisavaks tõendiks selle kohta, et uuritava kemikaali puhul on tegemist endokriinfunktsiooni kahjustava kemikaaliga.

9. Käesoleva katsemeetodi puhul pööratakse ühtlasi suurt tähelepanu konkreetse lõppnäitajana vaadeldavale neuroloogilisele mõjule ja rõhutatakse loomade hoolika kliinilise jälgimise vajadust, et saada võimalikult palju teavet. Meetod peaks võimaldama teha kindlaks kemikaalide võimaliku neurotoksilisuse, mida võib olla vaja täiendavalt põhjalikumalt uurida. Peale selle võib käesoleva meetodiga saada esialgset teavet immunoloogilise mõju kohta.
10. Täheledatavaid positiivseid tulemusi on võimalik muudest süsteemse mürgisuse, reproduktiiv-/arengutoksilisuse, neurotoksilisuse ja/või immunotoksilisuse uuringutest saadavate andmete puudumisel kasutada esialgselt ohuhindamiseks ning need aitavad teha otsuseid täiendavate uuringute tegemise vajaduse ja selliste uuringute ajastuse kohta. Katse tulemused võivad olla eriti kasulikud OECD sõeluuringute andmekogumi (SIDS) osana selliste olemasolevate kemikaalide hindamisel, mille kohta on vähe toksikoloogilist teavet või see puudub, ning sellist katset saab kasutada kahe eraldi katse asemel, milles hinnatakse vastavalt korduvannustamisel avalduvat mürgisust (OECD katsejuhend nr 407, mis vastab käesoleva lisa peatükile B.7) ja reproduktiiv-/arengutoksilisust (OECD katsejuhend nr 421, mis vastab käesoleva lisa peatükile B.63). Samuti võib seda kasutada ulatuslikumate paljunemisvõimet/arengut käsitlevate uuringute jaoks annusevahemiku kindlaksmääramiseks ning muudel asjakohaseks peetavatel juhtudel.
11. Üldjuhul eeldatakse, et tiinete ja mittetiinete loomade tundlikkus on erinev. Seepärast võib kõnealuses ühendkatses kahe eraldi katse läbiviimisega võrreldes olla keerulisem teha kindlaks sobivad annusemäärad, mis võimaldaksid üheaegselt hinnata nii üldist süsteemset mürgisust kui ka konkreetset reproduktiiv-/arengutoksilisust. Peale selle võib üldise süsteemse mürgisusega seotud katsetulemuste tõlgendamine olla raskem kui korduvannustamisel põhineva eraldi katse tegemisel, eriti juhul, kui seeruminäitajaid ja histopatoloogilisi näitajaid ei analüüsita uuringus üheaegselt. Nende tehniliste aspektide keerukusest tulenevalt nõuab kõnealuse ühendatud sõeluuringu läbiviimine ulatuslikke kogemusi mürgisuse hindamisel. Teisest küljest võimaldab selline ühendkatse peale väiksema arvu loomade kasutamise paremini eristada paljunemisele/arengule avalduvat otsest mõju mõjust, mis ilmneb muu (süsteemse) mõju tagajärjel.
12. Käesoleva meetodi puhul on manustamisperiood pikem kui tavapärasel 28-päevases korduvannustamisel põhinevas uuringus. Samal ajal on kummastki soost loomade arv igas rühmas väiksem kui olukorras, kus peale tavapärase 28-päevase korduvannustamisel põhineva uuringu tehakse veel ka reproduktiiv-/arengutoksilisuse sõeluuring.
13. Käesoleva katsemeetodi puhul eeldatakse, et uuritavat kemikaali manustatakse suu kaudu. Muu manustamisviisi kasutamise korral võib olla vaja teha meetodis muudatusi.
14. Kui soovitakse saada kavandatud regulatiivsel eesmärgil andmeid segu kohta, tuleks enne katsemeetodi kasutamist kaaluda, kas ja kuidas see võimaldab saada kõnealusele

eesmärgile vastavaid asjakohaseid tulemusi. Selline kaalumise ei ole vajalik, kui asjaomase segu hindamine on regulatiivse nõudega ette nähtud.

15. Kasutatud mõisted on määratletud 1. liites.

KATSE PÕHIMÕTE

16. Uuritavat kemikaali manustatakse astmeliselt suurenevates annustes mitme rühma isas- ja emasloomadele. Isasloomade puhul peaks manustamine toimuma vähemalt nelja nädala kestel kuni kavandatud surmamispäevale eelneva päevani, sealhulgas surmamiseelset päeval (see hõlmab vähemalt kahte paaritumiseelset nädalat, paaritumisperioodi ja umbes kahte paaritumisjärgset nädalat). Kuna isasloomadel on paaritumiseelne manustamisperiood piiratud kestusega, ei pruugi viljakus olla eriti tundlik munanditele avalduva mürgisuse näitaja. Seepärast on vaja teha munandite üksikasjalik histoloogiline analüüs. Kahe nädala pikkust paaritumiseelset manustamisperioodi koos järgneva paaritumise/viljakuse jälgimisega ning manustamisperioodi üldkestusega vähemalt neli nädalat, millele järgneb isaslooma sugunäärmete üksikasjalik histopatoloogiline analüüs, peetakse enamiku isasloomal täheldatavate viljakusele ja spermatogeneesile avalduva mõju ilmingute tuvastamiseks piisavaks.
17. Emasloomade puhul peaks manustamine toimuma kogu uuringu kestel. See hõlmab kahte paaritumiseelset nädalat (eesmärk on jälgida vähemalt kahte tervet innatsükli), eostumisele eelnevat varieeruva pikkusega ajavahemikku, tiinuse kestust ja vähemalt kolmeteistkümne päeva pikkust sünnitusjärgset perioodi, mis kestab kuni kavandatud surmamispäevale eelneva päevani ja hõlmab ka surmamiseelset päeva.
18. Kohanemisperioodile ja innatsükli manustamiseelsele hindamisele järgneva uuringu kestus sõltub emasloomade seisundist ning on umbes 63 päeva (vähemalt 14 päeva pikkune paaritumiseelne periood, (kuni) 14 päeva pikkune paaritumisperiood, 22 päeva pikkune tiinusperiood ja 13 päeva pikkune imetamisperiood).
19. Manustamisperioodi jooksul jälgitakse loomi iga päev hoolikalt mürgisusnähtude suhtes. Uuringu kestel surnud või surmatud loomad lahatakse ning uuringu lõpus surmatakse ja lahatakse ka ellujäänud loomad.

MEETODI KIRJELDUS

Loomaliigi valimine

20. Käesolev katsemeetod on kavandatud kasutamiseks rotil. Kui katsejuhendis nr 422 kirjeldatud näitajaid hinnatakse mõne muu liigi närilistel, tuleks seda üksikasjalikult põhjendada. Endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide kindlakstegemise rahvusvahelises valideerimisprogrammis, mille puhul on lähtutud katsejuhendist nr 407,

kasutati ainsa liigina rotte. Ei tohiks kasutada liine, kus sigivus on väike või kus teadaolevalt esineb sageli arenguhäireid. Tuleks kasutada terveid varem paaritamata loomi, keda ei ole varem katsetes kasutatud. Katseloomi tuleks iseloomustada liigi, liini, soo, kehamassi ja vanuse järgi. Uuringu alguses peaksid kasutatavate loomade kehamassi erinevused olema minimaalsed ning mitte üle ± 20 % kummaski soost loomade keskmisest kehamassist. Kui uuring viiakse läbi pikaajalise või tervet põlvkonda hõlmava uuringu eeluuringuna, tuleks mõlemas uuringus soovitatavalt kasutada samast liinist ja sama päritolu loomi.

Pidamis- ja söötmistingimused

21. Kõik katsetoimingud peaksid vastama kohalikele laboriloomade hooldamise normidele. Katseloomade ruumi temperatuur peaks olema 22 °C (± 3 °C). Suhteline õhuniiskus peaks olema vähemalt 30 % ja soovitatavalt mitte üle 70 %, v.a ruumi koristamise ajal. Tuleks kasutada tehisvalgustust valgusrežiimiga 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust. Söötmiseks võib kasutada tavapäraselt laborisööta ja piiramatus koguses joogivett. Söödavalikut võib mõjutada vajadus tagada sööda sobivus uuritava kemikaali lisamiseks, kui kemikaali manustatakse sellisel viisil.
22. Loomade pidamisel tuleks kasutada väikesi samasooliste isendite rühmi; loomi võib pidada eraldi, kui see on teaduslikult põhjendatud. Rühmas pidamisel ei tohiks puuris olla rohkem kui viis looma. Paaritamine peaks toimuma selleks sobivas puuris. Tiined emasloomad tuleks paigutada igaüks eraldi puuri, kus on olemas pesamaterjal. Imetavad emasloomad paigutatakse igaüks eraldi puuri koos järglaskonnaga.
23. Sööta tuleks korrapäraselt analüüsida saasteainete suhtes. Asjaomase sööda proov tuleks kuni katseprotokolli lõpliku valmimiseni alles hoida.

Loomade ettevalmistamine

24. Terved noored täiskasvanud loomad jagatakse juhuvaliku alusel katserühmadesse ja puuridesse. Puurid paigutatakse nii, et puuri asukohast tingitud võimalik mõju oleks võimalikult väike. Loomad idenditakse üheselt ja neil lastakse enne uuringu algust puuris vähemalt viis päeva laboritingimustega kohaneda.

Annuste ettevalmistamine

25. Uuritavat kemikaali on soovitatav manustada suu kaudu, välja arvatud juhul, kui mõnda muu manustamisviisi peetakse sobivamaks. Uuritava kemikaali suukaudseks manustamiseks kasutatakse tavaliselt toitmissondi; selle asemel võib siiski kasutada ka sööda või joogiveega manustamist.
26. Vajaduse korral lahustatakse või suspendeeritakse uuritav kemikaal sobivas kandeaines. Kui vähegi võimalik, on soovitatav esmalt kaaluda vesilahuse või veepõhise suspensiooni ja seejärel õlilahuse või õlipõhise suspensiooni (nt maisiõli) kasutamist ning pärast seda

lahustamist mõnes muus kandeaines. Muu kandeaine kui vee puhul peaksid olema teada selle mürgisusnäitajad. Tuleks teha kindlaks uuritava kemikaali püsivus ja homogeensus kandeaines.

KATSE KÄIK

Loomade arv ja sugu

27. Soovitavalt peaks igas rühmas olema alguses vähemalt 10 isaslooma ja 12–13 emaslooma. Emasloomi hinnatakse kokkupuute eel innatsükli alusel ja loomad, kelle innatsükkel erineb tavapärasest 4–5 päeva pikkusest tsüklist, jäetakse uuringust välja; seepärast on soovitatav kasutada suuremat arvu emasloomi, et igas rühmas oleks lõpuks 10 emaslooma. Eeldatavalt tiinestub igas rühmas vähemalt 8 emaslooma – seda peetakse tavapäraselt minimaalseks vastuvõetavaks tiinestumismääraks –, välja arvatud juhul, kui ilmneb märkimisväärne mürgine mõju. Eesmärk on saada piisav arv tiineid emasloomi, et oleks võimalik usaldusväärselt hinnata uuritava kemikaali võimet mõjutada viljakust, tiinust, ema- ja imetamiskäitumist ning F₁-põlvkonna järglaste kasvu ja arengut eostamisest kuni kolmeteistkümnenda sünnijärgse päevani. Kui osa loomi on kavas surmata juba katse ajal, tuleks suurendada loomade arvu nende loomade arvu võrra, kes surmatakse plaanijärgselt enne katse lõppu. Tuleks kaaluda võimalust luua kontrollrühma ja suurima annusega töödeldava rühma juurde täiendrühm, millesse kuulub kummastki soost viis looma, et jälgida vähemalt 14 päeva jooksul pärast manustamise lõpetamist süsteemse mürgise mõju pöördumist, püsivust või viivitusega avaldumist. Täiendrühma loomi ei paaritata ja neid ei kasutata seega reproduktiiv-/arengutoksilisuse hindamisel.

Annused

28. Üldjuhul tuleks kasutada vähemalt kolme katserühma ja ühte kontrollrühma. Sobivate üldise mürgisuse andmete puudumisel võib kasutatavate annuste kindlaksmääramise hõlbustamiseks teha annusevahemiku kindlaksmääramise uuringu, kus kasutatakse samast liinist ja sama päritolu loomi. Kontrollrühma loomi tuleks kohelda täpselt samal viisil kui katserühma loomi; ainus erinevus seisneb uuritava kemikaali manustamata jätmises. Kui uuritava kemikaali manustamisel kasutatakse kandeainet, tuleks võrdlusrühma loomadele manustada kandeainet suurimas kasutatavas koguses.
29. Annuste valimisel tuleks võtta arvesse kõiki kättesaadavaid mürgisusandmeid ja (toksiko)kineetilisi andmeid. Samuti tuleks arvesse võtta, et tiinete ja mittetiinete loomade tundlikkus võib olla erinev. Suurim annus tuleks valida nii, et kemikaal avaldaks mürgist mõju, kuid ei põhjustaks surma ega ilmseid kannatusi. Seejärel tuleks valida rida järkjärgult vähenevaid annuseid, mis võimaldaksid tõendada mõju sõltuvust annusest ja väikseima annuse puhul kahjuliku mõju puudumist. Sageli on eri annuste vaheline optimaalne erinevus kahe- kuni neljakordne ning üksteisest väga palju (näiteks üle 10 korra) erinevate annuste kasutamise asemel on tihti soovitatav lisada neljas katserühm.

30. Kui täheldatakse üldist mürgisust (nt kehamassi vähenemine, mõju maksale, südamele, kopsudele või neerudele jne) või muid muutusi, mis ei pruugi olla tingitud mürgisusest (nt väiksem söödatarbimine, maksa suurenemine), tuleks täheldatud mõju sisesekretsioonisüsteemiga seotud lõppnäitajatele tõlgendada ettevaatusega.

Piirsisalduskatse

31. Kui käesoleva meetodi kohaselt läbi viidud suukaudse manustamise uuringus, milles kasutatakse ainsa annusena annust vähemalt 1000 mg kehamassi kilogrammi kohta päevas või sööda või joogiveega manustamise korral sellega samaväärset protsentuaalset sisaldust söödas või joogivees (see määratakse kindlaks kehamassi mõõtmise alusel), ei täheldata mürgist mõju ja kui mürgisus ei ole uuritava kemikaaliga struktuurilt sarnaste ainetega saadud andmete põhjal ootuspärane, ei pruugita pidada mitme eri annusega täismahus uuringu tegemist vajalikuks. Piirsisalduskatse tulemused on kohaldatavad, kui inimese kokkupuutega seotud andmed ei viita vajadusele kasutada suuremat annusemäära. Muu manustamisviisi korral, näiteks sissehingamise teel või naha kaudu manustamisel võib uuritava kemikaali füüsikalise-keemilistest omadustest tulenevalt olla tihti vaja kasutada suurimat saavutatavat kokkupuutemäära.

Annuste manustamine

32. Uuritavat kemikaali manustatakse loomadele seitsmel päeval nädalas. Kui manustamiseks kasutatakse toitmissondi, tuleks kemikaali loomadele manustada ühe annusena maossondi või sobiva intubeerimiskanüüli abil. Suurim korraga manustatav vedelikukogus sõltub katselooma suurusest. See kogus ei tohiks olla suurem kui 1 ml 100 g kehamassi kohta, välja arvatud vesilahuse puhul, mida võib manustada koguses 2 ml 100 g kehamassi kohta. Katses kasutatava vedelikukoguse varieeruvuse minimeerimiseks tuleks reguleerida uuritava kemikaali kontsentratsiooni nii, et lahuse maht oleks kõikide annuste puhul ühesugune; see ei ole nõutav ärritava või söövitava uuritava kemikaali puhul, mille mõju kontsentratsiooni suurenedes tavaliselt tugevneb.
33. Sööda või joogiveega manustatava uuritava kemikaali puhul on oluline tagada, et seda kasutatakse koguses, mis ei muuda tavapärast toitumise või joogivee tarbimise tasakaalu. Kui uuritavat kemikaali manustatakse söödaga, võib kasutada kas muutumatut kontsentratsiooni söödas (ppm) või looma kehamassi suhtes muutumatut annusemäära; tuleks täpsustada, kumba võimalust kasutatakse. Toitmissondi kaudu manustatava uuritava kemikaali puhul peaks manustamine toimuma igal päeval sarnasel kellaajal ning annusemäära tuleks vähemalt kord nädalas kohandada, et see püsiks looma kehamassi suhtes muutumatuna. Kui ühendkatse viiakse läbi pikaajalise või täismahus reproduktiivtoksilisuse uuringu eeluuringuna, tuleks mõlemas uuringus kasutada samasugust sööta.

Katse ajakava

34. Annuste manustamist tuleks kummagi soo puhul alustada kaks nädalat enne paaritamist pärast seda, kui loomadel on lastud vähemalt viis päeva kohaneda ja emasloomi on hinnatud lähtuvalt innatsükli tavapärasest kestusest (töötlemiseelse kahe nädala pikkuse perioodi vältel). Uuringu ajakava peaks olema selline, et innatsükli hindamist alustatakse varsti pärast seda, kui loomad on saanud täielikult suguküpseks. See aeg võib olla eri rotiliinidel ja eri laborites veidi erinev: näiteks Sprague Dawley rottidel saabub suguküpsus 10 nädala vanuses ja Wistari rottidel umbes 12 nädala vanuses. Järglastega emasloomad tuleks surmata 13. sünnitusjärgsel päeval või veidi hiljem. Järglastega emasloomi ja järglasi ei pea tingimata surmama samal päeval, kui järglastega emasloomadel eelistatakse lasta enne vereproovi võtmist hommikuni paastuda. Sünnitamispäeva (päev, mil sünnitus lõpeb) loetakse sünnitusjärgseks 0-päevaks. Emasloomad, kellel ei täheldata paaritumise ilminguid, surmatakse 24–26 päeva pärast paaritumisperioodi viimast päeva. Paaritumisperioodi vältel jätkatakse kummaski soost loomadele kemikaali manustamist. Isasloomadele manustamist tuleks paaritumisperioodi järgselt jätkata vähemalt seni, kuni manustamisperioodi algusest on möödunud kokku minimaalselt 28 päeva. Seejärel loomad surmatakse või teise võimalusena jätkatakse neile kemikaali manustamist, et viia võimaluse korral läbi teine paaritamine, kui seda peetakse asjakohaseks.
35. Tiinestunud emasloomade puhul tuleks igapäevast manustamist jätkata kogu tiinuse vältel ning vähemalt kuni 13. sünnitusjärgse päevani, sealhulgas nimetatud päeval, või kuni surmamiseelse päevani. Uuringute puhul, kus uuritavat kemikaali manustatakse sissehingamise teel või naha kaudu, tuleks manustamist jätkata vähemalt kuni 19. tiinuspäevani, sealhulgas nimetatud päeval, ning taas alustada seda võimalikult varakult ja mitte hiljem kui 4. sünnitusjärgsel päeval.
36. Järelevaatluste jaoks ette nähtud täiendruhma kasutamisel jäetakse sellise rühma loomad paaritamata. Neid tuleks pärast järglastega emasloomade esimest plaanijärgset surmamist pidada veel vähemalt 14 päeva ja selle aja jooksul ei tohiks neile kemikaali manustada, et oleks võimalik hinnata mürgise mõju viivitusega avaldumist või selle püsivust või mürgisest mõjust taastumist.
37. Katse skemaatiline ajakava on esitatud 2. liites.

Innatsükkel

38. Enne töötlemise alustamist tuleks jälgida innatsükli ning valida selle alusel uuringusse emasloomad, kelle tsükkel on korrapärane (vt punkt 27). Tupeäiged tuleks igapäevaselt hinnata ka alates töötlemisperioodi algusest kuni paaritumise ilmingute tuvastamiseni. Kui on kahtlus, et innatsükkel võib pärast manustamise alustamist ägeda stressi mõjul muutuda, võib katseloomi laboris 2 nädala vältel uuritava kemikaaliga töödelda ning seejärel koguda paaritumiseelsel perioodil innatsükli jälgimiseks vähemalt kahe nädala jooksul iga päev tupeäiged ja jätkata jälgimist ka paaritumisperioodil, kuni täheldatakse paaritumise

ilminguid. Tupe-/emakakaelarakkude võtmisel tuleks olla ettevaatlik, et mitte kahjustada limaskesta, kuna see võib põhjustada pseudotiinuse teket (8, 9).

Paaritamine

39. Käesoleva meetodi kohases uuringus tuleks üldjuhul kasutada paaritamisel suhet 1 : 1 (üks isasloom ühe emaslooma kohta). Erandi võib teha juhul, kui isasloomad juhtuvad surema. Emaslooma tuleks hoida sama isaslooma juures seni, kuni täheldatakse paaritumise ilminguid või on möödunud kaks nädalat. Emasloomi tuleks igal hommikul uurida sperma või tupekorgi esinemise suhtes. Tiinuse 0-päevaks loetakse päeva, mil paaritumise toimumine leiab kinnitust (leitakse tupekork või spermat). Kui paaritamine ebaõnnestub, võib kaaluda emaslooma uuesti paaritamist sama rühma viljakaks osutunud isasloomaga.

Pesakonna suurus

40. Neljandal sünnijärgsel päeval võib iga pesakonna suurust korrigeerida; selleks kõrvaldatakse juhuvaliku alusel üleliigsed järglased nii, et pesakonda jääks sõltuvalt kasutatava rotiliini puhul tavapärasest pesakonna suurusest võimalikult täpselt neli või viis järglast kummagi soo kohta. Üleliigsetest järglastest kahelt tuleks võtta vereproov, moodustada nendest koondproov ja kasutada seda seerumi T₄-sisalduse määramiseks. Järglaste selektiivne kõrvaldamine, näiteks kehamassi või anogenitaalse vahemaa (AGD) alusel, ei ole sobiv. Kui emaste või isaste järglaste arv ei võimalda jätta pesakonda nelja või viit järglast kummastki soost, on vastuvõetav ka osaline korrigeerimine (nt kuus isast ja neli emast). Kui pesakond jääks kõrvaldamise tagajärjel väiksemaks kui kõrvaldamisega saavutatav soovitud sihtarv (8 või 10 järglast pesakonna kohta), ei kõrvaldata ühtki järglast. Kui kõrvaldamisega saavutatava soovitud sihtarvuga võrreldes on üle ainult üks järglane, kõrvaldataksegi vaid üks järglane, kellelt võetakse vereproov võimalikuks seerumi T₄-sisalduse hindamiseks.
41. Kui pesakonna suurust ei korrigeerita, surmatakse 4. sünnijärgsel päeval igast pesakonnast kaks järglast ning neilt võetakse vereproov seerumi kilpnäärmehormoonisisalduse mõõtmiseks. Võimaluse korral peaksid kõnealused kaks järglast igast pesakonnast olema emased, et võimaldada isaste järglaste kasutamist nisade esinemise hindamiseks; see soovitus ei kehti juhul, kui kõnealuse kahe järglase eemaldamisel ei jääks pesakonda ühtki emast, keda uuringu lõpus hinnata. Kui pesakonda jääks kõrvaldamise tagajärjel vähem kui 8 või 10 järglast (olenevalt kasutatava rotiliini puhul tavapärasest pesakonna suurusest), ei kõrvaldata ühtki järglast. Kui pesakonna tavapärase suurusega võrreldes on üle ainult üks järglane, kõrvaldataksegi vaid üks järglane, kellelt võetakse vereproov võimalikuks seerumi T₄-sisalduse hindamiseks.

Vaatlused

42. Üldisi kliinilisi vaatlusi tuleks teha vähemalt kord päevas, igal päeval soovitatavalt samal ajal või samadel aegadel; seejuures tuleks võtta arvesse manustamisjärgse eeldatava mõju

maksimaalse avaldumise aega. Tuleks registreerida loomade tervislik seisund. Kõiki loomi kontrollitakse haigestumise ja surmajuhtude tuvastamiseks vähemalt kaks korda päevas.

43. Kõikide paaritatavate loomade puhul tuleks läbi viia üksikasjalikud kliinilised vaatlused üks kord enne uuritava kemikaali manustamist (võimaldamaks sama loomaga saadud tulemuste võrdlemist) ning seejärel vähemalt kord nädalas. Need vaatlused tuleks teha standardalal väljaspool looma pidamiseks kasutatavat puuri ja igal vaatluste tegemise päeval soovitatavalt samal kellaajal. Tulemused tuleks hoolikalt registreerida; selleks tuleks soovitatavalt kasutada katset läbi viivas laboris selgelt kindlaks määratud hindamissüsteeme. Tuleks püüda tagada, et katsetingimused varieeruksid võimalikult vähe ja vaatlusi teeksid soovitatavalt isikud, kes ei ole asjaomasest töötlemisest teadlikud. Tuleks registreerida vähemalt järgmised ilmingud: nahal, karvastikus, silmades ja limaskestadel täheldatavad muutused, sekreetide ja eritiste esinemine ning autonoomse närvisüsteemiga seotud ilmingud (nt pisaravoolus, piloereksioon, pupillide suuruse muutus, ebaharilik hingamisrütm). Peale selle tuleks registreerida muutused kõnnakus, kehahoius ja selles, kuidas loomad nendega ümberkäimisele reageerivad, samuti klooniliste ja tooniliste liigutuste esinemine, stereotüüpia (nt ülemäärane karvastiku hooldamine, ringiratast keerlemine), raske või kauakestnud sünnitus ja kummaline käitumine (nt enese vigastamine, tagurpidi kõndimine) (10).
44. Uuringu kestel tuleks igast rühmast juhuvaliku alusel valitud viiel isasloomal ja viiel emasloomal hinnata ühel korral sensoorseid reaktsioone eri liiki ärritajatele (nt kuulmis-, nägemis- ja propriotseptiivsetele ärritajatele) (8, 9, 11), haardetugevust (12) ja motoorset tegevust (13). Asjaomaste võimalike meetodite täpsem kirjeldus on esitatud vastavate viidete kohastes allikates. Viidatud meetodite asemel võib siiski kasutada ka muid meetodeid. Isasloomadel tuleks kõnealused funktsionaalsed vaatlused läbi viia manustamisperioodi lõppjärgus veidi enne plaanijärgset surmamist, kuid enne hematoloogiliseks uuringuks või kliiniliseks biokeemiliseks analüüsiks vereproovi võtmist (vt punktid 53–56, sh joonealune märkus 1). Emasloomad peaksid nende funktsionaalsete vaatluste ajal olema sarnases füsioloogilises seisundis ja neid tuleks soovitatavalt vaadelda ühel korral viimasel imetamisnädalal (nt 6.–13. imetamispäeval) veidi enne plaanijärgset surmamist. Ajavahemik, mille vältel järglased on emast eraldatud, peaks olema võimalikult lühike.
45. Uuringu lõppjärgus ühel korral tehtavad funktsionaalsed vaatlused võib ära jätta, kui uuring viiakse läbi järgnevalt tehtava subkroonilise mürgisuse 90-päevase uuringu või pikaajalise uuringu eeluuringuna. Sellisel juhul tuleks kõnealused funktsionaalsed vaatlused läbi viia vastava järeluuringu käigus. Teisest küljest aga võivad käesoleva meetodi kohase korduvannustamisel põhineva uuringu käigus tehtud funktsionaalsete vaatluste andmed hõlbustada järgnevalt tehtava subkroonilise mürgisuse uuringu või pikaajalise uuringu jaoks annusemäärade valimist.

46. Funktsionaalsed vaatlused võib erandkorras ära jätta ka rühmade puhul, kus täheldatakse nii ulatuslikke mürgisusnähte, et see mõjutab märkimisväärselt funktsionaalse hindamise tulemuslikkust.
47. Tiinuse kestus tuleks registreerida; selle arvutamisel lähtutakse tiinuse 0-päevast. Iga pesakonda tuleks pärast sündi võimalikult varakult hinnata, et teha kindlaks järglaste arv ja sugu, surnultsünnid, elussünnid, kängunud järglaste (vastavatest kontrolljärglastest palju väiksemate järglaste) arv ja silmaga nähtavate kõrvalekallete esinemine.
48. Elus järglased tuleks loendada ja määrata nende sugu ning pesakonda tuleks kaaluda 24 tunni jooksul pärast sünnitust (sünnitusjärgsel 0-päeval või 1. päeval) ning vähemalt 4. ja 13. sünnitusjärgsel päeval. Peale paaritavataval loomadel tehtavate vaatluste tulemuste (vt punktid 43–44) tuleks registreerida ka kõik järglaste ebatavalise käitumise ilmingud.
49. Kõikidel järglastel tuleks ajavahemikul sünnijärgsest 0-päevast kuni 4. sünnijärgse päevani mõõta ühel ja samal päeval AGD. Järglaste kehamassi andmed tuleks koguda AGD mõõtmise päeval ja AGD tuleks normaliseerida järglase suurust kajastava näitaja, soovitatavalt kehamassi kuupjuure suhtes (14). Isastel järglastel tuleks 12. või 13. sünnijärgsel päeval loendada nisade/areoolide arv, nagu on soovitatud OECD katsejuhendis nr 151 (15).

Kehamass ja sööda/vee tarbimine

50. Isas- ja emasloomi tuleks kaaluda esimesel manustamispäeval ning seejärel vähemalt kord nädalas, samuti surmamise ajal. Tiinuse ajal tuleks emasloomi kaaluda tiinuse 0-päeval, 7., 14. ja 20. päeval, samuti tuleks neid kaaluda 24 tunni jooksul pärast sünnitust (sünnitusjärgsel 0-päeval või 1. päeval) ning vähemalt 4. ja 13. sünnitusjärgsel päeval. Nimetatud vaatluste tulemused tuleks esitada eraldi iga täiskasvanud looma kohta.
51. Paaritumiseelsel perioodil ning tiinuse ja imetamise ajal tuleks söödatarbimist mõõta vähemalt kord nädalas. Paaritumisperioodil ei ole söödatarbimise mõõtmine kohustuslik. Kui uuritavat kemikaali manustatakse veega, tuleks eelnimetatud perioodidel mõõta ka veetarbimist.

Hematoloogiline analüüs

52. Uuringu vältel tuleks igast rühmast juhuvaliku alusel valitud viiel emasloomal ja viiel isasloomal viia ühel korral läbi hematoloogiline analüüs järgmiste näitajate määramiseks: hematokrit, hemoglobiinisaldus, erütrotsüütide arv, retikulotsüütide arv, leukotsüütide üldarv ja eri tüüpi leukotsüütide arv, vereliistakute arv ja vere hüübimisaeg/hüübimisvõime. Kui uuritav kemikaal või mõni selle võimalikest metaboliitidest on või võib olla oksüdeerivate omadustega, tuleks teha muu hulgas kindlaks veel ka methemoglobiinisaldus ja Heinzi kehakeste esinemine.

53. Vereproov tuleks võtta kindlaksmääratud kohast. Emasloomad peaksid proovivõtu ajal olema sarnases füsioloogilises seisundis. Tiinuse algusaja varieeruvusega seotud praktilistest raskustest tulenevalt võib emasloomadelt vereproovi võtta juba paaritumiseelse perioodi lõpus, selmet võtta see loomade humaanse surmamise käigus või vahetult enne seda. Isasloomadelt tuleks vereproov võtta loomade humaanse surmamise käigus või vahetult enne seda. Teise võimalusena võib isasloomadelt vereproovi samuti võtta paaritumiseelse perioodi lõpus, kui emasloomade puhul eelistatakse seda proovivõtuaega.
54. Vereproove tuleks säilitada sobivates tingimustes.

Kliiniline biokeemiline analüüs

55. Kliinilise biokeemilise analüüsi jaoks, mille eesmärk on hinnata kudedes avalduvat olulist mürgist mõju ning konkreetset mõju neerudele ja maksale, tuleks kasutada kõnealuse igast rühmast valitud viie emaslooma ja viie isaslooma vereproove. Loomadel on soovitatav enne vereproovi võtmist hommikuni paastuda¹. Plasma või seerumi analüüs peaks hõlmama naatriumi, kaaliumi, glükoosi, kolesterooli üldsisalduse, karbamiidi, kreatiniini, valgu üldsisalduse ja albumiini, vähemalt kahe maksarakkudele avalduvale toimele osutava ensüümi (näiteksalaniini aminotransferaasi, aspartaadi aminotransferaasi ja sorbitooli dehüdrogenaasi) ning sapphapete määramist. Teatavatel juhtudel võib kasulikku teavet saada veel muude (maksas või mujal toodetud) ensüümide ja bilirubiini määramisest.
56. Vereproovid võetakse kindlaksmääratud kohast järgmise kava alusel:
- igas pesakonnas vähemalt kahelt järglaselt 4. sünnijärgsel päeval, kui järglaste arv seda võimaldab (vt punktid 40-41),
 - kõikidelt järglastega emasloomadelt ja igas pesakonnas vähemalt kahelt järglaselt surmamise ajal 13. päeval ning

¹ Mitme seerumist või plasmast määratava näitaja, eelkõige glükoosi mõõtmisel on soovitatav hommikuni paastuda, peamiselt seepärast, et söömise korral oleks tulemuste varieeruvus paratamatult suurem ning see segaks nõrgema mõju tuvastamist ja muudaks andmete tõlgendamise raskeks. Teisest küljest aga võib hommikuni paastumine häirida (tiinete) loomade üldist ainevahetust ning mõjutab piimaeritust ja imetamiskäitumist, samuti võib see muuta igapäevast uuritava kemikaaliga kokkupuutumise määra, eelkõige uuringutes, kus kasutatakse söödaga manustamist. Kui loomadel lastakse hommikuni paastuda, tuleks kliiniline biokeemiline analüüs teha isasloomade puhul uuringu neljandal nädalal pärast funktsionaalsete vaatluste läbiviimist. Järglastega emasloomi tuleks pärast järglaste eemaldamist (seda tehakse näiteks 13. sünnijärgsel päeval) veel ühe päeva elus hoida. Neil tuleks lasta 13. imetamispäevast 14. imetamispäeva hommikuni paastuda ja kasutada kliiniliste biokeemiliste näitajate määramiseks surmamise ajal võetud vereproovi.

- kõikidelt täiskasvanud isasloomadelt surmamise ajal.

Kõiki vereproove säilitatakse sobivates tingimustes. Järglastelt 13. päeval võetud vereproovides ja täiskasvanud isasloomade vereproovides analüüsitakse kilpnäärmehormoonide (T_4) sisaldust seerumis. Kui see on asjakohane, hinnatakse T_4 sisaldust ka järglastega emasloomade vereproovides ja järglastelt 4. päeval võetud vereproovides. Kui see on asjakohane, võib soovi korral mõõta ka muude hormoonide sisaldust. Järglaste vere võib kilpnäärmehormoonide analüüsimiseks pesakonnakaupa kokku koondada. Soovitavalt tuleks mõõta kilpnäärmehormoonide (T_4 ja TSH) üldsisaldust.

57. Uuringu viimasel nädalal võib igast rühmast juhuvaliku alusel valitud viielt isasloomalt koguda teatud kindla aja jooksul uriiniproovi ja määrata uriinianalüüsi käigus järgmised näitajad: välimus, ruumala, osmolaalsus või suhteline tihedus, pH, valgusisaldus, glükoosisisaldus ja veresisaldus / vererakkude sisaldus.
58. Peale selle tuleks kaaluda üldistele koekahjustustele osutavate seerumimarkerite uurimist. Kui uuritav kemikaal on oma teadaolevatest omadustest tulenevalt võimeline mõjutama asjaomast ainevahetusprofiili või kui esineb sellekohane kahtlus, peaks määramine muu hulgas hõlmama veel ka kaltsiumi, fosfaati, paastumisjärgselt määratavaid triglütseriide ja glükoosi, teatavaid hormone, methemoglobiini ja koliini esteraasi. Kõnealused näitajad tuleb igal konkreetsel juhul eraldi kindlaks määrata.
59. Hormoonide määramisel võivad varieeruvust ja absoluutset kontsentratsiooni mõjutada järgmised tegurid:
 - surmamise aeg tulenevalt asjaolust, et hormoonide kontsentratsioon ööpäeva jooksul muutub;
 - surmamisviis – tuleks hoiduda tekitamast loomadele tarbetut stressi, mis võib mõjutada hormoonide kontsentratsiooni;
 - hormoonide määramise komplektid, milles kasutatavad standardkõverad võivad olla erinevad.
60. Konkreetselt hormoonide määramiseks ette nähtud eri plasmaproovid tuleks koguda umbes samal kellaajal. Hormoonisisalduse analüüsimisel saadavad arvvaartused on müügilolevate eri katsekomplektide puhul erinevad.
61. Kui varasemad võrdlusandmed ei ole piisavad, tuleks kaaluda hematoloogiliste ja kliiniliste biokeemiliste näitajate määramist enne manustamisperioodi algust või soovitatavalt loomadel, kes ei kuulu ühessegi katserühma. Emasloomade puhul tuleb andmete saamiseks kasutada imetavaid loomi.

PATOLOOGILINE ANALÜÜS

Täielik lahkamine

62. Kõikidele uuringus kasutatud täiskasvanud loomadele tuleks teha täielik, põhjalik lahkamine, mille käigus uuritakse hoolikalt keha välispinda, kõiki avausi ning kolju-, rinna- ja kõhuõõnt ja nende sisu. Erilist tähelepanu tuleks pöörata reproduktiivsüsteemi elunditele. Tuleks registreerida pesastumiskohtade arv. Lahkamispäeval tuleks analüüsida tupeäiet, et teha kindlaks innatsükli etapp ja võimaldada korreleerimist emassuguelundite histopatoloogilise analüüsi tulemustega.
63. Kõikide täiskasvanud isasloomade munandid ja munandimanused ning eesnääre ja seemnepõiekesed koos koagulatsiooninäärmetega tuleks vajaduse korral vabastada nende külge jäänud kudedest ja kuivamise ärahoidmiseks tuleks elundite märgmass määrata võimalikult kiiresti pärast nende väljalõikamist. Peale selle võib soovi korral kaaluda isasloomade puhul sellised elundid nagu pärakutõsturlihase ja sibulakäsnkeha-lihase kompleks, Cowperi näärmed ja sugutilukk ning emasloomade puhul munasarjade paar (märgmass) ja emakas (koos emakakaelaga); kui seda tehakse, peaks kaalumise toimuma võimalikult kiiresti pärast elundite väljalõikamist. Kõikide täiskasvanud loomade munasarjad, munandid, munandimanused, suguelundid ja kõik makroskoopiliste kahjustustega elundid tuleks säilitada.
64. Kõikidelt täiskasvanud isas- ja emasloomadelt ning igast pesakonnast ühelt isaselt ja ühelt emaselt 13 päeva vanuselt järglaselt võetud kilpnääret tuleks säilitada fikseerimislahuses, mis on järgneva kavandatud histopatoloogilise analüüsi läbiviimiseks kõige sobivam. Kilpnäärme massi võib määrata pärast fikseerimist. Liigsed koed tuleks samuti eemaldada väga ettevaatlikult alles pärast fikseerimist, et kudesid mitte kahjustada. Koekahjustus võib mõjutada histopatoloogilise analüüsi tulemusi. Vereproovid tuleks võtta kindlaksmääratud kohast vahetult enne loomade humaanset surmamist või selle ajal ja neid tuleks säilitada sobivates tingimustes (vt punkt 56).
65. Peale selle tuleks igast rühmast juhuvaliku alusel valitud vähemalt viielt täiskasvanud isas- ja emasloomalt (juhuvalik ei hõlma loomi, kes on leitud olevat surmaeelses seisundis ja/või on enne uuringu lõppu humaanselt surmatud) võtta maks, neerud, neerupealised, harknääre, põrn, aju ja süda, eemaldada vastavalt vajadusele nende külge jäänud koed ning määrata kuivamise ärahoidmiseks võimalikult kiiresti pärast väljalõikamist nende märgmass. Nii koetüübi kui ka kavandatud järgneva histopatoloogilise uuringu jaoks kõige sobivamas fikseerimislahuses tuleks säilitada järgmisi kudesid: kõik silmaga nähtavate kahjustustega koed, aju (representatiivsed piirkonnad, sealhulgas suuraju, väikeaju ja ajusild), seljaaju, silm, magu, peensool ja jämesool (sealhulgas Peyeri naastud), maks, neerud, neerupealised, põrn, süda, harknääre, hingetoru ja kopsud (säilitamiseks täidetakse need fikseerimislahusega ja sukeldatakse seejärel lahusesse), sugunäärmed (munandid ja munasarjad), suguelundid (emakas ja emakakael, munandimanused, eesnääre ja seemnepõiekesed koos koagulatsiooninäärmetega), tupp, kusepõis, lümfisõlmed (peale manustamiskohale kõige lähemal asuva lümfisõlme tuleks võtta labori kogemustest

lähtuvalt veel teinegi lümfisõlm (16)), perifeerne närv (istmiku- või sääreluunärv), soovitatavalt lihase läheduses, skeletilihas ning luu koos luuüdiga (lõik või teise võimalusena värskelt aspireeritud luuüdi preparaat). Munandid on soovitatav fikseerida Bouini või muudetud Davidsoni fikseerimislahusesse sukeldamise teel (16, 17, 18); formaliinis fikseerimine ei ole nende kudede puhul soovitatav. Fikseerimislahuse kiire sissetungimise võimaldamiseks võib elundi kummaski otsas valkjaskesta ettevaatlikult väikese sügavuseni nõelaga läbi torgata. Kliinilised ja muud leiud võivad osutada vajadusele uurida ka muid kudesid. Tuleks säilitada ka kõik elundid, mida uuritava kemikaali teadaolevatest omadustest tulenevalt peetakse tõenäoliseks sihtelundiks.

66. Siseseretsioonisüsteemiga seotud mõju kohta võib saada väärtuslikku teavet järgmiste kudede uurimisel: sugunäärmed (munasarjad ja munandid), suguelundid (emakas koos emakakaelaga, munandimanused, seemnepõiekesed koos koagulatsiooninäärmetega, eesnäärme dorsolateraalne ja ventraalne osa), tupp, ajuripats, isaslooma rinnanäärmed ja neerupealised. Isaslooma rinnanäärmetes aset leidvad muutused on ebapiisavalt dokumenteeritud, kuid see näitaja võib olla väga tundlik östrogeense toimega ainete suhtes. Punktis 65 loetlemata elundite/kudede analüüsimine ei ole kohustuslik.
67. Surnud järglasi ja 13. sünnijärgsel päeval või varsti pärast seda surmatud järglasi tuleks miinimumnõudena väliselt hoolikalt uurida silmaga nähtavate kõrvalekallete suhtes. Erilist tähelepanu tuleks pöörata välistele suguelunditele, mida tuleks uurida arenguhäirete ilmingute suhtes.

Histopatoloogiline analüüs

68. Kontrollrühmast ja suurima annusega töödeldud rühmast valitud loomadelt pärit säilitatud elundite ja kudede puhul tuleks viia läbi täismahus histopatoloogiline uuring (seejuures tuleks pöörata erilist tähelepanu spermatogeneesi etappidele isaslooma sugunäärmetes ja munandite interstitsiaalarakustruktuuri histopatoloogilisele analüüsile). Vajaduse korral võib uurida ka järglastelt ja ülejäänud täiskasvanud loomadelt võetud kilpnääret. Kui suurima annusega töödeldud rühmas täheldatakse manustamisega seotud muutusi, peaks kõnealune analüüs hõlmama ka teiste annuserühmade loomi. Täiendav üksikasjalik teave siseseretsioonisüsteemi kudede väljalõikamise, fikseerimise, neist lõikude tegemise ja nende histopatoloogilise analüüsi kohta on esitatud histopatoloogilise analüüsi juhendis (10).
69. Tuleks uurida kõiki silmaga nähtavaid kahjustusi. NOAELi kindlakstegemise hõlbustamiseks tuleks analüüsida ka teiste annuserühmade loomade sihtelundeid, eelkõige sellistest rühmadest pärit sihtelundeid, mida iseloomustavate tulemuste põhjal saab väidetavalt määrata kindlaks NOAELi.
70. Täiendühma kasutamise korral tuleks histopatoloogilise analüüsi raames hinnata neid kudesid ja elundeid, kus katserühmade loomade puhul täheldati mõju avaldumist.

ANDMED JA ARUANDLUS

Andmed

71. Andmed tuleks esitada iga looma kohta eraldi. Peale selle tuleks esitada kõik andmed kokkuvõtliku tabeli kujul, kus on iga katserühma puhul toodud ära loomade arv katse alguses, katse käigus surnud või humaansetel kaalutlustel surmatud loomade arv ning surma või humaanse surmamise aeg, viljakate loomade arv, tiinete emasloomade arv, mürgisusnähtudega loomade arv, mürgisusnähtude kirjeldus, sealhulgas mürgise mõju ilmnemisaeg, kestus ja tugevus, histopatoloogiliste muutuste liik ja kõik asjakohased andmed pesakonna kohta. Paljunemisele/arengule avalduva mõju hindamiseks väga kasulikuks osutunud aruandevorm kokkuvõtliku tabeli kujul on esitatud 3. liites.
72. Numbrilisi tulemusi tuleks võimaluse korral hinnata asjakohase üldiselt tunnustatud statistilise meetodiga. Eri annuste puhul täheldatud mõju võrdlemisel tuleks hoiduda mitme t-testi kasutamisest. Kasutatavad statistilised meetodid tuleks valida uuringu kavandamise etapis. AGD ja nisade esinemise statistiline analüüs peaks põhinema iga üksiku järglase andmetel ning seejuures tuleks arvesse võtta pesakonnas ilmnevat mõju. Vajaduse korral käsitatakse analüüsiüksusena pesakonda. Järglaste kehamassi statistiline analüüs peaks põhinema iga üksiku järglase andmetel ning seejuures tuleks arvesse võtta pesakonna suurust. Uuringu piiratud ulatusest tulenevalt on tulemuste olulisuse tuvastamiseks tehtava statistilise analüüsi väärtus paljude lõppnäitajate, eelkõige paljunemisega seotud lõppnäitajate puhul piiratud. Mõned kõige sagedamini kasutatavatest meetoditest, eelkõige parameetrilised testid keskmise suundumuse näitajate analüüsimiseks, on ebasobivad. Statistilise analüüsi kasutamisel tuleks valida meetod, mis on uuritava muutuja väärtuste jaotuse analüüsimiseks sobiv, ning see valik tuleks teha enne uuringu alustamist.

Tulemuste hindamine

73. Käesoleva meetodi kohase mürgisusuuringu tulemusi tuleks hinnata lähtuvalt täheldatud mõjust, lahkamistulemustest ja mikroskoopilistest leidudest. Hindamine hõlmab seose kindlakstegemist uuritava kemikaali annuse ja kõrvalekallete – sealhulgas silmaga nähtavate kahjustuste, tuvastatud sihtelunditele avalduva mõju, viljatuse, kliiniliste kõrvalekallete, paljunemisvõimele ja pesakonnale avalduva mõju, kehamassi muutuste, suremusele avalduva mõju ja mis tahes muu mürgise mõju – esinemise või puudumise, esinemissageduse ja raskusastme vahel.
74. Isasloomade töötlemise lühiajalisuse tõttu tuleks isasloomade paljunemisele avalduva mõju hindamisel vaadelda munandite ja munandimanuste histopatoloogilise analüüsi tulemusi koos viljakusandmetega. Ühtlasi võib uuringutulemuste tõlgendamise hõlbustamiseks olla kasulik kasutada kontrollidega saadud varasemaid paljunemist/arengut käsitlevaid andmeid (nt pesakonna suuruse, AGD, nisade esinemise või seerumi T₄-sisalduse kohta), kui need on olemas.

75. Kvaliteedikontrolli eesmärgil on soovitatav koguda kontrolle käsitlevaid varasemaid andmeid ja arvutada arvandmete jaoks variatsioonikordajad, eriti näitajate puhul, mis on seotud endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide kindlakstegemisega. Neid andmeid võib kasutada võrdlusalusena käsiloleva uuringu tulemuste hindamiseks.

Katseprotokoll

76. Katseprotokollis tuleks esitada järgmine teave.

Uuritav kemikaal:

- allikas, partii number, aegumiskuupäev, kui on olemas;
- uuritava kemikaali püsivus, kui see on teada;

ühest koostisosast koosnev aine:

- füüsiline välimus, lahustuvus vees ja muud asjakohased füüsikalised-keemilised omadused;
- kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus, CASi number, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem, puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne;

mitut koostisosa sisaldav aine, UVCB või segu:

- võimalikult täpne omaduste kirjeldus lähtuvalt koostisosade keemilisest määratlusest (vt eespool), kvantitatiivsest sisaldusest ja asjakohastest füüsikalised-keemilistest omadustest.

Kandeaine (vajaduse korral):

- kandeaine valimise põhjendus, kui kandeaine ei ole vesi.

Katseloomad:

- kasutatud liik/liin;
- loomade arv, vanus ja sugu;
- päritolu, pidamistingimused, söötmisandmed jne;
- iga looma kehamass katse alguses;
- liigi valimise põhjendus, kui katseloom ei ole rott.

Katsetingimused:

- annuste valimise põhjendus;
- üksikasjad uuritava kemikaali valmistise / söödavalmistise, saavutatud kontsentratsioonide ning valmistise püsivuse ja homogeensuse kohta;
- uuritava kemikaali manustamise üksikasjad;

- vajaduse korral andmed söödas/joogivees sisalduva uuritava kemikaali kontsentratsiooni (ppm) teisendamiseks tegelikuks annuseks (mg kehamassi kilogrammi kohta päevas);
- sööda ja vee kvaliteedi üksikasjad;
- järglaste surmamise korral üksikasjalik kirjeldus surmatavate järglaste juhusliku valimise korra kohta.

Tulemused:

- kehamass / kehamassi muutused;
- vajaduse korral söödatarbimine ja veetarbimine;
- mürgise mõju andmed kummagi soo ja iga annusemäära kohta, sealhulgas viljakusele ja tiinusele avalduva mõju ning mis tahes muude mürgisusnähtude kohta;
- tiinuse kestus;
- mürgisus või muu mõju paljunemisele, järglastele, sünnijärgsele kasvule jne;
- kliiniliste ilmingute laad, raskusaste ja kestus (nähtude pöördumus või pöördumatus);
- sensoorse aktiivsuse, haardetugevuse ja motoorse tegevuse hindamise tulemused;
- hematoloogilise analüüsi tulemused koos asjaomaste võrdlusväärtustega;
- kliinilise biokeemilise analüüsi tulemused koos asjaomaste võrdlusväärtustega;
- normaalse või ebanormaalse innatsükliga täiskasvanud emasloomade arv ja tsükli kestus;
- elussündide arv ja pesastumisjärgne kadu;
- silmaga nähtavate kõrvalekalletega järglaste arv; väliste suguelundite makroskoopilise hindamise tulemused, kängunud järglaste arv;
- katse vältel suremise aeg või teave selle kohta, et loomad olid kuni surmamiseni elus;
- pesastunud embrüote arv, pesakonna suurus ja pesakonna kaal mõõtmishetkel;
- järglaste kehamassi andmed;
- iga järglase AGD (ja kehamass AGD mõõtmise päeval);
- nisade esinemine isastel järglastel;
- kilpnäärmehormoonide sisaldus järglastelt 13. päeval võetud proovides ja täiskasvanud isasloomade proovides (ning järglastega emasloomade proovides ja järglastelt 4. päeval võetud proovides, kui seda on mõõdetud);
- andmed järglastega loomade kehamassi kohta surmamise hetkel ning selliste loomade elundite massi kohta;
- lahkamistulemused;

- histopatoloogiliste leidude üksikasjalik kirjeldus;
- andmed absorbeerumise kohta (kui on olemas);
- vajaduse korral tulemuste statistilise analüüsi andmed.

Tulemuste arutelu

Järeldused

Tulemuste tõlgendamine

77. Kirjeldatud uuring võimaldab hinnata annuste korduval manustamisel täheldatavat paljunemisele/arengule avalduvat mürgist mõju. Kuna rõhk on seatud nii üldise mürgisuse kui ka reproduktiiv-/arengutoksilisuse lõppnäitajate hindamisele, võimaldavad uuringu tulemused eelkõige eristada üldise mürgisuse puudumisel paljunemisele/arengule avalduvat mõju sellisest mõjust paljunemisele/arengule, mis avaldub üksnes kontsentratsioonil, mille juures kemikaal on mürgine ka järglaste vanematele (vt punktid 7–11). Saadud tulemused võivad viidata vajadusele teha täiendavaid uuringuid ja võivad hõlbustada järgnevate uuringute kavandamist. Paljunemise ja arenguga seotud tulemuste hõlpsamaks tõlgendamiseks tuleks tutvuda OECD juhenddokumendiga nr 43 (19). Käesoleva katsemeetodi puhul võib olla kasu närilistega tehtavate sisesekreetsioonisüsteemi ja paljunemisega seotud katsete tulemuste histoloogilist hindamist käsitlevas OECD juhenddokumendis nr 106 (16) esitatud teabest (sisesekreetsiooni)elundite ja tupeäiete ettevalmistamise ja hindamise kohta.

KIRJANDUS

- (1) OECD (1990). Kemikaalide töörühma ja halduskomitee 14. ühiskoosoleku koosolekudokument nr 1. Taotluse korral kättesaadav Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioonist Pariisis.
- (2) OECD (1992). Ajutise eksperdirühma esimehe aruanne reproduktiivtoksilisust käsitlevate sõeluuringumeetodite alase koosoleku kohta. Tokyo, 27.–29. oktoober 1992. Taotluse korral kättesaadav Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioonist Pariisis.
- (3) Mitsumori, K., Kodama, Y., Uchida, O., Takada, K., Saito, M., Naito, K., Tanaka, S., Kurokawa, Y., Usami, M., Kawashima, K., Yasuhara, K., Toyoda, K., Onodera, H., Furukawa, F., Takahashi, M., ja Hayashi, Y. (1994). Confirmation Study, Using Nitro-Benzene, of the Combined Repeat Dose and Reproductive/ Developmental Toxicity Test Protocol Proposed by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). *J. Toxicol. Sci.* 19: 141–149.
- (4) Tanaka, S., Kawashima, K., Naito, K., Usami, M., Nakadate, M., Imaida, K., Takahashi, M., Hayashi, Y., Kurokawa, Y., ja Tobe, M. (1992). Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test (OECD): Familiarization Using Cyclophosphamide. *Fundam. Appl. Toxicol.* 18: 89–95.
- (5) OECD (1998). Endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide uurimise ja hindamise (EDTA) OECD rakkerühma esimese koosoleku aruanne. 10.–11. märts 1998. Taotluse korral kättesaadav Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioonist Pariisis.
- (6) OECD (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 217. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (7) 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. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (8) Goldman, J. M., Murr, A. S., ja Cooper, R. L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies. *Birth Defects Res. B* 80(2): 84–97.

- (9) Sadleir, R. M. F. S. (1979). Cycles and Seasons. Väljaandes: Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization. Auston, C. R., ja Short, R. V. (toim.), Cambridge, New York.
- (10) Rahvusvaheline kemikaaliohutuse programm (IPCS) (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.
- (11) Moser, V. C., McDaniel, K. M., ja Phillips, P. M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 108: 267–283.
- (12) Meyer, O. A., Tilson, H. A., Byrd, W. C., ja Riley, M. T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.* 1: 233–236.
- (13) Crofton, K. M., Howard, J. L., Moser, V. C., Gill, M. W., Reiter, L. W., Tilson, H. A., ja MacPhail, R. C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.* 13: 599–609.
- (14) Gallavan, R. H. Jr., Holson, J. F., Stump, D. G., Knapp, J. F., ja Reynolds, V. L. (1999). Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights. *Reprod. Toxicol.* 13: 383–390.
- (15) OECD (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 151. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (16) OECD (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 106. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (17) Hess, R. A., ja Moore, B. J. (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. Väljaandes: Methods in Reproductive Toxicology. Chapin, R. E., ja Heindel, J. J. (toim.), Academic Press, San Diego, CA. Lk 52–85.
- (18) Latendresse, J. R., Warbritton, A. R., Jonassen, H., ja 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.
- (19) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications,

Series on Testing and Assessment No. 43. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

- (20) OECD (2011). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Series on Testing and Assessment No. 150. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

1. liide

MÕISTED (VT KA OECD JUHENDDOKUMENT NR 150 (20))

Androgeensus – kemikaali võime toimida imetaja organismis samal viisil kui looduslik androgeen (nt testosteroon).

Annus – manustatav uuritava kemikaali kogus. Annust väljendatakse uuritava kemikaali kogusena massiühikutes katselooma kehamassi ühiku kohta päevas (näiteks milligrammides kehamassi kilogrammi kohta päevas) või kemikaali püsiva kontsentratsioonina söödas.

Annustamine – üldmõiste, mis hõlmab annust, selle manustamise sagedust ja annustamise kestust.

Antiandrogeensus – kemikaali võime pärssida imetaja organismis loodusliku androgeeni (nt testosterooni) toimet.

Antitüreoidne aktiivsus – kemikaali võime pärssida imetaja organismis loodusliku kilpnäärmehormooni (nt T₃) toimet.

Antiöstrogeensus – kemikaali võime pärssida imetaja organismis loodusliku östrogeeni (nt 17β-östradioli) toimet.

Arengutoksilisus – reproduktiivtoksilisuse ilming, mis avaldub järglaste sünnieelse, perinataalse või sünnijärgse struktuuri- või funktsioonihäirena.

Emale avalduv mürgisus – tiinele emasloomale avalduv kahjulik mõju, mis on spetsiifiline (otsene mõju) või mittespetsiifiline (kaudne mõju) ning on seotud tiinusega.

Ilmne mürgisus – üldmõiste, mille abil kirjeldatakse uuritava kemikaali manustamise järel täheldatavaid selgeid mürgisusnähte. Kõnealused nähud peaksid olema ohu hindamiseks piisavad ja sellised, et manustatava annuse suurendamisega kaasnevad eeldatavalt tõsised mürgisusnähud ja tõenäoliselt ka surm.

Kemikaal – aine või segu.

NOAEL – lühend, millega tähistatakse annusemäära, mille juures ei täheldata kahjulikku toimet. Tegemist on suurima annusega, mis ei põhjusta manustamisest tingitud kahjulikke ilminguid.

Reproduktiivtoksilisus – kahjulik mõju järglastele ja/või isas- või emasloomade paljunemisfunktsioonile või paljunemisvõimele.

Türeoidne aktiivsus – kemikaali võime toimida imetaja organismis samal viisil kui looduslik kilpnäärmehormoon (nt T₃).

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

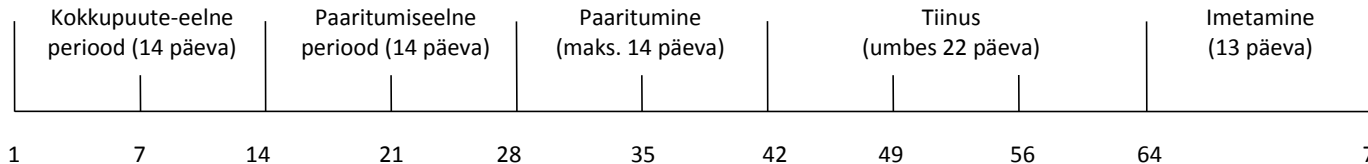
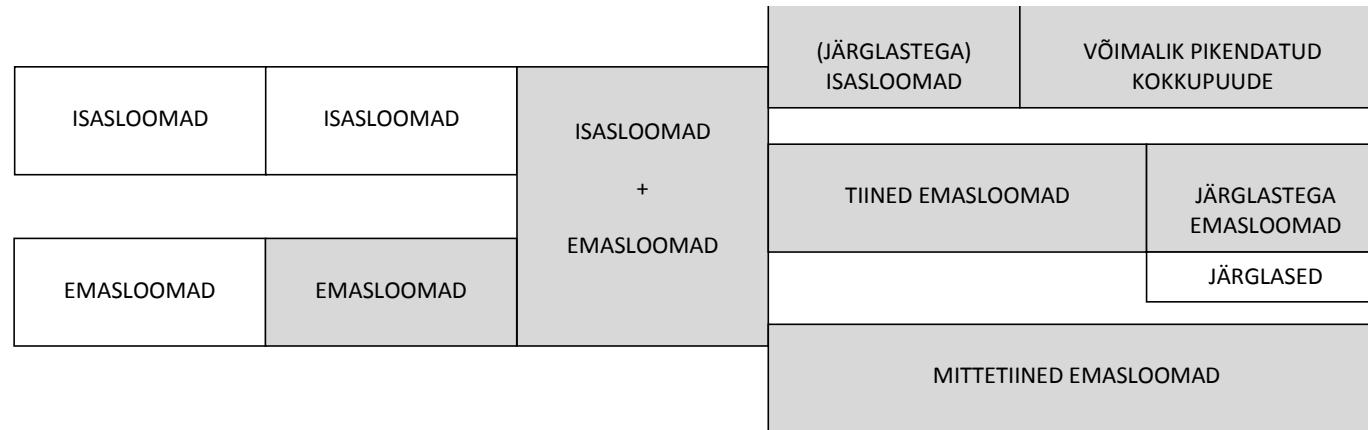
Valideerimine – teaduslik protsess, mille eesmärk on iseloomustada katsemeetodi rakendamisega seotud nõudeid ja piiranguid ning tõendada meetodi usaldusväärsust ja sobivust konkreetsel eesmärgil kasutamiseks.

Viljakuse vähenemine – isas- või emaslooma paljunemise funktsiooni häire või paljunemisvõime langus.

Östrogeensus – kemikaali võime toimida imetaja organismis samal viisil kui looduslik östrogeen (nt 17β -östradiool).

2. liide

UURINGU MAKSIMUMKESTUSELE VASTAV TÄISPIKAL 14-PÄEVASEL PAARITUMISPERIOODIL PÕHINEV KATSE SKEMAATILINE AJAKAVA



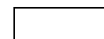
Uuringu algus

Kokkupuute-eelne
innatsükli hindamine,
seejärel tupeäiate
igapäevane hindamine
töötlemisperioodi
algusest kuni
paaritumise ilmingute
tuvastamiseni

Manustamisega



Manustamiseta



Hematoloogiline /
kliiniline biokeemiline
analüüs isas- ja
emasloomadel
(vajadusel)

(Järglastega) isasloomade
lahkamine;
funktsionaalsed vaatlused
isasloomadel (vajadusel);
hematoloogiline / kliiniline
biokeemiline analüüs
isasloomadel nende
surmamise korral (pärast
vähemalt 4 nädala pikkust
manustamisperioodi)

Ajavahemikul
sünnijärgsest 0-
päevast kuni 4.
sünnijärgse päevani:
AGD kõikidel
järglastel (samal
päeval);
igast peskonnast 2
järglase surmamine
T₄ mõõtmiseks (4.
sünnijärgsel päeval)

13. sünnijärgsel päeval:
emasloomade ja järglaste
lahkamine; (järglastega)
isasloomade võimalik
lahkamine; funktsionaalsed
vaatlused isasloomadel
(vajadusel) ja emasloomadel;
hematoloogiline / kliiniline
biokeemiline analüüs isas- ja
emasloomadel (vajadusel);
nisade loendamine isastel
järglastel

3. liide

**TABELI KUJUL KOKKUVÕTLIK ARUANNE PALJUNEMISELE/ARENGULE
AVALDUVA MÕJU KOHTA**

VAATLUSED	VÄÄRTUSED				
Annus (ühik)	0 (kontroll)	...	...	...	...
Paaride arv katse alguses (<i>N</i>)					
Innatstikkel (vähemalt keskmine pikkus ja ebaregulaarsete tsüklite esinemissagedus)					
Emasloomad, kellel täheldatakse paaritumise ilminguid (<i>N</i>)					
Tiinestunud emasloomad (<i>N</i>)					
Eostunud 1.–5. päeval (<i>N</i>)					
Eostunud 6.–.... ⁽¹⁾ päeval (<i>N</i>)					
Tiinuse kestus ≤ 21 päeva (<i>N</i>)					
Tiinuse kestus 22 päeva (<i>N</i>)					
Tiinuse kestus ≥ 23 päeva (<i>N</i>)					
Elusalt sündinud järglastega emasloomad (<i>N</i>)					
4. sünnijärgse päevani elus püsinud järglastega emasloomad (<i>N</i>)					
Pesastunud embrüote arv tiinestunud emaslooma kohta (keskmine)					
Elussündide arv järglastega emaslooma kohta (keskmine)					
4. päevani elus püsinud järglaste arv järglastega emaslooma kohta (keskmine)					
Sugude vahekord (isased/emased) sünnihetkel (keskmine)					
Sugude vahekord (isased/emased) 4. päeval (keskmine)					
Pesakonna kaal sünnihetkel (keskmine)					
Pesakonna kaal 4. päeval (keskmine)					
Järglaste kehamass sünnihetkel (keskmine)					
Järglaste kehamass AGD mõõtmise hetkel (isasloomade keskmine, emasloomade keskmine)					
Järglaste AGD samal sünnijärgsel päeval ajavahemikul sündimispäevast kuni 4. päevani (isasloomade keskmine, emasloomade keskmine; märkida sünnijärgne mõõtmispäev)					
Järglaste kehamass 4. päeval (keskmine)					

⁽¹⁾ Paaritumisperioodi viimane päev.

Järglaste kehamass 13. päeval (keskmine)					
Nisade esinemine isastel järglastel 13. päeval (keskmine)					
KÕRVALEKALLETEGA JÄRGLASED					
Järglastega emasloomad, kellel on 0 kõrvalekalletega järglast					
Järglastega emasloomad, kellel on 1 kõrvalekalletega järglane					
Järglastega emasloomad, kellel on ≥ 2 kõrvalekalletega järglast					
JÄRGLASTE KADU					
Sünnieelne (pesastunud embrüote arvu ja elussündide arvu vahe)					
0 järglast kaotanud emasloomad					
1 järglase kaotanud emasloomad					
2 järglast kaotanud emasloomad					
≥ 3 järglast kaotanud emasloomad					
Sünnijärgne (elussündide arvu ja 13. sünnijärgse päevani elus püsinud järglaste arvu vahe)					
0 järglast kaotanud emasloomad					
1 järglase kaotanud emasloomad					
2 järglast kaotanud emasloomad					
≥ 3 järglast kaotanud emasloomad					

B.65 *IN VITRO* MEMBRAANIBARJÄÄRI KATSEMEETOD NAHASÖÖVITUSE UURIMISEKS

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 435 (2015). Nahasöövituse on Ühinenud Rahvaste Organisatsiooni (ÜRO) ühtse ülemaailmse kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteemis (GHS (Globally Harmonized System) (1) ning Euroopa Liidu määruses (EÜ) nr 1272/2008, mis käsitleb ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist (CLP-määrus),¹ esitatud määratluse kohaselt pöördumatu nahakahjustuse, st marrasknahast pärisnahani ulatuva nähtava nekroosi tekkimine uuritava kemikaali pealekandmise tagajärjel. Käesolev katsemeetod, mis on samaväärne ajakohastatud OECD katsejuhendiga nr 435, on *in vitro* membraanibarjääri katsemeetod, mis saab kasutada söövitavate kemikaalide kindlakstegemiseks. Katsemeetodis kasutatakse tehismembraani, mis on kavandatud söövitavatele kemikaalidele reageerima sarnaselt loomanahale *in situ*.
2. Nahka söövitavat toimet on tavapäraselt hinnatud, kandes uuritavat kemikaali elusloomade nahale ja hinnates nahakahjustuse ulatust pärast kindla perioodi möödumist (2). Peale käesoleva meetodi on söövitavate kemikaalide kindlakstegemiseks kasutatava standardse küüliku *in vivo* nahakatse (käesoleva lisa peatükk B.4, samaväärne OECD katsejuhendiga nr 404) (2) alternatiividena vastu võetud mitu muud *in vitro* katsemeetodit (3, 4). ÜRO GHSi astmelise katsetamise ja hindamise strateegia nahka söövitava toime hindamiseks ja klassifitseerimiseks ning OECD juhenddokumendis nahaärrituse/-söövitusega seotud katsete tegemist ja hindamist käsitleva ühtse lähenemisviisi kohta soovatakse kasutada valideeritud ja heaks kiidetud *in vitro* katsemeetodeid moodulite 3 ja 4 kohaselt (1, 5). Kõnealuse katsete tegemist ja hindamist käsitleva ühtse lähenemisviisi raames kirjeldatakse mitut moodulit, milles teabeallikad ja analüüsivahendid on rühmitatud, ning i) antakse suuniseid, kuidas lõimida ja kasutada olemasolevaid katse- ja muid andmeid kemikaalide võimaliku nahka ärritava ja nahka söövitava toime hindamiseks ja ii) pakutakse välja lähenemisviisi juhiks, kui on vaja teha täiendavaid katseid, kaasa arvatud juhiks, kui saadakse negatiivsed tulemused (5). Selle modulaarse lähenemisviisi korral saab kasutada *in vitro* katsemeetoditega saadud positiivseid tulemusi kemikaali

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

klassifitseerimiseks söövitavana, ilma et oleks vaja täiendavaid loomkatseid; seega vähendatakse ja täiustatakse loomade kasutamist ja välditakse nende kasutamisega kaasneva võimaliku valu ja kannatust.

3. Valideerimisuuringud viidi läbi *in vitro* membraanibarjääri mudeliga, mis on müügil nimega Corrositex® (6, 7, 8) ja millega 163 ainest ja segust koosneva andmebaasi järgi oli kogutäpsus nahka söövitava toime prognoosimisel 79 % (128/163), tundlikkus 85 % (76/89) ning spetsiifilisus 70 % (52/74) (7). Tunnustatud nõuetekohasuse alusel on seda valideeritud võrdlusmeetod (VRM) soovitatav kasutada astmelise katsetamise strateegia osana kemikaalide võimalik nahka söövitava toime hindamisel (5, 7). Enne kui *in vitro* membraanibarjääri mudeliga katsemeetodit nahasöövituse uurimiseks võib kasutada regulatiivsel eesmärgil, tuleb kooskõlas eelnevalt kindlaksmääratud toimivusnõuetega (10) kindlaks teha selle usaldusväärsus, asjakohasus (täpsus) ja selle kavandatud kasutusega seotud piirangud, et tagada selle sarnasus valideeritud võrdlusmeetodiga (9). Andmete vastastikune tunnustamine vastavalt OECD kokkuleppele tagatakse ainult pärast seda, kui mis tahes uus või ajakohastatud kavandatud meetod on toimivusnõudeid järgides läbi vaadatud ja lisatud samaväärsesse OECD katsejuhendisse. Praegu on OECD katsejuhendiga nr 435 hõlmatud ainult üks *in vitro* ja käesoleva katsemeetod müügil oleva Corrositex®i mudeliga.
4. Teised katsemeetodid nahka söövitava toime uurimiseks põhinevad rekonstrueeritud inimnahal (OECD katsejuhend nr 431) (3) ja isoleeritud rotinahal kasutamisel (OECD katsejuhend nr 430) (4). Käesoleva katsesuunise järgi saab söövitavaid kemikaale jagada kolme ÜRO GHSi kohasesse söövitavuse alamkategoriasse ja söövitusohu järgi kolme ÜRO veopakendi rühma. Käesolev katsejuhend võeti esmakordselt vastu 2006. aastal ja seda ajakohastati 2015. aastal, et viidata katsete tegemist ja hindamist käsitleva ühtse lähenemisviisi juhenddokumendile ning ajakohastada pädevuse tõendamise ainete loendit.

MÕISTED

5. Kasutatud mõisted on esitatud liites.

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

6. Selles katsemeetodis kirjeldatud katse-eeskiri võimaldab kvalitatiivselt analüüsida söövitavaid uuritavaid kemikaale ning jagada need ÜRO GHSi / CLP-määruse kohastesse alamkategoriasse (tabel 1). Peale selle võib sellist katsemeetodit kasutada otsustamiseks

konkreetsete kemikaaliklasside, nt orgaaniliste ja anorgaaniliste hapete, happederivaatide¹ ja aluste söövitavate ja mittesöövitavate omaduste üle teatavate veokatsete puhul (7, 11, 12). Käesolevas katsemeetodis kirjeldatakse valideeritud võrdlusmeetodile (7) sarnanevat üldmeetodikat. See katsemeetod ei anna asjakohast teavet nahaärrituse kohta, seega tuleb märkida, et katsemeetodiga B.46 (samaväärne OECD katsejuhendiga nr 439) uuritakse spetsiaalselt *in vitro* sellist tervisemõju nagu nahaärritus (13). Nahale pärast ühekordset kokkupuudet avalduva paikse toime täielikuks hindamiseks tuleb juhinduda OECD juhenddokumendist katsete tegemist ja hindamist käsitleva ühtse lähenemisviisi kohta (5).

Tabel 1. ÜRO GHSi kohane nahka söövitava aine kategooria ja alamkategooriad (1)

Söövituskategooria (1. kategooria) (ametiasutustele, kes alamkategooriaid ei kasuta)	Võimalikud söövituse alamkategooriad ² (ametiasutustele, kes kasutavad alamkategooriaid, sealhulgas CLP-määrust)	Söövitav vähemalt ühe looma puhul kolmest	
		Kokkupuuteaeg	Vaatlus
Söövitav	Söövitav, alamkategooria 1A	≤ 3 minutit	≤ 1 tund
	Söövitav, alamkategooria 1B	> 3 minutit / ≤ 1 tund	≤ 14 päeva
	Söövitav, alamkategooria 1C	> 1 tund / ≤ 4 tundi	≤ 14 päeva

7. Valideeritud võrdlusmeetodi (7) puuduseks on asjaolu, et paljud mittesöövitavad kemikaalid ja mõned söövitavad kemikaalid ei tarvitse esialgse sobivuskatse (vt punkt 13 alusel) uurimiseks sobida. Sageli ei sobi uurimiseks kemikaalide vesilahused, mille pH on vahemikus 4,5...8,5; 85 % kõnealuse pH-vahemikuga uuritud kemikaalidest osutusid loomkatsetel mittesöövitavaks (7). *In vitro* membraanibarjääri meetodit võib kasutada tahkete ainete (vees lahustuvad või mittelahustuvad), vedelike (vesilahused või mitte) ja emulsioonide uurimiseks. Kuid uuritavaid kemikaale, mis sobivuskatsel tuvastatavat muutust (nt värvuse muutust valideeritud võrdlusmeetodi kemikaalide detekteerimissüsteemis) esile ei kutsu, ei saa membraanibarjääri meetodiga uurida ning nende uurimiseks tuleks kasutada muid katsemeetodeid.

KATSE PÕHIMÕTE

¹ Happederivaadid ei ole konkreetne klass ning on üldiselt määratletud kui hapest kas otseselt, muundamis- või asendusreaktsiooni käigus saadud kemikaal. Sellesse klassi kuuluvad anhüdriidid, halogenohapped, soolad ja muud liiki kemikaalid.

² ELis kohaldatakse CLP-määrust, milles on esitatud kolm nahka söövitava aine alamkategooriat: 1A, 1B ja 1C.

8. Katsesüsteem koosneb kahest osast: sünteetilisest makromolekulaarsest biobarjäärist ja kemikaalide detekteerimissüsteemist; selle katsemeetodiga tuvastatakse kemikaalide detekteerimissüsteemi abil membraanibarjääri kahjustus, mille on põhjustanud söövitav uuritav kemikaal pärast sünteetilise makromolekulaarse membraanibarjääri pinnale kandmist (7) eeldatavast sama(de) söövitusemehhanismi(de) järgi mis toimivad elusorganismi nahal.
9. Membraanibarjääri läbimist saab mõõta mitme toiminguga või kemikaali detekteerimissüsteemiga, sealhulgas pH indikaatori värvuse muutuse või mõne muu indikaatorlahuse omaduse muutusega barjääri all.
10. Membraanibarjäär peab olema ettenähtud kasutamiseks nõuetekohane, st asjakohane ja usaldusväärne. Muu hulgas peavad olema tagatud preparaatide ühtsed barjääriomadused, st barjääri säilimine mittesöövitavate kemikaalide suhtes ja võimalus liigitada kemikaalid söövitusomaduste järgi erinevatesse ÜRO GHSi söövitavuse alamkategoriatesse (1). Klassifitseerimine põhineb ajal, mis kulub kemikaali läbitungimiseks membraanibarjäärist ja indikaatorlahuseni jõudmiseks.

PÄDEVUSE TÕENDAMINE

11. Enne käesoleval meetodil põhinevat *in vitro* membraanibarjääri meetodi rutiinset kasutamist tuleb laboril tõendada oma tehnilist pädevust, klassifitseerides õigesti tabelis 2 soovitatud kaksteist pädevuse kontrolli ainet. Olukorras, kus loetletud aine ei ole kättesaadav, või kui see on põhjendatud, võib kasutada muud ainet (nt võrdluskemikaalide loetlust (10)), mille puhul on kättesaadavad piisavad võrdlusandmed *in vivo* ja *in vitro* katsete kohta, eeldusel, et järgitakse samu valikukriteeriumeid nagu esitatud tabelis 1.

Tabel 2. Pädevuse kontrolli ained¹

Aine ²	CASi nr	Aineklass	<i>In vivo</i> ÜRO GHSi kohane alamkategooria ³	<i>In vitro</i> ÜRO GHSi kohane alamkategooria ³
Boortrifluoriiddihüdraat	13319-75-0	Anorgaanilised happed	1A	1A
Lämmastikhape	7697-37-2	Anorgaanilised happed	1A	1A
Fosforpentakloriid	10026-13-8	Anorgaaniliste hapete prekursorid	1A	1A
Valerüülkloriid	638-29-9	Hapete kloriidid	1B	1B
Naatriumhüdroksiid	1310-73-2	Anorgaanilised alused	1B	1B
1-(2-aminoetüül)piperasiin	140-31-8	Alifaatsed amiinid	1B	1B

Benseensulfonüülkloriid	98-09-9	Hapete kloriidid	1C	1C
<i>N,N</i> -dimetüülbensüülamiin	103-83-3	Aniliinid	1C	1C
Tetraetüleenpentamiin	112-57-2	Alifaatsed amiinid	1C	1C
Eugenool	97-53-0	Fenoolid	MS	MS
Nonüülakrülaad	2664-55-3	Akrülaadid/metakrülaadid	MS	MS
Naatriumvesinikkarbonaat	144-55-8	Anorgaanilised soolad	MS	MS

¹Eespool loetletud kaheteistkümne aine seas on igast ÜRO GHSi söövitavate ainete alamkategooriast kolm ainet ja kolm mittesöövitavat ainet; kõik ained on kaubanduses kättesaadavad ja ÜRO GHSi alamkategooriasse on nad määratud *in vivo* katsel saadud kvaliteetsete tulemuste alusel. Need ained on võetud loendist, mis sisaldab 40 ainet, mis omakorda kuuluvad miinimumloendisse kemikaalidest, mis on kindlaks määratud struktuurilt ja funktsioonilt valideeritud katsemeetodiga sarnaste katsemeetodite täpsuse ja usaldusväärsuse tõendamiseks, ning valiti 163 võrdluskemikaali seast, mida algselt kasutati võrdlusmeetodi (Corrositex[®]) valideerimiseks (7, 10, 14). Sellise valimise eesmärk oli, et võimaluste piires oleks valikuga hõlmatud kemikaalid, mis: kutsuvad esile söövitusreaktsiooni kogu vahemikus, mida valideeritud võrdlusmeetodiga on võimalik mõõta või prognoosida (st on mittesöövitavad või kuuluvad ÜRO I, II ja III söövitavate ainete pakendirühma); esindavad samu aineklasse, mida kasutati valideerimisel; on hästi teada oleva keemilise struktuuriga; andsid valideeritud võrdlusmeetodiga korratavaid tulemusi; andsid *in vivo* võrdluskatsel üheselt mõistetavaid tulemusi; on müügil ja mille kõrvaldamine ei ole seotud ülemääraste kuludega (14).

²Uuritavad ained puhtal kujul või puhtusastmega ≥ 90 %.

³ÜRO pakendirühmad I, II ja III vastavad ÜRO GHSi alamkategooriatele 1A, 1B ja 1C. MS: mittesöövitav.

METOODIKA

- Järgmistes punktides kirjeldatakse söövitavate omaduste hindamiseks kasutatava tehismembraanibarjääri katsemeetodi (7, 15) osi ja meetoodikaid, mis põhinevad praegusel valideeritud võrdlusmeetodil, st müügil oleval Corrositex[®]-iga kasutaval meetodil. Membraanibarjääri, sobivuskatsel kasutatavad ja indikaatorlahused ning lahused, mis võimaldavad klassifitseerimist, võib sünteesida, valmistada või osta, nagu valideeritud võrdlusmeetodi puhul ostetakse Corrositex[®]. Saadaval on valideeritud katsemeetodi katse-eeskirja näidis (7). Katsed tuleb läbi viia toatemperatuuril (17–25 °C) ja nende osad peavad vastama järgmistele tingimustele.

Uuritava kemikaali sobivuskatse

- Enne membraanibarjääri katse tegemist tehakse sobivuskatse, et selgitada välja, kas kemikaali detekteerimissüsteem suudab uuritavat kemikaali avastada. Kui kemikaali detekteerimissüsteem uuritavat kemikaali avastada ei suuda, ei sobi membraanibarjääri katsemeetod selle konkreetse uuritava kemikaali võimalike söövitavate omaduste hindamiseks ja selleks tuleks kasutada teistsugust katsemeetodit. Sobivuskatses kasutatav kemikaali detekteerimissüsteem ja valitsevad kokkupuutetingimused peavad imiteerima järgnevas membraanibarjääriskatses toimuvat kokkupuudet.

Uuritava kemikaali ajakategooria katse

14. Kui see on katsemeetodi juures asjakohane, peab sobivuskatse läbinud uuritav kemikaal läbima ka ajakategooria katse, st sõelkatse, millega eristatakse üksteisest nõrgad ja tugevad happed ja alused. Näiteks valideeritud võrdlusmeetodis kasutatakse ajakategooria katset selleks, et teha kindlaks, millist ajavahemikku kahest võimalikust kasutada, võttes aluseks leitud puhvermahtuvuse suuruse. Olenevalt uuritava kemikaali puhvermahtuvusest tuleks söövitavate omaduste ja ÜRO GHSi nahasöövituse alamkategooriate kindlaksmääramisel kasutada kaht erinevat läbimisaja vahemikku.

MEMBRAANIBARJÄÄRI KATSEMEETODI OSAD

Membraanibarjäär

15. Membraanibarjäär koosneb kahest osast: Makromolekulaarne veepõhine valgugeel ja läbitav tugimembraan. Valgugeel peab olema vedelikele ja tahketele ainetele läbitungimatu, kuid see võib muutuda läbitavaks söövitamise tulemusena. Valmis konstrueeritud membraanibarjääri tuleb hoida eelnevalt kindlaksmääratud tingimustes, mis välistavad geeli riknemise, nt kuivamise, mikroobide kasvu, kihistumise, pragunemise vms, mis halvendaks selle toimivust. Tuleb kindlaks määrata vastuvõetav säilitusaeg ja pärast selle möödumist membraanibarjääri preparaate mitte kasutada.
16. Läbitav tugimembraan pakub valgugeelile mehaanilist tuge geelistumise ja uuritava kemikaaliga kokkupuute ajal. Tugimembraan peaks takistama geeli kortsumist ja nihkumist ning laskma hästi läbi kõiki uuritavaid kemikaale.
17. Valgugeel, mis koosneb näiteks keratiinist, kollageenist või valkude segust, mis moodustavad geelimaatriksi, on uuritava kemikaali sihtobjekt. Valgumaterjal kantakse tugimembraani pinnale ja lastakse enne membraanibarjääri indikaatorlahuse kohale seadmist geelistuda. Valgugeel peab olema läbivalt ühtlase paksuse ja tihedusega, ilma õhumullide ja muude defektideta, mis võiksid mõjutada selle funktsionaalset terviklikkust.

Kemikaalide detekteerimissüsteem

18. Indikaatorlahus, mis on sama mis sobivuskatses kasutatud, peab reageerima uuritava kemikaali olemasolule. Kasutada tuleb värvainest või värvainete segust pH-indikaatorit, nt kresoolpunast või metüüloranži, mis uuritava kemikaali olemasolule reageerides värvi muudavad. Mõõtesüsteem võib olla visuaalne või elektrooniline.
19. Detekteerimissüsteeme, mis on välja töötatud tuvastama uuritava kemikaali läbiminekut membraanibarjäärist, tuleb hinnata asjakohasuse ja usaldusväärsuse seisukohast, et teha kindlaks avastatavate kemikaalide hulk ja kvantitatiivne avastamispiir.

KATSE KÄIK

Katsemeetodi osade kokkupanek

20. Membraanibarjäär paigutatakse indikaatorlahust sisaldavasse viaali (või katseklaasi), nii et tugimembraan on indikaatorlahusega täielikus kontaktis ja õhumulle ei esine. Tuleb olla ettevaatlik, et barjääri terviklikkus säiliks.

Uuritava kemikaaliga töötlemine

21. Membraanibarjääri pealmisele pinnale kantakse hoolikalt ühe kihina sobiv kogus (nt 500 µl vedelikku või 500 mg pulbristatud tahket ainet (7)) uuritavat kemikaali ja aetakse ühtlaselt laiali. Iga uuritava kemikaaliga tehakse sobiv hulk paralleelproove, nt neli (7), samuti tehakse paralleelsed kontrollproovid (vt punktid 23–25). Registreeritakse uuritava kemikaali membraanibarjäärile kandmise aeg. Et tagada lühikese söövitusaaja täpne registreerimine, ei kanta uuritavat kemikaali paralleelproovidega viaalidesse samaaegselt.

Membraanibarjääri läbimise mõõtmine

22. Iga viaali jälgitakse ning registreeritakse ajahetk, mil indikaatorlahus esmakordselt muutub, st barjäär läbitakse, samuti tehakse kindlaks kemikaali pealekandmisest membraanibarjääri läbimiseni kulunud aeg.

Kontrollproovid

23. Katsetes, kus koos uuritava kemikaaliga kasutatakse kandeainet või lahustit, peab kandeaine või lahusti membraanibarjäärisüsteemiga sobima, st see ei tohi muuta membraanibarjääri süsteemi terviklikkust ega uuritava kemikaali söövitavaid omadusi. Vajaduse korral tuleb uuritava kemikaaliga paralleelselt teha kontrollproov lahusti (või kandeainega), et veenduda lahusti sobivuses membraanibarjäärisüsteemiga.
24. Selleks, et hinnata katsesüsteemi vastuvõetavat toimivust, tehakse uuritava kemikaaliga paralleelselt katse positiivse (söövitava) kontrollprooviga, mille söövitavad omadused on keskmised, nt 110 ± 15 mg naatriumhüdroksiidiga (ÜRO GHSi söövitavate ainete alamkategooria 1B) (7). Söövitava uuritava kemikaali suhtelise söövituspotsentiaali hindamiseks võib kasutada teist positiivset kontrollproovi ainest, mis kuulub uuritava kemikaaliga samasse aineklassi. Positiivsetesse kontrollproovidesse tuleb valida ained, mille söövitavad omadused on keskmise tugevusega (nt ÜRO GHSi alamkategooriasse 1B kuuluvad ained), et avastada muutusi läbitungimisaajas, mis võib olla lubamatult pikem või lühem kui kindlaksmääratud võrdlusväärtus, näidates seega, et katsesüsteem ei toimi nõuetekohaselt. Sellisel juhul on vähe kasu äärmiselt söövitavatest (ÜRO GHSi alamkategooria 1A) ja mittesöövitavatest kemikaalidest. Söövitav kemikaal, mis kuulub ÜRO GHSi alamkategooriast 1B, võimaldaks avastada liiga pikka või liiga lühikest läbitungimisaega. Nõrgalt söövitavat ainet (ÜRO GHSi alamkategooria 1C) võib kasutada positiivses kontrollproovis, et mõõta, kui järjepidevalt on katsemeetodiga võimalik eristada nõrgalt söövitavaid ja mittesöövitavaid kemikaale. Olenemata lähenemisviisist tuleks positiivse kontrollproovidega saadud vastuvõetavate tulemuste vahemik välja töötada

laboris varem kasutatud positiivsete kontrollproovidega saadud läbitungimisaegade vahemiku (nt keskväärtus $\pm 2-3$ standardhälvet) alusel. Iga uuringu käigus tuleb määrata positiivse kontrollproovi täpne läbitungimisaeg, et tuvastada vastuvõetavast vahemikust väljapoole langevad kõrvalekalded.

25. Paralleelselt uuritava kemikaaliga tuleb teha katse ka negatiivse (mittesöövitava) kontrollprooviga (nt 10 % sidrunhape, 6 % propioonhape (7)), mis on veel üks kvaliteedikontrolli meede membraanibarjääri funktsionaalse terviklikkuse tõendamiseks.

Uuringu nõuetekohasuse kriteeriumid

26. Vastavalt iga ÜRO GHSi söövitavate omaduste alamkategorია kohta kindlaksmääratud ajaparametritele kasutatakse uuritava kemikaali söövitavate omaduste prognoosimiseks uuritava kemikaali membraanibarjäärile kandmisest barjääri läbimiseni kulunud aega (minutites). Et uuringut saaks lugeda nõuetekohaseks, peab paralleelne positiivne kontrollproov andma eeldatava läbitungimisaja (st 8–16 minutit, kui positiivse kontrollainena kasutatakse naatriumhüdrosiidi), paralleelne negatiivne kontrollproov ei tohi olla söövitav ja lahusti kontrollproov, kui seda uuritakse, et tohi olla söövitav ega muuta uuritava kemikaali söövituspotsentiaali. Enne käesoleval katsemeetodil põhineva meetodi rutiinset kasutamist peaksid laborid tõendama oma tehnilist pädevust, kasutades tabelis 2 soovitatud kahteistkümmet ainet. Niisuguste käesoleva katsemeetodi alusel välja töötatud samalaadsete meetodite puhul, mis on valideeritud võrdlusmeetodiga (14) struktuurilt ja funktsioonilt sarnased, tuleks kasutada eelnevalt kindlaksmääratud toimivusnõudeid, et tõendada uue meetodi usaldusväärsust ja täpsust enne selle kasutamist regulatiivsel eesmärgil (10).

Tulemuste tõlgendamine ja uuritavate kemikaalide klassifitseerimine söövitava toime järgi

27. Uuritava kemikaali membraanibarjäärile kandmisest barjäärist läbitungimiseni kulunud aja (minutites) järgi klassifitseeritakse uuritav kemikaal ÜRO GHSi söövitavate ainete alamkategoriasse (1) ja ÜRO pakendirühma (16), kui see on asjakohane. Iga soovitatava katsemeetodi jaoks tehakse kindlaks läbitungimisaja läviväärtused kõigi kolme söövitavate omaduste alamkategorია puhul. Läbitungimisaja läviväärtuste kohta lõpliku otsuse tegemisel tuleb arvestada vajadust minimeerida söövitusohu alahindamist ja madalamasse kategoorias klassifitseerimist (st valenegatiivseid tulemusi). Praeguse katsejuhendi kohaselt tuleks kasutada Corrositex®-iga kehtivaid läbitungimisaja läviväärtusi, mis on esitatud tabelis 3, sest see on ainus katsemeetod, mis hetkel katsejuhendile vastab (7).

Tabel 3. Corrositex®i prognoosimismudel

Keskmise läbitungimisaeg (min)		Prognoositav ÜRO GHSi kategooria ³
1. kategooria uuritav kemikaal ¹	2. kategooria uuritav kemikaal ² (määratud)	

(määratud meetodi kategoriseerimiskatse alusel)	meetodi kategoriseerimiskatse alusel)	
0–3 min	0–3 min	Söövitav võimalik alamkategooria 1A
> 3 kuni 60 min	> 3 kuni 30 min	Söövitav võimalik alamkategooria 1B
> 60 kuni 240 min	> 30 kuni 60 min	Söövitav võimalik alamkategooria 1C
> 240 min	> 60 min	Mittesöövitav

¹ Suure puhvermahtuvusega uuritavad kemikaalid (6)

² Väikese puhvermahtuvusega uuritavad kemikaalid (6)

³ ÜRO GHSi alamkategoriad 1A, 1B ja 1C vastavad ÜRO I, II ja III pakendirühmale

ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE

Andmed

28. Uuritava kemikaaliga ja positiivse(te) kontrollproovi(de)ga saadud aeg (minutites), mis kulus pealekandmisest barjääri läbimiseni, tuleb esitada tabelina, kus on näidatud nii eraldi andmed iga paralleelproovi kohta kui ka iga katse keskmine tulemus $\pm$ standardhälve.

Katseprotokoll

29. Katseprotokollis tuleks esitada järgmine teave.

Uuritav kemikaal ja kontrollained

- Ühest koostisosast koosnev aine: kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus, CASi number, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem, puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne;
- mitme koostisosaga aine, tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal ja segu: võimalikult täpne omaduste kirjeldus lähtuvalt koostisosade keemilisest määratlusest (vt eespool), kvantitatiivsest sisaldusest ja asjakohastest füüsikalise-keemilistest omadustest;
- füüsiline välimus, lahustuvus vees ja muud asjakohased füüsikalise-keemilised omadused;
- tarnija ja partii number, kui see on olemas;
- vajaduse korral teave uuritava kemikaali / kontrollaine töötlemise kohta enne katset (näiteks soojendamine, peenestamine);

- uuritava kemikaali püsivus ja aegumiskuupäev või kordusanalüüsi tegemise tähtpäev, kui see on teada;
- säilitustingimused.

Kandeaine

- Identimisandmed, kontsentratsioon (vajaduse korral), kasutatud ruumala;
- kandeaine valimise põhjendus.

Kasutatud in vitro membraanibarjäär ja metoodika, sealhulgas tõendatud täpsus ja usaldusväärsus

Katsetingimused:

- kasutatud aparaat ja preparaadi ettevalmistusmeetodid;
- kasutatud *in vitro* membraanibarjääri tarnija ja koostis;
- indikaatorlahuse koostis ja omadused;
- avastamismeetod;
- uuritava kemikaali ja kontrollainete kogused;
- paralleelproovide arv;
- ajakategooria katse kirjeldus ja selle valimise põhjendus;
- pealekandmismeetod;
- vaatluse aeg;
- kasutatud hindamis- ja klassifitseerimiskriteeriumide kirjeldus;
- Katsemeetodi kasutamise pädevuse tõendamine, analüüsides asjaomaseid kemikaale enne meetodi rutiinset kasutamist.

Tulemused

- Iga uuritava ja kontrollprooviga igal paralleelkatsel saadud andmed tabelina;
- muude täheldatud toimete kirjeldus;
- tuletatud klassifikatsioon(id) viitega kasutatud prognoosimudelile ja/või otsustamiskriteeriumidele.

Tulemuste arutelu

Järeldused

KIRJANDUS

- (1) Ühinenud Rahvaste Organisatsioon (ÜRO), *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)*, 1. täiendatud väljaanne, United Nations, New York ja Genf, 2013. Kättesaadav aadressil http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.
- (2) Käesoleva lisa peatükk B.4, „Äge nahaärritus, söövitus“.
- (3) Käesoleva lisa peatükk B.40bis, „Nahasöövituskatse *in vitro*: rekonstrueeritud inimese epidermist (RHE) kasutatav katsemeetod“.
- (4) Käesoleva lisa peatükk B.40, „Nahasöövituskatse *in vitro*: transkutaanse elektritakistuse (TER) mõõtmine“.
- (5) OECD (2015), „Guidance Document on an Integrated Approach to Testing and Assessment (IATA) for Skin Corrosion and Irritation“, Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr 203), Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.-G. ja 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*, nr 12, lk 483–524.
- (7) ICCVAM (1999), „Corrositex®. An *In Vitro* Test Method for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by ICCVAM, NTP and NICEATM“, NIEHS, NIH Publication (nr 99–4495).
- (8) Gordon V.C., Harvell J.D. ja 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*, nr 10, lk 37–45.
- (9) OECD (2005), „Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment“, Environmental, Health and Safety Publications, Series on testing and Assessment (nr 34).
- (10) OECD (2014), „Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 435“, Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis. Kättesaadav aadressil <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/PerfStand-TG430-June14.pdf>.

- (11) ECVAM (2001), „Statement on the Application of the CORROSITEX® Assay for Skin Corrosivity Testing“, ECVAMi teadusliku nõuandekomitee 15. istungjärg, ISPRA; Itaalia. ATLA nr 29, lk 96–97.
- (12) USA Transpordiministeerium (2002), *Exemption DOT-E-10904* (5. täiendatud väljaanne), (20. september 2002), Washington, D.C., U.S. DOT.
- (13) Käesoleva lisa peatükk B.46, „Nahasöövituskatse *in vitro*: rekonstrueeritud inimese epidermist (RHE) kasutatav katsemeetod“, ICCVAM (2004), „ICCVAM Recommended Performance Standards for *In Vitro* Test Methods for Skin Corrosion“, NIEHS, NIH Publication (nr 04–4510). Kättesaadav aadressil http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/dermal_docs/ps/ps044510.pdf.
- (14) USA Keskkonnakaitseamet (1996), „Method 1120, Dermal Corrosion“. Kättesaadav aadressil <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/1120.pdf>.
- (15) Ühinenud Rahvaste Organisatsioon (ÜRO) (2013), *UN Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Model Regulations*, 18. täiendatud väljaanne (peatükk 2.8), UN, 2013. Kättesaadav aadressil http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/unrec/rev18/English/Rev18_Volume1_Part2.pdf.

Liide

MÕISTED

Täpsus: katsemeetodiga saadud tulemuste ja nõuetekohaste võrdlusväärtuste kokkulangevuse määr. Täpsus näitab katsemeetodi tulemuslikkust ja on üks olulistest aspektidest. Seda terminit kasutatakse ka vastavuse tähenduses ja see näitab, kui sageli annab katsemeetod õige tulemuse (9).

Kemikaal: aine või segu.

Kemikaalide detekteerimissüsteem: visuaalne või elektrooniline mõõtesüsteem indikaatorlahusega, mis reageerib uuritava kemikaali või muude kemikaalide olemasolule või elektrokeemilise reaktsiooni toimumisele nt pH-indikaatorvärvaine või värvainete segu värvuse muutusega.

Vastavus: katsemeetodi tulemuslikkuse näitaja katsemeetodite puhul, millega saadakse kategooriline tulemus, on üks asjakohasuse aspekte. Terminit kasutatakse mõnikord ka täpsuse tähenduses ja määratletakse kõigi nende uuritavate kemikaalide osakaaluna, mis saadud positiivse või negatiivse tulemuse alusel klassifitseeritakse õigesti. Vastavus on tugevas sõltuvuses positiivset tulemust andvate kemikaalide esinemissagedusest uuritavate kemikaalide hulgas (9).

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

IATA: Integrated Approach on Testing and Assessment – ühtne lähenemisviis katsete tegemisele ja hindamisele.

Segu: kahest või enamast ainest koosnev segu või lahus.

Ühest koostisosast koosnev aine: aine, mis on määratletud oma kvantitatiivse koostisega, milles ühe peamise koostisosa sisaldus on vähemalt 80 massiprotsenti.

Mitme koostisosaga aine: aine, mis on määratletud oma kvantitatiivse koostisega, milles rohkem kui ühe peamise koostisosa kontsentratsioon on $\geq 10\%$ ja $< 80\%$ (massiprotsendid). Mitme koostisosaga aine saadakse tootmisprotsessi käigus. Erinevus segu ja mitme koostisosaga aine vahel seisneb selles, et segu saadakse kahe või enama aine kokku segamisel, ilma et toimuks keemilist reaktsiooni. Mitme koostisosaga aine saadakse keemilise reaktsiooni tulemusel.

MS: mittesöövitav

Toimivusnõuded: valideeritud katsemeetodil põhinevad nõuded, mille alusel hinnatakse, kui võrd saab esitatud katsemeetodit võrrelda teostuslikult ja tööpõhimõttelt samalaadse meetodiga. See hõlmab järgmist: i) olulisemad katsemeetodi osad; ii) valideeritud katsemeetodi nõuetekohase toimivuse tõendamiseks kasutatud kemikaalide hulgast valitud võrdluskemikaalide miinimumloend ja iii) sarnased usaldusväärsuse ja täpsuse tasemed, mis põhinevad valideeritud katsemeetodiga saadud tulemustel ja mis tuleks kavandatud katsemeetodi hindamisel saavutada võrdluskemikaalide miinimumloendi kasutamisel (9).

Asjakohasus: mõiste, millega väljendatakse seda, kas katsemeetod võimaldab uurida huvipakkuvat mõju, kas meetod on mõttekas ja sobib konkreetse eesmärgi jaoks. See näitab, mil määral saab katsemeetodiga õigesti mõõta või prognoosida huvipakkuvat bioloogilist mõju. Asjakohasus hõlmab ka katsemeetodi täpsuse (vastavuse) aspekti (9).

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

Tundlikkus: kõigi positiivsete/reaktsioonivõimeliste kemikaalide osakaal, mis katsemeetodi alusel klassifitseeritakse õigesti. Tundlikkusega iseloomustatakse katsemeetodi täpsust, kui saadud tulemusi saab kategoriseerida, ning see on oluline aspekt katsemeetodi asjakohasuse hindamisel (9).

Nahasöövitus *in vivo*: naha pöördumatu kahjustuse tekitamine, läbi epidermise pärisnahka (dermasse) ulatuv nähtav nekroos, mis tekib kuni neljatunnisel kokkupuutel katseainega. Tüüpilised söövitusnähud on haavandid, verejooks, verised kärnad ning 14-päevase vaatlusperioodi lõpuks ilmnev värvimuutus naha valastumise tõttu, täielik alopeetsia ja armistumine. Ebaselgete kahjustuste hindamiseks tuleks kaaluda histopatoloogilise analüüsi tegemist.

Spetsiifilisus: kõigi niisuguste negatiivsete/mittereageerivate kemikaalide osakaal, mis katsemeetodiga klassifitseeritakse õigesti. Spetsiifilisusega iseloomustatakse katsemeetodi täpsust, kui saadud tulemusi saab kategoriseerida, ning see on oluline aspekt katsemeetodi asjakohasuse hindamisel (9).

Aine: looduslik või tootmisprotsessi teel saadud keemiline element ja selle ühendid, kaasa arvatud stabiilsuse säilitamiseks vajalikud lisaained ja tootmisprotsessist tingitud lisandid, välja arvatud mis tahes lahusti, mida on võimalik aine stabiilsust vähendamata ja selle koostist muutmata eraldada.

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

UVCB: tundmatu või muutuva koostisega ained, kompleksed reaktsioonisaadused või bioloogilist päritolu materjalid.

B.66. STABIILSE TRANSFEKTSIOONIGA TRANSAKTIVATSIOONI *IN VITRO* KATSEMEETODID, MILLEGA AVASTATAKSE ÖSTROGEENIRETSEPTORITE AGONISTE JA ANTAGONISTE

ÜLDINE SISSEJUHATUS

OECD toimivusel põhinev katsejuhend

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 455 (2016). Katsejuhend nr 455 on toimivusel põhinev katsejuhend, milles kirjeldatakse stabiilse transfektsiooniga transaktivatsiooni *in vitro* katsemeetodeid östrogeniretseptorite agonistide ja antagonistide tuvastamiseks (ER TA katsed). See hõlmab mitut teostuslikult ja tööpõhimõttelt samalaadset katsemeetodit östrogeniretseptorite (st ER α , ja/või ER β) agonistide ja antagonistide kvalitatiivseks määramiseks ning peaks hõlbustama uute samaväärsete või modifitseeritud katsemeetodite väljatöötamist kooskõlas valideerimispõhimõtetega, mis on esitatud OECD juhenddokumendis uute ja ajakohastatud ohu hindamise katsemeetodite valideerimise ja rahvusvahelise tunnustamise kohta (1). Täielikult valideeritud võrdlusmeetodid (liited 2 ja 3), mis on toimivuse põhineva katsejuhendi aluseks, on järgmised:
 - stabiilse transfektsiooniga transaktivatsiooni katsemeetod (2), milles kasutatakse rakuliini (h)ER α -HeLa-9903 ning
 - VM7Luc ER TA katsemeetod (3), milles kasutatakse rakuliini VM7Luc4E2,¹ mis ekspresseerib peamiselt hER α -d ja mõningal määral hER β -d (4, 5).

Sama ohunäitaja analüüsimiseks kasutatavate samaväärsete katsemeetodite väljatöötamiseks ja valideerimiseks on olemas toimivusnõuded (6, 7) ja neid tuleks kasutada. Need võimaldavad toimivusel põhinevat katsejuhendit nr 455 õigeaegselt muuta, nii et ajakohastatud katsejuhendisse saaks lisada uued samalaadsed katsemeetodid, kuid need lisatakse üksnes pärast seda, kui OECD on need läbi vaadanud ja nõustunud, et toimivusnõuded on täidetud. Selleks, et täita OECD liikmesriikide nõuded östrogeniretseptorite transaktivatsioonikatse tulemustele, võib

¹ Enne 2016. aasta juuni nimetati see rakuliin rakuliiniks BG1Luc. BG-1 rakke kirjeldasid algselt Geisinger jt (1998) (35) ning hiljem iseloomustasid neid Ameerika Ühendriikide riikliku keskkonnatervise instituudi (National Institute of Environmental Health Sciences – NIEHS) teadlased (36). Suhteliselt hiljuti avastati, et teadlaste kasutataval BG-11 rakkudel on olemas kaks varianti, BG-1 Fr ja BG-1 NIEHS. Nende kahe BG-1 rakuliini variandi põhjalik analüüs (sealhulgas DNA uuring), mille viis läbi Li koos kaastöötajatega (2014) (37), näitas, et BG-1 Fr oli unikaalne ja et BG-1 NIEHS, st katsemeetodi väljatöötamiseks kasutatud algne rakuliin, ei olnud BG-1 inimese munasarja kartsinoomi rakuliin, vaid hoopis inimese rinnavähi rakuliini MCF7 variant. Katsemeetodis kasutatud rakuliini, mida algselt nimetati BG1Luc4E2 (38), nimetatakse nüüd VM7Luc4E2 (V – variant; M7 – MCF7 rakud). Samuti nimetatakse katsemeetodit nüüd VM7Luc ER TA katsemeetodiks. Kuigi katsemeetodi aluseks oleva rakuliini päritolu on teine, ei mõjuta see avaldatud valideerimisuuringuid ega käesoleva katsemeetodi kasutamist östrogeense/antiöstrogeense toimega kemikaalide sõelumiseks.

kasutada suvalist meetodit katsejuhendiga nr 455 hõlmatud katsemeetoditest, kasutades ühtlasi andmete vastastikust tunnustamist vastavalt OECD kokkuleppele.

Käesoleva katsemeetodiga hõlmatud meetodite taust ja põhimõtted

2. OECD algatas 1998. aastal prioriteetse tegevussuunana olemasolevate katsejuhendite läbivaatamise ja uute väljatöötamise, et sõeluuringutega selgitada välja endokriinfunktsiooni potentsiaalselt kahjustava kemikaalid ja neid katsetada. OECD kontseptuaalne raamistik endokriinfunktsiooni potentsiaalselt kahjustavate kemikaalide uurimiseks ja hindamiseks vaadati läbi 2012. aastal. Esialgne ja läbivaadatud kontseptuaalne raamistik on esitatud endokriinseid häireid põhjustavate kemikaalide hindamist käsitlevate standarditud katsejuhendite kohta koostatud OECD juhenddokumendi (8) lisades. Kontseptuaalne raamistik koosneb viiest tasemest, millest igaüks vastab erinevale bioloogilise keerukuse tasemele. Käesolevas katsemeetodis kirjeldatud ERi transaktivatsiooni katsed on 2. tasemel, mis hõlmab „*in vitro* katseid, millega saadakse andmeid teatud kindla(te) endokriinse(te) mehhanismi(de) või raja/radade kohta.“ See katsemeetod kirjeldab *in vitro* transaktivatsiooni (TA) katseid, mis on välja töötatud östrogeeniretseptorite (ER) agonistide ja antagonistide määramiseks.
3. Östrogeenide vastastiktoime östrogeeniretseptoritega võib mõjutada östrogeenide reguleeritavate geenide transkriptsiooni, mis võib põhjustada rakuprotsesside induktsiooni või pärssimist, kaasa arvatud rakkude paljunemiseks, loote normaalseks arenguks ja reproduktiivfunktsiooni tööks vajalikud protsessid (9, 10, 11). Normaalse östrogeensõltuva süsteemi häirimine võib olla kahjuliku toimega normaalsele arengule (ontogeneesile), reproduktiivtervisele ja reproduktiivsüsteemi terviklikkusele.
4. *In vitro* transaktivatsiooni katsemeetodid põhinevad ainete otsese või kaudse vastastikmõjul konkreetse retseptoriga, mis reguleerib reportergeeni produkti transkriptsiooni. Selliseid katsemeetodeid on laialdaselt kasutatud spetsiifiliste tuumaretseptorite, nt ERide poolt reguleeritud geeniekspressiooni hindamiseks (12, 13, 14, 15, 16). Neid on soovitatud kasutada ERi reguleeritava östrogeense transaktivatsiooni tuvastamiseks (17, 18, 19). Tuuma ERidel on olemas vähemalt kaks peamist alatüüpi, α ja β , mida kodeerivad erinevad geenid. Vastavatel valkudel on erinevad bioloogilised funktsioonid, samuti erinev jaotumine kudedes ja erinev ligandisidumisvõime (20, 21, 22, 23, 24, 25, 26). Tuuma ER α vahendab klassikalist reaktsiooni östrogeenile (27, 28, 29, 30) ning seetõttu on enamik ERi aktiveerimise või inhibeerimise mõõtmiseks hetkel välja töötatavaid mudelid ER α -spetsiifilised. Katsemeetodeid kasutatakse selleks, et välja selgitada kemikaalid, mis aktiveerivad (või pärssivad) ERi pärast ligandi sidumist, misjärel retseptori-ligandi kompleks seondub DNA spetsiifilise vastuselemendiga ja transaktiveerib reportergeeni, mille tulemuseks on markervalgu suurenenud rakusisene ekspressioon. Nendes katsemeetodites võib kasutada erinevate reporterite reaktsioone. Lutsiferaasil põhinevates süsteemides transformeerib ensüüm lutsiferaas substraadi lutsiferiini helendavaks bioloogiliseks saaduseks, mida saab kvantitatiivselt mõõta

luminomeetriga. Muud näited levinud reporteritest on fluorestseeruv valk ja *lacZ*-geen, mis kodeerib β -galaktosidaasi, ensüümi, mis transformeerib värvitu substraadi X-gal-i (5-bromo-4-kloori-indolüül-galaktopüranosiid) siniseks saaduseks, mida saab kvantitatiivselt mõõta spektrofotomeetriga. Neid reportereid saab kiiresti ja odavalt hinnata müügil olevate katsekomplektidega.

5. STTA ja VM7Luc TA katsemeetodite valideerimisuuringutest nähtub, et need on ettenähtud eesmärgil kasutades asjakohased ja usaldusväärsed (3, 4, 5, 30). Rinna rakuliine kasutavate ja luminesentsil põhinevate ERI transaktivatsiooni katsemeetodite toimivusnõuded on esitatud ICCVAMi katsemeetodi hindamisaruandes „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). Neid toimivusnõudeid on muudetud, et neid saaks kohaldada nii STTA kui ka VM7Luc TA katsemeetoditele (2).
6. Käesolevas katsemeetodis kasutatud mõisted ja lühendid on esitatud 1. liites.

Transaktivatsiooni katsemeetodite rakendusala ja piirangud

7. Käesolevaid katsemeetodeid on soovitatav kasutada sõelumise ja prioriseerimise eesmärgil, kuid need võivad anda ka niisugust teavet mehhanismide kohta, mida saab kasutada tõendite kaalukust arvestava lähenemisviisi korral. Need katsed uurivad ERiga seondunud kemikaali esilekutsutud transaktsiooni *in vitro* süsteemis. Seega ei tohiks tulemust otse ekstrapoleerida terve *in vivo* endokriinsüsteemi keerukale signalseerimis- ja reguleerimismehhanismidele.
8. ERide vahendatud transaktsiooni peetakse üheks peamiseks endokriinse häire põhjustamise mehhanismiks, kuigi endokriinne häire võib ilmned ka muude mehhanismide kaudu, sealhulgas i) vastasmõjud endokriinsüsteemi teiste retseptorite ja ensüümisüsteemidega, ii) hormoonide süntees, iii) hormoonide metaboolne aktiveerimine ja/või inaktiveerimine, iv) hormoonide jaotumine sihtkudedes ja v) hormoonide väljumine organismist. Neid toimemehhanisme ei käsitle ükski käesoleva katsemeetodiga hõlmatud meetod.
9. See katsemeetod uurib kemikaalide võimet ER-sõltuvat transkriptsiooni aktiveerida (st toimida agonistina) ja pärssida (st toimida antagonistina). Mõned kemikaalid võivad olenevalt rakutüübist toimida nii agonisti kui ka antagonistina, olles tuntud kui selektiivsed östrogeenireseptori modulaatorid (SERMid). Nende katsemeetoditega negatiivse tulemuse andnud kemikaale võiks enne järeldamist, et kemikaal ei seo retseptorit, hinnata ERI sidumise katse abil. Peale selle annavad katsed tõenäoliselt teavet üksnes lähtemolekuli toime kohta, võttes arvesse, et *in vitro* rakusüsteemide metaboliseerimisvõime on piiratud. Arvestades, et valideerimisel kasutati üksnes puhtaid aineid, ei ole rakendatavust uuritavate segude puhul kontrollitud. See katsemeetod on siiski teoreetiliselt kohaldatav mitme koostisosaga ainete, tundmatu või muutuva koostisega ainete ning segude

uurimiseks. Kui soovitakse saada kavandatud regulatiivsel eesmärgil andmeid mitme koostisosaga aine, tundmatu või muutuva koostisega aine või segu kohta, tuleks enne katsemeetodi kasutamist kaaluda, kas ja kuidas see võimaldab saada kõnealusele eesmärgile vastavaid asjakohaseid tulemusi. Selline kaalumise ei ole vajalik, kui asjaomase segu hindamine on regulatiivse nõudega ette nähtud.

10. Teavitamise eesmärgil on tabelis 1 esitatud agonistikatse tulemused 34 aine kohta, mille uurimisel kasutati mõlemat käesolevas katsemeetodis kirjeldatud täielikult valideeritud võrdlusmeetodit. Nendest ainetest 26 on liigitatud kindlateks ERI agonistideks ja 8 negatiivseteks, võttes aluseks avaldatud aruanded, sealhulgas *in vitro* ERI sidumise ja transaktivatsiooni katsemeetodite ja/või uterotroofse katsemeetodi kohta (2, 3, 18, 31, 32, 33, 34). Tabelis 2 on esitatud antagonistikatse tulemused 15 aine kohta, mille uurimisel kasutati mõlemat käesolevas katsemeetodis kirjeldatud täielikult valideeritud võrdlusmeetodit. Nendest ainetest 4 on liigitatud kindlateks/eeldatavateks ERI antagonistideks ja 10 negatiivseteks, võttes aluseks avaldatud aruanded, sealhulgas *in vitro* ERI sidumise ja transaktivatsiooni katsemeetodite kohta (2, 3, 18, 31). Tabelites 1 ja 2 esitatud andmete kohaselt langesid kahe võrdlusmeetodiga saadud klassifitseerimise aluseks olevad tulemused 100 % kokku kõigi ainete puhul, välja arvatud ühe aine (mifepristoon) antagonistikatse tulemus, ning kõik ained klassifitseeriti korrektselt ERI agonistiks/antagonistiks või negatiivseks. Lisateave selle kemikaalirühma kohta, samuti muud kemikaalid, mida valideerimisuuringute käigus STTA ja VM7Luc ER TA katsemeetoditega uuriti, on esitatud 2. liites ER TA toimivusnõuetes (tabelid 1, 2 ja 3) (6, 7).

Tabel 1. STTA ja VM7Luc ER TA katsemeetodite tulemuste ülevaade ainete kohta, mida uuriti mõlema agonistikatsega ja mis klassifitseeriti kas ERi agonistideks (POS) või negatiivseteks (NEG).

	Aine	CASI nr	STTA katsemeetod ¹			VM7Luc ER TA katsemeetod ²		Klassifitseerimise andmete allikas ⁴		
			ER TA toime	PC ₁₀ väärtus (M)	PC ₅₀ väärtus ^b (M)	ER TA toime	EC ₅₀ väärtus ^{b,3} (M)	Muud ER TAd ^c	ERi siduv	Uterotroofne
1	17β-östradiol ^a	50-28-2	POS	< 1,00 × 10 ⁻¹¹	< 1,00 × 10 ⁻¹¹	POS	5,63 × 10 ⁻¹²	POS (227/227)	POS	POS
2	17α-östradiol ^a	57-91-0	POS	7,24 × 10 ⁻¹¹	6,44 × 10 ⁻¹⁰	POS	1,40 × 10 ⁻⁹	POS (11/11)	POS	POS
3	17α-etinüülöstradiol ^a	57-63-6	POS	< 1,00 × 10 ⁻¹¹	< 1,00 × 10 ⁻¹¹	POS	7,31 × 10 ⁻¹²	POS (22/22)	POS	POS
4	17β-trenboloon	10161-33-8	POS	1,78 × 10 ⁻⁸	2,73 × 10 ⁻⁷	POS	4,20 × 10 ⁻⁸	POS (2/2)	NT	NT
5	19-nortestosteroon ^a	434-22-0	POS	9,64 × 10 ⁻⁹	2,71 × 10 ⁻⁷	POS	1,80 × 10 ⁻⁶	POS (4/4)	POS	POS
6	4-kumüülfenool ^a	599-64-4	POS	1,49 × 10 ⁻⁷	1,60 × 10 ⁻⁶	POS	3,20 × 10 ⁻⁷	POS (5/5)	POS	NT
7	4-tert-oktüülfenool ^a	140-66-9	POS	1,85 × 10 ⁻⁹	7,37 × 10 ⁻⁸	POS	3,19 × 10 ⁻⁸	POS (21/24)	POS	POS
8	Apigeniin ^a	520-36-5	POS	1,31 × 10 ⁻⁷	5,71 × 10 ⁻⁷	POS	1,60 × 10 ⁻⁶	POS (26/26)	POS	NT
9	Atrasiin ^a	1912-24-9	NEG	–	–	NEG	–	NEG (30/30)	NEG	NT
10	Bisfenool A ^a	80-05-7	POS	2,02 × 10 ⁻⁸	2,94 × 10 ⁻⁷	POS	5,33 × 10 ⁻⁷	POS (65/65)	POS	POS
11	Bisfenool B ^a	77-40-7	POS	2,36 × 10 ⁻⁸	2,11 × 10 ⁻⁷	POS	1,95 × 10 ⁻⁷	POS (6/6)	POS	POS
12	Butüülbensüülfalaat ^a	85-68-7	POS	1,14 × 10 ⁻⁶	4,11 × 10 ⁻⁶	POS	1,98 × 10 ⁻⁶	POS (12/14)	POS	NEG
13	Kortikosteroon ^a	50-22-6	NEG	–	–	NEG	–	NEG (6/6)	NEG	NT
14	Kumestrool ^a	479-13-0	POS	1,23 × 10 ⁻⁹	2,00 × 10 ⁻⁸	POS	1,32 × 10 ⁻⁷	POS (30/30)	POS	NT
15	Daidseiin ^a	486-66-8	POS	1,76 × 10 ⁻⁸	1,51 × 10 ⁻⁷	POS	7,95 × 10 ⁻⁷	POS (39/39)	POS	POS
16	Dietüülstilböstrool ^a	56-53-1	POS	< 1,00 × 10 ⁻¹¹	2,04 × 10 ⁻¹¹	POS	3,34 × 10 ⁻¹¹	POS (42/42)	POS	NT
17	Di-n-butüülfalaat	84-74-2	POS	4,09 × 10 ⁻⁶		POS	4,09 × 10 ⁻⁶	POS (6/11)	POS	NEG
18	Etüülparabeen	120-47-8	POS	5,00 × 10 ⁻⁶	(PC ₅₀ puudub)	POS	2,48 × 10 ⁻⁵	POS		NT
19	Östroon ^a	53-16-7	POS	3,02 × 10 ⁻¹¹	5,88 × 10 ⁻¹⁰	POS	2,34 × 10 ⁻¹⁰	POS (26/28)	POS	POS
20	Genisteiin ^a	446-72-0	POS	2,24 × 10 ⁻⁹	2,45 × 10 ⁻⁸	POS	2,71 × 10 ⁻⁷	POS (100/102)	POS	POS
21	Haloperidool	52-86-8	NEG	–	–	NEG	–	NEG (2/2)	NEG	NT
22	Kamferool ^a	520-18-3	POS	1,36 × 10 ⁻⁷	1,21 × 10 ⁻⁶	POS	3,99 × 10 ⁻⁶	POS (23/23)	POS	NT
23	Kepoon ^a	143-50-0	POS	7,11 × 10 ⁻⁷	7,68 × 10 ⁻⁶	POS	4,91 × 10 ⁻⁷	POS (14/18)	POS	NT
24	Ketokonasool	65277-42-1	NEG	–	–	NEG	–	NEG (2/2)	NEG	NT

25	Linuroon ^a	330-55-2	NEG	–	–	NEG	–	NEG (8/8)	NEG	NT
26	meso-heksöstrool ^a	84-16-2	POS	$< 1,00 \times 10^{-11}$	$2,75 \times 10^{-11}$	POS	$1,65 \times 10^{-11}$	POS (4/4)	POS	NT
27	Metüültestosteroon ^a	58-18-4	POS	$1,73 \times 10^{-7}$	$4,11 \times 10^{-6}$	POS	$2,68 \times 10^{-6}$	POS (5/6)	POS	NT
28	Moriin	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	Noretinodreel ^a	68-23-5	POS	$1,11 \times 10^{-11}$	$1,50 \times 10^{-9}$	POS	$9,39 \times 10^{-10}$	POS (5/5)	POS	NT
30	<i>p,p'</i> -metoksükloor ^a	72-43-5	POS	$1,23 \times 10^{-6}$	(PC ₅₀ puudub) ^b	POS	$1,92 \times 10^{-6}$	POS (24/27)	POS	POS
31	Fenobarbitaal ^a	57-30-7	NEG	–	–	NEG	–	NEG (2/2)	NEG	NT
32	Reserpiin	50-55-5	NEG	–	–	NEG	–	NEG (4/4)	NEG	NT
33	Spironolaktoon ^a	52-01-7	NEG	–	–	NEG	–	NEG (4/4)	NEG	NT
34	Testosteroon	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

Lühendid: CASi nr – Chemical Abstracts Service'i number; M = molaarsus; EC₅₀ = 50 % uuritava kemikaali suurima toime avaldumise kontsentratsioonist; NEG = negatiivne; POS = positiivne; NT = ei uuritud; PC₁₀ (ja PC₅₀) = uuritava aine kontsentratsioon, mille puhul toime on 10 % (või PC₅₀ korral 50 %) võrreldes positiivse kontrollaine (E2, 1nM) toimega igal plaadil.

^aSTTA ja VM7Luc ER TA katsemeetoditega uuritud levinuimad ained, mis määrati kas östrogeenireseptori agonistiks või negatiivseks ja mida kasutati täpsuse hindamiseks VM7Luc ER TA valideerimisuuringus (ICCVAMi VM7Luc ER TA hindamisaruanne, tabel 4-1 (3)).

^bKui puudusid tsütotoksilisusest või mittelahustuvusest tingitud piirangud, olid maksimaalsed uuritavad kontsentratsioonid 1×10^{-5} M (STTA katsemeetod) ja 1×10^{-3} M (VM7Luc ER TA katsemeetod).

^cSulgudes esitatud number näitab, mitu positiivset (POS) või negatiivset (NEG) uuringutulemust saavutati kõigis viidatud uuringutes kokku.

¹Väärtused, mis on esitatud östrogeense toime tuvastamiseks kasutatava stabiilse transfektsiooniga transkriptsiooni aktivatsiooni (TA) katsemeetodi (meetod, milles uuritakse inimese östrogeeni α -retseptori vahendatud reportergeeni, kasutades rakuliini hER-HeLa-9903) eelvalideerimise ja laboritevahelise valideerimise esialgses aruandes (2).

²ICCVAMi katsemeetodi hindamisaruanne „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).

³Keskised EC₅₀ väärtused arvutati VM7Luc ER TA katse valideerimisuuringus osalenud laborite (XDS, ECVAM ja Hiyoshi) esitatud väärtuste alusel (3).

⁴ERi agonistiks või negatiivseks klassifitseerimise aluseks olid ICCVAMi taustaülevaadetokumentides ERi sidumise ja TA katsemeetodite kohta esitatud andmed (31) ning pärast ICCVAMi taustaülevaadetokumentide koostamist avaldatud ja täiendatud publikatsioonidest (2, 3, 18, 31, 33, 34) saadud teave.

Märkused. Kõigi katsemeetodiga hõlmatud meetodite puhul ei tehtud samu mõõtmisi. Mõnel juhul ei ole võimalik EC₅₀ arvutada, sest ei ole koostatud annuse-reaktsiooni seose täielikku kõverat. STTA katsemeetodi puhul on PC₁₀ väärtus peamiseks mõõdetud väärtuseks, kuid võib leiduda ka muid näiteid PC_x väärtuse abil kasuliku teabe saamisest.

Tabel 2. STTA ja VM7Luc ER TA katsemeetodite tulemuste võrdlus ainete kohta, mida uuriti mõlema antagonistikatsega ja mis klassifitseeriti kas ERi antagonistideks (POS) või negatiivseteks (NEG).

	Aine ^a	CASi nr	ER STTA katsemeetod ¹		VM7Luc ER TA katsemeetod ²		ER STTA oletatav toime ⁴	ICCVAMi ⁵ konsensusklassifikatsioon	MeSHi ⁶ aineklass	Tooteklass ⁷
			ER TA toime	IC ₅₀ väärtus ^b (M)	ER TA toime	IC ₅₀ väärtus ^{b,3} (M)				
1	4-hüdroksütamoksüfeen	68047-06-3	POS	$3,97 \times 10^{-9}$	POS	$2,08 \times 10^{-7}$	Mõõdukalt POS	POS	Süsivesinik (tsükliline)	Ravim
2	Dibenso[<i>a,h</i>]antratseen	53-70-3	POS	IC ₅₀ puudub	POS	IC ₅₀ puudub	POS	PP	Polütsükliline ühend	Laborikemikaal, looduslik toode
3	Mifepristoon	84371-65-3	POS	$5,61 \times 10^{-6}$	NEG	–	Nõrgalt POS	NEG	Steroid	Ravim
4	Raloksüfeenvesinikkloriid	82640-04-8	POS	$7,86 \times 10^{-10}$	POS	$1,19 \times 10^{-9}$	Mõõdukalt POS	POS	Süsivesinik (tsükliline)	Ravim
5	Tamoksüfeen	10540-29-1	POS	$4,91 \times 10^{-7}$	POS	$8,17 \times 10^{-7}$	POS	POS	Süsivesinik (tsükliline)	Ravim
6	17β-östradiool	50-28-2	NEG	–	NEG	–	PN	PN	Steroid	Ravim, veterinaarravim
7	Apigeniin	520-36-5	NEG	–	NEG	–	NEG	NEG	Heterotsükliline ühend	Värvaine, looduslik toode, ravimite vaheaine
8	Atrasiin	1912-24-9	NEG	–	NEG	–	NEG	PN	Heterotsükliline ühend	Herbitsiid
9	Di-n-butüülftaal	84-74-2	NEG	–	NEG	–	NEG	NEG	Ester, ftalhape	Kosmeetikatoodete koostisaine, tööstuskemikaal, plastifikaator
10	Fenarimool	60168-88-9	NEG	–	NEG	–	pole katsetatud	PN	Heterotsükliline ühend, pürimidiin	Fungitsiid
11	Flavoon	525-82-6	NEG	–	NEG	–	PN	PN	Flavonoid, heterotsükliline ühend	Looduslik toode, ravim
12	Flutamiid	13311-84-7	NEG	–	NEG	–	NEG	PN	Amiid	Ravim, veterinaarravim
13	Genisteiin	446-72-0	NEG	–	NEG	–	PN	NEG	Flavonoid, heterotsükliline ühend	Looduslik toode, ravim
14	<i>p</i> -n-nonüülfenool	104-40-5	NEG	–	NEG	–	pole katsetatud	NEG	Fenool	Keemiline vaheühend
15	Resveratrol	501-36-0	NEG	–	NEG	–	PN	NEG	Süsivesinik (tsükliline)	Looduslik toode

Lühendid: CASi nr – Chemical Abstracts Service'i number; M = molaarsus; IC₅₀ = 50 % uuritava kemikaali suurima inhibeeriva toime avaldumise kontsentratsioonist; NEG = negatiivne; PN = eeldatavasti negatiivne; POS = positiivne; PP = eeldatavasti positiivne.

^aSTTA ja VM7Luc ER TA katsetemethoditega uuritud levinuimad ained, mis määrati kas östrogeenireseptori antagonistiks või negatiivseks ja mida kasutati täpsuse hindamiseks VM7Luc ER TA valideerimisuuringus (2, 3).

^bKui puudusid tsütotoksilisusest või mittelahustuvusest tingitud piirangud, olid maksimaalsed uuritavad kontsentratsioonid 1×10^{-3} M (STTA katsemeetod) ja 1×10^{-5} M (VM7Luc ER TA katsemeetod).

¹Östrogeenireseptori vahendatud toime tuvastamiseks kasutatava stabiilse transfektsiooniga transkriptsiooni aktivatsiooni katsemeetodi valideerimisaruanne, B. osa (2).

²ICCVAMi katsemeetodi hindamisaruanne „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).

³Keskmsed IC₅₀ väärtused arvutati VM7Luc ER TA katse valideerimisuuringus osalenud laborite (XDS, ECVAM, and Hiyoshi) esitatud väärtuste alusel (3).

⁴ER STTA eeldatav toime CERI östrogeenireseptori sidumise katsemeetodi kohta aja jooksul kogutud andmete, uterotroofse katse ning avaldatud kirjandusandmetest kogutud teabe põhjal (2).

⁵ERi antagonistiks või negatiivseks klassifitseerimise aluseks olid ICCVAMi taustaülevaatedokumentides ERi sidumise ja TA katsemetoodite kohta esitatud andmed (31) ning pärast ICCVAMi taustaülevaatedokumentide koostamist avaldatud ja täiendatud publikatsioonidest (2, 3, 18, 31) saadud teave.

⁶Aineklass on igale ainele omistatud rahvusvaheliselt tunnustatud standardse klassifitseerimisskeemi kohaselt, mis põhineb USA meditsiiniraamatukogu meditsiiniteemade klassifitseerimissüsteemil (leitav veebisaidil <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁷Tooteklass on igale ainele omistatud USA meditsiiniraamatukogu ohtlike ainete andmebaasi (leitav veebisaidil <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>) alusel.

ER TA KATSEMEETODI OSAD

Katsemeetodi olulised osad

11. Käesolev katsemeetod kirjeldab katseid, milles kasutatakse stabiilse transfektsiooniga või endogeenseid ER α retseptori ja stabiilse transfektsiooniga reportergeeni konstrukti, mida reguleerib üks või mitu östrogeeni vastuselementi; leiduda võib siiski ka muid retseptoreid, nt ER β . Need on katsemeetodi olulised osad.

Kontrollproovid

12. Kirjeldada tuleb iga agonisti- ja antagonistikatse paralleelsetes kontrollproovides kasutatavate etalonainete soovitude alust. Asjakohaste paralleelsete kontrollproovide (negatiivne, lahusti ja positiivne) eesmärk on näidata, et katsemeetod katsetingimustes toimib, ning olla eksperimentide omavahelise võrdlemise aluseks; tavaliselt on paralleelsed kontrollproovid osa konkreetse eksperimendi nõuetekohasuse kriteeriumidest (1).

Kvaliteedikontrolli standardkord

13. Kvaliteedikontrolli standardkorda tuleb kirjeldatud viisil järgida iga katse puhul tagamaks, et rakuliin on püsivalt stabiilne mitme passaaži jooksul, ei sisalda mükoplasmat (st ei ole bakteriaalselt saastunud) ja säilitab võime anda aja jooksul oodatavaid ERi vahendatud vastuseid. Lisaks tuleb kontrollida rakuliinide õiget identiteeti, samuti teiste saasteainete (nt seened, pärmseened ja viirused) sisaldust.

Labori pädevuse tõendamine

14. Enne tundmatute kemikaalide uurimist mis tahes selle katsemeetodiga hõlmatud meetodi abil peab iga labor tõendama oma pädevust kõnealuse katsemeetodi kasutamiseks. Pädevuse tõendamiseks peab iga labor viima läbi katsed tabelis 3 loetletud 14 pädevuse tõendamise ainega agonistikatse puhul ja tabelis 4 loetletud 10 pädevuse tõendamise ainega antagonistikatse puhul. Pädevuskatsed kinnitavad ühtlasi katsesüsteemi reageerimisvõimet. Pädevuse tõendamise ainete loetelu on osa võrdlusainete loetelust, mis on esitatud ER TA katsemeetodite toimivusnõuetes (6). Need ained on müügil, esindavad niisuguseid kemikaaliklasse, mida üldiselt seostatakse ER agonistliku või antagonistliku toimega, avaldavad ER agonisti või antagonist puhul eeldatavat toimet sobivas vahemikus (st on tugevad või nõrgad) ja hõlmavad negatiive. Pädevuse tõendamise ainetega tuleb teha vähemalt kaks korduskatset eri päevadel. Pädevust tõendab iga pädevuse tõendamise aine õige klassifitseerimine (positiivne/negatiivne). Pädevuskatset peaks katsemeetodite õppimise ajal korduvalt tegema iga laboritöötaja. Olenevalt rakutüübist võivad mõned neist pädevuse tõendamise ainetest käituda SERMidena ja toimida nii agonisti kui ka antagonistina. Tabelites 3 ja 4 on pädevuse tõendamise ained siiski klassifitseeritud nende teadaoleva peamise toime järgi, mida tuleks pädevuse tõendamisel arvesse võtta.

15. Tulemuslikkuse tõendamiseks ja kvaliteedi kontrolli eesmärgil peaks iga labor võrdlema aja jooksul agonistide ja antagonistide kohta koostatud andmebaase andmetega etalonaine (nt 17 β -östradiool ja tamoksüfeen), positiivses ja negatiivses kontrollproovis kasutatud kemikaalide ning lahusti (nt DMSO) kontrollproovi kohta. Kõigepealt tuleks luua andmebaas vähemalt 10 sõltumatu agonisti (nt 17 β -östradiool) ja 10 sõltumatu antagonistide (nt tamoksüfeen) katse andmete põhjal. Kõnealuste etalonainete ja lahusti kontrollproovidega edaspidi saadud tulemused tuleks andmebaasi laiendamiseks sinna lisada; nii tagatakse laboris biokatsemeetodi järjepidevus ja tulemuslikkus läbi aja.

Tabel 3. Pädevuse tõendamise ainete (14) loetelu agonistikatse jaoks⁸

Nr ⁷	Aine	CASI nr	Eeldatav vastus ¹	STTA katsemeetod			VM7Luc ER TA katsemeetod		MeSHi aineklass ⁵	Tooteklass ⁶
				PC ₁₀ väärtus (M) ²	PC ₅₀ väärtus (M) ²	Katsel kasutatud kontsentratsioonivahemik (M)	VM7Luc EC ₅₀ väärtus (M) ³	Suurim kontsentratsioon vahemikuotsingus (M) ⁴		
14	Dietüülstilböstrool	56-53-1	POS	$< 1,00 \times 10^{-11}$	$2,04 \times 10^{-11}$	$10^{-14} - 10^{-8}$	$3,34 \times 10^{-11}$	$3,73 \times 10^{-4}$	Süsivesinik (tsükiline)	Ravim, veterinaarravim
12	17 α -östradiol	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	Ravim, veterinaarravim
15	meso-heksöstrool	84-16-2	POS	$< 1,00 \times 10^{-11}$	$2,75 \times 10^{-11}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1,65 \times 10^{-11}$	$3,70 \times 10^{-3}$	Süsivesinik (tsükiline), fenool	Ravim, veterinaarravim
11	4-tert-oktüülfenool	140-66-9	POS	$1,85 \times 10^{-9}$	$7,37 \times 10^{-8}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$3,19 \times 10^{-8}$	$4,85 \times 10^{-3}$	Fenool	Keemiline vaheühend
9	Genisteiin	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, heterotsükiline ühend	Looduslik toode, ravim
6	Bisfenool A	80-05-7	POS	$2,02 \times 10^{-8}$	$2,94 \times 10^{-7}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$5,33 \times 10^{-7}$	$4,38 \times 10^{-3}$	Fenool	Keemiline vaheühend
2	Kamferool	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, heterotsükiline ühend	Looduslik toode
3	Butüülbensüülfalaat	85-68-7	POS	$1,14 \times 10^{-6}$	$4,11 \times 10^{-6}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1,98 \times 10^{-6}$	$3,20 \times 10^{-4}$	Karboksüülhape, ester, ftaalhape	Plastifikaator, tööstuskemikaal
4	p,p'-metoksükloor	72-43-5	POS	$1,23 \times 10^{-6}$	–	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1,92 \times 10^{-6}$	$2,89 \times 10^{-3}$	Süsivesinik (halogeenitud)	Pestitsiid, veterinaarravim
1	Etüülparabeen	120-47-8	POS	$5,00 \times 10^{-6}$	–	$10^{-11} - 10^{-5}$	$2,48 \times 10^{-5}$	$6,02 \times 10^{-3}$	Karboksüülhape, fenool	Ravim, konservant
17	Atrasiin	1912-24-9	NEG	–	–	$10^{-10} - 10^{-4}$	–	$4,64 \times 10^{-4}$	Heterotsükiline ühend	Herbitsiid
20	Spironolaktoon	52-01-7	NEG	–	–	$10^{-11} - 10^{-5}$	–	$2,40 \times 10^{-3}$	Laktoon, steroid	Ravim
21	Ketokonasool	65277-42-1	NEG	–	–	$10^{-11} - 10^{-5}$	–	$9,41 \times 10^{-5}$	Heterotsükiline ühend	Ravim
22	Reserpiin	50-55-5	NEG	–	–	$10^{-11} - 10^{-5}$	–	$1,64 \times 10^{-3}$	Heterotsükiline ühend, indool	Ravim, veterinaarravim

Lühendid: CASi nr – Chemical Abstracts Service'i number; EC₅₀ = 50 % uuritava kemikaali suurima toime avaldumise kontsentratsioonist; NEG = negatiivne; POS = positiivne;

PC₁₀ (ja PC₅₀) = uuritava aine kontsentratsioon, mille puhul toime on 10 % (või PC₅₀ korral 50 %) võrreldes positiivse kontrollaine (E2, 1nM) toimega igal plaadil.

¹Positiivse või negatiivse ERI antagonistliku toimega ühendiks klassifitseerimise aluseks olid ICCVAMI taustaülevaadetokumentides ERI sidumise ja TA katsemeetodite kohta esitatud andmed (31)

ning empiirilised andmed ja muu teave, mis saadi pärast ICCVAMi taustaülevaatedokumentide koostamist avaldatud ja läbivaadatud viidatud uuringutest (2, 3, 18, 31, 32, 33, 34).

²Väärtused, mis on esitatud östrogeense toime tuvastamiseks kasutatava stabiilse transfektsiooniga transkriptsiooni aktivatsiooni (TA) katsemeetodi (meetod, milles uuritakse inimese östrogeeni α -retseptori vahendatud reportergeeni, kasutades rakuliini hER-HeLa-9903) eelvalideerimise ja laboritevahelise valideerimise esialgses aruandes (30).

³Keskmsed EC₅₀ väärtused arvutati VM7Luc ER TA katse valideerimisuuringus osalenud laborite (XDS, ECVAM, and Hiyoshi) esitatud väärtuste alusel (3).

⁴Esitatud kontsentratsioonid on suurimad kontsentratsioonid (vahemikuotsing), mida VM7Luc ER TA katsemeetodi valideerimise käigus uuriti. Kui kontsentratsioonid olid eri laborites erinevad, on esitatud suurim kontsentratsioon. Vt tabelit 4-10 ICCVAMi katsemeetodi hindamisaruandes „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).

⁵Aineklass on igale ainele omistatud rahvusvaheliselt tunnustatud standardse klassifitseerimisskeemi kohaselt, mis põhineb USA meditsiiniraamatukogu meditsiiniteemade klassifitseerimissüsteemil (leitav veebisaidil <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁶Tooteklass on igale ainele omistatud USA meditsiiniraamatukogu ohtlike ainete andmebaasi (leitav veebisaidil <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>) alusel.

⁷Tabelist 1 (Võrdluskemikaalide loetelu (22) ERi agonistikatse täpsuse hindamiseks) toimivusnõuete juures (6).

⁸Kui pädevuse tõendamise ainet enam müügil ei ole, võib kasutada samasuguseks klassifitseeritud ning võrreldava võimaliku toime, toimimismehhanismi ja aineklassiga ainet.

Tabel 4. Pädevuse tõendamise ainete (10) loetelu antagonistikatse jaoks⁸

	Aine ^a	CASI nr	ER STTA katsemeetod ¹			VM7Luc ER TA katsemeetod ²			ER STTA ¹ oletatav mõju	ICCVAMi ⁵ konsensusklassifikatsioon	MeSHi ⁶ aineklass	Tooteklass ⁷
			ER TA toime	IC ₅₀ (M)	Katsel kasutatud kontsentratsioonivahemik (M)	ER TA toime	IC ₅₀ ³ (M)	Suurim kontsentratsioon vahemikuotsingus (M) ⁴				
1	4-hüdroksütamoksüfeen	68047-06-3	POS	$3,97 \times 10^{-9}$	$10^{-12} - 10^{-7}$	POS	$2,08 \times 10^{-7}$	$2,58 \times 10^{-4}$	Mõõdukalt POS	POS	Süsivesinik (tsükliline)	Ravim
2	Raloksüfeenvesinikkloriid	82640-04-8	POS	$7,86 \times 10^{-10}$	$10^{-12} - 10^{-7}$	POS	$1,19 \times 10^{-9}$	$1,96 \times 10^{-4}$	Mõõdukalt POS	POS	Süsivesinik (tsükliline)	Ravim
3	Tamoksüfeen	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	Süsivesinik (tsükliline)	Ravim
4	17β-östradiool	50-28-2	NEG	–	$10^{-9} - 10^{-4}$	NEG	–	$3,67 \times 10^{-3}$	eeldatavalt negatiivne*	PN	Steroid	Ravim, veterinaarravim
5	Apigeniin	520-36-5	NEG	–	$10^{-9} - 10^{-4}$	NEG	–	$3,70 \times 10^{-4}$	NEG	NEG	Heterotsükliline ühend	Värvaine, looduslik toode, ravimite vaheaine
6	Di-n-butüülftaal	84-74-2	NEG	–	$10^{-8} - 10^{-3}$	NEG	–	$3,59 \times 10^{-3}$	NEG	NEG	Ester, ftalhape	Kosmeetikatoodete koostisaine, tööstuskemikaal, plastifikaator
7	Flavoon	525-82-6	NEG	–	$10^{-8} - 10^{-3}$	NEG	–	$4,50 \times 10^{-4}$	eeldatavalt negatiivne*	PN	Flavonoid, heterotsükliline ühend	Looduslik toode, ravim
8	Genisteiin	446-72-0	NEG	–	$10^{-9} - 10^{-4}$	NEG	–	$3,70 \times 10^{-4}$	eeldatavalt negatiivne*	NEG	Flavonoid, heterotsükliline ühend	Looduslik toode, ravim
9	p-n-nonüülfenool	104-40-5	NEG	–	$10^{-9} - 10^{-4}$	NEG	–	$4,54 \times 10^{-4}$	pole katsetatud	NEG	Fenool	Keemiline vaheühend
10	Resveratrool	501-36-0	NEG	–	$10^{-8} - 10^{-3}$	NEG	–	$4,38 \times 10^{-4}$	eeldatavalt negatiivne*	NEG	Süsivesinik (tsükliline)	Looduslik toode

Lühendid: CASi nr – Chemical Abstracts Service'i number; M = molaarsus; IC₅₀ = 50 % uuritava kemikaali suurima inhibeeriva toime avaldumise kontsentratsioonist; NEG = negatiivne; PN = eeldatavasti negatiivne; POS = positiivne.

* kirjandusandmete järgi klassifitseeritud negatiivseks (2).

^aSTTA ja VM7Luc ER TA katsetemethodiga uuritud levinuimad ained, mis määrati kas östrogeenireseptori antagonistiks või negatiivseks ja mida kasutati täpsuse hindamiseks VM7Luc ER TA valideerimisuuringus (2, 3).

¹Östrogeenireseptori vahendatud toime tuvastamiseks kasutatava stabiilse transfektsiooniga transkriptsiooni aktivatsiooni katsemetodi valideerimisaruanne, B. osa (2).

²ICCVAMi katsemetodi hindamisaruanne „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).

³Keskmsed IC₅₀ väärtused arvutati VM7Luc ER TA katse valideerimisuuringus osalenud laborite (XDS, ECVAM, and Hiyoshi) esitatud väärtuste alusel (3).

⁴Esitatud kontsentratsioonid on suurimad kontsentratsioonid (vahemikuotsing), mida VM7Luc ER TA katsemetodi valideerimise käigus uuriti. Kui kontsentratsioonid olid eri laborites erinevad, on esitatud suurim kontsentratsioon. Vt tabelit 4-11 ICCVAMi katsemetodi hindamisaruandes „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).

⁵ERi antagonistiks või negatiivseks klassifitseerimise aluseks olid ICCVAMi taustaülevaatedokumentides ERi sidumise ja TA katsemetodite kohta esitatud andmed (31) ning pärast ICCVAMi taustaülevaatedokumentide koostamist avaldatud ja täiendatud publikatsioonidest (2, 3, 18, 31) saadud teave.

⁶Aineklass on igale ainele omistatud rahvusvaheliselt tunnustatud standardse klassifitseerimisskeemi kohaselt, mis põhineb USA meditsiiniraamatukogu meditsiiniteemade klassifitseerimissüsteemil (leitav veebisaidil <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁷Tooteklass on igale ainele omistatud USA meditsiiniraamatukogu ohtlike ainete andmebaasi (leitav veebisaidil <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>) alusel.

Katse nõuetekohasuse kriteeriumid

16. Katse nõuetekohaseks tunnistamise või tagasilükkamise aluseks on iga katse tegemisel kasutatud etalonaine ja kontrollproovidega saadud tulemuste hinnang. Etalonainete PC_{50} (EC_{50}) või IC_{50} väärtused peaksid vastama valitud katsemeetodi (vt 2. liide STTA kohta ja 3. liide VM7Luc ER TA kohta) nõuetekohasuse kriteeriumidele ning kõik positiivsed/negatiivsed kontrollproovid peaksid igas nõuetekohaseks tunnistatud katses olema õigesti klassifitseeritud. Katse järjepideva läbiviimise võimet tuleb tõendada aja jooksul etalonainete ja kontrollproovide kohta kogutud andmeid sisaldava andmebaasi arendamise ja hooldamisega (vt punkt 15). Laborisisese korratavuse mõõduna võib kasutada mitme katsega saadud etalonainete kõverate ja parameetrite sobitamise tulemusel leitud keskväärtuste standardhälbeid (SD) või variatsioonikordajaid (CV). Peale selle peavad seoses nõuetekohasuse kriteeriumidega olema täidetud järgmised tingimused:
- andmed peavad olema ERi aktiveerimise (agonistikatse) või pärssimise (antagonistikatse) (st tõhususe ja toime) kvantitatiivseks hindamiseks piisavad;
 - piisava tundlikkuse tagamiseks peab reporteri keskmine aktiivsus võrdlusöstrogeeni võrdluskontsentratsiooni puhul olema võrdne vähemalt kandeaine (lahusti) kontrollproovi analüüsil määratud miinimumiga. STTA ja VM7Luc ER TA katsemeetodite korral on see igal plaadil neljakordne kandeaine kontrollprooviga saadud keskmine;
 - uuritavad kontsentratsioonid peaksid jääma uuritavate kemikaalide lahustuvusvahemikku ega tohiks olla tsütotoksilised.

Andmeanalüüs

17. Positiivse ja negatiivse vastuse klassifitseerimiseks tuleks iga katsemeetodi puhul järgida kindlaksmääratud andmete tõlgendamise eeskirja.
18. Nõuetekohasuse kriteeriumide (punkt 16) täitmine näitab, et katsemeetod toimib korrektselt, kuid see ei taga täpsete andmete saamist mis tahes konkreetsel katsel. Esimese katse tulemuste kordumine on parim märk täpsete andmete saamisest. Kui kahe katsega saadakse korratavad tulemused (st mõlema katse tulemused näitavad, et uuritav kemikaal on positiivne), ei ole kolmanda katse tegemine vajalik.
19. Kui kahe katsega saadud tulemused ei ole korratavad (nt uuritav kemikaal on ühe katse põhjal positiivne ja teise põhjal negatiivne) või kõnealuse katsemeetodi tulemuste puhul on nõutav suurem paikapidavuse aste, tuleks läbi viia vähemalt kolm sõltumatut katset. Sellisel juhul võetakse klassifitseerimisel aluseks kaks kokkulangevat tulemust kolmest.

Andmete tõlgendamise üldkriteeriumid

20. Praegu ei ole olemas üldtunnustatud meetodit ER TA andmete tõlgendamiseks. Kuid nii ERi vahendatud toime kvalitatiivne (nt positiivne/negatiivne) kui ka kvantitatiivne (nt EC_{50} , PC_{50} ,

IC₅₀) hindamine peab põhinema empiiriliste andmetel ja põhjendatud teaduslikel otsustel. Positiivseid tulemusi tuleks võimaluse korral iseloomustada nii toime suurusjärgu poolest kandeaine (lahusti) kontrollproovi või etalonöstrogeeniga võrreldes kui ka toime avaldumise kontsentratsiooni (nt EC₅₀, PC₅₀, RPC_{max}, IC₅₀ jms) poolest.

Katseprotokoll

21. Katseprotokollis tuleks esitada järgmine teave.

Katsemeetod:

- kasutatud katsemeetod;
- kontrollaine, etalonaine, uuritav kemikaal;
- tarnija, partii number, aegumise kuupäev, kui olemas;
- uuritava kemikaali püsivus, kui see on teada;
- uuritava kemikaali lahustuvus ja stabiilsus lahustis, kui teada;
- vastavalt vajadusele mõõtmistulemused söötme pH ja osmolaalsuse ning sademe tekke kohta pärast uuritava kemikaali lisamist.

Ühest koostisosast koosnev aine:

- füüsiline välimus, lahustuvus vees ja muud asjakohased füüsikalised-keemilised omadused;
- kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus, CASi number, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem, puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne.

Mitme koostisosaga aine, tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal ja segu:

- võimalikult täpne omaduste kirjeldus lähtuvalt koostisosade keemilisest määratlusest (vt eespool), kvantitatiivsest sisaldusest ja asjakohastest füüsikalised-keemilistest omadustest.

Lahusti/kandeaine:

- iseloomustus (omadused, tarnija ja partii);
- lahusti/kandeaine valiku põhjendus;
- uuritava kemikaali lahustuvus ja püsivus lahustis/kandeaines, kui teada.

Rakud:

- rakkude tüüp ja päritolu:

- kas ERI ekspresseeritakse endogeenselt? Kui ei, siis milline/millised retseptor(id) transfekteeeriti?
 - kasutatud reporterikonstruktsioon(id) (sealhulgas päritoluliigid);
 - transfektsioonimeetod;
 - stabiilse transfektsiooni säilitamiseks kasutatud selekteerimismeetod (kui asjakohane);
 - kas transfektsioonimeetod on stabiilsete liinide puhul asjakohane?
- rakupassaažide arv (sulatamisest alates);
 - rakupassaažide arv sulatamisel;
 - rakukultuuride säilitamise meetodid.

Katsetingimused:

- lahustuvusest tingitud piirangud;
- eluvõimelisuse hindamiseks kasutatud meetodite kirjeldus;
- söötme koostis, CO₂ kontsentratsioon;
- uuritava kemikaali kontsentratsioonid;
- kandeaine ja lisatud uuritava kemikaali kogus;
- inkubeerimise temperatuur ja niiskus;
- töötamise kestus;
- rakutiheduse töötamise alguses ja selle ajal;
- positiivsed ja negatiivsed etalonained;
- reporterreagendid (toote nimetus, tarnija ja partii);
- kriteeriumid, mille alusel katsetulemused liigitatakse positiivseteks, negatiivseteks või ebaselgeteks.

Nõuetekohasuse kontroll:

- Kordne induktsioon iga analüüsitava plaadi puhul ja kas need vastavad katses nõutavatele miinimumnõuetele, mille aluseks on aja jooksul kontrollproovidega saadud tulemused;
- nõuetekohasuse kriteeriumide, nt log₁₀EC₅₀, log₁₀PC₅₀, logIC₅₀ tegelikud väärtused ja Hilli kõvera tõusu väärtused paralleelselt uuritud positiivsete kontrollainete / etalonainete korral.

Tulemused

- Toor- ja normaliseeritud andmed;

- maksimaalne kordse induktsiooni tase;
- tsütotoksilisuse andmed;
- vähim toimet avaldav kontsentratsioon, kui see on olemas;
- RPC_{max} , PC_{max} , PC_{50} , IC_{50} ja/või EC_{50} väärtused, vajaduse korral;
- võimaluse korral andmed vastuse sõltuvuse kohta kontsentratsioonist;
- statistiline analüüs, kui see on olemas, koos mõõtevea ja usalduspiiridega (nt aritmeetilise keskmise standardviga, standardhälve, variatsioonikordaja või usaldusvahemik usaldusnivool 95 %) ning kirjeldus selle kohta, kuidas need väärtused saadi.

Tulemuste arutelu

Järeldused

KIRJANDUS

- (1) OECD (2005), „Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment“, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr 34), Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (2) OECD (2015), „Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity“, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr 225), Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (3) ICCVAM (2011), „ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method, an *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists“, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.
- (4) Pujol, P. *et al.* (1998), „Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis“, *Cancer. Res.*, nr 58(23), lk 5367–73.
- (5) Rogers, J. M. ja 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*, nr 13(1), lk 67–82.
- (6) OECD (2012), „Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Agonists (for TG 455)“, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr 173), Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (7) OECD (2015), „Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Antagonists“ Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr 174), Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (8) OECD (2012), „Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption“, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr 150), Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (9) Cavailles, V. (2002), „Estrogens and Receptors: an Evolving Concept“, *Climacteric*, nr 5, 2 lisa, lk 20–6.

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

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

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

1. liide

MÕISTED JA LÜHENDID

Katse nõuetekohasuse kriteeriumid: katse kontrollproovide ja etalonainete toimivuse miinimumnõuded. Selleks, et katse loetaks kehtivaks, peavad kõik nõuetekohasuse kriteeriumid olema täidetud.

Täpsus (vastavus): katsemeetodiga saadud tulemuste ja nõuetekohaste võrdlusväärtuste kokkulangevuse määr. Täpsus näitab katsemeetodi tulemuslikkust ja on üks olulistest aspektidest. Seda terminit kasutatakse ka vastavuse tähenduses ja see näitab, kui sageli annab katsemeetod õige tulemuse (1).

Agonist: aine, mis konkreetse retseptoriga seondudes põhjustab vastuse, nt transkriptsiooni.

Antagonist: retseptori ligandi või kemikaali liik, mis retseptoriga seondudes ei kutsu esile bioloogilist vastust, vaid blokeerib või summutab agonisti vahendatud vastuseid.

Antiöstrogeenne toime: kemikaali võime pärssida 17β -östradioli toimet, mida vahendatakse östrogeenireseptorite kaudu.

Raku morfoloogia: koekultuuri plaadi süvendis monokihis kasvanud rakkude kuju ja välimus. Surevate rakkude morfoloogia on sageli ebatavaline.

CF: OECD kontseptuaalne raamistik endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide uurimiseks ja hindamiseks.

Töötlemine aktiivsöe/dekstraaniga: rakukultuuris kasutatud seerumi töötlemine. Aktiivsöe/dekstraaniga töötlemise teel eemaldatakse endogeensed hormoonid ja hormoone siduvad valgud.

Kemikaal: aine või segu.

Tsütotoksilisus: kahjulik mõju raku struktuurile või funktsioonile, mis lõpuks võib põhjustada raku surma ning mida kajastab pärast kokkupuuteperioodi lõppemist süvendis leiduvate rakkude arvu vähenemine või rakufunktsiooni mõõtnäitajate vähenemine paralleelselt uuritud kandeaine kontrollprooviga võrreldes.

CV: variatsioonikordaja.

DCC-FBS: dekstraaniga kaetud aktiivsöega töödeldud veiselooteseerum.

DMEM: Dulbecco modifitseeritud Eagle'i sööde.

DMSO: dimetüülsulfoksiid.

E2: 17β -östradiol.

EC₅₀: 50 % uuritava kemikaali suurima toime avaldumise kontsentratsioonist.

ED: endokriinsed häired.

hER α : inimese östrogeneeni alfa-retseptor.

hER β : inimese östrogeneeni beeta-retseptor.

EFM: östrogenivaba sööde. Dulbecco modifitseeritud Eagle'i minimaalsööde (DMEM), millele on lisatud 4,5 % aktiivsöe/dekstraaniga töödeldud veiselooteseerumit, 1,9 % L-glutamiini ja 0,9 % Pen-Strepi.

ER: östrogenireseptor.

ERE: östrogeneeni vastuselement.

Östrogeneenne toime: kemikaali võime matkida 17 β -östradioli, sidudes östrogenireseptoreid ja neid aktiveerides. hER α vahendatud östrogeneenset toimet saab tuvastada käesoleva katsemeetodiga.

ERTA: östrogenireseptori transaktivatsioon.

FBS: veiselooteseerum.

HeLa: inimese emakakaelarakkude surematu liin.

HeLa9903: HeLa raku subkloon, millesse on stabiilselt transfekteeritud hER α ja lutsiferaasi reportergeen.

IC₅₀: 50 % uuritava pärssiva kemikaali suurima toime avaldumise kontsentratsioonist.

ICCVAM: The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods.

Laboritevaheline korratavus: suurus, mis näitab, millisel määral suudavad erinevad kvalifitseeritud laborid, kasutades sama katse-eeskirja ja uurides samu aineid, saada kvalitatiivselt ja kvantitatiivselt sarnaseid tulemusi. Laboritevaheline reprodutseeritavus määratakse eelvalideerimise ja valideerimise käigus ning see näitab, millisel määral võib uurimismeetodit edukalt üle viia ühest laborist teise (1).

Laborisisene korratavus: suurus, mis näitab, millisel määral suudavad sama labori kvalifitseeritud töötajad konkreetset katse-eeskirja kasutades saada eri aegadel samasuguseid tulemusi (1).

LEC: vähim toimet avaldav kontsentratsioon on uuritava kemikaali vähim kontsentratsioon, mis kutsub esile vastuse (st uuritava kemikaali vähim kontsentratsioon, mille juures kordne induktsioon on paralleelselt uuritud kandeaine kontrollproovi omaga võrreldes statistiliselt erinev).

Samalaadne katsemeetod: katsemeetod, mis on struktuurilt ja funktsioonilt sarnane valideeritud ja tunnustatud võrdlusmeetodiga. Nimetatakse ka samaväärseks katsemeetodiks.

MT: metallotioneiin.

MMTV: hiire piimanäärme kasvaja viirus.

OHT: 4-hüdroksütamoksüfeen.

PBTG: toimivusel põhinev katsejuhend.

PC (positiivne kontrollproov): väga aktiivne aine, eelistatavalt 17 β -östradiool, mida uuritakse kõigis katsetes, et tagada katsemeetodi nõuetekohane toimivus.

PC₁₀: uuritava kemikaali kontsentratsioon, mille juures agonistikatses mõõdetud toime on 10 % maksimaalsest toimest, mida positiivne kontrollproov (STTA katsemeetodi korral E2 kontsentratsiooniga 1 nM) igal plaadil esile kutsub.

PC₅₀: uuritava kemikaali kontsentratsioon, mille juures agonistikatses mõõdetud toime on 50 % maksimaalsest toimest, mida positiivne kontrollproov (E2 katsemeetodis täpsustatud võrdluskontsentratsioonis) igal plaadil esile kutsub.

PC_{max}: uuritava kemikaali kontsentratsioon, mis kutsub esile maksimaalse vastuse.

Toimivusnõuded: valideeritud katsemeetodil põhinevad nõuded, mille alusel hinnatakse, kui võrd saab esitatud katsemeetodit võrrelda teostuslikult ja tööpõhimõttelt samalaadse meetodiga. Sealhulgas on 1) katsemeetodi olulised osad, 2) valideeritud katsemeetodi vastuvõetava tulemuslikkuse tõendamiseks kasutatud kemikaalide hulgast valitud võrdluskemikaalide miinimumloetelu ja 3) võrreldavat usaldusväärsuse ja täpsuse taset, mille puhul on lähtutud valideeritud katsemeetodiga saadud tulemustest ja mis tuleks saavutada kavandatud katsemeetodi hindamisel võrdluskemikaalide miinimumloetelu kasutamise teel (1).

Pädevuse tõendamise ained: toimivusnõuetes sisalduvas alamloetelus esitatud võrdlusained, mida laborid võivad kasutada, et tõendada oma tehnilist pädevust standardse katsemeetodi kasutamiseks. Nende ainete tüüpilised valikukriteeriumid on, et need esindaks laia vastusevahemikku, oleksid müügil ja et nende kohta oleksid kättesaadavad kvaliteetsed võrdlusandmed.

Pädevus: enne tundmatute ainete uurimist tõendatud võime katsemeetodit korrektselt kasutada.

Võrdlusöstrogeen (positiivne kontrollaine): 17 β -östradiool (E2, CAS 50-28-2).

Etalonaine: võrdlusaine, mida kasutatakse katsemeetodi sobivuse tõendamiseks. STTA ja VM7Luc ER TA katsemeetodite puhul on etalonaineiks 17 β -östradiool.

Valideeritud katsemeetodid: katsemeetodid, millel põhineb toimivusel põhinev katsejuhend nr 455.

Asjakohasus: mõiste, millega väljendatakse seda, kas katsemeetod võimaldab uurida huvipakkuvat mõju, kas meetod on mõttekas ja sobib konkreetse eesmärgi jaoks. See näitab, mil määral saab katsemeetodiga õigesti mõõta või prognoosida huvipakkuvat bioloogilist mõju. Asjakohasus hõlmab ka katsemeetodi täpsuse (vastavuse) aspekti (1).

Usaldusväärsus: iseloomustab katsemeetodi korratavust, kui meetodit rakendatakse ühe ja sama katse-eeskirja alusel ühes laboris ja eri laborites pikema aja jooksul. Usaldusväärsuse hindamisel arvutatakse laborisisene ja laboritevaheline korratavus.

RLU: suhteline valgusühik.

RNA: ribonukleiinhape.

RPC_{max}: uuritava kemikaali indutseeritud maksimaalne vastus, väljendatuna protsendina 1 nM E2 indutseeritud vastusest samal plaadil.

RPMI: sööde RPMI-1640, millele on lisatud 0,9 % Pen-Strepi ja 8,0 % veiselooteserumit (FBS).

Katse: üksikeksperiment, millega hinnatakse kemikaali mõju bioloogilise analüüsi tulemustele. Iga katse on tervikeksperiment, mis viiakse läbi paralleelsüvendites rakkudega, mis on külvatud ühisest rakukogumist ühel ja samal ajal.

Sõltumatu katse: eraldiseisev sõltumatu eksperiment, millega hinnatakse kemikaali mõju bioloogilise analüüsi tulemustele, kasutades teisest rakukogumist pärit rakke ja värskest valmistatud kemikaalilahuseid; katse võib läbi viia erineval päeval või seda samal päeval teha teine töötaja.

SD: standardhälve.

Tundlikkus: kõigi niisuguste positiivsete/aktiivsete ainete osakaal, mis katse tulemusel klassifitseeritakse õigesti. Tundlikkusega iseloomustatakse katsemeetodi täpsust, kui saadud tulemusi saab kategoriseerida, ning see on oluline aspekt katsemeetodi asjakohasuse hindamisel (1).

Spetsiifilisus: kõigi niisuguste negatiivsete/mitteaktiivsete ainete osakaal, mis katse tulemusel klassifitseeritakse õigesti. Spetsiifilisusega iseloomustatakse katsemeetodi täpsust, kui saadud tulemusi saab kategoriseerida, ning see on oluline aspekt katsemeetodi asjakohasuse hindamisel (1).

Stabiilne transfektsioon: kui DNA transfekteeeritakse kultiveeritud rakkudesse nii, et see integreerub stabiilselt rakkude genoomi, mille tulemusena toimub transfekteeeritud geenide stabiilne ekspressioon. Stabiilselt transfekteeeritud rakkude kloonid valitakse välja stabiilsete markerite järgi (nt G418-resistentsus).

STTA katsemeetod: stabiilse transfektsiooniga transaktivatsiooni katse, ER α transkriptsiooni aktivatsiooni katse, milles kasutatakse rakuliini HeLa 9903.

Uuring: kogu katsetega seotud töö, mis on tehtud, et hinnata üht konkreetset ainet, kasutades konkreetset katsemeetodit. Uuring koosneb etappidest, mis hõlmavad kasutatavas uuritava aine söötmes lahustuvuse uurimist, eelkatseid vahemiku leidmiseks, kõiki vajalikke tervikkatseid kokku, andmeanalüüsi, kvaliteedi tagamist, tsütotoksilisuse hindamist jms. Uuringu lõpuleviimine võimaldab klassifitseerida uuritava kemikaali toimet (st, kas on aktiivne, mitteaktiivne või ei anna ühest tulemust) uuritava toksilise omaduse seisukohast, mida kasutava katsemeetodi abil hinnatakse, ja hinnata mõju tugevust positiivse võrdluskemikaaliga võrreldes.

Aine: REACH-määruses¹² on aine määratletud kui looduslik või tootmisprotsessi teel saadud keemiline element või selle ühendid koos stabiilsuse säilitamiseks vajalike ja tootmisprotsessist johtuvate lisanditega, välja arvatud lahustid, mida on võimalik ainest eraldada, mõjutamata aine stabiilsust või muutmata selle koostist. ÜRO GHSis (1) on kasutatud väga sarnast määratlust.

TA (transaktivatsioon): mRNA sünteesi alustamine vastusena keemilisele signaalile, näiteks östrogeeni seondumisele östrogeenireseptoriga.

Katsemeetod: siinses kontekstis on katsemeetod üks metoodikatest, mis on tunnistatud valiidses, sest see vastab väljatöötatud toimivuskriteeriumidele. Katsemeetodi osad hõlmavad näiteks konkreetset rakuliini koos sellega seotud kasvutingimustega, konkreetset söödet, milles katse läbi viiakse, plaadi ettevalmistamise tingimusi, uuritavate kemikaalide valimist ja lahjendamist, samuti mis tahes muid nõutavaid kvaliteedikontrolli meetmeid ja meetodiga seotud andmehindamisetappe.

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

Transkriptsioon: mRNA süntees.

UVCB: tundmatu või muutuva koostisega kemikaal, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal.

Valideeritud katsemeetod: katsemeetod, mille valideerimisuuringud on lõpule viidud, st on määratud selle asjakohasus (sealhulgas täpsus) ja usaldusväärsus konkreetse eesmärgi puhul. Oluline on märkida, et valideeritud katsemeetod ei tarvitse olla piisavalt kasutuskõlblik täpsuse ja usaldusväärsuse osas, et seda saaks lugeda vastuvõetavaks konkreetse eesmärgi puhul (1).

Valideerimine: protsess, millega tehakse kindlaks konkreetse lähenemisviisi, meetodi, analüüsi, protsessi või hindamisviisi usaldusväärsus ja asjakohasus seoses määratud eesmärgiga

¹² Euroopa Parlamendi ja nõukogu 18. detsembri 2006. aasta määrus (EÜ) nr 1907/2006, mis käsitleb kemikaalide registreerimist, hindamist, autoriseerimist ja piiramist (REACH) ning millega asutatakse Euroopa Kemikaaliamet, muudetakse direktiivi 1999/45/EÜ ja tunnistatakse kehtetuks nõukogu määrus (EMÜ) nr 793/93 ja komisjoni määrus (EÜ) nr 1488/94 ning samuti nõukogu direktiiv 76/769/EMÜ ja komisjoni direktiivid 91/155/EMÜ, 93/67/EMÜ, 93/105/EÜ ja 2000/21/EÜ. ELT L 304, 22.11.2007, lk 1.

(1).

VC (kandeaine kontrollproov): uuritavate ja kontrollkemikaalide lahustamiseks kasutatavat lahustit uuritakse eraldi kui kandeainet, mis ei sisalda lahustatud kemikaali.

VM7: immortaliseeritud adenokartsinoomirakk, mis ekspresseerib endogeenselt östrogenireseptorit.

VM7Luc4E2: rakuliin VM7Luc4E2 aretati inimese immortaliseeritud VM7 adenokartsinoomirakkudest, mis ekspresseerivad endogeenselt mõlemat liiki östrogenireseptorit ($ER\alpha$ ja $ER\beta$) ning millesse on stabiilselt transfekteeritud plasmiid pGudLuc7.ERE. Kõnealune plasmiid sisaldab nelja sünteetilise oligonukleotiidi koopiat, milles östrogeni vastuselement jääb ülespoole hiire piimanäärme kasvaja viiruse promootorist ja jaanimardika lutsiferaasi geenist.

Nõrgalt positiivne kontrollaine: võrdluskemikaalide loetelust valitud nõrgalt aktiivne aine, mida uuritakse kõigis katsetes, et tagada katsemeetodi nõuetekohane toimivus.

2. liide

STABIILSE TRANSFEKTSIOONIGA INIMESE ÖSTROGEENI α -RETSEPTORI TRANSAKTIVATSIOONI (TA) KATSEMEETOD, MILLES UURITAKSE KEMIKAALIDE TOIMET ÖSTROGEENI AGONISTI VÕI ANTAGONISTINA, KASUTADES RAKULIINI HERA-HELA-9903

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD (VT KA ÜLDIST SISSEJUHATUST)

1. Transaktivatsiooni (TA) katsemeetodis kasutatakse rakuliini hER α -HeLa-9903, et tuvastada toime östrogeeni agonistina, mida vahendab inimese östrogeeni α -retseptor (hER α). Stabiilse transfektsiooniga transaktivatsiooni (STTA) katsemeetodi valideerimisuuring, mille tegi Jaapani kemikaalide hindamise ja uurimise instituut (CERI), kasutades inimese östrogeeni α -retseptori vahendatava östrogeeni agonistliku ja antagonistliku toime tuvastamiseks rakuliini hER α -HeLa-9903, tõendas katsemeetodi asjakohasust ja usaldusväärsust ettenähtud eesmärgil kasutades (1).
2. See katsemeetod on välja töötatud spetsiaalselt hER α -vahendatud transaktivatsiooni tuvastamiseks, kasutades mõõdetava parameetrina kemoluminestsentsi. Kuid üle 1 μ M fütoöstrogeeni kontsentratsioonide juures on teadaolevalt saadud luminestsentssignaali, mida ei vahenda retseptorid, vaid mida põhjustab lutsiferaasi reportergeeni üleaktiveerimine (2, 3). Kuigi annuse-vastuse kõver näitab, et ERi süsteemi aktiveerumine toimub väiksematel kontsentratsioonidel, tuleb stabiilse transfektsiooniga ER TA katsesüsteemides hoolitalt uurida suurtel kontsentratsioonidel ilmnevat lutsiferaasi ekspressiooni, mida põhjustavad fütoöstrogeenid või samalaadsed ühendid, mis sarnaselt fütoöstrogeenile tekitavad lutsiferaasi reportergeeni üleaktivatsiooni (1. liide).
3. Enne käesoleva katsemeetodi regulatiivsel eesmärgil kasutamist tuleks lugeda peatükke „Üldine sissejuhatus“ ja „ER TA katsemeetodi osad“. Käesolevas katsejuhendis kasutatud mõisted ja lühendid on esitatud liites 2.1.

KATSEMEETODI PÕHIMÕTE (VT KA ÜLDIST SISSEJUHATUST)

4. Katsemeetodit kasutatakse selleks, et tuvastada östrogeeniretseptori seondumist ligandiga. Ligandi seondumise järel translokeerub retseptori-ligandi kompleks tuuma, kus seondub DNA spetsiifiliste vastuselementidega ja transaktiveerib jaanimardika lutsiferaasi reportergeeni, mille tulemusena suureneb ensüüm lutsiferaasi ekspressioon rakus. Lutsiferiin on substraat, mille ensüüm lutsiferaas transformeerib bioluminestsentsiga, mida saab luminomeetriga kvantitatiivselt mõõta. Lutsiferaasi aktiivsust saab kiiresti ja odavalt hinnata paljude müügilolevate katsekomplektidega.

5. Katsesüsteemi kasutatakse rakuliini hER α -HeLa-9903, mis on saadud inimese emakakaelakasvajast ja millele on stabiilselt lisatud kaks konstrukti: i) hER α ekspressiooni konstrukti (kodeerib inimese täispikkusega retseptorit) ja ii) jaanimardika lutsiferaasi reporterkonstrukti, milles on viis vitellogeniini östrogeeni vastuselemendi (ERE) tandemkordust, mida juhib hiire metallotioneiini (MT) promootori TATA-element. Hiire MT TATA geenikonstrukti on osutunud kõige paremini toimivaks ja seetõttu seda enamasti kasutatakse. Sellest tulenevalt saab selle hER α -HeLa-9903 rakuliiniga mõõta uuritava kemikaali võimet indutseerida lutsiferaasi geeni ekspressiooni hER α -vahendatud transaktivatsiooni.
6. ERi agonistikatse korral oleneb andmete tõlgendamine sellest, kas uuritava kemikaali indutseeritud maksimaalse vastuse tase on suurem või võrdne 10 %-ga positiivse kontrollaine (PC) 17 β -östradioli (E2) maksimaalselt indutseeriva kontsentratsiooniga (1 nM) indutseeritud vastuse tasemest (st PC₁₀-ga). ERi antagonistikatse korral oleneb andmete tõlgendamine sellest, kas vastuse toime on vähemalt 30 % väiksem kui vastus, mille indutseeris mittetsütotoksiline kontrollproov, kuhu oli lisatud võrdlusainet (25 pM E2). Andmete analüüsimist ja tõlgendamist on üksikasjalikult kirjeldatud punktides 34–48.

METOODIKA

Rakuliinid

7. Katsemeetodiga tuleks kasutada stabiilse transfektsiooniga hER α -HeLa-9903 rakuliini. Seda rakuliini saab osta Jaapani teadusbioressursside kogu (Japanese Collection of Research Bioresources, JCRB) rakupangast¹³ materjali üleandmise lepingu (Material Transfer Agreement, MTA) allakirjutamisel.
8. Katsete tegemisel tohib kasutada üksnes mükoplasmapuhastatud rakke. Mükoplasmainfektsiooni tuvastamiseks on sobiv tundlik meetod RT-PCR-meetod (polümeraasiahela reaktsioon reaaliajas) (4, 5, 6).

Rakuliini stabiilsus

9. Rakuliini stabiilsuse jälgimiseks tuleks agonistikatse korral kasutada etalonainetena E2, 17 α -östradioli, 17 α -metüültestosterooni ja kortikosterooni ning kontrollida kogu kontsentratsiooni-vastuse kõverat tabelis 1 esitatud uuritavate kontsentratsioonide vahemikus

¹³ JCRB Cell Bank: National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Asagi Saito, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Japan. Faks: +81-72-641-9812

vähemalt üks kord iga kord, kui katsemeetodit kasutatakse; tulemused peavad langema kokku tabelis 1 esitatud tulemustega.

10. Antagonistikatse korral tuleks iga katsega paralleelselt kontrollida kahe etalonaine, tamoksifeeni ja flutamiidi täielikke kontsentratsioonikõveraidsid. Jälgida tuleb nende kahe kemikaali korrektset positiivseks või negatiivseks klassifitseerimist.

Rakkude kasvatamine ja plaadile kandmise tingimused

11. Rakke tuleb hoida ilma fenoolpunaseta Eagle'i essentsiaalses minimaalsöötmes (EMEM), millele on lisatud 60 mg/l of antibiootikumi kanamütsiini ja 10 % dekstraankattega aktiivsöega töödeldud veiselooteseerumit (DCC-FBS), in a CO₂-inkubaatoris (5 % CO₂) temperatuuril 37±1 °C. 75–90 % konfluentsuse saavutamisel võib rakud ümber külvata, lisades 100 mm Petri tassi 10 ml rakukultuuri tihedusega $0,4 \times 10^5 - 1 \times 10^5$ rakku/ml. Rakud suspendeeritakse 10 % FBS-EMEMiga (sama mis DCC-FBSiga EMEM) ning külvatakse mikroplaadi süvenditesse tihedusega 1×10^4 rakku/(100 µl × süvend). Järgmiseks inkubeeritakse rakke 5 % CO₂ inkubaatoris temperatuuril 37±1 °C kolme tunni jooksul enne kemikaaliga kokku puutumist. Plasttarvikud ei tohi ilmutada östrogeenset toimet.
12. Vastuse usaldusväärsuse säilitamiseks tuleks rakke kasvatada külmutatud varudest konditsioneeritud söötmes rohkem kui ühe passaaži võrra, kuid mitte üle 40 passaaži. hERα-HeLa-9903 rakuliini puhul kestab see alla kolme kuu. Rakkude toimivus võib väheneda, kui neid kasvatatakse ebasobivates kasvutingimustes.
13. DCC-FBSi võib valmistada liites 2.2 esitatud kirjelduse järgi või hankida kaubandusest.

Katse nõuetekohasuse kriteeriumid

ERi agonistikatses kasutatavad positiivsed ja negatiivsed etalonained

14. Enne uuringut ja selle ajal tuleb kontrollida katsesüsteemi reageerimisvõimet, kasutades asjakohastes kontsentratsioonides tugevat östrogeeni (E2), nõrka östrogeeni (17α-östradioli), väga nõrka agonisti (17α-metüültestosterooni) ja negatiivset ainet (kortikosterooni). Valideerimisuuringus (1) leitud vastuvõetava vahemiku väärtused on esitatud tabelis 1. Nende nelja etalonaine paralleelproovid tuleb lisada igasse katsesse ning saadud tulemused peavad jääma antud vastuvõetavatesse piiridesse. Kui see nii ei ole, siis tuleb kindlaks teha nõuetekohasuse kriteeriumidele mittevastavuse põhjus (kontrollida nt rakkude käitlemist, seerumi ja antibiootikumi kvaliteeti ja kontsentratsiooni) ning analüüsi korrata. Kui nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, on äärmiselt oluline rakkude kasvatamise materjalide ühtlane kasutamine, et tagada EC₅₀, PC₅₀ ja PC₁₀ väärtuste minimaalne varieeruvus. Nelja etalonaine paralleelproovidega, mis lisatakse igasse katsesse (uuritakse samades tingimustes, sealhulgas samade materjalide, rakupassaažide arvu ja tehnikutega), saab kontrollida analüüsi tundlikkust, sest kolme positiivse etalonaine PC₁₀ väärtused peaksid

jääma vastuvõetavatesse piiridesse, samuti ka PC₅₀ ja EC₅₀ väärtused, kui neid on võimalik arvutada (vt tabelit 1).

Tabel 1. ERI agonistikatses kasutatava nelja etalonaine vastuvõetava vahemiku väärtused

Nimetus	logPC ₅₀	logPC ₁₀	logPC ₅₀	Hilli kõvera	Uuritav vahemik
17β-östradiool (E2) CASi nr: 50-28-2	-11,4 ~ -10,1	< -11	-11,3 ~ -10,1	0,7 ~ 1,5	10 ⁻¹⁴ ~ 10 ⁻⁸ M
17α-östradiool CASi 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
Kortikosteroon CASi nr: 50-22-6	–	–	–	–	10 ⁻¹⁰ ~ 10 ⁻⁴ M
17α-metüültestosteroon CASi nr: 58-18-4	-6,0 ~ -5,1	-8,0 ± -6,2	–	–	10 ⁻¹¹ ~ 10 ⁻⁵ M

ERI antagonistikatses kasutatavad positiivsed ja negatiivsed etalonained

15. Enne uuringut ja selle ajal tuleb kontrollida katsesüsteemi reageerimisvõimet, kasutades asjakohastes kontsentratsioonides positiivset ainet (tamoksifeeni) ja negatiivset ainet (flutamiidi). Valideerimisuuritus (1) leitud vastuvõetava vahemiku väärtused on esitatud tabelis 2. Nende kahe etalonaine paralleelproovid tuleb lisada igasse katsesse ning saadud tulemusi hinnata õigesti vastavalt kriteeriumides esitatule. Kui see nii ei ole, siis tuleb kindlaks teha kriteeriumidele mittevastavuse põhjus (kontrollida nt rakkude käitlemist, seerumi ja antibiootikumi kvaliteeti ja kontsentratsiooni) ning analüüsi korrata. Peale selle tuleb arvutada positiivse aine (tamoksifeeni) IC₅₀ väärtused ning tulemused peavad jääma esitatud vastuvõetavatesse piiridesse. Kui nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, on äärmiselt oluline rakkude kasvatamise materjalide ühtlane kasutamine, et tagada IC₅₀ väärtuste minimaalne varieeruvus. Kahe etalonaine paralleelproovidega, mis lisatakse igasse katsesse (uuritakse samades tingimustes, sealhulgas samade materjalide, rakupassaažide arvu ja tehnikutega), saab kontrollida analüüsi tundlikkust (vt tabelit 2).

Tabel 2. ERI antagonistikatses kasutatava kahe etalonaine kriteeriumid ja vastuvõetava vahemiku väärtused

Nimetus	Kriteeriumid	LogIC ₅₀	Uuritav vahemik
Tamoksifeen CASi nr: 10540-29-1	Positiivne: arvutada tuleb IC ₅₀	-5,942 ~ -7,596	10 ⁻¹⁰ ~ 10 ⁻⁵ M
Flutamiid CASi nr: 13311-84-7	Negatiivne: IC ₃₀ ei pea arvutama	–	10 ⁻¹⁰ ~ 10 ⁻⁵ M

Positiivne kontrollproov ja kandeaine kontrollproov

16. ERI agonistikatses kasutatavast positiivsest kontrollainest (1 nM E2) ja ERI antagonistikatses kasutatavast positiivsest kontrollainest (10 µM TAM) tuleb igale plaadile lisada vähemalt kolm paralleelproovi. Uuritava kemikaali lahustamiseks kasutatavast kandeainest tuleb igale

plaadile lisada vähemalt kolm paralleelproovi. Kui positiivse kontrollaine lahustamiseks kasutatakse muud kandeainet, kui seda, milles lahustatakse uuritav kemikaal, tuleb positiivsete kontrollproovidega samale plaadile lisada kolm paralleelproovi ka teisest kandeainest.

ERi agonistikatse kvaliteedi kriteeriumid

17. Positiivse kontrollainega (1 nM E2) saavutatud lutsiferaasi keskmine aktiivsuse peab olema vähemalt neljakordne igal plaadil kandeaine kontrollprooviga saavutatud keskmisega võrreldes. See kriteerium on kindlaks määratud valideerimisuuringus leitud näitajate väärtustega (aja jooksul mõõdetud 4- kuni 30-kordsed).
18. Katsemeetodi kvaliteedikontrolli seisukohast peaks positiivse kontrollproovi (1 nM E2) PC_{10} väärtusele vastav kordne induktsioon olema suurem kui $1+2$ SD kandeaine kontrollproovi kordse induktsiooni väärtusest (= 1). Prioriseerimise eesmärgil võib PC_{10} väärtus olla kasulik andmete vajalik analüüsimise hõlbustamiseks statistilise analüüsiga võrreldes. Kuigi statistiline analüüs annab teavet olulisuse kohta, ei ole niisugune analüüs kvantitatiivne parameeter kontsentratsioonil põhineva võimaliku toime puhul ega ole seega prioriseerimise seisukohast nii kasulik.

ERi antagonistikatse kvaliteedi kriteeriumid

19. Kontrollproovi lisatud ainega (25 pM E2) saavutatud lutsiferaasi keskmine aktiivsuse peab olema vähemalt neljakordne igal plaadil kandeaine kontrollprooviga saavutatud keskmisega võrreldes. See kriteerium on kindlaks määratud valideerimisuuringus leitud näitajate väärtustega.
20. Katsemeetodi kvaliteedikontrolli seisukohast peaks 1 nM E2 suhteline transkriptsiooni aktivatsioon (RTA) olema üle 100 %, 1 μ M 4-hüdroksütamoksüfeeni (OHT) RTA alla 40,6 % ja 100 μ M digitoniini (Dig) RTA alla 0 %.

Labori pädevuse tõendamine (vt käesoleva katsemeetodi jaotise „ER TA katsemeetodi osad“ punkti 14 ning tabelleid 3 ja 4).

Kandeaine

21. Kandeaine kontrollprooviks tuleks kasutada dimetüülsulfoksiidi (DMSO) või asjakohast lahustit samas kontsentratsiooni, nagu seda kasutatakse erinevates positiivsetes ja negatiivsetes kontrollproovides ja uuritavate kemikaalide proovides. Uuritavad kemikaalid tuleb lahustada lahustis, milles nad lahustuvad ja mis on võimeline segunema rakkude söötmega. Sobivad kandeained on vesi, etanool (puhtusega 95–100 %) ja DMSO. Kui kasutatakse DMSO-d, ei tohi selle kontsentratsioon ületada 0,1 mahuprotsenti. Mis tahes kandeaine korral tuleb tõendada, et maksimaalne kasutatav kogus ei ole tsütotoksiline ega sega analüüsimeetodi toimivust.

Uuritavate kemikaalide ettevalmistamine

22. Üldiselt tuleks kemikaalid lahustada DMSOs või muus sobivas lahustis ning seejärel lahjendada sama lahustiga tavapärasel vahekorras 1 : 10, et saada lahused söötmega lahjendamiseks.

Lahustuvus ja tsütotoksilisus: vahemiku leidmise kaalutlused

23. Uuritava kemikaali sobiva kontsentratsioonivahemiku määramiseks ning kontrollimiseks, kas uuritava kemikaali puhul võib tekkida probleeme lahustuvuse või tsütotoksilisusega, tuleb teha eelkatse. Kõigepealt uuritakse kemikaali maksimaalse kontsentratsiooniga kuni 1 µl/ml, 1 mg/ml või 1 mM olenevalt sellest, milline on väikseim. Olenevalt eelkatse täheldatud tsütotoksilisuse ulatusest või lahustuvuse puudumisest uuritakse esimeses põhikatses kemikaali 10-kordsete lahjenduste seerias alates maksimaalsest vastuvõetavast kontsentratsioonist (nt 1 mM, 100 µM, 10 µM jne) ning dokumenteeritakse täheldatav hägusus, sade või tsütotoksilisus. Teises ja vajaduse korral ka kolmandas katses tuleks kontsentratsioone sobivalt kohandada, nii et oleks võimalik paremini iseloomustada kontsentratsiooni-vastuse kõverat ning vältida kontsentratsioone, mille juures lahustuvus puudus või mis indutseerisid liigset tsütotoksilisust.
24. Eri agonistide ja antagonistide korral võib suurenenud tsütotoksilisus tüüpilist sigmoidset vastust oluliselt moonutada või summutada ning seda tuleks andmete tõlgendamisel arvesse võtta. Kasutada tuleks tsütotoksilisuse uurimismeetodeid, millega on võimalik saada teavet 80 % rakkude eluvõimelisuse kohta, kasutades labori kogemuste põhinevat asjakohast katset.
25. Kui tsütotoksilisuse katse tulemus näitab, et uuritava kemikaali kontsentratsioon on rakkude arvu vähendanud 20 % või rohkem, tuleb see kontsentratsioon lugeda tsütotoksiliseks ning tsütotoksilise kontsentratsiooni lähedased ja sellest kõrgemad kontsentratsioonid tuleb hindamisest välja jätta.

Kemikaaliga kokkupuude ja analüüsiplaadi jaotus

26. Kemikaali lahjendamise (1. ja 2. etapp) ning rakkudega kokkupuute (3. etapp) saab läbi viia järgmiselt.

1. etapp: igast uuritavast kemikaalst tehakse DMSO või sobiva lahustiga lahjenduste seeria ning lisatakse need mikroplaadi süvenditesse, et saada vahemiku leidmise eelkatses määratud lõplik lahjenduste seeria (tavaliselt on seerias nt kontsentratsioonid 1 mM, 100 µM, 10 µM, 1 µM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM ja 10 pM (10^{-3} – 10^{-11} M)) kolme paralleelprooviga.

2. etapp: kemikaali lahjendamine: kõigepealt lahjendada 1,5 µl uuritavat kemikaali lahust 500 µl söötmes.

3. etapp: rakkude kokkupuude kemikaaliga: lisada 50 µl söötmes lahust (valmistati 2. etapis) analüüsisüvendis, mis sisaldab 10^4 rakku/100 µl/süvend.

Igas süvendis on söötme soovitatav lõplik ruumala 150 µl. Uuritavad proovid ja etalonained

võib paigutada nii, nagu näidatud tabelites 3 ja 4.

Tabel 3. Etalonainete eri kontsentratsioonidega proovide mikroplaadile paigutamise näide ERI agonistikatse puhul.

Rida	17 α -metüültestosteroon			Kortikosteroon			17 α -östradiool			E2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Konts. 1 (10 μ M)	→	→	100 μ M	→	→	1 μ M	→	→	10 nM	→	→
B	Konts. 2 (1 μ M)	→	→	10 μ M	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	Konts. 3 (100 nM)	→	→	1 μ M	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	Konts. 4 (10 nM)	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	Konts. 5 (1 nM)	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	Konts. 6 (100 pM)	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	Konts. 7 (10 pM)	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: kandeaine kontrollproov (0,1 % DMSO); PC: positiivne kontrollproov (1 nM E2)

27. Etalonaineid (E2, 17 α -östradiool, 17 α -metüültestosteroon ja kortikosteroon) tuleb analüüsida iga katse käigus (tabel 3). Igal uuritava plaadil peavad olema süvendid positiivse kontrollprooviga (1 nM E2), mis on võimeline esile kutsuma E2 maksimaalse vastuse, ja kandeaine kontrollprooviga (DMSO või sobiv lahusti). Kui sama katse käigus kasutatakse eri allikatest pärit rakke (nt erineva passaažide arvuga, eri partiidest pärit vms), tuleb etalonaineid analüüsida iga päritoluga rakkudega.

Tabel 4. Eri kontsentratsioonidega uuritava kemikaali ja kontrollproovide mikroplaadile paigutamise näide ERI agonistikatse puhul.

Rida	Uuritav kemikaal 1			Uuritav kemikaal 2			Uuritav kemikaal 3			Uuritav kemikaal 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Konts. 1 (10 μ M)	→	→	1 nM	→	→	1 μ M	→	→	10 nM	→	→
B	Konts. 2 (1 μ M)	→	→	100 μ M	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	Konts. 3 (100 nM)	→	→	10 μ M	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	Konts. 4 (10 nM)	→	→	1 μ M	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	Konts. 5 (1 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	Konts. 6 (100 pM)	→	→	10 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	Konts. 7 (10 pM)	→	→	1 nM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: kandeaine kontrollproov (0,1 % DMSO); PC: positiivne kontrollproov (1 nM E2)

Tabel 5. Etalonainete eri kontsentratsioonidega proovide mikroplaadile paigutamise näide ERI antagonistikatse puhul.

Rida	Tamoksüfeen			Flutamiid			Uuritav kemikaal 1			Uuritav kemikaal 2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Konts. 1 (10 μ M)	→	→	10 μ M	→	→	10 μ M	→	→	10 μ M	→	→
B	Konts. 2 (1 μ M)	→	→	1 μ M	→	→	1 μ M	→	→	1 μ M	→	→
C	Konts. 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	Konts. 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→

E	Konts. 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	Konts. 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1 % DMSO	→	→	→	→	→	1 µM OHT	→	→	100 µM Dig	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: kandeaine kontrollproov (0,1 % DMSO); PC: positiivne kontrollproov (1 nM E2); OHT: 4-hüdroksütamoksüfeen; Dig: digitoniin.

 = lisatud on 25 pM E2

28.

29. Selleks, et hinnata kemikaalide antagonistlikku toimet, tuleb ridades A kuni G olevatesse süvenditesse lisada 25 pM E2. Etalonaineid (tamoksüfeen ja flutamiid) tuleb analüüsida iga katse käigus. Igal katses analüüsitavaal plaadil peaks olema positiivsete kontrollproovidega süvendid (töödeldud 1 nM E2ga, millega kontrollitakse hER α -HeLa-9903 rakuliini kvaliteeti), kandeaine kontrollproovidega süvendid (töödeldud DMSO või sobiva lahustiga), 0,1 % DMSOga süvendid, kuhu lisatakse veel E2 (rikastatud kontrollproov), lõplikus kontsentratsioonis 1 µM OHTga töödeldud süvendid ja 100 µM digitoniiniga töödeldud süvendid (tabel 5). Järgmisel analüüsitavaal plaadil peaks olema sama paigutus ilma etalonaineteta (tabel 6). Kui sama katse käigus kasutatakse eri allikatest pärit rakke (nt erineva passaažide arvuga, eri partiidest pärit vms), tuleb etalonaineid analüüsida iga päritoluga rakkudega.

Tabel 6. Eri kontsentratsioonidega uuritava kemikaali ja kontrollproovide mikroplaadile paigutamise näide Eri antagonistikatse puhul.

Rida	Uuritav kemikaal 1			Uuritav kemikaal 2			Uuritav kemikaal 3			Uuritav kemikaal 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Konts. 1 (10 µM)	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→
B	Konts. 2 (1 µM)	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→
C	Konts. 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	Konts. 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	Konts. 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	Konts. 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1 % DMSO	→	→	→	→	→	1 µM OHT	→	→	100 µM Dig	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: kandeaine kontrollproov (0,1 % DMSO); PC: positiivne kontrollproov (1 nM E2); OHT: 4-hüdroksütamoksüfeen; Dig: digitoniin.

 : lisatud on 25 pM E2

30.

31. Vajadust mööda tuleb kinnitada ääreefektide puudumist, kuid kui on ääreefektide kahtlus, tuleks plaadi paigutust muuta nii, et neid efekte saaks vältida. Näiteks võib proovide paigutamisel plaadile äärmised süvendid kasutamata jätta.

32. Pärast kemikaalide lisamist inkubeeritakse analüüsitavaid plaate 5 % CO₂ inkubaatoris temperatuuril 37±1 °C 20–24 tunni jooksul, et indutseerida reportergeeniprodukte.
33. Väga lenduvate ühendite korral tuleb rakendada eritingimusi. Sellisel juhul võivad lähedalasuvate süvendites kontrollproovid anda valepositiivseid tulemusi, mida tuleb eeldatavate ja aja jooksul kogutud kontrollväärtuse puhul arvesse võtta. Mõnel juhul, kui lenduvus võib olla probleemiks, võib kasutada kilekatteid, mis tõhusalt eraldavad üksikud süvendid katse läbiviimise ajaks ja mille kasutamine on seetõttu sellistel juhtudel soovitatav.
34. Sõltumatuse tagamiseks tuleb sama kemikaaliga korduskatsed läbi viia eri päevadel.

Lutsiferaasi mõõtmine

35. Kui nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, võib mõõtmiseks kasutada müügilolevat lutsiferaasi analüüsireagenti [nt Steady-Glo® Luciferase Assay System (Promega, E2510, või samaväärne)] või standardset lutsiferaasi analüüsisüsteemi (nt Promega, E1500 või samaväärne). Analüüsireagendid tuleb valida kasutatava luminomeetri tundlikkusest lähtuvalt. Standardset lutsiferaasi analüüsisüsteemi kasutades tuleks enne substraadi lisamist kasutada rakukultuuri lüüsimise reagenti (nt Promega, E1531 või samaväärne). Lutsiferaasi analüüsireagenti tuleb kasutada vastavalt tootja juhiste.

ANDMEANALÜÜS

ERi agonistikatse

36. ERi agonistikatse korral tuleb positiivse kontrollaine (1 nM E2) suhtelise transkriptsiooni aktiivsuse leidmiseks analüüsida sama plaadi luminescentssignaale, järgides järgmisi etappe (ka muud matemaatilised võtted on lubatud):

1. etapp. Arvutada kandeaine kontrollproovi keskvärtus.
2. etapp. Andmete normaliseerimiseks lahutada kandeaine kontrollproovi keskvärtus iga süvendi puhul saadud väärtusest.
3. etapp. Arvutada normaliseeritud positiivse kontrollproovi keskvärtus.
4. etapp. Jagada plaadi iga süvendi normaliseeritud väärtus normaliseeritud positiivse kontrollproovi keskvärtusega (PC = 100 %).

Viimane iga süvendi kohta saadu väärtus on kõnealuse süvendi suhteline transkriptsiooni aktiivsus positiivse kontrollproovi vastusega võrreldes.

5. etapp. Arvutada uuritava kemikaali iga kontsentratsioonirühma suhteliste transkriptsiooni aktiivsuste keskvärtus. Vastusega on seotud kaks mõõdet: keskmine transkriptsiooni aktiivsus (vastus) ja kontsentratsioon, mille juures vastus ilmneb (vt järgmist jaotist).

Kaalutlused EC₅₀, PC₅₀ ja PC₁₀ induksiooni kohta

37. EC₅₀ arvutamiseks on nõutav täielik kontsentratsiooni-vastuse kõver, kuid alati ei ole seda võimalik koostada või ei ole see praktiline uuritavast kontsentratsioonivahemikust tulenevate piirangute tõttu (nt tsütotoksilisus või probleemid lahustuvusega). EC₅₀ ja maksimaalne induksioonitase (mis vastab Hilli võrrandi suurimale väärtusele) on informatiivsed parameetrid, mida võimaluse korral tuleks dokumenteerida. EC₅₀ ja maksimaalse induksioonitaseme arvutamiseks tuleks kasutada asjakohast statistikatarkvara (nt Graphpad Prism). Kui Hilli logistiline võrrand on kontsentratsiooni-vastuse andmetele rakendatav, tuleks EC₅₀ arvutada järgmise valemi alusel (7):

$$Y = \text{alumine} + (\text{ülemine} - \text{alumine}) / (1 + 10^{\exp((\log EC_{50} - X) \times \text{Hilli tõus}))}, \text{ kus:}$$

X on logaritmi kontsentratsioonist ning

Y on vastus, mis algab sigmoidse kõvera alumiselt platoolt ja liigub ülemise platooni. Alumiseks platooks on Hilli logistilises võrrandis võetud null.

38. Iga uuritava kemikaali kohta peavad olema esitatud järgmised andmed:

RPC_{max}, mis on uuritava kemikaali indutseeritud maksimaalne vastus, väljendatuna protsendina 1 nM E2 indutseeritud vastusest samal plaadil, samuti PC_{max} (RPC_{max}-ga seotud kontsentratsioon) ning

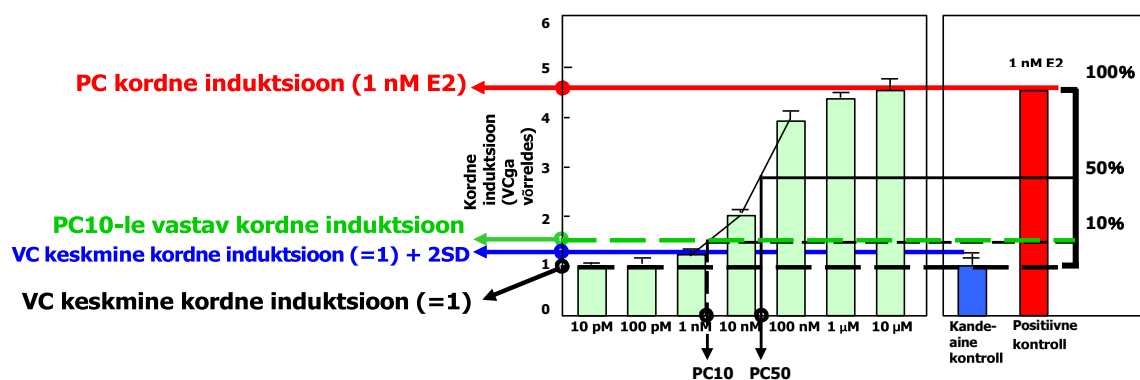
positiivsete kemikaalide korral indutseerivad kontsentratsioonid PC₁₀ ja, kui see on asjakohane, siis PC₅₀.

39. PC_x väärtuse saab arvutada, interpoleerides kahe punkti x- ja y-koordinaadi vahel, kusjuures üks neist punktidest on vahetult all- ja teine vahetult ülalpool PC_x väärtust. Vahetult all- ja ülalpool PC_x väärtust olevate andmepunktide koordinaatide (vastavalt (a,b) ja (c,d)) alusel saab järgmise valemi abil arvutada PC_x väärtuse:

$$\log[PC_x] = \log[c] + (x - d) / (d - b)$$

40. PC väärtusi kirjeldatakse allpool joonisel 1.

Joonis 1. Näide PC väärtuste arvutamisest. PC (1 nM E2) on lisatud igale analüüsitavale plaadile.



ERi antagonistikatse

41. ERi antagonistikatse korral tuleb positiivse kontrollaine (25 nM E2) suhtelise transkriptsiooni aktiivsuse (rikastatud kontrollproovi suhtes, 25 pM E2) leidmiseks analüüsida sama plaadi luminescentssignaale, järgides järgmisi etappe (ka muud matemaatilised võtted on lubatud):

1. etapp. Arvutada kandeaine kontrollproovi keskvärtus.

2. etapp. Andmete normaliseerimiseks lahutada kandeaine kontrollproovi keskvärtus iga süvendi puhul saadud väärtusest. 3. etapp. Arvutada normaliseeritud rikastatud kontrollproovi keskvärtus.

4. etapp. Jagada plaadi iga süvendi normaliseeritud väärtus normaliseeritud rikastatud kontrollproovi keskvärtusega (rikastatud kontrollproov = 100 %).

Viimane iga süvendi kohta saadu väärtus on kõnealuse süvendi suhteline transkriptsiooni aktiivsus rikastatud kontrollproovi vastusega võrreldes.

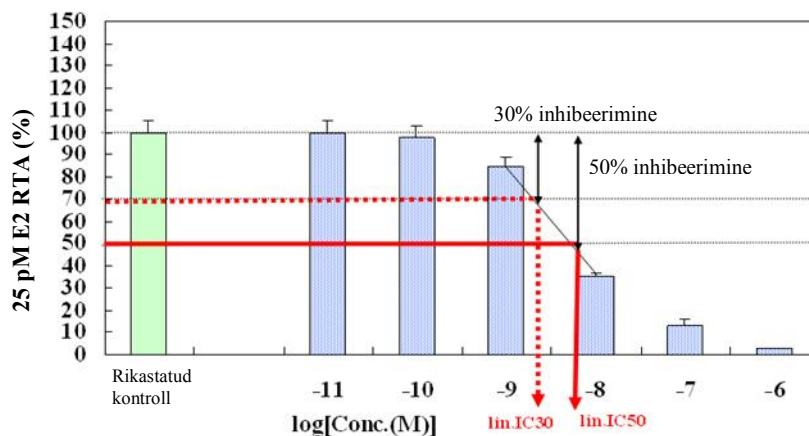
5. etapp. Arvutada iga töötluse kohta suhteliste transkriptsiooni aktiivsuste keskvärtus.

Kaalutlused IC₃₀ ja IC₅₀ induksiooni kohta

42. Positiivsete kemikaalide korral tuleb esitada indutseerivad kontsentratsioonid IC₃₀ ja, kui see on asjakohane, siis IC₅₀.
43. IC_x väärtuse saab arvutada, interpoleerides kahe punkti x- ja y-koordinaadi vahel, kusjuures üks neist punktidest on vahetult all- ja teine vahetult ülalpool IC_x väärtust. Vahetult all- ja ülalpool IC_x väärtust olevate andmepunktide koordinaatide (vastavalt (a,b) ja (c,d)) alusel saab järgmise valemi abil arvutada PC_x väärtuse:

$$\ln IC_x = a - (b - (100 - x)) (a - c) / (b - d)$$

Joonis 2. Näide IC väärtuste arvutamisest. Rikastatud kontrollproov (25 pM E2) on lisatud igale analüüsitava plaadile.



RTA: suhteline transkriptsiooni aktiivsus.

44. Tulemused peavad põhinema kahel (või kolmel) sõltumatul katsel. Kui kaks katset annavad võrreldavad ja seega korratavad tulemused, ei ole kolmandat katset vaja teha. Selleks, et olla vastuvõetavad, peavad tulemused:

- vastama nõuetekohasuse kriteeriumidele (vt nõuetekohasuse kriteeriumid punktides 14–20),
- olema korratavad.

Andmete tõlgendamise kriteeriumid

Tabel 7. Positiivseks ja negatiivseks klassifitseerimise otsuse kriteeriumid ERi agonistikatse korral

Positiivne	Kui leitud RPC_{max} on suurem kui 10 % positiivse kontrollprooviga vähemalt kahel katsel kahest või kolmest saadud vastusest või sellega võrdne.
Negatiivne	Kui leitud RPC_{max} ei ole vähemalt 10 % positiivse kontrollprooviga vähemalt kahel katsel kahest või kolmest saadud vastusest.

Tabel 8. Positiivseks ja negatiivseks klassifitseerimise otsuse kriteeriumid ERi antagonistikatse korral

Positiivne	Kui vähemalt kahel katsel kahest või kolmest on võimalik arvutada IC_{30} .
Negatiivne	Kui vähemalt kahel katsel kahest või kolmest ei ole võimalik IC_{30} arvutada.

45.

46. Andmete tõlgendamise kriteeriumid on esitatud tabelites 7 ja 8. Positiivset tulemust iseloomustatakse nii toime suurusjärgu kui ka kontsentratsiooniga, mille juures toime avaldub. Selleks võib tulemusi väljendada kontsentratsioonina, mille juures agonistikatses saadakse 50 % (PC_{50}) või 10 % (PC_{10}) positiivse kontrollproovi väärtustest ning antagonistikatses 50 % (IC_{50}) või 30 % (IC_{30}) rikastatud kontrollproovi väärtustest. Uuritav

kemikaal määratakse siiski positiivseks, kui tema maksimaalne indutseeritud vastus (RPC_{max}) on suurem kui 10 % positiivse kontrollprooviga vähemalt kahel katsel kahest või kolmest saadud vastusest või sellega võrdne, ning uuritav kemikaal loetakse negatiivseks, kui RPC_{max} jääb vähemalt kahel katsel kahest või kolmest alla 10 % positiivse kontrollprooviga saadud vastusest.

47. ERI agonistikatse PC_{10} , PC_{50} ja PC_{max} ning ERI antagonistikatse IC_{30} ja IC_{50} arvutused võib teha OECD avalikul veebisaidil¹ katsejuhendi juures leitava arvutustabeli abil.
48. On piisav, kui PC_{10} või PC_{50} ja IC_{30} või IC_{50} väärtused saadakse vähemalt kaks korda. Kuid kui sama kontsentratsioonivahemiku andmete baasjoon on varieeruv ning vastuvõetamatult suure variatsioonikordajaga (CV, %), võidakse andmed lugeda ebausaldusväärseks ning suure varieeruvuse põhjus tuleb kindlaks teha. PC_{10} arvutamiseks kasutatavate andmepunktide andmed, mida saadakse kolmest paralleelkatsest (st luminesentsi intensiivsuse andmed), peavad olema variatsioonikordajaga alla 20 %.
49. Nõuetekohasuse kriteeriumide täitmine näitab, et katsesüsteem toimib korrektselt, kuid see ei taga täpsete andmete saamist mis tahes konkreetsel katsel. Esimese katse tulemuste kordamine on parim võimalus tagada täpsete andmete saamine.
50. Kui tegemist on ERI agonistikatsega, kus lisaks sõelumise ja prioriseerimise eesmärgile on nõutav täiendav teave, on positiivsete uuritavate kemikaalide puhul, eriti nende puhul, mille PC väärtus on 10–49 %, samuti kemikaalide puhul, mida kahtlustatakse olevat lutsiferaasi ülestimuleerijad, võimalik $ER\alpha$ antagonisti kasutades kinnitada, et tähendatud lutsiferaasi aktiivsus on üksnes $ER\alpha$ -spetsiifiline vastus (vt liide 2.1).

KATSEPROTOKOLL

51. Vt punkti 20 jaotises „ER TA katsemeetodi osad“.

¹ <http://www.oecd.org/env/testguidelines>

KIRJANDUS

- (1) OECD (2015), „Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity“, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr 225), Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (2) Escande, A. *et al.* (2006), „Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta“, *Biochem. Pharmacol.*, nr 71, lk 1459–1469.
- (3) Kuiper, G. G., *et al.* (1998), „Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta“, *Endocrinol.*, nr 139, 4252–4263.
- (4) Spaepen, M., *et al.* (1992), „Detection of Bacterial and Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Polymerase Chain Reaction, *FEMS Microbiol. Lett.*, nr 78(1), lk 89–94.
- (5) Kobayashi, H., *et al.* (1995), „Rapid Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Enzymatic Detection of Polymerase Chain Reaction (PCR) Products“, *J. Vet. Med. Sci.*, nr 57(4), lk 769–71.
- (6) Dussurget, O. ja Roulland-Dussoix, D. (1994), „Rapid, Sensitive PCR-Based Detection of Mycoplasmas in Simulated Samples of Animal Sera“, *Appl. Environ. Microbiol.*, nr 60(3), lk 953–9.
- (7) De Lean, A., Munson, P. J. ja Rodbard, D. (1978), „Simultaneous Analysis of Families of Sigmoidal Curves: Application to Bioassay, Radioligand Assay, and Physiological Dose-Response Curves“, *Am. J. Physiol.*, nr 235, lk E97–E102.

Liide 2.1

VALEPOSITIIVSED TULEMUSED: NENDE LUMINESTSENTSSIGNAALIDE HINDAMINE, MIDA RETSEPTORID EI VAHENDA

1. ERi agonistikatse valepositiivsed tulemused võivad olla põhjustatud lutsiferaasigeeni aktivatsioonist, mida ei vahenda ER, või geeniproducti otsesest aktivatsioonist või sõltumatust fluorestsentsist. Selliseid mõjusid kajastab mittetäielik või ebahariliku kujuga annuse-vastuse kõver. Kui esineb selliste mõjude kahtlus, tuleks uurida ERi antagonist (nt 4-hüdroksütamoksüfeen (OHT) mittetoksilises kontsentratsioonis) mõju vastusele. Puhas antagonist ICI 182780 ei pruugi selleks otstarbeks sobida, sest piisavas kontsentratsioonis võib ICI 182780 kandeaine kontrollprooviga saadud väärtust vähendada, mis omakorda mõjutab andmete analüüsi.
2. Selle lähenemisviisi nõuetekohasuse tagamiseks tuleb samal plaadil analüüsida järgmist:
 - tundmatu kemikaali agonistlik toime koos 10 μ M OHTga ja ilma selleta;
 - kandeaine kontrollproov (kolm proovi);
 - OHT (kolm proovi);
 - 1 nM E2 (kolm proovi), agonisti positiivne kontrollproov;
 - 1 nM E2 + OHT (kolm proovi).

Andmete tõlgendamise kriteeriumid

Märkus: Kõigis süvendites olevaid proove tuleb töödelda samas kontsentratsioonis kandeainega.

- Kui ERi antagonistiga töötlemine ei mõjuta tundmatu kemikaali agonistlikku toimet, klassifitseeritakse tundmatu kemikaal negatiivseks.
- Kui tundmatu kemikaali agonistlik toime täielikult pärsitakse, rakendada otsustuskriteeriume.
- Kui madalaima kontsentratsiooni juures on agonistlik toime suurem kui PC_{10} saadud vastus või sellega võrdne, siis on tundmatu kemikaal inhibeeritud PC_{10} saadud vastusega võrdselt või rohkem. Arvutatakse ERiga töödeldud ja töötlemata süvendites saadud vastuste vahe, mida käsitletakse tõese vastusena ja kasutatakse asjakohaste parameetrite arvutamisel, mis võimaldavad teha otsuse klassifitseerimise kohta.

Andmete analüüs

Kontrollida toimivusnõudeid.

Kontrollida samades tingimustes töödeldud süvendites saadud tulemuste variatsioonikordajaid.

1. Arvutada kandeaine kontrollproovi keskväärus.
2. Lahutada kandeaine kontrollproovi keskväärus igas niisuguses süvendis saadud väärtusest, mida **ei ole** OHTga töödeldud.
3. Arvutada OHTga saadud tulemuste keskväärus.
4. Lahutada kandeaine kontrollproovi keskväärus igas OHTga töödeldud süvendis saadud väärtusest.
5. Arvutada positiivse kontrollproovi keskväärus.
6. Arvutada kõigi teiste süvendite suhteline transkriptsiooni aktiivsus positiivse kontrollprooviga võrreldes.

Liide 2.2

DEKSTRAANIGA KAETUD AKTIIVSÕEGA (DCC) TÖÖDELDUD SEERUMI VALMISTAMINE

1. Seerumi töötlemine dekstraaniga kaetud aktiivsõega (DCC) on levinud meetod rakkudes söötmesse lisatavast seerumist östrogensete komponentide eemaldamiseks, et vältida vastuse nihet seoses seerumis sisalduvate jääköstrogenidega. Seda metoodikat järgides saab töödelda 500 ml veiselooteseerumit (FBS).

Osad

2. Vaja läheb järgmisi materjale ja seadmeid.

Materjalid

Aktiivsüsi

Dekstraan

Magneesiumkloriidheksahüdraat, ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)

Sahharoos

1 M HEPES-puhverlahus (pH 7,4)

Filtrisüsteemist saadud ülipuhas vesi

Seadmed

Autoklaavitud klaasanum (suurus valitakse vajaduse järgi) Harilik laboritsentrifuug (mille temperatuuriks saab seada 4 °C)

Töö käik

3. Allpool kirjeldatud toimingud sobivad kasutamiseks 50 ml tsentrifuugianumatega.

[1. päev] Valmistada dekstraankattega aktiivsõe suspensioon 1 l ülipuhta veega, mis sisaldab 1,5 mM MgCl_2 , 0,25 M sahharoosi, 2,5 g aktiivsütt, 0,25 g dekstraani ja 5 mM HEPES-puhvrit, ning segada seda 4 °C juures üleöö.

[2. päev] Jaotada suspensioon 50 ml tsentrifuugianumatesse ja tsentrifuugida kiirusel 10 000 p/min 4 °C juures 10 minutit. Eemaldada supernatant ja säilitada pool söesadet 4 °C juures 3. päeval kasutamiseks. Teine pool söest suspendeerida FBSis, mis on sadenemise vältimiseks aeglaselt sulatatud ning 30 minuti jooksul 56 °C juures inaktiveeritud, seejärel viia suspensioon autoklaavitud klaasnõusse, näiteks koonilisse kolbi. Segada suspensiooni aeglaselt 4 °C juures üleöö.

[3. päev] Jaotada FBSis valmistatud suspensioon tsentrifuugianumatesse ja tsentrifuugida kiirusel 10 000 p/min 4 °C juures 10 minutit. Koguda FBS kokku ja viia uude söesademesse, mis valmistati 2. päeval. Suspendeerida söesade ja segada saadud suspensiooni aeglaselt autoklaavitud klaasnõus 4 °C juures üleöö.

[4. päev] Jaotada suspensiooni tsentrifuugianumatesse ja tsentrifuugida kiirusel 10000 p/min 4 °C juures 10 minutit, seejärel steriliseerida supernatant läbi 0,2 µm steriilse filtri filtrimise teel. Seda DCCga töödeldud FBSi tuleb säilitada –20 °C juures ja see tuleb ära kasutada ühe aasta jooksul.

3. LIIDE

VM7LUC ÖSTROGEENIRETSEPTORITE TRANSAKTIVATSIOONI KATSEMEETOD, MILLEGA TEHAKSE KINDLAKS ÖSTROGEENIRETSEPTORI AGONISTID JA ANTAGONISTID

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD (VT KA ÜLDIST SISSEJUHATUST)

1. Selle katsemeetodiga kasutatakse rakuliini VM7Luc4E2¹. Selle on valideerinud Ameerika Ühendriikide riikliku toksikoloogiaprogrammi alternatiivsete toksikoloogiameetodite ametitevaheline keskus (National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, NICEATM) ja alternatiivmeetodite valideerimise ametitevaheline koordineerimiskomitee (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods, ICCVAM) (1). VM7Luc-rakuliinid ekspresseerivad valdavalt endogeenset ER α -d ja vähesel määral endogeenset ER β -d (2, 3, 4).
2. See katsemeetod sobib paljude ainete uurimiseks eeldusel, et neid saab lahustada dimetüülsulfoksiidis (DMSO, CASi nr 67-68-5), need ei reageeri DMSOga ega rakkude söötmega ega ole uuritavate kontsentratsioonide juures tsütotoksilised. Kui DMSO-d ei saa kasutada, võib kasutada muud kandeainet, näiteks etanooli või vett (vt punkt 12). VM7Luc ER TA (ant)agonistikatse tõendatud toimivus lubab oletada, et käesoleva katsemeetodiga saadud andmed võivad anda teavet ERi vahendatud toimemehhanismide kohta ning tuleks kaaluda nende kasutamist ainete prioriseerimiseks edasise uurimise eesmärgil.
3. See katsemeetod on välja töötatud spetsiaalselt hER α ja hER β vahendatud transaktivatsiooni tuvastamiseks, kasutades mõõdetava parameetrina kemoluminestsentsi. Kemoluminestsentsi kasutamine biokatsetes on laialt levinud, sest luminestsentsil on suur signaali-müra suhe (10). Jaanimardika lutsiferaasi aktiivsust võivad rakupõhistes katsetes segada ained, mis inhibeervad lutsiferaasi ensüümi, põhjustades kas näilist inhibitsiooni või suurenenud

¹ Enne 2016. aasta juuni nimetati see rakuliin rakuliiniks BG1Luc. BG-1 rakke kirjeldasid algselt Geisinger jt (1998) (12) ning hiljem iseloomustasid neid Ameerika Ühendriikide riikliku keskkonnatervise instituudi (National Institute of Environmental Health Sciences – NIEHS) teadlased (13). Suhteliselt hiljuti avastati, et teadlaste kasutatavatel BG-11 rakkudel on olemas kaks varianti, BG-1 Fr ja BG-1 NIEHS. Nende kahe BG-1 rakuliini variandi põhjalik analüüs (sealhulgas DNA uuring), mille viis läbi Li koos kaastöötajatega (2014) (14), näitas, et BG-1 Fr oli unikaalne ja et BG-1 NIEHS, st katsemeetodi väljatöötamiseks kasutatud algne rakuliin, ei olnud BG-1 inimese munasarja kartsinoomi rakuliin, vaid hoopis inimese rinnavähi rakuliini MCF7 variant. Katsemeetodis kasutatud rakuliini, mida algselt nimetati BG1Luc4E2 (15), nimetatakse nüüd VM7Luc4E2 (V – variant; M7 – MCF7 rakud). Samuti nimetatakse katsemeetodit nüüd VM7Luc ER TA katsemeetodiks. Kuigi katsemeetodi aluseks oleva rakuliini päritolu on teine, ei mõjuta see avaldatud valideerimisuuringuid ega käesoleva katsemeetodi kasutamist östrogeense/antiöstrogeense toimega kemikaalide sõelumiseks.

luminestsentsi valgust stabiliseerimise tõttu (10). Peale selle on mõnede lutsiferaasipõhiste ERi reportergeeni uurivate katsemeetoditega üle 1 μ M fütoöstrogeeni kontsentratsioonide juures teadaolevalt saadud luminestsentssignaali, mida ei vahenda retseptorid, vaid mida põhjustab lutsiferaasi reportergeeni üleaktiveerimine (9) (11). Kuigi annuse-vastuse kõver näitab, et ERi süsteemi aktiveerumine toimub väiksematel kontsentratsioonidel, tuleb stabiilse transfektsiooniga ER TA katsesüsteemides hoolitult uurida suurtel kontsentratsioonidel ilmnevat lutsiferaasi ekspressiooni, mida põhjustavad fütoöstrogeenid või samalaadsed ühendid, mis sarnaselt fütoöstrogeenile tekitavad lutsiferaasi reportergeeni üleaktivatsiooni (see Appendix 2).

4. Enne käesoleva katsemeetodi regulatiivsel eesmärgil kasutamist tuleks lugeda peatükke „Üldine sissejuhatus“ ja „ER TA katsemeetodi osad“. Käesolevas katsemeetodis kasutatud mõisted ja lühendid on esitatud 1. liites.

KATSEMEETODI PÕHIMÕTE (VT KA ÜLDIST SISSEJUHATUST)

5. Katsemeetodit kasutatakse ERi ligandi sidumise kindlakstegemiseks, millele järgneb retseptori-ligandi kompleksi translokatsioon tuuma. Tuumas seondub retseptori-ligandi kompleks spetsiifilise DNA-vastuselemendiga ja transaktiveerib reportergeeni (*luc*), mille tulemusena tekib lutsiferaas ja valguse eraldumine, mida saab luminomeetriga kvantitatiivselt mõõta. Lutsiferaasi aktiivsust saab kiiresti ja odavalt hinnata paljude müügilolevate komplektidega. VM7Luc ER TA katsemeetodis kasutatakse *in vitro* ERi agonisti või antagonistina toimivate ainete kindlakstegemiseks inimese rinna adenokartsinoomi ER-tundlikku rakuliini VM7, millele on stabiilselt transfekteeritud jaanimardika *luc*-reporterkonstrukt, mida kontrollivad neli hiire piimanäärme kasvaja promootorit (MMTV) ülespoole jäävad östrogeeni vastuselementi. MMTV promootor annab ainult vähesel määral ristreaktsioone teiste steroidsete ja mittesteroidsete hormoonidega (8). Andmete tõlgendamise kriteeriumeid on üksikasjalikult kirjeldatud punktis 41. Lühidalt öeldes tehakse positiivne vastus kindlaks kontsentratsiooni-vastuse kõvera abil, millel on vähemalt kolm punkti, mille veavahemikud (keskväärtus $\pm$ SD) ei kattu, samuti amplituudi muutusena (normeeritud suhtelisi valgusühikuid (RLU) vähemalt 20 % etalonainega (agonistikatse korral 17 β -östradiool (E2, CASi nr 50-28-2)), antagonistikatse korral raloksüfeen HCl (Ral, CASi nr 84449-90-1) / E2 saadud maksimumväärtusest).

METOODIKA

Rakuliin

6. Katsemeetodiga tuleks kasutada stabiilse transfektsiooniga VM7Luc4E2 rakuliini. See rakuliin on praegu saadaval ainult tehnilise litsentsilepingu alusel California Ülikoolist

asukohaga Davis, California, USA¹ ja ettevõttest Xenobiotic Detection Systems Inc., asukohaga Durham, North Carolina, USA².

Rakuliini stabiilsus

7. Rakuliini stabiilsuse ja terviklikkuse säilitamiseks tuleks rakke kasvatada külmutatud varudest kultiveerimissöötmes rohkem kui ühe passaaži võrra (vt punkt 9). Rakke ei tohiks kasvatada rohkem kui 30 passaaži. VM7Luc4E2 rakuliini puhul kestavad 30 passaaži kokku ligikaudu 3 kuud.

Rakkude kasvatamine ja plaadile kandmise tingimused

8. Järgida tuleb rakkude kasvatamise heas tavas (5, 6) esitatud eeskirju, et tagada kõigi materjalide ja meetodite kvaliteet ning säilitada mis tahes tehtava töö terviklikkus, nõuetekohasus ja korratavus.
9. VM7Luc4E2 rakke hoitakse RPMI 1640 söötmes, millele on lisatud 0,9 % Pen-Strepi ja 8,0 % veiselooteseerumit (FBS), spetsiaalses koekultuuride inkubaatoris temperatuuril 37 ± 1 °C ja 90 ± 5 % niiskuse juures keskkonnas, kus õhk sisaldab $5,0 \pm 1$ % CO₂.
10. Ligikaudu 80 % konfluentsuse saavutamisel külvatakse VM7Luc4E2 rakud ümber ja lastakse kohaneda östrogeenivaba keskkonnaga 48 tunni jooksul enne nende kandmist 96 süvendiga plaatidele, et neid uuritavate kemikaalidega töödelda ning analüüsida östrogeenist sõltuvat lutsiferaasi aktiivsuse induktsiooni. Östrogeenivaba sööde (EFM) sisaldab Dulbecco modifitseeritud fenoolpunasevaba Eagle'i minimaalsöödet (DMEM), millele on lisatud 4,5 % aktiivsöe/dekstraaniga töödeldud veiselooteseerumit, 1,9 % L-glutamiini ja 0,9 % Pen-Strepi. Ükski plasttarvik ei tohi ilmutada östrogeenset toimet (vt üksikasjalikku juhendit (7))

Katse nõuetekohasuse kriteeriumid

11. Katse nõuetekohaseks tunnistamise või tagasilükkamise aluseks on kõigi 96 süvendiga plaadil tehtud katsete puhul kasutatud etalonaine ja kontrollproovidega saadud tulemuste hinnang. Iga etalonainet uuritakse mitme eri kontsentratsiooni juures ning iga etalonaine ja kontrollaine kontsentratsiooniga tehakse mitu paralleelproovi. Tulemusi võrreldakse nende kvaliteedikontrolli proovide (QC) parameetritega, mis saadi agonistide ja antagonistide kohta

¹ Michael S. Denison, Ph.D. Professor, Dept. of Environmental Toxicology, 4241 Meyer Hall, One Shields Ave, University of California, Davis, CA 95616, e-post: msdenison@ucdavis.edu, (530) 754-8649

² Xenobiotic Detection Systems Inc., 1601 East Geer Street, Suite S, Durham NC, 27704 USA, e-post: info@dioxins.com, telefon: 919-688-4804, faks: 919-688-4404

aja jooksul kogutud andmeid sisaldavatest andmebaasidest, mille iga labor on koostanud pädevuse tõendamise käigus. Kogutud andmetega andmebaase ajakohastatakse pidevalt etalonaine ja kontrollprooviga saadud väärtustega. Varustuse või laboritingimuste muutused võivad tingida vajaduse ajakohastatud andmebaasi loomiseks.

Agonistikatse

Vahemiku leidmise katse

- Induktsioon: induktsiooni mõõtmiseks plaadil jagatakse etalonaine E2 suurima kontsentratsiooni juures saadud suhteliste valgusühikute (RLU) keskvärtus DMSO kontrollprooviga saadud RLU keskvärtusega. Tavaliselt saavutatakse viiekordne induktsioon ning nõuetekohaseks tunnistamiseks peab induktsioon olema vähemalt neljakordne.
- DMSO kontrollprooviga saadud tulemused: lahusti kontrollprooviga saadud RLU väärtused ei tohi aja jooksul kogutud lahusti kontrollproovide tulemuste keskmisest RLU väärtusest erineda rohkem kui 2,5 standardhälbe võrra.
- Katse, mille puhul ei ole täidetud ükskõik kumb nõuetekohasuse kriteerium, tuleb tühistada ja uuesti läbi viia.

Tervikkatse

See hõlmab agonisti vahemiku leidmise katse nõuetekohasuse kriteeriume ning järgmist.

- Etalonainega saadud tulemused: etalonaine E2 kontsentratsiooni-vastuse kõver peab olema sigmoidne ning vähemalt kolm väärtust peavad paiknema kontsentratsiooni-vastuse kõvera lineaarvahemikus.
- Positiivse kontrolliga saadud tulemused: metoksükloori kontrollprooviga saadud RLU väärtused peavad olema suuremad kui DMSOga saadud keskvärtus pluss kolmekordne DMSO keskvärtuse standardhälve.
- Katse, mille puhul ei ole täidetud ükskõik milline nõuetekohasuse kriteerium, tuleb tühistada ja uuesti läbi viia.

Antagonistikatse

Vahemiku leidmise katse

- Vähenemine: vähenemise mõõtmiseks jagatakse etalonaine Ral/E2 suurima kontsentratsiooni juures saadud RLU keskvärtus DMSO kontrollprooviga saadud RLU keskvärtusega. Tavaliselt saavutatakse viiekordne vähenemine ning nõuetekohaseks tunnistamiseks peab vähenemine olema vähemalt kolmekordne.
- E2 kontrollproovidega saadud tulemused: E2 kontrollprooviga saadud RLU väärtused ei tohi aja jooksul kogutud E2 kontrollproovide tulemuste keskmisest RLU väärtusest erineda rohkem kui 2,5 standardhälbe võrra.
- DMSO kontrollprooviga saadud tulemused: DMSO kontrollprooviga saadud RLU väärtused ei tohi aja jooksul kogutud lahusti kontrollproovide tulemuste keskmisest RLU väärtusest erineda rohkem kui 2,5 standardhälbe võrra.

- Katse, mille puhul ei ole täidetud ükskõik milline nõuetekohasuse kriteerium, tühistatakse ja tehakse uuesti.

Tervikkatse

See hõlmab antagonisti vahemiku leidmise katse nõuetekohasuse kriteeriume ning järgmist.

- Etalonainega saadud tulemused: etalonaine Ral/E2 kontsentratsiooni-vastuse kõver peab olema sigmoidne ning vähemalt kolm väärtust peavad paiknema kontsentratsiooni-vastuse kõvera lineaarvahemikus.
- Positiivse kontrolliga saadud tulemused: tamoksifeeni/E2 kontrollprooviga saadud RLU väärtused peavad olema väiksemad kui E2 kontrollprooviga saadud keskvärtus miinus kolmekordne E2 kontrollproovi keskvärtuse standardhälve.
- Katse, mille puhul ei ole täidetud ükskõik milline nõuetekohasuse kriteerium, tühistatakse ja tehakse uuesti.

Etalonained, positiivsed ja lahusti kontrollproovid

Lahusti kontrollproov (agonisti- ja antagonistikatsed)

12. Uuritava kemikaali lahustamiseks kasutatavat kandeainet tuleb katseliselt kontrollida kandeaine kontrollproovina. VM7Luc ER TA katsemeetodi valideerimisel kasutatud kandeaine oli 1 % (mahuprotsent) dimetüülsulfoksiid (DMSO, CASi nr 67-68-5) (vt punkt 24). Kui DMSO asemel kasutatakse muud kandeainet, tuleb katsed kõigi etalonainete, kontrollproovide ja uuritavate kemikaalidega vajaduse korral läbi viia samas kandeaines.

Etalonaine (agonisti vahemiku leidmine)

13. Etalonaine on E2 (CASi nr 50-28-2). Vahemiku leidmiskatseks tehakse etalonainest järjestikused lahjendused, nii et saadakse neljas kontsentratsioonis E2 ($1,84 \times 10^{-10}$, $4,59 \times 10^{-11}$, $1,15 \times 10^{-11}$ ja $2,87 \times 10^{-12}$ M), ning iga kontsentratsiooniga tehakse katse kahes süvendis.

Etalonaine (agonisti tervikkatse)

14. Tervikkatses koosnevad E2 proovid järjestikustest 1 : 2 lahjendustest, mille tulemusena saadakse 11 eri kontsentratsiooniga ($3,67 \times 10^{-10}$ kuni $3,59 \times 10^{-13}$ M) E2 proovi, millest igaüht analüüsitakse paralleelselt kahes süvendis.

Etalonaine (antagonisti vahemiku leidmine)

15. Etalonaineiks on Rali (CASi nr 84449-90-1) ja E2 (CASi nr 50-28-2) segu. Vahemiku leidmise katses valmistatakse Ral/E2 järjestikused lahjendused nii, et saadakse kolmes kontsentratsioonis Ral ($3,06 \times 10^{-9}$, $7,67 \times 10^{-10}$ ja $1,92 \times 10^{-10}$ M), millest igaühele on lisatud muutmatu kontsentratsioon E2, analüüsitakse paralleelselt kahes süvendis.

Etalonaine (antagonisti tervikkatse)

16. Tervikkatses valmistatakse Ral/E2 järjestikused 1 : 2 lahjendused nii, et saadakse üheksas kontsentratsioon Ral ($2,45 \times 10^{-8}$ kuni $9,57 \times 10^{-11}$ M), millest igaühele on lisatud muutmatus kontsentratsioon E2, analüüsitakse paralleelselt kahes süvendis.

Nõrgalt positiivne kontrollaine (agonist)

17. Nõrgalt positiivne kontrollaine on $9,06 \times 10^{-6}$ M *p,p'*-metoksükloor (metoksükloor; CASi nr 72-43-5) EFMis.

Nõrgalt positiivne kontrollaine (antagonist)

18. Nõrgalt positiivne kontrollaine on $3,36 \times 10^{-6}$ M tamoksüfeen (CASi nr 10540-29-1) EFMis, millele on lisatud $9,18 \times 10^{-11}$ M E2.

E2 kontrollproov (ainult agonistikatse)

19. E2 kontrollproov koosneb $9,18 \times 10^{-11}$ M E2-st EFMis ja seda kasutatakse negatiivse kontrollproovi baasjoone leidmiseks.

Kordne induksioon (agonist)

20. Lutsiferaasi aktiivsuse indutseerimine etalonaine (E2) mõjul leitakse, jagades etalonaine E2 suurima kontsentratsiooniga saadud RLU keskväärtuse DMSO kontrollprooviga saadud RLU keskväärtusega ning tulemus peab olema rohkem kui neljakordne.

Kordne vähenemine (antagonist)

21. Etalonaine (Ral/E2) lutsiferaasi keskmine aktiivsus leitakse, jagades etalonaine Ral/E2 suurima kontsentratsiooniga saadud RLU keskväärtuse DMSO kontrollprooviga saadud RLU keskväärtusega ning tulemus peab olema rohkem kui kolmekordne.

Labori pädevuse tõendamine (vt käesoleva katsemeetodi jaotise „ER TA katsemeetodi osad“ punkti 14 ning tabeleid 3 ja 4).

Kandeaine

22. Uuritavad kemikaalid tuleb lahustada lahustis, milles nad lahustuvad ja mis on võimeline segunema rakkude söötmega. Sobivad kandeained on vesi, etanool (puhtusega 95–100 %) ja DMSO. Kui kasutatakse DMSOd, ei tohi selle kontsentratsioon ületada 1 mahuprotsenti. Mis tahes kandeaine korral tuleb tõendada, et maksimaalne kasutatav kogus ei ole tsütotoksiline ega sega analüüsimeetodi toimivust. Etalonaine ja kontrollained lahustatakse 100 % lahustis ning lahjendatakse seejärel EFMiga sobivate kontsentratsioonideni.

Uuritavate kemikaalide ettevalmistamine

23. Uuritavad kemikaalid lahustatakse 100 % DMSOs (või sobivas lahustis) ning lahjendatakse seejärel EFMiga sobivate kontsentratsioonideni. Enne lahustamist ja lahjendamist tuleb

kõigil uuritavatel kemikaalidel lasta saavutada toatemperatuur. Uuritavate kemikaalide lahused tuleb iga katse jaoks värskelt valmistada. Lahustes ei tohi olla nähtavat sadet ega hägu. Etalonaine ja kontrollainetega võib valmistada suurema koguse põhilahust, kuid etalonaine, kontrollaine ja uuritavate kemikaalide lõplikud lahused tuleb valmistada värskelt enne iga katset ning kasutada 24 tunni jooksul valmistamisest alates.

Lahustuvus ja tsütotoksilisus: vahemiku leidmise kaalutlused

24. Vahemiku leidmise katse koosneb seitsme punkti leidmisest järjestikuste 1 : 10 lahjendustega, millest igaühest tehakse kaks paralleelproovi. Kõigepealt tehakse uuritavate kemikaalidega katseid kuni maksimaalse kontsentratsioonini 1 mg/ml (~1 mM) agonistikatse korral ja 20 µg/ml (~10 µM) antagonistikatse korral. Vahemiku leidmise katsete abil määratakse järgmised parameetrid:
- uuritava kemikaali algkontsentratsioon tervikkatses kasutamiseks;
 - uuritava kemikaali lahjendused (1 : 2 või 1 : 5) tervikkatses kasutamiseks.
25. Agonisti- ja antagonistikatse eeskirjad hõlmavad raku eluvõimelisuse / tsütotoksilisuse hindamist ning see kuulub ka vahemiku leidmise ja tervikkatse juurde. VM7Luc ER TA valideerimisel (1) rakkude eluvõimelisuse hindamiseks kasutatud tsütotoksilisuse määramise meetod oli skaleeritud kvalitatiivne visuaalne jälgimismeetod, kuid tsütotoksilisuse määramiseks võib kasutada ka kvantitatiivset meetodit (vt eeskirja (7)). Nende uuritava kemikaali kontsentratsioonidega saadud andmeid, mis põhjustavad eluvõimelisuse rohkem kui 20 % vähenemise, ei saa kasutada.

Kemikaaliga kokkupuude ja analüüsiplaadi jaotus

26. Rakud loendatakse ja külvatakse 96 süvendiga koekultuuriplaadile (2×10^5 rakku süvendi kohta), kus neid inkubeeritakse EFMis 24 tundi, et võimaldada rakkudel plaadile kinnituda. EFM eemaldatakse ning asendatakse EFMis lahustatud uuritavate ja võrdluskemikaalidega, plaati inkubeeritakse 19–24 tundi. Suure lenduvusega ainete korral on vaja erimeetmeid, sest kontrollproovid lähedal paiknevates süvendites võivad anda valepositiivseid tulemusi. Sellisel juhul on soovitatav kasutada kilekatteid, mis tõhusalt eraldavad üksikud süvendid katse läbiviimise ajaks.

Vahemiku leidmise katsed

27. Vahemiku leidmise katsetes kasutatakse kõiki 96 süvendiga plaadi süvendeid, et katsetada kuni kuut uuritavat kemikaali seitsmes järjestikuste 1 : 10 lahjendustega saadud kontsentratsioonis kahe paralleelproovina (vt jooniseid 1 ja 2).
- *Agonisti* vahemiku leidmise katses kasutatakse etalonainena E2 nelja kontsentratsiooni kahes paralleelproovis ning neli süvendit kulub DMSO kontrolli paralleelproovidele.

- *Antagonisti* vahemiku leidmise katses kasutatakse etalonainena Ral/E2, kus Ral on kolmes eri kontsentratsioonis, millele on lisatud $9,18 \times 10^{-11}$ M E2; seda lahust analüüsitakse kahes paralleelproovis ning nii E2 kontrollproovile kui ka DMSO-kontrollproovile kulub kolm paralleelsüvendit.

Joonis 1. Agonisti vahemiku leidmise katse 96 süvendiga plaadi paigutus

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	VC	VC	VC	VC	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4

Lühendid: E2-1 kuni E2-4 = etalonaine E2 kontsentratsioonid (suuremast väiksemani); TC1-1 kuni TC1-7 = 1. uuritava kemikaali (TC1) kontsentratsioonid (suuremast väiksemani); TC2-1 kuni TC2-7 = 2. uuritava kemikaali (TC2) kontsentratsioonid (suuremast väiksemani); TC3-1 kuni TC3-7 = 3. uuritava kemikaali (TC3) kontsentratsioonid (suuremast väiksemani); TC4-1 kuni TC4-7 = 4. uuritava kemikaali (TC4) kontsentratsioonid (suuremast väiksemani); TC5-1 kuni TC5-7 = 5. uuritava kemikaali (TC5) kontsentratsioonid (suuremast väiksemani); TC6-1 kuni TC6-7 = 6. uuritava kemikaali (TC6) kontsentratsioonid (suuremast väiksemani); VC = kandeaine kontrollproov (DMSO [1 % (mahuprotsent) EFM]).

Joonis 2. Antagonisti vahemiku leidmise katse 96 süvendiga plaadi paigutus

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	VC	VC	VC	E2	E2	E2	Ral-1	Ral-2	Ral-3

Lühendid: E2 = E2 kontrollproov; Ral-1 kuni Ral-3 = etalonaine raloksüfeeni/E2 kontsentratsioonid (suuremast väiksemani); TC1-1 kuni TC1-7 = 1. uuritava kemikaali (TC1) kontsentratsioonid (suuremast väiksemani); TC2-1 kuni TC2-7 = 2. uuritava kemikaali (TC2) kontsentratsioonid (suuremast väiksemani); TC3-1 kuni TC3-7 = 3. uuritava kemikaali (TC3) kontsentratsioonid (suuremast väiksemani); TC4-1 kuni TC4-7 = 4. uuritava kemikaali (TC4) kontsentratsioonid (suuremast väiksemani); TC5-1 kuni TC5-7 = 5. uuritava kemikaali (TC5) kontsentratsioonid (suuremast väiksemani); TC6-1 kuni TC6-7 = 6. uuritava kemikaali (TC6) kontsentratsioonid (suuremast väiksemani); VC = kandeaine kontrollproov (DMSO [1 % (mahuprotsent) EFM]).

Märkus: kõigi uuritavate kemikaalidega viiakse katse läbi $9,18 \times 10^{-11}$ M E2 juuresolekul.

28. Igas süvendis on söötme soovitatav lõplik ruumala 200 µl. Kasutada ainult neid analüüsitavaid plaate, milles rakkude eluvõimelisus kõigis süvendites on vähemalt 80 %.

29. **Agonisti** tervikkatse jaoks lähtekontsentratsioonide määramist kirjeldatakse põhjalikult agonistikatse eeskirjas (7). Lühidalt, kasutatakse järgmisi kriteeriume.

- Kui uuritava kemikaali kontsentratsioonikõveral ei ole punkte, mis on suuremad kui DMSO kontrollprooviga saadud keskvärtus pluss kolmekordne standardhälve, viiakse tervikkatse läbi 11 järjestikuste 1 : 2 lahjendustega saadud kontsentratsioonis, alustades maksimaalsest lahustuvast kontsentratsioonist.
- Kui uuritava kemikaali kontsentratsioonikõveral on punkte, mis on suuremad kui DMSO kontrollprooviga saadud keskvärtus pluss kolmekordne standardhälve, peab 11 lahjenduse lähtekontsentratsioon tervikkatses olema 1 log suurem kui kontsentratsioon, millega vahemiku leidmise katses saadi suurim kohandatud RLU värtus. 11 kontsentratsiooniga lahjendusskeem põhineb kas 1 : 2 või 1 : 5 lahjendustel vastavalt järgmistele kriteeriumidele:

11 kontsentratsiooniga järjestikusi 1 : 2 lahjendusi tuleks kasutada, kui vahemiku leidmise katses saadud kontsentratsiooni-vastuse kõveral põhjal kajastab saadav kontsentratsioonide vahemik kogu vastuste vahemikku. Muul juhul tuleks lahjendada vahekorras 1 : 5.

- Kui uuritava kemikaali vahemiku leidmise katses saadud kontsentratsiooni-vastuse kõver on kahefaasiline, peab ka tervikkatse kajastama mõlemat faasi.

30. **Antagonisti** tervikkatse jaoks lähtekontsentratsioonide määramist kirjeldatakse põhjalikult antagonistikatse eeskirjas (7). Lühidalt, kasutatakse järgmisi kriteeriume.

- Kui uuritava kemikaali kontsentratsioonikõveral ei ole punkte, mis on väiksemad kui E2 kontrollprooviga saadud keskvärtus miinus kolmekordne standardhälve, viiakse tervikkatse läbi 11 järjestikuste 1 : 2 lahjendustega saadud kontsentratsioonis, alustades maksimaalsest lahustuvast kontsentratsioonist.
- Kui uuritava kemikaali kontsentratsioonikõveral on punkte, mis on väiksemad kui E2 kontrollprooviga saadud keskvärtus miinus kolmekordne standardhälve, peab 11 lahjenduse lähtekontsentratsioon tervikkatses olema üks järgmistest:
 - kontsentratsioon, mis vahemiku leidmise katses annab vähima kohandatud RLU väärtuse;
 - maksimaalne lahustuv kontsentratsioon (vt agonistikatse eeskiri (7), joonis 14-2);
 - vähim tsütotoksiline kontsentratsioon (vt näiteks antagonistikatse eeskiri (7), joonis 14-3).
- 11 kontsentratsiooniga lahjendusskeem põhineb kas järjestikustel 1 : 2 või 1 : 5 lahjendustel vastavalt järgmistele kriteeriumidele:

11 kontsentratsiooniga järjestikusi 1 : 2 lahjendusi tuleks kasutada, kui vahemiku leidmise katses saadud kontsentratsiooni-vastuse kõveral põhjal kajastab saadav kontsentratsioonide

vahemik kogu vastuste vahemikku. Muul juhul tuleks lahjendada vahekorras 1 : 5.

Tervikkatsed

31. Tervikkatse koosneb 11 kontsentratsiooniga järjestikustest lahjendustest (järjestikused lahjendused vahekorras kas 1 : 2 või 1 : 5 olenevalt tervikkatse kriteeriumide kohasest lähtekontsentratsioonist), kusjuures iga kontsentratsiooniga tehakse paralleelkatse 96 süvendiga plaadi kolmes süvendis (vt joonised 3 ja 4).

- *Agonisti* tervikkatses kasutatakse etalonainena E2 11 kontsentratsioonis kahes paralleelproovis. Igal plaadil tehakse neljas süvendis DMSO kontrollproovi paralleelkatsed ja veel neljas metoksükloori kontrollproovi ($9,06 \times 10^{-6}$ M) paralleelkatsed.
- *Antagonisti* tervikkatses kasutatakse etalonainena Ral/E2 lahust Rali üheksas kontsentratsioonis, millele on lisatud muutumatu $9,18 \times 10^{-11}$ M E2, neljas süvendis on $9,18 \times 10^{-11}$ M E2 paralleelkontrollproovid, neljas DMSO kontrollproovid ja neljas $3,36 \times 10^{-6}$ M tamoksüfeeni paralleelproovid.

Joonis 3. Agonisti tervikkatse 96 süvendiga plaadi paigutus

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Meth
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Meth
G	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Meth
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Meth

Lühendid: TC11-1 kuni TC1-11 = 1. uuritava kemikaali kontsentratsioonid (suuremast väiksemani); TC2-1 kuni TC2-11 = 2. uuritava kemikaali kontsentratsioonid (suuremast väiksemani); E2-1 kuni E2-11 = etalonaine E2 kontsentratsioonid (suuremast väiksemani); Meth = *p,p'*-metoksükloori nõrgalt positiivne kontrollproov; VC = DMSO (1 mahuprotsent) EFM kandeaine kontrollproov

Joonis 4. Antagonisti tervikkatse 96 süvendiga plaadi paigutus

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
G	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam

Lühendid: E2 = E2 kontrollproov; Ral-1 kuni Ral-9 = etalonaine raloksüfeeni/E2 kontsentratsioonid (suuremast väiksemani); Tam = tamoksüfeeni/E2 nõrgalt positiivne kontrollproov; TC1-1 kuni TC1-11 = 1. uuritava kemikaali (TC1) kontsentratsioonid (suuremast väiksemani); TC2-1 kuni TC2-11 = 2. uuritava kemikaali (TC2) kontsentratsioonid (suuremast väiksemani); VC = kandeaine kontrollproov (DMSO [1 % (mahuprotsent) EFM]).

Märkus: nagu märgitud, sisaldavad kõik süvendid muutumatus kontsentratsioonis E2 ($9,18 \times 10^{-11}$ M).

32. Sõltumatuse tagamiseks tuleb sama kemikaaliga tervikkatseid korrata eri päevadel. Kokku tuleks teha vähemalt kaks tervikkatset. Kui katsete tulemused on vasturääkivad (nt üks positiivne, teine negatiivne) või kui üks katsetest ei ole nõuetekohane, tuleb täiendavalt teha kolmas katse.

Luminesentsi mõõtmine

33. Luminestsentsi mõõdetakse lainepikkuste vahemikus 300 kuni 650 nm injektoriga luminomeetriga ning tarkvaraga, mis reguleerib süstitavat kogust ja mõõteintervalli (7). Igast süvendist emiteeritud valgust väljendatakse RLÜdes süvendi kohta.

ANDMEANALÜÜS

EC₅₀/IC₅₀ määramine

34. EC₅₀ väärtus (50 % uuritava kemikaali suurima toime avaldumise kontsentratsioonist (agonisti puhul)) ja IC₅₀ väärtus (50 % uuritava kemikaali suurima inhibeeriva toime avaldumise kontsentratsioonist (antagonisti puhul)) määratakse kontsentratsiooni-vastuse andmete järgi. Ühe või mitme kontsentratsiooni juures positiivse uuritava kemikaali puhul arvutatakse uuritava kemikaali kontsentratsioon, mis on 50 % suurima toime avaldumise kontsentratsioonist (IC₅₀ või EC₅₀), Hilli funktsiooni analüüsi või asjakohase alternatiivi abil. Hilli funktsioon on nelja parameetriga matemaatiline logistiline mudel, mis esitab uuritava kemikaali kontsentratsiooni seose vastusega (tavaliselt sigmoidse kõvera järgi) allpool toodud võrrandi kohaselt,

$$35. Y = alumine + \frac{(\text{ülemine} - alumine)}{1 + 10^{(\lg EC_{50} - X) \text{Hilli tõus}}}$$

kus:

Y = vastus (st RLÜd);

X = logaritmi kontsentratsioonist;

alumine (plato) = minimaalne vastus;

ülemine (plato) = maksimaalne vastus;

lg EC₅₀ (või lg IC₅₀) = logaritmi X-ist, vastusest, mis jääb ülemise ja alumise plato vahele;

Hilli tõus = kõvera tõus.

Mudeliga arvutatakse parim sobiv joon ülemise ja alumise plato ning tõusu järgi ning parameetrite IC₅₀ ja EC₅₀. EC₅₀ ja IC₅₀ väärtuste arvutamiseks tuleks kasutada asjakohast statistikatarkvara (nt Graphpad Prism^R).

Võõrväärtuste määramine

36. Head statistilist hindamist võib hõlbustada Q-testi jms (vt eeskirjad agonisti ja antagonisti puhul (7)) kasutamine „kasutute“ süvendite leidmiseks, millega saadud tulemused tuleb andmete analüüsimisel kõrvale jätta.
37. E2 etalonaine paralleelproovide (kaks tk) korral loetakse paralleelproovi igasugune kohandatud RLÜ väärtus antud E2 kontsentratsiooni juures võõrväärtuseks, kui selle on rohkem kui 20 % suurem või väiksem kui aja jooksul kogutud andmete andmebaasis olev kohandatud RLÜ väärtus kõnealuse kontsentratsiooni jaoks.

Luminomeetriliste andmete kogumine ja kohandamine vahemiku leidmise katseks

38. Luminomeetrist saadud töötlemata andmed tuleb kanda katse jaoks välja töötatud arvutustabelisse. Tuleb kindlaks teha, kas on olemas võõrväärtusi, mis tuleks eemaldada. (Vt katse nõuetekohasuse kriteeriume nende parameetrite osas, mida analüüsides määratakse.) Teha tuleb järgmised arvutused.

Agonist

1. etapp Arvutada kandeaine (DMSO) kontrollproovi (VC) keskväärus.
2. etapp Andmete normaliseerimiseks lahutada kandeaine (DMSO) kontrollproovi (VC) keskväärus iga süvendi puhul saadud väärtusest.
3. etapp Arvutada etalonaine (E2) kordse induktsiooni keskväärus.
4. etapp Arvutada uuritavate kemikaalide EC₅₀ keskväärused.

Antagonist

1. etapp Arvutada kandeaine DMSO kontrollproovi (VC) keskväärus.
2. etapp Andmete normaliseerimiseks lahutada kandeaine (DMSO) kontrollproovi (VC) keskväärus iga süvendi puhul saadud väärtusest.
3. etapp Arvutada etalonaine (Ral/E2) põhjustatud kordse vähenemise keskväärus.
4. etapp Arvutada etalonaine E2 kontrollproovide keskväärus.
5. etapp Arvutada uuritavate kemikaalide IC₅₀ keskväärused.

Luminomeetriliste andmete kogumine ja kohandamine tervikkatseks

39. Luminomeetrist saadud töötlemata andmed tuleb kanda katse jaoks välja töötatud arvutustabelisse. Tuleb kindlaks teha, kas on olemas võõrväärtusi, mis tuleks eemaldada. (Vt katse nõuetekohasuse kriteeriume nende parameetrite osas, mida analüüsides määratakse.) Tehakse järgmised arvutused.

Agonist

1. etapp Arvutada kandeaine DMSO kontrollproovi (VC) keskväärus.
2. etapp Andmete normaliseerimiseks lahutada kandeaine (DMSO) kontrollproovi (VC) keskväärus iga süvendi puhul saadud väärtusest.
3. etapp Arvutada etalonaine (E2) kordse induktsiooni keskväärus.
4. etapp Arvutada E2 ja uuritavate kemikaalide EC₅₀ keskväärused.
5. etapp Arvutada metoksükloori kohandatud RLU keskväärus.

Antagonist

1. etapp Arvutada kandeaine DMSO kontrollproovi (VC) keskväärus.
2. etapp Andmete normaliseerimiseks lahutada kandeaine (DMSO) kontrollproovi (VC) keskväärus iga süvendi puhul saadud väärtusest.
3. etapp Arvutada etalonaine (Ral/E2) põhjustatud kordse induktsiooni keskväärus.
4. etapp Arvutada Ral/E2 ja uuritavate kemikaalide IC₅₀ keskväärused.

5. etapp Arvutada tamoksüfeeni kohandatud RLU keskvärtus.
 6. etapp Arvutada etalonaine E2 kontrollproovide keskvärtus.

Andmete tõlgendamise kriteeriumid

40. VM7Luc ER TA katsemeetod on kavandatud osana tõendite kaalukust arvestavast lähenemisviisist, et aidata aineid prioriseerida endokriinse häire põhjustamise *in vivo* uurimiseks. Üks kõnealuse prioriseerimise osadest on uuritava kemikaali klassifitseerimine kas positiivseks või negatiivseks ERi suhtes agonistliku või antagonistliku toime seisukohast. VM7Luc ER TA valideerimisuuringus kasutatud positiivseks ja negatiivseks klassifitseerimise otsustuskriteeriumid on esitatud tabelis 1.

Tabel 1. Positiivseks ja negatiivseks klassifitseerimise otsustuskriteeriumid

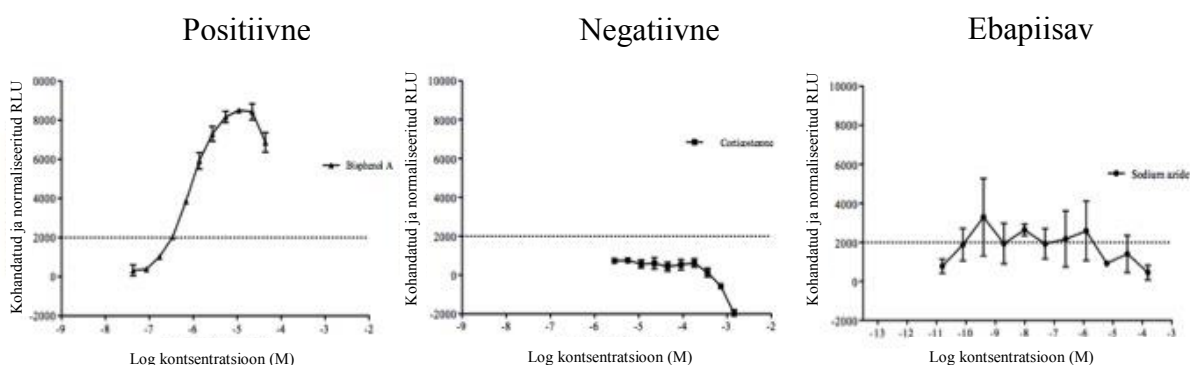
AGONISTLIK TOIME	
Positiivne	- Kõigil uuritavatel kemikaalidel, mis on ERi agonistliku toime järgi klassifitseeritud positiivseks, peab kontsentratsiooni-vastuse kõver sisaldama baasjoont, millele järgneb positiivne tõus, mis lõpeb platoo või tipuga. Mõnel juhul on võimalik kindlaks määrata üksnes kaks neist osadest (alumise platoo ja tõus või tõus ja ülemine platoo). - Positiivse tõusu joonel peab olema vähemalt kolm punkti, mille veavahemikud (keskväärtus $\pm$ SD) ei kattu. Alumist platood moodustavad punktid jäetakse välja, kuid kõvera lineaarvahemikku moodustavad punktid võivad sisaldada tipupunkti või platoo esimest punkti. - Positiivseks klassifitseerimiseks peab vastuse amplituud, st alumise ja ülemise platoo vaheline erinevus olema vähemalt 20 % etalonainega E2 saadud maksimaalsest väärtusest (st vähemalt 2000 RLUD, kui etalonaine (E2) vastuse maksimaalseks väärtuseks on seatud 10 000) RLUD). - Võimaluse korral arvutatakse iga positiivse uuritava kemikaali EC₅₀ väärtus.
Negatiivne	Konkreetses kontsentratsiooni keskmise kohandatud RLU on väiksem või võrdne DMSO kontrollproovi RLU keskvärtusega, millele on liidetud DMSO kontrollproovi RLU väärtuse kolmekordne standardhälve.
Ebapiisav	Ebapiisavaks loetakse andmed, mida suurte kvalitatiivsete või kvantitatiivsete puuduste tõttu ei saa tõlgendada usaldusväärsena toime olemasolu või selle puudumise kajastamisel, ning neid andmeid ei saa kasutada määramaks, kas uuritav kemikaal on positiivne või negatiivne. Kemikaalidega tuleks teha uued katsed.
ANTAGONISTLIK TOIME	

Positiivne	- Uuritava kemikaalide andmetest saab koostada kontsentratsiooni-vastuse kõvera, mis koosneb baasjoonest, millele järgneb negatiivne tõus. - Negatiivse tõusu joonel peab olema vähemalt kolm punkti, mille veavahemikud ei kattu. Baasjoont moodustavad punktid jäetakse välja, kuid kõvera lineaarvahemikku moodustavad punktid võivad sisaldada platoo esimest punkti. - Toime peaks olema vähemalt 20 % väiksem etalonainega Ral/E2 saadud maksimaalsest väärtusest (st 8000 RLUD või vähem, kui etalonaine (Ral/E2) vastuse maksimaalseks väärtuseks on seatud 10 000 RLUD). - Uuritava kemikaali suurim mittetsütotoksiline kontsentratsioon peab olema 1×10^{-5} M või alla selle. - Võimaluse korral arvutatakse iga positiivse uuritava kemikaali IC₅₀ väärtus.
Negatiivne	Kõik andmepunktid on suuremad kui EC ₈₀ väärtus (80% E2-ga saadud vastusest või 8000 RLUD) kontsentratsioonil alla $1,0 \times 10^{-5}$ M.
Ebapiisav	Ebapiisavaks loetakse andmed, mida suurte kvalitatiivsete või kvantitatiivsete puuduste tõttu ei saa tõlgendada usaldusväärsetena toime olemasolu või selle puudumise kajastamisel, ning neid andmeid ei saa kasutada määramaks, kas uuritav kemikaal on positiivne või negatiivne. Kemikaaliga tuleks teha uued katsed.

41.

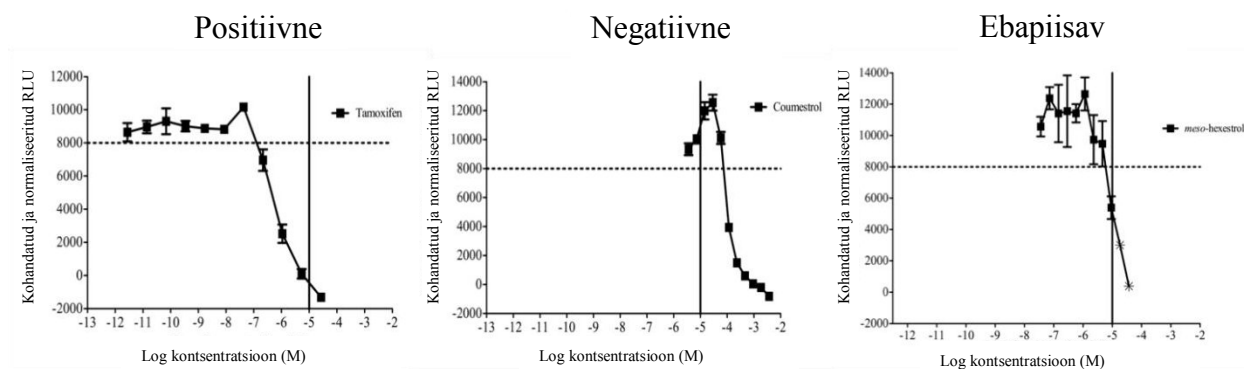
42. Positiivset tulemust iseloomustatakse nii toime suurusjärgu kui ka võimaluse korral kontsentratsiooniga, mille juures toime avaldub. Näited positiivsetest, negatiivsetest ja ebapiisavatest andmetest on esitatud joonistel 5 ja 6.

Joonis 5. Näited agonisti kohta: positiivsed, negatiivsed ja ebapiisavad andmed



Punktiirjoon tähistab 20 % E2-ga saadud vastusest, 2000 kohandatud ja normaliseeritud RLUD.

Joonis 6. Näited antagonisti kohta: positiivsed, negatiivsed ja ebapiisavad andmed



Punktiirjoon tähistab 80 % Ral/E2-ga saadud vastusest, 8000 kohandatud ja normaliseeritud RLUd.

Pidevjoon tähistab kontsentratsiooni $1,00 \times 10^{-5}$ M. Selleks, et vastus loetakse positiivseks, peab see kontsentratsioonidel alla $1,00 \times 10^{-5}$ M jääma allapoole 8000 RLU joont.

Meso-heksestrooli kõveral tärniga tähistatud kontsentratsioonidel juures on eluvõimelisus 2 või suurem.

Meso-heksestrooliga saadud katsetulemused loetakse ebapiisavateks andmetest, sest ainus vastus, mis jääb alla 8 000 RLU, ilmneb kontsentratsioonil $1,00 \times 10^{-5}$ M.

43. EC_{50} ja IC_{50} saab arvutada nelja parameetriga Hilli funktsiooni abil (täpsem teave on agonistikatse ja antagonistikatse eeskirjades (7)). Nõuetekohasuse kriteeriumide täitmine näitab, et süsteem toimib korrektselt, kuid see ei taga täpsete andmete saamist mis tahes konkreetsel katsel. Esimese katse tulemuste kordamine on parim võimalus tagada täpsete andmete saamine (vt punkti 19 jaotises „ER TA katsemeetodi osad“).

KATSEPROTOKOLL

44. Vt punkti 20 jaotises „ER TA katsemeetodi osad“.

KIRJANDUS

- (1) ICCVAM (2011), „ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method, an *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists“, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.
- (2) Monje P., Boland R. (2001). Subcellular Distribution of Native Estrogen Receptor α and β Isoforms in Rabbit Uterus and Ovary, *J. Cell Biochem.*, 82(3): 467-479.
- (3) Pujol P., *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, *Cancer Res.*, 58(23): 5367-5373.
- (4) Weihua Z., *et al.* (2000). Estrogen Receptor (ER) β , a Modulator of ER α in the Uterus, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(11): 936-5941.
- (5) Balls, M. *et al.* (2006), „The Importance of Good Cell Culture Practice (GCCP)“, *ALTEX*, nr 23 (Lisa), lk 270–273.
- (6) Coecke, S. *et al.* (2005), Guidance on Good Cell Culture Practice: a Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice“, *Alternatives to Laboratory Animals*, nr 33, lk 261–287.
- (7) ICCVAM (2011), „ICCVAM Test Method Evaluation Report, The LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals“, NIH Publication nr 11–7850.
- (8) Rogers, J.M., Denison, M.S. (2000), „Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals“, *In Vitro Mol. Toxicol.*, nr 13(1), lk 67–82.
- (9) Escande, A. *et al.* (2006), „Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta“, *Biochem. Pharmacol.*, nr 71(10), lk 1459–69.
- (10) Thorne, N., Inglese, J., Auld, D. S. (2010), „Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology“, *Chemistry and Biology* nr 17(6), lk 646–57.

- (11) Kuiper, G. G. *et al.* (1998), „Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta“, *Endocrinology*, nr 139(10), lk 4252–63.
- (12) Geisinger *et al.* (1989), „Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors“, *Cancer*, nr 63, lk 280–288.
- (13) Baldwin *et al.* (1998), „BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*“, *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Animal*, nr 34, lk 649–654.
- (14) Li, Y. *et al.* (2014), „Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant“, *Mol. Endo.*, nr 28, lk 2072–2081.
- (15) Rogers, J. M. ja 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.*, nr 13, lk 67–82.

4. LIIDE

STABIILSE TRANSFEKTSIOONIGA INIMESE ÖSTROGEENI α -RETSEPTORI TRANSAKTIVATSIOONI (TA) KATSEMEETOD, MILLES UURITAKSE KEMIKAALIDE TOIMET ÖSTROGEENI AGONISTI VÕI ANTAGONISTINA, KASUTADES RAKULIINI ERA CALUX

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD (VT KA ÜLDIST SISSEJUHATUST)

1. ER α CALUX transaktivatsiooni katsemeetodis kasutatakse inimese rakuliini U2OS, et tuvastada toime östrogeeni agonistina või antagonistina, mida vahendab inimese östrogeeni α -retseptor (hER α). Stabiilse transfektsiooniga ER α CALUX biokatsemeetodi valideerimisuuring, mille tegi BioDetection Systems BV (Amsterdam, Madalmaad), tõendas katsemeetodi asjakohasust ja usaldusväärsust ettenähtud eesmärgil kasutades (1). Rakuliin ER α CALUX ekspresseerib ainult stabiilse transfektsiooniga inimese ER α -d (2) (3).
2. See katsemeetod on välja töötatud spetsiaalselt hER α -vahendatud transaktivatsiooni tuvastamiseks, kasutades mõõdetava parameetrina bioluminestsentsi. Bioluminestsentsi kasutamine on suure signaali-müra suhte tõttu biokatsetes üldlevinud (4).
3. Üle 1 μ M fütoöstrogeeni kontsentratsioonid teadaolevalt üleaktiveerivad lutsiferaasi reportergeeni, mille tulemusena toimub luminesents, mida ei vahenda retseptorid (5, 6, 7). Seetõttu tuleb stabiilse transfektsiooniga ERi transaktivatsiooni katsesüsteemides hoolikalt uurida fütoöstrogeenide või muude sarnaste ühendite suuri kontsentratsioone, mis võivad lutsiferaasi ekspressiooni üleaktiveerida (vt 2. liide).
4. Enne käesoleva katsemeetodi regulatiivsel eesmärgil kasutamist tuleks lugeda peatükke „Üldine sissejuhatus“ ja „ER TA katsemeetodi osad“. Käesolevas katsemeetodis kasutatud mõisted ja lühendid on esitatud 1. liites.

KATSEMEETODI PÕHIMÕTE (VT KA ÜLDIST SISSEJUHATUST)

5. Biokatsemeetodit kasutatakse ERi ligandi sidumise ja sellele järgneva retseptori-ligandi kompleksi tuuma suunatud translokatsiooni hindamiseks. Tuumas seondub retseptori-ligandi kompleks DNA spetsiifiliste vastuselementidega ja transaktiveerib jaanimardika lutsiferaasi reportergeeni, mille tulemusena suureneb ensüüm lutsiferaasi ekspressioon rakus. Pärast lutsiferaasi substraadi lutsiferiini lisamist muundatakse lutsiferiin bioluminestseeruvaks saaduseks. Eralduvat valgust on luminomeetri abil lihtne tuvastada ja kvantitatiivselt mõõta.
6. Katsesüsteemis kasutatakse stabiilse transfektsiooniga ER α CALUX rakke. ER α CALUX rakud on pärit inimese osteoblastilise osteosarkoomi rakuliinist U2OS. Inimese U2OS rakud transfecteeriti stabiilselt 3xHRE-TATA-Luci ja pSG5-neo-hER α -ga, kasutades

kaltsiumfosfaadiga kaassadestamise meetodit. Rakuliin U2OS valiti välja kui parim östrogeenile (ja teistele steroidhormoonidele) reageeriv reporterrakuliin, mis põhineb tähelepanekul, et rakuliinil U2OS on retseptori endogeenne aktiivsus väike või puudub hoopis. Endogeensete retseptorite puudumist hinnati ainult lutsiferaasi reporterplasmiidide abil, mis ei ilmutanud retseptorligandide lisamisel mingit aktiivsust. Peale selle toetas nimetatud rakuliin tugevat hormoonvahendatud vastust, kui sellesse viidi ajutiselt sugulasretseptoreid (2, 3, 8).

7. Kemikaalide östrogeense või antiöstrogeense toime uurimine rakuliini ER α CALUX abil hõlmab eelnevat sõelkatset ja tervikkatseid. Eelneva sõelkatse käigus määratakse uuritavate kemikaalide lahustuvus, tsütotoksilisus ja täpsustatud, tervikkatses uuritavate kontsentratsioonide vahemik. Tervikkatsete käigus analüüsitakse uuritavaid kemikaale täpsustatud kontsentratsioonide vahemikus ER α CALUX biokatsemeetodi abil, millele järgneb uuritavate kemikaalide klassifitseerimine agonistideks ja antagonistideks.
8. Andmete tõlgendamise kriteeriumeid on üksikasjalikult kirjeldatud punktis 59. Lühidalt loetakse uuritav kemikaal antagonismi seisukohast positiivseks, kui vähemalt kaks uuritava kemikaali järjestikust kontsentratsiooni annavad vastuse, mis on suurem või võrdne 10 %ga etalonaine 17 β -östradiooliga saadud maksimaalsest vastusest (PC₁₀). Uuritav kemikaal loetakse antagonismi seisukohast positiivseks, kui vähemalt kaks uuritava kemikaali järjestikust kontsentratsiooni annavad vastuse, mis on väiksem või võrdne 80 %ga etalonaine tamoksüfeeniga saadud maksimaalsest vastusest (PC₈₀).

METOODIKA

Rakuliinid

9. Katsemeetodiga tuleks kasutada stabiilse transfektsiooniga rakuliini U2OS ER α CALUX. Rakuliin on tehnilise litsentsilepingu alusel saadaval ettevõttest BioDetection Systems BV, asukohaga Amsterdam, Madalmaad.
10. Kasutada tuleks ainult mükoplasmavabu rakukultuure. Rakupartiidel peab olema sertifikaat, mis tõendab, et need ei ole mükoplasmaga saastunud, või tuleb enne kasutamist mükoplasma olemasolu katseliselt kontrollida. Mükoplasmainfektsiooni tuvastamiseks tuleks kasutada tundlikku RT-PCR-meetodit (polümeraasiahela reaktsioon reaajas) (9).

Rakuliini stabiilsus

11. CALUX-rakkude stabiilsuse ja terviklikkuse säilitamiseks tuleb rakke hoida vedelas lämmastikus (–80 °C). Pärast rakkude sulatamist uue kultuuri külvamiseks tuleks rakke vähemalt kaks korda ümber külvata, enne kui neid kasutatakse kemikaalide agonistliku ja antagonistliku toime hindamiseks östrogeeni suhtes. Rakke ei tohiks ümber külvata rohkem kui 30 passaaži.

12. Selleks, et jälgida rakuliini stabiilsust ajas, tuleb kontrollida agonistliku ja antagonistliku toime katsesüsteemi reageerimisvõimet, hinnates etalonainega saadud parameetri EC_{50} või IC_{50} väärtusi. Peale selle tuleb kontrollida positiivse kontrollprooviga (PC) ja negatiivse kontrollprooviga (NC) saadud suhtelist induksiooni. Tulemused peavad olema kooskõlas agonistliku toime (tabel 3C) või antagonistliku toime (tabel 4C) hindamiseks tehtava $ER\alpha$ CALUXi biokatse nõuetekohasuse kriteeriumidega. Etalonained ning positiivsed ja negatiivsed kontrollained on agonistliku ja antagonistliku toime hindamiseks esitatud vastavalt tabelites 1 ja 2.

Rakkude kasvatamine ja külvamistingimused

13. U2OS rakke kasvatatakse söötmes (sööde DMEM/F12 (1 : 1), mis sisaldab indikaatorina fenoolpunast ja millele on lisatud veiselooteseerumit (7,5 %), asendatavaid aminohappeid (1 %), 10 ühikut/ml penitsilliini, streptomütsiini ja selektiivainena genetitsiini (G-418)). Rakud pannakse CO_2 -inkubaatorisse (5 % CO_2), kus temperatuur on 37 °C ja õhuniiskus 100 %. Kui rakud saavutavad 85–95 % konfluentsuse, külvatakse need ümber või valmistatakse ette külvamiseks 96 süvendiga mikrotiiterplaadile. Viimasel juhul suspendeeritakse rakud uuesti kontsentratsiooniga 1×10^5 rakku/ml katsesöötmes (DMEM/F12 (1 : 1), mis ei sisalda fenoolpunast ja millele on lisatud dekstraankattega aktiivsõega töödeldud veiselooteseerumit (5 mahuprotsenti), asendatavaid aminohappeid (1 mahuprotsent), 10 ühikut/ml penitsilliini ja streptomütsiini) ja külvatakse 96 süvendiga mikrotiiterplaadi süvenditesse (100 µl homogeniseeritud rakususpensiooni). Enne uuritava ainega töötlemist inkubeeritakse rakke 24 tundi CO_2 -inkubaatoris (5 % CO_2 , 37 °C, õhuniiskus 100 %) Plasttarvikud peavad olema östrogeenivabad.

Katse nõuetekohasuse kriteeriumid

14. Uuritava(te) kemikaali(de) agonistlikku ja antagonistlikku toimet uuritakse katseseeriade abil. Katseseeria koosneb maksimaalselt kuuest mikrotiiterplaadist. Igas katseseerias on vähemalt üks täisseeria etalonaine lahjendustest, positiivne kontrollproov, negatiivne kontrollproov ja lahusti kontrollproovid. Joonistel 1 ja 2 on esitatud proovide paigutus plaadil agonisti ja antagonist katseseeriade korral.
15. Iga etalonaine lahjendust, uuritavat kemikaali, lahusti kontrollproovi ning positiivset ja negatiivset kontrollproovi analüüsitakse kolme paralleelproovina. Kõik need kolm paralleelset analüüsi peavad vastama tabelis 3A ja 4A esitatud nõuetele.
16. Iga katseseeria esimesel plaadil mõõdetakse etalonaine (agonismi korral 17β-östradiool, antagonismi korral tamoksifeen) täielikku lahjenduste seariat. Selleks, et oleks võimalik võrrelda ülejäänud viie mikrotiiterplaadi analüüsi tulemusi etalonaine täieliku kontsentratsiooni-vastuse kõvera punkte sisaldava esimese mikrotiiterplaadi omadega, peavad kõik plaadid sisaldama kolme kontrollproovi: lahusti kontrollproov, uuritava etalonaine suurim kontsentratsioon ning etalonaine ligikaudne kontsentratsioon EC_{50}

(agonismi korral) või IC₅₀ (antagonismi korral). Esimese plaadi ja ülejäänud viie plaadi kontrollproovide keskmine suhtarv peab vastama tabelis 3C (agonismi korral) või 4C (antagonismi korral) esitatud nõuetele.

17. Iga katseseeria osaks oleva mikrotiiterplaadi kohta arvutatakse z-tegur (10). Z-teguri arvutamiseks kasutatakse etalonaine suurima ja vähima kontsentratsiooniga saadud vastuste abil. Mikrotiiterplaat loetakse nõuetekohaseks, kui see vastab tabelis 3C (agonismi korral) või 4C (antagonismi korral) esitatud nõuetele.
18. Etalonainega saadud annuse-vastuse kõver peab olema sigmoidne. Etalonaine lahjenduste seeriaga saadud vastustest tuletatud EC₅₀ või IC₅₀ peab vastama tabelis 3C (agonismi korral) või 4C (antagonismi korral) esitatud nõuetele.
19. Igas katseseerias peab olema positiivne ja negatiivne kontrollproov. Nii positiivse kui ka negatiivse kontrollproovi kohta arvutatud suhteline induksioon peab vastama tabelis 3C (agonismi korral) või 4C (antagonismi korral) esitatud nõuetele.
20. Kõigi mõõtmiste käigus tuleb mõõta etalonaine suurima kontsentratsiooni induksioonitegur, jagades selleks etalonaine 17β-östradioli suurima kontsentratsiooniga saadud vastuse (suhtelistes valgusühikutes, RLU) keskmise väärtuse lahusti kontrollprooviga saadud vastuse (RLU) keskmise väärtusega. See induksioonitegur peab vastama kordse induksiooni miimumnõuetele, mis on esitatud tabelis 3C (agonismi korral) või 4C (antagonismi korral).
21. Nõuetekohaseks loetakse ainult need mikrotiiterplaadid, mis vastavad kõigile eespool nimetatud kriteeriumidele; sel juhul võib neid kasutada uuritavate kemikaalide esile kutsutud vastuste hindamiseks.
22. Nõuetekohasuse kriteeriume kohaldatakse nii eelneva sõelkatse kui ka tervikkatsete suhtes.

Tabel 1. Etalonaine, positiivse kontrollaine (PC) ja negatiivse kontrollaine (NC) kontsentratsioonid agonistliku toime uurimiseks CALUXiga biokatsemeetodiga

	Aine	CASi nr	Uuritav vahemik (M)
Etalonaine	17β-östradiool	50-28-2	$1,0 \times 10^{-13} - 1,0 \times 10^{-10}$
Positiivne kontrollaine (PC)	17α-metüültestosteroon	58-18-4	$3,0 - 10^{-06}$
Negatiivne kontrollaine (NC)	Kortikosteroon	50-22-6	$1,0 \times 10^{-08}$

Tabel 2. Etalonaine, positiivse kontrollaine (PC) ja negatiivse kontrollaine (NC) kontsentratsioonid antagonistliku toime uurimiseks CALUX biokatsemeetodiga

	Aine	CASi nr	Uuritav vahemik (M)

Etalonaine	Tamoksüfeen	10540-29-1	$3,0 \times 10^{-09} - 1,0 \times 10^{-05}$
Positiivne kontrollaine (PC)	4-hüdroksütamoksüfeen	68047-06-3	$1,0 \times 10^{-09}$
Negatiivne kontrollaine (NC)	Resveratrol	501-36-0	$1,0 \times 10^{-05}$

Tabel 3. Nõuetekohasuse kriteeriumid agonistliku toime uurimiseks ER α CALUX biokatsemeetodiga

A – üksikproove plaadil		Kriteerium
1	Kolmes süvendis paralleelproovide (negatiivne kontrollproov, positiivne kontrollproov, kõik uuritava kemikaali ja etalonaine lahjendused, välja	< 15 %
2	Kolmes süvendis paralleelproovide (etalonaine ja uuritava kemikaali lahusti kontrollproovid (C0, SC)) maksimaalne %SD	< 30 %
3	Maksimaalne LDH teke tsütotoksilisuse mõõduna.	< 120 %
B – ühe mikrotiiterplaadi ulatuses		
4	Etalonaine lahusti kontrollproovi (C0, plaat 1) ja uuritava kemikaali lahusti kontrollproovi (SC; plaadid 2–x) suhe	0,5 – 2,0
5	Plaadil 1 oleva etalonaine ligikaudse EC ₅₀ ja suurima kontsentratsiooni ning plaatidel 2–x olevate etalonaine ligikaudsete EC ₅₀ ja suurimate kontsentratsioonide (C4, C8) suhe	0,70 – 1,30
6	Iga plaadi z-tegur	> 0,6
C – ühe analüüsiseeria ulatuses (kõik ühe analüüsiseeria plaadid)		
7	Etalonaine sigmoidne kõver	Jah (17 β -östradiol)
8	Etalonaine 17 β -östradioli EC ₅₀ vahemik	$4 \times 10^{-12} - 4 \times 10^{-11}$ M
9	17 β -östradioli suurima kontsentratsiooni vähim kordne induksioon võrrelduna etalonaine lahusti kontrollprooviga.	5
10	Positiivse kontrollproovi suhteline induksioon (%)	> 30 %
11	Negatiivse kontrollproovi suhteline induksioon (%)	< 10 %

PC: positiivne kontrollproov; NC: negatiivne kontrollproov; SC: uuritava kemikaali lahusti kontrollproov; C0: etalonaine lahusti kontrollproov; SD: standardhälve; LDH: laktaadi dehüdrogenaas

Tabel 4. Nõuetekohasuse kriteeriumid antagonistliku toime uurimiseks ER α CALUX biokatsemeetodiga

A – üksikproove plaadil		Kriteerium
1	Kolmes süvendis paralleelproovide (negatiivne kontrollproov, positiivne kontrollproov, kõik uuritava kemikaali ja etalonaine lahjendused, lahusti kontrollproov C0) maksimaalne %SD	< 15 %
2	Kolmes süvendis paralleelproovide (kandaine kontrollproov (VC) ja etalonaine suurim kontsentratsioon (C8)) maksimaalne %SD	< 30 %
3	Maksimaalne LDH teke tsütotoksilisuse mõõduna.	< 120 %
B – ühe mikrotiiterplaadi ulatuses		
4	Etalonaine lahusti kontrollproovi (C0, plaat 1) ja uuritava kemikaali lahusti kontrollproovi (SC; plaadid 2–x) suhe	0,70 – 1,30
5	Plaadil 1 oleva etalonaine ligikaudse IC ₅₀ kontsentratsiooni ning plaatidel 2–x olevate etalonaine ligikaudsete IC ₅₀ kontsentratsioonide (C4) suhe	0,70 – 1,30
6	Plaadil 1 oleva etalonaine suurima kontsentratsiooni ning plaatidel 2–x olevate etalonaine suurimate kontsentratsioonide (C8) suhe	0,50 – 2,0
7	Iga plaadi z-tegur	> 0,6
C – ühe analüüsiseeria ulatuses (kõik ühe analüüsiseeria plaadid)		
8	Etalonaine sigmoidne kõver	Jah (tamoksifeen)
9	Etalonaine (tamoksifeen) IC ₅₀ vahemik	$1 \times 10^{-8} - 1 \times 10^{-7}$ M
10	Etalonaine lahusti kontrollproovi vähim kordne induktsioon võrrelduna tamoksifeeni suurima kontsentratsiooniga.	2,5
11	Positiivse kontrollproovi suhteline induktsioon (%)	< 70 %
12	Negatiivse kontrollproovi suhteline induktsioon (%)	< 85 %

PC: positiivne kontrollproov; NC: negatiivne kontrollproov; VC: kandaine kontrollproov (lahusti kontroll ilma agonisti etalonaine määratud kontsentratsioonita); SC: uuritava kemikaali lahusti kontrollproov; C0: etalonaine lahusti kontrollproov; SD: standardhälve; LDH: laktaadi dehüdrogenaas

Lahusti/kandeaine kontrollproov, etalonained, positiivsed kontrollproovid, negatiivsed kontrollproovid

23. Eelnevas sõelkatses ja tervikkatsetes kasutatakse sama lahusti/kandeaine kontrollproovi, samu etalonaineid, positiivseid ja negatiivsed kontrollproove. Lisaks peab etalonainete, positiivsete ja negatiivsete kontrollproovide kontsentratsioon olema sama.

Lahusti kontrollproov

24. Uuritava kemikaali lahustamiseks kasutatavat lahustit tuleb katseliselt kontrollida lahusti kontrollproovina. ER α CALUX biokatsemeetodi valideerimisel kasutati kandeainena dimetüülsulfoksiidi (DMSO, 1 % (mahuprotsent), CASi nr 67-68-5). Kui DMSO asemel kasutatakse muud lahustit, tuleb katsed kõigi etalonainete, kontrollproovide ja uuritavate kemikaalidega läbi viia samas kandeaines. Antagonistlike omaduste uurimise korral sisaldab lahusti kontrollproov kindlas kontsentratsioonis agonistlikku etalonainet 17 β -östradiooli (ligikaudne EC₅₀ kontsentratsioon). Antagonistlike omaduste uurimisel kasutatava lahusti kontrollimiseks valmistatakse kandeaine kontrollproov ja analüüsitakse seda.

Kandeaine kontrollproov (antagonism)

25. Antagonistlike omaduste uurimiseks lisatakse katsesöötmesse kindlas kontsentratsioonis agonistlikku etalonainet 17 β -östradiooli (ligikaudne EC₅₀ kontsentratsioon). Antagonistlike omaduste suhtes uuritavate kemikaalide lahustamiseks kasutatava lahusti katseliseks kontrollimiseks valmistatakse katsesööde ilma kindlas kontsentratsioonis lisatud agonistliku etalonaineta (17 β -östradiool). Seda kontrollproovi nimetatakse kandeaine kontrollprooviks. ER α CALUX biokatsemeetodi valideerimisel kasutati kandeainena dimetüülsulfoksiidi (DMSO, 1 % (mahuprotsent), CASi nr 67-68-5). Kui DMSO asemel kasutatakse muud lahustit, tuleb katsed kõigi etalonainete, kontrollproovide ja uuritavate kemikaalidega läbi viia samas kandeaines.

Etalonained

26. Agonistlik etalonaine on 17 β -östradiool (tabel 1). Etalonaineteks on 17 β -östradiooli lahjenduste seeria, mis hõlmab kaheksat kontsentratsiooni ($1,0 \times 10^{-13}$, $3,0 \times 10^{-13}$, $1,0 \times 10^{-12}$, $3,0 \times 10^{-12}$, $6,0 \times 10^{-12}$, $1,0 \times 10^{-11}$, $3,0 \times 10^{-11}$, $1,0 \times 10^{-10}$ M).
27. Antagonistlik etalonaine on tamoksüfeen (tabel 2). Etalonaineteks on tamoksüfeeni lahjenduste seeria, mis hõlmab kaheksat kontsentratsiooni ($3,0 \times 10^{-9}$, $1,0 \times 10^{-8}$, $3,0 \times 10^{-8}$, $1,0 \times 10^{-7}$, $3,0 \times 10^{-7}$, $1,0 \times 10^{-6}$, $3,0 \times 10^{-6}$, $1,0 \times 10^{-5}$ M). Antagonistliku etalonaine kõigis kontsentratsioonides lahjendusi inkubeeritakse koos kindlas kontsentratsioonis lisatud agonistliku etalonainega (17 β -östradiool, $3,0 \times 10^{-12}$ M)

Positiivne kontrollproov

28. Agonistlike omaduste uurimise korral on positiivseks kontrollaineiks 17 α -metüültestosteroon (tabel 1).

29. Antagonistlike omaduste uurimise korral on positiivseks kontrollaineiks 4-hüdroksütamoksüfeen (tabel 2). Antagonistlikku positiivset kontrollproovi inkubeeritakse koos kindlas kontsentratsioonis lisatud agonistliku etalonainega (17β -östradiool, $3,0 \times 10^{-12}$ M)

Negatiivne kontrollproov

30. Agonistlike omaduste uurimise korral on negatiivseks kontrollaineiks kortikosteroon (tabel 1).
31. Antagonistlike omaduste uurimise korral on negatiivseks kontrollaineiks resveratrool (tabel 2). Antagonistlikku negatiivset kontrollproovi inkubeeritakse koos kindlas kontsentratsioonis lisatud agonistliku etalonainega (17β -östradiool, $3,0 \times 10^{-12}$ M)

Labori pädevuse tõendamine (vt käesoleva katsemeetodi jaotise „ER TA katsemeetodi osad“ punkti 14 ning tabelleid 3 ja 4).

Kandeaine

32. Uuritava kemikaali lahustamiseks kasutatav lahusti peab uuritava kemikaali täielikult lahustama ja segunema rakkude kasvusöötmega. Sobivad kandeained on DMSO, vesi ja etanool (puhtusega 95–100 %). Kui lahustina kasutatakse DMSOd, ei tohi DMSO maksimaalne kontsentratsioon inkubeerimise ajal ületada 1 mahuprotsenti. Enne kasutamist tuleb katseliselt kontrollides veenduda, et lahusti ei ole tsütotoksiline ega häiri katsemeetodi toimivust.

Etalonainete, positiivsete ja negatiivsete kontrollproovide ning uuritavate kemikaalide ettevalmistamine

33. Etalonained, positiivsed ja negatiivsed kontrollained ning uuritavad kemikaalid lahustatakse 100 % DMSOs (või sobivas lahustis). Seejärel valmistatakse samas lahustis asjakohased lahjendused (seeriana). Enne lahustamist lastakse kõigil ainetel saavutada toatemperatuur. Etalonainete, positiivsete ja negatiivsete kontrollainete ning uuritava kemikaalide värskest valmistatud põhilahustes ei tohi olla nähtavat sadet ega hägu. Etalonaine ja kontrollainetega võib valmistada suurema koguse põhilahust. Uuritavate kemikaalide põhilahused valmistatakse värskest enne igat katset. Etalonainete, positiivsete ja negatiivsete kontrollainete ja uuritavate kemikaalide lõplikud lahjendused tuleb valmistada värskest enne igat katset ning kasutada 24 tunni jooksul valmistamisest alates.

Lahustuvus, tsütotoksilisus ja vahemiku leidmine

34. Eelneva sõelkatsega määratakse uuritava kemikaali lahustuvus valitud lahustis. Valmistatakse põhilahus maksimaalse kontsentratsiooniga 0,1 M. Kui selle kontsentratsiooni juures tekib probleeme lahustuvusega, valmistatakse lahjemaid põhilahuseid, kuni uuritavad kemikaalid täielikult lahustuvad. Eelneva sõelkatse käigus analüüsitakse uuritava kemikaali lahjenduste seeriat, mis valmistatakse vahekorras 1 : 10. Maksimaalne analüüsiv

kontsentratsioon agonistlike ja antagonistlike omaduste uurimisel on 1 mM. Pärast eelnevat sõelkatset tuletatakse täpsem sobivate kontsentratsioonide vahemik, mida tervikkatsete käigus analüüsida. Tervikkatsetes kasutatavad lahjendused peaksid olema 1-, 3-, 10-, 30-, 100-, 300-, 1000- ja 3000-kordsed.

35. Agonisti- ja antagonistikatse eeskirjad (11) hõlmavad tsütotoksilisuse uurimist.

Tsütotoksilisuse katseline kontrollimine on ka eelneva sõelkatse ja tervikkatsete osa. ER α CALUXi biokatsemeetodi valideerimisel tsütotoksilisuse hindamiseks kasutatud meetod oli laktaadi dehüdrogenaasi (LDH) eraldumise katse koos rakkude kvalitatiivse visuaalse kontrolliga (vt liide 4.1) pärast uuritava kemikaaliga töötlemist. Tsütotoksilisuse määramiseks võib kasutada ka muid kvantitatiivseid meetodeid (nt kolorimeetriline (MTT) meetod tetrasooliumiga, või CALUXi tsütotoksilisuse biokatse). Üldiselt loetakse tsütotoksiliseks uuritava kemikaali kontsentratsioon, mille juures rakkude eluvõimelisus väheneb rohkem kui 20 % ning mida seetõttu ei saa andmete hindamisel kasutada. LDH eraldumise katse korral loetakse uuritava kemikaali kontsentratsioon tsütotoksiliseks, kui LDH eraldumine on üle 120 %.

Uuritava kemikaaliga kokkupuude ja analüüsiplaadi jaotus

36. Pärast kolvitaie konfluentse rakukultuuri trüpsineerimist suspendeeritakse rakud uuesti kontsentratsiooniga 1×10^5 rakku/ml östrogeenivabas katsesöötmes. 100 μ l uuesti suspendeeritud rakke külatakse 96 süvendiga mikrotiiterplaadi seesmistesse süvenditesse. Välimised süvendid täidetakse 200 μ l fosfaadiga puhverdatud füsioloogilise lahusega (PBS) (vt joonised 1 ja 2). Plaadile külutatud rakke inkubeeritakse 24 tundi CO₂-inkubaatoris (5 % CO₂, 37 °C, õhuniiskus 100 %).

37. Pärast inkubeerimist kontrollitakse plaate visuaalselt tsütotoksilisuse (vt liide 4.1), saastumise ja konfluentsuse suhtes. Katse läbiviimiseks kasutatakse ainult neid plaate, millel ei ole märke tsütotoksilisusest ega saastumisest ja mille konfluentsus on vähemalt 85 %. Seesmistest süvenditest eemaldatakse hoolikalt sööde ning asendatakse see 200 μ l östrogeenivaba katsesöötmega, mis sisaldab asjakohases seeriana saadud lahjendusastmes etalonaineid, uuritavaid kemikaale, positiivseid ja negatiivseid kontrollaineid ning lahusti kontrollproovi (tabel 5: agonistlike omaduste uuring; tabel 6: antagonistlike omaduste uuring). Kõiki etalonaineid, uuritavaid kemikaale, positiivseid ja negatiivseid kontrollproove ning lahusti kontrollproove analüüsitakse kolme paralleelproovina. Joonisel 1 on esitatud plaadi paigutus agonistikatse korral. Joonisel 2 on esitatud plaadi paigutus antagonistikatse korral. Eelneva sõelkatse ja tervikkatsete korral on plaadi paigutus samasugune. Antagonistikatse korral sisaldavad kõik seesmised süvendid peale kandaine kontrollproovidega süvendite (VC) ka kindlas kontsentratsioonis agonistlikku etalonainet 17 β -östradiooli ($3,0 \times 10^{-12}$ M). Etalonained C8 ja C4 tuleb lisada igale uuritava kemikaali proove sisaldavale plaadile.

38. Pärast rakkude töötlemist kõigi kemikaalidega inkubeeritakse 96 süvendiga mikrotiiterplaati veel 24 tundi CO₂-inkubaatoris (5 % CO₂, 37 °C, õhuniiskus 100 %).

Joonis 1. Proovide paigutus 96 süvendiga mikrotiiterplaadil eelneva sõelkatse ja agonistliku toime hindamise korral.

Plaat 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
E		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
F		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
G		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
H												

Ülejäänud plaadid

	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 (EC50)	
F		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
G		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
H												

C0 = etalonaine lahusti.

C(1–8) = etalonaine lahjenduste seeria (1–8, vähimast kontsentratsioonist suurimani).

PC = positiivne kontrollproov.

NC = negatiivne kontrollproov.

TCx-(1–8) = uuritava kemikaali lahjendused (1–8, vähimast kontsentratsioonist suurimani) eelnevaks sõelkatseks ja uuritava kemikaali x agonistliku toime hindamiseks.

SC = uuritava kemikaali lahusti kontrollproov (optimaalne on sama lahusti, mis proovis C0, kuid see võib olla teisest põhilahusest).

Hallid väljad = välimised süvendid, mis täidetakse 200 µl PBSiga.

Joonis 2. Proovide paigutus 96 süvendiga mikrotiiterplaadil antagonistliku toime uuringule eelneva sõelkatse ja antagonistliku toime hindamise korral.

Plaat 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
E		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
F		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
G		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
H												

Ülejäänud plaadid

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
F		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
G		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
H												

C0 = etalonaine lahusti.

C(1–8) = etalonaine lahjenduste seeria (1–8, vähimast kontsentratsioonist suurimani).

NC = negatiivne kontrollproov.

PC = positiivne kontrollproov.

TCx-(1–8) = uuritava kemikaali lahjendused (1–8, vähimast kontsentratsioonist suurimani) eelnevaks sõelkatseks ja uuritava kemikaali x agonistliku toime hindamiseks.

SC = uuritava kemikaali lahusti kontrollproov (optimaalne on sama lahusti, mis proovis C0, kuid see võib olla teisest põhilahusest).

VC = kandeaine kontrollproov (lahusti kontroll ilma agonisti etalonaine 17β-östradiooli määratud kontsentratsioonita).

Hallid väljad = välimised süvendid, mis täidetakse 200 µl PBSiga.

Märkus: kõik seismised süvendid peale kandeaine kontrollproovidega süvendite (VC) sisaldavad ka kindlas kontsentratsioonis agonistlikku etalonainet 17β-östradiooli ($3,0 \times 10^{-12}$ M).

Luminesentsi mõõtmine

39. Luminesentsi mõõtmist on üksikasjalikult kirjeldatud agonisti- ja antagonistikatse eeskirjades (10). Süvenditest eemaldatakse sööde ja rakud lüüsitakse, millele järgneb 24 tundi inkubeerimist, et rakumembraan avaneks ja lutsiferaasi aktiivsust oleks võimalik mõõta.

40. Luminesentsi mõõtmiseks on vaja kahe injektoriga luminomeetrit. Lutsiferaasi reaktsioon käivitatakse substraadi lutsiferiini süstimisega. Reaktsioon peatatakse 0,2 M NaOH lisamisega. Reaktsiooni peatatakse, et vältida luminesentsi ülekandumist ühest süvendist teise.

41. Igast süvendist eraldunud valgus väljendatakse suhtelistes valgusühikutes (RLU) süvendi kohta.

Eelnev sõelkatse

42. Eelnevas sõelkatses saadud analüüsitulemusi kasutatakse uuritavate kemikaalide täpsema kontsentratsioonivahemiku määramiseks tervikkatsete jaoks. Eelnevas sõelkatses saadud analüüsitulemuste hindamist ja uuritavate kemikaalide täpsema kontsentratsioonivahemiku

määramist tervikkatsete jaoks on süvitsi kirjeldatud agonisti- ja antagonistikatse eeskirjades (10). Siin on esitatud lühikokkuvõtte eeskirjadest, mida järgides määratakse uuritavate kemikaalide kontsentratsioonivahemik agonisti- ja antagonistikatse jaoks. Lahjendusteseeria ülesehituse juhised on esitatud tabelites 5 ja 6.

Kontsentratsioonide valimine agonistliku toime hindamiseks

43. Eelnevas sõelkatses analüüsitakse uuritavaid kemikaale, kasutades tabelites 5 (agonism) ja 6 (antagonism) esitatud lahjendusteseeriaid. Kõiki kontsentratsioone analüüsitakse paralleelproovidena kolmes süvendis vastavalt joonisel 1 (agonism) või 2 (antagonism) esitatud proovide paigutusele plaadil.
44. Nõuetekohaseks loetakse ainult need analüüsitulemused, mis vastavad nõuetekohasuse kriteeriumidele (tabel 3); sel juhul võib neid kasutada uuritavate kemikaalide esile kutsutud vastuste hindamiseks. Kui üks või mitu mikrotiiterplaati analüüsiseerias ei vasta nõuetekohasuse kriteeriumidele, tuleb vastavaid mikrotiiterplaate uuesti analüüsida. Kui nõuetekohasuse kriteeriumidele ei vasta esimene plaat, mis sisaldab etalonaine lahjenduste täielikku seeriat, tuleb uuesti analüüsida kogu katseseeria (6 plaati).
45. Uuritavate kemikaalide kontsentratsioonide vahemikku tuleb kohandada ja eelnevat sõelkatset korrata, kui:
 - ilmneb tsütotoksilisus. Eelnevalt sõelkatset tuleb korrata uuritava kemikaali väiksema kontsentratsiooniga, mis ei ole tsütotoksiline;
 - uuritava kemikaali eelnevas sõelkatses ei saa täielikku doosi-vastuse kõverat, sest uuritavad kontsentratsioonid annavad maksimaalse induktsiooni. Eelnevalt sõelkatset tuleb korrata uuritava kemikaali väiksema kontsentratsiooniga.
46. Kui leitakse nõuetekohane doosi-vastuse seos, tuleb valida (vähim) kontsentratsioon, mille juures saadakse maksimaalne induktsioon ega esine tsütotoksilisust. Tervikkatsetes analüüsitav uuritava kemikaali suurim kontsentratsioon peaks olema kõnealusest valitud kontsentratsioonist 3 korda suurem.
47. Uuritava kemikaali täielik täpsem lahjenduste seeria valmistatakse tabelis 5 esitatud lahjendusetappide kohaselt, alustatud eespool määratud suurimast kontsentratsioonist.
48. Uuritavat kemikaali, mille puhul ei ilmne mingit agonistlikku toimet, tuleks tervikkatsetes analüüsida, alustades eelnevas sõelkatses määratud suurima kontsentratsiooniga, mis ei ole tsütotoksiline.

Kontsentratsioonide valimine antagonistliku toime hindamiseks

49. Nõuetekohaseks loetakse ainult need analüüsitulemused, mis vastavad nõuetekohasuse kriteeriumidele (tabel 4); sel juhul võib neid kasutada uuritavate kemikaalide esile kutsutud

vastuste hindamiseks. Kui üks või mitu mikrotiiterplaati analüüsiseerias ei vasta nõuetekohasuse kriteeriumidele, tuleb vastavaid mikrotiiterplaate uuesti analüüsida. Kui nõuetekohasuse kriteeriumidele ei vasta esimene plaat, mis sisaldab etalonaine lahjenduste täielikku seeriat, tuleb uuesti analüüsida kogu katseseeria (6 plaati).

50. Uuritavate kemikaalide kontsentratsioonide vahemikku tuleb kohandada ja eelnevat sõelkatset korrata, kui:

- ilmneb tsütotoksilisus. Eelnevalt sõelkatset tuleb korrata uuritava kemikaali väiksema kontsentratsiooniga, mis ei ole tsütotoksiline;
- uuritava kemikaali eelnevas sõelkatses ei saa täielikku doosi-vastuse kõverat, sest uuritavad kontsentratsioonid annavad maksimaalse inhibitsiooni. Eelnevalt sõelkatset tuleb korrata uuritava kemikaali väiksema kontsentratsiooniga.

51. Kui leitakse nõuetekohane doosi-vastuse seos, tuleb valida (vähim) kontsentratsioon, mille juures saadakse maksimaalne inhibitsioon ega esine tsütotoksilisust. Tervikkatsetes analüüsitav uuritava kemikaali suurim kontsentratsioon peaks olema kõnealusest valitud kontsentratsioonist 3 korda suurem.

52. Uuritava kemikaali täielik täpsem lahjenduste seeria valmistatakse tabelis 6 esitatud lahjendusetappide kohaselt, alustatud eespool määratud suurimast kontsentratsioonist.

53. Uuritavat kemikaali, mille puhul ei ilmne mingit antagonistlikku toimet, tuleks tervikkatsetes analüüsida, alustades eelnevas sõelkatses uuritud suurima kontsentratsiooniga, mis ei ole tsütotoksiline.

Tervikkatsed

54. Pärast täpsema kontsentratsioonivahemiku valimist analüüsitakse uuritavaid kemikaale tervikkatsetes, kasutades tabelites 5 (agonism) ja 6 (antagonism) esitatud lahjendusteseeriaid. Kõiki kontsentratsioone analüüsitakse paralleelproovidena kolmes süvendis vastavalt joonisel 1 (agonism) või 2 (antagonism) esitatud proovide paigutusele plaadil.

55. Nõuetekohaseks loetakse ainult need analüüsitulemused, mis vastavad nõuetekohasuse kriteeriumidele (tabelid 3 ja 4); sel juhul võib neid kasutada uuritavate kemikaalide esile kutsutud vastuste hindamiseks. Kui üks või mitu mikrotiiterplaati analüüsiseerias ei vasta nõuetekohasuse kriteeriumidele, tuleb vastavaid mikrotiiterplaate uuesti analüüsida. Kui nõuetekohasuse kriteeriumidele ei vasta esimene plaat, mis sisaldab etalonaine lahjenduste täielikku seeriat, tuleb uuesti analüüsida kogu katseseeria (6 plaati).

Tabel 5. Etalonainete, kontrollainete ja uuritavate kemikaalide kontsentratsioonid ja lahjendused agonistikatse jaoks

Etalonaine 17β- östradiool	TCx – eelkatse	TCx – tervikkatse	Kontrollproovide

knts. (M)		lahjendus		lahjendus		knts. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 ×	TCx-1	3 000 ×	PC	$3,0 \times 10^{-06}$
C1	$1,0 \times 10^{-13}$	TCx-2	1 000 000 ×	TCx-2	1 000 ×	NC	$1,0 \times 10^{-08}$
C2	$3,0 \times 10^{-13}$	TCx-3	100 000 ×	TCx-3	300 ×	C0	0
C3	$1,0 \times 10^{-12}$	TCx-4	10 000 ×	TCx-4	100 ×	SC	0
C4	$3,0 \times 10^{-12}$	TCx-5	1 000 ×	TCx-5	30 ×		
C5	$6,0 \times 10^{-12}$	TCx-6	100 ×	TCx-6	10 ×		
C6	$1,0 \times 10^{-11}$	TCx-7	10 ×	TCx-7	3 ×		
C7	$3,0 \times 10^{-11}$	TCx-8	1 ×	TCx-8	1 ×		
C8	$1,0 \times 10^{-10}$						

TCx – uuritav kemikaal x

PC – positiivne kontrollproov (17α-metüültestosteroon)

NC – negatiivne kontrollproov (kortikosteroon)

C0 – etalonaine lahusti kontrollproov

SC – uuritava kemikaali lahusti kontrollproov

Tabel 6. Etalonainete, kontrollainete ja uuritavate kemikaalide kontsentratsioonid ja lahjendused antagonistikatse jaoks

Etalonaine tamoksüfeen knts. (M)		TCx – eelkatse lahjendus		TCx – tervikkatse lahjendus		Kontrollproovide knts. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 ×	TCx-1	3 000 ×	PC	$1,0 \times 10^{-09}$
C1	$3,0 \times 10^{-09}$	TCx-2	1 000 000 ×	TCx-2	1 000 ×	NC	$1,0 \times 10^{-05}$
C2	$1,0 \times 10^{-08}$	TCx-3	100 000 ×	TCx-3	300 ×	C0	0
C3	$3,0 \times 10^{-08}$	TCx-4	10 000 ×	TCx-4	100 ×	SC	0
C4	$1,0 \times 10^{-07}$	TCx-5	1 000 ×	TCx-5	30 ×		
C5	$3,0 \times 10^{-07}$	TCx-6	100 ×	TCx-6	10 ×		
C6	$1,0 \times 10^{-06}$	TCx-7	10 ×	TCx-7	3 ×		
C7	$3,0 \times 10^{-06}$					Lisatud agonisti knts. (M)	
C8	$1,0 \times 10^{-05}$	TCx-8	1 ×	TCx-8	1 ×	17β- östradiool	$3,0 \times 10^{-12}$

TCx – uuritav kemikaal x

PC – positiivne kontrollproov (4-hüdroksütamoksüfeen)

NC – negatiivne kontrollproov (resveratrool)

C0 – etalonaine lahusti kontrollproov

SC – uuritava kemikaali lahusti kontrollproov

VC – kandeaine kontrollproov (ei sisalda kindlas kontsentratsioonis lisatud agonistlikku etalonainet (17β-östradiool, $3,0 \times 10^{-12}$ M))

Andmete kogumine ja analüüs

56. Pärast eelnevat sõelkatset ja tervikkatseid määratakse agonistikatse korral uuritava kemikaali EC₁₀, EC₅₀, PC₁₀, PC₅₀ ning maksimaalset induktsiooni esile kutsuv kontsentratsioon (TC_{xmax}). Antagonistikatse korral arvutatakse IC₂₀, IC₅₀, PC₈₀, PC₅₀ ja minimaalset induktsiooni esile kutsuv kontsentratsioon (TC_{xmin}). Joonistel 3 (agonism) ja 4 (antagonism) on need parameetrid graafiliselt esitatud. Nõutavad parameetrid arvutatakse iga uuritava kemikaali suhtelise induktsiooni (võrreldes etalonaine maksimaalse induktsiooniga (=

100 %)) järgi. Andmete hindamiseks kasutatakse mittelineaarset regressiooni (muutuv tõus, 4 parameetrit) vastavalt järgmisele võrrandile:

$$Y = alumine + \frac{(\ddot{u}lemine - alumine)}{(1 + 10^{((lgEC_{50} - X) * Hilli\ t\ddot{o}us)})}$$

kus:

X = doosi või kontsentratsiooni logaritm

Y = vastus (suhteline induksioon (%))

Ülemine (plato) = maksimaalne induksioon (%)

Alumine (plato) = minimaalne induksioon (%)

LogEC₅₀ = logaritm kontsentratsioonist, mille juures täheldati 50 % maksimaalsest vastusest

HillSlope = Hilli tõus (Hilli koefitsient)

57. Luminomeetrist saadud töötlemata andmed tuleb kanda eelneva sõelkatse ja tervikkatsete jaoks välja töötatud arvutustabelisse. Töötlemata andmed peavad vastama nõuetekohasuse kriteeriumidele, mis on esitatud tabelites 3A ja 3B (antagonism) või 4A ja 4B (antagonism). Kui töötlemata andmed vastavad nõuetekohasuse kriteeriumidele, määratakse nõutavad parameetrid järgmisi arvutusetappi järgides.

Agonism

- Lahutada etalonaine lahusti kontrollproovi keskmine RLU väärtus etalonainete töötlemata analüüsitulemusest.
- Lahutada uuritava kemikaali lahusti kontrollproovi keskmine RLU väärtus uuritava kemikaali proovide töötlemata analüüsitulemusest.
- Arvutada etalonaine iga kontsentratsiooni jaoks suhteline induksioon. Võtta 100 % induksiooniks etalonaine suurima kontsentratsiooniga saadud induksioon.
- Arvutada uuritava kemikaali iga kontsentratsiooniga seotud suhteline induksioon võrreldes etalonaine suurima kontsentratsiooniga saadud induksiooniga (100 %).
- Hinnata analüüsitulemust mittelineaarse regressiooni (muutuv tõus, 4 parameetrit) alusel.
- Leida etalonaine EC₅₀ ja EC₁₀.
- Leida uuritavate kemikaalide EC₅₀ ja EC₁₀.
- Leida uuritava kemikaali maksimaalne suhteline induksioon (TC_{max}).
- Leida uuritavate kemikaalide PC₁₀ ja PC₅₀.

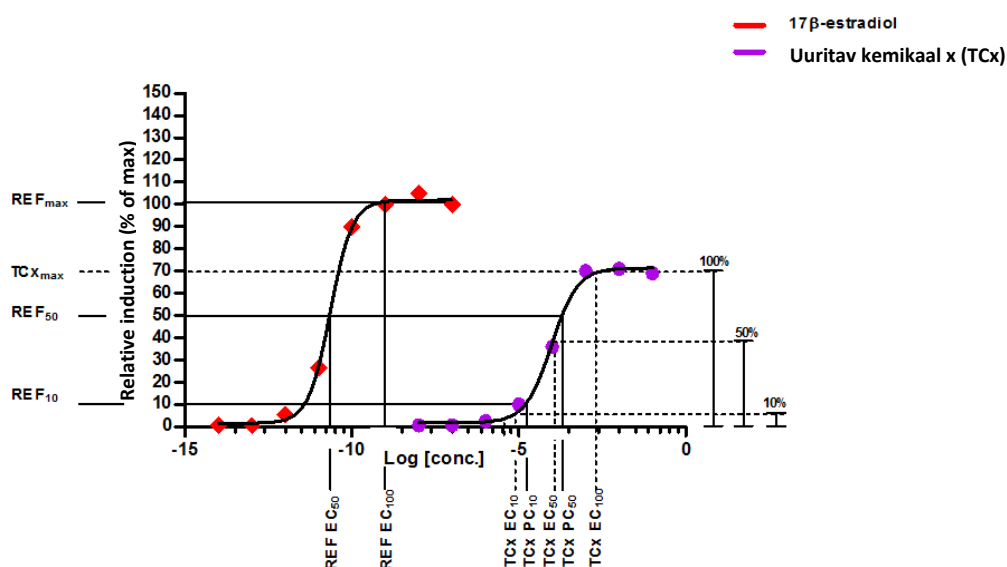
Uuritavate kemikaalide puhul ei ole näiteks tsütotoksilisuse või lahustuvusprobleemide tõttu võimalik alati täielikku doosi-vastuse kõverat leida. Sel juhul ei saa EC₅₀, EC₁₀ ja PC₅₀ leida.

Siis saab leida üksnes PC_{10} ja TC_{max} .

Antagonism

- Lahutada etalonaine suurima kontsentratsiooniga saadud keskmine RLU väärtus etalonainete töötlemata analüüsitulemusest.
- Lahutada etalonaine suurima kontsentratsiooniga saadud keskmine RLU väärtus uuritavate kemikaalide töötlemata analüüsitulemusest.
- Arvutada etalonaine iga kontsentratsiooni jaoks suhteline induksioon. Võtta 100 % induksiooniks etalonaine vähima kontsentratsiooniga saadud induksioon.
- Arvutada uuritava kemikaali iga kontsentratsiooniga seotud suhteline induksioon võrreldes etalonaine vähima kontsentratsiooniga saadud induksiooniga (100 %).
- Hinnata analüüsitulemust mittelineaarse regressiooni (varieeruv tõus, 4 parameetrit) alusel.
- Leida etalonaine IC_{50} ja IC_{20} .
- Leida uuritavate kemikaalide IC_{50} ja IC_{20} .
- Leida uuritava kemikaali minimaalne suhteline induksioon (TC_{min}).
- Leida uuritavate kemikaalide PC_{80} ja PC_{50} .

Joonis 3. Agonistikatsega leitud parameetrite ülevaade

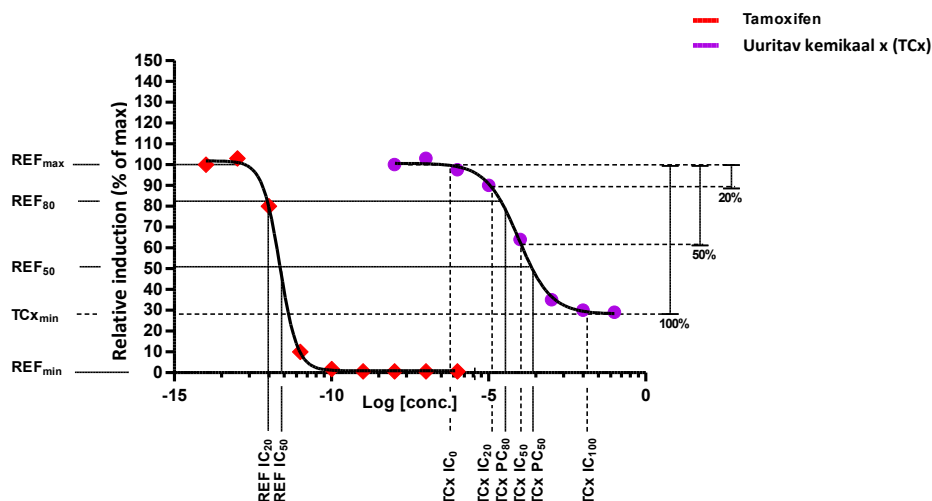


EC_{10} = aine kontsentratsioon, mille juures täheldati 10 % selle maksimaalsest vastusest.
 EC_{50} = aine kontsentratsioon, mille juures täheldati 50 % selle maksimaalsest vastusest.
 PC_{10} = uuritava kemikaali kontsentratsioon, mille juures vastus on võrdne etalonaine EC_{10} väärtusega.

PC_{50} = uuritava kemikaali kontsentratsioon, mille juures vastus on võrdne etalonaine EC_{50} väärtusega.

TCx_{max} = uuritava kemikaali maksimaalne suhteline induktsioon.

Joonis 4. Antagonistikatsega leitud parameetrite ülevaade



IC_{20} = aine kontsentratsioon, mille juures täheldati 80 % selle maksimaalsest vastusest (20 % inhibeerimine).

IC_{50} = aine kontsentratsioon, mille juures täheldati 50 % selle maksimaalsest vastusest (50 % inhibeerimine).

PC_{80} = uuritava kemikaali kontsentratsioon, mille juures vastus on võrdne etalonaine IC_{20} väärtusega.

PC_{50} = uuritava kemikaali kontsentratsioon, mille juures vastus on võrdne etalonaine IC_{50} väärtusega.

TCx_{min} = uuritava kemikaali minimaalne suhteline induktsioon.

Uuritavate kemikaalide puhul ei ole näiteks tsütotoksilisuse või lahustuvusprobleemide tõttu võimalik alati täielikku doosi-vastuse kõverat leida. Sel juhul ei saa IC_{50} , IC_{20} ja PC_{50} leida. Siis saab leida üksnes PC_{20} ja TC_{min} .

58. Tulemused peavad põhinema kahel (või kolmel) sõltumatul katsel. Kui kaks katset annavad võrreldavad ja seega korratavad tulemused, ei ole kolmandat katset vaja teha. Selleks, et olla vastuvõetavad, peavad tulemused:

- vastama nõuetekohasuse kriteeriumidele (vt nõuetekohasuse kriteeriumid punktides 14-22),
- olema korratavad.

Andmete tõlgendamise kriteeriumid

59. Andmete tõlgendamiseks ja otsustamiseks, kas uuritav kemikaal lugeda positiivseks või negatiivseks, kasutatakse järgmisi kriteeriume.

Agonism

Iga tervikkatse korral loetakse uuritav kemikaal **positiivseks**, kui:

1. TC_{max} on suurem kui 10 % etalonainega (REF_{10}) saadud maksimaalsest vastusest või sellega võrdne.
2. Vähemalt kaks uuritava kemikaali kontsentratsiooniga saadud tulemust on suuremad kui REF_{10} või sellega võrdsed.

Iga tervikkatse korral loetakse uuritav kemikaal **negatiivseks**, kui:

1. TC_{max} ei ületa 10 % etalonainega (REF_{10}) saadud maksimaalsest vastusest.
2. Vähem kui kahe uuritava kemikaali kontsentratsiooniga saadud tulemused on suuremad kui REF_{10} või sellega võrdsed.

Antagonism

Iga tervikkatse korral loetakse uuritav kemikaal **positiivseks**, kui:

1. TC_{min} on väiksem kui 80 % etalonainega ($REF_{80} = 20$ % inhibeerimine) saadud maksimaalsest vastusest või sellega võrdne.
2. Vähemalt kaks uuritava kemikaali kontsentratsiooniga saadud tulemust on väiksemad kui REF_{80} või sellega võrdsed.

Iga tervikkatse korral loetakse uuritav kemikaal **negatiivseks**, kui:

1. TC_{min} on suurem kui 80 % etalonainega ($REF_{80} = 20$ % inhibeerimine) saadud maksimaalsest vastusest.
2. Vähem kui kahe uuritava kemikaali kontsentratsiooniga saadud tulemused on väiksemad kui REF_{80} või sellega võrdsed.

60. Selleks, et iseloomustada uuritava kemikaali võimet kutsuda esile positiivset vastust, tuleb katseprotokolli kanda toime suurusjärk (agonism: TC_{max} ; antagonism: TC_{min}) ning kontsentratsioon, mille juures toime avaldub (agonism: EC_{10} , EC_{50} , PC_{10} , PC_{50} ; antagonism: IC_{20} , IC_{50} , PC_{80} , PC_{50}).

KATSEPROTOKOLL

61. Vt punkti 20 jaotises „ER TA katsemeetodi osad“.

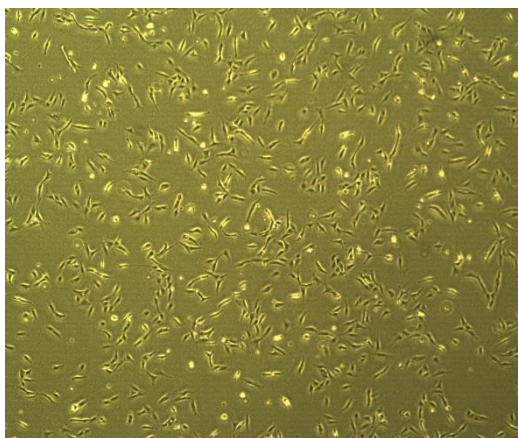
KIRJANDUS

- (1) OECD (2016), „Draft Validation report of the (anti-) ER α CALUX bioassay - transactivation bioassay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential“, Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 240), Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (2) 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.*, nr 83(1), lk 136–148.
- (3) Quaedackers, M. E., van den Brink, C. E., Wissink, S., Schreurs, R. H. M. M., Gustafsson, J. A., van der Saag, P. T. ja 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*, nr 142(3), lk 1156–1166.
- (4) Thorne, N., Inglese, J. ja Auld, D. S. (2010), „Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology“, *Chemistry and Biology*, nr 17(6), lk 646–57.
- (5) Escande, A., Pillon, A., Servant, N., Cravedi, J. P., Larrea, F., Muhn, P., Nicolas, J. C., Cavaillès, V. ja Balaguer, P. (2006), „Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta“, *Biochem. Pharmacol.*, nr 71, lk 1459–1469.
- (6) Kuiper, G. G., Lemmen, J. G., Carlsson, B., Corton, J. C., Safe, S. H., van der Saag, P. T., van der Burg, B. ja Gustafsson, J. A. (1998), „Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta“, *Endocrinol.*, nr 139, lk 4252–4263.
- (7) 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.*, nr 122, lk 204–211.
- (8) Sonneveld, E., Riteco, J. A. C., Jansen, H. J., Pieterse, B., Brouwer, A., Schoonen, W. G. ja van der Burg, B. (2006), „Comparison of *in vitro* and *in vivo* screening models for androgenic and estrogenic activities“, *Toxicol. Sci.*, nr 89(1), lk 173–187.
- (9) Kobayashi, H., Yamamoto, K., Eguchi, M., Kubo, M., Nakagami, S., Wakisaka, S., Kaizuka, M. ja Ishii, H. (1995), „Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures by enzymatic detection of

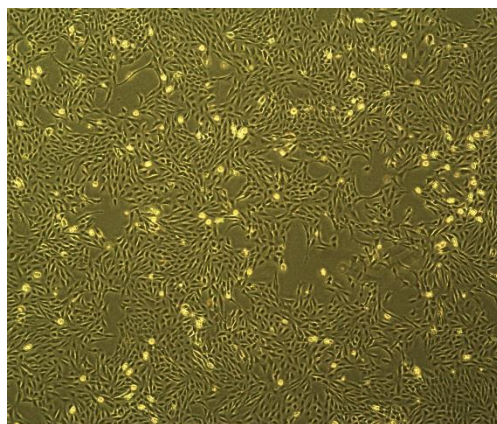
polymerase chain reaction (PCR) products“, *J. Vet. Med. Sci.*, nr 57(4), lk 769–771.

- (10) Zhang, J.-H., Chung, T. D. Y. ja Oldenburg, K. R. (1999), „A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays“, *J. Biomol. Scr.*, nr 4, lk 67–73.
- (11) Besselink, H., Middelhof, I. ja Felzel, E. (2014), „Transactivation assay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential using ER α CALUX cells“. BioDetection Systems BV (BDS), Amsterdam, Madalmaad.

Liide 4.1. Rakkude eluvõimelisuse visuaalne kontroll

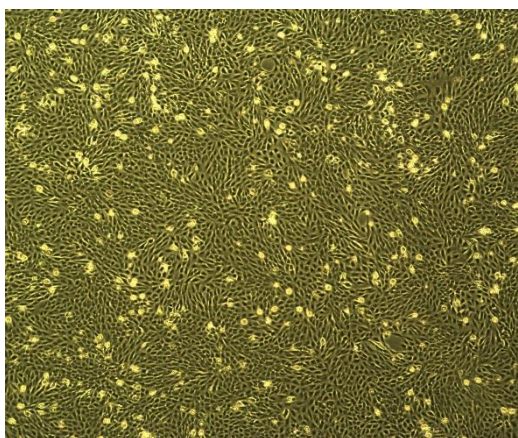


Konfluentsus < 5 %. Rakud on äsja külvatud.
Rakkude eluvõimelisus 100 %.
Klassifikatsioon: tsütotoksilisus puudub.



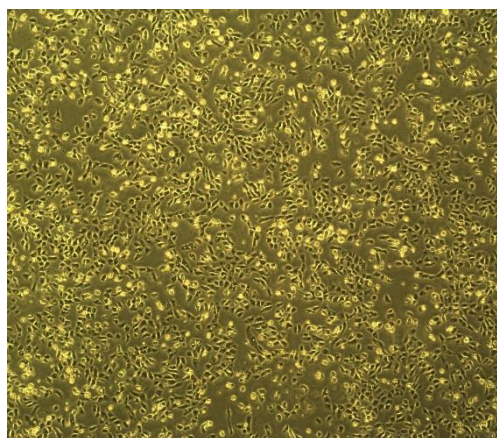
Konfluentsus > 85 %. Selles etapis töödeldakse
rakke uuritavate kemikaalidega. Rakkude
eluvõimelisus > 95 %.

Klassifikatsioon: tsütotoksilisus puudub.

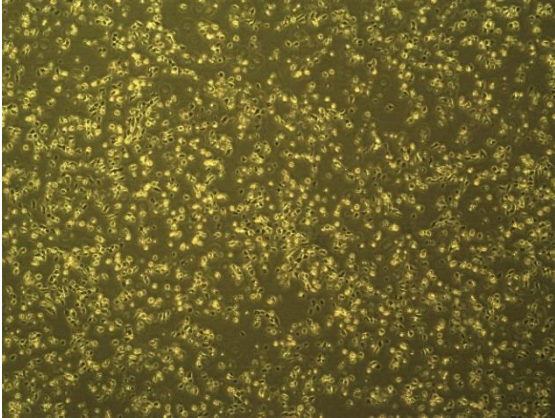


Konfluentsus > 95 %. Rakud on tihedalt koos ja
hakkavad suurenema. Rakkude eluvõimelisus
> 95 %.

Klassifikatsioon: tsütotoksilisus puudub.



Rakkude eluvõimelisus < 25 %. Rakud
eemalduvad üksteisest ja kontakt nende vahel
väheneb. Rakud on ümardunud. Klassifikatsioon:
tsütotoksilisus.



Rakkude eluvõimelisus < 5 %. Rakud on üksteisest täielikult eemaldunud ja kontakt nende vahel on kadunud. Rakud on ümardunud.
Klassifikatsioon: tsütotoksilisus.

B.67. TÜMIDIINI KINAASI GEENIL PÕHINEVAD *IN VITRO* GEENIMUTATSIOONIKATSED IMETAJARAKKUDEGA

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 490 (2016). Katsemeetodeid vaadatakse korrapäraselt läbi ja täiendatakse, et võtta arvesse teaduse arengut, regulatiivseid vajadusi ja loomade heaolu. Hiire lümfoomi katse (MLA) ja TK6-katse, milles kasutatakse tümidiini kinaasi (TK) lookust, olid varem hõlmatud katsemeetodiga B.17. Genotoksilisuse uuringute rahvusvahelise seminari (IWGT) MLA ekspertide tööühm on välja töötanud rahvusvaheliselt ühtlustatud soovitusel katsemeetodi nõuetekohasuse kriteeriumide ja andmete tõlgendamise kohta MLA korral (1, 2, 3, 4, 5) ja need soovitusel on hõlmatud käesoleva uue katsemeetodiga B.67. Käesoleva katsemeetod on kirjutatud MLA jaoks, samuti TK6-katse jaoks, kuna viimases kasutatakse samuti TK lookust. Kuigi MLAd on regulatiivsel eesmärgil laialdaselt kasutatud, on TK6 kasutus palju harvem. Näitajate sarnasusest hoolimata ei ole kaks rakuliini üksteisega asendatavad ning regulatiivsetes kavades võidakse õiguspäraselt väljendada konkreetse regulatiivse eesmärgiga seoses eelistust ühe või teise katse suhtes. Näiteks on MLA valideerimine tõendanud selle sobivust mitte üksnes geenimutatsioonide tuvastamiseks, vaid ka selle kindlakstegemiseks, kas uuritav kemikaal võib indutseerida struktuurse kromosoomi aberratsiooni. Käesolev katsemeetod kuulub geneetilise toksikoloogia katsemeetodite seeriasse. OECD on välja töötanud dokumendi, milles on esitatud kokkuvõtlik teave geneetilise toksikoloogia valdkonna katsete kohta ning ülevaade genotoksilisust käsitlevates OECD katsejuhendites tehtud viimastest muudatustest (6).
2. Käesoleva meetodi kohaste imetajarakkudega läbi viidavate *in vitro* geenimutatsioonikatsete eesmärk on tuvastada kemikaalide põhjustatud geenimutatsioone. Kõnealustes katsetes kasutatakse rakuliini, mis võimaldavad tuvastada otsemutatsioone reporter geenides, täpsemalt endogeenses tümidiini kinaasi geenis (inimese rakkudes *TK* ja näriliserakkudes *Tk*, käesolevas katsemeetodis viidatakse neile koos kui geenile *TK*). Käesolev katsemeetod on ette nähtud kasutamiseks kahe rakuliiniga: hiire lümfoomi rakuliin the L5178Y TK^{+/+}-3.7.2C (üldise nimetusega L5178Y) ja inimese lümfoblastoidi rakuliin TK6 (üldise nimetusega TK6). Kuigi kahe rakuliini päritolu, rakkude kasvamine, p53-staatus jms varieerub, saab TK-geenimutatsioonikatsed mõlema rakutüübiga läbi viia sarnasel viisil, nagu käesolevas katsemeetodis kirjeldatud.
3. Tümidiini kinaasi geeni autosoomsus ja heterosügootsus võimaldavad tuvastada eluvõimelisi kolooniaid, mille rakkudel esineb ensüümi tümidiini kinaasi defitsiit mutatsiooni TK^{+/+} → TK^{-/-} tagajärjel. Kõnealune defitsiit võib olla *TK*-geeni

mõjutavate sündmuste tagajärg, kusjuures sündmusteks võivad olla nii geenimutatsioonid (punktmutatsioonid, raaminihkemutatsioonid, väikesed deletsioonid jms) kui ka kromosoomidega toimuvad sündmused (suured deletsioonid, kromosoommutatsioonid ja mitootiline rekombinatsioon). Viimased sündmused väljenduvad heterosügootsuse kaoga, mis on tuumorsupressorgeeni tavaline geneetiline muutus inimesel kasvaja tekke puhul. Teoreetiliselt saab MLAGa tuvastada mitoosikävi kahjustusest ja/või mitootilisest mittelahknemisest põhjustatud terve *TK*-geeni kandva kromosoomi kadu. Kombineeritud tsütogeneetiline ja molekulaaranalüüs näitavad tõepoolest selgesti, et MLA *TK*-mutandid on mittelahknemise tagajärg. Kuid tõendite kaalukusest nähtub, et *TK*-geenimutatsioonikatsetega ei ole võimalik usaldusväärselt tuvastada aneugeene, kui kohaldatakse standardseid tsütotoksilisuse kriteeriume (nagu käesolevas katsemeetodis kirjeldatud), ning seetõttu ei sobi nimetatud katsed aneugeenide tuvastamiseks (7, 8, 9).

4. *TK*-geenimutatsioonikatsetes luuakse kaks erinevat *TK*-mutantide fenotüübiklassi; normaalse kasvuga mutandid, mis kasvavad sama kiirusega nagu *TK* heterosügootsed rakud, ning aeglase kasvuga mutandid, mille kasvamisel on populatsiooni kahekordistumisaeg pikenenud. Normaalse kasvuga ja aeglase kasvuga mutante nimetatakse MLA korral suurte kolooniate ja väikeste kolooniatega mutantideks ning *TK6* korral vara tekkivate kolooniate ja hilja tekkivate kolooniatega mutantideks. Nii suurte kui ka väikeste kolooniatega MLA mutantide molekulaarset ja tsütogeneetilist olemust on uuritud täpsemalt (8, 10, 11, 12, 13). Vara tekkivate kolooniate ja hilja tekkivate kolooniatega *TK6* mutantide molekulaarset ja tsütogeneetilist olemust on samuti täpsemalt uuritud (14, 15, 16, 17). Mõlemat tüüpi rakkude aeglase kasvuga mutandid on saanud geneetilise kahjustuse, mis hõlmab oletatavat/oletatavaid kasvu regulaatorgeeni või -geene *TK*-lookuse lähedal, mille tulemusena kahekordistumise aeg pikeneb ja kolooniad moodustuvad hiljem või on väikesed (18). Aeglase kasvuga mutantide tekkimist on seostatud kemikaalidega, mis põhjustavad suuri struktuurimuutusi kromosoomi tasandil. Rakud, mille kahjustus ei hõlma oletatavat/oletatavaid kasvu regulaatorgeeni või -geene *TK*-lookuse lähedal, kasvavad vanemrakkudele sarnase kiirusega ja neist saavad normaalse kasvuga mutandid. Peamiselt normaalse kasvuga mutantide tekkimist on seostatud kemikaalidega, mis toimivad peamiselt punktmutageenidena. Sellest tulenevalt on oluline loendada nii aeglase kui ka normaalse kasvuga mutante, et leida kõik mutandid ja saada ülevaade uuritava kemikaali põhjustatud kahjustuste liigist või liikidest (mutageenid *vs.* klastogeenid) (10, 12, 18, 19).
5. Katsemeetod on koostatud nii, et see annaks üldist teavet nii MLA kui ka *TK6* kohta ning spetsiifilisi suuniseid kummagi katse kohta eraldi.
6. Kasutatud mõisted on määratletud 1. liites.

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

7. *In vitro* katsete puhul tuleb metabolismi aktiveerimiseks üldjuhul kasutada eksogeenset allikat. Eksogeenne metabolismi aktiveerimise süsteem ei võimalda täielikult matkida *in vivo* tingimusi.
8. Tuleks hoiduda kasutamast tingimusi, mille puhul võib saada valepositiivseid tulemusi, mis ei ole põhjustatud uuritava kemikaali interaktsioonist raku geneetilise materjaliga (st võib esineda vastastikmõju katsesüsteemiga); sellised tingimused hõlmavad pH või osmolaalsuse muutusi, söötme koostisosadega reageerimist (20, 21) või liiga suurt tsütotoksilisust (22, 23, 24). MLA ja TK6-katse puhul loetakse liiga suureks tsütotoksilisuseks punktis 28 määratletud soovitatavat suurimat tsütotoksilisuse määra ületavat tsütotoksilisust. Lisaks tuleb tähelepanu pöörata sellele, et uuritavad kemikaalid, mis on tümidiini analoogid või käituvad sellisena, võivad raku töötlemise ajal suurendada muteerumissagedust muude spontaansete mutantide selektiivse kasvu teel ning nende nõuetekohaseks hindamiseks tuleb kasutada täiendavaid katsemeetodeid (25).
9. Tehislike nanomaterjalide uurimiseks võib olla vaja käesolevat katsemeetodit kohandada, kuid neid kohandusi ei ole käesolevas katsemeetodis kirjeldatud.
10. Enne kui kasutada käesolevat meetodit segu korral, et saada andmeid kavandatud regulatiivse eesmärgi jaoks, tuleb kaaluda, kas see katse annab selle eesmärgi jaoks piisavaid tulemusi ja kui annab, siis miks. Selline kaalumise ei ole vajalik, kui asjaomase segu hindamine on regulatiivse nõudega ette nähtud.
11. Muteerunud rakud, millel $TK^{+/-} \rightarrow TK^{-/-}$ -mutatsiooni tulemusel puudub ensüümi tümidiini kinaasi aktiivsus, on resistentsed pürimidiini analoogi trifluorotümidiini (TFT) tsütotoksiliste mõjude suhtes. Rakud, kus on olemas TK , on tundlikud TFT suhtes, mis pärsib rakkude ainevahetust ja peatab rakkude edasise jagunemise. Seega on muteerunud rakud võimelised TFT juuresolekul paljunema ja nähtavaid kolooniaid moodustama, kuid ensüümi TK sisaldavad rakud seda ei suuda.

KATSE PÕHIMÕTE

12. Rakususpensioon viiakse sobivaks ajavahemikuks (vt punkt 33) kokkupuutesse uuritava kemikaaliga – nii koos metabolismi aktiveeriva eksogeense allikaga kui ka ilma selleta (vt punkt 19) – ning seejärel külvatakse rakud ümber, et hinnata tsütotoksilisust ja võimaldada fenotüübi avaldumist enne mutantide selekteerimist. Tsütotoksilisuse hindamiseks kasutatakse MLA korral suhtelist kogukasvu (vt punkt 25) ja TK6 korral suhtelist ellujäämust (vt punkt 26). Töödeldud kultuure hoitakse söötmes piisava aja jooksul, mis on iseloomulik igale rakutüübile (vt punkt 37), võimaldamaks saavutatud mutatsioonide fenotüüpide avaldumist võimalikult lähedal

optimaalsele tasemele. Fenotüübi avaldumise järgselt külvatakse teadaolev arv rakke muteerumissageduse määramiseks nii söötmesse, mis sisaldab muteerunud kolooniate tuvastamist võimaldavat selektiivainet, kui ka selektiivaineta söötmesse, et teha kindlaks kloonimistõhusus (eluvõimelisus). Sobiva inkubatsiooniperioodi lõppedes kolooniad loendatakse. Muteerumissagedus arvutatakse muteerunud kolooniate arvu põhjal, mida on korrigeeritud lähtuvalt kloonimistõhususest mutantide selekteerimise ajal.

MEETODI KIRJELDUS

Ettevalmistused

Rakud

13. MLA korral: kuna MLA on välja töötatud L5178Y rakkude alaliini $TK^{+/-}$ -3.7.2C kasutades ning selle kasutamine seda katsemeetodit iseloomustab, tuleb MLA korral kasutada seda konkreetset alaliini. Rakuliin L5178Y on saadud DBA-2 hiire tüümuse lümfoomist, mille on esile kutsunud metüülkolantreen (26). Clive ja kaastöötajad töötlesid L5178Y rakke (Clive'i tähistus $TK^{+/-}$ -3) etüülmetaansulfonaadiga ja eraldasid $TK^{-/-}$ (tähistus $TK^{-/-}$ -3.7) kloon, kasutades selektiivainena bromodeoksüridiini. $TK^{-/-}$ kloonist eraldati spontaanne $TK^{+/-}$ kloon (tähistus $TK^{+/-}$ -3.7.2.) ja alamkloon (tähistus $TK^{+/-}$ -3.7.2C) ning iseloomustati neid MLAs kasutamiseks sobivana (27). Rakuliini karüotüüp on avaldatud (28, 29, 30, 31). Modaalne kromosoomiarv on 40. Leidub üks metatsentriline kromosoom (t12;13), mis tuleb loendada ühe kromosoomina. Hiire TK lookus asub kromosoomi 11 distaalses otsas. Rakuliinil L5178Y $TK^{+/-}$ -3.7.2C on mutatsioonid mõlemas p53 alleelis ning see toodab muteerunud p53 valku (32, 33). $TK^{+/-}$ -3.7.2C rakuliini p53 seisund mõjutab tõenäoliselt seda, kuidas on katsega võimalik tuvastada ulatuslikke kahjustusi (17).
14. TK6 korral: TK6 on inimese lümfoblastoidi rakuliin. Vanemrakuliin on Epstein-Barri viiruse toimel transformeerunud rakuliin WI-L2, mis algselt saadi päriliku sferotsütoosiga 5aastaselt meesisikult. Esimene isoleeritud kloon HH4 mutageniseeriti ICR191ga ja saadi TK heterosügootne rakuliin TK6 (34). TK6 rakud on peaaegu diploidsed ja esindav karüotüüp on 47, XY, 13+, t(14; 20), t(3; 21) (35). Inimese TK lookus asub kromosoomi 17 pikas õlas. TK6 on p53 sisaldav rakuliin, sest selle mõlemas alleelis on metsiktüüpi p53 järjestus ning see ekspresseerib üksnes metsiktüüpi p53 valku (36).
15. Nii MLA kui ka TK6 puhul on soovitatav, et katselabor rakkude tüvikultuuri luues või uuendades veenduks *Mycoplasma* puudumises, kontrolliks rakkude karüotüüpi või värviks TK lookusega kromosoomid ning kontrolliks populatsiooni kahekordistumise aegu. Katselaboris kasutatavate rakkude puhul tuleb teha kindlaks normaalne

rakutsükliks kuluv aeg ja see peab vastama rakkude kohta avaldatud iseloomulikele näitajatele (16, 19, 37). Tüvikultuuri säilitatakse –150 °C juures või madalamal temperatuuril ning kasutatakse kõigi rakkude töökultuuride valmistamiseks.

16. Enne suure hulga krüosäilitatud töökultuuride valmistamist või otse enne katses kasutamist võib olla vajalik puhastada kultuur eelnevalt leiduvatest muteerunud rakkudest (kui lahusti kontrollproovi muteerumissagedus (MF) jääb juba lubatavatesse piiridesse – vt tabel 2 MLA kohta). Selleks kasutatakse metotreksaati (aminopteriini), et selekteerida rakud, mis ei ole TK defitsiidiga, ning lisatakse kultuurile tümidiini, hüpoksaantiini ja glütsiini (L5178Y) või 2'-deoksütsütidini (TK6), et tagada TK sisaldusega rakkude optimaalne kasv (19, 38, 39) (ja TK6 kohta (40)). Üldised nõuanded rakukultuuride säilitamise hea tava kohta ning konkreetsed nõuanded L5178Y ja TK6 rakkude kohta on esitatud allikates (19, 31, 37, 39, 41). Laboritele, kus on vaja tüvikultuure MLA või TK6 alustamiseks või uusi tüvikultuure, on ligipääsetav hästi iseloomustatud rakkudega rakupank (37).

Söötmed ja kultiveerimistingimused

17. Mõlema katsemeetodi korral tuleks rakukultuuride kasvatamisel kasutada sobivat söödet ja sobivaid inkubeerimistingimusi (nt kasvunõud, 5 % CO₂-sisaldusega niiske atmosfäär, inkubeerimistemperatuur 37 °C). Kultiveerimisel tuleks alati järgida tingimusi, millega tagatakse rakkude püsimine logaritmilises kasvufaasis. On väga oluline valida söötmed ja kasvutingimused nii, et oleks tagatud rakkude optimaalne kasv ekspressiooniperioodil ning optimaalne kloonimine nii muteerunud kui ka muteerumata rakkude puhul. MLA ja TK6 korral on oluline ka see, et kultiveerimistingimused tagaksid nii suurte / vara tekkivate kolooniatega kui ka väikeste / hilja tekkivate kolooniatega Tk mutantide optimaalse kasvu. Rohkem üksikasju kultiveerimise, kaasa arvatud vajaduse kohta hobuseseerum soojusega korralikult inaktiveerida, kui kasutatakse RPMI söödet, on leitavad allikatest (19, 31, 38, 39, 40, 42).

Rakukultuuride ettevalmistamine

18. Rakkude paljundamiseks tüvikultuurist külvatakse need söötmesse sellise tihedusega, et rakkude eksponentsiaalne kasv suspensioonis jätkuks kogu töötlemis- ja ekspressiooniperioodi vältel.

Metabolismi aktiveerimine

19. L5178Y ja TK6 rakkude kasutamise korral tuleks kasutada eksogeenseid metabolismisüsteeme, sest nende rakkude endogeenne metaboliseerimisvõime on ebapiisav. Kui ei ole teisiti põhjendatud, soovitakse vaikevalikuna kõige sagedamini kasutatavat süsteemi, milleks on näriliste (tavaliselt roti) maksast valmistatud postmitokondriiline fraktsioon S9, millele on lisatud kofaktor ning mida on töödeldud

ensüümide induktoritega, nagu Aroclor 1254 (43, 44, 45) või fenobarbitaali ja β -naftoflavooni kombinatsiooniga (46, 47, 48, 49, 50, 51). Viimati nimetatud kombinatsiooni kasutamine ei ole vastuolus püsivate orgaaniliste saasteainete Stockholmi konventsiooniga (52) ning see on osutunud segafunktsiooniga oksüdaaside induktorina sama tõhusaks kui Aroclor 1254 (45, 46, 47, 48, 49). S9-fraktsiooni kasutatakse tavaliselt kontsentratsioonivahemikus 1–2 % (mahuprotsent), kuid lõplikus katsesöötmes võib kontsentratsiooni suurendada kuni 10 %-ni (mahuprotsent). Kasutatava eksogeense metabolismi aktiveerimise süsteemi või ensüümiinduktori liigi ja kontsentratsiooni valikut võib mõjutada uuritava kemikaali klass.

Uuritava kemikaali ettevalmistamine

20. Enne rakkude töötlemist tuleks tahke uuritav kemikaal lahustada sobivas lahustis ja vajaduse korral tuleks saadud lahust lahjendada (vt punkt 21). Vedelat uuritavat kemikaali võib lisada otse katsesüsteemi või seda enne lisamist lahjendada. Gaasilise või lenduva kemikaali kasutamisel tuleks standardmeetodit asjakohaselt muuta, näiteks viia kemikaaliga töötlemine läbi suletud kultiveerimishõõs (53, 54, 55). Uuritav kemikaal tuleks katseks ette valmistada vahetult enne kasutamist, välja arvatud juhul, kui püsivuse andmetest nähtub, et kemikaali säilitamine on vastuvõetav.

KATSETINGIMUSED

Lahustid

21. Lahusti tuleks valida nii, et oleks tagatud uuritava kemikaali optimaalne lahustumine, kuid lahusti ei mõjutaks samal ajal negatiivselt katse käiku näiteks rakkude kasvukiiruse või uuritava kemikaali omaduste muutmise, kultiveerimishõõsuga reageerimise või metabolismi aktiveerimise süsteemi kahjustamise teel. Esmajärjekorras soovitatakse võimaluse korral kaaluda veepõhise lahusti (või söötme) kasutamist. Tavalised lahustid on näiteks vesi või dimetüülsulfoksiid. Üldjuhul ei tohiks töötlusetapis kasutatavas lõppsöötmes orgaanilise lahusti sisaldus ületada 1 % (mahuprotsent) ja veepõhise lahusti (füsioloogiline lahus või vesi) sisaldus ei tohiks ületada 10 % (mahuprotsent). Kui kasutatakse muid kui tavaliselt kasutatavaid lahusteid (nt etanooli või atsetooni), tuleb nende kasutamiseks esitada andmed, millest nähtub nende kokkusobivus uuritava kemikaali ja katsesüsteemiga ning genotoksilise toime puudumine kasutatava kontsentratsiooni juures. Selliste tõendavate andmete puudumisel on oluline lisada katsesse kemikaaliga töötlemata kontrollproovid (vt 1. liide, määratlused), et tõendada valitud lahustist tuleneva kahjuliku või mutageense toime puudumist.

TSÜTOTOKSILISUSE MÕÕTMINE JA TÖÖTLEMISKONTSENTRATSIOONIDE

VALIMINE

22. Uuritava kemikaali suurima kontsentratsiooni valimisel tuleks hoiduda valimast kontsentratsiooni, mille puhul on võimalik saada valepositiivseid tulemusi, näiteks tulenevalt liiga suurest tsütotoksilisusest (vt punkt 28), söötmes sadenemisest (vt punkt 29) või pH või osmolaalsuse olulisest muutumisest (vt punkt 8). Kui uuritav kemikaal muudab lisamise hetkel oluliselt söötme pH-d, võib pH reguleerimiseks lisada töötlemiseks kasutatavasse lõppsöötmesse puhvrit, et hoida ära valepositiivsete tulemuste saamist ja säilitada sobivad kultiveerimistingimused.
23. Kontsentratsioonide valimisel lähtutakse tsütotoksilisusest ja muudest kaalutlustest (vt punktid 27–30). Ehkki tsütotoksilisuse hindamine eelkatses võib põhikatses kasutatavate kontsentratsioonide täpsemaks kindlakstegemiseks kasulikuks osutuda, ei ole eelkatse tegemine kohustuslik. Põhikatses on tsütotoksilisuse mõõtmine igas kultuuris vajalik ka juhul, kui tsütotoksilisust on eelnevalt juba hinnatud. Kui tehakse vahemiku leidmise katse, peab see hõlmama suurt kontsentratsioonide vahemikku ning selle võib lõpetada kas 1. päeval pärast töötlemist või pikendada seda ekspresseerimiseni ja mutantide selekteerimiseni 2. päeval (kui selgub, et kasutatavad kontsentratsioonid on selleks sobivad).
24. Tsütotoksilisust tuleks määrata iga üksiku katsekultuuri ja kontrollkultuuri puhul: MLA (2) ja TK6 (15) korral kasutatavad meetodid on määratletud rahvusvaheliselt kokkulepitud tavaga.
25. Nii MLA agari- kui ka mikrotiiterplaadi variandi korral: tsütotoksilisuse hindamiseks tuleks kasutada suhtelist kogukasvu, mille määratlesid esmakordselt Clive ja Spector 1975. aastal (2). See näitaja hõlmab suhtelist suspensioonikasvu (katsekultuur vs. lahusti kontrollproov) rakkude töötlemise ajal, ekspresseerimisega ja kloonimise suhtelist tõhusust (katsekultuur vs. lahusti kontrollproov) mutantide selekteerimise ajal (2). Tuleks võtta arvesse, et suhteline suspensioonikasv hõlmab igasugust rakkude arvu võimalikku vähenemist, mis töötlemise ajal katsekultuuris tekib (vt valemid 2. liites).
26. TK6 korral: tsütotoksilisuse hindamiseks tuleks kasutada suhtelist ellujäämust, st võrrelda vahetult pärast töötlemist välja külvatud rakkude kloonimise tõhusust, mida on kohandatud rakkude arvu võimaliku vähenemise suhtes töötlemise ajal, negatiivsete kontrollproovidega, mille ellujäämuseks loetakse 100 % (vt valem 2. liites).
27. Kemikaali tuleks hinnata vähemalt neljal nõuetekohasuse kriteeriumidele (sobiv tsütotoksilisuse määr, rakkude arv jne) vastaval katsekontsentratsioonil (see ei hõlma lahusti kontrollproovi ega positiivseid kontrollproove). Katse läbiviimisel on soovitatav kasutada iga katsekontsentratsiooni puhul kahte paralleelkultuuri, ent võib

kasutada ka suuremat arvu paralleelkultuure või ühteainsat kultuuri. Iga kontsentratsiooni puhul tuleks paralleelkultuuridega saadud tulemused esitada eraldi, kuid andmeanalüüsi jaoks võib need koondada (55). Uuritavate kemikaalide puhul, mille tsütotoksilisus on väike või millel see puudub, sobivad tavaliselt kontsentratsioonid, mis erinevad üksteisest umbes kaks kuni kolm korda. Tsütotoksilisuse avaldumise korral, tuleb kontsentratsioonid valida nii, et need kataksid tsütotoksilisuse vahemiku alates kontsentratsioonist, mille juures avaldub tsütotoksilisus (nagu on kirjeldatud punktis 28), ja hõlmama kontsentratsioonid, mille juures esineb mõõdukas ja väike (või olematu) tsütotoksilisus. Paljudel uuritavatel kemikaalidel on kontsentratsiooni-vastuse kõver järsu tõusuga ning tsütotoksilisuse täieliku vahemiku katmiseks või kontsentratsioonist-vastuse sõltuvuse üksikasjalikuks uurimiseks võib olla vaja kasutada üksteisest vähem erinevaid kontsentratsioone ja enam kui nelja kontsentratsiooni, eriti olukorras, kus on vaja teha korduskatse (vt punkt 70). Enam kui nelja kontsentratsiooni kasutamine võib osutuda eriti oluliseks, kui kasutatakse ühteainsat kultuuri.

28. Kui suurima kontsentratsiooni valimisel lähtutakse tsütotoksilisusest, tuleks suurim kontsentratsioon valida nii, et MLA puhul saavutataks suhteline kogukasv 10–20 % ning TK6 puhul suhteline ellujäämus 10–20 % (punkt 67).
29. Raskesti lahustuva uuritava kemikaali puhul, mis ei ole tsütotoksiline kontsentratsioonidel, mis on väiksemad kui vähim kontsentratsioon, mille juures kemikaal ei lahustu, peaks suurimal analüüsitava kontsentratsioonil olema pärast uuritava kemikaaliga töötlemise lõppemist täheldatav hägusus või silma või invertmikroskoobiga nähtav sade. Isegi kui tsütotoksilisus avaldub suuremal kontsentratsioonil kui vähim kontsentratsioon, mille juures kemikaal ei lahustu, on soovitatav teha katse ainult ühe sellise kontsentratsiooniga, mille juures tekib hägusus või nähtav sade, sest sade võib toimet moonutada. Kuna MLA ja TK6 korral kasutatakse suspendeeritud kultuure, tuleb eriti hoolikalt veenduda, et sade ei mõjuta katse käiku. Enne katse alustamist võib olla kasulik määrata ka kemikaali lahustuvus söötmes.
30. Kui ei täheldata ei sadet ega liigset tsütotoksilisust, peaks suurim katsekontsentratsioon olema vähim järgmistest kontsentratsioonidest: 10 mM, 2 mg/ml või 2 µl/ml (57, 58). Kui uuritava kemikaali koostis ei ole määratav, näiteks kui see on tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal (UVCB), keskkonnast saadud ekstrakt vms, võib juhul, kui ei täheldata kemikaali piisavat tsütotoksilisust, olla vaja selle iga koostisosa kontsentratsiooni suurendamiseks kasutada suuremat maksimumkontsentratsiooni (nt 5 mg/ml). Tuleks siiski märkida, et inimravimite puhul võivad need nõuded olla teistsugused (59).

Kontrollproovid

31. Iga katserežiimi puhul tuleks kasutada paralleelseid negatiivseid kontrollproove (vt punkt 21), mis koosnevad üksnes töötlemiseks kasutatavale söötmele lisatud lahustist ja mida käideldakse samamoodi kui töödeldud kultuure.
32. Paralleelseid positiivseid kontrollproove on vaja, et tõendada labori pädevust kasutatud katsetamismeetodika tingimustel määrata mutageene ja eksogeense metaboolse aktivatsiooni süsteemi tõhusust (kui asjakohane) ning tõendada suutlikkust nii väikeste / hilja tekkivate kui ka suure / vara tekkivate TK mutantide piisaval tuvastamisel. Positiivsete kontrollainete näited on esitatud allpool tabelis 1. Kui see on põhjendatud, võib positiivse kontrollainena kasutada mõnda muud ainet. Kuna *in vitro* genotoksilisuse katsed imetajarakkudega on piisavalt standarditud lühiajaliste (3–4 tundi) töötluste puhul, mis tehakse paralleelkatsetena metaboolse aktivatsiooniga või ilma selleta, kasutades sama kestusega töötlust, võib positiivse kontrollproovi osas piirduda metaboolset aktiveerimist vajava mutageeniga. Sel juhul võimaldab üheainsa kõnealuse positiivse kontrollprooviga saadud tulemus tõendada nii metabolismi aktiveerimise süsteemi toimimist kui ka katsesüsteemi reageerimisvõimet. Pikaajalise töötluste jaoks (st 24 tundi ilma S9-fraktsioonita), kui seda kasutatakse, peab siiski olema oma positiivne kontrollproov, sest töötluste kestus erineb sellest, mida kasutatakse metaboolse aktivatsiooniga katses. Iga positiivset kontrollainet puhul tuleks kasutada ühes või mitmes kontsentratsioonis, mille juures võib eeldada, et saadakse korratavad ja tuvastatavad, taustaset ületavad tulemused, mis võimaldavad tõendada katsesüsteemi tundlikkust, ning samal ajal ei tohiks tulemused olla mõjutatud käesolevas katsemeetodis sätestatud piirmäära ületavast tsütotoksilisusest (vt punkt 28).

Tabel 1. Labori pädevuse hindamiseks ja positiivsete kontrollainete valimiseks soovitatavad etalonained

Kategooria	Aine	CASi nr
1. Metaboolse aktivatsioonita toimivad mutageenid		
Metüülmetaansulfonaat	66-27-3	
Mitomütsiin C	50-07-7	
4-nitrokinoliin-N-oksiid	56-57-5	
2. Metaboolset aktivatsiooni vajavad mutageenid		
Benzo[a]püreen	50-32-8	
Tsüklofosfamiid (monohüdraat)	50-18-0 (6055-19-2)	
7,12-dimetüülbensantratseen	57-97-6	
3-metüülkolantreen	56-49-5	

METOODIKA

Uuritava kemikaaliga töötlemine

33. Paljunevaid rakke töödeldakse uuritava kemikaaliga nii metabolismi aktiveerimise süsteemi juuresolekul kui ka ilma selleta. Kokkupuuteperiood peab olema sobiva pikkusega (tavaliselt piisab 3–4 tunnist). Tuleks siiski märkida, et inimravimite puhul võivad need nõuded olla teistsugused (59). Kui MLA korral annab lühiajaline töötlemine negatiivsed tulemused ja leidub teavet, mille kohaselt oleks vaja pikemat töötlemist [nt nukleosiidi analoogid, halvasti lahustuvad kemikaalid (5, 59)], tuleks kaaluda katse tegemist pikema, nt 24-tunnise töötlemisega ilma S9-fraktsioonita.
34. Rakkude minimaalse arvu valimisel iga katsekultuuri (nii kontroll- kui ka töödeldud kultuuride) ja iga katseetapi jaoks tuleks lähtuda spontaanse muteerumise sagedusest. Üldsuunisena tuleks igas katsekultuuris töödelda ja ümber külvata piisav hulk rakke, et tagada igas katseetapis (töötlemine, fenotüübi ekspressioon ja mutantide selektsioon) vähemalt 10, kuid ideaaljuhul 100 mutandi spontaanne teke (56).
35. MLA puhul on soovituslik vastuvõetav spontaanse muteerumise sagedus vahemikus $35\text{--}140 \times 10^{-6}$ (agarivariant) ja $50\text{--}170 \times 10^{-6}$ (mikrotiiterplaadi variant) (vt tabel 2). Selleks, et saada igas katsekultuuris vähemalt 10, kuid ideaaljuhul 100 töötluses ellujäänud, spontaanselt tekkinud mutanti, on vaja töödelda vähemalt 6×10^6 rakku. Sellise arvu rakkude töötlemine ja rakkude piisava arvu tagamine ekspresseerumise ning mutantide selekteerimiseks vajaliku kloonimise etappides tagab katse igas etapis piisava arvu (10 või rohkem) spontaanselt tekkinud mutante ka juhul, kui kultuure töödeldakse kontsentratsioonidel, mis on 90 % ulatuses tsütotoksilised (mõõdetuna 10 % suhtelise kogukasvuna) (19, 38, 39).
36. TK6 korral jääb spontaanse muteerumise sagedus üldjuhul vahemikku $2\text{--}20 \times 10^{-6}$. Selleks, et saada igas kultuuris vähemalt 10 töötluses ellujäänud, spontaanselt tekkinud mutanti, on vaja töödelda vähemalt 20×10^6 rakku. Sellise arvu rakkude töötlemine tagab piisava arvu (10 või rohkem) spontaanselt tekkinud mutante ka juhul, kui kultuure töödeldakse kontsentratsioonidel, mis on 90 % ulatuses tsütotoksilised (suhteline ellujäämus 10 %). Peale selle tuleb ekspressiooniperioodi vältel kultiveerida ja mutantide selekteerimiseks välja külvata piisaval arvul rakke (60).

Fenotüübi avaldumise aeg ning tsütotoksilisuse ja muteerumissageduse mõõtmine

37. Töötlemisperioodi lõppedes kasvatatakse rakke teatava ajavahemiku jooksul, et võimaldada äsja tekkinud mutantide fenotüübi optimaalset või sellelähedast avaldumist; ajavahemik oleneb kasutatavast rakuliinist. MLA korral on fenotüübi avaldumise periood 2 päeva. TK6 korral on fenotüübi avaldumise periood 3–4 päeva.

Kui kasutatakse 24-tunnist töötlemist, algab avaldumisperiood pärast töötlemise lõppu.

38. Fenotüübi avaldumise perioodi jooksul loendatakse rakke iga päev. MLA korral kasutatakse päevaseid rakkude arve päevase suspensioonikasvu arvutamiseks. Pärast 2-päevast avaldumisperioodi suspendeeritakse rakud nii selektiivainet sisaldavas kui ka ilma selektiivaineta söötmes, et teha kindlaks mutantide arv (selekteerimisplaadid) ja kloonimistõhusus (eluvõimelisuse plaadid). MLA korral on kaks võrdselt tunnustatud meetodit mutantide selektiivseks kloonimiseks: üks pehmes agaris ja teine vedelsöötmes 96 süvendiga plaatidel (19, 38, 39). TK6 korral kloonitakse vedelsöötmetes 96 süvendiga plaatidel (16).
39. TK mutantide puhul on ainus soovitatav selektiivaine trifluorotümidiin (TFT) (61).
40. MLA korral loendatakse agariplaate ja mikrotiiterplaate pärast 10–12-päevast inkubeerimist. TK6 korral loendatakse mikrotiiterplaatidel vara tekkivaid mutante 10–14 päeva möödudes. Aeglase kasvuga (hilja tekkivate) TK6 mutantide avastamiseks on vaja rakkudele pärast vara tekkivate mutantide loendamist lisada söödet ja TFT-d ning inkubeerida plaate veel 7–10 päeva (62). Punktides 42 ja 44 on arutletud aeglase ja normaalse kasvuga TK mutantide loendamise üle.
41. MLA puhul sobivad, mõlemat meetodit (agar ja mikrotiiterplaat) hõlmavad arvutused on esitatud 2. liites. Muteerumissageduse arvutamiseks MLA agarimeetodi korral loendatakse kolooniad ja kohandatakse mutantide kolooniate arvu kloonimistõhususe järgi. MLA ja TK6 mikrotiiterplaadimeetodi korral tehakse kloonimistõhusus nii selekteerimis- kui ka kloonimistõhususe plaatidel kindlaks vastavalt Poissoni jaotusele (63). Muteerumissagedus arvutatakse nende kahe kloonimistõhususe alusel.

Mutantide kolooniate iseloomustamine

42. Kui MLA meetodil uuritav kemikaal on positiivne (vt punktid 62–63), tuleks kolooniaid iseloomustada nende arvu või kasvukiirusega vähemalt ühes uuritavas kultuuris (tavaliselt suurim vastuvõetav positiivne kontsentratsioon) ning negatiivsetes ja positiivsetes kontrollproovides. Kui uuritav kemikaal on negatiivne (vt punkt 64), tuleks mutantide kolooniaid iseloomustada nende arvuga negatiivsetes ja positiivsetes kontrollproovides. MLA mikrotiiterplaadimeetodi korral määratletakse väikese kolooniaga mutandid kui mutandid, mis katavad alla 25 % süvendi diameetrist, ja suure kolooniaga mutandid kui mutandid, mis katavad üle 25 % süvendi diameetrist. Agarimeetodi korral kasutatakse mutantide kolooniate loendamiseks ja suuruse määramiseks kolooniate automaatloendurit. Üksikasjalikud lähenemisviisid kolooniate suuruse määramisele on esitatud kirjandusallikates (19, 38, 40). Kolooniate iseloomustamine negatiivsetes ja positiivsete kontrollproovides on vajalik, et tõendada uuringute asjakohast läbiviimist.

43. Uuritavat kemikaali ei saa lugeda negatiivseks, kui positiivses kontrollproovis ei tuvastata piisavalt ei suure ega väikese kolooniaga mutante. Kolooniate iseloomustust võib kasutada üldise teabe saamiseks uuritava kemikaali võime kohta põhjustada punktmutatsioone ja/või kromosoomidega toimuvaid sündmusi (punkt 4).
44. TK6: Normaalse ja aeglase kasvuga mutandid eristatakse üksteisest erinevate inkubatsiooniaegade abil (vt punkt 40). TK6 puhul loendatakse üldiselt kõigis kultuurides, kaasa arvatud negatiivsetes ja positiivsete kontrollproovides nii vara kui ka hilja tekkivad mutandid. Kolooniate iseloomustamine negatiivsetes ja positiivsete kontrollproovides on vajalik, et tõendada uuringute asjakohast läbiviimist. Uuritavat kemikaali ei saa lugeda negatiivseks, kui positiivses kontrollproovis ei tuvastata piisavalt ei vara ega hilja tekkivaid mutante. Kolooniate iseloomustust võib kasutada üldise teabe saamiseks uuritava kemikaali võime kohta põhjustada punktmutatsioone ja/või kromosoomidega toimuvaid sündmusi (punkt 4).

Labori pädevus

45. Laboris peaks enne katsemeetodi rutiinset kasutamist olema katse läbiviimiseks piisava kogemuse tõendamiseks tehtud katseseeria positiivse kontrollainena kasutatud etalonainetega, millel on eri toimemehhanismid (tabelis 1 loetletud ainete hulgast valitud ained, millest vähemalt üks vajab toimimiseks metabolismi aktiveerimist ja vähemalt üks seda ei vaja), ning mitmesuguste negatiivsete kontrollainetega (sealhulgas töötlemata kultuurid ja mitmesugused lahustid/kandeained). Selliste positiivsete ja negatiivsete kontrollainetega saadud tulemused peaksid olema kooskõlas kirjanduse andmetega. Seda nõuet ei kohaldata kogemusega laborite puhul, kui on olemas varasemate tulemuste andmebaas, nagu on määratletud punktides 47–50. MLA korral peavad nii positiivsete kui ka negatiivsete kontrollainetega saadud tulemused olema kooskõlas IWGT soovitustega (vt tabel 2).
46. Valitud positiivseid kontrollaineid (vt tabel 1) tuleks uurida nii lühiajalise kui ka pikaajalise töötusega (kui pikaajalist töötust kasutatakse) aktiveerimata metabolismi tingimustes ning lühiajalise töötusega aktiveeritud metabolismi tingimustes, et tõendada mutageensete kemikaalide tuvastamise ja metabolismi aktiveerimise süsteemi tõhususe kindlakstegemise võimekust, samuti rakkude kasvutingimuste sobivust töötlemise, fenotüübi avaldumise ja mutantide selekteerimise ajal ning kasutatavate hindamismeetodite asjakohasust. Kõnealuste valitud ainete puhul tuleb katsesüsteemi tundlikkuse ja dünaamilise kasutusulatuse sobivuse tõendamiseks valida kontsentratsioonivahemikud nii, et oleks võimalik saada korratavaid, taustaset ületavaid ja kontsentratsioonist sõltuvaid tulemusi.

Varasemad andmed kontrollproovide kohta

47. Laboris tuleks kindlaks teha:

- positiivsete kontrollainetega saadud varasemate tulemuste vahemik ja jaotus,
 - negatiivsete kontrollainetega (töötlemata rakud, lahusti kontrollproov) saadud varasemate tulemuste vahemik ja jaotus.
48. Kui hangitakse algandmeid varasemate negatiivsete kontrollproovide tulemuste jaotuse määramiseks, peavad paralleelsete negatiivsete kontrollproovidega saadud andmed olema kooskõlas kontrollproovide kohta avaldatud andmetega. Kontrollproovidega saadud tulemuste jaotuse lähteandmetele üha uute katseandmete lisandumisel peaksid paralleelsete negatiivsete kontrollproovidega saadavad tulemused jääma ideaaljuhul selle jaotuse usaldusvahemikku usaldusnivool 95 % (64, 65).
49. Laboris negatiivsete kontrollproovidega saadud varasemate tulemuste andmebaas peaks algselt hõlmama vähemalt 10 katse andmeid, kuid soovitatavalt peaks see sisaldama vähemalt 20 võrreldavates tingimustes tehtud katse andmeid. Laboris tuleks kasutada kvaliteedikontrolli meetodeid, näiteks kontrollkaarte (nt vastavuse kontrollkaardid või X-tüüpi kontrollkaardid (65)), et teha kindlaks, kui suures ulatuses positiivsete ja negatiivsete kontrollproovide andmed varieeruvad, ja tõendada, et laboris kasutatav meetodika on usaldusväärne (66). Üksikasju ja soovitusi aja jooksul andmete kogumise ja kasutamise kohta võib leida kirjandusest (64).
50. Negatiivsete kontrollproovidega saadud andmed peaksid hõlmama muteerumissagedust ühes või soovitatavalt mitmes paralleelses kultuuris, nagu on kirjeldatud punktis 27. Paralleelsete negatiivsete kontrollproovide tulemused peaksid ideaaljuhul jääma labori varasemate kontrollproovi tulemuste jaotuse usaldusvahemikku usaldusnivool 95 %. Kui negatiivsete kontrollproovidega saadud tulemused jäävad väljapoole kõnealust usaldusvahemikku usaldusnivool 95 %, võivad need olla kontrollproovidega saadud varasemate tulemuste jaotuses arvessevõtmiseks vastuvõetavad juhul, kui tegemist ei ole äärmuslike võõrväärtustega ning on tõendatud, et katsesüsteem on usaldusväärne (vt punkt 49), ja puuduvad tõendid selle kohta, et tegemist on tehnilise vea või inimliku eksimusega.
51. Katsemetoodika mis tahes muudatuse puhul tuleks kaaluda, kas see mõjutab katseandmete vastavust laboris kontrollproovidega varem saadud olemasolevatele andmetele. Iga olulise mittevastavuse korral tuleks luua uus kontrollproovidega saadud varasemate tulemuste andmebaas.

ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE

Tulemuste esitamine

52. Nii MLA kui ka TK6 korral kuuluvad esitatavate andmete hulka nii töötlemata kui ka kontrollkultuuridega saadud andmed, mis on vajalik tsütotoksilisuse (vastavalt

suhteline kogukasv või suhteline ellujäämus) ja muteerumissageduse arvutamiseks allpool kirjeldatud viisil.

53. MLA korral tuleb iga üksiku kultuuri kohta esitada suhteline suspensioonikasv, suhteline kogukasv, kloonimistõhusus mutantide selekteerimise ajal ning mutantide kolooniate arv (agarivariandi korral) või tühjade süvendite arv (mikrotiiterplaadi variandi korral). Muteerumissagedust väljendatakse mutantrakkude arvuga miljoni ellujäänud raku kohta. Kui vastus on positiivne, esitatakse väikese ja suure koloonia muteerumissagedused (ja/või protsentuaalne osakaal muteerumise üldsagedusest), mis on leitud uuritava kemikaali vähemalt ühe kontsentratsiooniga (tavaliselt suurim positiivne kontsentratsioon), negatiivse kontrollprooviga ja positiivse kontrollprooviga. Negatiivse vastuse korral tuleb esitada negatiivse kontrollproovi ja positiivse kontrollprooviga saadud väikese ja suure koloonia muteerumissagedused.
54. TK6 korral tuleb iga üksiku kultuuri kohta esitada suhteline ellujäämus, kloonimistõhusus mutantide selekteerimise ajal ning tühjade süvendite arv vara ja hilja tekkivate mutantide puhul. Muteerumissagedust väljendatakse mutantrakkude arvuga ellujäänud rakkude arvu kohta ning see peaks hõlmama muteerumise üldsagedust ning vara ja hilja tekkivate mutantide muteerumissagedust (ja/või protsentuaalselt osakaalu muteerumise üldsagedusest).

Katse nõuetekohasuse kriteeriumid

55. Nii MLA kui ka TK6 korral peavad enne konkreetse uuritava kemikaali üldiste tulemuste määramist olema täidetud järgmised kriteeriumid:

- katse on tehtud kahes eri tingimuses (lühiajaline töötlus metabolismi aktiveerimisega ja ilma selleta, vt punkt 33), välja arvatud juhul, kui neist ühe puhul on saadud positiivsed tulemused;
- analüüsitud rakkude ja kontsentratsioonide arv on piisav (vt punktid 27 ja 34–36);
- suurima kontsentratsiooni valimise kriteeriumid on kooskõlas kriteeriumidega, mis on kirjeldatud punktides 28–30.

Negatiivsete ja positiivsete kontrollproovide nõuetekohasuse kriteeriumid

56. IWGT MLA ekspertide töörühma tehtud analüüs suure hulga MLA andmete kohta andis tulemuseks rahvusvahelise konsensuse MLA konkreetsete nõuetekohasuse kriteeriumide osas (1, 2, 3, 4, 5). Seega annab käesolev katsemeetod konkreetseid soovitusi negatiivsete ja positiivsete kontrollproovide vastuvõetavuse kindlakstegemiseks ning MLAgas saadud üksikainete tulemuste hindamiseks. TK6 andmebaas on palju väiksem ja töörühm ei ole seda hinnanud.

57. MLA korral tuleb iga katse juures hinnata, kas töötlemata/lahusti kontrollproov vastab IWGT MLA töörühma koostatud nõuetekohasuse kriteeriumidele ((4) ja tabel 2

allpool) järgmiste näitajate poolest: 1) muteerumissagedus (tuleb arvestada, et IWGT nõuetekohased muteerumissagedused on MLA agari- ja mikrotiiterplaadi variandi puhul erinevad); 2) kloonimistõhusus mutantide selekteerimise ajal ja 3) suspensioonikasv lahusti kontrollproovis (valemid on leitavad 2. liites).

Tabel 2. MLA nõuetekohasuse kriteeriumid

Näitaja	Pehme agari meetod	Mikrotiiterplaadi meetod
Muteerumissagedus:	$35-140 \times 10^{-6}$	$50-170 \times 10^{-6}$
Kloonimistõhusus	65–120 %	65–120 %
Suspensioonikasv	8–32-kordne (3–4-tunnine töötlus) 32–180-kordne (24-tunnine töötlus, kui seda kasutatakse)	8–32-kordne (3–4-tunnine töötlus) 32–180-kordne (24-tunnine töötlus, kui seda kasutatakse)

58. Samuti tuleb MLA korral iga katse juures hinnata, kas positiivne kontrollkatse või positiivsed kontrollkatse vastavad vähemalt ühele järgmisest kahest nõuetekohasuse kriteeriumist, mille on välja töötanud IWGT tööühm:
- positiivses kontrollproovis peab ilmnenema muteerumise üldsageduse absoluutne suurenemine, st suurenemine spontaanselt muteerumisest tulenevast taustsagedusest (indutseeritud muteerumissagedus) ülespoole vähemalt 300×10^{-6} . Vähemalt 40 % indutseeritud muteerumissagedusest peab kajastuma väikese koloonia muteerumissageduses;
 - positiivses kontrollproovis peab väikese koloonia muteerumissagedus olema vähemalt 150×10^{-6} võrra suurem töötlemata/lahusti kontrollproovis esinevast (väikese koloonia indutseeritud muteerumissagedus 150×10^{-6}).
59. TK6 korral on katse nõuetekohane, kui paralleelsete negatiivsete kontrollproovide tulemused on vastuvõetavad, et lisada need labori varasemate negatiivsete kontrollproovidega saadud tulemuste andmebaasi, nagu on kirjeldatud punktides 48–49. Peale selle peavad paralleelsete positiivsete kontrollproovidega (vt punkt 32) saadud tulemused olema võrreldavad positiivsete kontrollproovidega varem saadud tulemustega ning saadud väärtused peaksid paralleelset negatiivset kontrollproovi iseloomustavate väärtustega võrrelduna olema statistiliselt oluliselt suuremad.
60. Mõlema katse korral peab positiivses kontrollkultuuris leitud tsütotoksilisus olema sama mis katsekultuurides. See tähendab, et suhteline kogukasv või suhteline ellujäämus ei tohi jääda alla 10 % Positiivse kontrollproovi vastuvõetavuse kriteeriumidele vastavuse tõendamiseks piisab ühe kontsentratsiooni kasutamisest (või kui kasutatakse rohkem kontsentratsioone, siis ühe positiivse kontrollkultuuriga

kasutatava kontsentratsiooni kasutamisest). Peale selle peab positiivse kontrollproovi muteerumissagedus jääma labori jaoks määratud vastuvõetavasse vahemikku.

Tulemuste hindamine ja tõlgendamine

61. MLA kohta on IWGT hiire lümfoomi ekspertide töörühm ära teinud olulise töö positiivse vastuse bioloogilise olulisuse ja kriteeriumidega seoses (4). Seega annab käesolev katsemeetod konkreetseid soovitusi uuritava kemikaali MLA-katsega saadud tulemuste tõlgendamiseks (vt punktid 62–64). TK6 andmebaas on palju väiksem ja töörühm ei ole seda hinnanud. Seepärast on TK6 puhul esitatud soovitusel andmete tõlgendamiseks üldisemad (vt punktid 65–66). Täiendavad soovitusel kehtivad mõlema katsemeetodi kohta (vt punktid 67–71).

MLA

62. Positiivsete ja negatiivsete vastuste määratlemiseks on soovitatav kasutada lähenemisviisi, mis tagab, et suurenenud muteerumissagedus on bioloogiliselt oluline. Muude katsete puhul tavaliselt kasutatava statistilise analüüsi asemel põhineb see lähenemisviis eelnevalt määratletud indutseeritud muteerumise sagedusel (st muteerumissageduse suurenemisel ülespoole paralleelse kontrollprooviga saadud väärtusest), mis on nimetatud globaalseks hindamisteguriks (GEF) ja mille aluseks on osalevate laborite negatiivse kontrollproovi muteerumissageduse andmete jaotuse analüüs (4). MLA agariversiooni korral on $GEF\ 90 \times 10^{-6}$ ja MLA mikrotiiterplaadi variandi korral 126×10^{-6} .
63. Tingimusel, et kõik nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, loetakse uuritav kemikaal selgelt positiivseks, kui ükskõik millistel uuritud katsetingimustel (vt punkt 33) ületab muteerumissageduse kasv paralleelprooviga mõõdetud taustasageduse rohkem kui GEF võrra ning suurenemine on sõltuv kontsentratsioonist (nt kasutades trenditesti meetodit). Sel juhul käsitatakse uuritavat kemikaali võimelisena põhjustama selles katsesüsteemis mutatsiooni.
64. Tingimusel, et kõik nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, loetakse uuritav kemikaal selgelt negatiivseks, kui kõigis uuritud katsetingimustes (vt punkt 33) puudub kontsentratsioonist sõltuv vastus või kui muteerumissagedus on suurenenud, siis see ei ületa GEFi. Sel juhul käsitatakse uuritavat kemikaali võimetuna põhjustama selles katsesüsteemis mutatsioone.

TK6

65. Tingimusel, et kõik nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, loetakse uuritav kemikaal selgelt positiivseks, kui mis tahes uuritud katsetingimustes (vt punkt 33):
- vähemalt ühe katsekontsentratsiooni juures täheldatakse saadud väärtuse statistiliselt olulist suurenemist paralleelse negatiivse kontrollprooviga võrreldes;

- sobiva trenditestiga hindamisest nähtub, et see suurenemine on kontsentratsioonist sõltuv (vt punkt 33);
- ükski nendest tulemustest ei ole väljaspool labori varasemate negatiivse kontrollprooviga saadud tulemuste jaotust (nt väljaspool Poissoni jaotuse usaldusvahemikku usaldusnivool 95 %; vt punkt 48).

Kui kõik need kriteeriumid on täidetud, käsitatakse uuritavat kemikaali võimelisena põhjustama selles katsesüsteemis mutatsiooni. Soovitused kõige asjakohasemate statistiliste meetodite kohta on esitatud kirjanduses (66, 67).

66. Tingimusel, et kõik nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, loetakse uuritav kemikaal selgelt negatiivseks, kui kõikides uuritud katsetingimustes (vt punkt 33):

- ei täheldata ühegi katsekontsentratsiooni juures saadud väärtuse statistiliselt olulist suurenemist paralleelse negatiivse kontrollprooviga võrreldes;
- sobiva trenditestiga hindamisest nähtub, et kontsentratsioonist sõltuvat väärtuse suurenemist ei esine;
- kõik need tulemused on labori varasemate negatiivse kontrollprooviga saadud tulemuste jaotuse vahemikus (nt Poissoni jaotuse usaldusvahemikus usaldusnivool 95 %; vt punkt 48).

67. Sel juhul käsitatakse uuritavat kemikaali võimetuna põhjustama selles katsesüsteemis mutatsioone.

MLA ja TK6

68. Kui suurima kontsentratsiooni valimisel lähtutakse tsütotoksilisusest, tuleks suurim kontsentratsioon valida nii, et saavutataks suhteline kogukasv / suhteline ellujäämus 10–20 %. Ühine seisukoht on, et tuleb olla hoolikas niisuguste positiivsete tulemuste tõlgendamisel, mis on leitud suhtelise kogukasvu / suhtelise ellujäämuse vahemikus 10–20 %, ning et tulemust ei loeta positiivseks, kui muteerumissageduse suurenemine ilmnes üksnes 10 % või väiksema suhtelise kogukasvu / suhtelise ellujäämuse juures (kui seda hinnati) (2, 59).

69. Leidub asjaolusid, mille puhul täiendav teave võib olla abiks otsustamisel, et uuritav kemikaal ei ole mutageenne, kui ühegi kultuuriga ei saada suhtelise kogukasvu / suhtelise ellujäämuse väärtust vahemikus 10–20 %. Niisugused olukorrad on järgmised: 1) tõendid mutageensuse kohta puuduvad (st puudub doosi-vastuse seos, puuduvad paralleelse negatiivse kontrollprooviga saadud muteerumissagedusest või aja jooksul kogutud andmetest saadud taustväärtusest suuremad muteerumissagedused) andmepunktide seerias, mis on suhtelise kogukasvu / suhtelise ellujäämuse vahemikus 20–100 %, ning vähemalt üks andmepunkt on suhtelise kogukasvu / suhtelise ellujäämuse vahemikus 20–25 %; 2) tõendid mutageensuse

kohta puuduvad (st puudub doosi-vastuse seos, puuduvad paralleelse negatiivse kontrollprooviga saadud muteerumissagedusest või aja jooksul kogutud andmetest saadud taustväärtusest suuremad muteerumissagedused) andmepunktide seerias, mis on suhtelise kogukasvu / suhtelise ellujäämuse vahemikus 25–100 %, ning olemas on ka negatiivne andmepunkt, mis jääb veidi alla 10 % suhtelise kogukasvu / suhtelise ellujäämuse. Mõlemal juhul võib uuritava kemikaali lugeda negatiivseks.

70. Selgelt positiivset või negatiivset vastust ei ole vaja üle kontrollida.

71. Juhul, kui vastus ei ole eespool kirjeldatu kohaselt selgelt negatiivne ega selgelt positiivne ja/või kui eesmärk on aidata kindlaks teha tulemuse bioloogiline olulisus, tuleks andmete hindamiseks kasutada eksperdihinnangut ja/või täiendavaid uuringuid. Sellises olukorras võib olla kasulik teha korduskatse ja muuta vajaduse korral katsetingimusi (nt kontsentratsioonintervalli, et suurendada andmepunktide saamise tõenäosust suhtelise kogukasvu / suhtelise ellujäämuse vahemikus 10–20 %, või metabolismi aktiveerimise tingimusi (st S9 kontsentratsiooni või S9 päritolu) ja töötlemise kestust).

72. Harvadel juhtudel ei võimalda andmed isegi pärast täiendavaid uuringuid teha järeldust selle kohta, kas tulemus on positiivne või negatiivne. Seepärast tuleks sel juhul lugeda uuritava kemikaaliga saadud vastus ebaselgeks (seda tõlgendatakse positiivse ja negatiivse tulemuse võrdvõimalikkusena).

KATSEPROTOKOLL

73. Katseprotokollis tuleks esitada järgmine teave.

Uuritav kemikaal:

- allikas, partii number, aegumiskuupäev, kui on olemas;
- uuritava kemikaali püsivus, kui see on teada;
- uuritava kemikaali lahustuvus ja püsivus lahustis, kui see on teada;
- vastavalt vajadusele mõõtmistulemused söötme pH ja osmolaalsuse ning sademe tekke kohta pärast uuritava kemikaali lisamist.

Ühest koostisosast koosnev aine:

- füüsiline välimus, lahustuvus vees ja muud asjakohased füüsikalised-keemilised omadused;
- kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus, CASi number, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem, puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne.

Mitme koostisosaga aine, tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal ja segu:

- võimalikult täpne omaduste kirjeldus lähtuvalt koostisosade keemilisest määratlusest (vt eespool), kvantitatiivsest sisaldusest ja asjakohastest füüsikalis-keemilistest omadustest.

Lahusti:

- lahusti valimise põhjendus;
- lahusti protsentuaalne sisaldus lõppsöötmes.

Rakud:

labori tüvikultuuride puhul:

- rakkude tüüp ja päritolu ning nendega katselaboris tehtud toimingud;
- karüotüübi andmed ja/või kromosoomide modaalarv;
- rakukultuuride säilitamise meetodid;
- teave mükoplasma puudumise kohta;
- rakkude arvu kahekordistumise aeg.

Katsetingimused:

- kontsentratsioonide ja rakukultuuride arvu valiku põhjendus, sealhulgas näiteks andmed tsütotoksilisuse ja lahustuvuspiirangute kohta;
- söötme koostis, CO₂ kontsentratsioon, niiskusesisaldus;
- uuritava kemikaali kontsentratsioon, väljendatuna lõppkontsentratsioonina söötmes (nt µg/ml või mg/ml või mM);
- söötmele lisatud lahusti ja uuritava kemikaali kontsentratsioon (ja/või ruumala);
- inkubeerimistemperatuur;
- inkubeerimisaeg;
- töötamise kestus;
- rakutihedus töötamise ajal;
- metabolismi aktiveerimise süsteemi liik ja koostis (fraktsiooni S9 allikas, S9 segu valmistamise meetod, S9 segu ja S9 kontsentratsioon või ruumala lõppsöötmes, S9 kvaliteedikontrolli andmed);
- positiivsed ja negatiivsed kontrollained ja nende lõppkontsentratsioonid iga töötlemistingimuse puhul;

- ekspressiooniperioodi pikkus (samuti väljakülvatud rakkude arv ning vajaduse korral teave ümberkülvide ja söötmevahetusrežiimi kohta);
- selektiivaine identimisandmed ja kontsentratsioon;
- MLA korral tuleb näidata kasutatud variant (agar või mikrotiiterplaat);
- katse nõuetekohasuse kriteeriumid;
- eluvõimeliste ja muteerunud rakkude loendamiseks kasutatud meetodid;
- tsütotoksilisuse mõõtmiseks kasutatud meetodid;
- muu täiendav asjakohane teave tsütotoksilisuse ja kasutatud meetodi kohta;
- väljakülvamisele järgneva inkubeerimise kestus;
- kolooniate määratlus, milles on arvesse võetud kolooniate arvu ja tüüpi (sh „väikeste“ ja „suurte“ kolooniate kriteeriumid, vajaduse korral);
- uuringutulemuse positiivseks, negatiivseks või ebaselgeks liigitamise kriteeriumid;
- pH, osmolaalsuse (kui määratakse) ja sademe määramiseks kasutatud meetodid, kui on asjakohane.

Tulemused:

- töödeldud rakkude arv ja ümberkülvatud rakkude arv igas kultuuris;
- toksilisuse näitajad (MLA korral suhteline kogukasv ja TK6 korral suhteline ellujäämus);
- sadenemise ilmingud ja nende täheldamise aeg;
- selektiivainega ja selektiivaineta söötmesse külvatud rakkude arv;
- kolooniate arv selektiivaineta söötmes ja resistentsete kolooniate arv selektiivainega söötmes ning vastav muteerumissagedus;
- kolooniate suurus negatiivsetes ja positiivsete kontrollproovides ning kui uuritav kemikaal on positiivne, siis vähemalt ühe kontsentratsiooni juures, samuti vastavad muteerumissagedused;
- võimaluse korral andmed vastuse sõltuvuse kohta kontsentratsioonist;
- andmed paralleelsete negatiivsete (lahusti) kontrollproovide ja positiivsete kontrollproovide kohta (kontsentratsioonid ja lahustid);
- varasemate negatiivsete (lahusti) ja positiivsete kontrollproovide andmed (kontsentratsioonid ja lahustid), sh vahemikud, keskväärtused ja standardhälbed; kontrollkatsete arv, mille alusel varasemad andmed on saadud;

- statistilise analüüsi tulemused (iga kultuuri kohta eraldi ja vajaduse korral paralleelkultuuride koondandmed) ja vajaduse korral p-väärtused ning MLA korral GEF-hinnang.

Tulemuste arutelu

Järeldused

KIRJANDUS

- (1) Moore, M. M., Honma, M., Clements, J. (koostaja), 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. ja 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.*, nr 35 (3), lk 185–190.
- (2) Moore, M. M., Honma, M., Clements, J., Harrington-Brock, K., Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Collard, D., Fellows, M., Flanders, K., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Kraycer, J., McEnaney, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Oliver, Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Shimada, H. ja Stankowski, L.F. Jr. (2002), „Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: Follow-Up International Workshop on Genotoxicity Test Procedures, New Orleans, Louisiana, (Aprill 2000)“, *Environ. Mol. Mutagen.*, nr 40 (4), lk 292–299.
- (3) Moore, M. M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Delongchamp, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A., Wakuri, S. ja Yoshimura, I. (2003), „Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: International Workshop (Plymouth, UK) on Genotoxicity Test Procedures Workgroup Report“, *Mutation Res.*, nr 540, lk 127–140.
- (4) Moore, M. M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Delongchamp, R., Durward, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Lloyd, M., Majeska, J., Myhr, B., O'Donovan, M., Omori, T., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A.K., Van Goethem, F., Wakuri, S. ja 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.*, nr 47 (1), lk 1–5.
- (5) Moore, M. M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Clay, P., Doppalapudi, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Muster, W., Pant, K., Kidd, D.A., Lorge, E., Lloyd, M., Myhr, B., O'Donovan, M., Riach, C., Stankowski, L.F. Jr., Thakur A.K. ja 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.*, nr 627 (1), lk 36–40.

- (6) OECD (2016), Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014–2015. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 238. OECD, Paris.
- (7) Fellows M. D., Luker, T., Cooper, A. ja O'Donovan, M.R. (2012), „Unusual Structure-Genotoxicity Relationship in Mouse Lymphoma Cells Observed with a Series of Kinase Inhibitors“, *Mutation. Res.*, nr 746 (1), lk 21–28.
- (8) Honma, M., Momose, M., Sakamoto, H., Sofuni, T. ja Hayashi, M. (2001), „Spindol Poisons Induce Allelic Loss in Mouse Lymphoma Cells Through Mitotic Non-Disjunction“, *Mutation Res.*, nr 493 (1–2), lk 101–114.
- (9) Wang, J., Sawyer, J.R., Chen, L., Chen, T., Honma, M., Mei, N. ja Moore, M. M. (2009), „The Mouse Lymphoma Assay Detects Recombination, Deletion, and Aneuploidy“, *Toxicol. Sci.*, nr 109 (1), lk 96–105.
- (10) Applegate, M. L., Moore, M. M., Broder, C. B., Burrell, A. ja Hozier, J. C. (1990), „Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells“, *Proc. National. Academy. Sci. USA*, nr 87 (1), lk 51–55.
- (11) Hozier, J., Sawyer, J., Moore, M., Howard, B. ja Clive, D. (1981), „Cytogenetic Analysis of the L5178Y/TK^{+/−} Leads to TK^{−/−} Mouse Lymphoma Mutagenesis Assay System“, *Mutation Res.*, nr 84 (1), lk 169–181.
- (12) Hozier, J., Sawyer, J., Clive, D. ja Moore, M. M. (1985), „Chromosome 11 Aberrations in Small Colony L5178Y TK^{−/−} Mutants Early in their Clonal History“, *Mutation Res.*, nr 147 (5), lk 237–242.
- (13) Moore, M. M., Clive, D., Hozier, J. C., Howard, B. E., Batson, A. G., Turner, N. T. ja Sawyer, J. (1985), „Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFTr) Mutants of L5178Y/TK^{+/−} Mouse Lymphoma Cells“, *Mutation Res.*, nr 151 (1), lk 161–174.
- (14) Liber, H. L., Call, K. M. ja Little, J. B. (1987), „Molecular and Biochemical Analyses of Spontaneous and X-Ray-Induced Mutants in Human Lymphoblastoid Cells“, *Mutation Res.*, nr 178 (1), lk 143–153.

- (15) Li, C. Y., Yandell, D. W. ja Little, J. B. (1992), „Molecular Mechanisms of Spontaneous and Induced Loss of Heterozygosity in Human Cells *In Vitro*“, *Somat. Cell Mol. Genet.*, nr 18 (1), lk 77–87.
- (16) Honma, M., Hayashi, M. ja Sofuni, T. (1997), „Cytotoxic and Mutagenic Responses to X-Rays and Chemical Mutagens in Normal and P53-Mutated Human Lymphoblastoid Cells“, *Mutation. Res.*, nr 374 (1), lk 89–98.
- (17) Honma, M., Momose, M., Tanabe, H., Sakamoto, H., Yu, Y., Little, J.B., Sofuni, T. ja Hayashi, M. (2000), „Requirement of Wild-Type P53 Protein for Maintenance of Chromosomal Integrity“, *Mol. Carcinogen.*, nr 28 (4), lk 203–14.
- (18) Amundson, S. A. ja 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.*, nr 267 (1), lk 89–95.
- (19) Schisler, M. R., Moore, M. M. ja Gollapudi, B. B. (2013), „*In Vitro* Mouse Lymphoma (L5178Y TK^{+/−}-3.7.2C) Forward Mutation Assay“, *Protocols in Genotoxicity Assessment*, toim. A. Dhawan ja M. Bajpayee, Springer Protocols, Humana Press, lk 27–50.
- (20) Long, L. H., Kirkland, D., Whitwell, J. ja 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.*, nr 634 (1–2), lk 177–183.
- (21) Nessler, F., Simar-Meintier, S., Watzinger, M., Talahari, I. ja Marzin, D. (2008), „Characterization of the Genotoxicity of Nitrotriacetic Acid“, *Environ. Mol. Mutagen.*, nr 49 (6), lk 439–452.
- (22) Brusick, D. (1986), „Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion Concentrations“, *Environ. Mutagen.*, nr 8 (6), lk 879–886.
- (23) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. ja Okumura, K. (1992), „Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells“, *Mutation Res.*, nr 268 (2), lk 297–305.
- (24) Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M. Jr, Brusick, D., Ashby, J. ja Myhr, B. C. (1991), „Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9“, *Mutation Res.*, nr 257, lk 147–204.
- (25) Wang, J., Heflich, R. H. ja 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.*, nr 626 (1–2), lk 185–190.

- (26) Fischer, G. A. (1958), „Studies on the Culture of Leukemic Cells *In Vitro*“, *Ann. N.Y. Academy Sci.*, nr 76, lk 673–680.
- (27) Clive, D., Johnson, K. O., Spector, J. F. S., Batson, A. G. ja Brown, M. M. (1979), „Validation and Characterization of the L5178Y/TK+/- Mouse Lymphoma Mutagen Assay System“, *Mutation Res.*, nr 59(1), lk 61–108.
- (28) Sawyer, J., Moore, M. M., Clive, D. ja Hozier, J. (1985), „Cytogenetic Characterization of the L5178Y TK^{+/-} 3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line“, *Mutation Res.*, nr 147 (5), lk 243–253.
- (29) Sawyer J. R., Moore M. M. ja Hozier J. C. (1989), „High-Resolution Cytogenetic Characterization of the L5178Y TK^{+/-} Mouse Lymphoma Cell Line“, *Mutation Res.*, nr 214 (2), lk 181–193.
- (30) Sawyer, J. R., Binz, R. L., Wang, J. ja Moore, M. M. (2006), „Multicolor Spectral Karyotyping of the L5178Y TK^{+/-}-3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line“, *Environ. Mol. Mutagen.*, nr 47 (2), lk 127–131.
- (31) Fellows, M. D., McDermott, A., Clare, K. R., Doherty, A. ja 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.*, nr 55 (1), lk 35–42.
- (32) Storer, R. D., Jraynak, A. R., McKelvey, T. W., Elia, M. C., Goodrow, T. L. ja 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.*, nr 373 (2), lk 157–165.
- (33) Clark L. S., Harrington-Brock, K., Wang, J., Sargent, L., Lowry, D., Reynolds, S. H. ja 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.*, nr 19 (4), lk 263–268.
- (34) Skopek, T. R., Liber, H. L., Penman, B. W. ja 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.*, nr 84 (2), lk 411–416.

- (35) Honma, M. (2005), „Generation of Loss of Heterozygosity and its Dependency on P53 Status in Human Lymphoblastoid Cells“, *Environ. Mol. Mutagen.*, nr 45 (2–3): lk 162–176.
- (36) Xia, F., Wang, X., Wang, Y. H., Tsang, N. M., Yandell, D. W., Kelsey, K. T. ja 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.*, nr 55 (1), lk 12–15.
- (37) Lorge, E., Moore, M., Clements, J., O'Donovan, M., 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.“ (Pooleliolev käsikiri.)
- (38) Lloyd, M. ja Kidd, D. (2012), „The Mouse Lymphoma Assay“, *Springer Protocols: Methods in Molecular Biology 817, Genetic Toxicology Principles and Methods*, toim. Parry ja Parry, Humana Press, ISBN 978-1-61779-420-9, lk 35–54.
- (39) Mei, N., Guo, X. ja Moore M. M. (2014), „Methods for Using the Mouse Lymphoma Assay to Screen for Chemical Mutagenicity and Photo-Mutagenicity“ väljaandes *Optimization in Drug Discover: In Vitro Methods*, toim. Yan, Z. ja Caldwell, 2. trükk, GW; Humana Press, Totowa, NJ.
- (40) Liber, H. L. ja Thilly, W. G. (1982), „Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploidhuman Lymphoblasts“, *Mutation Res.*, nr 94 (2), lk 467–485.
- (41) Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Hay, R., Merten, O. W., Price, A., Schechtman, L., Stacey, G. ja Stokes, W. (2005), „Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice“, *ATLA*, nr 33 (3), lk 261–287.
- (42) Moore, M. M. ja Howard, B. E. (1982), „Quantitation of Small Colony Trifluorothymidine-Resistant Mutants of L5178Y/TK+/- Mouse Lymphoma Cells in RPMI-1640 Medium“, *Mutation Res.*, nr 104 (4–5), lk 287–294.
- (43) Ames, B. N., McCann, J. ja Yamasaki, E. (1975), „Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test“, *Mutation Res.*, nr 31 (6), lk 347–364.

- (44) Maron, D. M. ja Ames, B. N. (1983), „Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test“, *Mutation Res.*, nr 113 (3–4), lk 173–215.
- (45) Natarajan, A. T., Tate, A. D., Van Buul, P. P. W., Meijers, M. ja 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.*, nr 37 (1), lk 83–90.
- (46) Matsuoka, A., Hayashi, M. ja Ishidate, M. Jr. (1979), „Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*“, *Mutation Res.*, nr 66 (3), lk 277–290.
- (47) Ong, T. M. *et al.* (1980), „Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver“, *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, nr 4 (1), lk 55–65.
- (48) Elliott, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. ja Wolf, R. C. (1992), „Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays“, *Mutagen.*, nr 7 (3), lk 175–177.
- (49) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. ja Sugimura, T. (1976), „A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems“ väljaandes *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, toim. de Serres F. J. *et al.*, Elsevier, North-Holland, lk 85–88.
- (50) Galloway, S. M. *et al.* (1994), „Report from Working Group on *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations“, *Mutation Res.*, nr 312 (3), lk 241–261.
- (51) Johnson, T. E., Umbenhauer, D. R. ja 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.*, nr 28 (1), lk 51–59.
- (52) UNEP (2001), Püsivate orgaaniliste saasteainete Stockholmi konventsioon. Ühinenud Rahvaste Organisatsioon Keskkonnaprogramm (UNEP).

- (53) Krahn, D. F., Barsky, F. C. ja McCooey, K. T. (1982), „CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids“ väljaandes *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, toim. Tice, R. R., Costa, D. L. ja Schaich, K. M., New York, Plenum, lk 91–103.
- (54) Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P. ja 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.*, nr 5 (6), lk 795–801.
- (55) Asakura, M., Sasaki, T., Sugiyama, T., Arito, H., Fukushima, S. ja Matsushima, T. (2008), „An Improved System for Exposure of Cultured Mammalian Cells to Gaseous Compounds in the Chromosomal Aberration Assay“, *Mutation Res.*, nr 652 (2), lk 122–130.
- (56) Arlett, C. F. *et al.* (1989), „Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation“ väljaandes *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, toim. Kirkland, D. J., Cambridge University Press, lk 66–101.
- (57) Morita, T., Honma, M. ja 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.*, nr 741 (1–2), lk 32–56.
- (58) Brookmire, L., Chen, J. J. ja Levy, D. D. (2013), „Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay“, *Environ. Mol. Mutagen.*, nr 54 (1), lk 36–43.
- (59) USA Toidu- ja Ravimiamet (2012), International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Kättesaadav aadressil [<https://www.federalregister.gov/a/2012-13774>].
- (60) Honma, M. ja 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.*, nr 52 (5), lk 373–384.
- (61) Moore-Brown, M. M., Clive, D., Howard, B. E., Batson, A. G. ja 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.*, nr 85 (5), lk 363–378.
- (62) Liber, H. L., Yandell, D. W. ja 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.*, nr 216 (1), lk 9–17.

- (63) Furth, E. E., Thilly, W. G., Penman, B. W., Liber, H. L. ja Rand, W. M. (1981), „Quantitative Assay for Mutation in Diploid Human Lymphoblasts Using Microtiter Plates“, *Anal. Biochem.*, nr 110 (1), lk 1–8.
- (64) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H. J. ja Thybaud, V. (2011), „Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data“, *Mutation Res.*, nr 723 (2), lk 87–90.
- (65) Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement*. 2. trükk. John Wiley & Sons, New York.
- (66) OECD (2014), *Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines*. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr 199), Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (67) Fleiss, J. L., Levin, B. ja Paik, M. C. (2003), *Statistical Methods for Rates and Proportions*. 3. trükk. John Wiley & Sons, New York.

1. liide

MÕISTED

Aneugeen: iga kemikaal või protsess, mis põhjustab interaktsiooni kaudu mitootilise või meiotilise rakujagunemise tsükli komponentidega rakkude või organismide aneuploidsust.

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

Aluspaarivahetust põhjustav mutageen: kemikaal, mis kutsub esile aluspaari vahetuse DNAs.

Kemikaal: aine või segu.

Kloonimistõhusus: väikesel tihedusel välja külvatud rakkude hulgas esinevate selliste rakkude protsentuaalne osakaal, mis on võimelised moodustama loendatava koloonia.

Klastogeen: iga kemikaal, mis põhjustab rakkude või organismide populatsioonis struktuurseid kromosoomiaberratsioone.

Tsütotoksilisus: käesoleva katsemeetodi kohaste katsete puhul on tsütotoksilisus määratletud kui suhtelise kogukasvu (MLA korral) või suhtelise ellujäämuse (TK6 korral) vähenemine.

Otsemutatsioon: geenimutatsioon, mille puhul algne geen võtab mutantse vormi ja mille tulemusena muutub või kaob asjaomase kodeeritud valgu ensümaatiline aktiivsus või funktsioon.

Raaminihet põhjustav mutageen: kemikaal, mille mõjul lisatakse DNA molekuli või eemaldatakse sealt üks või mitu aluspaari.

Genotoksilisus: üldmõiste, mis hõlmab DNA ja kromosoomide igat liiki kahjustusi, sealhulgas DNA-ahela katkemisi, adukte, ümberkorraldusi, mutatsioone, kromosoomiaberratsioone ja aneuploidsust põhjustavaid omadusi. Genotoksiline mõju ei väljendu alati mutatsiooni või püsiva kromosoomikahjustusena.

Mitootiline rekombinatsioon: mitoosi ajal homoloogsete kromatiidide vahel toimuv rekombinatsioon, millega võib kaasneda DNA kahe ahela katkemine või heterosügootsuse kadu.

Mutageensus: omadus, mis põhjustab pärilikke muutusi geenide DNA aluspaaride järjestuses või kromosoomide struktuuris (kromosoomiaberratsioonid).

Muteerumissagedus (MF): vaadeldud mutantrakkude arv, mis on jagatud elujõuliste rakkude arvuga.

Fenotüübi ekspressiooniaeg: töötlusele järgnev aeg, mille vältel geneetiline muutus kinnistub genoomis ja mis tahes varem esinenud geeniproduktide sisaldus väheneb nii palju, et asjaomane fenotüübiline tunnus muutub.

Suhteline ellujäämus (RS): näitaja, mille kaudu TK6 korral väljendatakse töötlusest tulenevat tsütotoksilisust. See on vahetult pärast töötlemist välja külvatud rakkude kloonimise tõhusus (CE), mida on kohandatud rakkude arvu võimaliku vähenemise suhtes töötlemise ajal, võrrelduna negatiivse kontrollprooviga leitud kloonimistõhususega.

Suhteline suspensioonikasv (RSG): MLA korral katsekultuuri kogu suhteline suspensioonikasv kahe päeva jooksul, võrrelduna negatiivse/lahusti kontrollprooviga leitud kogu suspensioonikasvuga kahe päeva jooksul (Clive ja Spector, 1975). RSG peaks hõlmama katsekultuuri suhtelist kasvu võrrelduna negatiivse/lahusti kontrollprooviga töötlemisperioodi jooksul.

Suhteline kogukasv (RTG): näitaja, mille kaudu MLA korral väljendatakse töötlusest tulenevat tsütotoksilisust. Sellega väljendatakse katsekultuuride suhtelist (kandeaine kontrollprooviga võrreldud) kasvu katse töötlemis-, kahepäevases avaldumis- ja mutantide selektiivse kloonimise faasis. Iga katsekultuuri RSG korrutatakse katsekultuuri suhtelise kloonimistõhususega mutantide selekteerimise ajal ning väljendatakse negatiivse/kandeaine kontrollprooviga leitud kloonimistõhususe suhtes (Clive ja Spector, 1975).

Maksafraktsioon S9: maksa homogenaadi supernatant, mis on eraldatud pärast tsentrifuugimist 9000g juures, st maksa toorekstrakt.

S9 segu: maksafraktsiooni S9 ja metaboolsete ensüümide aktiivsuse tagamiseks vajalike kofaktorite segu.

Suspensioonikasv (SG): rakkude arvu kordne suurenemine MLA töötlemis- ja avaldumisfaasi jooksul. SG arvutamiseks korrutatakse lühiajalise töötlemise (3 või 4 tundi) korral kordne kasv 1. päeval kordse kasvuga 2. päeval. Kui kasutati 24-tunnist töötlemist, on SG 24 tunnise töötlemisaja kordse kasvu korrutis 1. ja 2. avaldumispäeva kordsete kasvudega.

Lahusti kontrollproov: üldmõiste, millega tähistatakse kontrollkultuuri, kuhu on lisatud üksnes uuritava kemikaali lahustamiseks kasutatud lahustit.

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

Töötlemata kontrollproov: töötlemata kontrollproovid on rakukultuurid, mida ei ole töödeldud (st ei uuritava kemikaali ega lahustiga), kuid mida on käideldud samaaegselt samal viisil kui uuritava kemikaaliga töödeldud rakukultuure.

2. liide

VALEMID

Tsütotoksilisus

Nii MLA agari- kui ka mikrotiiterplaadi variandi korral

Tsütotoksilisus on määratletud suhtelise kogukasvuna (RTG), mis hõlmab suhtelise kogukasvu (RSG) 2-päevase avaldumisperioodi jooksul ja mutantide selekteerimise ajal leitud suhtelise kloonimistõhususe (RCE). Nii RTG, RSG kui ka RCE väljendatakse protsentides.

RSG arvutamine: Suspensioonikasv SG_1 on 0-päeva ja 1. päeva vaheline kasvumäär (rakkude kontsentratsiooni 1. päeval / rakkude kontsentratsioon 0-päeval) ja suspensioonikasv SG_2 on 1. päeva ja 2. päeva vaheline kasvumäär (rakkude kontsentratsioon 2. päeval / rakkude kontsentratsioon 1. päeval). RSG on töödeldud kultuuri kogu SG ($SG_1 \times SG_2$) võrrelduna töötlemata/lahusti kontrollproovi omaga. Seega: $RSG = [SG_{1(uuritav)} \times SG_{2(uuritav)}] / [SG_{1(kontrollproov)} \times SG_{2(kontrollproov)}]$. SG_1 arvutamisel tuleb lähtuda rakkude algsest kontsentratsioonist, mida kasutati rakkude töötlemise alguses. Seega võetakse arvesse rakkude töötlemise ajal katsekultuuris ilmneva erineva tsütotoksilisi toimeid.

RCE on katsekultuuri suhteline kloonimistõhusus võrreldes töötlemata/lahusti kontrollproovi suhtelise kloonimistõhususega mutantide selekteerimise ajal.

Suhteline kogukasv (RTG): $RTG = RSG \times RCE$

TK6

Suhteline ellujäämus (RS):

tsütotoksilisust hinnatakse suhtelise ellujäämusega, st vahetult pärast töötlemist välja külvatud rakkude kloonimise tõhususega, kohandatuna rakkude arvu võimaliku vähenemise suhtes töötlemise käigus ja võrrelduna kloonimistõhususega negatiivsete kontrollproovide puhul, mille ellujäämuseks loetakse 100 %. Kohandusarvutus, mis võtab arvesse rakkude arvu vähenemist töötlemise ajal, on järgmine:

$$\text{Kohandatud CE} = CE \times \frac{\text{Rakkude arv töötlemise lõpus}}{\text{Rakkude arv töötlemise alguses}}$$

Uuritava kemikaaliga töödeldud kultuuri RS arvutatakse järgmiselt:

$$RS = \frac{\text{Kohandatud CE töödeldud kultuuris}}{\text{Kohandatud CE lahusti kontrollproovis}} \times 100$$

Muteerumissagedus MLA ja TK6 korral

Muteerumissagedus (MF) on mutantsete kolooniate kloonimistõhusus selektiivsöötmes (CE_M), mis on kohandatud selekteerimisaegse kloonimistõhususega selektiivaineta söötmes (CE_V). Seega $MF = CE_M/CE_V$. Nende kahe kloonimistõhususe arvutuskäigud on esitatud allpool kloonimise agari- ja mikrotiiterplaadimeetodi jaoks.

MLA agarivariant: MLA pehme agari variandi korral saadakse kolooniate arv mutantide selekteerimisplaadil (C_M) ja kolooniate arv selektiivaineta või kloonimistõhususe (eluvõimeliste rakkude arv) leidmise plaadil (C_V) vahetult kolooniaid loendades. Kui 600 rakku külvatakse kloonimistõhususe (CE) määramiseks mutantide selekteerimisplaatidele (CE_M) ja selektiivaineta või kloonimistõhususe (eluvõimeliste rakkude arv) määramise plaatidele (CE_V) ja mutantide selekteerimiseks kasutatakse 3×10^6 rakku, siis

$$CE_M = C_M / (3 \times 10^6) = (C_M / 3) \times 10^{-6}$$

$$CE_V = C_V / 600$$

MLA ja TK6 mikrotiiterplaadi variant: MLA ja TK6 mikrotiiterplaadi variandi korral arvutatakse C_M ja C_V korrutisena mikrotiiterplaadi süvendite koguarvust (TW) ja tõenäolisest kolooniate arvust süvendi kohta (P).

$$C_M = P_M \times TW_M$$

$$C_V = P_V \times TW_V$$

Lähtudes Poissoni jaotuse kujust, kui argument on null (Furth *et al.*, 1981), saab P avaldada järgmiselt:

$$P = -\ln(EW / TW),$$

kus Ew on tühjade süvendite arv ja Tw on süvendite koguarv. Niisiis:

$$CE_M = C_M / T_M = (P_M \times TW_M) / T_M$$

$$CE_V = C_V / T_V = (P_V \times TW_V) / T_V$$

MLA mikrotiiterplaadi variandi korral arvutatakse väikeste ja suurte kolooniate muteerumissagedused samal viisil, kasutades vastavalt väikeste ja suurte kolooniatega seotud tühjade süvendite arvu.

TK6 korral on väikeste ja suurte kolooniate muteerumissageduste aluseks vara tekkivad ja hilja tekkivad mutandid.

B.68. LÜHIAJALISE KOKKUPUUTE *IN VITRO* KATSEMEETOD SELLISTE KEMIKAALIDE KINDLAKSTEGEMISEKS, I) MIS TEKITAVAD RASKEID SILMAKAHJUSTUSI, JA II) MIDA EI OLE VAJA KLASSIFITSEERIDA SEOSSES SILMADE ÄRRITUSE VÕI RASKE SILMAKAHJUSTUSEGA

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 491 (2017). Lühiajalise kokkupuute katsemeetod on *in vitro* meetod, mida võib teatavatel asjaoludel ja teatavate piirangutega kasutada, et klassifitseerida ja märgistada kemikaale (aineid ja segusid), mis põhjustavad rasket silmakahjustust või silmade ärritust, nagu need on määratletud Ühinenud Rahvaste Organisatsiooni ühtses ülemaailmses kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteemis (GHS) (1) ning Euroopa Liidu määruses (EÜ) nr 1272/2008, mis käsitleb ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist (CLP-määrus)¹.
2. Paljude aastate jooksul on kemikaalidest tingitud silmakahjustuse ohu hindamiseks kasutatud peamiselt *in vivo* silmakatset küülikul (katsemeetod B.5 (8), samaväärne OECD katsejuhendiga nr 405). Üldiselt ollakse arvamusel, et lähitulevikus ei ole võimalik rasket silmakahjustust tekitava / silmi ärritava toime kogu ulatuse prognoosimisel eri kemikaaliklasside puhul ühegi alternatiivse *in vitro* katsega täielikult asendada *in vivo* silmakatset küülikul. Kuid astmelise katsetamise strateegia osana kasutatava mitme alternatiivse katsemeetodi strateegilise kombineerimisega võib siiski olla võimalik küüliku silmakatset (2) täielikult asendada. Ültalt-alla lähenemisviisi tuleks kasutada katsetes kemikaalidega, mille puhul olemasoleva teabe põhjal võib eeldada, et asjaomane kemikaal võib silma tugevasti ärritada või põhjustada raske silmakahjustuse. Alt-üles lähenemisviisi tuleks kasutada vastupidiselt katsetes kemikaalidega, millel puhul olemasoleva teabe põhjal võib eeldada, et asjaomane kemikaal ei põhjusta klassifitseerimiseks piisavat silmade ärritust. Kuigi ei peeta võimalikuks, et lühiajalise kokkupuute katsemeetod asendaks täielikult *in vivo* silmakatset küülikuga, sobib see kasutamiseks astmelise katsetamise strateegia osana õigusliku klassifitseerimise ja märgistamise jaoks näiteks ültalt-alla ja alt-üles lähenemisviisi puhul, et teha täiendava katsetamiseta kindlaks i) kemikaalid, mis põhjustavad raske silmakahjustuse (ÜRO GHSi / CLP-määruse kohane

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

1. kategooria) ja ii) kemikaalid (välja arvatud väga lenduvad ained ja kõik tahked kemikaalid peale pindaktiivsete ainete), mida ei ole vaja klassifitseerida seoses silmade ärrituse või raske silmakahjustusega (ÜRO GHSi / CLP-määruse kohane kategooria puudub) (1, 2). Kuid niisugune kemikaal, mille puhul lühiajalise kokkupuute katsemeetodiga ei prognoosita raske silmakahjustuse põhjustamist (ÜRO GHSi / CLP-määruse kohane 1. kategooria) ega ka ÜRO GHSi / CLP-määruse kohase kategooria puudumist (ei põhjusta rasket silmakahjustust ega silmade ärritust), vajab siiski täiendavat uurimist, et saaks määrata lõpliku klassifikatsiooni. Peale selle tuleks konsulteerida asjakohaste reguleerivate asutustega, enne kui lühiajalise kokkupuute katset hakatakse muu kui ÜRO GHSi / CLP-määruse klassifitseerimisskeemi korral kasutama alt-üles lähenemisviisi rakendamiseks. Kõige asjakohasema katsemeetodi valimist ja selle kasutamist tuleks vaadelda raske silmakahjustuse ja silmade ärrituse põhjustamise uurimiseks ja hindamiseks kasutatavaid kompleksseid lähenemisviise käsitleva OECD juhenddokumendi (14) kontekstis.
3. Käesoleva katsemeetodi eesmärk on kirjeldada eeskirju, mida kasutatakse, et hinnata uuritava kemikaali võimalikku ohtlikkust silmale selle võime põhjal kutsuda esile tsütotoksilisust lühiajalise kokkupuute meetodi kasutamisel. Kemikaalide tsütotoksiline mõju sarvkesta epiteelirakkudele on oluline toimemehhanism, mille tulemusena tekib sarvkesta epiteeli kahjustus ja silmade ärritus. Lühiajalise kokkupuute katsemeetodiga mõõdetakse rakkude eluvõimelisust vitaalvärvaine MTT (3-(4,5-dimetüültiasool-2-üül)-2,5-difenüültetrasooliumbromiid, tiasolüülsinine) ensümaatilise muundamise järgi siniseks formasaansoolaks, mis pärast rakkudest ekstraheerimist määratakse kvantitatiivselt (3). Saadud rakkude eluvõimelisust võrreldakse lahusti kontrollprooviga (suhteline eluvõimelisus) ja kasutatakse uuritavast kemikaalist tingitud võimaliku silmakahjustuse ohu hindamiseks. Uuritav kemikaal klassifitseeritakse ÜRO GHSi / CLP-määruse kohasesse 1. kategooriasse, kui nii 5 % kui ka 0,05 % kontsentratsiooni juures on rakkude eluvõimelisus alla 70 % või sellega võrdne. Kui rakkude eluvõimelisus nii 5 % kui ka 0,05 % kontsentratsiooni juures on üle 70 %, viidatakse kemikaalile kui ÜRO GHSi / CLP-määruse kohase kategooriata kemikaalile.
4. Käesolevas katsemeetodis kasutatakse terminit „uuritav kemikaal“ uurimisobjektile viitava terminina ja see ei ole seotud lühiajalise kokkupuute katsemeetodi kohaldatavusega ainete ja/või segude uurimiseks. Mõisted on esitatud liites.

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

5. Käesolev katsemeetod põhineb Kao Corporationi välja töötatud metoodikal (4), millega viidi läbi kaks eraldi valideerimisuuringut: ühe tegi Jaapani loomkatsete alternatiivide ühing (JSAAE) (5) ning teise Jaapani alternatiivmeetodite valideerimiskeskus (JaCVAM) (6). Vastastikuse eksperdihinnangu tegid Ameerika

Ühendriikide riikliku toksikoloogiaprogrammi (NTP) alternatiivsete toksikoloogiameetodite ametitevaheline keskus (National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, NICEATM) ja alternatiivmeetodite valideerimise ametitevaheline koordineerimiskomitee (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods, ICCVAM) (7) valideerimisuuringute aruannete ning katsemeetodi taustaülevaatedokumentide põhjal.

6. Kui lühiajalise kokkupuute katsemeetodit kasutatakse selliste kemikaalide (ainete ja segude) kindlakstegemiseks, mis tekitavad rasket silmakahjustust (ÜRO GHSi / CLP-määruse kohane 1. kategooria) (1), on lühiajalise kokkupuute katsemeetodil 125 kemikaali (nii ained kui ka segud) kohta saadud andmete kogutäpsus 83 % (104/125), valepositiivsete tulemuste määr on 1 % (1/86) ja valenegatiivsete tulemuste määr 51 % (20/39), võrreldes küüliku *in vivo* silmakatsega (7). Saadud valenegatiivsete tulemuste määr ei ole selles kontekstis kriitiline, sest kõiki uuritavaid kemikaale, mille puhul rakkude eluvõimelisus 5 % kontsentratsiooni juures on ≤ 70 % ja 0,05 % kontsentratsiooni juures > 70 %, uuritakse järgmiseks muude asjakohaselt valideeritud *in vitro* katsemeetoditega või viimase võimalusena, olenevalt regulatiivsetest nõuetest, küüliku *in vivo* silmakatsetes kooskõlas järjestikuse katsete tegemise strateegia ning hetkel soovitatava tõendite kaalukuse lähenemisviisiga (1, 8). Põhiliselt uuriti ühe koostisosaga aineid, kuigi piiratud kogus andmeid on olemas ka katsetest segudega. See katsemeetod on siiski tehniliselt kohaldatav mitme koostisosaga ainete ja segude uurimiseks. Enne kui kasutada seda katsemeetodit segu korral, et saada andmeid kavandatud regulatiivse eesmärgi jaoks, tuleb siiski kaaluda, kas see katse annab selle eesmärgi jaoks piisavaid tulemusi, ja kui annab, siis miks. Sellist kaalumist ei ole vaja, kui regulatiivne nõue eeldabki segu katsetamist. Lühiajalise kokkupuute katsemeetodil ei ole spetsiifilisi puudusi, kui seda kasutatakse nende uuritavate kemikaalide kindlakstegemisel, mis kuuluvad ÜRO GHSi / CLP-määruse kohaselt 1. kategooriasse. Teadlased võiksid kaaluda uuritavate kemikaalide puhul kõnealuse katsemeetodi kasutamist, kusjuures rakkude eluvõimelisus ≤ 70 % nii 5 % kui ka 0,05 % kontsentratsiooni juures tuleks lugeda tõendiks, et kemikaal põhjustab rasket silmakahjustust ja tuleks liigitada ÜRO GHSi / CLP-määruse kohaselt 1. kategooriasse ilma edasise katsete tegemiseta.
7. Kui lühiajalise kokkupuute katsemeetodit kasutatakse selliste kemikaalide (ainete ja segude) kindlakstegemiseks, mida ei ole vaja klassifitseerida seoses silmade ärrituse ja raske silmakahjustusega (ÜRO GHSi / CLP-määruse kohane kategooria puudub), on lühiajalise kokkupuute katsemeetodil 130 kemikaali (nii ained kui ka segud) kohta saadud andmete kogutäpsus 85 % (110/130), valenegatiivsete tulemuste määr on 12 % (9/73) ja valepositiivsete tulemuste määr 19 % (11/57), võrreldes küüliku *in vivo* silmakatsega (7). Kui andmestikust jäetakse välja väga lenduvad ained ja tahked ained

peale pindaktiivsete ainete, paraneb kogutäpsus 90 %-ni (92/102), valenegatiivsete tulemuste määra 2 %-ni (1/54) ja valepositiivsete tulemuste määr 19 %-ni (9/48) (7). Seega on lühiajalise kokkupuute katsemeetodi võimalik puudus nende kemikaalide kindlakstegemiseks kasutamise korral, mida ei ole vaja klassifitseerida seoses silmade ärrituse või raske silmakahjustusega (ÜRO GHSi / CLP-määruse kohane kategooria puudub), suur valepositiivsete tulemuste määr, kui tegemist on i) üle 6 kPa aururõhuga väga lenduvate ainetega ning ii) tahkete kemikaalidega (ained ja segud), välja arvatud pindaktiivsed ained ja ainult pindaktiivsetest ainetest koosnevad segud. Niisugused kemikaalid jäetakse lühiajalise kokkupuute katsemeetodi (7) kohaldamisvaldkonnast välja.

8. Lisaks punktides 6 ja 7 nimetatud kemikaalidele sisaldab lühiajalise kokkupuute katsemeetodiga saadud andmestik ettevõttesiseseid andmeid 40 segu kohta ning võrreldes Draize'i *in vivo* silmakatsega on nende andmete täpsus 88 % (35/40), valepositiivsete tulemuste määr 50 % (5/10) ja valenegatiivsete tulemuste määr 0 % (0/30), kui prognoosida nende segude omadusi, mida ei ole vaja ÜRO GHSi / CLP-määruse klassifitseerimissüsteemide kohaselt klassifitseerida (9). Seega võib lühiajalise kokkupuute katsemeetodit kasutada ÜRO GHSi / CLP-määruse kohase kategooriata segude kindlakstegemiseks alt-üles lähenemisviisi järgides, välja arvatud muude tahkete segude korral kui ainult pindaktiivsetest ainetest koosnevad segud, kuna nendele laieneb tahkete ainetega seotud piirang. Peale selle tuleks segusid, mis sisaldavad üle 6 kPa aururõhuga aineid, hoolikalt hinnata, et vältida võimalikku alahindamist, ning see peab olema igal üksikjuhtumil põhjendatud.
9. Lühiajalise kokkupuute katsemeetodit ei saa kasutada nende uuritavate kemikaalide kindlakstegemiseks, mida klassifitseerida ÜRO GHSi / CLP-määruse kohasesse 2. kategooriasse, ÜRO GHSi kohasesse 2A (silmaärritus) või 2B kategooriasse (kerge silmaärritus); selle põhjuseks on nende ÜRO GHSi / CLP-määruse kohase 1. kategooria kemikaalide suur arv, mis on alahinnatud 2., 2A või 2B kategooriasse kuuluvaks, samuti nende ÜRO GHSi / CLP-määruse kohase kategooriata kemikaalide suur arv, mis on ülehinnatud 2., 2A või 2B kategooriasse kuuluvaks (7). Selleks võib vaja minna täiendavaid uuringuid muu sobiva meetodiga.
10. Lühiajalise kokkupuute meetod sobib uuritavate kemikaalide puhul, mis lahustuvad füsioloogilises lahuses, 5 % dimetüülsulfoksiidisisaldusega füsioloogilises lahuses või mineraalõlis või suspendeeruvad nendes ühtlaselt vähemalt viieks minutiks. Lühiajalise kokkupuute meetod ei sobi uuritavate kemikaalide puhul, mis füsioloogilises lahuses, 5 % dimetüülsulfoksiidisisaldusega füsioloogilises lahuses või mineraalõlis ei lahustu ega nendes vähemalt viieks minutiks ühtlaselt ei suspendeeru. Mineraalõli kasutamine lühiajalise kokkupuute meetodi korral on võimalik lühiajalise kokkupuute tõttu. Seega sobib lühiajalise kokkupuute meetod vees lahustumatute uuritavate kemikaalide (nt pikaahelalised rasvhapped või ketoonid) võimaliku silmale

ohtlikkuse hindamiseks tingimusel, et kõnealused kemikaalid segunevad vähemalt ühega kolmest eespool soovitatud lahustist (4).

11. Käesolevas katsemeetodis kasutatakse terminit „uuritav kemikaal“ uurimisobjektile viitava terminina¹ ja see ei ole seotud lühiajalise kokkupuute katsemeetodi kohaldatavusega ainete ja/või segude uurimiseks.

KATSE PÕHIMÕTE

12. Lühiajalise kokkupuute katsemeetod on tsütotoksilisusel põhinev *in vitro* meetod, mis viiakse läbi Taani riikliku seerumiinstituudi küüliku sarvkesta (Statens Seruminstitut Rabbit Cornea – SIRC) rakkude konfluentse monokihiga, mis kasvatatakse 96 süvendiga, polükarbonaadist mikrotiiterplaadil (4). Pärast 5-minutist kokkupuudet uuritava kemikaaliga määratakse tsütotoksilisus kvantitatiivselt SIRC-rakkude suhtelise eluvõimelisusena MTT-katsel (4). Rakkude vähenenud eluvõimelisuse alusel prognoositakse silmakahjustusi põhjustavat võimalikku kahjulikku mõju.
13. On teatatud, et 80 % küüliku silma tilgutatud lahusest väljutatakse sidekestakoti kaudu kolme kuni nelja minuti jooksul ning üle 80 % inimese silma tilgutatud lahusest väljutatakse ühe kuni kahe minuti jooksul (10). Lühiajalise kokkupuute katsemeetodiga on püütud neid kokkupuuteaegu ühtlustada ning kasutatud tsütotoksilisust näitajana, mille alusel hinnata pärast 5-minutist kokkupuudet uuritava kemikaaliga SIRC-rakkudele tekitatud kahjustuste ulatust.

PÄDEVUSE TÕENDAMINE

14. Enne käesoleval katsemeetodil põhineva lühiajalise kokkupuute meetodi rutiinset kasutamist tuleb laboril tõendada oma tehnilist pädevust, klassifitseerides õigesti tabelis 1 soovitatud üksteist ainet. Need ained on valitud nii, et need esindavad rasket silmakahjustust või silmade ärritust tekitavate ainete põhjustatud reaktsioonide täielikku vahemikku, mis põhineb küüliku silma *in vivo* katse (katsemeetod 405) ja ÜRO GHSi / CLP-määruse kohase klassifitseerimissüsteemi tulemustel (1). Teisteks valikukriteeriumideks olid ainete kaubanduslik kättesaadavus, kvaliteetsete võrdlusandmete kättesaadavus *in vivo* katsete kohta ning kvaliteetsete võrdlusandmete kättesaadavus lühiajalise kokkupuute meetodil tehtud *in vitro* katsete kohta (3). Olukorras, kus loetletud aine ei ole kättesaadav, või kui see on põhjendatud, võib

¹ 2013. aasta juunis lepidi ühiskoosolekul kokku, et võimaluse korral kasutatakse uute ja ajakohastatud katsemeetodite kirjeldustes uurimisobjektile viitamiseks järjepidevamalt terminit „uuritav kemikaal“.

kasutada muud ainet, mille puhul on kättesaadavad piisavad võrdlusandmed *in vivo* ja *in vitro* katsete kohta, eeldusel, et järgitakse eespool kirjeldatud kriteeriumeid.

Tabel 1. Pädevuse tõendamise ainete loend

Aine	CASi nr	Aineklass ¹	Füüsikaline olek	<i>In vivo</i> katsel määratud ÜRO GHSi /CLP-määruse kohane kategooria ²	Lühiajalise kokkupuute katsel kasutatud lahusti	Lühiajalise kokkupuute katsel määratud ÜRO GHSi /CLP-määruse kohane kategooria
Bensalkooniumkloriid (10 % vesilahus)	8001-54-5	Ooniumühend	Vedel	1. kategooria	Füsioloogiline lahus	1. kategooria
Triton X-100 (100 %)	9002-93-1	Eeter	Vedel	1. kategooria	Füsioloogiline lahus	1. kategooria
Happeline punane 92	18472-87-2	Heterotsüklikne ühend; broomiühend; klooriühend	Tahke	1. kategooria	Füsioloogiline lahus	1. kategooria
Naatriumhüdroksiid	1310-73-2	Leelis; anorgaaniline aine	Tahke	1. kategooria ³	Füsioloogiline lahus	1. kategooria
Butürolaktoon	96-48-0	Laktoon; heterotsüklikne ühend	Vedel	2A kategooria (CLP-määruse kohane 2. kategooria)	Füsioloogiline lahus	Prognoosida ei ole võimalik
1-oktanool	111-87-5	Alkohol	Vedel	2A/B kategooria ⁴ (CLP-määruse kohane 2. kategooria)	Mineraalõli	Prognoosida ei ole võimalik
Tsüklopentanol	96-41-3	Alkohol; süsivesinik (tsüklikline)	Vedel	2A/B kategooria ⁵ (CLP-määruse kohane 2. kategooria)	Füsioloogiline lahus	Prognoosida ei ole võimalik
2-etoksüetüülatsetaat	111-15-9	Alkohol; eeter	Vedel	Kategooriata	Füsioloogiline lahus	Kategooriata

Dodekaan	112-40-3	Süsivesinik (atsükliline)	Vedel	Kategooriata	Mineraalõli	Kategooriat a
Metüülisobutüülketoon	108-10-1	Ketoon	Vedel	Kategooriata	Mineraalõli	Kategooriat a
N,N-dimetüülguanidiinsulfaat	598-65-2	Amidiin Väävliühend	Tahke	Kategooriata	Füsioloogiline lahus	Kategooriat a

Lühendid: CASi nr = Chemical Abstracts Service'i registrinumber

¹Aineklasside määramisel kasutati NICEATMi varem avaldatud materjalist saadud teavet ning kui see ei olnud kättesaadav, siis USA riikliku meditsiiniraamatukogu (National Library of Medicine) tesaaurust MeSH® (Medical Subject Headings) (andmebaasi ChemIDplus® kaudu, kättesaadav veebisaidil <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>) ning NICEATMi määratlusi.

²Põhineb küüliku *in vivo* silmakatse (OECD katsejuhend nr 405) tulemustel ning selles kasutatakse ÜRO GHSi / CLP-määruse kohast klassifikatsiooni (1).

³Klassifitseeritud 1. kategooriasse 100 % naatriumhüdroksiidi nahasöövitussuutlikkuse (loetletud OECD katsejuhendis 435 pädevuse tõendamise kemikaalina, millel on nahasöövitussuutlikkuse) ja ÜRO GHSi / CLP-määruse kohaselt 1. kategooriasse klassifitseerimise kriteeriumi alusel (1).

⁴Klassifitseerimine 2A või 2B kategooriasse oleneb selle ÜRO GHSi kriteeriumi tõlgendusest, mille alusel neid kahte kategooriat eristatakse, st 7. päeval peab mõju avalduma veel vastavalt kahel või neljal loomal kuuest; viimasel juhul klassifitseeritakse kemikaal 2A kategooriasse. *In vivo* katsetel saadud andmestik hõlmab kaht uuringut, millest kummaski kasutati kolme looma. Ühes uuringus ilmnisid 7. päeval mõjud kahel loomal kolmest, mis klassifitseerimist õigustab 2A kategooriasse (11), kuid teises uuringus olid kõigil kolmel loomal 7. päevaks kõik näitajad saavutanud nulltaseme, mis õigustab klassifitseerimist 2B kategooriasse (12).

⁵Klassifitseerimine 2A või 2B kategooriasse oleneb selle ÜRO GHSi kriteeriumi tõlgendusest, mille alusel neid kahte kategooriat eristatakse, st 7. päeval peab mõju avalduma veel vastavalt ühel või kahel loomal kolmest; viimasel juhul klassifitseeritakse kemikaal 2A kategooriasse. *In vivo* uuringus kasutati kolme looma. Kõik näitajad peale sarvkesta läbipaistmatus ja sidekesta punetuse ühel loomal saavutasid hiljemalt 7. päevaks nulltaseme. Ühel loomal, kes ei paranenud täielikult 7. päevaks, oli 7. päeval sarvkesta läbipaistmatus aste 1 ja sidekesta punetuse aste 1, mis paranesid täielikult 14. päevaks (11).

KATSE KÄIK

Rakkude monokihi valmistamine

15. Lühiajalise kokkupuute katsemeetodi rakendamiseks tuleks kasutada küüliku sarvkesta rakkude SIRC-liini. Soovitav on soetada SIRC-rakud usaldusväärsest rakupangast, näiteks USA tüüpkultuuride kollektsioonist (American Type Culture Collection), tootekood CCL60.
16. SIRC-rakke kasvatatakse 37 °C juures reguleeritud õhuniiskusega 5 % CO₂-sisaldusega atmosfääris kultuurikolvis, mis sisaldab kasvusöödet, mis koosneb Eagle'i essentsiaalsest minimaalsöötmest (MEM), millele on lisatud 10 % veise loote seerumit (FBS), 2 mM L-glutamiini, 50–100 ühikut/ml penitsilliini ja 50–100 µg/ml streptomütsiini. Rakud, mis on saavutanud kultuurikolvis konfluentsuse, eraldatakse trüpsiini etüleendiamiintetraaadikahappe lahusega, kasutada võib rakukaabitsat. Enne

rutiinanalüüsis kasutamist kasvatatakse rakke (nt 2–3 passaaži) kultuurikolvis ning need ei tohiks pärast sulatamist läbida üle 25 passaaži.

17. Lühiajalise kokkupuute katses kasutamiseks valmis rakud külvatakse sobiva tihedusega 96 süvendiga plaatidesse. Kui kultuuri ruumala on 200 µl, on rakkude soovitatav külvitihedus $6,0 \times 10^3$ rakku süvendis, kui rakke kasutatakse neli päeva pärast külvamist, või $3,0 \times 10^3$ rakku süvendis, kui rakke kasutatakse viis päeva pärast külvamist. Lühiajalise kokkupuute katses kasutatavad rakud, mis külvatakse kasvusöötmesse sobiva tihedusega, saavutavad katse läbiviimise ajaks, st 4. või 5. külvijärgseks päevaks üle 80 % konfluentsuse.

Uuritavate kemikaalide ja kontrollainete kasutamine

18. Uuritavate kemikaalide lahustamiseks või suspendeerimiseks tuleks esmajoones valida füsioloogiline lahus. Kui uuritavad kemikaalid lahustuvad füsioloogilises lahuses halvasti või neid ei saa selles vähemalt viieks minutiks lahustada või ühtlaselt suspendeerida, tuleks teise lahustina valida 5 % DMSO (CASi nr 67-68-5) sisaldusega füsioloogiline lahus. Nende uuritavate kemikaalide jaoks, mida ei saa vähemalt viieks minutiks lahustada või ühtlaselt suspendeerida ei füsioloogilises lahuses ega 5 % DMSO-sisaldusega füsioloogilises lahuses, kasutatakse kolmanda valikuna mineraalõli (CASi nr 8042-47-5).
19. Uuritavad kemikaalid lahustatakse või suspendeeritakse valitud lahustis ühtlaselt 5 % kontsentratsiooni (massiprotsent) juures ning valmistatakse järjestikuste 10-kordsete lahjendamiste teel 0,5 % ja 0,05 % kontsentratsiooniga lahused. Iga uuritava kemikaaliga viiakse katse läbi nii 5 % kui ka 0,05 % kontsentratsiooni juures. 96 süvendiga plaadis kasvatatud rakud viiakse toatemperatuuril viieks minutiks kokkupuutesse uuritava kemikaali lahuse või suspensiooniga, mille kontsentratsioon on kas 5 % või 0,05 % ja mida lisatakse 200 µl süvendi kohta. Uuritavaid kemikaale (ühe või mitme koostisainega ained või segud) käsitletakse nende puhtusastet arvestamata puhaste ainetena ning need lahustatakse või suspendeeritakse vastavalt meetodis esitatud juhiste.
20. Punktis 16 kirjeldatud kasvusöödet kasutatakse söötmega kontrolliks iga korduskatse igas plaadis. Peale selle tuleb rakud iga korduskatse igas plaadis viia kokkupuutesse ka lahusti kontrollproovidega. On kindlaks tehtud, et punktis 18 loetletud lahustitel ei ole kahjulikku mõju SIRC-rakkude eluvõimelisusele.
21. Lühiajalise kokkupuute katsemeetodi korral kasutatakse iga korduskatse igas plaadis positiivseks kontrolliks 0,01 % naatriumlaurüülsulfaadisisaldusega füsioloogilist lahust. Positiivse kontrolli rakkude eluvõimelisuse arvutamiseks peab iga korduskatse iga plaat hõlmama ka lahusti kontrollproovi füsioloogilise lahusega.

22. Tühiproov on vajalik optilise tiheduse kompensatsiooni määramiseks ja seda tuleks kontrollida süvendites, mis sisaldavad ainult fosfaadiga puhverdatud füsioloogilist lahust (PBS) ega sisalda kaltsiumi, magneesiumi ega rakke.
23. Igat proovi (uuritava kemikaali 5 % ja 0,05 % lahus, lahusti kontrollproov, söötme kontrollproov ja positiivne kontroll) tuleb igas korduskatses analüüsida kolme paralleelproovina, viies rakud toatemperatuuril viieks minutiks kokku 200 µl asjaomase uuritava või kontrollkemikaaliga.
24. Võrdlusained võimaldavad hinnata teatavasse kemikaali- või tooteklassi kuuluva uurimata kemikaali omadust põhjustada silmade ärritust või hinnata teatava silmi ärritava aine mõju tugevust teatavas ärritava toime vahemikus.

Raku eluvõimelisuse mõõtmine

25. Pärast kokkupuudet pestakse rakke kaks korda 200 µl PBSiga ja lisatakse 200 µl MTT lahust (0,5 mg MTTd 1 ml kasvusöötme kohta). Pärast kahetunnise reaktsiooniaja möödumist inkubaatoris (37 °C, 5 % CO₂) MTT lahus dekanteeritakse ja lisatakse MTT formasaani ekstraheerimiseks 200 µl 0,04 N vesinikkloriidhappe lahust isopropanoolis, lastakse lahusel 60 minutit pimedas toatemperatuuril seista ning mõõdetakse plaadilugeriga neelduvus MTT formasaani lahuses lainepikkusel 570 nm. Uuritavate kemikaalide segav mõju MTT-katses (värvainete või MTT otseste redutseerijate puhul) esineb ainult juhul, kui uuritavasse süsteemi jääb pärast kokkupuutejärgset pesu märkimisväärne kogus uuritavat kemikaali. Seda juhtub inimese kolmemõõtmelise rekonstrueeritud sarvkesta või inimese kolmemõõtmelise rekonstrueeritud epidermise kudede puhul, kuid lühiajalise kokkupuute katsemeetodis kasutatud kahemõõtmeliste rakukultuuride puhul on see tähtsusetu.

Tulemuste tõlgendamine ja prognoosimismudel

26. Iga uuritava kemikaali kohta saadud optilise tiheduse (OD) väärtusi kasutatakse selleks, et arvutada rakkude eluvõimelisus lahusti kontrollproovi suhtes, mille puhul eluvõimelisuseks loetakse 100 %. Rakkude suhtelist eluvõimelisust väljendatakse protsentides ning see saadakse, jagades uuritava kemikaali optilise tiheduse väärtuse lahusti kontrollproovi omaga, kusjuures eelnevalt on neist mõlemast lahutatud tühiproovi optilise tiheduse väärtus.

$$\text{Rakkude eluvõimelisus (\%)} = \frac{(\text{uuritava kemikaali } OD_{570}) - (\text{tühiproovi } OD_{570})}{(\text{lahusti kontrolli } OD_{570}) - (\text{tühiproovi } OD_{570})} \times 100$$

Samamoodi väljendatakse protsentides rakkude suhtelist eluvõimelisust igas lahusti kontrollproovis ning see saadakse, jagades iga lahusti kontrollproovi optilise tiheduse väärtuse söötme kontrollproovi omaga, kusjuures eelnevalt on neist mõlemast lahutatud tühiproovi optilise tiheduse väärtus.

27. Läbi tuleb viia kolm sõltumatut korduskatset, millest igaüks toimub paralleelselt kolme süvendiga (*st* $n=9$). Rakkude suhtelise eluvõimelisuse aritmeetilise keskmise arvutamiseks kasutatakse sõltumatutel korduskatsetel iga uuritava kemikaali ja lahustiga kontrollprooviga kolmes süvendis saadud tulemuste aritmeetilist keskmist. Rakkude eluvõimelisuse lõplik aritmeetiline keskmine arvutatakse kolme sõltumatu korduskatse põhjal.
28. Rakkude eluvõimelisuse läviväärtused, mille järgi uuritavaid kemikaale, mis põhjustavad rasket silmakahjustust (ÜRO GHSi / CLP-määruse kohane 1. kategooria), eristatakse uuritavatest kemikaalidest, mida ei ole vaja klassifitseerida seoses silmade ärrituse või raske silmakahjustusega (ÜRO GHSi / CLP-määruse kohase kategooriata kemikaal), on esitatud allpool.

Tabel 2. Lühiajalise kokkupuute katsemeetodi prognoosimismudel

Rakkude eluvõimelisus		ÜRO GHSi / CLP-määruse kohane klassifikatsioon	Kohaldamine
5 % korral	0,05 % korral		
> 70 %	> 70 %	Kategooriata	Ained ja segud, välja arvatud: i) väga lenduvad ained aururõhuga üle 6 kPa ¹ ja ii) tahked kemikaalid (ained ja segud) peale pindaktiivsete ainete ja ainul pindaktiivsetest ainetest koosnevate segude
≤ 70 %	> 70 %	Prognoosida ei ole võimalik	Ei kohaldata
≤ 70 %	≤ 70 %	1. kategooria	Ained ja segud ²

¹Segusid, mis sisaldavad üle 6 kPa aururõhuga aineid, tuleks hoolikalt hinnata, et vältida võimalikku alahindamist, ning see peab olema igal üksikjuhtumil põhjendatud.

²Põhineb peamiselt ühe koostisosaga ainetega saadud tulemustel, kuigi leidub ka piiratud kogus andmeid segudega katsetamise kohta. See katsemeetod on siiski tehniliselt kohaldatav mitme koostisosaga ainete ja segude uurimiseks. Enne kui kasutada käesolevat meetodit segu korral, et saada andmeid kavandatud regulatiivse eesmärgi jaoks, tuleb kaaluda, kas see katse annab selle eesmärgi jaoks piisavaid tulemusi ja kui annab, siis miks. Sellist kaalumist ei ole vaja, kui regulatiivne nõue eeldabki segu katsetamist.

Nõuetekohasuse kriteeriumid

29. Katsetulemused loetakse nõuetekohaseks, kui on täidetud kõik järgmised kriteeriumid.
- a) Söötme kontrollproovi (kasvusööde, mida kokkupuutel kasutati) optiline tihedus peab pärast tühiproovi optilise tiheduse väärtuse lahutamist olema vähemalt 0,3;
 - b) Eluvõimelisus lahusti kontrollproovis peab olema vähemalt 80 %, võrreldes eluvõimelisusega söötme kontrollproovis. Kui igal korduskatsel kasutatakse mitut lahusti kontrollproovi, peab neist igaühes rakkude eluvõimelisus olema üle 80 %, et nende lahustitega analüüsitud uuritavate kemikaalide omadusi oleks võimalik nõuetekohaselt hinnata.
 - c) Positiivse kontrollprooviga (0,01 % naatriumlaaurüülsulfaat) saadud rakkude eluvõimelisus võib varasemate uuringute keskväärtusest erineda kahe standardhälbe ulatuses. Positiivse kontrollproovi nõuetekohasuse ülem- ja alampiiri tuleb sageli, st iga kolme kuu möödudes ajakohastada, või tuleb laborites, kus katseid tehakse harva (st vähem kui kord kuus), iga kord teha ka nõuetekohane katse. Kui laboris ei viida läbi piisaval arvul eksperimente, et saavutada positiivse kontrollproovi tulemuste statistiliselt robustne jaotus, on lubatud kasutada meetodi väljatöötaja antud nõuetekohasuse ülem- ja alampiiri, st vahemikku 21,1–62,3 % vastavalt laboris aja jooksul kogutud andmetele, samas kui laborisisene jaotus tehakse kindlaks esimeste rutiinsete katsetega.
 - d) Kolmest sõltumatust korduskatses saadud rakkude lõpliku eluvõimelisuse standardhälve peab nii uuritava kemikaali 5 % kui ka 0,05 % kontsentratsiooni juures jääma alla 15 %.
30. Kui üks või mitu nendest kriteeriumidest ei ole täidetud, tuleb tulemused kehtetuks lugeda ja läbi viia veel kolm sõltumatut korduskatset.

ANDMED JA ARUANDLUS

Andmed

31. Esitada tuleb iga korduskatse iga üksiksüvendi kohta saadud andmed (nt rakkude eluvõimelisuse väärtused) ning üldine keskväärtus, standardhälve ja klassifikatsioon.

Katseprotokoll

32. Katseprotokollis tuleks esitada järgmine teave.

Uuritav kemikaal ja kontrollained

- – Ühest koostisosast koosnev aine: kemikaali identifitseerimisandmed, nagu IUPACi või CASi nimetus(ed) ja CASi number/numbrid, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem ja/või muud identifikaatorid;

- – mitme koostisosaga aine, tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal ja segu: võimalikult täpne omaduste kirjeldus lähtuvalt koostisosade keemilisest määratlusest (vt eespool), kvantitatiivsest sisaldusest ja asjakohastest füüsikalis-keemilistest omadustest (vt eespool), kättesaadavas ulatuses;
- – füüsikaline olek, lenduvus, pH, log P, molekulmass, aineklass ja muud uuringu tegemisega seotud asjakohased füüsikalis-keemilised omadused, kättesaadavas ulatuses;
- – puhtus, lisandite keemiline määratlus, kui see on asjakohane ja praktiliselt teostatav jne;
- – töötlemine enne katset, kui asjakohane (nt soojendamine, peenestamine);
- – säilitamise tingimused ja stabiilsus säilitamisel, kättesaadavas ulatuses.

Katsetingimused ja -eeskirjad

- Sponsori, katselabori ja uuringu juhi nimi ja aadress;
- kasutatud katsemeetodi kirjeldus;
- kasutatud rakuliin, selle päritolu, passaažide arv ja katses kasutatud rakkude konfluentsus;
- kasutatud katse-eeskirja üksikasjad;
- kordus- ja paralleelproovide arv;
- uuritava kemikaali kasutatud kontsentratsioonid (kui erinevad soovitatust);
- iga uuritava kemikaali puhul lahusti valimise põhjendus;
- uuritava kemikaaliga kokkupuute kestus (kui erineb soovitatust);
- kõikide katse-eeskirjas tehtud muudatuste kirjeldus;
- kasutatud hindamis- ja otsustamiskriteeriumide kirjeldus;
- viide aja jooksul kogutud positiivsete kontrollproovide tulemuste keskväärtusele ja standardhälbele;
- labori kasutatud meetod, millega tõendatakse katsemeetodi kasutamise pädevust (nt pädevuse kontrolli ainetega katsetamine) või meetod, millega tõendatakse katsemeetodi korratavat toimivust ajas.

Tulemused

- Iga uuritava kemikaali ja kontrollaine ning iga uuritava kontsentratsiooni kohta tuleb tabeli kujul esitada optiline tihedus igas paralleelkatse süvendis, iga sõltumatu korduskatse optilise tiheduse väärtuste aritmeetiline keskmine, iga sõltumatu

korduskatse rakkude eluvõimelisus protsentides ning kokku kolmes korduskatses saadud rakkude eluvõimelisuse (%) lõplik aritmeetiline keskmine ja standardhälve;

- söötme kontrollproovi, lahusti kontrollproovi ja positiivse kontrollproovi tulemused, mis tõendavad vastavust uuringu nõuetekohasuse kriteeriumidele;
- muude täheldatud toimete kirjeldus;
- tuletatud üldine/üldised klassifikatsioon(id) viitega kasutatud prognoosimudelile ja/või otsustamiskriteeriumidele.

Tulemuste arutelu

Järeldused

KIRJANDUS

- (1) Ühinenud Rahvaste Organisatsioon (ÜRO), *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)*. 5. täiendatud väljaanne, United Nations Publications, New York & Genf, 2013. ISBN: 978-92-1-117006-1. Kättesaadav aadressil http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.
- (2) Scott, L. *et al.* (2010), „A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *in vivo* Studies Using Bottom-up and Top-down Approaches“, *Toxicol. in Vitro*, nr 24, lk 1–9.
- (3) Mosmann, T. (1983). „Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to 7 Proliferation and Cytotoxicity Assays“, *J. Immunol. Methods*, nr 65, lk 55–63.
- (4) Takahashi, Y. *et al.* (2008), „Development of the Short Time Exposure (STE) Test: an *In Vitro* Eye Irritation Test Using SIRC Cells“, *Toxicol. In Vitro*, nr 22, lk 760–770.
- (5) Sakaguchi, H. *et al.* (2011), „Validation Study of the Short Time Exposure (STE) Test to Assess the Eye Irritation Potential of Chemicals“, *Toxicol. In Vitro*, nr 25, lk 796–809.
- (6) Kojima, H. *et al.* (2013), „Second-Phase Validation of Short Time Exposure Tests for Assessment of Eye Irritation Potency of Chemicals“, *Toxicol. In Vitro*, nr 27, lk 1855–1869.
- (7) ICCVAM (2013), Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document, NIH. Kättesaadav aadressil [http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf].
- (8) Käesoleva lisa peatükk B.5 „Äge mürgisus: silmade ärritus/söövitus“.
- (9) Saito, K. *et al.* (2015), „Predictive Performance of the Short Time Exposure Test for Identifying Eye Irritation Potential of Chemical Mixtures“.
- (10) Mikkelsen, T.J., Chrai, S.S. ja Robinson, J.R. (1973), „Altered Bioavailability of Drugs in the Eye Due to Drug-Protein Interaction“, *J. Pharm. Sci.*, lk 1648–1653.
- (11) ECETOC (1998), Eye Irritation Reference Chemicals Data Bank. Technical Report (No 48. (2)), Brüssel, Belgia.

- (12) Gautheron, P. *et al.* (1992). „Bovine Corneal Opacity and Permeability Test: an *In Vitro* Assay of Ocular Irritancy“, *Fundam. Appl. Toxicol.*, nr 18, lk 442–449.
- (13) OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34). Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (14) OECD (2017), Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 263). Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

Liide

MÕISTED

Täpsus: katsemeetodiga saadud tulemuste ja nõuetekohaste võrdlusväärtuste kokkulangevuse määr. Täpsus näitab katsemeetodi tulemuslikkust ja on üks olulistest aspektidest. Seda terminit kasutatakse ka vastavuse tähenduses ja see näitab katsemeetodiga saadud õigete tulemuste osakaalu (13).

Võrdlusaine: aine, mida kasutatakse standardina võrdlemiseks uuritava kemikaaliga. Võrdlusainel peaksid olema järgmised omadused: i) pidev ja usaldusväärne tarnija; ii) struktuuriline ja funktsionaalne sarnasus uuritava ainega; iii) teadaolevad füüsikalised ja keemilised omadused; iv) teadaolevat toimet tõendavad andmed ja v) teadaolev mõjusoo soovitavas reaktsioonitugevuse vahemikus.

Alt-üles lähenemisviis: etapiviisiline lähenemisviis, mida kasutatakse niisuguste uuritavate kemikaalide korral, mille puhul on põhjust arvata, et need ei vaja klassifitseerimist silmade ärrituse või raske silmakahjustusega seoses; nimetatud lähenemisviisi puhul eristatakse kõigepealt kemikaalid, mis ei vaja klassifitseerimist (tulemus on negatiivne), muudest kemikaalidest (tulemus on positiivne).

Kemikaal: aine või segu.

Silmade ärritus: muutuse tekkimine silmas pärast uuritava kemikaali silma eespinnalet manustamist, seejuures on muutus 21 päeva jooksul pärast manustamist täielikult taandunud. Samatähenduslik mõistetega „pöörduv mõju silmale“ ja „ÜRO GHSi / CLP-määruse kohane 2. kategooria“.

Valenegatiivsete tulemuste määr: kõikide selliste kemikaalide osakaal, mis peaksid andma positiivse tulemuse, kuid on katsemeetodit järgides andnud negatiivse tulemuse. See on üks katsemeetodi tulemuslikkuse näitaja.

Valepositiivsete tulemuste määr: kõikide selliste kemikaalide osakaal, mis peaksid andma negatiivse tulemuse, kuid on katsemeetodit järgides andnud positiivse tulemuse. See on üks katsemeetodi tulemuslikkuse näitaja.

Oht: niisuguse mõjuri või olukorra loomupärane omadus, mis võib avaldada kahjulikku toimet, kui organism, süsteem või (ala)populatsioon selle mõjuriga kokku puutub.

Söötme kontrollproov: töötlemata paralleelproov, mis sisaldab kõiki katsesüsteemi komponente. Seda proovi analüüsitakse koos uuritava kemikaaliga töödeldud proovide ja teiste kontrollproovidega, et teha kindlaks, kas lahusti mõjutab katsesüsteemi.

Segu: kahest või enamast ainest koosnev segu või lahus.

Ühe koostisosaga aine: aine, mis on määratletud oma kvantitatiivse koostisega, milles ühe peamise koostisosa sisaldus on vähemalt 80 massiprotsenti.

MTT: 3-(4,5-dimetüültiasool-2-üül)-2,5-difenüültetrasooliumbromiid, tiasolüülsinine.

Mitme koostisosaga aine: aine, mis on määratletud oma kvantitatiivse koostisega, milles rohkem kui ühe peamise koostisosa kontsentratsioon on $\geq 10\%$ ja $< 80\%$ (massiprotsendid). Mitme koostisosaga aine saadakse tootmisprotsessi käigus. Erinevus segu ja mitme koostisosaga aine vahel seisneb selles, et segu saadakse kahe või enama aine kokku segamisel, ilma et toimuks keemilist reaktsiooni. Mitme koostisosaga aine saadakse keemilise reaktsiooni tulemusel.

OD: optiline tihedus.

Positiivne kontrollproov: paralleelproov, mis sisaldab kõiki katsesüsteemide komponente ja mida on töödeldud ainega, mis teadaolevalt kutsub esile positiivse reaktsiooni. Selleks, et oleks võimalik hinnata positiivse kontrollproovi esilekutsutud reaktsiooni varieeruvust ajas, ei tohi positiivne reaktsioon olla ülemäära tugev.

Asjakohasus: mõiste, millega väljendatakse seda, kas katsemeetod võimaldab uurida huvipakkuvat mõju, kas meetod on mõttekas ja sobib konkreetse eesmärgi jaoks. See näitab, mil määral saab katsemeetodiga õigesti mõõta või prognoosida huvipakkuvat bioloogilist mõju. Asjakohasus hõlmab ka katsemeetodi täpsuse (vastavuse) aspekti (10).

Usaldusväärsus: iseloomustab katsemeetodi korratavust, kui meetodit rakendatakse ühe ja sama katse-eeskirja alusel ühes laboris ja eri laborites pikema aja jooksul. Usaldusväärsuse hindamiseks arvutatakse laborisisene ja laboritevaheline korratavus ning laborisisene korduvus (13).

Tundlikkus: kõigi niisuguste positiivsete/reaktsioonivõimeliste kemikaalide osakaal, mis katse tulemusel klassifitseeritakse õigesti. Tundlikkusega iseloomustatakse katsemeetodi täpsust, kui saadud tulemusi saab kategoriseerida, ning see on oluline aspekt katsemeetodi asjakohasuse hindamisel (10).

Raske silmakahjustus: sellise koekahjustuse tekkimine silmas või selline tugev nägemisteravuse langus pärast seda, kui uuritavat kemikaali on manustatud silma eespinnaale, mis ei ole 21 päeva jooksul pärast manustamist täielikult pöörduv. Samatähenduslik mõistetega „pöördumatu mõju silmale“ ja „ÜRO GHSi / CLP-määruse kohane 1. kategooria“.

Lahusti/kandeaine kontrollproov: töötlemata proov, mis sisaldab kõiki katsesüsteemi komponente, sealhulgas lahustit või kandeainet, ning mida analüüsitakse koos uuritava kemikaaliga töödeldud proovide ja muude kontrollproovidega, et määrata kindlaks samas lahustis või kandeaines lahustatud uuritava kemikaaliga töödeldud proovide nulljoonetase. Kui seda proovi analüüsitakse samaaegselt söötme kontrollprooviga, näitab see samuti, kas lahusti või kandeaine mõjutab katsesüsteemi.

Spetsiifilisus: kõigi niisuguste negatiivsete/mittereageerivate kemikaalide osakaal, mis katse tulemusel klassifitseeritakse õigesti. Spetsiifilisusega iseloomustatakse katsemeetodi täpsust, kui saadud tulemusi saab kategoriseerida, ning see on oluline

aspekt katsemeetodi asjakohasuse hindamisel (13).

Aine: looduslik või tootmisprotsessi teel saadud keemiline element ja selle ühendid, kaasa arvatud stabiilsuse säilitamiseks vajalikud lisaained ja tootmisprotsessist tingitud lisandid, välja arvatud mis tahes lahusti, mida on võimalik aine stabiilsust vähendamata ja selle koostist muutmata eraldada.

Pindaktiivne aine: kemikaal, näiteks pesuaine, mis vähendab vedeliku pindpinevust ning muudab selle vahutavaks või tahket materjali läbivaks, seda nimetatakse ka märgavaks aineks.

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

Astmelise katsetamise strateegia: etapiviisi katsete tegemise strateegia, milles enne järgmise etapiga alustamist vaadatakse kindlaksmääratud korras läbi kogu uuritava kemikaali kohta olemasolev teave, kasutades igas etapis tõendite kaalukuse menetlust, et otsustada, kas teave on ohuklassi määramiseks piisav. Kui olemasoleva teabe põhjal saab otsustada uuritava kemikaali ärritava toime üle, ei ole täiendavaid katseid vaja teha. Kui olemasoleva teabe põhjal ei saa otsustada uuritava kemikaali ärritava toime üle, jätkatakse järjestikuste loomkatsete etapiti tegemist, kuni kemikaali saab üheselt klassifitseerida.

Ülalt-alla lähenemisviis: etapiviisiline lähenemisviis, mida kasutatakse niisuguste uuritavate kemikaalide korral, mille puhul on põhjust arvata, et need põhjustavad rasket silmakahjustust; nimetatud lähenemisviisi puhul eristatakse kõigepealt rasket silmakahjustust tekitavad kemikaalid (tulemus on positiivne) muudest kemikaalidest (tulemus on negatiivne).

Ühinenud Rahvaste Organisatsiooni ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteem (ÜRO GHS (Globally Harmonized System)): süsteem, milles kemikaalid (ained ja segud) on klassifitseeritud vastavalt nende füüsilise ohtlikkuse ning kahjuliku tervise- ja keskkonnamõju standarditud tüübile ja -tasemele ning mis hõlmab asjaomaseid teavitustähiseid, nagu piktogrammid, märksõnad, ohulaused, hoiatuslaused ja ohutuskaardid, et anda edasi inimeste (sealhulgas tööandjate, töötajate, vedajate, tarbijate ja päästetöötajate) ja keskkonna kaitsmiseks vajalikku teavet kõnealuste kemikaalide kahjuliku mõju kohta (1).

ÜRO GHSi / CLP-määruse kohane 1. kategooria: vt „Raske silmakahjustus“.

ÜRO GHSi / CLP-määruse kohane 2. kategooria: vt „Silmade ärritus“.

ÜRO GHSi / CLP-määruse kohase kategooriata: kemikaalid, mis ei ole klassifitseeritud ÜRO GHSi / CLP-määruse kohasesse 1. ega 2. kategooriasse (ega ÜRO GHSi 2A või 2B kategooriasse).

UVCB: tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal.

B.69. REKONSTRUEERITUD INIMESE SARVKESTA SARNASE EPITEELI (RhCE) KATSEMEETOD NENDE KEMIKAALIDE KINDLAKSTEGEMISEKS, MIDA EI OLE VAJA KLASSIFITSEERIDA EGA MÄRGISTADA SEOS SILMADE ÄRRITUSE VÕI RASKE SILMAKAHJUSTUSEGA

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 492 (2017). *Raske silmakahjustus* on Ühinenud Rahvaste Organisatsiooni ühtse ülemaailmse kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteemis (ÜRO GHS (Globally Harmonized System) (1) ning Euroopa Liidu määruses (EÜ) nr 1272/2008, mis käsitleb ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist (CLP-määrus)¹, esitatud määratluse kohaselt sellise koekahjustuse tekkimine silmas või selline tugev nägemisteravuse langus pärast seda, kui uuritavat kemikaali on manustatud silma eespinnale, mis ei ole 21 päeva jooksul pärast manustamist täielikult pöörduv. Samuti on ÜRO GHSi ja CLP-määruse kohaselt *silmade ärritus* muutuste tekkimine silmas pärast uuritava kemikaali silma eespinnale manustamist, seejuures on muutus 21 päeva jooksul pärast manustamist täielikult taandunud. Raske silmakahjustust põhjustavad uuritavad kemikaalid klassifitseeritakse ÜRO GHSi ja CLP-määruse kohasesse 1. kategooriasse ning silmade ärritust põhjustavad uuritavad kemikaalid ÜRO GHSi ja CLP-määruse kohasesse 2. kategooriasse. Kemikaal, mida ei klassifitseerita seoses silmade ärrituse või raske silmakahjustusega, on määratletud kui kemikaal, mis ei vasta ÜRO GHSi 1. või 2. (2A või 2B) kategooriasse klassifitseerimise nõuetele, see tähendab, et sellele viidatakse kui ÜRO GHSi kategooriata kemikaalile.
2. Rasket silmakahjustust / silmade ärritust tekitava toime hindamisel on tavaliselt kasutatud laboriloomi (katsemeetod B.5 (2)). Kõige asjakohasema katsemeetodi valimist ja selle kasutamist tuleks vaadelda raske silmakahjustuse ja silmade ärrituse põhjustamise uurimiseks ja hindamiseks kasutatavaid kompleksseid lähenemisviise käsitleva OECD juhenddokumendi (39) kontekstis.
3. Käesolevas katsemeetodis kirjeldatakse *in vitro* meetodit, mis võimaldab kindlaks teha kemikaalid (ained ja segud), mida ei ole vaja seoses silmade ärrituse või raske silmakahjustusega ÜRO GHSi ja CLP-määruse kohaselt klassifitseerida ega

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

märgistada. Meetodis kasutatakse rekonstrueeritud inimese sarvkesta sarnast epiteeli, mille histoloogilised, morfoloogilised, biokeemilised ja füsioloogilised omadused on ülimalt sarnased inimese sarvkesta epiteeli omadele. Valideeritud, teaduslikult põhjendatuiks arvatud ning katsemeetoditena B.47 (3), B.48 (4), B.61 (5) ja B.68 (6) vastu võetud on veel neli *in vitro* katsemeetodit, mis uurivad rasket silmakahjustust / silmade ärritust inimeste seotud näitajana.

4. Käesolev katsemeetod hõlmab kaht valideeritud katset, mille puhul kasutatakse müügil olevaid RhCE-mudeleid. Valideerimisuringud silmade ärrituse / raske silmakahjustuse hindamiseks viidi läbi (7, 8, 9, 10, 11, 12, 13) EpiOcular™i silmaärrituse katse ja SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli kasutava silmaärrituse katse põhjal. Mõlemas katses kasutatakse katsesüsteemina müügil olevaid RhCE-koemudeleid, millele edaspidises tekstis viidatakse kui valideeritud võrdlusmeetoditele VRM1 ja VRM2 (VRM – Validated Reference Methods). Nende valideerimisuringute ja seotud sõltumatu vastastikuse eksperdi hinnangu (9, 12) põhjal tehti järeldus, et EpiOcular™i silmaärrituse katse ja SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli kasutav silmaärrituse katse sobivad nende kemikaalide (nii ainete kui ka segude) korrektseks kindlakstegemiseks, mida ei ole vaja seoses silmade ärrituse ega raske silmakahjustusega ÜRO GHSi kohaselt klassifitseerida ja märgistada, ning soovitati kõnealuseid meetodeid kui selleks eesmärgiks sobivaid teaduslikult põhjendatud meetodeid (13).
5. Praegu ollakse üldiselt arvamusel, et lähitulevikus ei ole võimalik rasket silmakahjustust tekitava / silmi ärritava toime kogu ulatuse prognoosimisel eri kemikaaliklasside puhul ühegi *in vitro* katsemeetodiga täielikult asendada Draize'i *in vivo* silmakatset (2, 14). Kuid mitme alternatiivse katsemeetodi kombineerimisega (astmelise) katsetamise strateegiat (nt alt-üles või ülalt-alla lähenemisviisi) rakendades võib siiski olla võimalik Draize'i silmakatset (15) täielikult asendada. Alt-üles lähenemisviisi (15) tuleks kasutada siis, kui olemasoleva teabe põhjal võib eeldada, et kemikaal ei põhjusta piisavalt silma ärritust, et seda oleks vaja klassifitseerida; ülalt-alla lähenemisviisi (15) tuleks kasutada siis, kui olemasoleva teabe põhjal võib eeldada, et kemikaal põhjustab raske silmakahjustuse. EpiOcular™i silmaärrituse katset ja SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli kasutavat silmaärrituse katset soovitatakse kasutada selleks, et teha täiendava katsetamiseta kindlaks need kemikaalid, mida ei ole vaja seoses silmade ärrituse või raske silmakahjustusega ÜRO GHSi / CLP-määruse kohaselt klassifitseerida (kategooria puudub), kasutades neid näiteks Scott *et al.* soovitatud alt-üles / ülalt-alla lähenemisviisidele sarnastes katsestrateegiatel, nt esimese etapina alt-üles lähenemisviisi puhul ja ühena viimastest etappidest ülalt-alla lähenemisviisi puhul (15). EpiOcular™i silmaärrituse katse ja SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli kasutav silmaärrituse katse ei ole siiski ette nähtud ÜRO GHSi / CLP-määruse kohase 1. kategooria (raske silmakahjustus) ja

2. kategooria (silmade ärritus) eristamiseks. Selliseks eristamiseks peab katsestrateegias olema mõni muu etapp (15). Kui EpiOcular™i silmaärrituse katse või SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli kasutava silmaärrituse katsega on kindlaks tehtud, et uuritavat kemikaali on vaja seoses silmade ärrituse või raske silmakahjustusega klassifitseerida, on lõpliku järelduse (kas tegemist on ÜRO GHSi / CLP-määruse kohase kategooriaga, 1. kategooria või 2. kategooria kemikaaliga) tegemiseks vaja täiendavaid katseid (*in vitro* ja/või *in vivo*), kasutades näiteks katsemeetodit B.47, B.48, B.61 või B.68.
6. Käesoleva katsemeetodi eesmärk on kirjeldada eeskirja, mida kasutatakse, et hinnata uuritava kemikaali võimalikku ohtlikkust silmale selle võime põhjal kutsuda esile tsütotoksilisust RhCE-koemudelil; kõnealust võimet mõõdetakse MTT-katsega (16) (vt punkt 21). RhCE-koe eluvõimelisuse määramiseks pärast uuritava kemikaaliga kokkupuudet võrreldakse seda kudedega, mida on töödeldud negatiivse kontrollainega (saadakse eluvõimelisuse %), ning saadud tulemust kasutatakse, et prognoosida uuritava kemikaali võimalikku ohtlikkust silmale.
7. Kättesaadavad on toimivusnõuded (17), mis hõlbustavad EpiOcular™i silmaärrituse katsega või SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli kasutava silmaärrituse katsega sarnaste uute või modifitseeritud RhCE-põhiste *in vitro* katsemeetodite valideerimist kooskõlas OECD juhenddokumendis nr 34 (18) esitatud põhimõtetega, ning võimaldavad OECD katsejuhendit nr 492 õigeaegselt muuta, lisades sinna kõnealused meetodid. Andmete vastastikune tunnustamine vastavalt OECD kokkuleppele tagatakse vaid nende katsemeetodite puhul, mis on valideeritud kooskõlas toimivusnõuetega, kui need katsemeetodid on läbi vaadatud ja lisatud OECD poolt vastavasse juhendisse.

MÕISTED

8. Mõisted on esitatud 1. liites.

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

9. Käesolevas katsemeetodis kasutatakse kaubanduslikult saadaolevaid kolmemõõtmelisi RhCE-koemudeleid, mis on valmistatud kas inimese epidermise esmastest keratinotsüütidest (nt EpiOcular™ OCL-200) või inimese sarvkesta immortaliseeritud epiteelirakkudest (nt SkinEthic™ HCE/S). RhCE-koemudelid EpiOcular™ OCL-200 ja SkinEthic™ HCE/S sarnanevad *in vivo* sarvkesta kolmemõõtmelise struktuuriga epiteelile ning nende valmistamiseks kasutatakse huvipakkuva liigi rakke (19, 20). Peale selle mõõdetakse nende katsetega otseselt tsütotoksilisust, mis ilmneb kemikaali tungimisel läbi sarvkesta ning raku- ja koekahjustuste tekkides; tsütotoksilisusreaktsioon on aluseks üldisele *in vivo* katsel saadud tulemusele raske

silmakahjustuse / silmade ärrituse kohta. Rakukahjustuse tekkimise mehhanismid võivad olla erinevad (vt punkt 20), kuid tsütotoksilisusel on koekahjustust põhjustanud füüsikalis-keemilistest protsessidest olenemata oluline või isegi peamine mehhanistlik roll kemikaali põhjustatud üldise reaktsiooni (raske silmakahjustus või silmade ärritus) määramisel, reaktsioon avaldub *in vivo* peamiselt sarvkesta läbipaistmatuse, vikerkestapõletiku, sidekesta punetuse ja/või sidekesta tursena.

10. Käesoleva katsemeetodi valideerimisuuringus uuriti katseliselt paljusid kemikaale, mis kuulusid mitmesse eri liiki ja kemikaaliklassi ning millel oli erinev molekulmass, log P, keemiline struktuur jne. EpiOcular™i silmaärrituse katse valideerimise andmebaas sisaldas kokku andmeid 113 kemikaali kohta, millel olid OECD rakendusega QSAR Toolbox tehtud analüüsi (8) kohaselt esindatud 95 erinevat funktsionaalrühma. Enamik neist kemikaalidest olid ühe koostisosaga ained, kuid uuringusse oli võetud ka mitu mitme koostisosaga ainet (sealhulgas 3 homopolümeeri, 5 kopolümeeri ja 10 kvaasipolümeeri). Füüsikalise oleku ja ÜRO GHSi / CLP-määruse kohase kategooria järgi jagunesid 113 uuritud kemikaali järgmiselt: 13 vedelikku 1. kategooriast, 15 tahket ainet 1. kategooriast, 6 vedelikku 2A kategooriast, 10 tahket ainet 2A kategooriast, 7 vedelikku 2B kategooriast, 7 tahket ainet 2B kategooriast, 27 kategooriata vedelikku ja 28 kategooriata tahket ainet (8). SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli kasutava silmaärrituse katse valideerimise andmebaas sisaldas kokku andmeid 200 kemikaali kohta, milles esindatud 165 erinevat funktsionaalrühma (8, 10, 11). Enamik neist kemikaalidest olid ühe koostisosaga ained, kuid uuringusse oli võetud ka mitu mitme koostisosaga ainet (sealhulgas 10 polümeeri). Füüsikalise oleku ja ÜRO GHSi / CLP-määruse kohase kategooria järgi jagunesid 200 uuritud kemikaali järgmiselt: 27 vedelikku 1. kategooriast, 24 tahket ainet 1. kategooriast, 19 vedelikku 2A kategooriast, 10 tahket ainet 2A kategooriast, 9 vedelikku 2B kategooriast, 8 tahket ainet 2B kategooriast, 50 kategooriata vedelikku ja 53 kategooriata tahket ainet (10, 11).
11. Seda katsemeetodit saab kasutada ainete ja segude uurimiseks tahkete ainete, vedelike, pooltahkete ainete ja vahade puhul. Vedelikud võivad olla vesilahused või muud vedelikud; tahked ained võivad olla vees lahustuvad või lahustumatud. Tahked ained tuleks enne pealekandmist võimaluse korral peenestada peeneks pulbriks; proovi muud eeltöötlust ei ole vaja. Gaase ja aerosooli ei ole valideerimisuuringuga veel hinnatud. Kuigi on mõeldav, et neidki saab uurida RhCE-koemudeli abil, ei võimalda praegune katsemeetod gaaside ega aerosoolide uurimist.
12. Uuritavad kemikaalid, mis (iseloomulikult või pärast töötlemist) neelavad valgust MTT formasaaniga samas lainepikkuste vahemikus või suudavad vitaalvärvaine MTT-d otse redutseerida (MTT formasaaniks), võivad koe eluvõimelisuse mõõtmist segada ning siis on vaja kasutada kohandatud kontrollproove paranduste tegemiseks. Vajalike kohandatud kontrollproovide liik varieerub olenevalt uuritava kemikaali

põhjustatud häire iseloomust ja MTT formaani kvantitatiivse mõõtmise metoodikast (vt punkte 36–42).

13. Eelvalideerimisel (21, 22) ja täielikus valideerimisuurinus (8, 10, 11) saadud tulemused näitasid, et nii EpiOcular™i silmaärrituse katse kui ka SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli kasutatav silmaärrituse katse on rakendatavad laboris, millel ei ole nimetatud analüüside tegemise kogemust, samuti on need korratavad nii laborisiseselt kui ka laboritevaheliselt. Kõnealuste uuringute kohaselt on 113 kemikaali kohta saadud andmete põhjal EpiOcular™i silmaärrituse katse eeldatav korratavuse suurusjärg prognooside kokkulangevuse järgi laborisisesel korratavuse puhul 95 % ja laboritevahelise korratavuse puhul 93 %. 120 kemikaali kohta saadud andmete põhjal on SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli kasutatava silmaärrituse katse eeldatav korratavuse suurusjärg prognooside kokkulangevuse järgi laborisisesel korratavuse puhul 92 % ja laboritevahelise korratavuse puhul 95 %.
14. EpiOcular™i silmaärrituse katset saab kasutada niisuguste kemikaalide kindlakstegemiseks, mida ei ole vaja seoses silmade ärrituse või raske silmakahjustusega ÜRO GHSi / CLP-määruse klassifitseerimissüsteemi järgi klassifitseerida. Võttes arvesse valideerimisuurinus saadud andmeid (8), on EpiOcular™i silmaärrituse katse kogutäpsus 80 % (112 kemikaali põhjal), tundlikkus 96 % (57 kemikaali põhjal), valenegatiivsete tulemuste määr 4 % (57 kemikaali põhjal), spetsiifilisus 63 % (55 kemikaali põhjal) ja valepositiivsete tulemuste määr 37 % (55 kemikaali põhjal), võrreldes võrdluskatsena kasutataval küüliku *in vivo* silmakatsel (katsemeetod B.5) (2, 14) saadud andmetega, mille põhjal loetletud tooted olid klassifitseeritud ÜRO GHSi / CLP-määruse klassifikatsioonisüsteemi kohaselt. 97 vedel agrokeemiatootu uuringus EpiOcular™i silmaärrituse katsega leiti et katsemeetodi toimivus seda liiki segude puhul sarnaneb valideerimisuurinus leitud toimivusega (23). Nimetatud 97 toodet jagunesid järgmiselt: 21 toodet 1. kategooriast, 19 toodet 2A kategooriast, 14 toodet 2B kategooriast ja 43 kategooriata toodet, mis olid klassifitseeritud ÜRO GHSi klassifitseerimissüsteemi järgi võrdluskatsena kasutataval küüliku *in vivo* silmakatsel (katsemeetod B.5) (2, 14) saadud andmete alusel. Leiti, et kogutäpsus on 82 % (97 toote põhjal), tundlikkus 91 % (54 toote põhjal), valenegatiivsete tulemuste määr 9 % (54 toote põhjal), spetsiifilisus 72 % (43 toote põhjal) ja valepositiivsete tulemuste määr 28 % (43 toote põhjal) (23).
15. SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli kasutatava silmaärrituse katset saab kasutada niisuguste kemikaalide kindlakstegemiseks, mida ei ole vaja seoses silmade ärrituse või raske silmakahjustusega ÜRO GHSi / CLP-määruse klassifitseerimissüsteemi järgi klassifitseerida. Võttes arvesse valideerimisuurinus saadud andmeid (10, 11), on SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli kasutatava silmaärrituse katse kogutäpsus 84 % (200 kemikaali põhjal), tundlikkus 95 % (97 kemikaali põhjal), valenegatiivsete tulemuste määr 5 % (97 kemikaali põhjal), spetsiifilisus 72 % (103 kemikaali põhjal)

ja valepositiivsete tulemuste määr 28 % (103 kemikaali põhjal), võrreldes võrdluskatsena kasutataval küüliku *in vivo* silmakatsel (katsemeetod B.5) (2, 14) saadud andmetega, mille põhjal loetletud tooted olid klassifitseeritud ÜRO GHSi / CLP-määruse klassifikatsioonisüsteemi kohaselt.

16. Mõlema RhCE-põhise katsemeetodiga nii ainete kui ka segude puhul korduvatel katsetel saadud valenegatiivsete tulemuste määrade alusel on üldine tõenäosus 12 %, et kemikaalid klassifitseeritakse Draize'i *in vivo* silmakatse tulemusena kas ÜRO GHSi ja CLP-määruse kohasesse 2. kategooriasse või neil ÜRO GHSi ja CLP-määruse kohane kategooria puudub. seda põhjustab meetodile iseloomulik katsesisene hajuvus (24). Mõlema RcHE-põhise katsemeetodiga nii ainete kui ka segude puhul saadud valepositiivsete tulemuste määrad ei ole selle katsemeetodi kontekstis kriitilised, sest kõiki uuritavaid kemikaale, mille puhul koe eluvõimelisus on võrdne kindlaksmääratud läviväärtusega (vt punkt 44) või sellest väiksem, tuleb järgmiseks uurida muude *in vitro* katsemeetoditega või viimase võimalusena, olenevalt regulatiivsetest nõuetest, katsetes küülikutega kooskõlas järjestikuse katsete tegemise strateegia ning tõendite kaalukuse lähenemisviisiga. Neid katsemeetodeid võib kasutada iga tüüpi kemikaalide puhul, kusjuures negatiivse tulemuse võib aktsepteerida kui tõendi, et kemikaali ei ole vaja seoses silmärrituse või raske silmakahjustusega klassifitseerida (ÜRO GHSi ja CLP-määruse kohane kategooria puudub). Kui EpiOcular™i silmärrituse katset ja SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli kasutatavat silmärrituse katset hakatakse kasutama muu kui ÜRO GHSi / CLP-määruse klassifitseerimisskeemiga seoses, tuleks eelnevalt konsulteerida asjakohaste reguleerivate asutustega.
17. Selle katsemeetodi kasutamist piirab asjaolu, et see ei võimalda vahet teha silmade ärritusel / pöördumal mõjul silmale (2. kategooria) ja tõsisel silmakahjustusel / pöördumatul mõjul silmale (1. kategooria), nagu need on määratletud ÜRO GHSis ja CLP-määruses, ega ka silma ärritaval (valikuline 2A kategooria) ja silma kergelt ärritaval (valikuline 2B kategooria) kemikaalil, nagu need on määratletud ÜRO GHSis (1). Selleks on vajalik täiendav uuring muude *in vitro* katsemeetoditega.
18. Käesolevas katsemeetodis kasutatakse terminit „uuritav kemikaal“ uurimisobjektile viitava terminina¹ ja see ei ole seotud RhCE-põhise katsemeetodi kohaldatavusega ainete ja/või segude uurimiseks.

¹ 2013. aasta juunis lepitati OECD ühiskoosolekul kokku, et võimaluse korral kasutatakse uute ja ajakohastatud OECD katsejuhendites uurimisobjektile viitamiseks järjepidevamalt terminit „uuritav kemikaal“.

KATSE PÕHIMÕTE

19. Uuritav kemikaal kantakse vähemalt kahele kolmemõõtmelisele RhCE-koemudelile ning pärast kokkupuute ja töötlemise järgset ajavahemikku mõõdetakse koe eluvõimelisus. RhCE-koed rekonstrueeritakse inimese epidermise esmastest keratinotsüütidest või inimese sarvkesta immortaliseeritud epiteelirakkudest, mida on mitme päeva jooksul kasvatatud, et saada mitmekihiline, ülimalt diferentseerunud lameepiteel, mis morfoloogiliselt sarnaneb inimese sarvkesta leiduvale. EpiOcular™i RhCE-koemudel koosneb vähemalt kolmest eluvõimelisest rakukihist ja sarvestumata pinnast, mille struktuur on sarvkesta sarnane ja analoogne *in vivo* esinevale. SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli RhCE-koemudel koosneb vähemalt neljast eluvõimelisest rakukihist, sealhulgas kolumnaarsed basaalrakud, sarvkesta pealispinnaalused üleminekurakud ja pindmised lamerakud, ning sarnaneb tavalisele inimese sarvkesta epiteelile (20, 26).
20. Kemikaalist põhjustatud raske silmakahjustus / silmade ärritus, mis avaldub *in vivo* peamiselt sarvkesta läbipaistmatuse, vikerkestapõletiku, sidekesta punetuse ja/või sidekesta tursena, on selliste järjestikuste muutuste tagajärg, mis algavad kemikaali tungimisega läbi sarvkesta ja/või sidekesta ja rakukahjustuse tekitamisega. Rakukahjustuse tekkimise mehhanismid võivad olla erinevad, sealhulgas rakumembraani lüüs (nt pindaktiivsete ainete, orgaaniliste lahustite toimetel), makromolekulide (eelkõige valkude) koaguleerumine (nt pindaktiivsete ainete, orgaaniliste lahustite, leeliste ja hapete toimetel), lipiidide seebistumine (nt leeliste toimetel) ning alküülimine või muud kovalentsed vastastikmõjud makromolekulidega (nt pleegitite, peroksiidide ja alküülijate toimetel) (15, 27, 28). Siis on näidatud, et tsütotoksilisusel on koekahjustust põhjustanud füüsikalis-keemilistest protsessidest olenemata oluline või isegi peamine mehhanistlik roll kemikaali põhjustatud üldise reaktsiooni (raske silmakahjustus või silmade ärritus) määramisel (29, 30). Peale selle määratakse kemikaali võime põhjustada rasket silmakahjustust / silmade ärritust põhimõtteliselt esialgse vigastuse ulatuse järgi (31), mis on vastavuses rakkude hävimise (29) ning sellest tulenevate reaktsioonide ja lõpptulemuse ulatusega (32). Seega mõjutavad silma kergelt ärritavad kemikaalid üldiselt üksnes sarvkesta pindmist epiteeli, kergelt ja mõõdukalt ärritavad kemikaalid kahjustavad põhimõtteliselt epiteeli ja pindmist stroomat ning tugevalt ärritavad kemikaalid kahjustavad epiteeli, strooma süvakihte ja kohati sarvkesta endoteeli (30, 33). RhCE-koemudeli eluvõimelisuse mõõtmine pärast pindmist kokkupuudet uuritava kemikaaliga, et teha kindlaks kemikaalid, mida ei ole vaja seoses raske silmakahjustuse / silmade ärritusega klassifitseerida (ÜRO GHSi ja CLP-määruse kohane kategooria puudub), põhineb eeldusel, et kõik kemikaalid, mis põhjustavad raske silmakahjustuse või silmade ärrituse, põhjustavad sarvkesta epiteelis ja/või sidekesta tsütotoksilisust.

21. Tavapäraselt mõõdetakse RhCE-koe eluvõimelisust vitaalvärvaine MTT [3-(4,5-dimetüültiasool-2-üül)-2,5-difenüültetrasooliumbromiid, tiasolüülsinine; CASi number 298-93-1] ensümaatilise muundamise järgi siniseks MTT formasaansoolaks, mis pärast koest ekstraheerimist määratakse kvantitatiivselt (16). Kemikaalid, mida ei ole vaja ÜRO GHSi / CLP-määruse kohaselt klassifitseerida ja märgistada (kategooria puudub), on kemikaalid, mis uurimisel ei vähenda koe eluvõimelisust allapoole määratud läviväärtust (st EpiOcular™i silmaärrituse katsel ja SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli kasutavat silmaärrituse katsel EITL¹ koe eluvõimelisus > 60 % või SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli kasutavat silmaärrituse katsel EITS² > 50 %) (vt punkt 44).

PÄDEVUSE TÕENDAMINE

22. Enne RhCE-koemudeliga tehtavate katsete rutiinset kasutamist regulatiivsel eesmärgil tuleb laboril tõendada oma tehnilist pädevust, prognoosides õigesti tabelis 1 loetletud pädevuse tõendamise kemikaalide omadused. Need kemikaalid valiti välja valideeritud võrdlusmeetodite valideerimisuuringutes kasutatud kemikaalide seast (8, 10, 11). Valikus on võimaluste piires esindatud järgmiste omadustega kemikaalid: i) neil erinevad füüsikalised olekud; ii) nad esindavad *in vivo* raske silmakahjustuse / silmade ärrituse reaktsioonide täit vahemikku võrdluskatsena kasutataval küüliku *in vivo* silmakatsel (katsemeetod B.5) (2, 14) saadud kvaliteetsete andmete ning ÜRO GHSi klassifitseerimissüsteemi (st 1. kategooria, 2A, 2B kategooria või klassifitseerimata) ja CLP-määruse kohase klassifitseerimissüsteemi (st 1. või 2. kategooria või kategooria puudub) alusel; iii) nad esindavad mitmesuguseid aluseid *in vivo* klassifitseerimiseks (24, 25); iv) kuuluvad samadesse kemikaaliklassidesse, mida kasutati valideerimisuuringus (8, 10, 11); v) neis on hästi esindatud mitmesugused funktsionaalrühmad (8, 10, 11); vi) nende keemiline ehitus on hästi teada (8, 10, 11); vii) nad on värvilised ja/või MTT otsesed redutseerijad; viii) nad andsid valideerimisel RhCE-koemudelitega katsemeetodeid kasutades korratavad tulemused; ix) nende omadused prognoositi valideerimisuuringutes RhCE-koemudeleid kasutavate katsemeetoditega õigesti; x) nad esindavad RhCE-koemudelil kasutava katsemeetodiga saadud kvaliteetsete andmete kohaselt *in vitro* reaktsioonide täit vahemikku (eluvõimelisus 0 kuni 100 %) xi) nad on müügil ja xii) nendega ei kaasne ülemääraseid soetamis- ja/või kõrvaldamiskulusid. Kui mõnda loetletud

¹ EITL: silmaärrituse katse vedelikega, kui kasutatakse SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli

² EITS: silmaärrituse katse tahkete ainete, kui kasutatakse SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli

kemikaali ei ole saada või seda ei saa muul õigustatud põhjusel kasutada, võib kasutada muud eespool kirjeldatud kriteeriumidele vastavat kemikaali näiteks valideeritud võrdlusmeetodi valideerimisel kasutatud kemikaalide hulgast. Sellised kõrvalekalded peavad siiski olema põhjendatud.

Tabel 1. Pädevuse tõendamise kemikaalide loend

Keemiline nimetus	C AS i nr	Funktsiona alrühm ¹	Füüsikaline olek	Eluvõi melisus meetodi ga VRM1 (%) ²	Eluvõi melisus meetodi ga VRM2 (%) ³	Prognoos VRM-meetodiga	MTT reduts eerija	Sega va värv useg a
<i>In vivo 1. kategooria</i>⁴								
Metüülglükolaat	23 65-48-2	Karboksüülha ppeester, tioalkohol	Vedel	10,9 ± 6,4	5,5 ± 7,4	Progn oosida ei ole võima lik	Jah (tugev)	Ei
Hüdroksüetüülakrülaat	81 8-61-1	Akrülaat, alkohol	Vedel	7,5 ± 4,7 ₅	1,6 ± 1,0	Progn oosida ei ole võima lik	Ei	Ei
2,5-dimetüül-2,5-heksaandiool	11 0-03-2	Alkohol	Tahke	2,3 ± 0,2	0,2 ± 0,1	Progn oosida ei ole võima lik	Ei	Ei
Naatriumoksalaat	62-76-0	Oksokarboks üülhape	Tahke	29,0 ± 1,2	5,3 ± 4,1	Progn oosida ei ole võima lik	Ei	Ei
<i>In vivo 2A kategooria</i>⁴								

Keemiline nimetus	CAS i nr	Funktsiona alrühm ¹	Füüsikaline olek	Eluvõi melisus meetodiga VRM1 (%) ²	Eluvõi melisus meetodiga VRM2 (%) ³	Prognos VRM-meetodiga	MTT reduts eeri ja	Sega va värv useg a
<i>N,N'</i> -bis(4-klorofenüül)-3,12-diimino-2,4,11,13-tetraasatetradekaandiimidamiidi di-D-glükonaat (20 % vesilahus) ⁶	18472-51-0	Aromaatne heterotsüklik haliid, arüülhaliid, dihüdrosüülühm, guanidiin	Vedel	4,0 ± 1,1	1,3 ± 0,6	Prognosida ei ole võimalik	Ei	Jah (nõrk)
Naatriumbensoaat	532-32-1	Arüül, karboksüülhape	Tahke	3,5 ± 2,6	0,6 ± 0,1	Prognosida ei ole võimalik	Ei	Ei
<i>In vivo</i> 2B kategooria⁴								
Dietüültoluamiid	134-62-3	Bensamiid	Vedel	15,6 ± 6,3	2,8 ± 0,9	Prognosida ei ole võimalik	Ei	Ei

Keemiline nimetus	CAS i nr	Funktsiona alrühm ¹	Füüsikaline olek	Eluvõi melisus meetodi ga VRM1 (%) ²	Eluvõi melisus meetodi ga VRM2 (%) ³	Prognos VRM-meetodiga	MTT redutseerija	Sega va värvusega
2,2-dimetüül-3-metüleenbitsüklo[2.2.1]heptaan	79-92-5	Alkaan, hargnev, tertsiaarse süsinikuga; alkeen; bitsükloheptaan; sildtsükliilised ühendid; tsükloalkaan	Tahke	4,7 ± 1,5	15,8 ± 1,1	Prognosida ei ole võimalik	Ei	Ei
<i>In vivo</i> kategooria puudub⁴								
1-etüül-3-metüülimidasoolium etüülsulfaat	34-25-73-75-5	Alkoksürühm; ammoniumsool; arüülrühm; imidasool; sulfaat	Vedel	79,9 ± 6,4	79,4 ± 6,2	Kategooria puudub	Ei	Ei
Dikaprüüüleeter	62-9-82-3	Alkoksürühm; eeter	Vedel	97,8 ± 4,3	95,2 ± 3,0	Kategooria puudub	Ei	Ei

Keemiline nimetus	CAS i nr	Funktsiona alrühm ¹	Füüsikaline olek	Eluvõi melisus meetodi ga VRM1 (%) ²	Eluvõi melisus meetodi ga VRM2 (%) ³	Prognoos VRM-meetodiga	MTT reduts eerija	Sega va värv useg a
Piperonüülbutoksiid	51-03-6	Alkoksürühm ; bensodioksool; bensüülrühm; eeter	Vedel	104,2 ± 4,2	96,5 ± 3,5	Kategooria puudub	Ei	Ei
Hüdrogeenitud kastoorõli polüetüleenglükool ester (PEG-40)	61788-85-0	Atsülaalrühm , alkohol; allüülrühm, eeter	Viskossne	77,6 ± 5,4	89,1 ± 2,9	Kategooria puudub	Ei	Ei
1-(4-klorofenüül)-3-(3,4-diklorofenüül)karbamiid	101-20-2	Aromaatne heterotsükliiline haliid, arüülhaliid, Karbamiidi derivaadid	Tahke	106,7 ± 5,3	101,9 ± 6,6	Kategooria puudub	Ei	Ei

Keemiline nimetus	CASi nr	Funktsionaalrühm ¹	Füüsikaline olek	Eluvõi melisus meetodiga VRM1 (%) ²	Eluvõi melisus meetodiga VRM2 (%) ³	Prognos VRM-meetodiga	MTT reduts eeri	Sega värvusega
2,2'-metüleen-bis-(6-(2H-bensotriasool-2-üül)-4-(1,1,3,3-tetrametüülbutüül)fenool	103597-45-1	Alkaan, hargnev, kvaternaarse süsinikuga; kondenseerunud tsüklitega aromaatsed ühendid; kondenseerunud küllastunud heterotsüklid; kinoidühendid e prekursor; tert-butüülrühm	Tahke	102,7 ± 13,4	97,7 ± 5,6	Kategooria puudub	Ei	Ei
Kaaliumtetrafluoroboraat	14075-53-7	Anorgaaniline sool	Tahke	88,6 ± 3,3	92,9 ± 5,1	Kategooria puudub	Ei	Ei

Lühendid: CASi nr – Chemical Abstracts Service'i number; ÜRO GHS – Ühinenud Rahvaste Organisatsiooni ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteem (1); VRM1 – valideeritud võrdlusmeetod (*Validated Reference Method*), EpiOcular™i silmaärrituse katse; VRM2 – valideeritud võrdlusmeetod (*Validated Reference Method*), SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli kasutatav silmaärrituse katse; segava värvusega – ühendi värvus segab MTT formasaani neelduvuse (optilise tiheduse) mõõtmist.

¹Funktsionaalrühm on omistatud vastavalt hierarhilisele analüüsile OECD rakendusega Toolbox 3.1 (8).

²Põhineb EpiOcular™i silmaärrituse katsega saadud tulemustel EURL ECVAMi ja ühenduse Cosmetics Europe tehtud silmaärrituse katsemeetodi valideerimisuurings (8).

³Põhineb SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli kasutava silmaärrituse katsega valideerimisuurings (10, 11) saadud tulemustel.

⁴Põhineb küüliku *in vivo* silmakatse (katsemeetod B.5 / OECD katsejuhend nr 405) (2, 14) tulemustel ja selles kasutatakse ÜRO GHSi klassifikatsiooni.

⁵Põhineb konsortsiumi CEFIC *in vitro* silmaärrituse katsete tegemise strateegia (CON4EI) uuringus saadud tulemustel.

⁶Klassifitseerimine 2A või 2B kategooriasse oleneb selle ÜRO GHSi kriteeriumi tõlgendusest, mille alusel neid kahte kategooriat eristatakse, st 7. päeval peab mõju avalduma veel vastavalt ühel või kahel loomal kolmest; viimasel juhul klassifitseeritakse kemikaal 2A kategooriasse. *In vivo* uuringus kasutati kolme looma. Kõik näitajad peale sarvkesta läbipaistmatuse ühel loomal saavutasid hiljemalt 7. päevaks nulltaseme. Ühel loomal, kes ei paranenud täielikult 7. päevaks, oli 7. päeval sarvkesta läbipaistmatuse aste 1, mis paranes täielikult 9. päevaks.

23. Pädevuse tõendamise katsete osana soovitatakse kasutajal pärast kudede saamist kontrollida nende kaitsekihiomaduste vastavust RhCE-koemudeli tootja kirjeldusele (vt punktid 25, 27 ja 30). See on eriti oluline pärast kudede pikaajalist või kaugvedu. Kui katsemeetod on edukalt omandatud ning oskus seda kasutada on saavutatud ja tõendatud, ei ole katse rutiinse kasutamise puhul selline kontrollimine igapäevaselt vajalik. Katse rutiinse kasutamise puhul soovitatakse siiski jätkata kaitsekihiomaduste kontrollimist korrapäraste ajavahemike järel.

KATSE KÄIK

24. Selle katsemeetodiga praegu hõlmatud katsed on teaduslikult põhjendatud EpiOcular™i silmaärrituse katse ja SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli kasutatav silmaärrituse katse, millele viidatakse kui valideeritud võrdlusmeetoditele (vastavalt VRM1 ja VRM2). RhCE-koemudelit kasutava katsemeetodi standardeeskiri on kättesaadav ja seda tuleb järgida katsemeetodi juurutamisel ja kasutamisel laboris (34, 35). Järgmistes punktides ja 2. liites kirjeldatakse RhCE-koemudelit kasutavate katsete peamisi osi ja eeskirju.

RHCE-KOEMUDELIT KASUTAVA KATSEMEETODI OSAD

Üldtingimused

25. Sarvkesta epiteelile sarnaneva kolmemõõtmelise koe rekonstrueerimiseks tuleb kasutada asjakohaseid inimese rakke; kude peaks koosnema progressiivselt kihistunud, kuid mitte sarvestunud rakkudest. RhCE-koemudel valmistatakse plaatidel, millel on sünteetiline poorne membraan, millest toitained läbi liiguvad ja rakkudesse suunduvad. Rekonstrueeritud sarvkesta epiteelile sarnanevas koes peab olema mitu kihti eluvõimelisi sarvestumata epiteelirakke. RhCE-koemudeli epiteelipind peaks olema otseses kokkupuutes õhuga, et võimaldada otsest pindmist kokkupuudet uuritavate kemikaalidega sarnaselt sellele, kuidas sarvkesta epiteeli kokkupuude toimuks *in vivo*. RhCE-koemudel peab moodustama funktsionaalse kaitsekihi, mis on piisavalt tugev, et takistada tsütotoksiliste võrdlusainete, nt Triton X-100 või naatriumdodetsüülsulfaadi kiiret läbitungimist. Nimetatud kaitsekihina toimimist tuleks tõendada ja seda saab hinnata kas sellise kokkupuuteaja määramisega, mille jooksul võrdlusaine teatava kindla kontsentratsiooni (nt 100 µl 0,3-mahuprotsendilist Triton X-100) juures vähendab koe eluvõimelisust 50 % võrra (ET₅₀), või sellise kontsentratsiooni määramisega, mille juures võrdlusaine vähendab kindla kokkupuuteaja (nt 30-minutine töötlemine 50 µl naatriumdodetsüülsulfaadiga) jooksul koe eluvõimelisust 50 % võrra (IC₅₀). RhCE-koemudel peab olema selline, et uuritav kemikaal ei saaks tungida eluskudedesse ümber serva, vastasel korral ei oleks tegemist sarvkesta ja uuritava aine kokkupuute õige mudeliga. RhCE-koemudeli

valmistamiseks kasutatavad inimese rakud ei tohi olla saastunud bakterite, viiruste, mükoplasma ega seentega. Koemudeli steriilsust peaks kontrollima tarnija, kes jälgib, et mudel ei oleks saastatud seente ega bakteritega.

Funktsionaalsed tingimused

Eluvõimelisus

26. Koe eluvõimelisuse määramiseks kasutatakse MTT-katset (16). RhCE-koemudeli eluvõimelised rakud redutseerivad vitaalvärvaine MTT siniseks MTT formasaaniks, mis sadeneb ning ekstraheeritakse seejärel koest isopropanooliga (või sarnase lahustiga). Ekstraheeritud MTT formasaani saab määrata kvantitatiivselt kas neelduvuse (optilise tiheduse) mõõtmisega või HPLC-/UPLC-spektromeetrilise ühendmeetodiga (36). Puhta ekstraheerimislahusti optiline tihedus peab olema piisavalt madal, väiksem kui 0,1. RhCE-koemudeli kasutajad peaksid tagama, et iga kasutatav RhCE-koemudeli partii vastab kindlaksmääratud negatiivse kontrollproovi kriteeriumidele. Negatiivse kontrollproovi optilise tiheduse lubatavad vahemikud valideeritud võrdlusmeetodite puhul on esitatud tabelis 2. HPLC-/UPLC-spektromeetrilise ühendmeetodi kasutaja peaks negatiivse kontrollproovi nõuetekohasuse kriteeriumina kasutama tabelis 2 esitatud negatiivse kontrollproovi optilise tiheduse vahemikke. Katseprotokollis peaks olema dokumenteeritud, et negatiivse võrdlusainega töödeldud koed on kultuuris stabiilsed (annavad sarnaseid koe eluvõimelisuse mõõtmistulemusi) katses kasutatava kokkupuuteaja jooksul. Samasugust eeskirja peaks koepartii kvaliteedikontrolli osana järgima koemudeli tootja, kuid sellisel juhul võivad kehtida teised nõuetekohasuse kriteeriumid kui tabelis 2 esitatud. RhCE-koemudeli väljatootaja/tarnija peaks kindlaks määrama negatiivse kontrollproovi optilise tiheduse väärtuste (kvaliteedikontrolli katsetingimuste korral) nõuetekohasuse vahemiku (ülem- ja alampiiri).

Tabel 2. Negatiivse kontrollproovi optilise tiheduse väärtuste nõuetekohasuse vahemik (katse läbiviijatele)

Katse	Vastuvõetav alampiir	Vastuvõetav ülempiir
EpiOcular™i silmaärrituse katse (OCL-200) – VRM1 (nii vedelate kui ka tahkete ainete töötlemisel)	> 0,8 ¹	> 2,5
SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli kasutatav silmaärrituse katse (HCE/S) – VRM2 (nii vedelate kui ka tahkete ainete töötlemisel)	> 1,0	≤ 2,5

¹Selle vastuvõetavuspiiri juures arvestatakse võimalikku pikaajalist vedu või ladustamist (nt kauem kui 4 päeva), mis ei ole osutunud katsemeetodi toimivust mõjutavaks (37).

Toimimine kaitsekihina

27. RhCE-koemudel peab olema piisavalt paks ja tugev, et takistada tsütotoksiliste võrdlusainete kiiret läbitungimist, seda hinnatakse ET_{50} (Triton X-100) või IC_{50} (naatriumdodetsüülsulfaat) abil (tabel 3). RhCE-koemudeli väljatöötaja/müüja peab lõppkasutajale kudesid tarnides tõendama iga RhCE-koemudeli partii toimivust kaitsekihina (vt punkt 30).

Morfoloogia

28. RhCE-koemudeli histoloogilisel uuringul peab see osutuma olevaks inimese sarvkesta epiteeli sarnase struktuuriga (sealhulgas vähemalt kolm eluvõimeliste epiteelirakkude kihti ja sarvestumata pind). VRMide puhul on sobiv morfoloogiline struktuur väljatöötaja/tarnija poolt kindlaks määratud ning seetõttu ei pea katsemeetodi kasutaja selle omadusi iga kasutatava koepartii juures uuesti tõendama.

Korratavus

29. Katsemeetodiga peavad positiivsete ja negatiivsete kontrollproovide tulemused olema ajas korratavad.

Kvaliteedikontroll

30. RhCE-koemudelit tuleks kasutada üksnes siis, kui selle väljatöötaja/tarnija tõendab, et kõik kasutatavad RhCE-koemudelpartiid vastavad toote kindlaksmääratud kvaliteedikriteeriumidele, mille seas kõige olulisemad on eluvõimelisuse (punkt 26) ja kaitsekihina toimivuse (vt punkti 27) kriteeriumid. RhCE-koemudeli väljatöötaja/tarnija peaks kindlaks määrama ET_{50} - või IC_{50} -meetodiga (vt punktid 25 ja 26) mõõdetava kaitsekihina toimivuse nõuetekohasuse vahemiku (ülem- ja alampiiri). ET_{50} ja IC_{50} nõuetekohasuse vahemikud, mida RhCE-koemudelite (kasutatavad VRMides) väljatöötaja/tarnija kasutab partii kvaliteedikontrolli kriteeriumina, on esitatud tabelis 3. RhCE-koemudeli väljatöötaja/tarnija peab esitama katsemeetodi kasutajale andmed, mis tõendavad vastavust kõigile toote kvaliteedikriteeriumidele, nii et meetodi kasutaja saaks selle teabe katseprotokolli lisada. Ainult kõigile toote kvaliteedikriteeriumidele vastavate kudedega saadud tulemused sobivad nende kemikaalide kohta usaldusväärsete prognooside tegemiseks, mida ei ole vaja seoses silmade ärrituse või raske silmakahjustusega ÜRO GHSi / CLP-määruse kohaselt klassifitseerida ega märgistada.

Tabel 3. Partii kvaliteedi kontrollimise kriteerium

Katse	Vastuvõetav v alampiir	Vastuvõetav ülempiir
EpiOcular™i silmärrituse katse (OCL-200) – VRM1	$ET_{50} = 12,2$ min	$ET_{50} = 37,5$ min

(100 µl 0,3-mahuprotsendilist Triton X-100)		
SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli kasutatav silmaärrituse katse (HCE/S) – VRM2 (30-minutine töötlemine 50 µl naatriumdodetsüülsulfaadiga)	IC ₅₀ = 1 mg/ml	IC ₅₀ = 3,2 mg/ml

Uuritavate kemikaalide ja kontrollainete kasutamine

31. Iga uuritava kemikaali ja iga kontrollainega tuleks iga kord kasutada vähemalt kaht koe paralleelproovi. Kasutatakse kaht erinevat töötlemismeetodit, üht vedelate ja teist tahkete uuritavate kemikaalide puhul (34, 35). Mõlema meetodi ja töötlemismeetodi korral tuleb koemudeli pinda enne uuritava kemikaaliga töötlemist niisutada kaltsiumi- ja magneesiumvaba Dulbecco fosfaadiga puhverdatud füsioloogilise lahusega (Ca²⁺/Mg²⁺-vaba DPBS), et jäljendada inimsilma niiskustingimusi. Kudede töötlemine algab kokkupuutesse viimisega uuritava(te) kemikaali(de) ja kontrollainetega. Mõlemas valideeritud võrdlusmeetodis tuleb mõlema töötlemismeetodi puhul kanda piisav kogus uuritavat kemikaali või kontrollainet ühtlaselt epiteeli pinnale, vältides lõpmatut annust (vt punktid 32 ja 33) (liide 2).
32. Uuritavaid kemikaale, mida 37 °C juures või madalamal temperatuuril saab pipeteerida (vajaduse korral kolbpipetti kasutades), käsitletakse valideeritud võrdlusmeetodites vedelikena, muul juhul tuleb neid käsitleda tahkete ainetena (vt punkt 33). Valideeritud võrdlusmeetodites levitatakse vedelad uuritavad kemikaalid ühtlaselt koe pinnale (st kantakse peale vähemalt 60 µl pinna cm² kohta) (vt liidet 2) (33, 34). Plaadile kantavate väikeste ruumalade tõttu ilmnedavad võivad kapillaarjõudu (pindpinevusjõudu) tuleks võimalikult palju vältida, et tagada õige annustamine koele. Vedela uuritava kemikaaliga töödeldud kudesid inkubeeritakse 30 minutit rakkude kasvatamise standardtingimustes (37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO₂, suhteline õhuniiskus ≥ 95 %). Kokkupuuteaja lõppedes tuleb vedel uuritav kemikaal ja kontrollained koe pinnalt hoolikalt eemaldada, loputades ohtra Ca²⁺/Mg²⁺-vaba DPBSiga toatemperatuuril. Loputusetaibile järgneb kokkupuutejärgne sukeldamine värskesse söötmesse toatemperatuuril (et eemaldada igasugune koesse imendunud uuritav kemikaal) eelnevalt kindlaks määratud ajavahemikuks, mis varieerub olenevalt kasutatavast valideeritud võrdlusmeetodist. Kokkupuutejärgset inkubeerimist värskes söötmes rakkude kasvatamise standardtingimustes enne MTT-katse tegemist rakendatakse üksnes VRM1 korral (vt liide 2) (34, 35).
33. Uuritavaid kemikaale, mida temperatuuril kuni 37 °C pipeteerida ei saa, käsitletakse valideeritud võrdlusmeetodites tahkete ainetena. Pealekantava uuritava kemikaali kogus peaks olema piisav, et katta kogu koepind, st peale tuleb kanda vähemalt 60 mg

ainet pinna cm^2 kohta (liide 2). Võimaluse korral tuleks tahket ainet alati katsetada peene pulbri kujul. Tahke uuritava kemikaaliga töödeldud kudesid inkubeeritakse eelnevalt kindlaks määratud ajavahemiku (oleneb kasutatavast valideeritud võrdlusmeetodist) jooksul rakkude kasvatamise standardtingimustes (vt liide 2) (34, 35). Kokkupuuteaja lõppedes tuleb tahke uuritav kemikaal ja kontrollained koe pinnalt hoolikalt eemaldada, loputades ohtra $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -vaba DPBSiga toatemperatuuril. Loputusetapile järgneb kokkupuutejärgne sukeldamine värskesse söötmesse toatemperatuuril (et eemaldada igasugune koesse imendunud uuritav kemikaal) eelnevalt kindlaks määratud ajavahemikuks, mis varieerub olenevalt kasutatavast valideeritud võrdlusmeetodist, ning kokkupuutejärgne inkubeerimine värskes söötmes rakkude kasvatamise standardtingimustes enne MTT-katse tegemist (vt liide 2) (34, 35).

34. Iga analüüsitsüklil peaks sisaldama ühtlasi ka negatiivset ja positiivset kontrollproovi, millega tõendatakse, et kudede eluvõimelisus (määratakse negatiivse kontrollprooviga) ja tundlikkus (määratakse positiivse kontrollprooviga) jäävad aja jooksul kogutud andmete põhjal kindlaks määratud nõuetekohasesse vahemikku. Samaaegselt analüüsitav negatiivne kontrollproov annab samuti lähtetaseme (koe eluvõimelisus 100 %) uuritava kemikaaliga töödeldud kudede suhtelise eluvõimelisuse arvutamiseks protsentides (%eluvõimelisust_{uuritav}). Valideeritud võrdlusmeetoditega kasutamiseks soovitatav positiivne kontrollaine on puhas metüülatsetaat (CASi nr 79-20-9, saab osta nt Sigma-Aldrichist, katalooginr 45997, vedelik). Valideeritud võrdlusmeetoditega VRM1 ja VRM2 kasutamiseks soovitatavad negatiivsed kontrollained on vastavalt ülipuhas H_2O ja $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -vaba DPBS. Neid kasutati kontrollainetena valideeritud võrdlusmeetodite valideerimisuuringutes ja nende kohta on olemas kõige rohkem aja jooksul kogutud andmeid. Sobivate alternatiivsete positiivsete ja negatiivsete kontrollainete kasutamine peab olema teaduslikult ja piisavalt põhjendatud. Negatiivsete ja positiivsete kontrollainetega tuleb katse teha sama(de) katse-eeskirja(de) järgi, mida kasutatakse analüüsitsüklis olevate uuritavate kemikaalide puhul (nt vedelike ja tahkete ainete puhul). Sellele peaks järgnema töötlemine kokkupuutesse viimise teel, loputamine, kokkupuutejärgne sukeldamine ja vajaduse korral kokkupuutejärgne inkubeerimine, nagu kirjeldatud vedelate uuritavate kemikaalidega paralleelselt samas analüüsitsüklis kasutatavate kontrollainete puhul (vt punkt 32) ja tahkete uuritavate kemikaalidega paralleelselt samas analüüsitsüklis kasutatavate kontrollainete puhul (vt punkt 33), enne kui tehakse MTT-katse (vt punkt 35) (34, 35). Ühest negatiivsete ja positiivsete kontrollproovide komplektist piisab kõigi samas analüüsitsüklis uuritavate samas olekus (vedelad või tahked) kemikaalide jaoks.

Koe eluvõimelisuse mõõtmine

35. MTT-katse on standarditud kvantitatiivne meetod (16), mida tuleks käesoleva katsemeetodi puhul kasutada koe eluvõimelisuse mõõtmiseks. Meetodit saab kasutada kolmemõõtmelises koemudelis. MTT-katse tehakse vahetult pärast kokkupuutejärgse inkubatsiooniperioodi lõppemist. Valideeritud võrdlusmeetodite puhul asetatakse RhCE-koemudeli proov rakkude kasvatamise standardtingimustes 180 ± 15 minutiks 0,3 ml MTT-lahusesse, mille kontsentratsioon on 1 mg/ml. RhCE-koemudeli eluvõimelised rakud redutseerivad vitaalvärvaine MTT siniseks sadenevaks MTT formasaaniks. Seejärel ekstraheeritakse sadenenud sinine MTT formasaan koest sobiva koguse isopropanooliga (või sarnase lahustiga) (34, 35). Vedelate kemikaalide uurimiseks kasutatud kudede puhul tuleks ekstraheerida nii koe pealt kui ka alt, kuid tahkete kemikaalide ja värviliste vedelike uurimiseks kasutatud kudede puhul tuleks ekstraheerida ainult koe alt (et minimeerida ekstraheerimiseks kasutatava isopropanoolilahuse võimalikku saastumist igasuguse uuritava kemikaaliga, mis võib olla koesse jäänud). Niisuguste vedelate kemikaalide uurimiseks kasutatud kudede puhul, mida ei saa hõlpsasti maha pesta, võib samuti ekstraheerida üksnes koe alt. Samaaegselt uuritud negatiivse ja positiivse kontrollaine proove tuleb töödelda sarnaselt uuritava kemikaali proovidega. Ekstraheeritud MTT formasaani võib kvantitatiivselt määrata kas neelduvuse (optilise tiheduse) mõõtmisega lainepikkusel 570 nm, kasutades spektririba laiust ± 30 nm, või HPLC-/UPLC-spektrofotomeetrilisel ühendmeetodil (vt punkt 42) (11, 36).
36. Uuritava kemikaali optilised omadused või selle keemiline reaktsioon MTTga võib MTT formasaani mõõtmist segada ja põhjustada vea koe eluvõimelisuse hindamisel. Uuritava kemikaalid võivad MTT formasaani mõõtmist segada, redutseerides MTT siniseks MTT formasaaniks ja/või olles segava värvusega, st uuritav kemikaal neelab tavaolekus või töötlemisprotsessi tõttu samas lainepikkuste vahemikus kui MTT formasaan (st 570 nm ümbruses). Enne katse läbiviimist tuleks teha eelkontroll, et teha kindlaks võimalikud MTT otsesed redutseerijad ja/või segava värvusega kemikaalid, samuti tuleks kasutada täiendavaid kontrollproove, et leida niisuguste kemikaalide põhjustatud võimalikud häired ja neid korrigeerida (vt punktid 37–41). See on eriti oluline, kui konkreetsest uuritavat kemikaali ei saa loputades RhCE-koemudelist täielikult eemaldada või kui see läbib sarvkesta epiteeliga sarnase koe ja esineb seetõttu RhCE-koemudelis MTT-katse tegemise ajal. Nende MTT formasaaniga samas lainepikkuste vahemikus valgust neelavate uuritavate kemikaalide puhul, mis ei võimalda tugeva segava mõju tõttu (st tugeva neelduvuse tõttu lainepikkusel 570 ± 30 nm) MTT-formasaani neelduvuse (optilise tiheduse) mõõtmist, võib MTT formasaani sisalduse mõõtmiseks kasutada HPLC-/UPLC-spektromeetrilist ühendmeetodit (vt punktid 41 ja 42) (11, 36). Üksikasjalik kirjeldus, kuidas tuvastada MTT otsene redutseerimine ja värviliste ainete segav mõju ning teha parandusi nende arvestamiseks, on esitatud valideeritud võrdlusmeetodite standardeeskirjades (34, 35). Samuti on III ja IV liites esitatud vastavalt VRM1- ja

VRM2-meetodi puhul illustreerivad vooskeemid, millest juhinduda MTT otseste redutseerijate ja/või segava värvusega kemikaalide kindlakstegemisel ja nendega tegelemisel.

37. MTT formasaaniga samas lainepikkuste vahemikus valgust neelavate (loomulikus olekus või pärast töötlemist) uuritavate kemikaalide võimaliku segava mõju kindlakstegemiseks ning täiendavate kontrollproovide vajalikkuse üle otsustamiseks lisatakse uuritavat kemikaali vette ja/või isopropanooli ning inkubeeritakse sobiva aja jooksul toatemperatuuril (vt liide 2) (34, 35). Kui VRM1-meetodi puhul neelab vees ja/või etanoolis lahustatud uuritav kemikaal küllaldaselt valgust vahemikus 570 ± 20 nm (vt liide 3) või VRM2-meetodi puhul saadakse uuritava kemikaali segamisel veega värviline lahus (vt liide 4), segab uuritav kemikaal eeldatavalt MTT formasaani neelduvuse (optilise tiheduse) mõõtmist ning teha tuleks täiendavaid kontrollkatseid värvainetega või tuleks kasutada HPLC-/UPLC-spektromeetrilist ühendmeetodit – sel juhul ei ole nimetatud kontrollkatsete tegemine vajalik (vt punkte 41 ja 41 ning III ja IV liidet) (34, 35). Neelavuse (optilise tiheduse) mõõtmise korral tuleb iga uuritavat kemikaali kanda vähemalt kahele elujõulise koe paralleelproovile, millega tehakse läbi kogu katse käik, kuid MTTga inkubeerimise etapis inkubeeritakse neid MTT asemel söötmega, et saada kontrollproov, mille eluskudedes on mittespetsiifiline värvus (NSC_{elus}) (34, 35). Katse NSC_{elus} -kontrollprooviga tuleb läbi viia paralleelselt uuritava värvilise kemikaali prooviga ning korduvate katsete korral tuleb eluskudedele bioloogilise varieeruvuse tõttu koos iga tehtava katsega (igas analüüsitsükklis) analüüsida ka eraldi NSC_{elus} -kontrollproovi. Koe tegelik eluvõimelisus arvutatakse järgmiselt: segava uuritava kemikaaliga kokku puutunud ja MTT-lahusega inkubeeritud eluskudedega saadud eluvõimelisuse protsent ($\%eluvõimelisust_{uuritav}$) miinus segava uuritava kemikaaliga kokku puutunud ning söötmega ja ilma MTTga inkubeeritud eluskudedega saadud mittespetsiifiline värvus ($\%NSC_{elus}$), mis saadakse paralleelselt selle katse läbiviimisega, mille tulemused vajavad korregerimist, st koe tegelik eluvõimelisus = $[\%eluvõimelisust_{uuritav}] - [\%NSC_{elus}]$.
38. MTT otseste redutseerijate kindlakstegemiseks tuleb iga uuritavat kemikaali lisada värskest valmistatud MTT-lahusele. MTT-lahusele lisatakse sobiv kogus uuritavalt kemikaali ning segu inkubeeritakse rakkude kasvatamise standardtingimustes ligikaudu 3 tundi (vt III ja IV liide) (34, 35). Kui uuritavat kemikaali sisaldav MTT-segu (või mittelahustuvate kemikaalide korral suspensioon) muutub siniseks/lillaks, võib eeldada, et uuritav kemikaal redutseerib otseselt MTTd ning olenemata sellest, kas kasutatakse neelavuse (optilise tiheduse) mõõtmist või HPLC-/UPLC-spektromeetrilist ühendmeetodit, tuleb mitteeluvõimelise RhCE-koemudeliga toimimist täiendavalt kontrollida. Täiendav toimivuskontroll tehakse surnud kudedega, millel on üksnes metaboolne jääkaktiivsus, kuid mis imavad ja seovad uuritavat kemikaali sarnaselt eluvõimeliste kudedega. VRM1-meetodi puhul saadakse

surnud koed madalal temperatuuril hoides (edaspidi „külmutades saadud surnud koed“). VRM2-meetodi puhul saadakse surnud koed pikaajalisel (vähemalt 24 ± 1 tundi) hoidmisel vees, millele järgneb säilitamine madalal temperatuuril (edaspidi „vees saadud surnud koed“). Iga MTT-d redutseeriv uuritav kemikaal kantakse vähemalt kahele surnud loe paralleelproovile, mis läbivad kogu katse käigu, et saada kontrollproov, milles MTT redutseerimine on mittespetsiifiline (NSMTT) (34, 35). Piisab ühest NSMTT-kontrollproovist iga uuritava kemikaali kohta, olenemata sellest, kui palju üksikkatseid/katsetsükleid tehakse. Koe tegelik eluvõimelisus arvutatakse järgmiselt: MTT redutseerijaga kokku puutunud eluskudedega saadud eluvõimelisuse protsent ($\% \text{eluvõimelisus}_{\text{uuritav}}$) miinus sama MTT redutseerijaga kokku puutunud surnud kudedega saadud MTT redutseerimine, mis arvutatakse negatiivse kontrollproovi suhtes, mida analüüsitakse paralleelselt korrigeerimist vajavate tulemustega katse läbiviimisega, st koe tegelik eluvõimelisus = $[\% \text{eluvõimelisus}_{\text{uuritav}}] - [\% \text{NSMTT}]$.

39. Kui on selgunud, et uuritav kemikaal on nii segava värvusega (vt punkt 37) kui ka MTT otsene redutseerija (vt punkt 38), on neelduvuse (optilise tiheduse) mõõtmise korral peale eelmistes punktides kirjeldatud NSMTT- ja NSC_{elus} -kontrollproovide vajalik ka kolmas kontrollproovide komplekt. See on tavaline tumeda värvusega uuritavate kemikaalide puhul, mis neelavad valgust lainepikkuste vahemikus 570 ± 30 nm (nt sinine, lilla, must), sest nende loomulik värv takistab nende MTT otsese redutseerimise võime hindamist vastavalt punktis 38 kirjeldatule. Selline olukord nõuab automaatselt nii NSMTT- kui ka NSC_{elus} -kontrollproovide kasutamist. Uuritavaid kemikaale, millega viiakse läbi nii NSMTT- kui ka NSC_{elus} -kontrollproovid, võivad absorbeerida ja siduda nii elus kui ka surnud loed. Seega võib juhtuda, et NSMTT-kontrollproov ei aita parandustes arvestada mitte ainult uuritava kemikaali MTT otsese redutseerimise võimet, vaid ka uuritava kemikaali surnud kudedesse absorbeerumisel ja seal püsimisel tekkivat segavat värvust. See võib põhjustada segavast värvusest tingitud vigade topeparandusi, sest uuritava kemikaali elusas koos absorbeerumisest ja seal püsimisest tingitud värvuse häirivat mõju korrigeeritakse juba NSC_{elus} -kontrollproovi järgi. Et vältida segavast värvusest tingitud vigade topeparandusi, on vaja teha kolmas kontrollkatse, millega analüüsitakse mittespetsiifilist värvust surnud kudedes ($\text{NSC}_{\text{surnud}}$) (vt III ja IV liide) (34, 35). Uuritavat kemikaali kantakse vähemalt kahele surnud koe paralleelproovile, millega tehakse läbi kogu katse käik, kuid MTTga inkubeerimise etapis inkubeeritakse neid MTT lahuse asemel söötmega. Piisab ühest $\text{NSC}_{\text{surnud}}$ -kontrollproovist iga uuritava kemikaali kohta, olenemata sellest, kui palju üksikkatseid/katsetsükleid tehakse, kuid kõnealust kontrollproovi tuleks uurida paralleelselt NSMTT-kontrollprooviga ning kasutada mõlemas sama koepartiid. Koe tegelik eluvõimelisus arvutatakse järgmiselt: uuritava kemikaaliga kokku puutunud eluskudedega saadud eluvõimelisuse protsent ($\% \text{eluvõimelisus}_{\text{uuritav}}$) miinus

%NSMTT miinus %NSC_{elus} pluss segava värvusega uuritava kemikaaliga kokku puutunud ning söötmega ja ilma MTTta inkubeeritud surnud kudedega saadud mittespetsiifilise värvuse %, mis arvutatakse negatiivse kontrollproovi suhtes, mida analüüsitakse paralleelselt korrigeerimist vajavate tulemustega katse läbiviimisega, st koe tegelik eluvõimelisus = [%eluvõimelisust_{uuritav}] – [%NSMTT] – [%NSC_{elus}] + [%NSC_{surnud}].

40. Oluline on arvestada, et mittespetsiifiline MTT redutseerimine ja mittespetsiifilise värvuse häiriv mõju võivad suurendada koeekstrakti optilist tihedust (kui mõõdetakse neelduvust) nii, et see jääb ülespoole spektrofotomeetri lineaarsusvahemikku, ning et mittespetsiifiline MTT redutseerimine võib suurendada koeekstraktis sisalduva MTT formaani piigi pindala (kui mõõdetakse HPLC-/UPLC-spektromeetrilise ühendmeetodiga) nii, et see jääb ülespoole spektrofotomeetri lineaarsusvahemikku. Seetõttu on oluline et iga labor määraks näiteks MTT formaaniga (CASi nr 57360-69-7, saab osta nt Sigma-Aldrichist, katalooginr M2003) kindlaks oma spektrofotomeetri optilise tiheduse / piigi pindala lineaarsusvahemiku, enne kui alustab uuritavate kemikaalide analüüsimist regulatiivsel eesmärgil.
41. Neelduvuse (optilise tiheduse) mõõtmine spektrofotomeetriga on asjakohane MTT otseste redutseerijate ning segava värvusega uuritavate kemikaalide hindamisel, kui MTT formaaniga mõõtmisel täheldatud segav mõju ei ole väga tugev (st uuritava kemikaaliga saadud koeekstraktide optilised tihedused ilma MTT otsest redutseerimist ja/või värvuse segavat mõju arvestavate parandusteta on spektrofotomeetri lineaarsusvahemikus). Sellegipoolest tuleb ettevaatlikult suhtuda nende uuritavate kemikaalide puhul saadud tulemustesse, mille negatiivse kontrollproovi tulemus on %NSMTT ja/või %NSC_{elus} ≥ 60 % (VRM1, ja VRM2 vedelike analüüsimise meetodika) või 50 % (VRM2 tahkete ainete analüüsimise meetodika), sest need on kindlaksmääratud läviväärtused, mille järgi valideeritud võrdlusmeetodites eristatakse klassifitseeritud ja klassifitseerimata kemikaale (vt punkt 44). Neelduvust (optilist tihedust) ei saa siiski mõõta, kui MTT formaani sisalduse mõõtmist segav mõju on liiga tugev (st põhjustab uuritavate koeekstraktide korrigeerimata optiliste tiheduste sattumist väljapoole spektrofotomeetri lineaarsusvahemikku). Neid uuritavaid kemikaale, mis on värvilised või muutuvad värviliseks kokkupuutel vee või isopropanooliga ja segavad liiga tugevalt MTT formaani neelduvuse (optilise tiheduse) mõõtmist, saab siiski analüüsida HPLC-/UPLC-spektromeetrilist ühendmeetodit kasutades (vt III ja IV liidet). HPLC-/UPLC-aparatuur võimaldab MTT formaani enne selle kvantitatiivset määramist kemikaalist eraldada (36). Sel põhjusel ei ole HPLC-/UPLC-spektromeetrist ühendmeetodit kasutades vaja analüüsida NSC_{elus}- või NSC_{surnud}-kontrollproove olenemata sellest, missugust kemikaali uuritakse. Siiski tuleks uurida NSMTT-kontrollproove, kui on kahtlus, et uuritav kemikaal redutseerib otseselt MTTd (toimides punktis 38 kirjeldatu kohaselt).

Samuti tuleks NSMTT-kontrollproove kasutada värviliste (iseloomuliku või veega kokkupuutel tekkiva värvusega) uuritavate kemikaalide puhul, kui värvus takistab hinnata nende võimet otseselt MTTd redutseerida (nimetatud kontrollproovide kasutamist on kirjeldatud punktis 38). Kui MTT formasaani sisalduse mõõtmiseks kasutatakse HPLC-/UPLC-spektromeetrilist ühendmeetodit, arvutatakse koe eluvõimelisus (protsentides) uuritava kemikaaliga kokku puutunud elusa koega saadud MTT formasaani piigi pindala protsendina paralleelse negatiivse kontrollprooviga saadud MTT formasaani piigi suhtes. Nende uuritavate kemikaalide puhul, mis on võimelised otseselt MTT redutseerima, arvutatakse koe tegelik eluvõimelisus järgmiselt: $\% \text{Eluvõimelisus}_{\text{uuritav}} - \% \text{NSMTT}$, nagu on kirjeldatud punkti 38 viimases lauses. Lõpuks tuleb märkida, et neid otseseid MTT redutseerijaid (mis võivad olla ka segava värvusega), mis jäävad kudedesse pärast töötlemist püsima ja redutseerivad MTTd nii tugevalt, et see põhjustab uuritavate koeekstraktide optiliste tiheduste (kui mõõdetakse optilist tihedust) või piigi pindalade (kui kasutatakse HPLC-/UPLC-spektromeetrilist ühendmeetodit) sattumist väljapoole spektrofotomeetri lineaarsusvahemikku, ei saa analüüsida RhCE-katsemeetoditega, kuigi neid esineb eeldatavast väga harva.

42. HPLC-/UPLC-spektromeetrilist ühendmeetodit võib kasutada MTT formasaani sisalduse mõõtmiseks igat tüüpi uuritava kemikaali korral (värvilised, värvitud, MTT redutseerijad ja mitteredutseerijad) (11, 36). Kuna HPLC-/UPLC-spektrofotomeetria aparatuurid on erinevad, ei ole igal kasutajal lihtne luua süsteemis täpselt samasugused tingimused. Enne HPLC-/UPLC-spektromeetria aparatuuri kasutamist koeekstraktidest pärit MTT formasaani kvantitatiivseks mõõtmiseks tuleb tõendada aparatuuri nõuetekohasust; selleks peavad olema täidetud mitme standardse kvalifikatsiooninäitajaga seotud nõuetekohasuse kriteeriumid, mille aluseks on näitajad ja kriteeriumid, mida on kirjeldatud USA Toidu- ja Ravimiameti juhendis bioanalüütilise meetodi valideerimise kohta tööstuses (36, 38). Need põhinäitajad ja nende nõuetekohasuse kriteeriumid on esitatud 5. liites. Kui 5. liites määratletu nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, loetakse HPLC-/UPLC-fotomeetriaaparatuur nõuetekohaseks ning see on valmis MTT formasaani sisalduse mõõtmiseks käesolevas katsemeetodis kirjeldatud katsetingimuste juures.

Nõuetekohasuse kriteeriumid

43. Igas analüüsitsükklis, kus kasutakse kvaliteedikontrolli (vt punkt 30) läbinud RhCE-koepartiisid, peab negatiivse kontrollainega töödeldud kudede optiline tihedus kajastama kudede veo-, vastuvõtu- ja katse-eeskirjakohaste töötluste järgset kvaliteeti ega tohi jääda väljapoole varem kindlaksmääratud piire, mis on esitatud tabelis 2 (vt punkt 26). Samuti peab positiivse kontrollainega, nt metüülatsaadiga töödeldud kudede keskmine eluvõimelisus negatiivse kontrollprooviga võrreldes olema $< 50 \%$, kui järgitakse VRM1-meetodi vedelike või tahkete ainete katse-eeskirja, ja $\leq 30 \%$

(vedelikel) või $\leq 20\%$ (tahketel ainetel), kui kasutatakse VRM2-meetodit; see näitaja kirjeldab kudede võimet reageerida ärritavale uuritavale kemikaalile katsemeetodiga ettenähtud tingimustes (34, 35). Uuritava kemikaalide ja kontrollainetega töödeldud paralleelsete koeproovidega saadud tulemuste varieeruvus peab jääma vastuvõetavatesse piiridesse (st kahe paralleelse koeproovi eluvõimelisuse erinevus peab olema alla 20 % või ei tohi kolme paralleelse koeprooviga saadud tulemuste standardhälve ületada 18 %). Kui analüüsitsükklisse võetud negatiivse või positiivse kontrollprooviga saadud tulemus jääb väljapoole vastuvõetavaid piire, loetakse analüüsitsükkel ebakvaliteetseks ja seda tuleb korrata. Kui uuritava kemikaaliga töödeldud paralleelsete koeproovidega saadud tulemuste varieeruvus jääb väljapoole vastuvõetavaid piire, loetakse katse ebakvaliteetseks ja katset uuritava kemikaaliga tuleb korrata.

Tulemuste tõlgendamine ja prognoosimismudel

44. Iga uuritava kemikaaliga töödeldud paralleelsete koeproovide ekstraktidega saadud optilise tiheduse väärtuste / piikide pindalade järgi arvutatakse protsentides koe keskmine eluvõimelisus (paralleelsete koeproovidega saadud tulemuste keskvärtus) normaliseerituna negatiivse kontrollproovi järgi, mille väärtuseks võetakse 100 %. Koe eluvõimelisuse (protsentides) läviväärtused nende uuritavate kemikaalide kindlakstegemiseks, mida ei ole vaja klassifitseerida seoses silmade ärrituse või raske silmakahjustusega (ÜRO GHSi / CLP-määruse kohane kategooria puudub), on esitatud tabelis 4. Tulemusi tuleb seega tõlgendada järgmiselt:
- uuritav kemikaal määratletakse ÜRO GHSi ja CLP-määruse kohast klassifitseerimist ja märgistamist mittevajava kemikaalina (kategooria puudub), kui koe keskmine eluvõimelisus (protsentides) pärast kemikaaliga kokkupuudet ja kokkupuutejärgset inkubeerimist on suurem kui ($>$) koe eluvõimelisuse (protsentides) kindlaksmääratud läviväärtus, mis on esitatud tabelis 4. Sellisel juhul ei ole vaja täiendavaid katseid teiste katsemeetoditega;
 - kui koe keskmine eluvõimelisus (protsentides) pärast kemikaaliga kokkupuudet ja kokkupuutejärgset inkubeerimist on väiksem kui koe eluvõimelisuse (protsentides) kindlaksmääratud läviväärtus või sellega võrdne ($\leq$), ei ole võimalik prognoose teha, nagu näidatud tabelis 4. Sellisel juhul on vaja täiendavaid katset teiste katsemeetoditega, sest RhCED kasutavad katsemeetodid annavad teatava hulga valepositiivseid tulemusi (vt punktid 14–15) ega suuda eristada ÜRO GHSi ja CLP-määruse kohastes kategooriatesse 1 ja 2 kuuluvaid kemikaale (vt punkt 17)

Tabel 4. Prognoosimismudelid ÜRO GHSi ja CLP-määruse klassifikatsiooni järgi

VRM	Kategooriata	Prognoosida ei ole võimalik

VRM1 – EpiOcular™i silmäärrituse katse (mõlemad katse-eeskirjad)	Koe keskmine eluvõimelisus > 60 %	Koe keskmine eluvõimelisus ≤ 60 %
VRM2 – SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli kasutav silmäärrituse katse (katse-eeskiri vedelike korral)	Koe keskmine eluvõimelisus > 60 %	Koe keskmine eluvõimelisus ≤ 60 %
VRM2 – SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli kasutav silmäärrituse katse (katse-eeskiri tahkete ainete korral)	Koe keskmine eluvõimelisus > 50 %	Koe keskmine eluvõimelisus ≤ 50 %

45.

46. Üksainus katse vähemalt kahe paralleelse koeprooviga uuritava kemikaali kohta peaks olema piisav, kui tulemus on ühene. Piiripealse tulemuse puhul, nagu lahkuminevad tulemused paralleelproovide mõõtmisel ja/või keskmine eluvõimelisuse protsent $60 \pm 5 \%$ (VRM1 ja VRM2 vedelike korral) või $50 \pm 5 \%$ (VRM2 tahkete ainete korral), tuleks kaaluda teise ja isegi kolmanda katse läbiviimist, kui kaks esimest katset annavad vastuolulise tulemuse.

47. Kui see on asjakohane ja õigustatud, võib teatavat liiki segude puhul kaaluda teistsuguste koe eluvõimelisuse (protsentides) läviväärtuste kasutamist, millega eristatakse klassifitseeritud ja klassifitseerimata uuritavad kemikaalid, et suurendada katsemeetodi üldist toimivust seda liiki segude korral (vt punkt 14).
Võrdluskemikaalid võivad aidata hinnata tundmatu uuritava kemikaali või tooteklassi võimet põhjustada rasket silmakahjustust / silmade ärritust või hinnata klassifitseeritud kemikaali võimalikku suhtelist toksilisust silmade suhtes teatavas positiivsete reaktsioonide vahemikus.

ANDMED JA ARUANDLUS

Andmed

48. Iga analüüsitsüklis oleva paralleelse koeprooviga saadud andmed (nt uuritavate kemikaalide ja kontrollainete optilise tiheduse väärtused / piikide pindalad ja arvutatud koe eluvõimelisuse (protsentides) andmed ning RhCE-katsemeetodi kohane

lõplik prognoos) esitatakse tabelina iga uuritava kemikaali kohta, samuti tuleb vajaduse korral esitada korduskatsetel saadud andmed. Peale selle tuleb esitada kudede keskmine eluvõimelisus (protsentides) ja kahe paralleelse koeproovi eluvõimelisuse erinevus (kui $n = 2$ paralleelset koeproovi) või iga uuritava kemikaali ja kontrollainega saadud tulemuste standardhälve (kui $n \geq 3$ paralleelset koeproovi). Kui uuritud kemikaali puhul täheldati segavat mõju MTT formasaani sisalduse mõõtmisele MTT otsese redutseerimise tõttu ja/või segavat värvust, tuleb iga niisuguse kemikaali puhul esitada sellekohased andmed.

Katseprotokoll

49. Katseprotokollis tuleks esitada järgmine teave.

Uuritav kemikaal

Ühest koostisosast koosnev aine:

- kemikaali identifitseerimisandmed, nagu IUPACi või CASi nimetus(ed) ja CASi number/numbrid, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem ja/või muud identifikaatorid;
- füüsikaline olek, lenduvus, pH, log P, molekulmass, aineklass ja muud uuringu tegemisega seotud asjakohased füüsikalis-keemilised omadused, kättesaadavas ulatuses;
- puhtus, lisandite keemiline määratlus, kui see on asjakohane ja praktiliselt teostatav jne;
- töötlemine enne katset, kui asjakohane (nt soojendamine, peenestamine);
- säilitamise tingimused ja stabiilsus säilitamisel, kättesaadavas ulatuses.

Mitme koostisosaga aine, tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal ja segu:

- võimalikult täpne omaduste kirjeldus lähtuvalt koostisosade keemilisest määratlusest (vt eespool), kvantitatiivsest sisaldusest ja asjakohastest füüsikalis-keemilistest omadustest (vt eespool), kättesaadavas ulatuses;
- füüsikaline olek ja muud uuringu tegemisega seotud asjakohased füüsikalis-keemilised omadused, kättesaadavas ulatuses;
- puhtus, lisandite keemiline määratlus, kui see on asjakohane ja praktiliselt teostatav jne;
- töötlemine enne katset, kui asjakohane (nt soojendamine, peenestamine);
- säilitamise tingimused ja stabiilsus säilitamisel, kättesaadavas ulatuses.

Positiivsed ja negatiivsed kontrollained

- Kemikaali identifitseerimisandmed, nagu IUPACi või CASi nimetus(ed) ja CASi number/numbrid, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem ja/või muud identifikaatorid;
- füüsikaline olek, lenduvus, molekulmass, aineklass ja muud uuringu tegemisega seotud asjakohased füüsikalised-keemilised omadused, kättesaadavas ulatuses;
- puhtus, lisandite keemiline määratlus, kui see on asjakohane ja praktiliselt teostatav jne;
- töötlemine enne katset, kui asjakohane (nt soojendamine, peenestamine);
- säilitamise tingimused ja stabiilsus säilitamisel, kättesaadavas ulatuses;
- muu negatiivse kontrollaine kui ülipuhta H_2O või $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -vaba DPBSi kasutamise põhjendus, kui see on asjakohane;
- muu positiivse kontrollaine kui puhta metüülatsetaadi kasutamise põhjendus, kui see on asjakohane;
- viide varasematele positiivse ja negatiivse kontrollproovi tulemustele, mis tõendavad sobivaid analüüsitsükli nõuetekohasuse kriteeriume.

Teave sponsori ja katselabori kohta

- Sponsori, katselabori ja uuringu juhi nimi ja aadress.

Kasutatud RhCE-koemudel ja katse-eeskiri (koos valikute põhjendustega, kui see on asjakohane)

Katsemeetodi tingimused

- Kasutatud RhCE-koemudel, sealhulgas partii number;
- MTT formaani kvantitatiivseks määramiseks kasutatud lainepikkus ja spektririba laius (kui asjakohane) ning mõõteseadme (nt spektrofotomeetri) lineaarsusvahemik;
- MTT formaani kvantitatiivse määramise meetodi kirjeldus;
- kasutatud HPLC-/UPLC-fotomeetriaaparatuuri kirjeldus, kui asjakohane;
- kogu täiendav teave kasutatud konkreetse RhE-koemudeli ja selle toimivuse kohta. See hõlmab vähemalt järgmist:
 - i) eluvõimelisus kvaliteedi kontrollil (tarnija andmed);
 - ii) eluvõimelisus katsemeetodiga nõutavates tingimustes (kasutaja andmed);
 - iii) kaitsekihina toimivuse kontroll;
 - iv) morfoloogiaandmed, kui on olemas;
 - v) reprodutseeritavus ja prognoosivõime;

- vi) muude RhCE-koemudeli kvaliteedi kontrollide andmed, kui on olemas;
- viide varasematele andmetele RhCE-koemudeli kohta. See hõlmab vähemalt järgmist: kvaliteedikontrolli andmete nõuetekohasus, arvestades varasemaid partii andmeid;
- kinnitus, et katselabor on enne katsemeetodi rutiinset kasutamist tõendanud oma pädevust asjaomaseid kemikaale analüüsides.

Analüüsiseeria ja katse nõuetekohasuse kriteeriumid

- Positiivsete ja negatiivsete kontrollproovidega saadud tulemuste keskväärtused ja nõuetekohased vahemikud, mille aluseks on aja jooksul kogutud andmed;
- positiivsel ja negatiivsel kontrollkatsel paralleelsete koeproovidega saadud tulemuste lubatav varieeruvus;
- uuritava kemikaaliga paralleelsete koeproovidega saadud tulemuste lubatav varieeruvus.

Katse käik

- Kasutatud katse-eeskirja üksikasjad;
- uuritava kemikaali ja kontrollainete kasutatud doosid;
- kokkupuute, kokkupuutejärgse sukeldatuse ja inkubeerimise kestus ja temperatuur nende ajal (kui asjakohane);
- kõikide katse-eeskirjas tehtud muudatuste kirjeldus;
- otseste MTT redutseerijate ja/või värviliste uuritavate kemikaalide puhul kasutatud kontrollproovid, kui asjakohane;
- kasutatud paralleelsete koeproovide arv uuritava kemikaali kohta ja kontrollproovid (positiivne kontrollproov, negatiivse kontrollproov, NSMTT, NSC_{elus} ja NSC_{sumud}, kui asjakohane).

Tulemused

- Tabeli kujul esitatud andmed igas analüüsitsüklis ja paralleelmõõtmises olnud iga uuritava kemikaali ja kontrollaine kohta (kaasa arvatud korduskatsete andmed, kui see on asjakohane), sealhulgas optilise tiheduse väärtus või MTT formaani piigi pindala, koe eluvõimelisus (protsentides), koe keskmine eluvõimelisus (protsentides), paralleelsete koeproovidega saadud tulemuste erinevus või standardhälve ning lõplik prognoos;
- kui see on asjakohane, siis otseselt MTT redutseerivate ja/või värviliste uuritavate kemikaalide puhul kasutatud kontrollproovide tulemused, sealhulgas optilise tiheduse

väärtus või MTT formasaani piigi pindala, %NSMTT, %NSC_{elus}, %NSC_{surnud},
paralleelsete koeproovidega saadud tulemuste erinevus või standardhälve, lõplik
korrigeeritud koe eluvõimelisus (protsentides) ja lõplik prognoos;

- uuritava(te) kemikaali(de)ga ja kontrollainetega saadud tulemuste võrdlus
analüüsitsükli ja katsete nõuetekohasuse kriteeriumidega;
- muude täheldatud mõjude (nt kudede värvumine värvilise uuritava kemikaali tõttu)
kirjeldus.

Tulemuste arutelu

Järeldused

KIRJANDUS

- (1) Ühinenud Rahvaste Organisatsioon (ÜRO), „United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)“, ST/SG/AC.10/30/Rev 6, 6., täiendatud väljaanne, United Nations, New York ja Genf, 2015. Kättesaadav aadressil http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.
- (2) Käesoleva lisa peatükk B.5 „Äge mürgisus: silmade ärritus/söövitus“.
- (3) Käesoleva lisa peatükk B.47, „Veise sarvkesta hägususe ja läbilaskvuse katsemeetod selliste kemikaalide kindlakstegemiseks, i) mis tekitavad raskeid silmakahjustusi, ja ii) mida ei ole vaja klassifitseerida seoses silmade ärrituse või raske silmakahjustusega“.
- (4) Käesoleva lisa peatükk B.48, „Isoleeritud kanasilma katsemeetod selliste kemikaalide kindlakstegemiseks, i) mis tekitavad raskeid silmakahjustusi, ja ii) mida ei ole vaja klassifitseerida“.
- (5) Käesoleva lisa peatükk B.61, „Fluorestseiini lekke katsemeetod silmi söövitavate ja tugevalt ärritavate kemikaalide kindlakstegemiseks“.
- (6) Käesoleva lisa peatükk B.68, „Lühiajalise kokkupuute *in vitro* katsemeetod selliste kemikaalide kindlakstegemiseks, i) mis tekitavad raskeid silmakahjustusi, ja ii) mida ei ole vaja klassifitseerida seoses silmade ärrituse või raske silmakahjustusega“.
- (7) Freeman, S.J., Alépée N., Barroso, J., Cole, T., Compagnoni, A., Rubingh, C., Eskes, C., Lammers, J., McNamee, P., Pfannenbecker, U., Zuang, V. (2010), „Prospective Validation Study of Reconstructed Human Tissue Models for Eye Irritation Testing“, *ALTEX*, nr 27, eriväljaanne 2010, lk 261–266.
- (8) EC EURL ECVAM (2014), „The EURL ECVAM – Cosmetics Europe prospective validation study of Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE)-based test methods for identifying chemicals not requiring classification and labelling for serious eye damage/eye irritation: Validation Study Report.“ EUR 28125 EN; doi:10.2787/41680. Kättesaadav aadressil <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC100280>.
- (9) EURL ECVAMi teaduslik nõuandekomitee (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.“ ESACi aramus nr 2014-03, 17. november 2014; EUR

28173 EN; doi: 10.2787/043697. Kättesaadav aadressil
<http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103702>.

- (10) Alépée, N., Leblanc, V., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Lelièvre, D., Meloni, M., Nardelli, L., Roper, C.S, Santirocco, E., Toner, F., Van Rompay, A., Vinall, J., Cotovio, J. (2016), „Multi-laboratory validation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using liquid chemicals“, *Toxicol. In Vitro*, nr 31, lk 43–53.
- (11) Alépée, N., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Meloni, M., Nardelli, L., Vinall, C.J., Toner, F., Roper, C.S, Van Rompay, A.R., Leblanc, V., Cotovio, J. (2016), „Multi-laboratory evaluation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using solid chemicals and overall performance of the test method with regard to solid and liquid chemicals testing“, *Toxicol. In Vitro*, nr 34, lk 55–70.
- (12) EURL ECVAMi teaduslik nõuandekomitee (2016), „ESAC Opinion on the SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT)“, ESACi arvamus nr 2016-02, 24. juuni 2016; EUR 28175 EN; doi: 10.2787/390390. Kättesaadav aadressil
<http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103704>.
- (13) EC EURL ECVAM (2016), „Recommendation on the Use of the Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Serious Eye Damage/Eye Irritation According to UN GHS“ (pooleliolev käsikiri).
- (14) Draize, J.H., Woodard, G., Calvery, H.O. (1944), „Methods for the Study of Irritation and Toxicity of Substances Applied Topically to the Skin and Mucous Membranes“, *Journal of Pharmacol. and Exp. Therapeutics*, nr 82, lk 377–390.
- (15) Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., Zuang, V. (2010), „A Proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *In Vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches“, *Toxicol. In Vitro*, nr 24, lk 1–9.
- (16) Mosmann, T. (1983), „Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays“, *J. Immunol. Methods*, nr 65, lk 55–63.
- (17) OECD (2016), „Series on Testing and Assessment No 216: Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro*

Reconstructed Human Cornea-Like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage, Based on the Validated Reference Methods EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE EIT described in TG 492“, Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

- (18) OECD (2005), „Series on Testing and Assessment No 34: Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment“, Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (19) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Hayden, P., Kubilus, J., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2011), „Development of the EpiOcular™ Eye Irritation Test for Hazard Identification and Labelling of Eye Irritating Chemicals in Response to the Requirements of the EU Cosmetics Directive and REACH Legislation“, *Altern. Lab. Anim.*, nr 39, lk 339–364.
- (20) Nguyen, D.H., Beuerman, R.W., De Wever, B., Rosdy, M. (2003), „Three-dimensional construct of the human corneal epithelium for in vitro toxicology“, Väljaandes: Salem, H., Katz, S.A. (toim.), *Alternative Toxicological Methods*, CRC Press, lk 147–159.
- (21) Pfannenbecker, U., Bessou-Touya, S., Faller, C., Harbell, J., Jacob, T., Raabe, H., Tailhardat, M., Alépée, N., De Smedt, A., De Wever, B., Jones, P., Kaluzhny, Y., Le Varlet, B., McNamee, P., Marrec-Fairley, M., Van Goethem, F. (2013), „Cosmetics Europe multi-laboratory pre-validation of the EpiOcular™ reconstituted Human Tissue Test Method for the Prediction of Eye Irritation“, *Toxicol. In Vitro*, nr 27, lk 619–626.
- (22) Alépée, N., Bessou-Touya, S., Cotovio, J., de Smedt, A., de Wever, B., Faller, C., Jones, P., Le Varlet, B., Marrec-Fairley, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., van Goethem, F., McNamee, P. (2013), „Cosmetics Europe Multi-Laboratory Pre-Validation of the SkinEthic™ Reconstituted Human Corneal Epithelium Test Method for the Prediction of Eye Irritation“, *Toxicol. In Vitro*, nr 27, lk 1476–1488.
- (23) Kolle, S.N., Moreno, M.C.R., Mayer, W., van Cott, A., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R. (2015), „The EpiOcular™ Eye Irritation Test is the Method of Choice for *In Vitro* Eye Irritation Testing of Agrochemical Formulations: Correlation Analysis of EpiOcular™ Eye Irritation Test and BCOP Test Data to UN GHS, US EPA and Brazil ANIVSA Classifications“, *Altern. Lab. Anim.*, nr 43, lk 1–18.
- (24) Adriaens, E., Barroso, J., Eskes, C., Hoffmann, S., McNamee, P., Alépée, N., Bessou-Touya, S., De Smedt, A., De Wever, B., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Zuang, V. (2014), „Retrospective Analysis of the Draize Test for Serious Eye Damage/Eye Irritation: Importance of Understanding the *In*

Vivo Endpoints Under UN GHS/EU CLP for the Development and Evaluation of *In Vitro* Test Methods“, *Arch. Toxicol.*, nr 88, lk 701–723.

- (25) Barroso, J., Pfannenbecker, U., Adriaens, E., Alépée, N., Cluzel, M., De Smedt, A., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Templier, M., McNamee, P. (2017), „Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation *in vivo* data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD)“, *Arch. Toxicol.*, nr 91, lk 521–547.
- (26) Meloni, M., De Servi, B., Marasco, D., Del Prete, S. (2011), „Molecular mechanism of ocular surface damage: Application to an *in vitro* dry eye model on human corneal epithelium“, *Molecular Vision*, nr 17, lk 113–126.
- (27) Hackett, R.B., McDonald, T.O. (1991), „Eye Irritation“, väljaandes *Advances in Modern Toxicology: Dermatoxicology* Marzulli F.N. ja Maibach H.I. (toim.), 4th trükk, lk 749–815, Hemisphere Publishing Corporation, Washington, DC, USA.
- (28) Fox, D.A., Boyes, W.K. (2008), „Toxic Responses of the Ocular and Visual System“, Väljaandes „Casarett & Doull’s Toxicology: The Basic Science of Poisons“, Klaassen C.D. (toim.), 7. trükk, lk 665–697, McGraw-Hill Ryerson, Withby, ON, Kanada.
- (29) Jester, J.V., Li, H.F., Petroll, W.M., Parker, R.D., Cavanagh, H.D., Carr, G.J., Smith, B., Maurer, J.K. (1998), „Area and Depth of Surfactant Induced Corneal Injury Correlates with Cell Death“, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, nr 39, lk 922–936.
- (30) Maurer, J.K., Parker, R.D., Jester, J.V. (2002), „Extent of Corneal Injury as the Mechanistic Basis for Ocular Irritation: Key Findings and Recommendations for the Development of Alternative Assays“, *Reg. Tox. Pharmacol.*, nr 36, lk 106–117.
- (31) Jester, J.V., Li, L., Molai, A., Maurer, J.K. (2001), „Extent of Corneal Injury as a Mechanistic Basis for Alternative Eye Irritation Tests“, *Toxicol. In Vitro*, nr 15, lk 115–130.
- (32) Jester, J.V., Petroll, W.M., Bean, J., Parker, R.D., Carr, G.J., Cavanagh, H.D., Maurer, J.K. (1998), „Area and Depth of Surfactant-Induced Corneal Injury Predicts Extent of Subsequent Ocular Responses“, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, nr 39, lk 2610–2625.
- (33) Jester, J.V. (2006), „Extent of Corneal Injury as a Biomarker for Hazard Assessment and the Development of Alternative Models to the Draize Rabbit Eye Test“, *Cutan. Ocul. Toxicol.*, nr 25, lk 41–54.

- (34) EpiOcular™i silmaärrituse katse standardeeskiri, 8. versioon (5. märts 2013), „EpiOcular™ EIT for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals“, kättesaadav aadressil [<https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index>].
- (35) SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli kasutava silmaärrituse katse standardeeskiri, 1. versioon (20. juuli 2015), „SkinEthic™ HCE Eye Irritation Test (EITL for Liquids, EITS for Solids) for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals“, kättesaadav aadressil <https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index>.
- (36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., McNamee, P. (2015), „Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT-Reduction Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals“, *Toxicol. In Vitro*, nr 29, lk 741–761.
- (37) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Handa, Y., DeLuca, J., Truong, T., Hunter, A., Kearney, P., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2015), „EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) for Hazard Identification and Labeling of Eye Irritating Chemicals: Protocol Optimization for Solid Materials and Extended Shipment Times“, *Altern. Lab. Anim.*, nr 43, lk 101–127.
- (38) USA Toidu- ja Ravimiamet (2001), „Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation“, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, mai 2001. Kättesaadav aadressil <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>.
- (39) OECD (2017), „Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Series on Testing and Assessment No 263“, ENV Publications, Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

1. liide

MÕISTED

Täpsus: katsemeetodiga saadud tulemuste ja nõuetekohaste võrdlusväärtuste kokkulangevuse määr. Täpsus näitab katsemeetodi tulemuslikkust ja on üks olulistest aspektidest. Seda terminit kasutatakse ka vastavuse tähenduses ja see näitab katsemeetodiga saadud õigete tulemuste osakaalu (18).

Võrdluskemikaal: kemikaal, mida kasutatakse standardina võrdlemiseks uuritava kemikaaliga. Võrdluskemikaalil peaksid olema järgmised omadused: i) pidev ja usaldusväärne tarnija, kes kemikaali identifitseerib ja seda kirjeldab; ii) struktuuriline ja funktsionaalne sarnasus uuritava(te) kemikaali(de)ga ja/või sellega/nendega sarnane kemikaali-/tooteklass; iii) teadaolevad füüsikalised-keemilised omadused; iv) teadaolevat toimet tõendavad andmed ja v) teadaolev mõjusoo soovitatavas reaktsioonitugevuse vahemikus.

Alt-üles lähenemisviis: etapiviisiline lähenemisviis, mida kasutatakse niisuguste uuritavate kemikaalide korral, mille puhul on põhjust arvata, et need ei vaja klassifitseerimist ega märgistamist silmade ärrituse või raske silmakahjustusega seoses; nimetatud lähenemisviisi puhul eristatakse kõigepealt kemikaalid, mis ei vaja klassifitseerimist ega märgistamist (tulemus on negatiivne), muudest kemikaalidest (tulemus on positiivne).

Kemikaal: aine või segu.

Vastavus: vt „Täpsus“.

Sarvkest: silmamuna esikülje läbipaistev osa, mis katab vikerkesta ja pupilli ning laseb valgusel tungida silma sisse.

CV: variatsioonikordaja.

Dev: hälve.

EIT: silmärrituse katse.

EURL ECVAM: loomkatsete alternatiivide Euroopa Liidu referentlabor.

Silmade ärritus: muutuse tekkimine silmas pärast uuritava kemikaali silma eespinnale manustamist, seejuures on muutus 21 päeva jooksul pärast manustamist täielikult taandunud. Samatähenduslik mõistetega „pöörduv mõju silmale“ ja „ÜRO GHSi / CLP-määruse kohane 2. kategooria“.

ET₅₀: kokkupuuteaeg, mille jooksul pealekantud, teatava kindla kontsentratsiooniga võrdluskemikaal vähendab koe eluvõimelisust 50 % võrra.

Valenegatiivsete tulemuste määr: kõikide selliste ainete osakaal, mis peaksid andma positiivse tulemuse, kuid on katsemeetodit järgides andnud negatiivse tulemuse. See on üks

katsemeetodi tulemuslikkuse näitaja.

Valepositiivsete tulemuste määr: kõikide selliste ainete osakaal, mis peaksid andma negatiivse tulemuse, kuid on katsemeetodit järgides andnud positiivse tulemuse. See on üks katsemeetodi tulemuslikkuse näitaja.

Oht: niisuguse mõjuri või olukorra loomupärane omadus, mis võib avaldada kahjulikku toimet, kui organism, süsteem või (ala)populatsioon selle mõjuriga kokku puutub.

HCE: SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteel.

HPLC: kõrgefektiivne vedelikkromatograafia.

IC₅₀: kontsentratsioon, mille juures võrdluskemikaal vähendab kindla kokkupuuteaja (nt 30-minutine töötlemine naatriumdodetsüülsulfaadiga) jooksul koe eluvõimelisust 50 % võrra.

Lõpmatu annus: RhCE-koemudelile kantud uuritava kemikaali kogus, mis on suurem epiteeli pinna täielikuks ja ühtlaseks katmiseks vajalikust kogusest.

Pöördumatu mõju silmale: vt „Raske silmakahjustus“.

LLOQ: alumine määramispiir.

LogP: oktanol-vesi jaotuskoefitsiendi logaritm.

Segu: kahest või enamast ainest koosnev segu või lahus.

Ühe koostisosaga aine: aine, mis on määratletud oma kvantitatiivse koostisega, milles ühe peamise koostisosa sisaldus on vähemalt 80 massiprotsenti.

Mitme koostisosaga aine: aine, mis on määratletud oma kvantitatiivse koostisega, milles rohkem kui ühe peamise koostisosa kontsentratsioon on $\geq 10\%$ ja $< 80\%$ (massiprotsendid). Mitme koostisosaga aine saadakse tootmisprotsessi käigus. Erinevus segu ja mitme koostisosaga aine vahel seisneb selles, et segu saadakse kahe või enama aine kokku segamisel, ilma et toimuks keemilist reaktsiooni. Mitme koostisosaga aine saadakse keemilise reaktsiooni tulemusel.

MTT: 3-(4,5-dimetüültiasool-2-üül)-2,5-difenüültetrasooliumbromiid, tiasolüülsinine.

Negatiivne kontrollproov: proov, mis sisaldab kõiki katsesüsteemi komponente ja mida on töödeldud ainega, mis teadaolevalt kutsub katsesüsteemis esile positiivse reaktsiooni. Seda proovi analüüsitakse koos uuritava kemikaaliga töödeldud proovide ja teiste kontrollproovidega, et määrata kindlaks 100 % koe eluvõimelisus.

Klassifitseerimata: kemikaalid, mida ei ole klassifitseeritud seoses silmade ärrituse (ÜRO GHSi / CLP-määruse kohane 2. kategooria, ÜRO GHSi kategooria 2A või 2B) ega raske silmakahjustusega (ÜRO GHSi / CLP-määruse kohane 1. kategooria). Samatähenduslik mõistega „ÜRO GHSi /CLP-määruse kohane kategooria puudub“.

NSC_{surv}: mittespetsiifiline värvus surnud koes.

NSC_{elus}: mittespetsiifiline värvus elavas koes.

NSMTT: mittespetsiifiline MTT redutseerimine.

OD: optiline tihedus.

Toimivusnõuded: teaduslikult põhjendatuks arvatud valideeritud katsemeetodil põhinevad nõuded, mille alusel hinnatakse, kuivõrd saab kavandatud katsemeetodit võrrelda teostuslikult ja tööpõhimõttelt samalaadse meetodiga. Hõlmab järgmist: i) katsemeetodi olulised osad; ii) valideeritud katsemeetodi nõuetekohase toimivuse tõendamiseks kasutatud kemikaalide hulgest valitud võrdluskemikaalide miinimumloend ja iii) võrreldavad täpsuse ja usaldusväärsuse tasemed, mis põhinevad valideeritud katsemeetodiga saadud tulemustel ja mis tuleks kavandatud katsemeetodi hindamisel saavutada võrdluskemikaalide miinimumloendi kasutamisel (18).

Positiivne kontrollproov: proov, mis sisaldab kõiki katsesüsteemi komponente ja mida on töödeldud ainega, mis teadaolevalt kutsub katsesüsteemis esile positiivse reaktsiooni. Seda proovi analüüsitakse koos uuritava kemikaaliga töödeldud proovide ja teiste kontrollproovidega. Selleks, et oleks võimalik hinnata positiivse kontrollproovi esilekutsutud reaktsiooni varieeruvust ajas, ei tohi positiivne reaktsioon olla ülemäära tugev.

Asjakohasus: mõiste, millega väljendatakse seda, kas katsemeetod võimaldab uurida huvipakkuvat mõju, kas meetod on mõttekas ja sobib konkreetse eesmärgi jaoks. See näitab, mil määral saab katsemeetodiga õigesti mõõta või prognoosida huvipakkuvat bioloogilist mõju. Asjakohasus hõlmab ka katsemeetodi täpsuse (vastavuse) aspekti (18).

Usaldusväärsus: iseloomustab katsemeetodi korratavust, kui meetodit rakendatakse ühe ja sama katse-eeskirja alusel ühes laboris ja eri laborites pikema aja jooksul. Usaldusväärsuse hindamiseks arvutatakse laborisisene ja laboritevaheline korratavus ning laborisisene korduvus (18).

Asendav meetod: katsemeetod, mis on kavandatud rutiinses kasutuses oleva kinnitatud meetodi asendamiseks ohtude kindlakstegemise ja/või riskide hindamise meetodina ning mille puhul on kindlaks tehtud, et see tagab kas inimeste või loomade tervise või keskkonna samaväärse või parema kaitse kui kinnitatud katsemeetod kõikide võimalike määramisolukordade ja kemikaalide puhul (18).

Korratavus: sama uuritava kemikaali ja sama katsemeetodikaga korduvatel katsetel saadud tulemuste kokkulangevus (18).

Pöörduv mõju silmale: vt „Silmade ärritus“.

RhCE: rekonstrueeritud inimese sarvkesta sarnane epiteel.

Analüüsitsükl: analüüsitsükl hõlmab ühe või mitme uuritava kemikaali analüüsi koos negatiivse ja positiivse kontrollprooviga.

SD: standardhälve.

Tundlikkus: kõigi niisuguste positiivsete/reaktsioonivõimeliste uuritavate kemikaalide osakaal, mis katse tulemusel klassifitseeritakse õigesti. Tundlikkusega iseloomustatakse katsemeetodi täpsust, kui saadud tulemusi saab kategoriseerida, ning see on oluline aspekt katsemeetodi asjakohasuse hindamisel (18).

Raske silmakahjustus: sellise koekahjustuse tekkimine silmas või selline tugev nägemisteravuse langus pärast seda, kui uuritavat ainet on manustatud silma eespinnale, mis ei ole 21 päeva jooksul pärast manustamist täielikult pöörduv. Samatähenduslik mõistetega „pöördumatu mõju silmale“ ja „ÜRO GHSi ja CLP-määruse kohane 1. kategooria“.

Standardeeskiri: kirjalik formaalne eeskiri, mis kirjeldab üksikasjalikult, kuidas viia läbi rutiinseid ja katsega seotud laboritoiminguid. See on nõutav hea laboritava kohaselt.

Spetsiifilisus: kõigi niisuguste negatiivsete/mittereageerivate uuritavate kemikaalide osakaal, mis katse tulemusel klassifitseeritakse õigesti. Spetsiifilisusega iseloomustatakse katsemeetodi täpsust, kui saadud tulemusi saab kategoriseerida, ning see on oluline aspekt katsemeetodi asjakohasuse hindamisel (18).

Aine: looduslik või tootmisprotsessi teel saadud keemiline element ja selle ühendid, kaasa arvatud stabiilsuse säilitamiseks vajalikud lisaained ja tootmisprotsessist tingitud lisandid, välja arvatud mis tahes lahusti, mida on võimalik aine stabiilsust vähendamata ja selle koostist muutmata eraldada.

Katse: ühe uuritava kemikaali analüüsimine vähemalt kahe paralleelse koeprooviga, nagu määratletud vastavas standardeeskirjas.

Koe eluvõimelisus: rekonstrueeritud koe rakupopulatsiooni üldist aktiivsust (nt rakkude võimet redutseerida vitaalvärvainet MTT) väljendav parameeter, mis olenevalt mõõdetavast näitajast ja katseplaanist on vastavuses elusrakkude koguarvu ja/või elujõulisusega.

Ülalt-alla lähenemisviis: etapiviisiline lähenemisviis, mida kasutatakse niisuguste kemikaalide korral, mille puhul on põhjust arvata, et need põhjustavad rasket silmakahjustust; nimetatud lähenemisviisi puhul eristatakse kõigepealt rasket silmakahjustust tekitavad kemikaalid (tulemus on positiivne) muudest kemikaalidest (tulemus on negatiivne).

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

Astmelise katsetamise strateegia: Etapiviisi katsete tegemise strateegia, milles kasutatakse järjestikku eri katsemeetodeid. Enne strateegia järgmise etapiga alustamist vaadatakse igas etapis läbi kogu uuritava kemikaali kohta olemasolev teave, kasutades tõendite kaalukuse menetlust, et otsustada, kas teave on ohuklassi määramiseks piisav. Kui olemasoleva teabe põhjal saab antud etapis otsustada uuritava kemikaali võimaliku ohtlikkuse üle, ei ole täiendavaid katseid vaja teha (18).

ULOQ: ülemine määramispiir.

Ühinenud Rahvaste Organisatsiooni ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteem (ÜRO GHS (Globally Harmonized System)): süsteem, milles kemikaalid (ained ja segud) on klassifitseeritud vastavalt nende füüsilise ohtlikkuse ning kahjuliku tervise- ja keskkonnamõju standarditud tüübile ja -tasemele ning mis hõlmab asjaomaseid teavitustähiseid, nagu piktogrammid, märksõnad, ohulaused, hoiatuslaused ja ohutuskardid, et anda edasi inimeste (sealhulgas tööandjate, töötajate, vedajate, tarbijate ja päästetöötajate) ja keskkonna kaitsmiseks vajalikku teavet kõnealuste kemikaalide kahjuliku mõju kohta (1).

ÜRO GHSi ja CLP-määruse kohane 1. kategooria: vt „Raske silmakahjustus“.

ÜRO GHSi ja CLP-määruse kohane 2. kategooria: vt „Silmade ärritus“.

ÜRO GHSi ja CLP-määruse kohase kategooriata: kemikaalid, mis ei vasta ÜRO GHSi / CLP-määruse kohasesse 1. ega 2. kategooriasse (ega ÜRO GHSi 2A või 2B kategooriasse) klassifitseerimise nõuetele. Samatähenduslik mõistega „Klassifitseerimata“.

UPLC: ultraefektiivne vedelikkromatograafia.

UVCB: tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal.

Teaduslikult põhjendatud katsemeetod: katsemeetod, mille asjakohasust ja usaldusväärsust konkreetse eesmärgi puhul käsitatakse piisavana ning mis põhineb teaduslikult tõendatud põhimõtetel. Katsemeetod ei ole kunagi teaduslikult põhjendatud absoluutses tähenduses, vaid ainult seoses määratud eesmärgiga (18).

Valideeritud katsemeetod: katsemeetod, mille valideerimisuuringud on lõpule viidud, st on määratud selle asjakohasus (sealhulgas täpsus) ja usaldusväärsus konkreetse eesmärgi puhul. Oluline on märkida, et valideeritud katsemeetod ei tarvitse olla piisavalt kasutuskõlblik täpsuse ja usaldusväärsuse osas, et seda saaks lugeda vastuvõetavaks konkreetse eesmärgi puhul (18).

VRM: valideeritud võrdlusmeetod.

VRM1: EpiOcular™i silmaärrituse katsele viidatakse kui 1. valideeritud võrdlusmeetodile.

VRM2: SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli kasutava silmaärrituse katsele viidatakse kui 2. valideeritud võrdlusmeetodile.

Tõendusmaterjali kaalukuse hindamine: protsess, milles kaalutakse mitmesuguste andmete tugevaid ja nõrku külgi, et jõuda otsuseni uuritava aine võimaliku ohtlikkuse kohta ja toetada sellist otsust.

2. liide

KATSEMEETODI PEAMISED OSAD – RHCE-KOEMUDELIT KASUTAV KATSEMEETOD, MIS ON VALIDEERITUD NENDE KEMIKAALIDE KINDLAKSTEGEMISEKS, MIDA EI OLE VAJA KLASSIFITSEERIDA EGA MÄRGISTADA SEOSSES SILMADE ÄRRITUSE VÕI RASKE SILMAKAHJUSTUSEGA

Katse osad	EpiOcular™i silmaärrituse katse (VRM 1)		SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli kasutav silmaärrituse katse (VRM 2)	
Metoodikad	Vedelikud (pipeteeritavad 37 ± 1 °C juures või madalamal temperatuuril 15 minuti jooksul)	Tahked ained (mittepipeteeritavad)	Vedelikud ja viskoossed ained (pipeteeritavad)	Tahked ained (mittepipeteeritavad)
Mudeli pindala	0,6 cm ²	0,6 cm ²	0,5 cm ²	0,5 cm ²
Paralleelsete koeproovide arv	Vähemalt 2	Vähemalt 2	Vähemalt 2	Vähemalt 2

Katse osad	EpiOcular™i silmaärrituse katse (VRM 1)		SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli kasutav silmaärrituse katse (VRM 2)	
Segava värvuse eelkontroll	50 µl + 1 ml H₂O 60 minuti jooksul temperatuuril 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO₂, suhteline õhuniiskus ≥ 95 % (värvuseta uuritavad kemikaalid) või 50 µl + 2 ml isopropanooli, segada toatemperatuuril 2–3 tundi (värvilised uuritavad kemikaalid) → kui uuritava kemikaali optiline tihedus lainepikkusel 570 ± 20 nm pärast isopropanooli või vee optilise tiheduse lahutamist on > 0,08 (mis on ligikaudu 5 % negatiivse kontrollproovi keskmisest	50 mg + 1 ml H₂O 60 minuti jooksul temperatuuril 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO₂, suhteline õhuniiskus ≥ 95 % (värvuseta uuritavad kemikaalid) või 50 mg + 2 ml isopropanooli, segada toatemperatuuril 2–3 tundi (värvilised ja värvuseta uuritavad kemikaalid) → kui uuritava kemikaali optiline tihedus lainepikkusel 570 ± 20 nm pärast isopropanooli või vee optilise tiheduse lahutamist on > 0,08 (mis on ligikaudu 5 % negatiivse kontrollproovi keskmisest optilisest tihedusest), tuleks teha kohandatud	10 µl + 90 µl H₂O, segada 30 ± 2 minutit toatemperatuuril (18–28 °C) → kui uuritav kemikaal on väriline, tuleks teha kohandatud kontrollkatsed eluskoega.	10 mg + 90 µl H₂O, segada 30 ± 2 minutit toatemperatuuril → kui uuritav kemikaal on väriline, tuleks teha kohandatud kontrollkatsed eluskoega.

Katse osad	EpiOcular™i silmaärrituse katse (VRM 1)		SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli kasutav silmaärrituse katse (VRM 2)	
MTT otsese redutseerimise eelkontroll	50 µl + 1 ml MTT 1 mg/ml lahust, 180 ± 15 min 37 ± 2 °C juures, 5 ± 1 % CO₂, suhteline õhuniiskus ≥ 95 % →kui lahus muutub siniseks/lillaks, tuleks teha kohandatud kontrollkatsed külmutades saadud surnud kudedega (negatiivse kontrollainena kasutatakse 50 µl steriilset deioniseeritud vett MTT lahuses)	50 µg + 1 ml MTT 1 mg/ml lahust, 180 ± 15 min 37 ± 2 °C juures, 5 ± 1 % CO₂, suhteline õhuniiskus ≥ 95 % →kui lahus muutub siniseks/lillaks, tuleks teha kohandatud kontrollkatsed külmutades saadud surnud kudedega (negatiivse kontrollainena kasutatakse 50 µl steriilset deioniseeritud vett MTT lahuses)	30 µl + 300 µl MTT 1 mg/ml lahust, 180 ± 15 min 37 ± 2 °C juures, 5 ± 1 % CO₂, suhteline õhuniiskus ≥ 95 % →kui lahus muutub siniseks/lillaks, tuleks teha kohandatud kontrollkatsed vees saadud surnud kudedega (negatiivse kontrollainena kasutatakse 30 µl steriilset deioniseeritud vett MTT lahuses)	30 mg + 300 µl MTT 1 mg/ml lahust, 180 ± 15 min 37 ± 2 °C juures, 5 ± 1 % CO₂, suhteline õhuniiskus ≥ 95 % →kui lahus muutub siniseks/lillaks, tuleks teha kohandatud kontrollkatsed vees saadud surnud kudedega (negatiivse kontrollainena kasutatakse 30 µl steriilset deioniseeritud vett MTT lahuses)

Katse osad	EpiOcular™i silmaärrituse katse (VRM 1)		SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli kasutatav silmaärrituse katse (VRM 2)	
Eeltöötlus	20 µl Ca ²⁺ /Mg ²⁺ - vaba DPBS, 30 ± 2 min 37 ± 2 °C juures, 5 ± 1 % CO ₂ , suhteline õhuniiskus ≥ 95 %, valguse eest kaitstud.	20 µl Ca ²⁺ /Mg ²⁺ - vaba DPBS, 30 ± 2 min 37 ± 2 °C juures, 5 ± 1 % CO ₂ , suhteline õhuniiskus ≥ 95 %, valguse eest kaitstud.	–	–
Töötlemiskogused ja pealekandmine	50 µl (83,3 µl/cm ²)	50 mg (83,3 mg/cm ²) kalibreeritud vahendiga (nt tasandatud lusikatäis lusikaga, mis on kalibreeritud 50 g naatriumkloriidi mõõtmiseks).	10 µl Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -vaba DPBS, + 30 ± 2 µl (60 µl/cm ²) Viskoosete vedelike korral kasutada nailonvõrku	30 µl Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -vaba DPBS, + 30 ± 2 mg (60 mg/cm ²)

Katse osad	EpiOcular™i silmaärrituse katse (VRM 1)		SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli kasutav silmaärrituse katse (VRM 2)	
Kokkupuuteaeg ja -temperatuur	30 min (± 2 min) söötmes 37 ± 2 °C juures, 5 ± 1 % CO ₂ , suhteline õhuniiskus ≥ 95 %	6 tundi (± 0,25 tundi) söötmes 37 ± 2 °C juures, 5 ± 1 % CO ₂ , suhteline õhuniiskus ≥ 95 %	30 min (± 2 min) söötmes 37 ± 2 °C juures, 5 ± 1 % CO ₂ , suhteline õhuniiskus ≥ 95 %	4 tundi (± 0,1 tundi) söötmes 37 ± 2 °C juures, 5 ± 1 % CO ₂ , suhteline õhuniiskus ≥ 95 %
Loputamine toatemperatuuril	3 korda 100 ml Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -vaba DPBSiga	3 korda 100 ml Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -vaba DPBSiga	20 ml Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -vaba DPBSiga	25 ml Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -vaba DPBSiga
Kokkupuutejärgne sukeldamine	12 min (± 2 min) toatemperatuuril söötmes	25 min (± 2 min) toatemperatuuril söötmes	30 min (± 2 min) 37 °C juures, 5 % CO ₂ , suhteline õhuniiskus 95 %, söötmes	30 min (± 2 min) toatemperatuuril söötmes
Kokkupuutejärgne inkubeerimine	120 min (± 15 min) söötmes 37 ± 2 °C juures, 5 ± 1 % CO ₂ , suhteline õhuniiskus ≥ 95 %	18 tundi (± 0,25 tundi) söötmes 37 ± 2 °C juures, 5 ± 1 % CO ₂ , suhteline õhuniiskus ≥ 95 %	puudub	18 tundi (± 0,5 tundi) söötmes 37 ± 2 °C juures, 5 ± 1 % CO ₂ , suhteline õhuniiskus ≥ 95 %

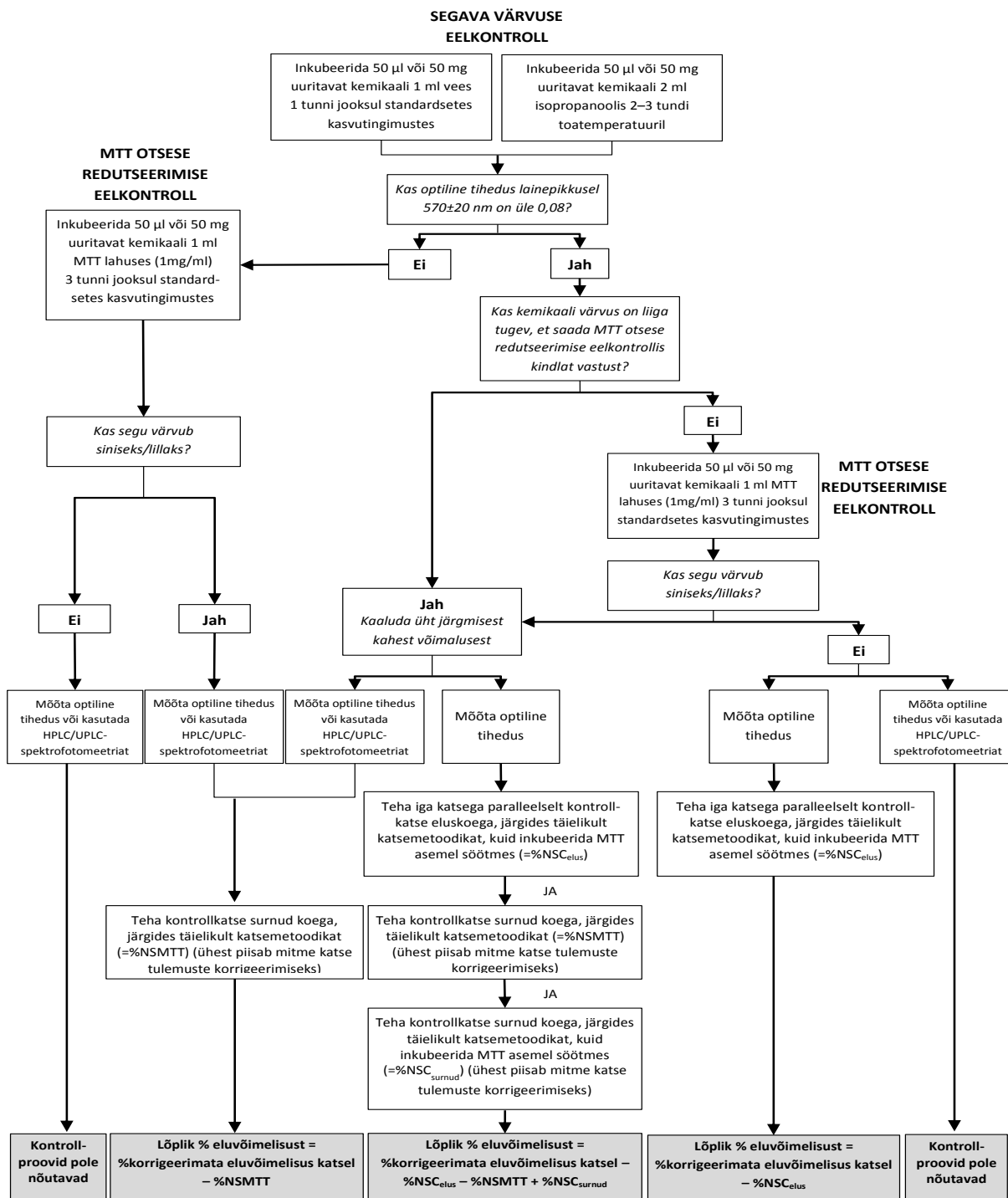
Katse osad	EpiOcular™i silmaärrituse katse (VRM 1)		SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli kasutav silmaärrituse katse (VRM 2)	
Negatiivne kontrollproov	50 µl H ₂ O Analüüsitakse paralleelselt	50 µl H ₂ O Analüüsitakse paralleelselt	30 ± 2 µl Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -vaba DPBSi Analüüsitakse paralleelselt	30 ± 2 µl Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -vaba DPBSi Analüüsitakse paralleelselt
Positiivne kontrollproov	50 µl metüülatsetaati Analüüsitakse paralleelselt	50 µl metüülatsetaati Analüüsitakse paralleelselt	30 ± 2µl metüülatsetaati Analüüsitakse paralleelselt	30 ± 2µl metüülatsetaati Analüüsitakse paralleelselt
MTT lahus	300 µl, 1 mg/ml	300 µl, 1 mg/ml	300 µl, 1 mg/ml	300 µl, 1 mg/ml
MTT inkubeerimisaeg ja -temperatuur	180 min (± 15 min) 37 ± 2 °C juures, 5 ± 1 % CO ₂ , suhteline õhuniiskus ≥ 95 %	180 min (± 15 min) 37 ± 2 °C juures, 5 ± 1 % CO ₂ , suhteline õhuniiskus ≥ 95 %	180 min (± 15 min) 37 ± 2 °C juures, 5 ± 1 % CO ₂ , suhteline õhuniiskus ≥ 95 %	180 min (± 15 min) 37 ± 2 °C juures, 5 ± 1 % CO ₂ , suhteline õhuniiskus ≥ 95 %
Ekstraheerimislahusti	2 ml isopropanooli (ekstraheerimine plaadi pealt ja alt, kude läbi torgates)	2 ml isopropanooli (ekstraheerimine plaadi alt, kude läbi torgates)	1,5 ml isopropanooli (ekstraheerimine plaadi pealt ja alt)	1,5 ml isopropanooli (ekstraheerimine plaadi alt)

Katse osad	EpiOcular™i silmaärrituse katse (VRM 1)		SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli kasutav silmaärrituse katse (VRM 2)	
Ekstraheerimisaeg ja -temperatuur	2–3 tundi loksutades (~120 pööret minutis) toatemperatuuril või üle öö temperatuuril 4– 10 °C	2–3 tundi loksutades (~120 pööret minutis) toatemperatuuril või üle öö temperatuuril 4–10 °C	4 tundi loksutades (~120 pööret minutis) toatemperatuuril või vähemalt üle öö ilma loksutamata temperatuuril 4–10 °C	Vähemalt 2 tundi loksutades (~120 pööret minutis) toatemperatuuril
Optilise tiheduse mõõtmine	570 nm (550–590 nm) ilma võrdlusfiltrita	570 nm (550–590 nm) ilma võrdlusfiltrita	570 nm (540–600 nm) ilma võrdlusfiltrita	570 nm (540–600 nm) ilma võrdlusfiltrita
Koe kvaliteedi kontroll	Töötlemine 100 µl 0,3- mahuprotsendilis e Triton X-100-ga 12,2 min ≤ ET ₅₀ ≤ 37,5 min	Töötlemine 100 µl 0,3- mahuprotsendilise Triton X-100-ga 12,2 min ≤ ET ₅₀ ≤ 37,5 min	30-minutine töötlemine naatriumdodetsüülsulfaadig a (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC ₅₀ ≤ 3,5 mg/ml	30-minutine töötlemine naatriumdodetsüülsulfaadig a (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC ₅₀ ≤ 3,2 mg/ml

Katse osad	EpiOcular™i silmaärrituse katse (VRM 1)		SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli kasutav silmaärrituse katse (VRM 2)	
Nõuetekohasuse kriteeriumid	1. Negatiivse kontrollainega töödeldud paralleelsete koeproovide keskmine optiline tihedus peab olema $> 0,8$ ja $< 2,5$ 2. 30 minutit positiivse kontrollainega kokku puutunud paralleelsete koeproovide keskmine eluvõimelisus, väljendatuna protsendina negatiivse kontrollainega saadud tulemusest, peab olema $< 50 \%$ 3. Kahe paralleelse koeproovi eluvõimelisuse erinevus ei tohi ületada 20%	1. Negatiivse kontrollainega töödeldud paralleelsete koeproovide keskmine optiline tihedus peab olema $> 0,8$ ja $< 2,5$ 2. 6 tundi positiivse kontrollainega kokku puutunud paralleelsete koeproovide keskmine eluvõimelisus, väljendatuna protsendina negatiivse kontrollainega saadud tulemusest, peab olema $< 50 \%$ 3. Kahe paralleelse koeproovi eluvõimelisuse erinevus ei tohi ületada 20%	1. Negatiivse kontrollainega töödeldud paralleelsete koeproovide keskmine optiline tihedus peab olema $> 1,0$ ja $\leq 2,5$ 2. 30 minutit positiivse kontrollainega kokku puutunud paralleelsete koeproovide keskmine eluvõimelisus, väljendatuna protsendina negatiivse kontrollainega saadud tulemusest, peab olema $\leq 30 \%$ 3. Kahe paralleelse koeproovi eluvõimelisuse erinevus ei tohi ületada 20%	1. Negatiivse kontrollainega töödeldud paralleelsete koeproovide keskmine optiline tihedus peab olema $> 1,0$ ja $\leq 2,5$ 2. 4 tundi positiivse kontrollainega kokku puutunud paralleelsete koeproovide keskmine eluvõimelisus, väljendatuna protsendina negatiivse kontrollainega saadud tulemusest, peab olema $\leq 20 \%$ 3. Kahe paralleelse koeproovi eluvõimelisuse erinevus ei tohi ületada 20%

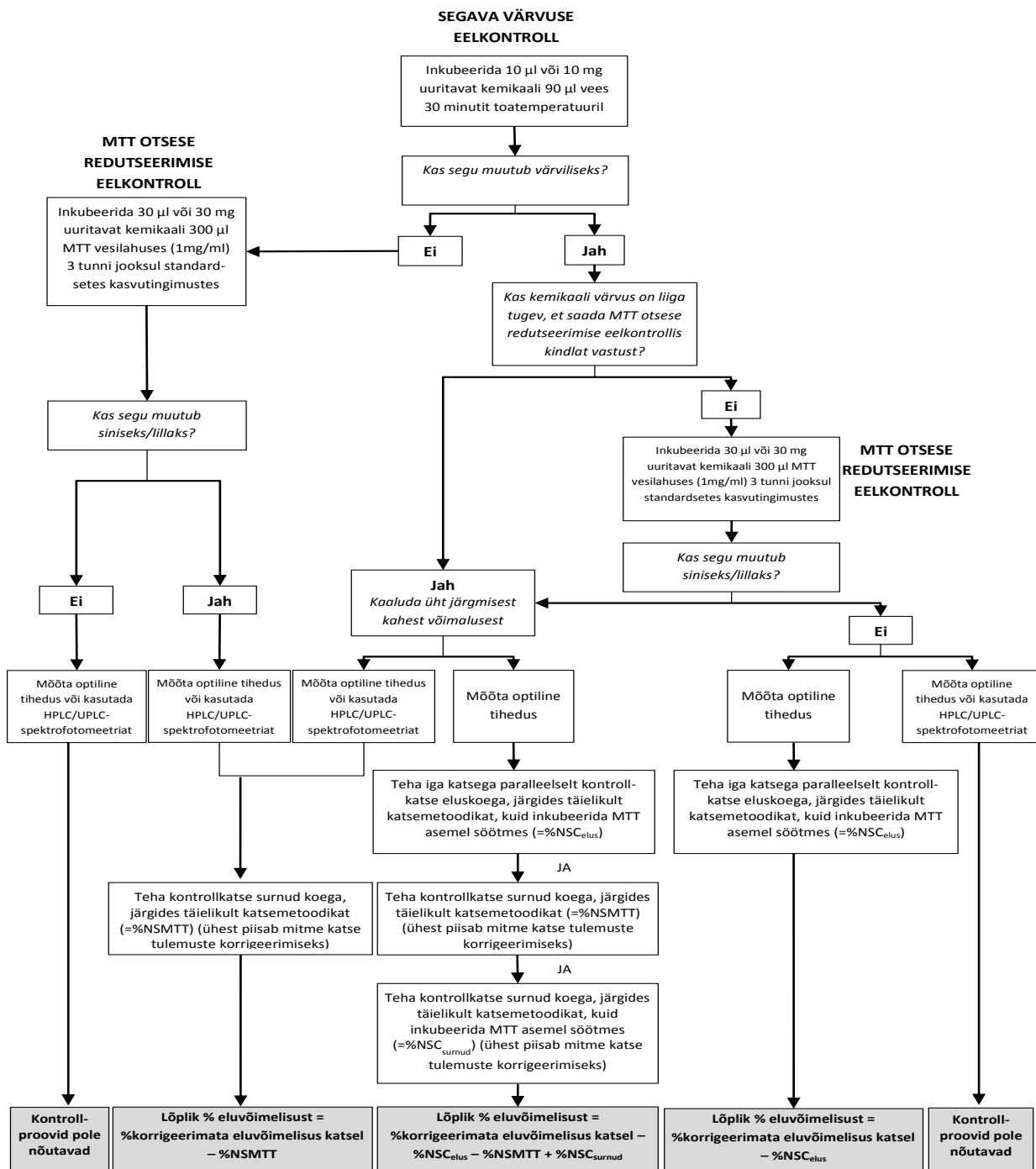
3. liide

VRM1 STANDARDEESKIRJAL PÕHINEV ILLUSTREERIV VOOSKEEM, MILLEST JUHINDUDA MTT OTSESTE REDITSEERIJATE JA/VÕI SEGAVA VÄRVUSEGA KEMIKAALIDE KINDLAKSTEGEMISEL JA NENDEGA TEGELEMISEL



4. liide

VRM2 STANDARDEESKIRJAL PÕHINEV ILLUSTREERIV VOOSKEEM, MILLEST JUHINDUDA MTT OTSESTE REDITSEERIJATE JA/VÕI SEGAVA VÄRVUSEGA KEMIKAALIDE KINDLAKSTEGEMISEL JA NENDEGA TEGELEMISEL



5. liide

**HPLC-/UPLC-SPEKTROMEETRIA APARATUURI PEAMISED
KVALIFIKATSIOONINÄITAJAD JA NENDE NÕUETEKOHASUSE KRITEERIUMID
SEOS RHCE-KOEMUDELIST EKSTRAHEERITUD MTT FORMASAANI
MÕÕTMISEGA**

Näitaja	USA Toidu- ja Raviameti juhendist (36, 38) tuletatud eeskiri	Nõuetekohasuse kriteeriumid
Selektiivsus	Isopropanooliga ekstraheeritud eluskoe tühiproovi (töötlemata elusa RhCE-koemudeli ekstrakt isopropanooliga), surnud koe tühiproovi (töötlemata surnud RhCE-koemudeli ekstrakt isopropanooliga) ja värvaine (nt metüleensinine) analüüs	$Pindala_{segav} \leq 20 \%$ $pindalast_{LLOQ}^1$
Kordustäpsus	Kvaliteedi kontrollimise katsed (st MTT formasaan kontsentratsiooniga 1,6 µg/ml, 16 µg/ml ja 160 µg/ml) isopropanooliga (n = 5)	$CV \leq 15 \%$ või alumise määramispiiri korral $\leq 20 \%$
Täpsus	Kvaliteedi kontrollimise katsed isopropanooliga (n = 5)	$\%Dev \leq 15 \%$ või alumise määramispiiri korral $\leq 20 \%$
Maatriksefekt	Kvaliteedi kontrollimise katsed elusa koega tühiprooviga (n = 5)	$85 \% \leq \%maatriksefekt \leq 115 \%$
Proovimälu	Isopropanooli analüüs pärast ULOQ ² standardit	$Pindala_{segav} \leq 20 \%$ $pindalast_{LLOQ}$
Korratavus (samal päeval)	3 sõltumatut kaliibrimisgraafikut (MTT formasaani lahus isopropanoolis, 6 järjestikust lahendust 1/3 võrra alates ülemisest määramispiirist, st 200 µg/ml) Kvaliteedi kontrollimise katsed isopropanooliga (n = 5)	Kaliibrimiskõverad: $\%Dev \leq 15 \%$ või alumise määramispiiri korral $\leq 20 \%$
Korratavus (eri päevadel)	1. päev: 1 kaliibrimiskõver ja kvaliteedi kontrollimise katsed isopropanooliga (n=3) 2. päev: 1 kaliibrimiskõver ja kvaliteedi kontrollimise katsed isopropanooliga (n=3) 3. päev: 1 kaliibrimiskõver ja kvaliteedi kontrollimise katsed isopropanooliga (n=3)	Kvaliteedi kontrollimise katsed: $\%Dev \leq 15 \%$ ja $CV \leq 15 \%$
MTT formasaani lühiajaline stabiilsus RhCE-koe ekstraktis	Kvaliteedi kontrollimise katsed elusa koega tühiproovidega (n = 3), analüüsitud valmistamise päeval ja pärast 24 tundi toatemperatuuril seismist	$\%Dev \leq 15 \%$
MTT formasaani pikaajaline stabiilsus RhCE-koe ekstraktis, kui see on nõutav	Kvaliteedi kontrollimise katsed elusa koega tühiproovidega (n = 3), analüüsitud valmistamise päeval ja pärast mitu päeva –20 °C juures seismist	$\%Dev \leq 15 \%$

¹ LLOQ: alumine määramispiir, peab olema 1–2 % koe eluvõimelisusest, st 0,8 µg/ml.

² ULOQ: ülemine määramispiir, peab olema vähemalt kaks korda suurem MTT formasaani suurimast eeldatavast kontsentratsioonist isopropanooliga negatiivsetest kontrollproovidest saadud ekstraktides (valideeritud võrdlusmeetodis ~70 µg/ml), st 200 µg/ml.

B.70. REKOMBINANTSEL INIMESE ÖSTROGEENIRETSEPTORIL (hrER) PÕHINEVAD *IN VITRO* ANALÜÜSIMETODID ÖSTROGEENIRETSEPTORIGA SEONDUVATE KEMIKAALIDE TUVASTAMISEKS

ÜLDINE SISSEJUHATUS

Tulemusnäitajatel põhinev Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsiooni (OECD) katsejuhend

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 493 (2015). Katsejuhend nr 493 on tulemusnäitajatel põhinev katsejuhend, milles kirjeldatakse *in vitro* analüüsimeetodeid inimese rekombinantse östrogeeniretseptoriga (ER) seonduvate ainete tuvastamiseks (hrERiga seondumise katsed). See hõlmab kahte vaadeldava mehhanismi ja funktsionaalsuse poolest sarnast analüüsimeetodit östrogeeniretseptoriga (st α -ERiga) seonduvate kemikaalide tuvastamiseks ja peaks hõlbustama uute sarnaste või modifitseeritud analüüsimeetodite väljatöötamist vastavalt valideerimispõhimõtetele, mis on esitatud ohuhindamiseks kasutatavate uute või ajakohastatud katsemeetodite valideerimist ja rahvusvahelist tunnustamist käsitlevas OECD juhenddokumendis (1). Kõnealuse tulemusnäitajatel põhineva katsejuhendi aluseks on järgmised täielikult valideeritud võrdlusmeetodid (2. ja 3. liide):
 - täispikal rekombinantsel inimese α -ERil põhinev Freybergeri-Wilsoni (FW) *in vitro* meetod östrogeeniretseptoriga seondumise analüüsimiseks (2) ja
 - ligandiga seonduval rekombinantsel inimese valgudomeenil põhinev Jaapani Kemikaalide Hindamise ja Uurimise Instituudi (CERI) *in vitro* meetod östrogeeniretseptoriga seondumise analüüsimiseks (2).
2. On kehtestatud tulemuslikkuse standardid (3), mis hõlbustavad sama ohunäitaja hindamiseks kasutatavate sarnaste katsemeetodite väljatöötamist ja valideerimist ning võimaldavad tulemusnäitajatel põhinevat katsejuhendit nr 493 õigeaegselt muuta, et täiendada seda ajakohastamise eesmärgil uute sarnaste analüüsimeetoditega. Siiski lisatakse sarnased katsemeetodid juhendisse üksnes pärast seda, kui OECD on need läbi vaadanud ja kinnitanud nende vastavust tulemuslikkuse standarditele. Östrogeeniretseptoriga seondumise katsete tulemusi käsitlevatele OECD liikmesriikide nõuetele vastavuse saavutamiseks võib kasutada ükskõik millist katsejuhendis nr 493 esitatud analüüsimeetodit ning seejuures saadakse kasu OECD otsuse kohasest andmete vastastikusest tunnustamisest.

Käesoleva katsemeetodiga hõlmatud analüüsimeetodite taust ja põhimõtted

3. OECD algatas 1998. aastal prioriteetse tegevussuunana olemasolevate katsejuhendite läbivaatamise ja uute väljatöötamise, et võimaldada sõeluuringute tegemist võimalike endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide tuvastamiseks ja selliste kemikaalide hindamist. OECD kontseptuaalset raamistikku võimalike endokriinfunktsiooni

kahjustavate kemikaalide analüüsimiseks ja hindamiseks muudeti 2012. aastal. Nii algne kui ka muudetud kontseptuaalne raamistik on esitatud kemikaalide võimaliku endokriinfunktsiooni kahjustava toime hindamise standardiseeritud katsejuhendeid käsitleva juhenddokumendi lisadena (4). Kõnealune kontseptuaalne raamistik hõlmab viit taset; iga tase vastab bioloogilise keerukuse eri tasemele. Käesolevas katsemeetodis kirjeldatud ERiga seondumise katsed kuuluvad 2. tasemele, mis hõlmab „*in vitro* katseid valitud endokriinse(te) mehhanismi(de) või raja/radade kohta andmete saamiseks“. Käesolev katsemeetod on ette nähtud retseptoriga seondumise *in vitro* katsete tegemiseks eesmärgiga tuvastada inimese östrogeenireseptori α -vormi (α -ER) ligandid.

4. ERiga tehtavate *in vitro* seondumiskatsete asjakohasus bioloogiliste funktsioonide hindamisel on selgelt tõendatud. ERiga tehtavad seondumiskatsed on ette nähtud selliste kemikaalide tuvastamiseks, millel võib olla kahjulik mõju östrogeenirajale, ning neid on viimase kahe kümnendi jooksul laialdaselt kasutatud, et iseloomustada ERi jaotust kudedes ja identifitseerida ERi agoniste/antagoniste. Need katsed põhinevad ligandi ja retseptori vahelisel interaktsioonil, mis on esimene samm östrogeeni signaalirajas ja on hädavajalik kõigi selgroogsete paljunemisvõime tagamiseks.
5. Östrogeenide interaktsioon ERidega võib mõjutada östrogeeni kontrollitavate geenide transkriptsiooni ja avaldada mittegenoomset mõju, mille tulemusena võidakse käivitada või pärssida muu hulgas selliseid rakuprotsesse, mis on vajalikud rakkude paljunemiseks, loote normaalseks arenguks ja paljunemisvõime säilitamiseks (5, 6, 7). Normaalsete östrogeensete süsteemide häiretel võib olla kahjulik mõju normaalsele arengule (ontogenees), reproduktiivtervisele ja reproduktiivsüsteemi terviklikkusele. Ebasobiv ERist lähtuv signaaliülekanne võib näiteks suurendada hormoonsõltuva vähi tekke riski, vähendada viljakust ja põhjustada muutusi loote kasvus ja arengus (8).
6. *In vitro* seondumiskatsed põhinevad aine otsesel interaktsioonil retseptori spetsiifilise ligandiseondumiskohaga, mille kaudu reguleeritakse geenitranskriptsiooni. Inimese rekombinantse α -östrogeenireseptoriga (hr- α -ER) seondumise katses mõõdetakse põhinäitajana radiomärgistatud ligandi ($[^3\text{H}]17\beta$ -östradiool) võimet seonduda ERiga üha suuremas kontsentratsioonis esineva uuritava kemikaali (st konkureeriva ligandi) juuresolekul. Uuritavad kemikaalid, millel on ERi suhtes suur afiinsus, konkureerivad radiomärgistatud ligandiga väiksemal kontsentratsioonil kui kemikaalid, mille afiinsus retseptori suhtes on väiksem. Kõnealune meetod hõlmab kahte põhielementi: küllastava seondumise katset, millega iseloomustatakse retseptori ja ligandi vahelise interaktsiooni parameetreid ja dokumenteeritakse spetsiifilisus ERi suhtes, ning sellele järgnevat konkureeriva seondumise katset, millega iseloomustatakse uuritava kemikaali ja radiomärgistatud ligandi vahelist konkurentsi ERile seondumisel.
7. CERi ja FW seondumiskatsete asjakohasus ja usaldusväärsus sihtotstarbelisel kasutamisel on valideerimisuuringutega tõendatud (2).

8. Käesolevas katsemeetodis kasutatud mõisted ja lühendid on esitatud 1. liites.

Retseptoriga seondumise katsete rakendusala ja piirangud

9. Kõnealused katsed on ette nähtud sõeluuringu tegemiseks ja prioriseerimiseks, kuid nende käigus võib ühtlasi saada teavet molekulaarse lähtesündmuse kohta, mida saab kasutada tõendite kaalukusel põhineva lähenemisviisi puhul. Katsetes vaadeldakse kemikaali seondumist α -ERi ligandi siduvale domeenile *in vitro* süsteemis. Seega tuleks hoiduda saadud tulemuste otsesest ekstrapoleerimisest tervikliku endokriinsüsteemi keerukale signaaliülekande- ja reguleerimismehhanismile *in vivo*.
10. Loodusliku ligandi 17 β -östradiooli seondumine on esimene samm selliste molekulaarsete sündmuste jadas, mille abil aktiveeritakse sihtgeenide transkriptsioon ja mille lõpptulemuseks on füsioloogiline muutus (9). Seega on seondumine α -ERi ligandi siduvale domeenile üks peamisi ERI vahendatavate endokriinsüsteemi häirete tekkemehhanisme, kuigi kõnealuseid häireid võivad põhjustada ka muud mehhanismid, sealhulgas i) interaktsioon α -ERi teiste piirkondadega peale ligandisidumistasku, ii) interaktsioon östrogeeni signaalirajaga seotud muude retseptoritega, α -ERiga ja G-valguga seotud östrogeeniretseptoriga ning teiste endokriinsüsteemi retseptorite ja ensüümisüsteemidega, iii) hormoonide süntees, iv) hormoonide metaboolne aktiveerimine ja/või inaktiveerimine, v) hormoonide jaotumine sihtkudedes ja vi) hormoonide väljutamine kehast. Selliseid toimemehhanisme ei vaadelda üheski käesoleva katsemeetodi kohases katses.
11. Käesoleva katsemeetodi puhul uuritakse ainete võimet seonduda inimese α -ERiga ja see ei võimalda eristada α -ERi agoniste α -ERi antagonistidest. Kõnealustes katsetes ei vaadelda ka seondumisele järgnevaid sündmusi, näiteks geenitranskriptsiooni ega füsioloogilisi muutusi. Kuna valideerimisel kasutati ühekaupa aineid, mis koosnevad ainult ühest koostisosast, ei ole uuritud selle meetodi kohaldatavust segude analüüsimiseks. Teoreetiliselt on kõnealustes katsetes siiski võimalik analüüsida ka mitut koostisosa sisaldavaid aineid ja segusid. Kui soovitakse saada kavandatud regulatiivsel eesmärgil andmeid segu kohta, tuleks enne katsemeetodi kasutamist kaaluda, kas ja kuidas see võimaldab saada kõnealusele eesmärgile vastavaid asjakohaseid tulemusi. Selline kaalumise ei ole vajalik, kui asjaomase segu hindamine on regulatiivse nõudega ette nähtud.
12. Rakuvabadel retseptorisüsteemidel puudub metaboliseerimisvõime ja neid ei ole valideeritud kombinatsioonis metaboolsete ensüümisüsteemidega. Siiski võib olla võimalik lisada uuringumudelisse metaboliseerimisvõimet tagavad elemendid, kuid see nõuab täiendavat valideerimist.
13. Kemikaale, mis võivad valku (st retseptorvalku) denatureerida – näiteks pindaktiivseid aineid ja analüüsipuhvri pH-d muuta võivaid kemikaale –, ei tohi analüüsida või võib analüüsida üksnes kontsentratsioonidel, mille juures selline mõju puudub. Muudel juhtudel

võib uuritava kemikaali analüüsimiseks kasutada kontsentratsioonivahemikku, mille puhul kemikaal on analüüsipuhvril lahustuv.

14. Tabelis 1 on teavitamise eesmärgil esitatud katsetulemused 24 aine kohta, mida on analüüsitud mõlema käesolevas katsemeetodis kirjeldatud täielikult valideeritud analüüsimeetodiga. Avaldatud aruannete kohaselt, mis muu hulgas hõlmavad *in vitro* katseid ERI-seoselise transkriptsiooni aktiveerimise tuvastamiseks ja uterotroofse mõju analüüsi, liigitati nendest ainetest 17 ERiga seonduvateks aineteks ja kuus mitteseonduvateks aineteks (9, 10, 11, 12, 13, 14, 15). Vastavalt tabelis 1 esitatud kokkuvõtlikele andmetele on kahe analüüsimeetodiga saadud liigitamistulemused kõigi ainete puhul kuni kontsentratsioonini 10^{-4} M peaaegu täielikult kattuvad ja iga aine on õigesti liigitatud ERiga seonduvaks või ERiga mitteseonduvaks. Lisateave selle ainete rühma ja valideerimisuuringute raames tehtud ERiga seondumise katsetes analüüsitud täiendavate ainete kohta on esitatud hrERiga seondumise katsete tulemuslikkuse standardite (3) 2. lisas (tabelid 1, 2 ja 3).

Tabel 1. Ainete liigitamine ERiga seonduvaks või mitteseonduvaks nende analüüsimisel FW ja CERI meetodite kohastes hrERiga seonduvuse katsetes ning võrdlus eeldatava tulemusega

	Aine nimetus	CAS i nr	Eeldatav tulemus	FW meetod		CERI meetod		MeSHi kemikaalikklass	Tootekategooria
				Kontsentratsioonivahe (M)	Liigitus	Kontsentratsioonivahe (M)	Liigitus		
1	17β-östradiol	50-28-2	Seonduv	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Seonduv	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Seonduv	Steroid	Ravim, veterinaarravim
2	Noretünodreel	68-23-5	Seonduv	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-4}$	Seonduv	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-4}$	Seonduv	Steroid	Ravim, veterinaarravim
3	Noretindroon	68-22-4	Seonduv	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-4}$	Seonduv	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-4}$	Seonduv	Steroid	Ravim, veterinaarravim
4	Di-n-butüülfalaat	84-74-2	Mitteseonduv*	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Mitteseonduv*†	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Mitteseonduv*†	Süsivesinik (tsükliline), ester	Plastifikaator, keemiline vaheühend
5	DES	56-53-1	Seonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	Süsivesinik (tsükliline), fenool	Ravim, veterinaarravim
6	17α-etüüülöstradiol	57-63-6	Seonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	Steroid	Ravim, veterinaarravim
7	Mesoheksöstrool	84-16-2	Seonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	Süsivesinik (tsükliline), fenool	Ravim, veterinaarravim
8	Genisteiin	446-72-0	Seonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	Süsivesinik (heterotsükliline), flavonoid	Looduslik ühend
9	Ekvool	531-95-3	Seonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	Fütoöstrogeeni metaboliit	Looduslik ühend
10	Butüülparabeen (n-butüül-4-hüdroksübensoaat)	94-26-8	Seonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	Parabeen	Säilitusaine
11	Nonüülfenool (segu)	84852-15-3	Seonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	Alküülfenool	Vaheühend
12	o,p'-DDT	789-02-6	Seonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	Kloororgaaniline ühend	Insektitsiid
13	Kortikosteroon	50-22-6	Mitteseonduv*	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Mitteseonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Mitteseonduv	Steroid	Looduslik ühend
14	Zearalenoon	17924-92-4	Seonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	Süsivesinik (heterotsükliline), laktoon	Looduslik ühend
15	Tamoksifeen	10540-29-1	Seonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	Süsivesinik (tsükliline)	Ravim, veterinaarravim
16	5α-dihüdrotestosteroon	521-18-6	Seonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	Steroid, mittefenoolne	Looduslik ühend
17	Bisfenool A	80-05-7	Seonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	Fenool	Keemiline vaheühend
18	4-n-heptüülfenool	1987-50-4	Seonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ebaselge ^a	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	Alküülfenool	Vaheühend
19	Kepoon (kloordekoon)	143-50-0	Seonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	Süsivesinik (halogeenitud)	Pestitsiid

20	Bens[a]antratseen	56-55-3	Mitteseonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Mitteseonduv ^b	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Mitteseonduv ^b	Aromaatne süsivesinik	Vaheühend
21	Enterolaktoon	78473-71-2	Seonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	Fütoöstrogeen	Looduslik ühend
22	Progesteron	57-83-0	Mitteseonduv*	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Mitteseonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Mitteseonduv	Steroid	Looduslik ühend
23	Oktüültrioksüülaan	2943-75-1	Mitteseonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Mitteseonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Mitteseonduv	Silaan	Pinnamodifikaator
24	Atrasiin	1912-24-9	Mitteseonduv*	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Mitteseonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Mitteseonduv	Heterotsüklikne ühend	Herbitsiid

* Lahustuvuspiir $< 1 \times 10^{-4}$ M.

* Di-*n*-butüülfaltaadi (DBP) kasutamine ja klassifitseerimine mitteseonduva ainega põhineb analüüsimisel kuni kontsentratsioonini 10^{-4} M, sest valideerimiselsete uuringute käigus täheldati mõnes laboris, et aine on kontsentratsioonil 10^{-3} M mittelahustuv (nt ilmneb hägusus).

† Valideerimisuurimus analüüsi di-*n*-butüülfaltaadi (DBP) kodeeritud katseainena kontsentratsioonidel kuni 10^{-3} M. Nendes tingimustes täheldati mõnes laboris radiomärgistatud ligandi seondumise vähenemist kõige suuremal kontsentratsioonil (10^{-3} M) ja/või lähenduskõvera ebasobivust. Neis katsetes liigitati DBP „ebaselgeks“ või „seonduvaks“ CERI meetodi puhul viiest laborist kolmes ja FW meetodi puhul kuuest laborist viies (vt allikas 2, jaotise IV.B.3 alajaotised a ja b ning jaotis VI.A).

^a Liigitus ei vasta eeldatavale tulemusele. 4-*n*-heptüülfenooli liigitamine „ebaselgeks“ või „mitteseonduvaks“ viiest laborist kolmes andis keskmiseks liigitamistulemuseks „ebaselge“. Täpsemal uurimisel ilmnes, et sellise liigitamise põhjuseks oli kemikaali piiratud lahustuvus, mis takistas täieliku seondumiskõvera saamist.

^b Valideerimisuuringu ajal liigitati bens[a]antratseen ümber mitteseonduvaks aineks (st negatiivne tulemus) lähtuvalt avaldatud kirjandusandmetest, mille alusel on tõendatud, et kõnealuse aine puhul täheldatav *in vitro* östrogeenne toime (16) põhineb peamiselt selle metaboolse aktiveerimise (17, 18). Kõnealuses laboritevahelises valideerimisuurimus kasutatud rakuvabades hrERiga seondumise katsetes aine ensümaatilist metaboolset aktiveerimist eeldatavalt ei toimu. Seega on see aine õige liigituse kohaselt „mitteseonduv“, kui seda kasutatakse FW ja CERI meetoditele vastavates katsetingimustes.

hrER-GA SEONDUMISE KATSE ELEMENDID

Katse põhielemendid

15. Käesolevat katsemeetodit kohaldatakse katsete puhul, kus kasutatakse östrogeeniretseptorit ja sellega tugevalt seonduvat sobivat ligandi, mida on võimalik kasutada markeri/märgistusainena ja mida saab uuritava kemikaali kontsentratsiooni suurendamise teel välja tõrjuda. Seondumiskatsed hõlmavad kahte järgmist põhielementi: 1) küllastav seondumine ja 2) konkureeriv seondumine. Küllastava seondumise katset kasutatakse retseptoripreparaadi spetsiifilisuse ja aktiivsuse kontrollimiseks, konkureeriva seondumise katset aga selleks, et hinnata uuritava kemikaali võimet seonduda hrERiga.

Kontrollid

16. Kavandatud paralleelsete kontrollide ja võrdlusöstrogeeni valikut tuleks põhjendada. Paralleelseid kontrole (lahusti (kandeaine), positiivsed kontrollid (ERiga tugevalt seonduv aine ja nõrgalt seonduv aine), negatiivne kontroll (mitteseonduv aine)) kasutatakse vastavalt vajadusele meetodi töökindluse kontrollimiseks asjaomastes katsetingimustes ja nende alusel saab katseid omavahel võrrelda; need kuuluvad tavaliselt katse nõuetekohasuse kriteeriumide hulka (1). Igas analüüsitsükliks tuleks ühel plaadil kasutada võrdlusöstrogeeni ja kontrole (st nõrgalt seonduv aine ja mitteseonduv aine) täieliku kontsentratsioonikõvera ulatuses. Kõik

ülejäanud plaadid peaksid sisaldama: 1) nii E2 kui ka nõrgalt seonduvat ainet suures (umbes radiomärgistatud ligandi täielikuks väljatõrjumiseks vajalikus) ja keskmises (umbes IC₅₀-le vastavas) kontsentratsioonis kolmes paralleelis; 2) lahustiga kontrolli ja mittespetsiifilise seondumise kontrolli, kumbagi kolmes paralleelis.

Standardne kvaliteedikontrolli kord

17. Standardset kvaliteedikontrolli korda tuleks kohaldada vastavalt iga analüüsimeetodi kohta esitatud kirjeldusele, et tagada retseptorite aktiivsus, õigete kemikaalikontsentratsioonide kasutamine, hõlbepiirides püsimine mitme korduskatse vältel ja ERiga seondumist käsitlevate ootuspäraste tulemuste saamise võimekus pikema aja vältel.

Labori pädevuse tõendamine

18. Enne tundmatute kemikaalide analüüsimist käesoleva katsemeetodi kohases katses tuleks igas laboris tõendada asjaomase meetodi kasutamise pädevust; selleks viiakse läbi küllastava seondumise katsed, et kontrollida ERi preparaadi spetsiifilisust ja aktiivsust, ning konkureeriva seondumise katsed võrdlusöstrogeeni ja kontrollidega (nõrgalt seonduv aine ja mitteseonduv aine). Laboris tuleks luua varasemate tulemuste andmebaas, mis sisaldab võrdlusöstrogeeni ja kontrollidega saadud tulemusi eri päevadel läbi viidud 3–5 sõltumatust katsest. Nende katsetega luuakse laboris varasemate võrdlusöstrogeeni ja kontrolle hõlmavate tulemuste näol võrdlusalus, mida kasutatakse järgnevate katsete nõuetekohasuse hindamise osana.
19. Katsesüsteemi reageerimisvõime kontrollimiseks analüüsitakse ka tabelis 2 loetletud pädevusaineid. Sellesse loetellu kantud pädevusained on valitud võrdlusainete hulgast, mida on kirjeldatud ERiga seondumise katsete tulemuslikkuse standardites (3). Kõnealused ained on turul kättesaadavad, kuuluvad kemikaaliklassidesse, mida tavaliselt seostatakse ERiga seondumise võimega, nende afiinsus ERi suhtes jääb sobivasse vahemikku (st tugevast kuni nõrgani) ja nende hulgas on ka mitteseonduvaid aineid (st negatiivsed kontrollid). Iga pädevusaine puhul kasutatavad kontsentratsioonid peaksid hõlmama tabelis 2 esitatud vahemikku. Iga ainega tuleks läbi viia vähemalt kolm katset ning nende katsete tulemused peaksid vastama aine eeldatavale aktiivsusele. Iga katse tuleks läbi viia sõltumatult (st kasutada retseptori, kemikaalide ja reaktiivselt värskest valmistatud lahjendusi); seejuures tuleks iga kontsentratsiooni puhul kasutada kolme paralleelproovi. Pädevuse tõendamiseks tuleb iga pädevusaine liigitada õigesti positiivseks või negatiivseks. Pädevuse tõendamise katsed peaks läbi viima iga asjaomaseid analüüsimeetodeid omandav laborant.

Tabel 2. hrERiga tehtavas konkureeriva seondumise katses kasutatavate kontrollide ja pädevusainete loetelu¹

Nr	Aine nimetus	CASi nr ²	Eeldatav tulemus ^{3,4}	Uuritav kontsentratsioonivahemik (M)	MeSHi kemikaaliklass ⁵	Tootekategooria ⁶
Kontrollid (võrdlusöstrogeen, nõrgalt seonduv aine, mitteseonduv aine)						
1	17β-östradiool	50-28-2	Seonduv	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Steroid	Ravim, veterinaarravim
2	Noretünodreel (või) Noretindroon	68-23-5 (või) 68-22-4	Seonduv	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-6}$	Steroid	Ravim, veterinaarravim
3	Oktüültrietsüülaan	2943-75-1	Mitteseonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Silaan	Pinnamodifikaator
Pädevusained⁶						
4	Dietüülstilböstrool	56-53-1	Seonduv	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Süsivesinik (tsükliline), fenool	Ravim, veterinaarravim
5	17α-etüüülöstradiool	57-63-6	Seonduv	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Steroid	Ravim, veterinaarravim
6	Mesoheksöstrool	84-16-2	Seonduv	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Süsivesinik (tsükliline), fenool	Ravim, veterinaarravim
7	Tamoksifeen	10540-29-1	Seonduv	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Süsivesinik (tsükliline)	Ravim, veterinaarravim
8	Genisteiin	446-72-0	Seonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Heterotsükliline ühend, flavonoid	Looduslik ühend
9	Bisfenool A	80-05-7	Seonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Fenool	Keemiline vaheühend
10	Zearalenoon	17924-92-4	Seonduv	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-3}$	Heterotsükliline ühend, laktoon	Looduslik ühend

11	Butüülparabeen	94-26-8	Seonduv	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-3}$	Karboksüülhape, fenool	Säilitusaine
12	Atrasiin	1912-24-9	Mitteseonduv	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Heterotsükliline ühend	Herbitsiid
13	Di- <i>n</i> -butüülftaal (DBP) ⁷	84-74-2	Mitteseonduv ⁸	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Süsivesinik (tsükliline), ester	Plastifikaator, keemiline vaheühend
14	Kortikosteroon	50-22-6	Mitteseonduv	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-4}$	Steroid	Looduslik ühend

¹ Kui pädevusaine ei ole enam turul kättesaadav, võib kasutada ainet, millel on ERiga seondumise võimet iseloomustav sama liigitus ja võrreldav toime tugevus ning mis kuulub samasse kemikaaliklassi.

² Lühendid: CASi nr – Chemical Abstracts Service'i registrinumber.

³ hrERiga seondumist käsitlevate CERI ja FW meetodite valideerimise uuringus α -ERiga seonduvaks või mitteseonduvaks aineks liigitamise tulemus (2).

⁴ ERiga seondumise võimet hinnati lähtuvalt alternatiivsete meetodite valideerimise ametitevahelise koordineerimiskomitee (ICCVAM) taustülevaadetokumentidest ERiga seondumise ja transkriptsiooni aktiveerimise katsete kohta (9) ning empiirilistest andmetest ja muust teabest, mis on avaldatud kirjanduse loetelus viidatud läbivaadatud uuringutulemustena (10, 11, 12, 13, 14, 15).

⁵ Ainete liigitamiseks ühte või mitmesse kemikaaliklassi kasutati rahvusvaheliselt tunnustatud standardiseeritud klassifitseerimissüsteemina USA riikliku meditsiiniraamatukogu meditsiiniterminite andmebaasi (MeSH) (kättesaadav aadressil <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁶ Ainete liigitamiseks ühte või mitmesse tootekategooriasse kasutati USA riikliku meditsiiniraamatukogu ohtlike ainete andmebaasi (kättesaadav aadressil <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).

⁷ DPB-d võib kasutada alternatiivse mitteseonduva kontrollainena suurimas kontsentratsioonis 10^{-4} M.

⁸ Selle aine lahustuvuspiir on 10^{-4} M. Di-*n*-butüülfalaadi (DBP) kasutamine ja klassifitseerimine mitteseonduva ainega põhineb analüüsimisel kuni kontsentratsioonini 10^{-4} M, sest valideerimiselsete uuringute käigus täheldati mõnes laboris, et aine on kontsentratsioonil 10^{-3} M mittelahustuv (nt ilmneb hägusus).

Uuritava kemikaali lahustuvuse analüüsimine ja kontsentratsioonivahemiku kindlakstegemine

20. Iga uuritava kemikaali puhul tuleks teha eelkatse, et määrata lahustuvuspiir ja teha kindlaks katse läbiviimiseks sobiv kontsentratsioonivahemik. Iga uuritava kemikaali lahustuvuspiir tuleb algselt määrata lahustis ja seejärel tuleb kontrollida seda katsetingimustes. Katses kasutatav lõppkontsentratsioon ei tohiks olla suurem kui 1 mM. Kontsentratsioonivahemiku kindlakstegemise katses kasutatakse lahustiga kontrolli koos kaheksa järjestikuse üksteisest log-ühiku võrra erineva lahjendusega, mille puhul alustatakse maksimaalsest vastuvõetavast kontsentratsioonist (nt 1 mM või väiksem, olenevalt lahustuvuspiirist), ja registreeritakse hägu või sademe tekkimine. Teises ja kolmandas katses tuleks kontsentratsioone vajaduse korral kohandada, et kontsentratsioonist sõltuvuse kõverat oleks võimalik paremini iseloomustada.

Katse nõuetekohasuse kriteeriumid

21. Katse tunnistamine nõuetekohaseks või nõuetele mittevastavaks põhineb igas analüüsitsükli kasutatud võrdlusöstrogeeni ja kontrollidega saadud tulemuste hindamisel. Esiteks peaks 1. plaadil olevate võrdluskontrollide täielikud kontsentratsioonikõverad igas analüüsitsükli vastama lähenduskõvera parameetritega (nt IC_{50} ja Hilli tõus) seotud tulemusnäitajatele, mis põhinevad vastavates CERI ja FW meetodite kohastes katse-eeskirjades käsitletud tulemustel (2. ja 3. liide) ja katset läbi viivas laboris kontrollidega varem saadud andmetel. Kõik kontrollid (võrdlusöstrogeen, nõrgalt seonduv aine ja mitteseonduv aine) peaksid igas analüüsitsükli olema õigesti liigitatud. Teiseks tuleb hinnata kõigil ülejäänud plaatidel olevate kontrollide andmete kooskõla 1. plaadi puhul saadud tulemustega. Tuleks kasutada piisavalt suurt uuritava kemikaali kontsentratsioonide vahemikku, et konkureeriva seondumise kõvera ülemine osa selgelt välja joonistuks. Paralleelproovide vaheline varieeruvus igal uuritava kemikaali kontsentratsioonil ja kolme sõltumatu analüüsitsükli vaheline varieeruvus peaks olema mõõdukas ja teaduslikult põhjendatav. Katse järjepideva läbiviimise võimekuse tõendamiseks tuleks luua võrdlusöstrogeeni ja kontrolle iseloomustavate varasemate tulemuste andmebaas ja seda hallata. Laborisisese reprodutseeritavuse hindamiseks võib kasutada mitmest eri katsest pärinevate võrdlusöstrogeenile ja nõrgalt seonduvale kontrollainele vastavate lähenduskõverate parameetrite keskvärtuste standardhälbeid (SD) ja variatsioonikordajaid (CV). Plaatidel olevate kontrollidega saadud tulemuste hindamine igas analüüsitsükli ja iga uuritava kemikaali puhul peaks põhinema eksperdi hinnangul.

Lisaks tuleks juhinduda järgmistest katse nõuetekohasuse kriteeriumidega seotud põhimõtetest:

- andmed peaksid olema piisavad ERiga seondumise kvantitatiivseks hindamiseks;
- kasutatud kontsentratsioonid peaksid jääma uuritava kemikaali lahustuvusvahemikku.

Andmeanalüüs

22. Küllastava ja konkureeriva seondumise andmete analüüsimise kindlaksmääratud korra puhul tuleks järgida retseptor ja ligandi vaheliste interaktsioonide iseloomustamise aluspõhimõtteid. Tavaliselt kasutatakse küllastava seondumise andmete analüüsimiseks mittelineaarse regressiooni mudelit, milles võetakse arvesse summaarset ja mittespetsiifilist seondumist. $B_{\max}$ -i ja K_d määramisel võib olla vaja korrigeerida andmeid ligandi väljatõrjumise suhtes (nt Swillens, 1995 (19)). Konkureeriva seondumise katsete puhul kasutatakse tavaliselt transformeeritud andmeid (nt spetsiifiline seondumine protsentides ja uuritava kemikaali kontsentratsioon ($\log M$)). Iga uuritava kemikaali puhul tuleks IC_{50} hinnangulise logaritmitud väärtuse kindlakstegemiseks kasutada sobivat mittelineaarse kõvera lähendamise tarkvara, milles rakendatakse neljaparameetrilist Hilli võrrandit. Pärast esmast analüüsi tuleks määrata lähenduskõvera parameetrid ja visuaalselt hinnata, kui hästi sobituvad seondumisandmed saadud konkureeriva seondumise kõveraga. Mõnel juhul võib olla vaja viia läbi täiendav analüüs, et leida parim lähenduskõver (nt kõvera ülemise ja/või alumise osa piiritlemine, 10 % reegli kasutamine; vt 4. liide ja allikas 2 (jaotis III.A.2)).
23. Katsete vastavus nõuetekohasuse kriteeriumidele (punkt 20) viitab sellele, et katsesüsteem töötab nõuetekohaselt, kuid sellega ei ole tagatud, et igas konkreetsetes katses saadavad andmed on täpsed. Esimese katse nõuetekohaste tulemuste korduvus on parim viide sellele, et saadud andmed on täpsed.

Üldised andmete tõlgendamise kriteeriumid

24. Praegu puudub ühtne kokkulepitud meetod ERiga seondumise andmete tõlgendamiseks. Siiski tuleks hrERi vahendatava mõju kvalitatiivsel (nt seonduv/mitteseonduv) ja/või kvantitatiivsel (nt $\log IC_{50}$, suhteline seondumisaafiinsus (RBA) jne) analüüsimisel lähtuda empiirilistest andmetest ja usaldusväärsest teaduslikust hinnangust.

Katseprotokoll

25. Katseprotokollis tuleks esitada järgmine teave.

Analüüsimetod:

- kasutatud analüüsimetod.

Kontrollkemikaal / võrdluskemikaal / uuritav kemikaal:

- allikas, partii number, aegumiskuupäev, kui on teada;
- uuritava kemikaali püsivus, kui on teada;
- uuritava kemikaali lahustuvus ja püsivus lahustis, kui on teada;
- lisatud uuritava kemikaaliga söötme pH ja osmolaalsus ning sademe teke selles (vastavalt vajadusele);

ühest koostisosast koosnev aine:

- füüsiline välimus, lahustuvus vees ja muud asjakohased füüsikalised-keemilised omadused;

- kemikaali identifitseerimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus, CASi number, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem, puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne;

mitut koostisosa sisaldav aine, tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal (UVCB) või segu:

- võimalikult täpne omaduste kirjeldus lähtuvalt koostisosade keemilisest määratlusest (vt eespool), kvantitatiivsest sisaldusest ja asjakohastest füüsikalise-keemilistest omadustest.

Lahusti/kandeaine:

- kirjeldus (aine liik, tarnija ja partii);
- lahusti/kandeaine valiku põhjendus;
- uuritava kemikaali lahustuvus ja püsivus lahustis/kandeaines, kui see on teada.

Retseptorid:

- retseptorite päritolu (tarnija, katalooginumber, partii, retseptori liik, retseptori aktiivne kontsentratsioon tarnija andmetel, sertifikaat tarnijalt)
- retseptorite kirjeldus (sh küllastava seondumise tulemused): K_d , B_{max} ;
- retseptorite säilitamine.

Radiomärgistatud ligand:

- tarnija, katalooginumber, partii, eriaktiivsus.

Katsetingimused:

- lahustuvuspiir katsetingimustes;
- seondumispuhvri koostis;
- retseptori kontsentratsioon;
- märgistusaine (st radiomärgistatud ligandi) kontsentratsioon;
- uuritava kemikaali kontsentratsioonid;
- kandeaine protsentuaalne sisaldus lõppkatses;
- inkubeerimise temperatuur ja kestus;
- meetod vaba aine eraldamiseks seondunud ainest;
- positiivsed ja negatiivsed kontrollid/võrdlusained;
- kriteeriumid, mille alusel katsetulemus liigitatakse positiivseks, negatiivseks või ebaselgeks.

Nõuetekohasuse kontroll:

- paralleelsete positiivsete kontrollidega/võrdlusainetega saadud tegelikud IC_{50} ja Hilli tõusu väärtused.

Tulemused:

- algandmed ja andmed seondunud/vaba aine kohta;
- vajaduse korral denatureerumise kontrollimise tulemused;
- väikseim efektiivne kontsentratsioon (LEC), kui see on olemas;
- vastavalt vajadusele RBA ja/või IC_{50} väärtused;
- võimaluse korral mõju sõltuvus kontsentratsioonist;
- statistilise analüüsi tulemused, kui need on olemas, koos veamäära ja usaldusnivooga (nt keskväärtuse standardviga (SEM), SD, CV või usaldusvahemik usaldusnivool 95 %) ning kirjeldus selle kohta, kuidas need väärtused saadi.

Tulemuste arutelu:

- 10 % reegli rakendamine.

Järeldused

KIRJANDUS

- (1) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 34. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (2) OECD (2015). Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrER α). Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 226. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (3) OECD (2015). Performance Standards for Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrER α). Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 222. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (4) OECD (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 150. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (5) Cavailles, V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept. *Climacteric* 5 Suppl. 2: 20–26.
- (6) Welboren, W. J. *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and How are they Regulated? *Endocr. Relat. Cancer* 16(4): 1073–1089.
- (7) Younes, M., ja Honma, N. (2011). Estrogen Receptor Beta. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 135(1): 63–66.
- (8) Diamanti-Kandarakis *et al.* (2009). Endocrine-Disrupting Chemicals: an Endocrine Society Scientific Statement. *Endocr. Rev.* 30(4): 293–342.
- (9) ICCVAM (2002). Background Review Document. Current Status of Test Methods for Detecting Endocrine Disruptors: *In Vitro* Estrogen Receptor Binding Assays. NIH Publication No 03-4504. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC.
- (10) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.
- (11) ICCVAM (2006). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

- (12) Akahori, Y. *et al.* (2008). Relationship Between the Results of *In Vitro* Receptor Binding Assay to Human Estrogen Receptor Alpha and *In Vivo* Uterotrophic Assay: Comparative Study with 65 Selected Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 22(1): 225–231.
- (13) OECD (2007). Additional Data Supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 67. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (14) Takeyoshi, M. (2006). Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity – The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line. Jaapani Kemikaalide Hindamise ja Uurimise Instituut (CERI), Jaapan. Lk 1–188.
- (15) Yamasaki, K., Noda, S., Imatanaka, N., ja Yakabe, Y. (2004). Comparative Study of the Uterotrophic Potency of 14 Chemicals in a Uterotrophic Assay and their Receptor-Binding Affinity. *Toxicol. Lett.* 146: 111–120.
- (16) Kummer, V., Maskova, J., Zraly, Z., Neca, J., Simeckova, P., Vondracek, J., ja Machala, M. (2008). Estrogenic Activity of Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Uterus of Immature Wistar Rats. *Toxicol. Lett.* 180: 213–221.
- (17) Gozgit, J. M., Nestor, K. M., Fasco, M. J., Pentecost, B. T., ja Arcaro, K. F. (2004). Differential Action of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Endogenous Estrogen-Responsive Genes and on a Transfected Estrogen-Responsive Reporter in MCF-7 Cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 196: 58–67.
- (18) Santodonato, J. (1997). Review of the Estrogenic and Antiestrogenic Activity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Relationship to Carcinogenicity. *Chemosphere* 34: 835–848.
- (19) Swillens, S. (1995). Interpretation of Binding Curves Obtained with High Receptor Concentrations: Practical Aid for Computer Analysis. *Mol. Pharmacol.* 47(6): 1197–1203.

1. liide

MÕISTED JA LÜHENDID

10 % reegel – võimalus jätta analüüsist välja andmepunktid, kus [^3H]17 β -östradiooli spetsiifilist seondumist iseloomustav paralleelproovide andmete keskväärtus on vähemalt 10 % suurem kui vastav keskväärtus mõnel väiksemal kontsentratsioonil (vt 4. liide).

Asjakohasus – näitaja, mille abil kirjeldatakse, kuivõrd katsemeetod võimaldab uurida huvipakkuvat toimet, kas selle kasutamine on mõttekas ja kas see on konkreetse eesmärgi jaoks sobiv. Asjakohasusest nähtub, mil määral saab katsemeetodiga õigesti mõõta või ennustada huvipakkuvat bioloogilist toimet. Asjakohasuse puhul võetakse arvesse ka katsemeetodiga saavutatavat täpsust (vastavust) (1).

CV – variatsioonikordaja.

E2 – 17 β -östradiool.

ER – östrogeeniretseptor.

hr- α -ER – rekombinantne inimese α -östrogeeniretseptor.

IC₅₀ – kontsentratsioon, mille juures pärssiva uuritava kemikaali mõju on poole väiksem maksimaalsel efektiivsel kontsentratsioonil avalduvast mõjust.

ICCVAM – alternatiivsete meetodite valideerimise ametitevaheline koordineerimiskomitee.

Kemikaal – aine või segu.

Kontseptuaalne raamistik – OECD kontseptuaalne raamistik võimalike endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide analüüsimiseks ja hindamiseks.

Laborisisene reprodutseeritavus – näitaja, mis iseloomustab seda, millisel määral suudavad sama labori kvalifitseeritud töötajad saada konkreetset katse-eeskirja kasutades eri aegadel ühesuguseid tulemusi (1).

Laboritevaheline reprodutseeritavus – näitaja, mis iseloomustab seda, millisel määral suudavad eri pädevad laborid sama katse-eeskirja alusel samu aineid uurides saada kvalitatiivselt ja kvantitatiivselt sarnaseid tulemusi. Laboritevaheline reprodutseeritavus määratakse valideerimiseelse ja valideerimisega seotud tegevuse käigus ja see näitab, millisel määral on katsemeetod eri laborites edukalt kasutatav (1).

LEC – väikseim efektiivne kontsentratsioon: uuritava kemikaali väikseim kontsentratsioon, mille juures kemikaal avaldab veel mõju (st uuritava kemikaali väikseim kontsentratsioon, mille juures mõju on statistiliselt erinev üksnes kandeainet sisaldava paralleelse kontrolli puhul täheldatavast mõjust).

Mina-ka-meetod – kõnekeelne väljend katsemeetodi kohta, mis on oma ülesehituselt ja funktsionaalsuse poolest sarnane valideeritud ja tunnustatud standardse katsemeetodiga. Seda väljendit kasutatakse sarnase katsemeetodi tähenduses.

Nõuetekohasuse kriteeriumid – katses kasutatavate kontrollide ja võrdlusstandardite minimaalsed tulemuslikkuse standardid. Katse nõuetekohaseks tunnistamiseks peaksid kõik nõuetekohasuse kriteeriumid olema täidetud.

Pädevus – enne tundmatute ainete analüüsimist tõendatud võimekus katsemeetodi kohaseid katseid nõuetekohaselt läbi viia.

Pädevusained – tulemuslikkuse standarditega hõlmatud alarühm võrdlusaineid, mida võib laboris kasutada standardiseeritud analüüsimeetodi abil tehnilise pädevuse tõendamiseks. Nende ainete valikukriteeriumide hulka kuulub tavaliselt nõue, et nende ainete mõju tugevus oleks erinev, need oleksid turul kättesaadavad ja nende kohta oleksid olemas kvaliteetsed võrdlusandmed.

RBA – suhteline seondumisaafiinsus. Aine RBAd väljendatakse aine IC_{50} logaritmitud väärtuse protsentuaalse osakaaluna 17β -östradiooli IC_{50} logaritmitud väärtusest.

SD – standardhälve.

Standardsed katsemeetodid – analüüsimeetodid, millele tuginetakse tulemusnäitajatel põhinevas katsejuhendis nr 493.

Tulemuslikkuse standardid – valideeritud katsemeetodil põhinevad standardid, mille alusel hinnatakse vaadeldava mehhanismi ja funktsionaalsuse poolest sarnase kavandatud katsemeetodi võrreldavust. Need hõlmavad 1) katsemeetodi olulisi elemente, 2) valideeritud katsemeetodi vastuvõetava tulemuslikkuse tõendamiseks kasutatud kemikaalide hulgast valitud võrdluskemikaalide miinimumloetelu ja 3) võrreldavat usaldusväärsuse ja täpsuse taset, mille puhul on lähtutud valideeritud katsemeetodiga saadud tulemustest ja mis tuleks saavutada kavandatud katsemeetodi hindamisel võrdluskemikaalide miinimumloetelu kasutamise teel (1).

Täpsus (vastavus) – katsetulemuste ja vastuvõetavate võrdlusväärtuste kooskõla määr. Täpsus näitab analüüsimeetodi tulemuslikkust ja on üks asjakohastest aspektidest. Seda mõistet kasutatakse sageli vastavuse tähenduses, et väljendada õigete katsetulemuste osakaalu (1).

Usaldusväärsus – näitaja, mis iseloomustab katsemeetodiga saadud tulemuste reprodutseeritavust pikema aja jooksul samas laboris ja eri laborites, kui meetodit rakendatakse ühe ja sama katse-eeskirja alusel. Usaldusväärsuse hindamiseks arvutatakse laborisisene ja laboritevaheline reprodutseeritavus.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

Valideerimine – tegevus, mille käigus määratakse teatud kindla lähenemisviisi, meetodi, katsemudeli, protsessi või hindamisviisi usaldusväärsus ja asjakohasus kindlaksmääratud eesmärgil kasutamisel (1).

Valideeritud katsemeetod – katsemeetod, mille puhul valideerimisuuringud on lõpule viidud, st on määratud selle asjakohasus (sealhulgas täpsus) ja usaldusväärsus konkreetsel eesmärgil kasutamisel. Oluline on märkida, et valideeritud katsemeetod ei pruugi olla täpsuse ja usaldusväärsuse poolest piisavalt tulemuslik, et seda saaks lugeda kavandatud eesmärgi puhul vastuvõetavaks (1).

Võrdlusöstrogeen – 17β -östradiool (E2, CASi nr: 50-28-2).

Östrogeenne toime – kemikaali võime jäljendada 17β -östradiooli võimet seonduda östrogeenireseptoriga. Käesolev katsemeetod võimaldab tuvastada seondumist inimese α -ERiga.

2. liide

ÖSTROGEENIRETSEPTORIL (α -ER) PÕHINEVAD FREYBERGERI-WILSONI *IN VITRO* MEETODID KÜLLASTAVA JA KONKUREERIVA SEONDUMISE ANALÜÜSIMISEKS TÄISPIKA REKOMBINANTSE α -ER-I ABIL

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD (VT KA ÜLDINE SISSEJUHATUS)

1. Käesoleva östrogeeniretseptoril (α -ER) põhineva, küllastava ja konkureeriva seondumise analüüsimist võimaldava *in vitro* meetodi puhul kasutatakse täispikka inimese α -östrogeeniretseptorit (hr- α -ER), mille tootmiseks ja eraldamiseks on kasutatud bakuloviirusega nakatunud putukarakke. Freybergeri ja Wilsoni välja töötatud katse-eeskirja on hinnatud rahvusvahelises mitme labori osalusel läbi viidud valideerimisuuringus (2), mille käigus tõendati, et see analüüsimeetod on kavandatud kasutuseesmärgi puhul asjakohane ja usaldusväärne.
2. Käesolev meetod on rakendatav sõeluuringu jaoks, mille eesmärk on tuvastada aineid, mis on võimelised seonduma täispikka hr- α -ERiga. Seda kasutatakse selleks, et hinnata uuritava kemikaali võimet konkureerida hr- α -ERile seondumisel 17 β -östradiooliga. Kvantitatiivsed katsetulemused võivad hõlmata uuritava kemikaali IC₅₀ (uuritava kemikaali kontsentratsioon, mis on vajalik poole [³H]17 β -östradiooli väljatõrjumiseks hr- α -ERilt) ja suhtelist seondumisaafiinsust hr- α -ERi suhtes võrreldes 17 β -östradiooliga. Kemikaalide sõeluuringu puhul võivad vastuvõetavad kvalitatiivsed katsetulemused hõlmata uuritava kemikaali liigitamist hr- α -ERiga seonduvaks aineks, mitteseonduvaks aineks või ebaselge mõjuga aineks lähtuvalt seondumiskõverate suhtes kohaldatavatest kriteeriumidest.
3. Käesoleva analüüsimeetodi puhul kasutatakse radioaktiivset ligandi, mille jaoks peab laboril olema radioaktiivsete materjalide käitlemise luba. Kõikide radioisotoopide ja ohtlike kemikaalidega tehtavate toimingute puhul tuleks järgida siseriiklikes õigusaktides kirjeldatud eeskirju ja korda.
4. Enne käesoleva meetodi kasutamist regulatiivsel eesmärgil tuleks lugeda peatükke „ÜLDINE SISSEJUHATUS“ ja „hrER-GA SEONDUMISE KATSE ELEMENDID“. Käesolevas katsemeetodis kasutatud mõisted ja lühendid on esitatud 1. liites.

MEETODI PÕHIMÕTE (VT KA ÜLDINE SISSEJUHATUS)

5. Inimese rekombinantse α -östrogeeniretseptoriga (hr- α -ER) seondumise analüüsimisel mõõdetakse radiomärgistatud ligandi ([³H]17 β -östradiool) võimet seonduda ERiga üha suuremas kontsentratsioonis esineva uuritava kemikaali (st konkureeriva ligandi) juuresolekul. Uuritavad kemikaalid, millel on ERi suhtes suur aafiinsus, konkureerivad radiomärgistatud ligandiga väiksemal kontsentratsioonil kui kemikaalid, mille aafiinsus retseptori suhtes on väiksem.

6. Kõnealune meetod hõlmab kahte põhielementi: küllastava seondumise katset, millega iseloomustatakse retseptori ja ligandi vahelise interaktsiooni parameetreid, ning sellele järgnevat konkureeriva seondumise katset, millega iseloomustatakse uuritava kemikaali ja radiomärgistatud ligandi vahelist konkurentsi ERile seondumisel.
7. Küllastava seondumise katse eesmärk on teha konkureeriva seondumise katse eel kindlaks konkreetse partii retseptorite seondumisasiinsus ja arv. Küllastava seondumise katses mõõdetakse tasakaalutingimustes teatud kindlas kontsentratsioonis kasutatava östrogeeniretseptori afiinsust loodusliku ligandi suhtes (seda väljendab dissotsiatsioonikonstant K_d) ja retseptori aktiivsete seondumiskohtade kontsentratsiooni (B_{max}).
8. Konkureeriva seondumise katses mõõdetakse aine afiinsuse hindamiseks selle võimet konkureerida ERile seondumisel [^3H]17 β -östradioliga. Afiinsust väljendatakse uuritava kemikaali sellise kontsentratsiooni kaudu, mille juures kemikaal vähendab tasakaalutingimustes [^3H]17 β -östradioli spetsiifilist seondumist 50 % võrra (sellele vastab mõiste „50 % ulatuses inhibeeriv kontsentratsioon“ ehk IC_{50}). Afiinsust on võimalik hinnata ka suhtelise seondumisasiinsuse (RBA) kaudu, mis määratakse samas analüüsitsüklis eraldi mõõdetud östradioli IC_{50} suhtes. Konkureeriva seondumise katses mõõdetakse teatud kindlas kontsentratsioonis kasutatava [^3H]17 β -östradioli seondumist laia vahemikku (kaheksat suurusjärku) hõlmavates kontsentratsioonides esineva uuritava kemikaali juuresolekul. Seejärel kohaldatakse saadud andmete suhtes võimaluse korral teatavat liiki Hilli võrrandit (Hill, 1910), millega kirjeldatakse radioligandi väljatõrjumist konkureeriva seonduva ainega, millel on üks seondumiskoht. Radiomärgistatud östradioli väljatõrjumise ulatust tasakaalutingimustes kasutatakse uuritava kemikaali liigitamiseks seonduvaks aineks, mitteseonduvaks aineks või ebaselge mõjuga aineks.

KATSE KÄIK

hr- α -ERi vastuvõetava funktsionaalsuse tõendamine

9. Enne küllastava seondumise ja konkureeriva seondumise katsete regulaarset kasutamist tuleks iga uue hr- α -ERi partii puhul tõendada selle nõuetekohast funktsionaalsust laboris, kus seda kasutama hakatakse. Funktsionaalsuse tõendamine peaks hõlmama kahte etappi. Need etapid on järgmised.
 - Viiakse läbi [^3H]17 β -östradioli küllastava seondumise katse, et tõendada hr- α -ERi spetsiifilisust ja küllastumist. Nende andmete analüüsimisel mittelineaarse regressiooni teel (nt BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) ja järgnevalt saadud Scatchardi graafiku alusel tuleks iga hr- α -ERi partii puhul dokumenteerida [^3H]17 β -östradioli seondumisasiinsus hr- α -ERi suhtes (K_d) ja retseptorite arv (B_{max}).
 - Viiakse läbi konkureeriva seondumise katse kontrollainetega (võrdlusöstrogeen (17 β -östradiool)), nõrgalt seonduv aine (nt noretünodreel või noretindroon) ja mitteseonduv aine

(oktüültrietoksüsilaan (OTES)). Igas laboris tuleks luua varasemate tulemuste andmebaas, et võimaldada dokumenteerida võrdlusöstrogeeni ja nõrgalt seonduva aine IC₅₀ ja muude asjakohaste näitajate väärtuste kooskõla määra eri katsete lõikes ja hr- α -ERi eri partiide puhul. Kontrollaineid iseloomustavate konkureeriva seondumise kõverate parameetrid peaksid jääma usaldusnivoole 95 % vastavasse usaldusvahemikku (vt tabel 1), mis tehti kindlaks kõnealuse analüüsimeetodi valideerimise uuringus osalenud laborites saadud andmete põhjal (2).

Tabel 1. FW meetodi kohases hrERiga seondumise katses võrdlusöstrogeeni ja nõrgalt seonduva aine puhul kohaldatavad tulemuslikkuse kriteeriumid

Aine	Näitaja	Keskmine ^a	Standardhälve (n)	Usaldusvahemik usaldusnivool 95 % ^b	
				Alampiir	Ülempiir
17β-östradiool	Maksimumväärtus (%)	100,44	10,84 (67)	97,8	103,1
	Miinumväärtus (%)	0,29	1,25 (67)	-0,01	0,60
	Hilli tõus	-1,06	0,20 (67)	-1,11	-1,02
	Log IC ₅₀ (M)	-8,92 ^c	0,18 (67)	-8,97	-8,88
Noretüodreel	Maksimumväärtus (%)	99,42	8,90 (68)	97,27	101,60
	Miinumväärtus (%)	2,02	3,42 (68)	1,19	2,84
	Hilli tõus	-1,01	0,38 (68)	-1,10	-0,92
	Log IC ₅₀ (M)	-6,39	0,27 (68)	-6,46	-6,33
Noretindroon^c	Maksimumväärtus (%)	96,14	8,44 (27)	92,80	99,48
	Miinumväärtus (%)	2,38	5,02 (27)	0,40	4,37
	Hilli tõus	-1,41	0,32 (27)	-1,53	-1,28
	Log IC ₅₀ (M)	-5,73	0,27 (27)	-5,84	-5,62

^a Keskmine ± standardhälve (SD) (n) on arvatud lähtuvalt lähenduskõvera hinnangulistest näitajatest (neljapameetriline Hilli võrrand) kontrollkatsetes, mis viidi valideerimisuuringu jooksul läbi neljas laboris (vt allikas 2, N lisa).

^b Usaldusvahemik usaldusnivool 95 % on esitatud katse nõuetekohasuse kriteeriumide kehtestamise võimaldamiseks.

^c Noretindrooni analüüsimine ei olnud valideerimisuuringus 4. alategevuse raames kohustuslik (vt allikas 2, 4. alategevus). Seega on keskmine ± SD (n) arvatud lähtuvalt lähenduskõvera hinnangulistest näitajatest (neljapameetriline Hilli võrrand) kontrollkatsetes, mis viidi läbi kahes laboris.

IC₅₀ väärtuste vahemik sõltub konkreetsetes laboris kasutatava retseptoripreparaadi K_d väärtusest ja radiomärgistatud ligandi kontsentratsioonist. IC₅₀ väärtuste vahemiku asjakohane kohandamine sõltuvalt katse läbiviimiseks kasutatud tingimustest on lubatud.

Labori pädevuse tõendamine

10. Tutvuge käesoleva katsemeetodi punktidega 17 ja 18 ning tabeliga 2 peatükis „**hrER-GA SEONDUMISE KATSE ELEMENTID**“. Iga katse (nii küllastava kui ka konkureeriva seondumise puhul) peaks koosnema kolmest eri päevadel läbi viidavast sõltumatust analüüsitsüklist (st kasutatakse retseptori, kemikaalide ja reaktiivide värskelt valmistatud lahjendusi) ja igas tsükli tuleks kasutada kolme paralleelproovi.

Retseptori (hr-α-ER) kontsentratsiooni määramine

11. Aktiivse retseptori kontsentratsioon varieerub pisut eri partiide ja säilitustingimuste puhul. Seepärast tuleks määrata tarnijalt saadud aktiivse retseptori kontsentratsioon. See võimaldab kasutada katses sobivat aktiivse retseptori kontsentratsiooni.
12. Retseptorit tuleks konkureerivale seondumisele vastavates tingimustes (st 1 nM [^3H]östradiool) inkubeerida nominaalsel kontsentratsioonil 0,25, 0,5, 0,75 ja 1 nM ilma märgistamata östradioolita (summaarne seondumine) ja koos 1 μM märgistamata östradiooliga (mittespetsiifiline seondumine). Spetsiifiline seondumine, mis arvutatakse summaarse ja mittespetsiifilise seondumise vahena, esitatakse graafikul vastavuses retseptori nominaalse kontsentratsiooniga. Retseptori kontsentratsioon, mille puhul spetsiifilise seondumise määr vastab 20 protsendile lisatud radiomärgise kogusest, on seotud retseptori vastava nominaalse kontsentratsiooniga ja seda retseptori kontsentratsiooni tuleks kasutada küllastava ja konkureeriva seondumise katsetes. Sageli vastab nendele tingimustele hrERi lõppkontsentratsioon 0,5 nM.
13. Kui 20 % kriteeriumi täitmine korduvalt ebaõnnestub, tuleks kontrollida katseplaani võimalike vigade suhtes. Suutmatus saavutada vastavust 20 % kriteeriumile võib viidata sellele, et rekombinantse valgu partiis on väga vähe aktiivset retseptorit, ning sel juhul tuleks kaaluda mõne muu retseptoripartii kasutamist.

Küllastava seondumise katse

14. [^3H]17 β -östradiooli tuleks hindamiseks kasutada kaheksas eri kontsentratsioonis, iga kontsentratsiooni puhul kolmes paralleelis, ning kohaldada seejuures järgmist kolme tingimust (vt tabel 2).
- Seondumine märgistamata 17 β -östradiooli puudumisel ja ERi juuresolekul. Nii määratakse summaarne seondumine, mida väljendab radioaktiivsus kannudes, kus on ainult [^3H]17 β -östradiool.
 - Seondumine märgistamata 17 β -östradiooli juuresolekul 1000-kordses liias, võrreldes radiomärgistatud 17 β -östradiooliga, ning ERi juuresolekul. Nende tingimuste puhul on eesmärk küllastada aktiivsed seondumiskohad märgistamata 17 β -östradiooliga ja määrata kannudes radioaktiivsuse mõõtmise teel mittespetsiifiline seondumine. Radioaktiivse östradiooli mis tahes kogus, mis on veel võimeline retseptoriga seonduma, loetakse olevat seondunud mittespetsiifiliselt, sest märgistamata östradiooli kontsentratsioon peaks olema nii suur, et kõik saadaolevad spetsiifilise seondumise kohad retseptoril on hõivatud.
 - Seondumine märgistamata 17 β -östradiooli puudumisel ja ERi puudumisel (summaarse radioaktiivsuse määramine).

[^3H]17 β -östradiooli ja märgistamata 17 β -östradiooli lahuste valmistamine

15. [^3H]17 β -östradiooli lahjenduste saamiseks tuleks 12 nM [^3H]17 β -östradiooli põhilahusele analüüsipuhvri lisamise teel valmistada lahused, kus kontsentratsioon jääb algselt vahemikku 0,12 nM kuni 12 nM. Pärast 40 μl sellise lahuse lisamist 96-kannulise

mikroitiiterplaadi vastavasse kannu (saadav lõppruumala on 160 µl) saadakse lahused lõpliku katsekontsentratsiooniga 0,03 kuni 3,0 nM. Analüüsipuhvri, [³H]17β-östradioli põhilahuse ja lahjenduste valmistamist ning kontsentratsiooni määramist on põhjalikult kirjeldatud FW meetodi kohases katse-eeskirjas (2).

16. Etanoolis lahustatud 17β-östradioli lahjenduste saamiseks tuleks analüüsipuhvri lisamise teel valmistada kaheksa eri kontsentratsioonidega lahust, mille kontsentratsioon jääb algselt vahemikku 0,06 µM kuni 6 µM. Pärast 80 µl sellise lahuse lisamist 96-kannulise mikroitiiterplaadi vastavasse kannu (saadav lõppruumala on 160 µl) saadakse lahused lõpliku katsekontsentratsiooniga 0,03 µM kuni 3 µM. Märjastamata 17β-östradioli lõppkontsentratsioon igas mittespetsiifilise seondumise mõõtmiseks kasutatavas kannus peaks olema 1000 korda suurem kui märjastatud [³H]17β-östradioli kontsentratsioon. Märjastamata 17β-östradioli lahjenduste valmistamist on põhjalikult kirjeldatud FW meetodi kohases katse-eeskirjas (2).
17. Tuleks kasutada retseptori sellist nominaalset kontsentratsiooni, mille puhul spetsiifiline seondumine on $20 \pm 5 \%$ (vt punktid 12–13). hr-α-ERi lahus tuleks valmistada vahetult enne kasutamist.
18. 96-kannulised mikroitiiterplaadid valmistatakse ette vastavalt tabelis 2 esitatud skeemile, kus iga kontsentratsiooni puhul kasutatakse kolme paralleelproovi. Näide plaadil kasutatavate [³H]17β-östradioli, märjastamata 17β-östradioli, puhvri ja retseptori kontsentratsioonide ja koguste kohta on esitatud liites 2.2.

Tabel 2. Küllastava seondumise katses kasutatav mikroitiiterplaadi skeem

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [³ H]E2 + ER			0,06 nM [³ H]E2 + ER			0,08 nM [³ H]E2 + ER			0,10 nM [³ H]E2 + ER			Summaarne seondumine (ainult lahusti)
B	0,30 nM [³ H]E2 + ER			0,60 nM [³ H]E2 + ER			1,0 nM [³ H]E2 + ER			3,0 nM [³ H]E2 + ER			
C													
D	0,03 nM [³ H]E2 + ER + 0,03 μM E2			0,06 nM [³ H]E2 + ER + 0,06 μM E2			0,08 nM [³ H]E2 + ER + 0,08 μM E2			0,10 nM [³ H]E2 + ER + 0,10 μM E2			Mittespetsiifiline seondumine
E	0,30 nM [³ H]E2 + ER + 0,30 μM E2			0,60 nM [³ H]E2 + ER + 0,60 μM E2			1,0 nM [³ H]E2 + ER + 1,0 μM E2			3,0 nM [³ H]E2 + ER + 3,0 μM E2			
F													
G													
H													

[³H]E2 – [³H]17β-östradiool

ER – östrogenireseptor

E2 – märjastamata 17β-östradiool

19. Katses kasutatavaid mikrotiiterplaate tuleks inkubeerida pöördloksutil 2–8 °C juures 16 kuni 20 tundi.

hr-α-ERiga seondunud [³H]17β-östradiooli koguse mõõtmine

20. hr-α-ERiga seondunud [³H]17β-östradiooli eraldamiseks vabast [³H]17β-östradioolist tuleks lisada igasse kannu 80 µl külma DCC suspensiooni, loksutada mikrotiiterplaate 10 minutit ja tsentrifuugida neid 10 minutit kiirusel umbes 2500 pööret minutis. Et vähendada seondunud [³H]17β-östradiooli dissotsieerumist hr-α-ERilt eraldamisprotsessi käigus, on väga oluline hoida puhvreid ja analüüsitavaid kanne temperatuuril 2–8 °C ning viia kõik etapid läbi kiirelt. Mikrotiiterplaadiloksuti on vajalik, et plaate tõhusalt ja kiiresti töödelda.
21. Seejärel tuleks DCC puudutamisest tuleneda võiva kannude saastumise ärahoidmiseks väga ettevaatlikult võtta 50 µl supernatanti, mis sisaldab hr-α-ERiga seondunud [³H]17β-östradiooli, ning kanda see teisele mikrotiiterplaadile.
22. Seejärel lisatakse igasse kannu (A1–B12 ja D1–E12) 200 µl stsintillatsioonivedelikku, mis on võimeline muutma tuumakiirguse kineetilise energia valgusenergiaks. Mõõteplaadi kannudesse G1–H12 (kasutatakse summaarse radioaktiivsuse mõõtmiseks) tuleks otse stsintillatsioonivedelikku lisada [³H]17β-östradiooli lahused (40 µl) järjestikuste lahjendustena, nagu on näidatud tabelis 3; need kannud sisaldavad seega üksnes 200 µl stsintillatsioonivedelikku ja vastava lahjendusastmega [³H]17β-östradiooli lahust. Nendest kannudest saadud andmetest nähtub, kui palju [³H]17β-östradiooli (mõõdetuna dpm-des) lisati iga rühma kannudesse summaarse seondumise ja mittespetsiifilise seondumise hindamiseks.

Tabel 3. Küllastava seondumise katses radioaktiivsuse mõõtmisel kasutatav mikrotiiterplaadi skeem

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [³ H]E2 + ER			0,06 nM [³ H]E2 + ER			0,08 nM [³ H]E2 + ER			0,10 nM [³ H]E2 + ER			Summaarne seondumine (ainult lahusti)
B	0,30 nM [³ H]E2 + ER			0,60 nM [³ H]E2 + ER			1,0 nM [³ H]E2 + ER			3,0 nM [³ H]E2 + ER			
C													
D	0,03 nM [³ H]E2 + ER + 0,03 μM E2			0,06 nM [³ H]E2 + ER + 0,06 μM E2			0,08 nM [³ H]E2 + ER + 0,08 μM E2			0,10 nM [³ H]E2 + ER + 0,10 μM E2			Mittespetsiifiline seondumine
E	0,30 nM [³ H]E2 + ER + 0,30 μM E2			0,60 nM [³ H]E2 + ER + 0,60 μM E2			1,0 nM [³ H]E2 + ER + 1,0 μM E2			3,0 nM [³ H]E2 + ER + 3,0 μM E2			
F													
G	0,03 nM [³ H]E2 (summaarne radioaktiivsus dpm-des)			0,06 nM [³ H]E2			0,08 nM [³ H]E2			0,10 nM [³ H]E2			Summaarne radioaktiivsus dpm-des*
	0,30 nM [³ H]E2			0,60 nM [³ H]E2			1,0 nM [³ H]E2			3,0 nM [³ H]E2			

[³H]E2 – [³H]17β-östradiool

ER – östrogeeniretseptor

E2 – märgistamata 17β-östradiool

dpm – lagunemiste arv minutis

* Kannudes G1–H12 tuleks [³H]-ga märgistatud radioaktiivse östradiooli lahused lisada järjestikuste lahjendustena otse 200 mikrolitriile stsintillatsioonivedelikule.

23. Mõõtmist tuleks alustada pärast vähemalt kahe tunni pikkust viivitust ja loendamisaeg peaks olema 40 minutit kannu kohta. Radioaktiivsuse mõõtmiseks dpm-des kannu kohta tuleks kasutada mikrotiiterplaadi stsintillatsiooniloendurit ja võtta seejuures arvesse sumbumisparandit. Kui mikrotiiterplaadi stsintillatsiooniloendur ei ole kättesaadav, võib proovide analüüsimiseks kasutada tavalist loendurit. Sellisel juhul võib kaaluda loendamisaja lühendamist.

Konkureeriva seondumise katse

24. Konkureeriva seondumise katse käigus mõõdetakse ühel kontsentratsioonil kasutatava [³H]17β-östradiooli seondumist üha suuremas kontsentratsioonis esineva uuritava kemikaali juuresolekul. Igas analüüsitsüklis tuleks iga kontsentratsiooni puhul kasutada üheaegselt kolme paralleelproovi. Lisaks tuleks iga uuritava kemikaaliga läbi viia kolm järjestikust analüüsitsüklit. Katse läbiviimiseks tuleks kasutada ühte või mitut 96-kannulist mikrotiiterplaati.

Kontrollid

25. Katse läbiviimisel tuleks igas analüüsitsüklis kasutada paralleelset lahustiga kontrolli ja teisi kontrolle (st võrdlusöstrogeeni, nõrgalt seonduvat ainet ja mitteseonduvat ainet). Igas analüüsitsüklis tuleks ühel plaadil kasutada võrdlusöstrogeeni ja kontrollaineid (st nõrgalt seonduvat ainet ja mitteseonduvat ainet) täieliku kontsentratsioonikõvera ulatuses. Kõikidele ülejäänud plaatidele tuleks kanda i) E2 ja nõrgalt seonduv aine suures (maksimaalsele väljatõrjumisele vastavas) ja keskmises (umbes IC₅₀-le vastavas) kontsentratsioonis kolmes paralleelis ning ii) lahustiga kontroll ja mittespetsiifilise seondumise kontroll, kumbki vähemalt kolmes paralleelis. Analüüsipuhvri, kontrollide, [³H]17β-östradiooli, hr-α-ERi ja uuritava kemikaali lahuste valmistamist on kirjeldatud allikas 2 (K lisa; vt FW meetodi kohane katse-eeskiri).

Lahustiga kontroll

26. Lahustiga kontroll võimaldab tõendada, et lahusti ei mõjuta katsesüsteemi, ja ühtlasi mõõta summaarset seondumist (SS). Eelistatud lahusti on etanool. Kui uuritav kemikaal on suurimal kontsentratsioonil etanoolis mittelahustuv, võib lahustina kasutada DMSOd. Etanooli või DMSO lõppkontsentratsioon katsekannudes on 1,5 %; see ei tohi olla suurem kui 2 %.

Puhvrikontroll

27. Puhvrikontroll (PK) ei tohiks sisaldada lahustit ega uuritavat kemikaali, kuid peaks sisaldama kõiki teisi analüüsikomponente. Puhvrikontrolliga saadud tulemusi võrreldakse lahustiga kontrolliga saadud tulemustega, tõendamaks, et kasutatud lahusti ei mõjuta analüüsisüsteemi.

Tugevalt seonduv aine (võrdlusöstrogeen)

28. 17 β -östradiool (CASi nr: 50-28-2) on ERi endogeenne ligand ja seondub retseptori α -vormiga suure afiinsusega. Igas hr- α -ERiga tehtavas konkureeriva seondumise katses tuleks kasutada märgistamata 17 β -östradiooli standardkõverat, et oleks võimalik hinnata katsetulemuste varieeruvust samas laboris pikema aja jooksul. Märgistamata 17 β -östradioolist tuleks katsekannudes kasutamiseks valmistada etanoolis kaheksa lahust kontsentratsioonivahemikus 100 nM kuni 10 pM (-7 [log M] kuni -11 [log M]); lahuste kontsentratsioonid on järgmised: -7 [log M], -8 [log M], -8,5 [log M], -9 [log M], -9,5 [log M], -10 [log M], -11 [log M]. Märgistamata 17 β -östradiooli suurimat kontsentratsiooni (1 μ M) kasutatakse ka mittespetsiifilise seondumise hindamiseks. See kontsentratsioon on tabelis 4 tähistatud märgisega „MSS“, kuigi see on samuti osa standardkõverast.

Nõrgalt seonduv aine

29. Igas analüüsitsükli tuleks tundlikkuse tõendamiseks ja pikema aja jooksul saadud tulemuste varieeruvuse hindamiseks kasutada ka nõrgalt seonduvat ainet (noretünodreeli (CASi nr: 68-23-5) või noretindrooni (CASi nr: 68-22-4)). Nõrgalt seonduvast ainest tuleks katsekannudes kasutamiseks valmistada etanoolis kaheksa lahust kontsentratsioonivahemikus 3 nM kuni 30 μ M (-8,5 [log M] kuni -4,5 [log M]); lahuste kontsentratsioonid on järgmised: -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].

Mitteseonduv aine

30. Negatiivse kontrollina (mitteseonduva ainenä) tuleks kasutada oktüültrietoksüsilaani (OTES; CASi nr: 2943-75-1). Sellega tagatakse, et katse käigus on võimalik tuvastada hr- α -ERiga mitteseonduvaid uuritavaid kemikaale. Mitteseonduvast ainest tuleks katsekannudes kasutamiseks valmistada etanoolis kaheksa lahust log-ühiku kaupa suurenevate kontsentratsioonide vahemikus 0,1 nM kuni 1000 μ M (-10 [log M] kuni -3 [log M]). Alternatiivse mitteseonduva ainenä võib kasutada di-*n*-butüülfalaati (DBP). Selle maksimaalne lahustuvus on teadaolevalt -4 [log M].

hr- α -ERi kontsentratsioon

31. Tuleks kasutada sellist retseptori kogust, mille puhul spetsiifiline seondumine radioligandi kontsentratsioonil 1 nM on 20 ± 5 % (vt 2. liite punktid 12–13). hr- α -ERi lahus tuleks valmistada vahetult enne kasutamist.

[³H]17 β -östradiool

32. [³H]17 β -östradiooli kontsentratsioon katsekannudes peaks olema 1,0 nM.

Uuritavad kemikaalid

33. Iga uuritava kemikaali puhul on esmalt vaja läbi viia lahustuvuskatse, et määrata lahustuvuspiir ja teha kindlaks katse-eeskirja järgimiseks sobiv kontsentratsioonivahemik. Iga uuritava kemikaali lahustuvuspiir tuleb algselt määrata lahustis ja seejärel kontrollida seda katsetingimustes. Katses kasutatav lõppkontsentratsioon ei tohiks olla suurem kui 1 mM. Kontsentratsioonivahemiku leidmise katses kasutatakse lahustiga kontrolli koos kaheksa järjestikuse üksteisest log-ühiku võrra erineva lahjendusega, mille puhul alustatakse maksimaalsest vastuvõetavast kontsentratsioonist (nt 1 mM või väiksem, olenevalt lahustuvuspiirist), ja registreeritakse nähtava hägu või sademe tekkimine (vt ka punkt 35). Uuritava kemikaali analüüsimiseks tuleks kasutada eelnevas kontsentratsioonivahemiku leidmise katses kindlaks tehtud kaheksal järjestikusel üksteisest log-ühiku võrra erineval kontsentratsioonil põhinevat kõverat. Teises ja kolmandas katses tuleks kontsentratsioone vajaduse korral kohandada, et kontsentratsioonist sõltuvuse kõverat oleks võimalik paremini iseloomustada.
34. Uuritava kemikaali lahjendused tuleks valmistada sobivas lahustis (vt 2. liite punkt 26). Kui uuritav kemikaal ei lahustu suurimal kontsentratsioonil etanoolis ega DMSO-s ja suurema koguse lahusti lisamisel tõuseks lahusti sisaldus lõpplahuses üle lubatud piirmäära, võib suurima kontsentratsioonina kasutada lahjenduste reas järgmist väiksemat kontsentratsiooni. Sellisel juhul võib lisada kontsentratsioonirea lahjemasse otsa ühe lisalahjenduse. Teised kontsentratsioonid lahjenduste reas tuleks jätta muutmata.
35. Uuritava kemikaali lahuseid tuleks pärast katsekannu lisamist hoolikalt jälgida, sest uuritav kemikaal võib kannu lisamisel välja sadeneda. Kõigi sadet sisaldavate kannude andmed tuleks kõvera lähendamisel välja jätta ja registreerida andmete väljajätmise põhjus.
36. Kui eelnevalt on olemas muudest allikatest pärinev teave uuritava kemikaali log IC_{50} kohta, võib olla asjakohane kasutada lahjenduste geomeetrilist jaotust eeldatava log IC_{50} ümber (nt sammuga 0,5 log-ühikut). Lõpptulemuses peaks kajastuma piisav kontsentratsioonide ulatus kummalgi pool log IC_{50} väärtust, sealhulgas kõvera ülemine ja alumine osa, nii et seondumiskõverat oleks võimalik piisavalt iseloomustada.

Katseplaatide kasutusskeemid

37. Mikrotiiterplaatide ettevalmistamisel tuleks need tähistada koodidega, mis vastavad lahustiga kontrollile, võrdlusöstrogeeni suurimale kontsentratsioonile – selle abil hinnatakse ühtlasi mittespetsiifilist seondumist (MSS) – ja puhvrikontrollile, mida kõiki kasutatakse kuues paralleelis, ning igale kontsentratsioonile kaheksast mitteseonduva kontrollaine (oktüültrietsülaani) kontsentratsioonist, võrdlusöstrogeeni seitsmest väiksemast kontsentratsioonist, nõrgalt seonduva aine kaheksast kontsentratsioonist ja iga uuritava kemikaali (UK) kaheksast kontsentratsioonist, mida kõiki kasutatakse kolmes paralleelis. Võrdlusöstrogeeni ja kontrollide täielikke kontsentratsioonikõveraid hõlmav plaadi näidisskeem on esitatud tabelis 4. Uuritavate kemikaalide analüüsimiseks kasutatakse eraldi mikrotiiterplaate, mis peaksid sisaldama ka järgmisi plaadikontrolle: 1)

E2 ja nõrgalt seonduvat ainet suures (maksimaalsele väljatõrjumisele vastavas) ja keskmises (umbes IC_{50} -le vastavas) kontsentratsioonis, kõikidel juhtudel kolmes paralleelis; 2) lahustiga kontrolli ja mittespetsiifilise seondumise kontrolli, kummalgi juhul kuues paralleelis (tabel 5). Konkureeriva seondumise katses kasutatavale mikrotiiterplaadi skeemile vastav näidistööleht kolme tundmatu uuritava kemikaali analüüsimiseks on esitatud liites 2.3. Tabelites 4 ja 5 on esitatud katses kasutatavad lõppkontsentratsioonid. E2 maksimaalne kontsentratsioon peaks olema 1×10^{-7} M ja nõrgalt seonduva aine puhul tuleks kasutada 1. plaadil kasutatud suurimat kontsentratsiooni. IC_{50} tuleb laboris määrata kontrollidega varem saadud tulemuste andmebaasi alusel. Eeldatavalt on see väärtus sarnane valideerimisuuringutes täheldatud väärtusega (vt tabel 1).

Tabel 4. Konkureeriva seondumise katses kasutatav mikrotiiterplaadi skeem, mis hõlmab võrdlusöstrogeeni ja kontrollide täielikke kontsentratsioonikõveraid (1. plaat)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SS (ainult lahusti)			SS (ainult lahusti)			MSS			MSS		
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})			Tühi kann*		
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	Tühiproov (radiomärgise jaoks)**			Tühiproov (radiomärgise jaoks)**			Puhvrikontroll			Puhvrikontroll		

Selles näites on nõrgalt seonduv aine noretinodreel (NE).

* Täiesti tühi kasutamata kann.

** Tühiproov, mida ei kasutata inkubeerimise ajal, kuid mida kasutatakse lisatud radiomärgise summaarse radioaktiivsuse kontrollimiseks.

Tabel 5. Konkureeriva seondumise katses kasutatav mikrotiiterplaadi skeem, mis hõlmab uuritavate kemikaalide täielikke kontsentratsioonikõveraid ja plaadikontrolle

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SS (ainult lahusti)			SS (ainult lahusti)			MSS			MSS		
B	UK1 (1×10^{-3})			UK1 (1×10^{-4})			UK1 (1×10^{-5})			UK1 (1×10^{-6})		
C	UK1 (1×10^{-7})			UK1 (1×10^{-8})			UK1 (1×10^{-9})			UK1 (1×10^{-10})		
D	UK2 (1×10^{-3})			UK2 (1×10^{-4})			UK2 (1×10^{-5})			UK2 (1×10^{-6})		
E	UK2 (1×10^{-7})			UK2 (1×10^{-8})			UK2 (1×10^{-9})			UK2 (1×10^{-10})		
F	UK3 (1×10^{-3})			UK3 (1×10^{-4})			UK3 (1×10^{-5})			UK3 (1×10^{-6})		

G	UK3 (1×10^{-7})	UK3 (1×10^{-8})	UK3 (1×10^{-9})	UK3 (1×10^{-10})
H	NE (IC ₅₀)	NE ($1 \times 10^{-4.5}$)	E2 (IC ₅₀)	E2 (1×10^{-7})

Selles näites on nõrgalt seonduv aine noretinodreel (NE).

Konkureeriva seondumise katse lõpetamine

38. Nagu on näidatud tabelis 6, tuleks kannudesse lisada 80 µl lahustiga kontrolli, puhvrikontrolli, võrdlusöstrogeeni, nõrgalt seonduvat ainet, mitteseonduvat ainet ja uuritavaid kemikaale, mille lahused on valmistatud analüüsipuhvris. Seejärel lisatakse igasse kannu 40 µl 4 nM [³H]17β-östradioli lahust. Pärast 10 kuni 15 minuti pikkust tasast loksutamist temperatuuril 2–8 °C tuleks lisada 40 µl hr-α-ERi lahust. Katses kasutatavaid mikrotiiterplaate tuleks inkubeerida pöördloksutil 2–8 °C juures 16 kuni 20 tundi.

Tabel 6. hrERil põhineva konkureeriva seondumise katse komponentide kogused mikrotiiterplaadil

Kogus (µl)	Koostisosa
80	Märgistamata 17β-östradiol, noretinodreel, OTES, uuritav kemikaal, lahusti või puhver
40	4 nM [³ H]17β-östradioli lahus
40	Määratud kontsentratsiooniga hr-α-ERi lahus
160	Lõppruumala igas katsekannus

39. Seejärel tuleks viia läbi hr-α-ERiga seondunud [³H]17β-östradioli kvantifitseerimine pärast seda, kui hr-α-ERiga seondunud [³H]17β-östradiol on eraldatud vabast [³H]17β-östradiolist igasse kannu 80 µl külma DCC suspensiooni lisamise teel, nagu on kirjeldatud küllastava seondumise katset käsitlevates punktides 20–23.
40. Kannusid H1–H6 (tabelis 4 tähistatud kui tühiproovid (radiomärgise jaoks)) kasutatakse 40 µl [³H]-ga märgistatud östradioli radioaktiivsuse määramiseks dpm-des. 40 µl suurused alikvoodid tuleks lisada otse kannudes H1–H6 olevasse stsintillatsioonivedelikku.

Katse nõuetekohasuse kriteeriumid

Küllastava seondumise katse

41. Spetsiifilise seondumise kõver peaks jõudma [³H]17β-östradioli kontsentratsiooni suurenedes platoole; see viitab hr-α-ERi küllastumisele ligandiga.
42. Spetsiifiline seondumine [³H]17β-östradioli kontsentratsioonil 1 nM peaks jääma vastuvõetavasse vahemikku 15–25 % eri analüüsitsüklites mõõdetud, lisatud radiomärgise kogusele vastava summaarse radioaktiivsuse näitajate keskvaartusest. Aeg-ajalt esinevad väikesed kõrvalekalded sellest vahemikust on lubatud, ent kui analüüsitsüklites saadud tulemused on pidevalt sellest vahemikust väljaspool või mõnes konkreetses analüüsitsüklis

saadud väärtus jääb sellest vahemikust väga kaugemale, tuleks valgu kontsentratsiooni kohandada ja küllastamiskatset korrata.

43. Andmed peaksid võimaldama saada lineaarse Scatchardi graafiku.
44. Mittespetsiifiline seondumine ei tohi olla liiga ulatuslik. Mittespetsiifilise seondumise määr on tavaliselt $< 35\%$ summaarse seondumise määrast. See suhtarv võib siiski olla aeg-ajalt suurem, kui mõõdetakse väga väikest dpm-des väljendatavat radioaktiivsust radiomärgistatud 17β -östradiooli väikseimal katses kasutataval kontsentratsioonil.

Konkureeriva seondumise katse

45. Märgistamata 17β -östradiool peaks kontsentratsiooni suurenedes tõrjuma $[^3\text{H}]17\beta$ -östradiooli retseptorilt välja viisil, mis vastab konkureerivale seondumisele ühes seondumiskohas.
46. Võrdlusöstrogeeni (st 17β -östradiooli) IC_{50} väärtus peaks olema ligikaudselt võrdne $[^3\text{H}]17\beta$ -östradiooli molaarse kontsentratsiooni ja küllastava seondumise katses määratud K_d summaga.
47. Spetsiifiline seondumine peaks järjepidevalt olema vastuvõetavas vahemikus $20 \pm 5\%$, kui igas kannus täheldatavale summaarsele radioaktiivsusele vastav lisatud radiomärgise keskmine mõõdetud kontsentratsioon on eri analüüsitsüklite lõikes 1 nM. Aeg-ajalt esinevad väikesed kõrvalekalded sellest vahemikust on lubatud, ent kui analüüsitsüklites saadud tulemused on pidevalt sellest vahemikust väljaspool või mõnes konkreetses analüüsitsüklis saadud väärtus jääb sellest vahemikust väga kaugemale, tuleks valgu kontsentratsiooni kohandada.
48. Lahusti ei tohiks mõjutada analüüsimeetodi tundlikkust ega tulemuste reprodutseeritavust. Lahustiga kontrolliga (SSi kannudega) saadud tulemusi võrreldakse puhvrikontrolliga saadud tulemustega, tõendamaks, et kasutatud lahusti ei mõjuta katsesüsteemi. Kui lahustil puudub mõju katsetulemustele, peaksid SSi proove ja puhvrikontrolli iseloomustavad tulemused olema võrreldavad.
49. Mitteseonduv aine ei tohiks tõrjuda hr- α -ERilt välja rohkem kui 25% $[^3\text{H}]17\beta$ -östradioolist, kui sellist ainet analüüsitakse kontsentratsioonil kuni 10^{-3} M (OTES) või 10^{-4} M (DBP).
50. Tulemuslikkuse kriteeriumide väljatöötamiseks võrdlusöstrogeeni ja kahe nõrgalt seonduva aine (nt noretünodreeli ja noretindrooni) jaoks on kasutatud hrERiga seondumist analüüsida võimaldava FW meetodi valideerimise uuringu andmeid (allikas 2, N lisa). Valideerimisuuringus osalenud laborites tehtud kõikide kontrollkatsete tulemuste puhul on keskvärtuse (n) $\pm$ SD kõrval esitatud ka usaldusvahemik usaldusnivool 95 %. Usaldusvahemik usaldusnivool 95 % on arvutatud võrdlusöstrogeeni ja nõrgalt seonduvaid aineid iseloomustavate lähenduskõvera parameetrite (st maksimumi, miinimumi, Hilli

tõusu, $\log IC_{50}$) jaoks ning võrdlusöstrogeeni suhtes väljendatava nõrgalt seonduvate ainete $\log_{10}$ RBA jaoks ning seda näitajat kasutatakse positiivsete kontrollide puhul tulemuslikkuse kriteeriumina. Tabelis 1 on esitatud tulemuslikkuse kriteeriumidena kasutatavate lähenduskõvera parameetrite eeldatavad väärtusevahemikud. Praktikas võib IC_{50} väärtuste vahemik retseptoripreparaadi K_d -st ja ligandi kontsentratsioonist sõltuvalt pisut varieeruda.

51. Uuritavate kemikaalide jaoks ei ole lähenduskõvera parameetreid käsitlevaid tulemuslikkuse kriteeriume kindlaks määratud, kuna olemasolevate võimalike uuritavate kemikaalide hulk on lai ning nende võimalik afiinsus ja saadavad tulemused varieeruvad (nt täielik kõver, osaline kõver, sobiva kõvera puudumine). Uuritava kemikaaliga igas analüüsitsükli saadud tulemuste hindamisel tuleks siiski lähtuda eksperdihinnangust. Tuleks kasutada piisavalt suurt uuritava kemikaali kontsentratsioonide vahemikku, et konkureeriva seondumise kõvera ülemine osa (nt osa, kus seondumine on 90–100 %) selgelt välja joonistuks. Paralleelproovide vaheline varieeruvus igal uuritava kemikaali kontsentratsioonil ja kolme järjestikuse analüüsitsükli vaheline varieeruvus peaks olema mõõdukas ja teaduslikult põhjendatav. Uuritava kemikaali hindamisel peaksid kontrollidega saadud tulemused igas analüüsitsükli ligilähedaselt vastama FW meetodit iseloomustavatele tulemusnäitajatele ja olema kooskõlas asjaomases laboris kontrollidega varem saadud tulemustega.

ANDMEANALÜÜS

Küllastava seondumise katse

52. Mõõdetakse nii summaarset kui ka mittespetsiifilist seondumist. Nende väärtuste põhjal arvutatakse üha suuremas kontsentratsioonis esineva $[^3H]17\beta$ -östradioli spetsiifilise seondumise näitaja tasakaalutingimustes; selleks lahutatakse summaarse seondumise näitajast mittespetsiifilise seondumise näitaja. $[^3H]17\beta$ -östradioli kontsentratsioonist sõltuva spetsiifilise seondumise kõver peaks jõudma platoole, kus $[^3H]17\beta$ -östradioli spetsiifiline seondumine on $hr\text{-}\alpha\text{-ERi}$ küllastumisest tulenevalt maksimaalne. Lisaks peaks andmeanalüüsist nähtuma $[^3H]17\beta$ -östradioli seondumine ühteainsasse suure afiinsusega seondumiskohta. Küllastava seondumise graafikul peaks olema näidatud mittespetsiifiline, summaarne ja spetsiifiline seondumine. Järgnevas andmeanalüüsis tuleks kasutada mittelineaarset regressiooni (nt BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) ja andmed tuleks lõplikul kujul esitada Scatchardi graafikul.
53. Andmeanalüüsi käigus tuleks määrata B_{max} ja K_d üksnes summaarse seondumise andmete põhjal ning lähtuda seejuures eeldusest, et mittespetsiifiline seondumine on lineaarne, v.a juhul, kui esitatakse põhjendus teistsuguse meetodi kasutamise kohta. Lisaks tuleks parima lähenduskõvera leidmiseks kasutada robustset regressioonianalüüsi, v.a juhul, kui esitatakse põhjendus muu lähenemisviisi kasutamise kohta. Tuleks märkida, millist robustse regressioonianalüüsi meetodit kasutatakse. Küllastava seondumise andmete alusel B_{max} -i ja

K_d määramisel tuleks andmeid alati korrigeerida ligandi väljatõrjumise suhtes (nt meetodi abil, mida on kirjeldanud Swillens (1995)).

Konkureeriva seondumise katse

54. Konkureeriva seondumise kõver esitatakse graafikul nii, et ühel teljel on [^3H]17 β -östradioli spetsiifiline seondumine ja teisel konkureeriva aine kontsentratsioon ($\log_{10}$ -ühikutes). Uuritava kemikaali kontsentratsioon, mille juures [^3H]17 β -östradioli spetsiifiline seondumine on 50 % maksimummäärast, on IC_{50} väärtus.
55. Positiivsete kontrollide (nt võrdlusöstrogeeni ja nõrgalt seonduva aine) $\log \text{IC}_{50}$ hinnanguliste väärtuste kindlakstegemiseks tuleks kasutada sobivat mittelineaarse kõvera lähendamise tarkvara, milles rakendatakse neljaparameetrilist Hilli võrrandit (nt BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). Kõnealuste kõverate lähendamisel tuleks kõvera ülemine ja alumine osa, tõus ja $\log \text{IC}_{50}$ üldjuhul jätta piiritlemata. Parima lähenduskõvera leidmiseks tuleks kasutada robustset regressioonianalüüsi, v.a juhul, kui esitatakse põhjendus muu lähenemisviisi kasutamise kohta. Andmeid ei tohiks korrigeerida ligandi väljatõrjumise suhtes. Pärast esmast analüüsi tuleks iga seondumiskõver üle vaadata, et veenduda mudeli ja andmete omavahelises sobivuses. Nõrgalt seonduva aine suhtelise seondumisafiinsuse (RBA) leidmiseks tuleks arvutada nõrgalt seonduva aine $\log \text{IC}_{50}$ väärtuse protsentuaalne osakaal 17 β -östradioli $\log \text{IC}_{50}$ väärtusest. Positiivsete kontrollidega ja mitteseonduval ainel põhineva kontrolliga saadud tulemusi tuleks hinnata lähtuvalt käesoleva 2. liite punktide 45–50 kohastest katsemeetodi tulemuslikkuse näitajatest.
56. Kõigi uuritavate kemikaalide andmete analüüsimisel tuleks kasutada astmelist lähenemist, et tagada andmete asjakohane analüüs ja kõigi konkureeriva seondumise kõverate nõuetekohane liigitamine. Soovitavalt tuleks uuritava kemikaaliga läbi viidud iga analüüsitsükli puhul esmalt rakendada täpselt sama standardiseeritud andmeanalüüsi, mida kasutatakse võrdlusöstrogeenil ja nõrgalt seonduval ainel põhinevate kontrollide puhul (vt eespool punkt 55). Pärast esmast analüüsi tuleks iga analüüsitsükli puhul teha lähenduskõvera parameetrite tehniline kontroll ja visuaalselt hinnata, kui hästi sobituvad seondumisandmed saadud konkureeriva seondumise kõveraga. Tehnilise kontrolli käigus täheldatav kontsentratsioonist sõltuv [^3H]17 β -östradioli spetsiifilise seondumise protsentuaalse määra vähenemine, tehniliste paralleelproovide andmete vaheline väike varieeruvus kemikaali kõigil kontsentratsioonidel ja lähenduskõvera parameetrite sarnased väärtused kolmes analüüsitsükli viitavad sellele, et katse ja andmeanalüüs on läbi viidud nõuetekohaselt.

Andmete tõlgendamine

57. Kui kõik nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, loetakse uuritav kemikaal hr- α -ERiga seonduvaks, kui seondumiskõver sobitub andmetega ja katseandmete vahemikku jäävale sõltuvuskõvera madalaimale punktile vastav väärtus on väiksem kui 50 % (joonis 1).

58. Kui kõik nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, loetakse uuritav kemikaal hr- α -ERiga mitteseonduvaks, kui:

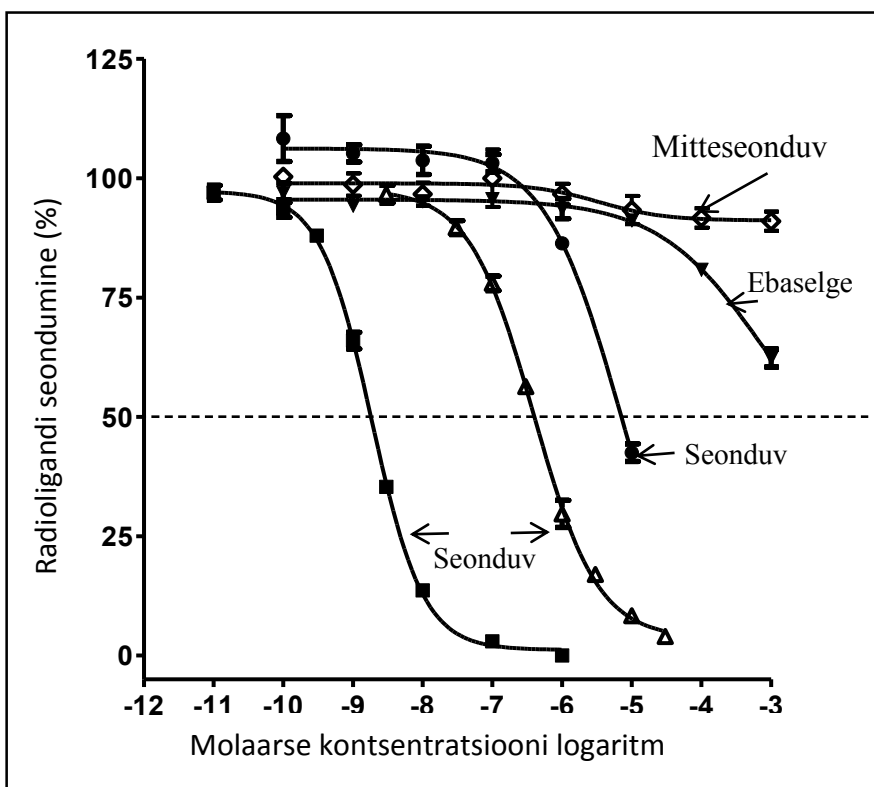
- seondumiskõver sobitub andmetega ja katseandmete vahemikku jäävale lähendatud sõltuvuskõvera madalaimale punktile vastav väärtus on suurem kui 75 % või
- sobiv seondumiskõver puudub ja väikseim silumata keskmine seondumisprotsent eri kontsentratsioonidel saadud andmete hulgas on suurem kui 75 %.

59. Kui ükski eespool kirjeldatud tingimus ei ole täidetud (nt lähendatud sõltuvuskõvera madalaimale punktile vastav väärtus on vahemikus 75–50 %), liigitatakse uuritav kemikaal ebaselgeks.

Tabel 7. Uuritava kemikaali konkureeriva seondumise kõveral põhinevad liigitamiskriteeriumid

Liigitus	Kriteeriumid
Seonduv ^a	Seondumiskõver sobitub andmetega. Katseandmete vahemikku jäävale sõltuvuskõvera madalaimale punktile vastav väärtus on väiksem kui 50 %.
Mitteseonduv ^b	Seondumiskõvera sobitumisel andmetega on katseandmete vahemikku jäävale lähendatud sõltuvuskõvera madalaimale punktile vastav väärtus suurem kui 75 %. Sobiva seondumiskõvera puudumisel on väikseim silumata keskmine seondumisprotsent eri kontsentratsioonidel saadud andmete hulgas suurem kui 75 %.
Ebaselge ^c	Ükskõik millises nõuetekohases analüüsisüklis saadud tulemus, mille alusel ei saa uuritavat kemikaali liigitada seonduvaks aineks ega mitteseonduvaks aineks (näiteks vastab lähendatud sõltuvuskõvera madalaim punkt väärtusele 75–50 %).

Joonis 1. Näited uuritava kemikaali liigitamise kohta konkureeriva seondumise kõvera alusel



60. Samas laboris uuritava kemikaaliga läbi viidud mitme analüüsitsükli tulemuste kokkuvõtmiseks omistatakse iga analüüsitsükli tulemusele arvvärtus ja leitakse nende arvvärtuste keskmine, nagu on kirjeldatud tabelis 8. Igas laboris analüüsitsükli tulemuste koondamisel saadud tulemust võrreldakse iga uuritava kemikaali puhul eeldatava liigitamistulemusega.

Tabel 8. Meetod uuritava kemikaali liigitamiseks samas laboris läbi viidud mitme analüüsitsükli alusel

Iga analüüsitsükli tulemusele väärtuse omistamine	
Liigitus	Arvväärtus
Seonduv	2
Ebaselge	1
Mitteseonduv	0
Liigitamine eri analüüsitsükli saadud arvvärtuste keskmise alusel	
Liigitus	Arvväärtus
Seonduv	Keskmine $\geq 1,5$
Ebaselge	$0,5 \leq \text{keskmine} < 1,5$
Mitteseonduv	Keskmine $< 0,5$

KATSEPROTOKOLL

61. Vt käesoleva katsemeetodi punkt 24 peatükis „**hrER-GA SEONDUMISE KATSE
ELEMENDID**“.

Liide 2.1

MÕISTETE LOETELU

[³H]E2 – triitiumiga radiomärgistatud 17β-östradiool.

Analüüsipuhver – 10 mM Tris, veise seerumi albumiin kontsentratsioonis 10 mg/ml, 2 mM DTT, 10 % glütserooli, 0,2 mM leupeptiin, pH 7,5.

Analüüsitsükkel – mikrotiiterplaadi katsekannude täieliku komplekti üheaegne analüüs, mille tulemusena saadakse kogu vajalik teave uuritava kemikaali ja hr-α-ERi omavahelise seondumise iseloomustamiseks (nimelt katsekannu lisatud [³H]17β-östradioli üldkogus, [³H]17β-östradioli maksimaalne seondumismäär hr-α-ERiga seondumisel, mittespetsiifilise seondumise määr ja summaarse seondumise määr uuritava kemikaali eri kontsentratsioonidel). Analüüsitsükkelis võidakse igal kontsentratsioonil kasutada ka ainult ühte katsekannu (st paralleeli), ent kuna käesolevas katse-eeskirjas nõutakse kolme paralleelproovi kasutamist, analüüsitakse käesoleval juhul ühes analüüsitsükkelis iga kontsentratsiooni puhul kolme katsekannu. Peale selle viiakse käesoleva katse-eeskirja kohaselt iga kemikaaliga läbi kolm iseseisvat (st järjestikust) analüüsitsükli.

DCC – dekstraaniga kaetud süsi.

E2 – märgistamata 17β-östradiool (inertne).

hr-α-ER – rekombinantne inimese α-östrogeeniretseptor.

Paralleelproov – üks mitmest kannust, mis sisaldavad samu koostisaineid samas kontsentratsioonis ning mida analüüsitakse üheaegselt samas analüüsitsükkelis. Käesoleva katse-eeskirja puhul analüüsitakse uuritavat kemikaali igal kontsentratsioonil kolmes paralleelis, st igal uuritava kemikaali kontsentratsioonil analüüsitakse üheaegselt kolme paralleelproovi.

Liide 2.2

TAVAPÄRANE [³H]17β-ÖSTRADIOOLIGA KÜLLASTAMISE KATSE KOLME PARALLEELKANNUGA

Tavapärane [³ H]17β-östradiooliga küllastamise katse kolme paralleelkannuga												
Asukoht	Paralleelproov	Kannuliigi kood	Radioaktiivse E2 algkontsentratatsioon (nM)	Radioaktiivse E2 kogus (µl)	Radioaktiivse E2 lõppkontsentratatsioon (nM)	Märgistamata E2 algkontsentratatsioon (nM)	Märgistamata E2 kogus (µl)	Märgistamata E2 lõppkontsentratatsioon (nM)	Märgistamata E2 kogus (µl)	Puhvri kogus (µl)	Retseptori kogus (µl)	Üldkogus kannus (µl)
A1	1	R	0,12	40	0,03	—	—	—	—	80	40	160
A2	2	R	0,12	40	0,03	—	—	—	—	80	40	160
A3	3	R	0,12	40	0,03	—	—	—	—	80	40	160
A4	1	R	0,24	40	0,06	—	—	—	—	80	40	160
A5	2	R	0,24	40	0,06	—	—	—	—	80	40	160
A6	3	R	0,24	40	0,06	—	—	—	—	80	40	160
A7	1	R	0,32	40	0,08	—	—	—	—	80	40	160
A8	2	R	0,32	40	0,08	—	—	—	—	80	40	160
A9	3	R	0,32	40	0,08	—	—	—	—	80	40	160
A10	1	R	0,40	40	0,10	—	—	—	—	80	40	160
A11	2	R	0,40	40	0,10	—	—	—	—	80	40	160
A12	3	R	0,40	40	0,10	—	—	—	—	80	40	160
B1	1	R	1,20	40	0,30	—	—	—	—	80	40	160
B2	2	R	1,20	40	0,30	—	—	—	—	80	40	160
B3	3	R	1,20	40	0,30	—	—	—	—	80	40	160
B4	1	R	2,40	40	0,60	—	—	—	—	80	40	160
B5	2	R	2,40	40	0,60	—	—	—	—	80	40	160
B6	3	R	2,40	40	0,60	—	—	—	—	80	40	160
B7	1	R	4,00	40	1,00	—	—	—	—	80	40	160
B8	2	R	4,00	40	1,00	—	—	—	—	80	40	160
B9	3	R	4,00	40	1,00	—	—	—	—	80	40	160
B10	1	R	12,00	40	3,00	—	—	—	—	80	40	160
B11	2	R	12,00	40	3,00	—	—	—	—	80	40	160
B12	3	R	12,00	40	3,00	—	—	—	—	80	40	160
D1	1	RM	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	—	40	160
D2	2	RM	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	—	40	160
D3	3	RM	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	—	40	160
D4	1	RM	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	—	40	160
D5	2	RM	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	—	40	160
D6	3	RM	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	—	40	160
D7	1	RM	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	—	40	160
D8	2	RM	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	—	40	160
D9	3	RM	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	—	40	160
D10	1	RM	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	—	40	160
D11	2	RM	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	—	40	160
D12	3	RM	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	—	40	160

Tavapärane [³ H]17β-östradiooliga küllastamise katse kolme paralleelkannuga											
Asukoht	Paralleelproov	Kannuliigi kood	Radioaktiivse E2 algkontsentratsioon (nM)	Radioaktiivse E2 kogus (μl)	Radioaktiivse E2 lõppkontsentratsioon (nM)	Märgistamata E2 algkontsentratsioon (nM)	Märgistamata E2 kogus (μl)	Märgistamata E2 lõppkontsentratsioon (μM)	Puhvri kogus (μl)	Retseptori kogus (μl)	Üldkogus kannus (μl)
E1	1	RM	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E2	2	RM	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E3	3	RM	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E4	1	RM	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E5	2	RM	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E6	3	RM	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E7	1	RM	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E8	2	RM	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E9	3	RM	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E10	1	RM	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E11	2	RM	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E12	3	RM	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
G1	1	Radiomärgis	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G2	2	Radiomärgis	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G3	3	Radiomärgis	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G4	1	Radiomärgis	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G5	2	Radiomärgis	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G6	3	Radiomärgis	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G7	1	Radiomärgis	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G8	2	Radiomärgis	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G9	3	Radiomärgis	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G10	1	Radiomärgis	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G11	2	Radiomärgis	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G12	3	Radiomärgis	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
H1	1	Radiomärgis	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H2	2	Radiomärgis	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H3	3	Radiomärgis	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H4	1	Radiomärgis	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H5	2	Radiomärgis	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H6	3	Radiomärgis	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H7	1	Radiomärgis	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H8	2	Radiomärgis	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H9	3	Radiomärgis	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H10	1	Radiomärgis	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H11	2	Radiomärgis	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H12	3	Radiomärgis	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40

Tuleb silmas pidades, et kannud tähisega „Radiomärgis“ on inkubeerimise ajal tühjad. Ettenähtud 40 μl lisatakse ainult stsintillatsioonide loendamiseks.

Liide 2.3: konkureeriva seondumise katses kasutatav mikrotiiterplaadi skeem

Plaat	Asukoht	Paralleelproov	Kannu liik	Kannu kood	Kontsentratsiooni kood	Konkureeriva aine algkontsentratsioon (M)	hRERi põhilahus (µl)	Puhvri kogus (µl)	Margise (radioaktiivse E2) kogus (µl)	Lahjendusplaadilt lisatav kogus (µl)	Lõppruumala (µl)	Konkureeriva aine lõppkontsentratsioon (M)
S	A1	1	Summaarne	SS	SS1	-	40	-	40	80	160	-
S	A2	2	Summaarne seondumine	SS	SS2	-	40	-	40	80	160	-
S	A3	3	Summaarne	SS	SS3	-	40	-	40	80	160	-
S	A4	1	Summaarne	SS	SS4	-	40	-	40	80	160	-
S	A5	2	Summaarne	SS	SS5	-	40	-	40	80	160	-
S	A6	3	Summaarne	SS	SS6	-	40	-	40	80	160	-
S	A7	1	Märgistamata E2	MSS	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	A8	2	Märgistamata E2	MSS	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	A9	3	Märgistamata E2	MSS	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	A10	1	Märgistamata E2	MSS	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	A11	2	Märgistamata E2	MSS	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	A12	3	Märgistamata E2	MSS	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	B1	1	Märgistamata E2	S	S1	2,00E-07	40	-	40	80	160	1,0E-07
S	B2	2	Märgistamata E2	S	S1	2,00E-07	40	-	40	80	160	1,0E-07
S	B3	3	Märgistamata E2	S	S1	2,00E-07	40	-	40	80	160	1,0E-07
S	B4	1	Märgistamata E2	S	S2	2,00E-08	40	-	40	80	160	1,0E-08
S	B5	2	Märgistamata E2	S	S2	2,00E-08	40	-	40	80	160	1,0E-08
S	B6	3	Märgistamata E2	S	S2	2,00E-08	40	-	40	80	160	1,0E-08
S	B7	1	Märgistamata E2	S	S3	6,00E-09	40	-	40	80	160	3,0E-09
S	B8	2	Märgistamata E2	S	S3	6,00E-09	40	-	40	80	160	3,0E-09
S	B9	3	Märgistamata E2	S	S3	6,00E-09	40	-	40	80	160	3,0E-09
S	B10	1	Märgistamata E2	S	S4	2,00E-09	40	-	40	80	160	1,0E-09
S	B11	2	Märgistamata E2	S	S4	2,00E-09	40	-	40	80	160	1,0E-09
S	B12	3	Märgistamata E2	S	S4	2,00E-09	40	-	40	80	160	1,0E-09
S	C1	1	Märgistamata E2	S	S5	6,00E-10	40	-	40	80	160	3,0E-10
S	C2	2	Märgistamata E2	S	S5	6,00E-10	40	-	40	80	160	3,0E-10
S	C3	3	Märgistamata E2	S	S5	6,00E-10	40	-	40	80	160	3,0E-10
S	C4	1	Märgistamata E2	S	S6	2,00E-10	40	-	40	80	160	1,0E-10
S	C5	2	Märgistamata E2	S	S6	2,00E-10	40	-	40	80	160	1,0E-10
S	C6	3	Märgistamata E2	S	S6	2,00E-10	40	-	40	80	160	1,0E-10
S	C7	1	Märgistamata E2	S	S7	2,00E-11	40	-	40	80	160	1,0E-11
S	C8	2	Märgistamata E2	S	S7	2,00E-11	40	-	40	80	160	1,0E-11
S	C9	3	Märgistamata E2	S	S7	2,00E-11	40	-	40	80	160	1,0E-11
S	C10	1	Tühiproov	Tühiproov	T1	-	-	160	-	-	160	-
S	C11	2	Tühiproov	Tühiproov	T2	-	-	160	-	-	160	-
S	C12	3	Tühiproov	Tühiproov	T3	-	-	160	-	-	160	-
S	D1	1	Noretünodreel	NE	WP1	6,00E-05	40	-	40	80	160	3,0E-05
S	D2	1	Noretünodreel	NE	WP1	6,00E-05	40	-	40	80	160	3,0E-05
S	D3	1	Noretünodreel	NE	WP1	6,00E-05	40	-	40	80	160	3,0E-05
S	D4	1	Noretünodreel	NE	WP2	2,00E-05	40	-	40	80	160	1,0E-05
S	D5	1	Noretünodreel	NE	WP2	2,00E-05	40	-	40	80	160	1,0E-05
S	D6	1	Noretünodreel	NE	WP2	2,00E-05	40	-	40	80	160	1,0E-05
S	D7	1	Noretünodreel	NE	WP3	6,00E-06	40	-	40	80	160	3,0E-06
S	D8	1	Noretünodreel	NE	WP3	6,00E-06	40	-	40	80	160	3,0E-06
S	D9	1	Noretünodreel	NE	WP3	6,00E-06	40	-	40	80	160	3,0E-06
S	D10	1	Noretünodreel	NE	WP4	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	D11	1	Noretünodreel	NE	WP4	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	D12	1	Noretünodreel	NE	WP4	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06

Konkureeriva seondumise katses kasutatav mikrotiiterplaadi skeem												
Plaat	Asukoht	Paralleelproov	Kannu liik	Kannu kood	Kontsentratsioonikood	Konkureeriva aine algkontsentratsioon (M)	hr-ERi põhilahus (μl)	Puhvri kogus (μl)	Margise (radioaktiivse E2) kogus (μl)	Lahjendusplaadil lisatav kogus (μl)	Lõppruumala (μl)	Konkureeriva aine lõppkontsentratsioon (M)
S	E1	1	Noretünodreel	NE	WP	6,00E-07	40	-	40	80	160	3,0E-07
S	E2	2	Noretünodreel	NE	WP	6,00E-07	40	-	40	80	160	3,0E-07
S	E3	3	Noretünodreel	NE	WP	6,00E-07	40	-	40	80	160	3,0E-07
S	E4	1	Noretünodreel	NE	WP	2,00E-07	40	-	40	80	160	1,0E-07
S	E5	2	Noretünodreel	NE	WP	2,00E-07	40	-	40	80	160	1,0E-07
S	E6	3	Noretünodreel	NE	WP	2,00E-07	40	-	40	80	160	1,0E-07
S	E7	1	Noretünodreel	NE	WP	6,00E-08	40	-	40	80	160	3,0E-08
S	E8	2	Noretünodreel	NE	WP	6,00E-08	40	-	40	80	160	3,0E-08
S	E9	3	Noretünodreel	NE	WP	6,00E-08	40	-	40	80	160	3,0E-08
S	E10	1	Noretünodreel	NE	WP	6,00E-09	40	-	40	80	160	3,0E-09
S	E11	2	Noretünodreel	NE	WP	6,00E-09	40	-	40	80	160	3,0E-09
S	E12	3	Noretünodreel	NE	WP	6,00E-09	40	-	40	80	160	3,0E-09
S	F1	1	OTES	N	OTES	2,00E-03	40	-	40	80	160	1,0E-03
S	F2	2	OTES	N	OTES	2,00E-03	40	-	40	80	160	1,0E-03
S	F3	3	OTES	N	OTES	2,00E-03	40	-	40	80	160	1,0E-03
S	F4	1	OTES	N	OTES	2,00E-04	40	-	40	80	160	1,0E-04
S	F5	2	OTES	N	OTES	2,00E-04	40	-	40	80	160	1,0E-04
S	F6	3	OTES	N	OTES	2,00E-04	40	-	40	80	160	1,0E-04
S	F7	1	OTES	N	OTES	2,00E-05	40	-	40	80	160	3,0E-05
S	F8	2	OTES	N	OTES	2,00E-05	40	-	40	80	160	3,0E-05
S	F9	3	OTES	N	OTES	2,00E-05	40	-	40	80	160	3,0E-05
S	F10	1	OTES	N	OTES	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	F11	2	OTES	N	OTES	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	F12	3	OTES	N	OTES	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	G1	1	OTES	N	OTES	2,00E-07	40	-	40	80	160	3,0E-07
S	G2	2	OTES	N	OTES	2,00E-07	40	-	40	80	160	3,0E-07
S	G3	3	OTES	N	OTES	2,00E-07	40	-	40	80	160	3,0E-07
S	G4	1	OTES	N	OTES	2,00E-08	40	-	40	80	160	1,0E-08
S	G5	2	OTES	N	OTES	2,00E-08	40	-	40	80	160	1,0E-08
S	G6	3	OTES	N	OTES	2,00E-08	40	-	40	80	160	1,0E-08
S	G7	1	OTES	N	OTES	2,00E-09	40	-	40	80	160	1,0E-09
S	G8	2	OTES	N	OTES	2,00E-09	40	-	40	80	160	1,0E-09
S	G9	3	OTES	N	OTES	2,00E-09	40	-	40	80	160	1,0E-09
S	G10	1	OTES	N	OTES	2,00E-10	40	-	40	-	160	1,0E-10
S	G11	2	OTES	N	OTES	2,00E-10	40	-	40	-	160	1,0E-10
S	G12	3	OTES	N	OTES	2,00E-10	40	-	40	-	160	1,0E-10
S	H1	1	Radiomärgis	R	R	-	-	-	40	-	40	-
S	H2	1	Radiomärgis	R	R	-	-	-	40	-	40	-
S	H3	1	Radiomärgis	R	R	-	-	-	40	-	40	-
S	H4	1	Radiomärgis	R	R	-	-	-	40	-	40	-
S	H5	1	Radiomärgis	R	R	-	-	-	40	-	40	-
S	H6	1	Radiomärgis	R	R	-	-	-	40	-	40	-
S	H7	1	Puhvrikontroll	PK	PK	-	40	80	40	-	160	-
S	H8	1	Puhvrikontroll	PK	PK	-	40	80	40	-	160	-
S	H9	1	Puhvrikontroll	PK	PK	-	40	80	40	-	160	-
S	H10	1	Puhvrikontroll	PK	PK	-	40	80	40	-	160	-
S	H11	1	Puhvrikontroll	PK	PK	-	40	80	40	-	160	-
S	H12	1	Puhvrikontroll	PK	PK	-	40	80	40	-	160	-

Tuleb silmas pida, et kannud tähisega „Radiomärgis“ on inkubeerimise ajal tühjad. Ettenähtud 40 μl lisatakse ainult stsintillatsioonide loendamiseks.

Konkureeriva seondumise katses kasutatav mikrotiiterplaadi skeem													
Plaat	Asukoht	Paralleelproov	Kannu liik	Kannu kood	Kontsentratsioonikood	Konkureeriva aine algkontsentratsioon (M)	hErEi põhilahus (µl)	Puhvri kogus (µl)	Märgise (radioaktiivse E2) kogus (µl)	Ette lisatav kogus (µl)	Lõppruumala (µl)	Konkureeriva aine lõppkontsentratsioon (M)	
P1	A1	1	Summaarne	SS	SS1	-	40	-	40	80	160	-	
P1	A2	2	Summaarne	SS	SS2	-	40	-	40	80	160	-	
P1	A3	3	Summaarne	SS	SS3	-	40	-	40	80	160	-	
P1	A4	1	Summaarne	SS	SS4	-	40	-	40	80	160	-	
P1	A5	2	Summaarne	SS	SS5	-	40	-	40	80	160	-	
P1	A6	3	Summaarne	SS	SS6	-	40	-	40	80	160	-	
P1	A7	1	Märgistamata E2	MSS	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06	
P1	A8	2	Märgistamata E2	MSS	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06	
P1	A9	3	Märgistamata E2	MSS	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06	
P1	A10	1	Märgistamata E2	MSS	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06	
P1	A11	2	Märgistamata E2	MSS	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06	
P1	A12	3	Märgistamata E2	MSS	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06	
P1	B1	1	Uuritav kemikaal	UK1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03	
P1	B2	2	Uuritav kemikaal	UK1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03	
P1	B3	3	Uuritav kemikaal	UK1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03	
P1	B4	1	Uuritav kemikaal	UK1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04	
P1	B5	2	Uuritav kemikaal	UK1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04	
P1	B6	3	Uuritav kemikaal	UK1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04	
P1	B7	1	Uuritav kemikaal	UK1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05	
P1	B8	2	Uuritav kemikaal	UK1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05	
P1	B9	3	Uuritav kemikaal	UK1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05	
P1	B10	1	Uuritav kemikaal	UK1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06	
P1	B11	2	Uuritav kemikaal	UK1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06	
P1	B12	3	Uuritav kemikaal	UK1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06	
P1	C1	1	Uuritav kemikaal	UK1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07	
P1	C2	2	Uuritav kemikaal	UK1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07	
P1	C3	3	Uuritav kemikaal	UK1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07	
P1	C4	1	Uuritav kemikaal	UK1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08	
P1	C5	2	Uuritav kemikaal	UK1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08	
P1	C6	3	Uuritav kemikaal	UK1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08	
P1	C7	1	Uuritav kemikaal	UK1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09	
P1	C8	2	Uuritav kemikaal	UK1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09	
P1	C9	3	Uuritav kemikaal	UK1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09	
P1	C10	1	Uuritav kemikaal	UK1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10	
P1	C11	2	Uuritav kemikaal	UK1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10	
P1	C12	3	Uuritav kemikaal	UK1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10	
P1	D1	1	Uuritav kemikaal	UK2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03	
P1	D2	2	Uuritav kemikaal	UK2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03	
P1	D3	3	Uuritav kemikaal	UK2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03	
P1	D4	1	Uuritav kemikaal	UK2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04	
P1	D5	2	Uuritav kemikaal	UK2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04	
P1	D6	3	Uuritav kemikaal	UK2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04	
P1	D7	1	Uuritav kemikaal	UK2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05	
P1	D8	2	Uuritav kemikaal	UK2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05	
P1	D9	3	Uuritav kemikaal	UK2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05	
P1	D10	1	Uuritav kemikaal	UK2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06	
P1	D11	2	Uuritav kemikaal	UK2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06	
P1	D12	3	Uuritav kemikaal	UK2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06	
P1	E1	1	Uuritav kemikaal	UK2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07	
P1	E2	2	Uuritav kemikaal	UK2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07	
P1	E3	3	Uuritav kemikaal	UK2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07	

Konkureeriva seondumise katses kasutatav mikrotiiterplaadi skeem											
Plaat	Asukoht	Paralleelproov	Kannu liik	Kannu kood	Kontsentratsioon i kood	Konkureeriva aine algkontsentratsioon (M)	hrERI põhilahus (µl)	Puhvri kogus (µl)	Märgise (radioaktiivse Et ³² kogus) (µl)	Lõppruumala (µl)	Konkureeriva aine lõppkontsentratsioon (M)
P1	E4	1	Uuritav kemikaal nr UK2	UK2	6	-	40	0	40	80	1,0E-08
P1	E5	2	Uuritav kemikaal nr UK2	UK2	6	-	40	0	40	80	1,0E-08
P1	E6	3	Uuritav kemikaal nr UK2	UK2	6	-	40	0	40	80	1,0E-08
P1	E7	1	Uuritav kemikaal nr UK2	UK2	7	2,00E-06	40	0	40	80	1,0E-09
P1	E8	2	Uuritav kemikaal nr UK2	UK2	7	2,00E-06	40	0	40	80	1,0E-09
P1	E9	3	Uuritav kemikaal nr UK2	UK2	7	2,00E-06	40	0	40	80	1,0E-09
P1	E10	1	Uuritav kemikaal nr UK2	UK2	8	2,00E-06	40	0	40	80	1,0E-10
P1	E11	2	Uuritav kemikaal nr UK2	UK2	8	2,00E-06	40	0	40	80	1,0E-10
P1	E12	3	Uuritav kemikaal nr UK2	UK2	8	2,00E-06	40	0	40	80	1,0E-10
P1	F1	1	Uuritav kemikaal nr UK3	UK3	1	2,00E-03	40	0	40	80	1,0E-03
P1	F2	2	Uuritav kemikaal nr UK3	UK3	1	2,00E-03	40	0	40	80	1,0E-03
P1	F3	3	Uuritav kemikaal nr UK3	UK3	1	2,00E-03	40	0	40	80	1,0E-03
P1	F4	1	Uuritav kemikaal nr UK3	UK3	2	2,00E-04	40	0	40	80	1,0E-04
P1	F5	2	Uuritav kemikaal nr UK3	UK3	2	2,00E-04	40	0	40	80	1,0E-04
P1	F6	3	Uuritav kemikaal nr UK3	UK3	2	2,00E-04	40	0	40	80	1,0E-04
P1	F7	1	Uuritav kemikaal nr UK3	UK3	3	2,00E-05	40	0	40	80	1,0E-05
P1	F8	2	Uuritav kemikaal nr UK3	UK3	3	2,00E-05	40	0	40	80	1,0E-05
P1	F9	3	Uuritav kemikaal nr UK3	UK3	3	2,00E-05	40	0	40	80	1,0E-05
P1	F10	1	Uuritav kemikaal nr UK3	UK3	4	2,00E-06	40	0	40	80	1,0E-06
P1	F11	2	Uuritav kemikaal nr UK3	UK3	4	2,00E-06	40	0	40	80	1,0E-06
P1	F12	3	Uuritav kemikaal nr UK3	UK3	4	2,00E-06	40	0	40	80	1,0E-06
P1	G1	1	Uuritav kemikaal nr UK3	UK3	5	2,00E-07	40	0	40	80	1,0E-07
P1	G2	2	Uuritav kemikaal nr UK3	UK3	5	2,00E-07	40	0	40	80	1,0E-07
P1	G3	3	Uuritav kemikaal nr UK3	UK3	5	2,00E-07	40	0	40	80	1,0E-07
P1	G4	1	Uuritav kemikaal nr UK3	UK3	6	2,00E-08	40	0	40	80	1,0E-08
P1	G5	2	Uuritav kemikaal nr UK3	UK3	6	2,00E-08	40	0	40	80	1,0E-08
P1	G6	3	Uuritav kemikaal nr UK3	UK3	6	2,00E-08	40	0	40	80	1,0E-08
P1	G7	1	Uuritav kemikaal nr UK3	UK3	7	2,00E-09	40	0	40	80	1,0E-09
P1	G8	2	Uuritav kemikaal nr UK3	UK3	7	2,00E-09	40	0	40	80	1,0E-09
P1	G9	3	Uuritav kemikaal nr UK3	UK3	7	2,00E-09	40	0	40	80	1,0E-09
P1	G10	1	Uuritav kemikaal nr UK3	UK3	8	2,00E-10	40	0	40	80	1,0E-10
P1	G11	2	Uuritav kemikaal nr UK3	UK3	8	2,00E-10	40	0	40	80	1,0E-10
P1	G12	3	Uuritav kemikaal nr UK3	UK3	8	2,00E-10	40	0	40	80	1,0E-10
P1	H1	1	Noretünodreel	NE	IC ₅₀		40	0	40	80	160
P1	H2	2	Noretünodreel	NE	IC ₅₀		40	0	40	80	160
P1	H3	3	Noretünodreel	NE	IC ₅₀		40	0	40	80	160
P1	H4	1	Noretünodreel	NE	1,00E-4,5		40	0	40	80	160
P1	H5	2	Noretünodreel	NE	1,00E-4,5		40	0	40	80	160
P1	H6	3	Noretünodreel	NE	1,00E-4,5		40	0	40	80	160
P1	H7	1	Märgistamata E2	S	IC ₅₀		40	0	40	80	160
P1	H8	2	Märgistamata E2	S	IC ₅₀		40	0	40	80	160
P1	H9	3	Märgistamata E2	S	IC ₅₀		40	0	40	80	160
P1	H10	1	Märgistamata E2	S	1,00E-7		40	0	40	80	160
P1	H11	2	Märgistamata E2	S	1,00E-7		40	0	40	80	160
P1	H12	3	Märgistamata E2	S	1,00E-7		40	0	40	80	160

3. liide

LIGANDIGA SEONDUVAL REKOMBINANTSEL INIMESE α -ER-I VALGUDOMEENIL PÕHINEV JAAPANI KEMIKAALIDE HINDAMISE JA UURIMISE INSTITUUDI (CERI) *IN VITRO* MEETOD ÖSTROGEENIRETSEPTORIGA SEONDUMISE ANALÜÜSIMISEKS

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD (VT KA ÜLDINE SISSEJUHATUS)

1. Käesoleva östrogeeniretseptoril (α -ER) põhineva, küllastava ja konkureeriva seondumise analüüsimist võimaldava *in vitro* meetodi puhul kasutatakse inimese α -ERi (hr- α -ER) ligandiga seonduvat domeeni (LBD). See valgukonstrukt on toodetud Jaapani Kemikaalide Hindamise ja Uurimise Instituudis (CERI) ja seda ekspresseeritakse glutatiooni S-transferaasiga (GST) ühendatud liitvalguna bakteris *E. coli*. CERI katse-eeskirja on hinnatud rahvusvahelises mitme labori osalusel läbi viidud valideerimisuuringus (2), mille käigus tõendati, et see analüüsimeetod on kavandatud kasutuseesmärgi puhul asjakohane ja usaldusväärne.
2. Käesolev meetod on rakendatav sõeluuringu jaoks, mille eesmärk on tuvastada aineid, mis on võimelised seonduma hr- α -ERiga. Seda kasutatakse selleks, et hinnata uuritava kemikaali võimet konkureerida hr- α -ERi LBD-le seondumisel 17β -östradiooliga. Kvantitatiivsed katsetulemused võivad hõlmata uuritava kemikaali IC_{50} (uuritava kemikaali kontsentratsioon, mis on vajalik poole [^3H] 17β -östradiooli väljatõrjumiseks hr- α -ERilt) ja suhtelist seondumisaafiinsust hr- α -ERi suhtes võrreldes 17β -östradiooliga. Kemikaalide sõeluuringu puhul võivad vastuvõetavad kvalitatiivsed katsetulemused hõlmata uuritavate kemikaalide liigitamist hr- α -ERiga seonduvaks aineks, mitteseonduvaks aineks või ebaselge mõjuga aineks lähtuvalt seondumiskõverate suhtes kohaldatavatest kriteeriumidest.
3. Käesoleva analüüsimeetodi puhul kasutatakse radioaktiivset ligandi, mille jaoks peab laboril olema radioaktiivsete materjalide käitlemise luba. Kõikide radioisotoopide ja ohtlike kemikaalidega tehtavate toimingute puhul tuleks järgida siseriiklikes õigusaktides kirjeldatud eeskirju ja korda.
4. Enne käesoleva katsemeetodi kasutamist regulatiivsel eesmärgil tuleks lugeda peatükke „ÜLDINE SISSEJUHATUS“ ja „hrER-GA SEONDUMISE KATSE ELEMENTID“. Käesolevas katsemeetodis kasutatud mõisted ja lühendid on esitatud 1. liites.

MEETODI PÕHIMÕTE (VT KA ÜLDINE SISSEJUHATUS)

5. Inimese rekombinantse α -östrogeeniretseptoriga (hr- α -ER) seondumise analüüsimisel mõõdetakse radiomärgistatud ligandi ([^3H] 17β -östradiool) võimet seonduda ERiga üha suuremas kontsentratsioonis esineva uuritava kemikaali (st konkureeriva ligandi) juuresolekul. Uuritavad kemikaalid, millel on ERi suhtes suur aafiinsus, konkureerivad

radiomärgistatud ligandiga väiksemal kontsentratsioonil kui kemikaalid, mille afiinsus retseptori suhtes on väiksem.

6. Kõnealune meetod hõlmab kahte põhielementi: küllastava seondumise katset, millega iseloomustatakse retseptor ja ligandi vahelise interaktsiooni parameetreid, ning sellele järgnevat konkureeriva seondumise katset, millega iseloomustatakse uuritava kemikaali ja radiomärgistatud ligandi vahelist konkurentsi ERile seondumisel.
7. Küllastava seondumise katse eesmärk on teha konkureeriva seondumise katse eel kindlaks konkreetse partii retseptorite seondumisafiinsus ja arv. Küllastava seondumise katses mõõdetakse tasakaalutingimustes teatud kindlas kontsentratsioonis kasutatava östrogeeniretseptori afiinsust loodusliku ligandi suhtes (seda väljendab dissotsiatsioonikonstant K_d) ja retseptori aktiivsete seondumiskohtade kontsentratsiooni (B_{max}).
8. Konkureeriva seondumise katses mõõdetakse aine afiinsuse hindamiseks selle võimet konkureerida ERile seondumisel [^3H]17 β -östradiooliga. Afiinsust väljendatakse uuritava kemikaali sellise kontsentratsiooni kaudu, mille juures kemikaal vähendab tasakaalutingimustes [^3H]17 β -östradiooli spetsiifilist seondumist 50 % võrra (sellele vastab mõiste „50 % ulatuses inhibeeriv kontsentratsioon“ ehk IC_{50}). Afiinsust on võimalik hinnata ka suhtelise seondumisafiinsuse (RBA) kaudu, mis määratakse samas analüüsitsüklis eraldi mõõdetud östradiooli IC_{50} suhtes. Konkureeriva seondumise katses mõõdetakse teatud kindlas kontsentratsioonis kasutatava [^3H]17 β -östradiooli seondumist laia vahemikku (kaheksat suurusjärku) hõlmavates kontsentratsioonides esineva uuritava kemikaali juuresolekul. Seejärel kohaldatakse saadud andmete suhtes võimaluse korral teatavat liiki Hilli võrrandit (Hill, 1910), millega kirjeldatakse radioligandi väljatõrjumist konkureeriva seonduva ainega, millel on üks seondumiskoht. Radiomärgistatud östradiooli väljatõrjumise ulatust tasakaalutingimustes kasutatakse uuritava kemikaali liigitamiseks seonduvaks aineks, mitteseonduvaks aineks või ebaselge mõjuga aineks.

KATSE KÄIK

hr- α -ERi vastuvõetava funktsionaalsuse tõendamine

9. Enne küllastava seondumise ja konkureeriva seondumise katsete regulaarset kasutamist tuleks iga uue hr- α -ERi partii puhul tõendada selle nõuetekohast funktsionaalsust laboris, kus seda kasutama hakatakse. Funktsionaalsuse tõendamine peaks hõlmama kahte etappi. Need etapid on järgmised.
 - Viiakse läbi [^3H]17 β -östradiooli küllastava seondumise katse, et tõendada hr- α -ERi spetsiifilisust ja küllastumist. Nende andmete analüüsimisel mittelineaarse regressiooni teel (nt BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) ja järgnevalt saadud Scatchardi graafiku alusel tuleks iga hr- α -ERi partii puhul dokumenteerida [^3H]17 β -östradiooli seondumisafiinsus hr- α -ERi suhtes (K_d) ja retseptorite arv (B_{max}).

- Viiakse läbi konkureeriva seondumise katse kontrollainetega (võrdlusöstrogeen (17β -östradiool), nõrgalt seonduv aine (nt noretünodreel või noretindroon) ja mitteseonduv aine (oktüültrietsülaan (OTES)). Igas laboris tuleks luua varasemate tulemuste andmebaas, et võimaldada dokumenteerida võrdlusöstrogeeni ja nõrgalt seonduva aine IC_{50} ja muude asjakohaste näitajate väärtuste kooskõla määra eri katsete lõikes ja hr- α -ERi eri partiide puhul. Kontrollaineid iseloomustavate konkureeriva seondumise kõverate parameetrid peaksid jääma usaldusnivoole 95 % vastavasse usaldusvahemikku (vt tabel 1), mis tehti kindlaks kõnealuse analüüsimeetodi valideerimise uuringus osalenud laborites saadud andmete põhjal (2).

Tabel 1. CERI meetodi kohases hrERiga seondumise katses võrdlusöstrogeeni ja nõrgalt seonduva aine puhul kohaldatavad tulemuslikkuse kriteeriumid

Aine	Näitaja	Keskmine ^a	Standardhälve (<i>n</i>)	Usaldusvahemik usaldusnivool 95 % ^b	
				Alampiir	Ülempiir
17β-östradiool	Maksimumväärtus	104,74	13,12 (70)	101,6	107,9
	Miinumväärtus	0,85	2,41 (70)	0,28	1,43
	Hilli tõus	-1,22	0,20 (70)	-1,27	-1,17
	Log IC ₅₀	-8,93	0,23 (70)	-8,98	-8,87
Noretüodreel	Maksimumväärtus	101,31	10,55 (68)	98,76	103,90
	Miinumväärtus	2,39	5,01 (68)	1,18	3,60
	Hilli tõus	-1,04	0,21 (68)	-1,09	-0,99
	Log IC ₅₀	-6,19	0,40 (68)	-6,29	-6,10
Noretindroon^c	Maksimumväärtus	92,27	7,79 (23)	88,90	95,63
	Miinumväärtus	16,52	10,59 (23)	11,94	21,10
	Hilli tõus	-1,18	0,32 (23)	-1,31	-1,04
	Log IC ₅₀	-6,01	0,54 (23)	-6,25	-5,78

^a Keskmine ± standardhälve (SD) koos valimi suurusega (*n*) on arvatud lähtuvalt lähenduskõvera hinnangulistest näitajatest (neljaparametriline Hilli võrrand) kontrollkatsetes, mis viidi valideerimisuringu jooksul läbi neljas laboris (vt allikas 2, N lisa).

^b Usaldusvahemik usaldusnivool 95 % on esitatud katse nõuetekohasuse kriteeriumide kehtestamise võimaldamiseks.

^c Noretindrooni analüüsimine ei olnud valideerimisuringus 4. alategevuse raames kohustuslik (vt allikas 2, 4. alategevus). Seega on keskmine ± SD (*n*) arvatud lähtuvalt lähenduskõvera hinnangulistest näitajatest (neljaparametriline Hilli võrrand) kontrollkatsetes, mis viidi läbi kahes laboris.

IC₅₀ väärtuste vahemik sõltub konkreetse laboris kasutatava retseptoripreparaadi K_d väärtusest ja radiomärgistatud ligandi kontsentratsioonist. IC₅₀ väärtuste vahemiku asjakohane kohandamine sõltuvalt katse läbiviimiseks kasutatud tingimustest on lubatud.

Labori pädevuse tõendamine

10. Tutvuge käesoleva katsemeetodi punktidega 17 ja 18 ning tabeliga 2 peatükis „**hrER-GA SEONDUMISE KATSE ELEMENDID**“. Iga katse (nii küllastava kui ka konkureeriva seondumise puhul) peaks koosnema kolmest eri päevadel läbi viidavast sõltumatust analüüsitsüklist (st kasutatakse retseptori, kemikaalide ja reaktiivide värskelt valmistatud lahjendusi) ja igas tsüklis tuleks kasutada kolme paralleelproovi.

Retseptori (hr-α-ER) kontsentratsiooni määramine

11. Aktiivse retseptori kontsentratsioon varieerub pisut eri partiide ja säilitustingimuste puhul. Seepärast tuleks määrata tarnijalt saadud aktiivse retseptori kontsentratsioon. See võimaldab kasutada katses sobivat aktiivse retseptori kontsentratsiooni.

12. Retseptorit tuleks konkureerivale seonduvale vastavates tingimustes (st 0,5 nM [^3H]östradiool) inkubeerida nominaalsel kontsentratsioonil 0,1, 0,2, 0,4 ja 0,6 nM ilma märgistamata östradioolita (summaarne seondumine) ja koos 1 μM märgistamata östradiooliga (mittespetsiifiline seondumine). Spetsiifiline seondumine, mis arvutatakse summaarse ja mittespetsiifilise seondumise vahena, esitatakse graafikul vastavuses retseptori nominaalse kontsentratsiooniga. Retseptori kontsentratsioon, mille puhul spetsiifilise seondumise määr vastab 40 protsendile lisatud radiomärgise kogusest, on seotud retseptori vastava nominaalse kontsentratsiooniga ja seda retseptori kontsentratsiooni tuleks kasutada küllastava ja konkureeriva seondumise katsetes. Sageli vastab neile tingimustele hrERi lõppkontsentratsioon 0,2 nM.
13. Kui 40 % kriteeriumi täitmine korduvalt ebaõnnestub, tuleks kontrollida katseplaani võimalike vigade suhtes. Suutmatust saavutada vastavust 40 % kriteeriumile võib viidata sellele, et rekombinantse valgu partiis on väga vähe aktiivset retseptorit, ning sel juhul tuleks kaaluda mõne muu retseptoripartii kasutamist.

Küllastava seondumise katse

14. [^3H]17 β -östradiooli tuleks hindamiseks kasutada kaheksas eri kontsentratsioonis, iga kontsentratsiooni puhul kolmes paralleelis, ning kohaldada seejuures järgmist kolme tingimust (vt tabel 2).
- Seondumine märgistamata 17 β -östradiooli puudumisel ja ERi juuresolekul. Nii määratakse summaarne seondumine, mida väljendab radioaktiivsus kannudes, kus on ainult [^3H]17 β -östradiool.
 - Seondumine märgistamata 17 β -östradiooli juuresolekul 2000-kordses liias, võrreldes radiomärgistatud 17 β -östradiooliga, ning ERi juuresolekuga. Nende tingimuse puhul on eesmärk küllastada aktiivsed seondumiskohad märgistamata 17 β -östradiooliga ja määrata kannudes radioaktiivsuse mõõtmise teel mittespetsiifiline seondumine. Radioaktiivse östradiooli mis tahes kogus, mis on veel võimeline retseptoriga seonduma, loetakse olevat seondunud mittespetsiifiliselt, sest märgistamata östradiooli kontsentratsioon peaks olema nii suur, et kõik saadaolevad spetsiifilise seondumise kohad retseptoril on hõivatud.
 - Seondumine märgistamata 17 β -östradiooli puudumisel ja ERi puudumisel (summaarse radioaktiivsuse määramine).

[^3H]17 β -östradiooli, märgistamata 17 β -östradiooli ja hr- α -ERi lahuste valmistamine

15. [^3H]17 β -östradiooli 1 μM põhilahusest tuleks valmistada [^3H]17 β -östradiooli 40 nM lahus DMSOs; selleks lisatakse toatemperatuuril DMSOd (et saada 200 nM lahus) ja analüüsipuhvrit (et saada 40 nM lahus). Saadud 40 nM lahusest valmistatakse toatemperatuuril analüüsipuhvri lisamise teel rida [^3H]17 β -östradiooli lahjendusi kontsentratsiooniga 0,313 nM kuni 40 nM (nagu on kirjeldatud tabeli 2 kaheteistkümnendas

veerus). Lõplik katsekontsentratsioon vahemikus 0,0313–4,0 nM saavutatakse 10 µl sellise lahuse lisamisega 96-kannulise mikrotiiterplaadi vastavasse katsekannu (vt tabelid 2 ja 3). Analüüsipuhvri valmistamist, eriaktiivsusel põhinevat [³H]17β-östradioli algse põhilahuse kontsentratsiooni arvutamist, lahjenduste valmistamist ning kontsentratsiooni määramist on põhjalikult kirjeldatud CERI katse-eeskirjas (2).

16. Märhistamata 17β-östradioli lahuse lahjenduste valmistamiseks tuleks kasutada 17β-östradioli 1 nM põhilahust, millele lisatakse analüüsipuhvrit, et saada kaheksa eri kontsentratsioonidega lahust, mille kontsentratsioon jääb algselt vahemikku 0,625 µM kuni 80 µM. Lõplik katsekontsentratsioon vahemikus 0,0625–8 µM saavutatakse 10 µl sellise lahuse lisamisega 96-kannulise mikrotiiterplaadi vastavasse katsekannu, mis on ette nähtud mittespetsiifilise seondumise mõõtmiseks (vt tabelid 2 ja 3). Märhistamata 17β-östradioli lahjenduste valmistamist on põhjalikult kirjeldatud CERI katse-eeskirjas (2).
17. Tuleks kasutada retseptori sellist kontsentratsiooni, mille puhul spetsiifiline seondumine on $40 \pm 10 \%$ (vt punktid 12–13). hr-α-ERi lahus tuleks valmistada jääkülma analüüsipuhvri lisamise teel vahetult enne kasutamist, st pärast seda, kui kõik summaarse seondumise, mittespetsiifilise seondumise ja ainult radioaktiivse ligandi määramiseks ette nähtud kannud on katseks ette valmistatud.
18. 96-kannulised mikrotiiterplaadid valmistatakse ette vastavalt tabelis 2 esitatud skeemile, kus [³H]17β-östradioli iga kontsentratsiooni puhul kasutatakse kolme paralleelproovi. Kasutatavad [³H]17β-östradioli, märhistamata 17β-östradioli, puhvri ja retseptori kogused on esitatud tabelis 3.

Tabel 2. Küllastava seondumise katses kasutatav mikrotiiterplaadi skeem

	1*	2*	3*	4*	5*	6*	7*	8*	9*	10	11**	12**
	SSi mõõtmiseks			MSSi mõõtmiseks			Ainult radioaktiivse ligandi määramiseks				Märhistamata [³ H]E2 lahjendused plaadi 4.–6. tulba jaoks	[³ H]E2 lahjendused plaadi 1.–9. tulba jaoks
A	0,0313 nM [³ H]E2 + ER			0,0313 nM [³ H]E2 + 0,0625 µM E2 + ER			0,0313 nM				0,625 µM	0,313 nM
B	0,0625 nM [³ H]E2 + ER			0,0625 nM [³ H]E2 + 0,125 µM E2 + ER			0,0625 nM				1,25 µM	0,625 nM
C	0,125 nM [³ H]E2 + ER			0,125 nM [³ H]E2 + 0,25 µM E2 + ER			0,125 nM				2,5 µM	1,25 nM
D	0,250 nM [³ H]E2 + ER			0,250 nM [³ H]E2 + 0,5 µM E2 + ER			0,250 nM				5 µM	2,5 nM

E	0,50 nM [³ H]E2 + ER	0,50 nM [³ H]E2 + 1 μM E2 + ER	0,50 nM	10 μM	5 nM
F	1,00 nM [³ H]E2 + ER	1,00 nM [³ H]E2 + 2 μM E2 + ER	1,00 nM	20 μM	10 nM
G	2,00 nM [³ H]E2 + ER	2,00 nM [³ H]E2 + 4 μM E2 + ER	2,00 nM	40 μM	20 nM
H	4,00 nM [³ H]E2 + ER	4,00 nM [³ H]E2 + 8 μM E2 + ER	4,00 nM	80 μM	40 nM

SS – summaarne seondumine

MSS – mittespetsiifiline seondumine

[³H]E2 – [³H]17β-östradiool

E2 – märgistamata 17β-östradiool

* Siin on esitatud lõppkontsentratsioon igas kannus.

** Märgistamata E2 ja [³H]E2 lahjendused võib valmistada ka eraldi plaadil.

Tabel 3. Reaktiivide kogused küllastamiskatses kasutataval mikrotiiterplaadil

Tulba number		1	2	3	4	5	6	7*	8*	9*
Katseetapid		SSi kannud			MSSi kannud			Ainult radioaktiivne ligand		
Eespool kirjeldatud reaktsioonikannude sse lisatavate komponentide kogused ja lisamise järjekord	Puhver	60 µl			50 µl			90 µl		
	Märgistamata E2 tabeli 2 üheteistkümnendast veerust	-			10 µl			-		
	[³ H]E2 tabeli 2 kaheteistkümnendast veerust	10 µl			10 µl			10 µl		
	hr-α-ER	30 µl			30 µl			-		
Reaktsiooni koguruumala		100 µl			100 µl			100 µl		
Inkubeerimine		PÄRAST 2 TUNNI PIKKUST INKUBEERIMIST						Radioaktiivsuse kvantifitseerimine kohe pärast lahuse valmistamist; inkubeerimist ei toimu		
Töötlus 0,4 % DCCga		Jah			Jah			Ei		
0,4 % DCC kogus		100 µl			100 µl			-		
Filtrimine		Jah			Jah			Ei		
RADIOAKTIIVSUSE MÕÕTMINE DPM-DES										
Stsintillatsioonikokteilile kvantifitseerimiseks lisatav kogus		100 µl**			100 µl**			50 µl		

* Kui radioaktiivsuse mõõtmiseks dpm-des kasutatakse mikrotiiterplaatide jaoks ette nähtud vedelikstsintillatsiooniloendurit, ei ole ainult radioaktiivset ligandi sisaldava proovi lisamine SSi ja MSSi kanne sisaldavale katseplaadile asjakohane. Ainult radioaktiivset ligandi sisaldav proov tuleks sel juhul valmistada eraldi plaadil.

** Kui DCC eraldamiseks kasutatakse tsentrifuugimist, tuleks vedelikstsintillatsiooniloenduriga mõõtmiseks kasutada 50 µl supernatanti, et hoida ära DCCga saastumist.

19. Summaarse seondumise ja mittespetsiifilise seondumise määramiseks kasutatavaid mikrotiiterplaate tuleks inkubeerida toatemperatuuril (22–28 °C) kaks tundi.

hr-α-ERiga seondunud [³H]17β-östradiooli mõõtmine

20. Pärast kahetunnist inkubatsiooniperioodi tuleks hr-α-ERiga seondunud [³H]17β-östradiooli eraldamiseks vabast [³H]17β-östradioolist lisada kannudesse 100 µl jääkülma 0,4 % DCC suspensiooni. Seejärel tuleks plaadid asetada 10 minutiks jääle ning DCC eraldamiseks tuleks reaktsioonisegu ja DCC suspensioon kanda filtrimiseks mikrotiiterplaatifiltrile. Järgnevalt tuleks 100 µl filtraati lisada vedelikstsintillatsiooniloenduri viaalis olevale stsintillatsioonivedelikule, et määrata vedelikstsintillatsiooniloenduri abil igas viaalis lagunemiste arv minutis (dpm).
21. Kui mikrotiiterplaatifilter ei ole kättesaadav, võib DCC eemaldamiseks kasutada tsentrifuugimist. Seejärel tuleks DCC puudutamisest tuleneda võiva kannude saastumise ärahoidmiseks väga ettevaatlikult võtta 50 µl supernatanti, mis sisaldab hr-α-ERiga seondunud [³H]17β-östradiooli, ning kasutada seda stsintillatsioonide loendamiseks.
22. Ainult radioaktiivset ligandi sisaldavaid proove kasutatakse selleks, et määrata katsekannudesse lisatud [³H]17β-östradioolis toimuvate lagunemiste arv minutis (dpm). Radioaktiivsus tuleks kvantifitseerida vahetult pärast proovide valmistamist. Kõnealuseid kanne ei tohiks inkubeerida ega töödelda DCC suspensiooniga, vaid nende sisu tuleks lisada otse stsintillatsioonivedelikku. Saadavatest mõõtmistulemustest nähtub, kui palju [³H]17β-östradiooli lisati dpm-des iga rühma kannudesse summaarse seondumise ja mittespetsiifilise seondumise hindamiseks.

Konkureeriva seondumise katse

23. Konkureeriva seondumise katse käigus mõõdetakse ühel kontsentratsioonil kasutatava [³H]17β-östradiooli seondumist üha suuremas kontsentratsioonis esineva uuritava kemikaali juuresolekul. Igas analüüsitsükliks tuleks iga kontsentratsiooni puhul kasutada üheaegselt kolme paralleelproovi. Lisaks tuleks iga uuritava kemikaaliga läbi viia kolm järjestikust analüüsitsükli. Katse läbiviimiseks tuleks kasutada ühte või mitut 96-kannulist mikrotiiterplaati.

Kontrollid

24. Katse läbiviimisel tuleks igas analüüsitsükliks kasutada paralleelset lahustiga kontrolli ja teisi kontrolle (st võrdlusöstrogeeni, nõrgalt seonduvat ainet ja mitteseonduvat ainet). Igas analüüsitsükliks tuleks ühel plaadil kasutada võrdlusöstrogeeni ja kontrollaineid (st nõrgalt seonduvat ainet ja mitteseonduvat ainet) täieliku kontsentratsioonikõvera ulatuses. Kõikidele ülejäänud plaatidele tuleks kanda i) E2 ja nõrgalt seonduv aine suures

(maksimaalsele väljatõrjumisele vastavas, st radiomärgistatud ligandi praktiliselt täielikuks väljatõrjumiseks vajalikus) ja keskmises (umbes IC₅₀-le vastavas) kontsentratsioonis kolmes paralleelis ning ii) lahustiga kontroll ja mittespetsiifilise seondumise kontroll, kumbki kolmes paralleelis. Analüüsipuhvri, [³H]17β-östradiooli, hr-α-ERi ja uuritava kemikaali lahuste valmistamist on põhjalikult kirjeldatud CERI katse-eeskirjas (2).

Lahustiga kontroll

25. Lahustiga kontroll võimaldab tõendada, et lahusti ei mõjuta katsesüsteemi, ja ühtlasi mõõta summaarset seondumist (SS). Eelistatud lahusti on DMSO. Kui uuritav kemikaal on suurimal kontsentratsioonil DMSOs mittelahustuv, võib lahustina kasutada etanooli. DMSO lõppkontsentratsioon katsekannudes peaks olema 2,05 %; kui uuritav kemikaal on vähelahustuv, võib DMSO sisaldust suurendada kuni 2,5 protsendini. DMSO ei tohiks kasutada kontsentratsioonis üle 2,5 %, sest suuremal kontsentratsioonil hakkab lahusti mõjutama katsetulemusi. Kui uuritav kemikaal ei ole DMSOs lahustuv, kuid lahustub etanoolis, võib katses kasutada etanooli maksimaalses kontsentratsioonis 2 %, ilma et see mõjutaks katsetulemusi.

Puhvrikontroll

26. Puhvrikontroll (PK) ei tohiks sisaldada lahustit ega uuritavat kemikaali, kuid peaks sisaldama kõiki teisi analüüsikomponente. Puhvrikontrolliga saadud tulemusi võrreldakse lahustiga kontrolliga saadud tulemustega, tõendamaks, et kasutatud lahusti ei mõjuta analüüsisüsteemi.

Tugevalt seonduv aine (võrdlusöstrogeen)

27. 17β-östradiool (CASi nr: 50-28-2) on ERi endogeenne ligand ja seondub retseptori α-vormiga suure afiinsusega. Igas hr-α-ERiga tehtavas konkureeriva seondumise katses tuleks kasutada märgistamata 17β-östradiooli standardkõverat, et oleks võimalik hinnata katsetulemuste varieeruvust samas laboris pikema aja jooksul. DMSOs ja analüüsipuhvris tuleks valmistada kaheksa märgistamata 17β-östradiooli lahust; lõppkontsentratsioonid standardkõverate saamiseks kasutatavates katsekannudes on järgmised: 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸, 10^{-8,5}, 10⁻⁹, 10^{-9,5}, 10⁻¹⁰, 10⁻¹¹ M. Märgistamata 17β-östradiooli suurimat kontsentratsiooni (1 μM) kasutatakse ka mittespetsiifilise seondumise hindamiseks. See kontsentratsioon on tabelis 4 tähistatud märgisega „MSS“, kuigi see on samuti osa standardkõverast.

Nõrgalt seonduv aine

28. Igas analüüsitsükli tuleks tundlikkuse tõendamiseks ja pikema aja jooksul saadud tulemuste varieeruvuse hindamiseks kasutada ka nõrgalt seonduvat ainet (noretünodreeli (CASi nr: 68-23-5) või noretindrooni (CASi nr: 68-22-4)). Nõrgalt seonduvast ainest tuleks valmistada DMSOs ja analüüsipuhvris kaheksa lahust; katsekannudes kasutatavad lõppkontsentratsioonid on järgmised: 10^{-4,5}, 10^{-5,5}, 10⁻⁶, 10^{-6,5}, 10⁻⁷, 10^{-7,5}, 10⁻⁸ ja 10⁻⁹ M.

Mitteseonduv aine

29. Negatiivse kontrollina (mitteseonduva ainenä) tuleks kasutada oktüültrietoksüsilaani (OTES; CASi nr: 2943-75-1). Sellega tagatakse, et katse käigus on võimalik tuvastada hr- α -ERiga mitteseonduvaid uuritavaid kemikaale. Mitteseonduvast ainest tuleks valmistada DMSOs ja analüüsipuhvris kaheksa lahust; katsekannudes kasutatavad lõppkontsentratsioonid on järgmised: 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} M. Alternatiivse mitteseonduva ainenä võib kasutada di-*n*-butüülftalaati (DBP; CASi nr: 84-72-2), ent seda võib analüüsida üksnes kontsentratsioonini 10^{-4} M. DBP maksimaalne lahustuvus katsetingimustes on teadaolevalt 10^{-4} M.

hr- α -ERi kontsentratsioon

30. Tuleks kasutada sellist retseptori kogust, mille puhul spetsiifiline seondumine on 40 ± 10 % (vt 3. liite punktid 12–13). hr- α -ERi lahus, mis saadakse funktsionaalse hr- α -ERi lahjendamisel jääkülmas analüüsipuhvris, tuleks valmistada vahetult enne kasutamist.

[^{3} H]17 β -östradiool

31. [^{3} H]17 β -östradiooli lõppkontsentratsioon katsekannudes peaks olema 0,5 nM.

Uuritavad kemikaalid

32. Iga uuritava kemikaali puhul on esmalt vaja läbi viia lahustuvuskatse, et määrata lahustuvuspiir ja teha kindlaks katse-eeskirja järgimiseks sobiv kontsentratsioonivahemik. Iga uuritava kemikaali lahustuvuspiir tuleb algselt määrata lahustis ja seejärel kontrollida seda katsetingimustes. Katses kasutatav lõppkontsentratsioon ei tohiks olla suurem kui 1 mM. Kontsentratsioonivahemiku leidmise katses kasutatakse lahustiga kontrolli koos vähemalt kaheksa järjestikuse üksteisest log-ühiku võrra erineva lahjendusega, mille puhul alustatakse maksimaalsest vastuvõetavast kontsentratsioonist (nt 1 mM või väiksem, olenevalt lahustuvuspiirist), ja registreeritakse nähtava hägu või sademe tekkimine (vt ka 3. liite punkt 35). Kui katse jaoks sobiv kontsentratsioonivahemik on kindlaks tehtud, tuleks uuritavat kemikaali analüüsida eelnevas kontsentratsioonivahemiku leidmise katses kindlaks tehtud kaheksal üksteisest log-ühiku võrra erineval kontsentratsioonil. Teises ja kolmandas katses tuleks kontsentratsioone vajaduse korral kohandada, et kontsentratsioonist sõltuvuse kõverat oleks võimalik paremini iseloomustada.
33. Uuritava kemikaali lahjendused tuleks valmistada sobivas lahustis (vt 3. liite punkt 25). Kui uuritava kemikaal ei lahustu suurimal kontsentratsioonil DMSOs ega etanoolis ja suurema koguse lahusti lisamisel tõuseks lahusti sisaldus lõpplahuses üle lubatud piirmäära, võib suurima kontsentratsioonina kasutada lahjenduste reas järgmist väiksemat kontsentratsiooni. Sellisel juhul võib lisada kontsentratsioonirea lahjemasse otsa ühe lisalahjenduse. Teised kontsentratsioonid lahjenduste reas tuleks jätta muutmata.
34. Uuritava kemikaali lahuseid tuleks pärast katsekannu lisamist hoolikalt jälgida, sest uuritav kemikaal võib kannu lisamisel välja sadeneda. Kõigi sadet sisaldavate kannude andmed tuleks kõvera lähendamisel välja jätta ja registreerida andmete väljajätmise põhjus.

35. Kui eelnevalt on olemas muudest allikatest pärinev teave uuritava kemikaali log IC₅₀ kohta, võib olla asjakohane kasutada lahjenduste geomeetrilist väiksema sammuga jaotust eeldatava log IC₅₀ ümber (nt sammuga 0,5 log-ühikut). Lõpptulemuses peaks kajastuma piisav kontsentratsioonide ulatus kummalgi pool log IC₅₀ väärtust, sealhulgas kõvera ülemine ja alumine osa, nii et seandumiskõverat oleks võimalik piisavalt iseloomustada.

Katseplaatide kasutusskeemid

36. Tähistatud mikrotiiterplaatide ettevalmistamisel tuleks lähtuda sellest, et katses kasutatakse lahustiga kontrolli, võrdlusöstrogeeni (E2) suurimat kontsentratsiooni – selle abil hinnatakse ühtlasi mittespetsiifilist seundumist (MSS) – ja puhvrikontrolli kuues paralleelis ning mitteseonduva kontrollaine (oktüültrietoksüsilaani) kaheksat kontsentratsiooni, võrdlusöstrogeeni (E2) seitset väiksemat kontsentratsiooni, nõrgalt seonduva aine (noretünodreeli või noretindrooni) kaheksat kontsentratsiooni ja iga uuritava kemikaali (UK) kaheksat kontsentratsiooni kolmes paralleelis. Võrdlusöstrogeeni ja kontrollide täielikke kontsentratsioonikõveraid hõlmav plaadi näidisskeem on esitatud tabelis 4. Uuritavate kemikaalide analüüsimiseks kasutatakse eraldi mikrotiiterplaate, mis peaksid sisaldama ka järgmisi plaadikontrolle: i) E2 ja nõrgalt seonduvat ainet suures (maksimaalsele väljatõrjumisele vastavas) ja keskmises (umbes IC₅₀-le vastavas) kontsentratsioonis, kõikidel juhtudel kolmes paralleelis; ii) lahustiga kontrolli (summaarse seondumise hindamiseks) ja mittespetsiifilise seondumise kontrolli, kummalgi juhul kuues paralleelis (tabel 5). Konkureeriva seondumise katses kasutatavale mikrotiiterplaadi skeemile vastav näidistööleht kolme tundmatu uuritava kemikaali analüüsimiseks on esitatud liites 3.3. Töölehel ning tabelites 4 ja 5 on esitatud igas katsekannus kasutatavad lõppkontsentratsioonid. E2 maksimaalne kontsentratsioon peaks olema 1×10^{-7} M ja nõrgalt seonduva aine puhul tuleks kasutada 1. plaadil kasutatud suurimat kontsentratsiooni. IC₅₀ tuleb laboris määrata kontrollidega varem saadud tulemuste andmebaasi alusel. Eeldatavalt on see väärtus sarnane valideerimisuuringutes täheldatud väärtusega (vt tabel 1).

Tabel 4. Konkureeriva seondumise katses kasutatav mikrotiiterplaadi skeem^{1,2}, mis hõlmab võrdlusöstrogeeni ja kontrollide täielikke kontsentratsioonikõveraid (1. plaat)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Puhvrikontroll ja positiivne kontroll (E2)			Nõrgalt positiivne aine (noretünodreel)			Negatiivne kontroll (OTES)			SS ja MSS		
A	Tühi kann*			1×10^{-9} M			1×10^{-10} M			SS (lahustiga kontroll) (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			MSS (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	Puhvrikontroll
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	Tühiproov (radiomärgise jaoks)**
H	E2 (1×10^{-7} M)	$1 \times 10^{-4,5}$ M	1×10^{-3} M	

¹ Proovide skeem standardeid sisaldaval mikrotiiterplaadil, mida tuleb kasutada igas analüütsükli.

² Tuleb silmas pidada, et sellel mikrotiiterplaadil olevate proovide jaoks kasutatakse lahjendusplaadil valmistatud eespool kirjeldatud standardite lahjendusi.

Selles näites on nõrgalt seonduv aine noretinodreel (NE).

* Täiesti tühi kasutamata kann.

** Tühiproov, mida ei kasutata inkubeerimise ajal, kuid mida kasutatakse lisatud radiomärgise summaarse radioaktiivsuse kontrollimiseks.

Tabel 5. Konkureeriva seondumise katses kasutatav mikrotiiterplaadi skeem uuritavaid kemikaale (UK) ja plaadikontrolle sisaldavate ülejäänud plaatide jaoks

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Uuritav kemikaal nr 1 (UK-1)			Uuritav kemikaal nr 2 (UK-2)			Uuritav kemikaal nr 3 (UK-3)			Kontrollid		
A	UK-1 (1×10^{-10} M)			UK-2 (1×10^{-10} M)			UK-3 (1×10^{-10} M)			E2 (1×10^{-7} M)		
B	UK-1 (1×10^{-9} M)			UK-2 (1×10^{-9} M)			UK-3 (1×10^{-9} M)			E2 (IC ₅₀)		
C	UK-1 (1×10^{-8} M)			UK-2 (1×10^{-8} M)			UK-3 (1×10^{-8} M)			NE ($1 \times 10^{-4,5}$ M)		
D	UK-1 (1×10^{-7} M)			UK-2 (1×10^{-7} M)			UK-3 (1×10^{-7} M)			NE (IC ₅₀)		
E	UK-1 (1×10^{-6} M)			UK-2 (1×10^{-6} M)			UK-3 (1×10^{-6} M)			MSS (10^{-6} M E2)		
F	UK-1 (1×10^{-5} M)			UK-2 (1×10^{-5} M)			UK-3 (1×10^{-5} M)					
G	UK-1 (1×10^{-4} M)			UK-2 (1×10^{-4} M)			UK-3 (1×10^{-4} M)			SS (lahustiga kontroll)		
H	UK-1 (1×10^{-3} M)			UK-2 (1×10^{-3} M)			UK-3 (1×10^{-3} M)					

Selles näites on nõrgalt seonduv aine noretinodreel (NE).

Konkureeriva seondumise katse lõpetamine

37. Nagu on näidatud tabelis 6, tuleks igasse kannu – välja arvatud summaarse seondumise ja tühiproovide (radiomärgise) analüüsimiseks ette nähtud kannud – lisada 50 µl analüüsipuhvrit ja seejärel 10 µl lahustiga kontrolli, võrdlusöstrogeeni (E2), nõrgalt seonduvat ainet, mitteseonduvat ainet või uuritavat kemikaali ning 10 µl 5 nM [³H]17β-östradioli lahust. Seejärel lisatakse igasse kannu 30 µl jääkülma retseptorilahust ja segatakse saadud lahust ettevaatlikult. hr-α-ERi lahus tuleks lisada viimasena. Katses kasutatavaid mikrotiiterplaate inkubeeritakse toatemperatuuril (22–28 °C) kaks tundi.

Tabel 6. hrERil põhineva konkureeriva seondumise katse komponentide kogused mikrotiiterplaadil

Ettevalmistusetapid	Muud kannud peale SSi kannude	SSi kannud	Tühiproov (radiomärgise jaoks)

Eespool kirjeldatud reaktsioonikannudesse lisatavate komponentide kogused ja lisamise järjekord	Toatemperatuuril analüüsipuhver	50 µl	60 µl	90 µl
	Märgistamata E2, nõrgalt seonduv aine, mitteseonduv aine, lahusti või uuritav kemikaal*	10 µl	-	-
	[³ H]17β-östradiool kontsentratsioonis, mille puhul saadav lõppkontsentratsioon on 0,5 nM (st 5 nM)	10 µl	10 µl	10 µl
	Määratud kontsentratsiooniga hr-α-ERi lahus (vt punktid 12–13)	30 µl	30 µl	-
Lõppruumala igas katsekannus		100 µl	100 µl	100 µl

* Nõuetekohaselt nii valmistatud, et saadava lõppkontsentratsiooni puhul jääb lahusti sisaldus vastuvõetavasse vahemikku.

38. Seejärel tuleks viia läbi hr-α-ERiga seondunud [³H]17β-östradioli kvantifitseerimine pärast seda, kui hr-α-ERiga seondunud [³H]17β-östradiool on eraldatud vabast [³H]17β-östradiolist igasse kannu 100 µl jääkülma DCC suspensiooni lisamise teel, nagu on kirjeldatud küllastava seondumise katset käsitlevates 3. liite punktides 21–23.

39. Kannusid G10–G12 ja H10–H12 (tabelis 4 tähistatud kui tühiproovid (radiomärgise jaoks)) kasutatakse 10 µl [³H]-ga märgistatud östradioli radioaktiivsuse määramiseks dpm-des. 10 µl suurused alikvoodid tuleks lisada otse stsintillatsioonivedelikku.

Katse nõuetekohasuse kriteeriumid

Küllastava seondumise katse

40. Spetsiifilise seondumise kõver peaks jõudma [³H]17β-östradioli kontsentratsiooni suurenedes platoole; see viitab hr-α-ERi küllastumisele ligandiga.
41. Spetsiifiline seondumine [³H]17β-östradioli kontsentratsioonil 0,5 nM peaks jääma vastuvõetavasse vahemikku 30–50 % eri analüüsitsüklites mõõdetud, lisatud radiomärgise kogusele vastava summaarse radioaktiivsuse näitajate keskvärtusest. Aeg-ajalt esinevad väikesed kõrvalekalded sellest vahemikust on lubatud, ent kui analüüsitsüklites saadud tulemused on pidevalt sellest vahemikust väljaspool või mõnes konkreetses analüüsitsüklis saadud väärtus jääb sellest vahemikust väga kaugele, tuleks valgu kontsentratsiooni kohandada ja küllastamiskatset korrata.
42. Andmed peaksid võimaldama saada lineaarse Scatchardi graafiku.
43. Mittespetsiifiline seondumine ei tohi olla liiga ulatuslik. Mittespetsiifilise seondumise määr on tavaliselt < 35 % summaarse seondumise määrast. See suhtarv võib siiski olla aeg-ajalt suurem, kui mõõdetakse väga väikest dpm-des väljendatavat radioaktiivsust radiomärgistatud 17β-östradioli väikseimal katses kasutataval kontsentratsioonil.

Konkureeriva seondumise katse

44. Märgistamata 17 β -östradiool peaks kontsentratsiooni suurenedes tõrjuma [^3H]17 β -östradiooli retseptorilt välja viisil, mis vastab konkureerivale seondumisele ühes seondumiskohas.
45. Võrdlusöstrogeeni (st 17 β -östradiooli) IC₅₀ väärtus peaks olema ligikaudselt võrdne [^3H]17 β -östradiooli molaarse kontsentratsiooni ja küllastava seondumise katses määratud K_d summaga.
46. Spetsiifiline seondumine peaks järjepidevalt olema vastuvõetavas vahemikus 40 $\pm$ 10 %, kui igas kannus täheldatavale summaarsele radioaktiivsusele vastav lisatud radiomärgise keskmine mõõdetud kontsentratsioon on eri analüüsitsüklite lõikes 0,5 nM. Aeg-ajalt esinevad väikesed kõrvalekalded sellest vahemikust on lubatud, ent kui analüüsitsüklites saadud tulemused on pidevalt sellest vahemikust väljaspool või mõnes konkreetses analüüsitsüklis saadud väärtus jääb sellest vahemikust väga kaugele, tuleks valgu kontsentratsiooni kohandada.
47. Lahusti ei tohiks mõjutada analüüsimeetodi tundlikkust ega tulemuste reprodutseeritavust. Lahustiga kontrolliga (SSi kannudega) saadud tulemusi võrreldakse puhvrikontrolliga saadud tulemustega, tõendamaks, et kasutatud lahusti ei mõjuta katsesüsteemi. Kui lahustil puudub mõju katsetulemustele, peaksid SSi proove ja puhvrikontrolli iseloomustavad tulemused olema võrreldavad.
48. Mitteseonduv aine ei tohiks tõrjuda hr- α -ERilt välja rohkem kui 25 % [^3H]17 β -östradioolist, kui sellist ainet analüüsitakse kontsentratsioonil kuni 10⁻³ M (OTES) või 10⁻⁴ M (DBP).
49. Tulemuslikkuse kriteeriumide väljatöötamiseks võrdlusöstrogeeni ja kahe nõrgalt seonduva aine (nt noretünodreeli ja noretindrooni) jaoks on kasutatud hrERiga seondumist analüüsida võimaldava CERi meetodi valideerimise uuringu andmeid (allikas 2, N lisa). Valideerimisuuringu osalenud neljas laboris tehtud kõikide kontrollkatsete tulemuste puhul on keskväärtuse $\pm$ SD (*n*) kõrval esitatud ka usaldusvahemik usaldusnivool 95 %. Usaldusvahemik usaldusnivool 95 % on arvatud võrdlusöstrogeeni ja nõrgalt seonduvaid aineid iseloomustavate lähenduskõvera parameetrite (st maksimumi, miinimumi, Hilli tõusu, log IC₅₀) jaoks ning võrdlusöstrogeeni suhtes väljendatava nõrgalt seonduvate ainete log₁₀ RBA jaoks. Tabelis 1 on esitatud tulemuslikkuse kriteeriumidena kasutatavate lähenduskõvera parameetrite eeldatavad väärtusevahemikud. Praktikas võib IC₅₀ väärtuste vahemik retseptoripreparaadi katseliselt määratud K_d-st ja katses kasutatavast ligandi kontsentratsioonist sõltuvalt pisut varieeruda.
50. Uuritavate kemikaalide jaoks ei ole lähenduskõvera parameetreid käsitlevaid tulemuslikkuse kriteeriume kindlaks määratud, kuna olemasolevate võimalike uuritavate kemikaalide hulk on lai ning nende võimalik afiinsus ja saadavad tulemused varieeruvad (nt täielik kõver, osaline kõver, sobiva kõvera puudumine). Uuritava kemikaaliga igas analüüsitsüklis saadud tulemuste hindamisel tuleks siiski lähtuda eksperdi hinnangust. Tuleks kasutada piisavalt suurt uuritava kemikaali kontsentratsioonide vahemikku, et

konkureeriva seondumise kõvera ülemine osa (nt osa, kus seondumine on 90–100 %) selgelt välja joonistuks. Paralleelproovide vaheline varieeruvus igal uuritava kemikaali kontsentratsioonil ja kolme järjestikuse analüüsitsükli vaheline varieeruvus peaks olema mõõdukas ja teaduslikult põhjendatav. Uuritava kemikaali hindamisel peaksid kontrollidega saadud tulemused igas analüüsitsüklis ligilähedaselt vastama CERi meetodit iseloomustavatele tulemusnäitajatele ja olema kooskõlas asjaomases laboris kontrollidega varem saadud tulemustega.

ANDMEANALÜÜS

Küllastava seondumise katse

51. Mõõdetakse nii summaarset kui ka mittespetsiifilist seondumist. Nende väärtuste põhjal arvutatakse üha suuremas kontsentratsioonis esineva [^3H]17 β -östradioli spetsiifilise seondumise näitaja tasakaalutingimustes; selleks lahutatakse summaarse seondumise näitajast mittespetsiifilise seondumise näitaja. [^3H]17 β -östradioli kontsentratsioonist sõltuva spetsiifilise seondumise kõver peaks jõudma platoole, kus [^3H]17 β -östradioli spetsiifiline seondumine on hr- α -ERi küllastumisest tulenevalt maksimaalne. Lisaks peaks andmeanalüüsist nähtuma [^3H]17 β -östradioli seondumine ühteainsasse suure afiinsusega seondumiskohta. Küllastava seondumise graafikul peaks olema näidatud mittespetsiifiline, summaarne ja spetsiifiline seondumine. Järgnevas andmeanalüüsis tuleks kasutada mittelineaarset regressiooni (nt BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) ja andmed tuleks lõplikul kujul esitada Scatchardi graafikul.
52. Andmeanalüüsi käigus tuleks määrata $B_{\max}$ ja K_d üksnes summaarse seondumise andmete põhjal ning lähtuda seejuures eeldusest, et mittespetsiifiline seondumine on lineaarne, v.a juhul, kui esitatakse põhjendus teistsuguse meetodi kasutamise kohta. Lisaks tuleks parima lähenduskõvera leidmiseks kasutada robustset regressioonianalüüsi, v.a juhul, kui esitatakse põhjendus muu lähenemisviisi kasutamise kohta. Tuleks märkida, millist robustse regressioonianalüüsi meetodit kasutatakse. Küllastava seondumise andmete alusel $B_{\max}$ -i ja K_d määramisel tuleks andmeid alati korrigeerida ligandi väljatõrjumise suhtes (nt meetodi abil, mida on kirjeldanud Swillens (1995)).

Konkureeriva seondumise katse

53. Konkureeriva seondumise kõver esitatakse graafikul nii, et ühel teljel on [^3H]17 β -östradioli spetsiifiline seondumine ja teisel konkureeriva aine kontsentratsioon (log₁₀-ühikutes). Uuritava kemikaali kontsentratsioon, mille juures [^3H]17 β -östradioli spetsiifiline seondumine on 50 % maksimummäärast, on IC₅₀ väärtus.
54. Positiivsete kontrollide (nt võrdlusöstrogeeni ja nõrgalt seonduva aine) log IC₅₀ hinnanguliste väärtuste kindlakstegemiseks tuleks kasutada sobivat mittelineaarse kõvera lähendamise tarkvara, milles rakendatakse neljaparametrilist Hilli võrrandit (nt BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). Kõnealuste kõverate lähendamisel tuleks kõvera ülemine ja alumine osa, tõus ja log IC₅₀ üldjuhul jätta piiritlemata. Parima lähenduskõvera

leidmiseks tuleks kasutada robustset regressioonanalüüsi, v.a juhul, kui esitatakse põhjendus muu lähenemisviisi kasutamise kohta. Andmeid ei tohiks korrigeerida ligandi väljatõrjumise suhtes. Pärast esmast analüüsi tuleks iga seondumiskõver üle vaadata, et veenduda mudeli ja andmete omavahelises sobivuses. Nõrgalt seonduva aine suhtelise seondumisafiinsuse (RBA) leidmiseks tuleks arvutada nõrgalt seonduva aine log IC₅₀ väärtuse protsentuaalne osakaal 17β-östradioli log IC₅₀ väärtusest. Positiivsete kontrollidega ja mitteseonduval ainel põhineva kontrolliga saadud tulemusi tuleks hinnata lähtuvalt käesoleva 3. liite punktide 44–49 kohastest katsemeetodi tulemuslikkuse näitajatest.

55. Kõigi uuritavate kemikaalide andmete analüüsimisel tuleks kasutada astmelist lähenemist, et tagada andmete asjakohane analüüs ja kõigi konkureeriva seondumise kõverate nõuetekohane liigitamine. Soovitavalt tuleks uuritava kemikaaliga läbi viidud iga analüüsitsükli puhul esmalt rakendada täpselt sama standardiseeritud andmeanalüüsi, mida kasutatakse võrdlusöstrogeenil ja nõrgalt seonduval ainel põhinevate kontrollide puhul (vt käesoleva 3. liite punkt 54). Pärast esmast analüüsi tuleks iga analüüsitsükli puhul teha lähenduskõvera parameetrite tehniline kontroll ja visuaalselt hinnata, kui hästi sobituvad seondumisandmed saadud konkureeriva seondumise kõveraga. Tehnilise kontrolli käigus täheldatav kontsentratsioonist sõltuv [³H]17β-östradioli spetsiifilise seondumise protsentuaalse määra vähenemine, tehniliste paralleelproovide andmete vaheline väike varieeruvus kemikaali kõigil kontsentratsioonidel ja lähenduskõvera parameetrite sarnased väärtused kolmes analüüsitsükli viitavad sellele, et katse ja andmeanalüüs on läbi viidud nõuetekohaselt.

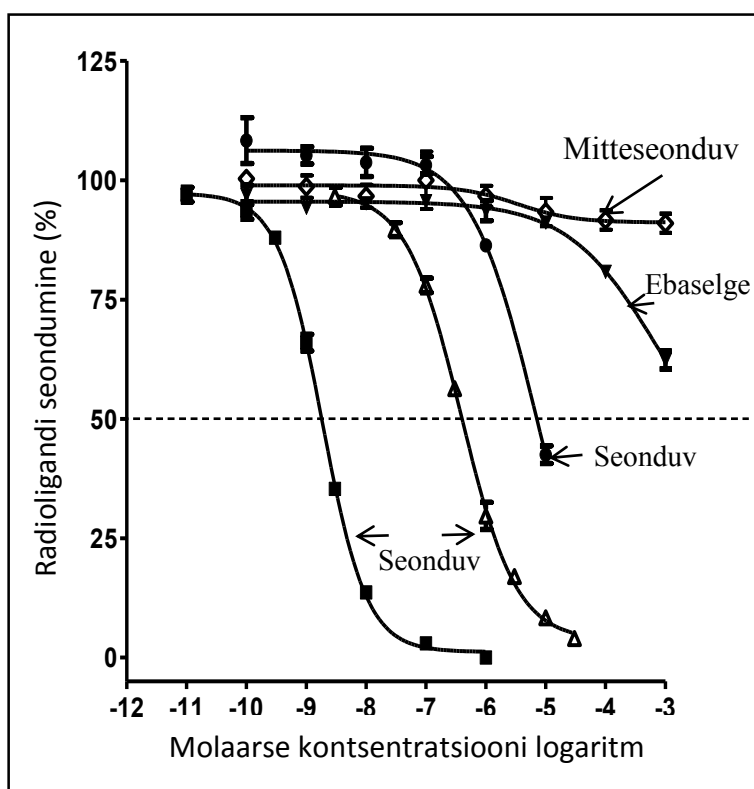
Andmete tõlgendamine

56. Kui kõik nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, loetakse uuritav kemikaal hr-α-ERiga seonduvaks, kui seondumiskõver sobitub andmetega ja katseandmete vahemikku jäävale sõltuvuskõvera madalaimale punktile vastav väärtus on väiksem kui 50 % (joonis 1).
57. Kui kõik nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, loetakse uuritav kemikaal hr-α-ERiga mitteseonduvaks, kui:
- seondumiskõver sobitub andmetega ja katseandmete vahemikku jäävale lähendatud sõltuvuskõvera madalaimale punktile vastav väärtus on suurem kui 75 % või
 - sobiv seondumiskõver puudub ja väikseim silumata keskmine seondumisprotsent eri kontsentratsioonidel saadud andmete hulgas on suurem kui 75 %.
58. Kui ükski eespool kirjeldatud tingimus ei ole täidetud (nt lähendatud sõltuvuskõvera madalaimale punktile vastav väärtus on vahemikus 75–50 %), liigitatakse uuritav kemikaal ebaselgeks.

Tabel 7. Uuritava kemikaali konkureeriva seondumise kõveral põhinevad liigitamiskriteeriumid

Liigitus	Kriteeriumid
Seonduv ^a	Seondumiskõver sobitub andmetega. Katseandmete vahemikku jäävale sõltuvuskõvera madalaimale punktile vastav väärtus on väiksem kui 50 %.
Mitteseonduv ^b	Seondumiskõvera sobitumisel andmetega - on katseandmete vahemikku jäävale lähendatud sõltuvuskõvera madalaimale punktile vastav väärtus suurem kui 75 %. Sobiva seondumiskõvera puudumisel - on väikseim silumata keskmine seondumisprotsent eri kontsentratsioonidel saadud andmete hulgas suurem kui 75 %.
Ebaselge ^c	Ükskõik millises nõuetekohases analüüsitsükli saadud tulemus, mille alusel ei saa uuritavat kemikaali liigitada seonduvaks aineks ega mitteseonduvaks aineks (näiteks vastab lähendatud sõltuvuskõvera madalaim punkt väärtusele 75–50 %).

Joonis 1. Näited uuritava kemikaali liigitamise kohta konkureeriva seondumise kõvera alusel



59. Samas laboris uuritava kemikaaliga läbi viidud mitme analüüsitsükli tulemuste kokkuvõtmiseks omistatakse iga analüüsitsükli tulemusele arvvärtus ja leitakse nende arvvärtuste keskmine, nagu on kirjeldatud tabelis 8. Igas laboris analüüsitsükli tulemuste

koondamisel saadud tulemust võrreldakse iga uuritava kemikaali puhul eeldatava liigitamistulemusega.

Tabel 8. Meetod uuritava kemikaali liigitamiseks samas laboris läbi viidud mitme analüüsitsükli alusel

Iga analüüsitsükli tulemusele väärtuse omistamine	
Liigitus	Arvväärtus
Seonduv	2
Ebaselge	1
Mitteseonduv	0
Liigitamine eri analüüsitsüklites saadud arvvaartuste keskmise alusel	
Liigitus	Arvväärtus
Seonduv	Keskmine $\geq 1,5$
Ebaselge	$0,5 \leq \text{keskmine} < 1,5$
Mitteseonduv	Keskmine $< 0,5$

KATSEPROTOKOLL

60. Vt käesoleva katsemeetodi punkt 24 peatükis „hrER-GA SEONDUMISE KATSE ELEMENDID“.

Liide 3.1

MÕISTETE LOETELU

[³H]E2 – trüitiumiga radiomärgistatud 17β-östradiool.

Analüüsipuhver – 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaVO₃, 10 % glütserooli, 0,2 mM leupeptiin, 1 mM ditiotreitol ja veise seerumi albumiin kontsentratsioonis 10 mg/ml.

Analüüsitsükkel – mikrotiiterplaadi katsekannude täieliku komplekti üheaegne analüüs, mille tulemusena saadakse kogu vajalik teave uuritava kemikaali ja hr-α-ERi omavahelise seondumise iseloomustamiseks (nimelt katsekannu lisatud [³H]17β-östradioli üldkogus, [³H]17β-östradioli maksimaalne seondumismäär hr-α-ERiga seondumisel, mittespetsiifilise seondumise määr ja summaarse seondumise määr uuritava kemikaali eri kontsentratsioonidel). Analüüsitsükklis võidakse igal kontsentratsioonil kasutada ka ainult ühte katsekannu (st paralleeli), ent kuna käesolevas katse-eeskirjas nõutakse kolme paralleelproovi kasutamist, analüüsitakse käesoleval juhul ühes analüüsitsükklis iga kontsentratsiooni puhul kolme katsekannu. Peale selle viiakse käesoleva katse-eeskirja kohaselt iga kemikaaliga läbi kolm iseseisvat (st järjestikust) analüüsitsükklit.

DCC – dekstraaniga kaetud süsi.

E2 – märgistamata 17β-östradiool (inertne).

hr-α-ER – rekombinantne inimese α-östrogeeniretseptor (ligandiga seonduv domeen).

Paralleelproov – Üks mitmest kannust, mis sisaldavad samu koostisaineid samas kontsentratsioonis ning mida analüüsitakse üheaegselt samas analüüsitsükklis. Käesoleva katse-eeskirja puhul analüüsitakse uuritavat kemikaali igal kontsentratsioonil kolmes paralleelis, st igal uuritava kemikaali kontsentratsioonil analüüsitakse üheaegselt kolme paralleelproovi.

Liide 3.2

KONKUREERIVA SEONDUMISE KATSES KASUTATAV MIKROTIITERPLAADI SKEEM

Plaat	Asukoht	Paralleelproov	Kannu liik	Kannu kood	Kontsentratsioon i kood	Konkureeriva aine algkontsentratsioon (M)	hrERI põhilahus (µl)	Puhvri kogus (µl)	Märgise (radioaktiivse E2) kogus (µl)	Lahjendusplaadi lt lisatav kogus (µl)	Lõppruumala (µl)	Konkureeriva aine lõppkontsentratsioon (M)
S	A1	1	Tühi kann	TK	TK1	—	—	—	—	—	—	—
S	A2	2	Tühi kann	TK	TK2	—	—	—	—	—	—	—
S	A3	3	Tühi kann	TK	TK3	—	—	—	—	—	—	—
S	B1	1	Märgistamata E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	B2	2	Märgistamata E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	B3	3	Märgistamata E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	C1	1	Märgistamata E2	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	C2	2	Märgistamata E2	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	C3	3	Märgistamata E2	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	D1	1	Märgistamata E2	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	D2	2	Märgistamata E2	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	D3	3	Märgistamata E2	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	E1	1	Märgistamata E2	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	E2	2	Märgistamata E2	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	E3	3	Märgistamata E2	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	F1	1	Märgistamata E2	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	F2	2	Märgistamata E2	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	F3	3	Märgistamata E2	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	G1	1	Märgistamata E2	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	G2	2	Märgistamata E2	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	G3	3	Märgistamata E2	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	H1	1	Märgistamata E2	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	H2	2	Märgistamata E2	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	H3	3	Märgistamata E2	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	A4	1	Noretünodreel	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	A5	2	Noretünodreel	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	A6	3	Noretünodreel	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B4	1	Noretünodreel	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	B5	2	Noretünodreel	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	B6	3	Noretünodreel	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C4	1	Noretünodreel	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	C5	2	Noretünodreel	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	C6	3	Noretünodreel	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	D4	1	Noretünodreel	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D5	2	Noretünodreel	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D6	3	Noretünodreel	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	E4	1	Noretünodreel	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07
S	E5	2	Noretünodreel	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07
S	E6	3	Noretünodreel	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07
S	F4	1	Noretünodreel	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F5	2	Noretünodreel	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F6	3	Noretünodreel	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	G4	1	Noretünodreel	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	G5	2	Noretünodreel	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	G6	3	Noretünodreel	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06

Konkureeriva seondumise katses kasutatav mikrotiiterplaadi skeem													
Plaat	Asukoht	Paralleelproov	Kannu liik	Kannu kood	Kontsentratsiooni kood	Konkureeriva aine algkontsentratsioon (M)	hrERI põhilahus (µl)	Puhvri kogus (µl)	Märgise (radioaktiivse E2) kogus (µl)	Lahjendusplaadilt lisatav kogus (µl)	Lõppruumala (µl)	Konkureeriva aine lõppkontsentratsioon (M)	
S	H4	1	Noretünodreel	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05	
S	H5	2	Noretünodreel	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05	
S	H6	3	Noretünodreel	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05	
S	A7	1	OTES	N	OTES1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10	
S	A8	2	OTES	N	OTES1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10	
S	A9	3	OTES	N	OTES1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10	
S	B7	1	OTES	N	OTES2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09	
S	B8	2	OTES	N	OTES2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09	
S	B9	3	OTES	N	OTES2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09	
S	C7	1	OTES	N	OTES3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08	
S	C8	2	OTES	N	OTES3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08	
S	C9	3	OTES	N	OTES3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08	
S	D7	1	OTES	N	OTES4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07	
S	D8	2	OTES	N	OTES4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07	
S	D9	3	OTES	N	OTES4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07	
S	E7	1	OTES	N	OTES5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06	
S	E8	2	OTES	N	OTES5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06	
S	E9	3	OTES	N	OTES5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06	
S	F7	1	OTES	N	OTES6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05	
S	F8	2	OTES	N	OTES6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05	
S	F9	3	OTES	N	OTES6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05	
S	G7	1	OTES	N	OTES7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04	
S	G8	2	OTES	N	OTES7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04	
S	G9	3	OTES	N	OTES7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04	
S	H7	1	OTES	N	OTES8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03	
S	H8	2	OTES	N	OTES8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03	
S	H9	3	OTES	N	OTES8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03	
S	A10	1	Summaarne	SS	SS1	-	30	60	10	-	100	-	
S	A11	2	Summaarne	SS	SS2	-	30	60	10	-	100	-	
S	A12	3	Summaarne	SS	SS3	-	30	60	10	-	100	-	
S	B10	4	Summaarne	SS	SS4	-	30	60	10	-	100	-	
S	B11	5	Summaarne	SS	SS5	-	30	60	10	-	100	-	
S	B12	6	Summaarne	SS	SS6	-	30	60	10	-	100	-	
S	C10	1	Märgistamata E2	MSS	S1	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06	
S	C11	2	Märgistamata E2	MSS	S2	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06	
S	C12	3	Märgistamata E2	MSS	S3	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06	
S	D10	4	Märgistamata E2	MSS	S4	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06	
S	D11	5	Märgistamata E2	MSS	S5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06	
S	D12	6	Märgistamata E2	MSS	S6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06	
S	E10	1	Puhvrikontroll	PK	PK1	-	-	100	-	-	100	-	
S	E11	2	Puhvrikontroll	PK	PK2	-	-	100	-	-	100	-	
S	E12	3	Puhvrikontroll	PK	PK3	-	-	100	-	-	100	-	
S	F10	4	Puhvrikontroll	PK	PK4	-	-	100	-	-	100	-	
S	F11	5	Puhvrikontroll	PK	PK5	-	-	100	-	-	100	-	
S	F12	6	Puhvrikontroll	PK	PK6	-	-	100	-	-	100	-	
S	G10*	1	Tühiproov	Radiomärgis	H1	-	90	-	10	-	100	-	
S	G11*	2	Tühiproov	Radiomärgis	H2	-	90	-	10	-	100	-	
S	G12*	3	Tühiproov	Radiomärgis	H3	-	90	-	10	-	100	-	
S	H10*	4	Tühiproov	Radiomärgis	H4	-	90	-	10	-	100	-	
S	H11*	5	Tühiproov	Radiomärgis	H5	-	90	-	10	-	100	-	
S	H12*	6	Tühiproov	Radiomärgis	H6	-	90	-	10	-	100	-	

* Tuleb silmas pida, et kannud tähisega „Radiomärgis“ on inkubeerimise ajal tühjad. Ettenähtud 10 µl lisatakse ainult

stsintillatsioonide loendamiseks.

Konkureeriva seondumise katses kasutatav mikrotiiterplaadi skeem												
Plaat	Asukoht	Paralleelproov	Kannu liik	Kannu kood	Kontsentratsioonikood	Konkureeriva aine algkontsentratsioon (M)	hrERi põhilahus (µl)	Puhvri kogus (µl)	Märgise (radioaktiivse E2) kogus (µl)	Lahjendusplaadil lisatav kogus (µl)	Lõppruumala (µl)	Konkureeriva aine lõppkontsentratsioon (M)
P1	A1	1	Tundmatu nr 1	T1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A2	2	Tundmatu nr 1	T1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A3	3	Tundmatu nr 1	T1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B1	1	Tundmatu nr 1	T1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B2	2	Tundmatu nr 1	T1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B3	3	Tundmatu nr 1	T1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C1	1	Tundmatu nr 1	T1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C2	2	Tundmatu nr 1	T1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C3	3	Tundmatu nr 1	T1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D1	1	Tundmatu nr 1	T1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D2	2	Tundmatu nr 1	T1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D3	3	Tundmatu nr 1	T1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E1	1	Tundmatu nr 1	T1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E2	2	Tundmatu nr 1	T1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E3	3	Tundmatu nr 1	T1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F1	1	Tundmatu nr 1	T1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F2	2	Tundmatu nr 1	T1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F3	3	Tundmatu nr 1	T1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G1	1	Tundmatu nr 1	T1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G2	2	Tundmatu nr 1	T1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G3	3	Tundmatu nr 1	T1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H1	1	Tundmatu nr 1	T1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H2	2	Tundmatu nr 1	T1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H3	3	Tundmatu nr 1	T1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A4	1	Tundmatu nr 2	T2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A5	2	Tundmatu nr 2	T2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A6	3	Tundmatu nr 2	T2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B4	1	Tundmatu nr 2	T2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B5	2	Tundmatu nr 2	T2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B6	3	Tundmatu nr 2	T2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C4	1	Tundmatu nr 2	T2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C5	2	Tundmatu nr 2	T2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C6	3	Tundmatu nr 2	T2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D4	1	Tundmatu nr 2	T2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D5	2	Tundmatu nr 2	T2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D6	3	Tundmatu nr 2	T2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E4	1	Tundmatu nr 2	T2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E5	2	Tundmatu nr 2	T2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E6	3	Tundmatu nr 2	T2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F4	1	Tundmatu nr 2	T2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F5	2	Tundmatu nr 2	T2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F6	3	Tundmatu nr 2	T2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G4	1	Tundmatu nr 2	T2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G5	2	Tundmatu nr 2	T2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G6	3	Tundmatu nr 2	T2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H4	1	Tundmatu nr 2	T2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H5	2	Tundmatu nr 2	T2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H6	3	Tundmatu nr 2	T2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03

Konkureeriva seondumise katses kasutatav mikrotiiterplaadi skeem

Plaat	Asukoht	Paralleelproov	Kannu liik	Kannu kood	Kontsentratsioonikood	Konkureeriva aine algkontsentratsioon (M)	hErI põhilahus (µl)	Puhvri kogus (µl)	Märgise (radioaktiivse E2) kogus (µl)	Lahjendusplaadil lisatav kogus (µl)	Lõppruumala (µl)	Konkureeriva aine lõppkontsentratsioon (M)
P1	A7	1	Tundmatu nr 3	T3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A8	2	Tundmatu nr 3	T3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A9	3	Tundmatu nr 3	T3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B7	1	Tundmatu nr 3	T3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B8	2	Tundmatu nr 3	T3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B9	3	Tundmatu nr 3	T3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C7	1	Tundmatu nr 3	T3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C8	2	Tundmatu nr 3	T3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C9	3	Tundmatu nr 3	T3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D7	1	Tundmatu nr 3	T3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D8	2	Tundmatu nr 3	T3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D9	3	Tundmatu nr 3	T3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E7	1	Tundmatu nr 3	T3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E8	2	Tundmatu nr 3	T3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E9	3	Tundmatu nr 3	T3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F7	1	Tundmatu nr 3	T3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F8	2	Tundmatu nr 3	T3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F9	3	Tundmatu nr 3	T3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G7	1	Tundmatu nr 3	T3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G8	2	Tundmatu nr 3	T3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G9	3	Tundmatu nr 3	T3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H7	1	Tundmatu nr 3	T3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H8	2	Tundmatu nr 3	T3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H9	3	Tundmatu nr 3	T3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A10	1	Kontroll: E2	S	E2maks1	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	A11	2	Kontroll: E2	S	E2maks2	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	A12	3	Kontroll: E2	S	E2maks3	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	B10	1	Kontroll: E2	S	E2IC ₅₀ 1	E2 IC ₅₀ × 10	30	50	10	10	100	E2 IC ₅₀
P1	B11	2	Kontroll: E2	S	E2IC ₅₀ 2	E2 IC ₅₀ × 10	30	50	10	10	100	E2 IC ₅₀
P1	B12	3	Kontroll: E2	S	E2IC ₅₀ 3	E2 IC ₅₀ × 10	30	50	10	10	100	E2 IC ₅₀
P1	C10	1	Kontroll: NE	S	NEmaks1	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	C11	2	Kontroll: NE	S	NEmaks2	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	C12	3	Kontroll: NE	S	NEmaks3	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	D10	1	Kontroll: NE	S	NEIC ₅₀ 1	NE IC ₅₀ × 10	30	50	10	10	100	NE IC ₅₀
P1	D11	2	Kontroll: NE	S	NEIC ₅₀ 2	NE IC ₅₀ × 10	30	50	10	10	100	NE IC ₅₀
P1	D12	3	Kontroll: NE	S	NEIC ₅₀ 3	NE IC ₅₀ × 10	30	50	10	10	100	NE IC ₅₀
P1	E10	1	Märgistamata E2	MSS	S1	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E11	2	Märgistamata E2	MSS	S2	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E12	3	Märgistamata E2	MSS	S3	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F10	4	Märgistamata E2	MSS	S4	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F11	5	Märgistamata E2	MSS	S5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F12	6	Märgistamata E2	MSS	S6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	G10	1	Summaarne	SS	SS1	-	30	60	10	-	100	-
P1	G11	2	Summaarne	SS	SS2	-	30	60	10	-	100	-
P1	G12	3	Summaarne	SS	SS3	-	30	60	10	-	100	-
P1	H10	4	Summaarne	SS	SS4	-	30	60	10	-	100	-
P1	H11	5	Summaarne	SS	SS5	-	30	60	10	-	100	-
P1	H12	6	Summaarne	SS	SS6	-	30	60	10	-	100	-

4. liide

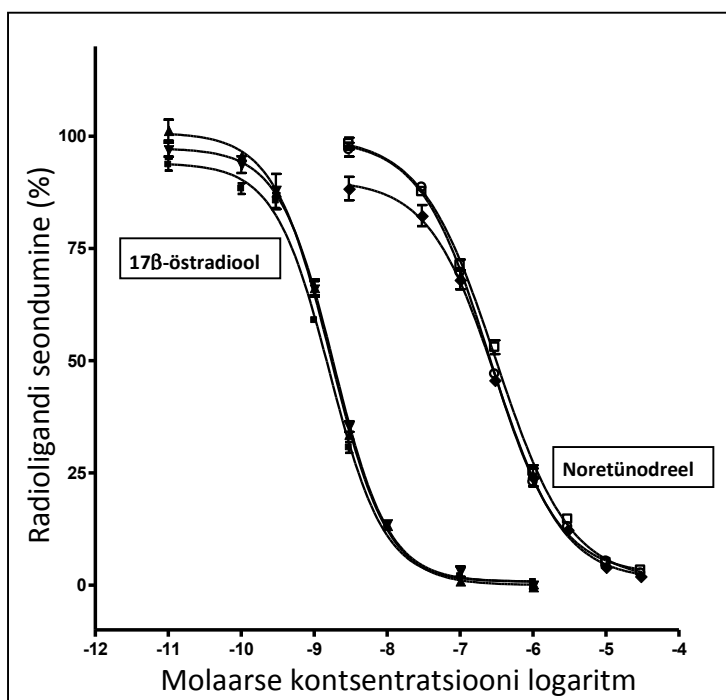
hrER-IL PÕHINEVA KONKUREERIVA SEONDUMISE KATSE ANDMETE ANALÜÜSIMISE KAALUTLUSED

1. hr- α -ERil põhineva konkureeriva seondumise katse käigus mõõdetakse ühel kontsentratsioonil kasutatava [^3H]17 β -östradiooli seondumist üha suuremas kontsentratsioonis esineva uuritava kemikaali juuresolekul. Konkureeriva seondumise kõver esitatakse graafikul nii, et ühel teljel on [^3H]17 β -östradiooli spetsiifiline seundumine ja teisel konkureeriva aine kontsentratsioon ($\log_{10}$ -ühikutes). Uuritava kemikaali kontsentratsioon, mille juures [^3H]17 β -östradiooli spetsiifiline seundumine on 50 % maksimummäärast, on IC_{50} väärtus.

Võrdlusöstrogeeni ja nõrgalt seonduva aine andmete analüüs (1)

2. Kontrollidega saadud andmete edasiseks analüüsimiseks need transformeeritakse (st [^3H]17 β -östradiooli spetsiifilist seondumist väljendatakse protsentides ja kontrollkemikaali kontsentratsiooni logaritmituna). Positiivsete kontrollide (nt võrdlusöstrogeeni ja nõrgalt seonduva aine) $\log \text{IC}_{50}$ hinnangulise väärtuse kindlakstegemiseks tuleks kasutada sobivat mittelineaarse kõvera lähendamise tarkvara, milles rakendatakse neljaparameetrilist Hilli võrrandit (nt BioSoft; GraphPad Prism) (2). Kõnealuste kõverate lähendamisel tuleks kõvera ülemine ja alumine osa, tõus ja $\log \text{IC}_{50}$ üldjuhul jätta piiritlemata. Parima lähenduskõvera leidmiseks tuleks kasutada robustset regressioonanalüüsi, v.a juhul, kui esitatakse põhjendus muu lähenemisviisi kasutamise kohta. Tuleks märkida, millist robustse regressioonanalüüsi meetodit kasutatakse. Andmete korrigeerimine ligandi väljatõrjumise suhtes ei ole hrERil põhinevate FW ja CERI meetodite puhul vajalik, kuid seda võib vajaduse korral kaaluda. Pärast esmast analüüsi tuleks iga seondumiskõver üle vaadata, et veenduda mudeli ja andmete omavahelises sobivuses. Nõrgalt seonduva aine suhtelise seondumisafiinsuse (RBA) leidmiseks võib arvutada nõrgalt seonduva aine $\log \text{IC}_{50}$ väärtuse protsentuaalne osakaal 17 β -östradiooli $\log \text{IC}_{50}$ väärtusest. Positiivsete kontrollidega ja mitteseonduval ainel põhineva kontrolliga saadud tulemusi tuleks hinnata lähtuvalt katsemeetodi tulemuslikkuse näitajatest ja nõuetekohasuse kriteeriumidest, mida on kirjeldatud käesolevas katsemeetodis (punkt 20), 2. liites (FW analüüsimeetod, punktid 41–51) ja 3. liites (CERI analüüsimeetod, punktid 41–51). Võrdlusöstrogeeni ja nõrgalt seonduva ainega läbi viidud kolme analüüsitsükli tulemusi hõlmavad näited on esitatud joonisel 1.

Joonis 1. Võrdlusöstrogeeni ja nõrgalt seonduvat kontrollainet iseloomustavate konkureeriva seondumise kõverate näited

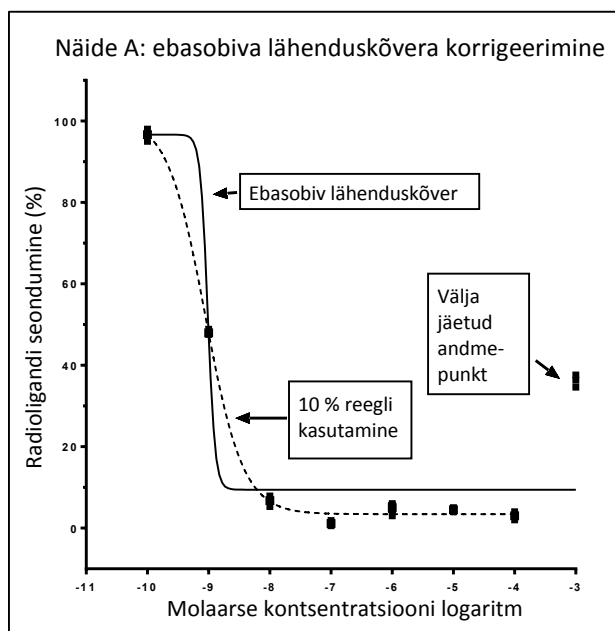


Uuritavate kemikaalide andmete analüüs

3. Kõigi uuritavate kemikaalide andmete analüüsimisel tuleks kasutada astmelist lähenemist, et tagada andmete asjakohane analüüs ja kõigi konkureeriva seondumise kõverate nõuetekohane liigitamine. Uuritava kemikaaliga läbi viidud iga analüüsitsükli puhul tuleks esmalt rakendada täpselt sama standardiseeritud andmeanalüüsi, mida kasutatakse võrdlusöstrogeenil ja nõrgalt seonduval ainel põhinevate kontrollide puhul. Pärast esmast analüüsi tuleks iga analüüsitsükli puhul teha lähenduskõvera parameetrite tehniline kontroll ja visuaalselt hinnata, kui hästi sobituvad seondumisandmed saadud konkureeriva seondumise kõveraga. Tehnilise kontrolli käigus täheldatav kontsentratsioonist sõltuv [³H]17β-östradiooli spetsiifilise seondumise protsentuaalse määra vähenemine, tehniliste paralleelproovide andmete vaheline väike varieeruvus kemikaali kõigil kontsentratsioonidel ja lähenduskõvera parameetrite sarnased väärtused kolmes analüüsitsükklis viitavad sellele, et katse ja andmeanalüüs on läbi viidud nõuetekohaselt. Uuritava kemikaaliga igas analüüsitsükklis saadud andmete hindamisel tuleks lähtuda eksperdihinnangust ja tulemused, mille alusel iga uuritav kemikaal liigitatakse seonduvaks või mitteseonduvaks, peaksid olema teaduslikult põhjendatavad.
4. Aeg-ajalt võib esineda andmeid, mis vajavad täiendavat tähelepanu, et hrERiga seondumise tulemusi oleks võimalik nõuetekohaselt analüüsida ja tõlgendada. Varasemates uuringutes on täheldatud juhtumeid, kus retseptoripõhise konkureeriva seondumise andmete analüüsi võib muuta keeruliseks asjaolu, et spetsiifilise seondumise protsentuaalne määr kemikaali suurimatel kontsentratsioonidel suureneb (joonis 2). See on tuntud probleem, millega on kokku puutunud mitme retseptoripõhist konkureerivat

seondumist käsitleva katse-eeskirja puhul (3). Sellistel juhtudel täheldatakse väiksematel kontsentratsioonidel kontsentratsioonist sõltuvust, kuid kui uuritava kemikaali kontsentratsioon läheneb lahustuvuspiirile, ei suurene $[^3\text{H}]17\beta$ -östradioli väljatõrjumine enam. Sellisel juhul nähtub suurematel kontsentratsioonidel saadud andmetest, et on jõutud analüüsimeetodi bioloogilise kasutuspiirini. Näiteks on seda nähtust paljudel juhtudel seostatud kemikaali mittelahustuvusega ja väljasadenemisega suurel kontsentratsioonil, kuid see võib olla põhjustatud ka asjaolust, et dekstraaniga kaetud süsi ei ole kemikaali suurimatel kontsentratsioonidel võimeline siduma eraldamisetapis enam rohkem radiomärgistatud vaba ligandi. Selliste andmepunktide sissejätmine sigmoidikõvera lähendamisel konkureeriva seondumise katse andmetele võib vahel põhjustada uuritava kemikaali valesti liigitamist ERiga seondumise võime alusel (joonis 2). Sellise olukorra ärahoidmiseks on hrERiga seondumisel põhinevate FW ja CERi meetodite katse-eeskirjas nähtud ette võimalus jätta analüüsist välja andmepunktid, kus $[^3\text{H}]17\beta$ -östradioli spetsiifilist seondumist iseloomustav paralleelproovide andmete keskväärtnus on vähemalt 10 % suurem kui vastav keskväärtnus mõnel väiksemal kontsentratsioonil (sellele viidatakse tavaliselt kui 10 % reeglile). Seda reeglit võib iga kõvera puhul kasutada ainult ühe korra ja seejuures peavad allesjäänud andmed hõlmama vähemalt kuut kontsentratsiooni, et kemikaali oleks võimalik kõvera alusel õigesti liigitada.

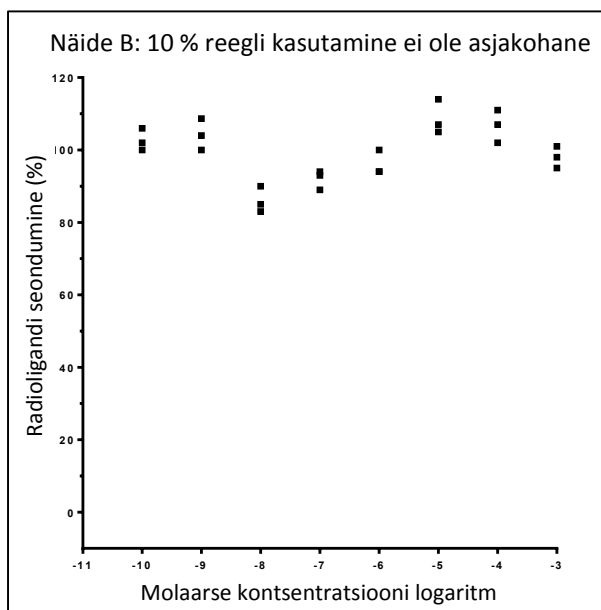
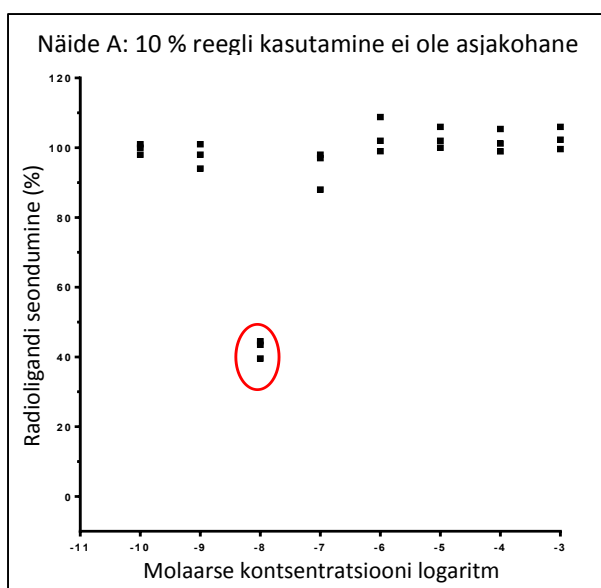
Joonis 2. Näide konkureeriva seondumise kõvera kohta enne ja pärast 10 % reegli kasutamist



- Asjaomaste kõverate korrigeerimisel tuleks 10 % reegli asjakohast kasutamist hoolikalt kaaluda ja kasutada seda üksnes juhul, kui esineb selgeid viiteid selle kohta, et tegemist on hrERiga seonduva ainega. hrERiga seondumisel põhineva FW meetodi kohaste katsete tegemisel valideerimisuringu raames täheldati, et 10 % reegli kasutamisel on mõnikord

soovimatu ja ettenägematu tagajärg. Kemikaalide puhul, mis retseptoriga ei interakteeru (st tõelised mitteseonduvad ained), täheldati tasemel, kus radioligandi seondumine oli umbes 100 %, kasutatud kontsentratsioonide lõikes sageli varieeruvust, mis oli suurem kui 10 %. Kui väikseimale täheldatud väärtusele vastas juhtumisi väike kontsentratsioon, oluaks võimalik kõik sellest suuremal kontsentratsioonil saadud andmed 10 % reegli alusel analüüsist välja jätta, isegi kui kõnealustest andmetest võinuks olla kasu kemikaali liigitamisel mitteseonduvaks. Joonisel 3 on esitatud näited, mille puhul 10 % reegli kasutamine ei ole asjakohane.

Joonis 3. Näited konkureeriva seondumise andmete kohta, mille puhul 10 % reegli kasutamine ei ole asjakohane



Viited

- (1) OECD (2015). Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrER α). Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 226. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (2) Motulsky, H., ja Christopoulos, A. (2003). The law of mass action. Väljaandes: Fitting Models to Biological Data Using Linear and Non-linear Regression. GraphPad Software Inc., San Diego, CA. Lk 187–191. www.graphpad.com/manuals/Prism4/RegressionBook.pdf.
- (3) Laws, S. C., Yavanhxay, S., Cooper, R. L., ja Eldridge, J. C. (2006). Nature of the Binding Interaction for 50 Structurally Diverse Chemicals with Rat Estrogen Receptors. *Toxicol. Sci.* 94(1): 46–56.