

Bruxelles, 25. veljače 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

POP RATNA BILJEŠKA

Od:	Europska komisija
Datum primitka:	22. veljače 2019.
Za:	Glavno tajništvo Vijeća
Br. dok. Kom.:	Annex to D060575/02
Predmet:	Prilog UREDBI KOMISIJE (EU) .../... od XXX o izmjeni Priloga Uredbi (EZ) br. 440/2008 o utvrđivanju ispitnih metoda u skladu s Uredbom (EZ) br. 1907/2006 Europskog parlamenta i Vijeća o registraciji, evaluaciji, autorizaciji i ograničavanju kemikalija (REACH) radi prilagodbe tehničkom napretku

Za delegacije se u prilogu nalazi dokument Annex to D060575/02.

Priloženo: Annex to D060575/02

HR

PRILOG

Prilog Uredbi (EZ) br. 440/2008 mijenja se kako slijedi:

(1) u dijelu B poglavlje B.4. zamjenjuje se sljedećim:

„B.4. AKUTNO NADRAŽIVANJE/NAGRIZANJE KOŽE**UVOD**

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 404 (TG) (2015.). Smjernice OECD-a za ispitivanje kemikalija periodički se preispituju kako bi se osiguralo da odražavaju najbolje dostupne znanstvene spoznaje. Kod preispitivanja Smjernice OECD-a za ispitivanje 404 posebna je pozornost posvećena mogućim poboljšanjima u vezi s dobrobiti životinja i procjeni svih postojećih informacija o ispitivanoj kemikaliji kako bi se izbjegla nepotrebna ispitivanja na laboratorijskim životinjama. Ažurirana verzija Smjernice OECD-a za ispitivanje 404 (izvorno donesena 1981., revidirana 1992., 2002. i 2015.) uključuje upućivanje na Smjernice o integriranim pristupima ispitivanju i procjeni (IATA) za nadraživanje/nagrivanje kože (1.), u kojima se predlaže modularan pristup ispitivanju nadraživanja i nigrivanja kože. U IATA-i je opisano nekoliko modula u kojima se grupiraju izvori informacija i alati za analizu te se pružaju smjernice o i. načinu integriranja i uporabe postojećih podataka o ispitivanju i podataka koji se dobivaju bez ispitivanja za procjenu potencijala kemikalija da uzrokuju nadraživanje i nigrivanje kože te se ii. predlaže pristup kad je potrebno daljnje ispitivanje (1.). Osim toga, u toj se smjernici, prema potrebi, kod početnog ispitivanja *in vivo* preporučuje postupna, a ne istodobna primjena triju ispitnih krpica (*patch test*) na životinju.
2. Definicije za nadraživanje i nigrivanje kože utvrđene su u Dodatku ovoj ispitnoj metodi.

POČETNA RAZMATRANJA

3. Kako bi se osigurala pouzdanost znanstvenih rezultata i dobrobit životinja, *in vivo* ispitivanje ne bi trebalo započeti sve dok se analizom snage dokaza ne ocijene svi raspoloživi podaci koji su relevantni za moguće nigravajuće/nadražujuće djelovanje ispitivane kemikalije na kožu, kako je navedeno u Smjernicama o integriranim pristupima ispitivanju i procjeni za nigrivanje i nadraživanje kože, tj. u trima dijelovima tih smjernica i njihovim odgovarajućim modulima (1.). Ukratko, u dijelu 1. postojeći se podaci razmatraju u sedam modula kojima su obuhvaćeni podaci dobiveni ispitivanjima na

ljudima, podaci dobiveni metodom *in vivo*, podaci dobiveni metodom *in vitro*, podaci o fizikalno-kemijskim svojstvima (npr. pH-vrijednost, osobito jaka kiselost ili lužnatost) i metode koje ne uključuju ispitivanje. U dijelu 2. provodi se analiza snage dokaza. Ako analiza snage dokaza i dalje nije jednoznačna, trebao bi se provesti dio 3. s dodatnim ispitivanjem, pri čemu se počinje s *in vitro* metodama, a *in vivo* ispitivanja koriste se kao posljednja opcija. Ta bi analiza stoga trebala smanjiti potrebu za *in vivo* ispitivanjem nagrizajućeg/nadražujućeg djelovanja ispitivanih kemikalija na kožu za koje u pogledu te dvije krajnje točke već postoji dovoljno dokaza na temelju drugih istraživanja.

NAČELO *IN VIVO* ISPITIVANJA

4. Jedna doza ispitivane kemikalije nanosi se na kožu pokusne životinje; netretirani dijelovi kože ispitne životinje služe za kontrolu. Stupanj nadraženosti/nagriženosti očitava se i bilježi u određenim vremenskim intervalima i zatim se dodatno opisuje kako bi se mogla napraviti kompletna ocjena učinaka. Istraživanje treba trajati dovoljno dugo da bude moguće ocijeniti jesu li uočeni učinci reverzibilni ili ireverzibilni.
5. Životinje koje pokazuju stalne znakove jakog stresa i/ili boli u bilo kojoj fazi ispitivanja treba humano usmrtiti te ispitivanu kemikaliju s tim u skladu ocijeniti. Kriteriji za donošenje odluke o humanom usmrćivanju životinja koje su na umoru i koje jako pate navedeni su u zasebnom dokumentu sa smjernicama (2.).

PRIPREME ZA *IN VIVO* ISPITIVANJE

Odabir životinjske vrste

6. Kao pokusne životinje preporučuje se upotrijebiti albino kuniće, i to zdrave, mlade odrasle primjerke. U slučaju da se koristi neka druga životinjska vrsta, treba navesti razloge za to.

Priprema životinja

7. Otprilike 24 sata prije ispitivanja životinjama se s leđnog dijela trupa uklanja dlaka šišanjem neposredno uz kožu. Pritom treba paziti da se koža ne ošteti te treba koristiti samo životinje sa zdravom, netaknutom kožom.
8. Kod nekih su sojeva kunića određeni dijelovi kože prekriveni vrlo gustom dlakom, što je posebno izraženo u određeno doba godine. Na takvima se gusto obraslim dijelovima kože ispitivanja ne bi smjela obavljati.

Uvjeti smještaja i hranjenja

9. Životinje treba smjestiti pojedinačno. Kad su u pitanju kunići, temperatura prostorije u kojoj se drže pokusne životinje treba biti 20 °C (± 3 °C). Iako bi relativna vlaga trebala biti najmanje 30 % te je poželjno da ne prijeđe 70 %, osim tijekom čišćenja prostorije, cilj bi trebao biti 50–60 %. Rasvjeta bi trebala biti umjetna uz izmjenu 12 sati svjetla i 12 sati

mraka. Kad je riječ o hranjenju, može se primjenjivati standardna hrana za laboratorijske životinje uz neograničene količine vode za piće.

ISPITNI POSTUPAK

Primjena ispitivane kemikalije

10. Ispitivanu kemikaliju treba nanijeti na malu površinu (približno 6 cm²) kože i prekriti gazenom krpicom koju treba pričvrstiti nenadražujućom ljepljivom trakom. U slučajevima kad izravno nanošenje nije moguće (npr. tekućine ili neke paste) ispitivanu kemikaliju prvo treba nanijeti na gazenu krpicu koja se zatim stavlja na kožu. Krpicu treba držati labavo u kontaktu s kožom s pomoću odgovarajućeg poluokluzivnog obloga tijekom cijelog razdoblja izlaganja. Ako se ispitivana kemikalija nanosi na krpicu, na kožu je treba pričvrstiti na takav način da se ostvari dobar kontakt između kemikalije i kože te da kemikalija bude jednoliko raspoređena po koži. Životinju treba spriječiti da dosegne krpicu te da kemikaliju unese u organizam gutanjem ili udisanjem.
11. Tekuće ispitivane kemikalije obično se koriste nerazrijeđene. Kad se ispituju krute tvari (koje mogu biti usitnjene u prah ako se smatra potrebnim), ispitivanu kemikaliju treba navlažiti najmanjom mogućom količinom vode (ili, prema potrebi, nekim drugim odgovarajućim nosačem) koja je dovoljna da omogući dobar kontakt s kožom. Kad se koriste drugi nosači, a ne voda, potencijalni utjecaj nosača na nadraženost kože izazvanu ispitivanom kemikalijom treba biti minimalan ili nikakav.
12. Na kraju razdoblja izlaganja, koje obično traje četiri sata, ostatke ispitivane kemikalije po mogućnosti treba ukloniti vodom ili odgovarajućim otapalom, ne mijenjajući nastao odgovor ili integritet površinskog sloja kože (epiderme).

Visina doze

13. Na pripremljeni dio kože nanosi se doza od 0,5 ml tvari u tekućem obliku ili 0,5 g u krutom obliku ili u obliku paste.

Početno ispitivanje (ispitivanje nadražujućih/nagrizajućih svojstava *in vivo* na jednoj životinji)

14. Ako se na temelju analize snage dokaza ili prethodnog *in vitro* ispitivanja utvrdi da je ispitivana kemikalija korozivna, nadražujuća ili nerazvrstana, daljnje *in vivo* ispitivanje obično nije potrebno. Međutim, u slučajevima u kojima se smatra da su potrebni dodatni podaci provodi se *in vivo* ispitivanje u kojem se prvo upotrebljava jedna životinja i primjenjuje se sljedeći pristup. Na kožu jedne životinje u slijedu se stavljaju najviše tri krpice. Prva se krpica uklanja nakon tri minute. Ako se na koži ne uoči jaka reakcija, na drugo se mjesto stavlja druga krpica koja se uklanja nakon jednog sata. Ako se na temelju opažanja u ovoj fazi može zaključiti da ne bi bilo nehumano produžiti izlaganje, stavlja se treća krpica koja se uklanja nakon četiri sata i utvrđuje stupanj odgovora.

15. Ako se nakon bilo kojeg od tri izlaganja u nizu opazi nagrizajuće djelovanje, ispitivanje se odmah prekida. Ako se nakon uklanjanja posljednje krpice ne uoči nagrizajuće djelovanje, životinja se opaža 14 dana, osim u slučaju da do nagrizanja dođe ranije.
16. U slučajevima kad se ne očekuje da će ispitivana kemikalija uzrokovati nagrizanje, ali da može biti nadražujuća, treba na jednu životinju staviti jednu krpicu i držati je četiri sata.

Potvrđni test (ispitivanje nadraživanja kože *in vivo* na dodatnim životinjama)

17. Ako se tijekom početnog ispitivanja ne opazi nagrizajući učinak, nadražujući ili negativan odgovor treba potvrditi ispitivanjem na najviše dvije dodatne životinje, od kojih na svaku treba primijeniti po jednu krpicu u trajanju od četiri sata. Ako se tijekom početnog ispitivanja opazi nadražujući učinak, potvrdno se ispitivanje može izvesti sekvencijski ili istodobnim izlaganjem dviju dodatnih životinja. U iznimnim slučajevima kod kojih se početno ispitivanje ne provodi, može se tretirati dvije ili tri životinje jednom krpicom koja se nakon četiri sata uklanja. Ako pri korištenju dviju životinja obje pokažu isti odgovor, daljnje ispitivanje nije potrebno. U suprotnom, ispitivanju se podvrgava i treća životinja. Dvosmislene odgovore ponekad treba ocijeniti ispitivanjem na dodatnim životinjama.

Razdoblje opažanja

18. Opažanje treba trajati dovoljno dugo da se u potpunosti može utvrditi reverzibilnost uočenih učinaka. Međutim, pokus treba prekinuti u bilo kojem trenutku ako životinja pokazuje trajne znakove jake boli ili stresa. Da bi se utvrdila reverzibilnost učinaka, životinje treba opažati do 14 dana nakon uklanjanja krpica. Ako se reverzibilnost utvrdi prije isteka 14 dana, pokus odmah treba prekinuti.

Klinička opažanja i stupnjevanje reakcija na koži

19. Sve životinje treba pregledati kako bi se vidjelo pokazuju li znakove crvenila kože (eritema) ili otekline (edema) i to nakon 60 minuta, a zatim nakon 24, 48 i 72 sata po skidanju krpice. Za početno ispitivanje na jednoj životinji mjesto ispitivanja pregledava se i odmah nakon uklanjanja krpice. Stupanj reakcije na koži utvrđuje se i bilježi prema stupnjevima opisanim u tablici u nastavku. Ako se na koži pojavi oštećenje koje se nakon 72 sata ne može definirati kao nadraženosť ili nagriženost, možda će za utvrđivanje reverzibilnosti učinaka biti potrebno opažanje u trajanju od 14 dana. Uz opažanja povezana s nadraženošću kože treba detaljno opisati i zabilježiti sve lokalne toksične učinke, kao što je isušivanje kože, i sve sustavne štetne učinke (npr. klinički znakovi toksičnosti i promjene u tjelesnoj masi). U slučaju dvosmislenih odgovora trebalo bi razmotriti mogućnost histopatološkog pregleda.
20. Stupnjevanje odgovora na koži po svojoj je prirodi subjektivno. Da bi se poboljšala usklađenost u stupnjevanju odgovora na koži te da bi se u tom smislu pomoglo ispitnim laboratorijima i onima koji obavljaju opažanja i tumače rezultate, osoblje koje obavlja ta

opažanja treba proći odgovarajuće osposobljavanje za primjenu sustava ocjenjivanja (vidjeti tablicu u nastavku). Od pomoći bi mogao biti ilustrirani priručnik za utvrđivanje stupnja nadraženosti i drugih lezija kože (3.).

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

21. Rezultate istraživanja, koji obuhvaćaju sve stavke iz stavka 24., treba rezimirati u obliku tablice u konačnom izvješću o ispitivanju.

Ocjena rezultata

22. Pokazatelje nadraženosti kože treba ocijeniti ovisno o vrsti i stupnju lezija te o njihovoj reverzibilnosti ili ireverzibilnosti. Pojedinačni rezultati ne predstavljaju apsolutni standard za nadražujuća svojstva određenog ispitnog materijala, s obzirom na to da se ocjenjuju i drugi njegovi učinci. Umjesto toga, na pojedinačne rezultate treba gledati kao na referentne vrijednosti koje se ocjenjuju u kombinaciji sa svim ostalim opažanjima iz istraživanja.

23. Kod ocjenjivanja nadraženosti kože treba uzeti u obzir reverzibilnost lezija. Ako reakcije kao što su alopecija (ograničena površina), hiperkeratoza, hiperplazija i perutanje ostanu prisutne do kraja 14-dnevnog razdoblja opažanja, ispitivanu kemikaliju treba smatrati nadražujućom.

Izvješće o ispitivanju

24. Izvješće o ispitivanju mora sadržavati sljedeće informacije:

Razlozi za ispitivanje in vivo:

- analiza snage dokaza postojećih podataka dobivenih prethodnim ispitivanjima, uključujući rezultate dobivene primjenom strategije sekvencijskog ispitivanja,
- opis relevantnih podataka dobivenih ranijim ispitivanjima,
- podaci dobiveni u svakoj fazi primijenjene strategije ispitivanja,
- opis obavljenih *in vitro* ispitivanja, uključujući pojedinosti o postupcima i rezultate dobivene ispitivanjem ispitivanih/referentnih tvari,
- analiza snage dokaza radi provođenja istraživanja *in vivo*.

Ispitivana kemikalija:

- tvar s jednim sastojkom: kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv, CAS broj, SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula, čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi, itd.,

- tvar s više sastojaka, smjesa i tvari nepoznatog ili promjenjivog sastava, složeni reakcijski proizvodi ili biološki materijali (UVCB): opis (koliko je to moguće) kemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativnog udjela i relevantnih fizikalno-kemijskih svojstava sastojaka,
- fizički izgled, topljivost u vodi i druga relevantna fizikalno-kemijska svojstva,
- izvor, broj serije, ako su dostupni,
- tretiranje ispitivane kemikalije/kontrolne tvari prije ispitivanja, ako je primjenljivo (npr. grijanje, mljevenje),
- stabilnost ispitivane kemikalije, rok uporabe ili datum za ponovnu analizu ako je poznat,
- uvjeti skladištenja.

Nosač:

- identifikacijska oznaka, koncentracija (prema potrebi), upotrijebljeni volumen,
- obrazloženje za odabir nosača.

Ispitne životinje:

- upotrijebljena vrsta/soj, razlozi za upotrebu drugih životinja umjesto albino kunića,
- broj životinja svakog spola,
- tjelesna masa pojedinačnih životinja na početku i na kraju ispitivanja,
- dob na početku istraživanja,
- podrijetlo životinja, uvjeti smještaja, prehrana itd.

Ispitni uvjeti:

- tehnika pripremanja mjesta na koje će se staviti krpica,
- pojedinosti o upotrijebljenim materijalima i tehnici stavljanja krpice,
- pojedinosti o pripremi ispitivane kemikalije, nanošenju i uklanjanju.

Rezultati:

- tablični prikaz stupnjeva nadražujućeg/nagrizajućeg odgovora za svaku životinju u svakoj vremenskoj točki u kojoj se provodi opažanje,
- opis svih uočenih lezija,
- detaljni opis vrste i stupnja uočene nadraženosti ili nagrizanja i svi histopatološki nalazi,
- opis drugih štetnih lokalnih (npr. isušivanje kože) i sustavnih učinaka koji se javljaju pored nadraživanja i nagrizanja kože.

Rasprava o rezultatima

Zaključci

LITERATURA

1. OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
2. OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, studeni 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), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

TABLICA: UTVRĐIVANJE STUPNJA REAKCIJE NA KOŽI**Nastanak eritema i eshara (crvenila kože i krasta)**

Nema eritema	0
Lagano izraženi eritemi (jedva uočljivi).....	1
Dobro definirani eritemi.....	2
Srednje do jako izraženi eritemi.....	3
Jako izraženi eritemi (tamno crvenilo, poput boje govedine) uz stvaranje eshara koji sprečavaju utvrđivanje stupnja eritema... 4	
Najviši mogući stupanj: 4	

Nastanak edema

Nema edema.....	0
Vrlo lagani edemi (jedva uočljivi).....	1
Lagani edemi (rubovi površine izdignuti i jasno definirani).....	2
Srednji edemi (izdignuti približno 1 mm).....	3
Jaki edemi (izdignuti više od 1 mm i šire se izvan površine izlaganja)....	4
Najviši mogući stupanj: 4	

U slučaju dvosmislenih odgovora može se obaviti histopatološki pregled.

Dodatak

DEFINICIJE

Kemikalija je tvar ili smjesa.

Nadraživanje kože je uzrokovanje reverzibilnog oštećenja kože nakon primjene ispitivane kemikalije u trajanju do najviše četiri sata.

Nagrizanje kože je uzrokovanje ireverzibilnog oštećenja kože, odnosno vidljive nekroze koja kroz epidermu prodire u dermu nakon što je ispitivana kemikalija primjenjivana u trajanju do najviše četiri sata. Nagrizanje je obično popraćeno čirevima, krvarenjem, krvavim krastama, a do kraja razdoblja promatranja od 14 dana i promjenom boje zbog izbjeljivanja kože, potpunim gubitkom dlake na zahvaćenim dijelovima te ožiljcima. Za ocjenjivanje sumnjivih lezija treba razmotriti mogućnost histopatoloških pretraga.

Ispitivana kemikalija je svaka tvar ili smjesa koja se ispituje ovom ispitnom metodom.”;

(2) u dijelu B poglavlje B.17. zamjenjuje se sljedećim:

„B.17. *IN VITRO* ISPITIVANJA GENSKIH MUTACIJA STANICA SISAVACA UPOTREBOM GENA HPRT I XPRT

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara smjernici OECD-a za ispitivanje 476 (2016.). Ispitne metode periodično se preispituju uzimajući u obzir znanstveni napredak, promjene regulatornih potreba i dobrobit životinja. U trenutačnoj revidiranoj verziji ispitne metode B.17. uzima se u obzir gotovo 30 godina iskustva s ovim ispitivanjem te je ona rezultat razvoja posebne nove metode namijenjene *in vitro* ispitivanjima genskih mutacija stanica sisavaca upotrebom gena za timidin kinazu. Ispitna metoda B.17. dio je niza ispitnih metoda u području genetske toksikologije. OECD je sastavio dokument u kojem se daju sažete informacije o ispitivanju u području genetske toksikologije te pregled novijih promjena smjernica OECD-a za ispitivanje genotoksičnosti (1.).
2. Svrha je *in vitro* ispitivanja genskih mutacija stanica sisavaca otkrivanje genskih mutacija induciranih kemikalijama. Stanične linije koje se upotrebljavaju u tim ispitivanjima mjere napredne mutacije na reporterskim genima, točnije na genu za endogenu hipoksantins-gvanin-fosforibozil-transferazu (Hprt kod stanica glodavaca, HPRT kod ljudskih stanica; u ovoj se ispitnoj metodi zajednički nazivaju gen Hprt i HPRT test) i transgenu za ksantins-gvanin-fosforibozil-transferaze (gpt) (dalje u tekstu „XPRT test”). Testovi mutacija HPRT i XPRT otkrivaju različite spektre genetskih pojava. Uz mutacije otkrivene HPRT testom (npr. supstitucije baznih parova, pomaci okvira očitavanja, manje delecije i insercije), autosomalna lokacija transgena gpt može omogućiti otkrivanje mutacija koje su rezultat velikih delecija i moguće mitotske rekombinacije koja nije otkrivena HPRT testom jer se gen Hprt nalazi na X-kromosomu (2., 3., 4., 5., 6. i 7.). XPRT se trenutačno upotrebljava manje nego HPRT test u regulatorne svrhe.
3. Upotrijebljene definicije navedene su u Dodatku 1.

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

4. Ispitivanja koja se obavljaju *in vitro* obično zahtijevaju primjenu egzogenog izvora metaboličke aktivacije. Egzogenim sustavom metaboličke aktivacije ne oponašaju se u cijelosti *in vivo* uvjeti.
5. Trebalo bi voditi računa o tome da se izbjegnu uvjeti koji bi doveli do lažno pozitivnih rezultata (odnosno moguće interakcije s ispitnim sustavom) koji nisu uzrokovani izravnom interakcijom ispitivanih kemikalija i genetskog materijala stanice; takvi uvjeti uključuju promjene pH-vrijednosti ili osmolalnosti (8., 9. i 10.), interakciju s komponentama medija (11. i 12.) ili prekomjerne razine citotoksičnosti (13.). Citotoksičnost koja premašuje

preporučene najviše razine citotoksičnosti, kako su definirane u stavku 19., smatra se prekomjernom za HPRT test.

6. Prije nego što se ova ispitna metoda primijeni na smjesi radi dobivanja podataka za predviđenu regulatornu svrhu, potrebno je razmotriti mogu li se te, ako se mogu, zašto se njome mogu dobiti primjereni rezultati za tu svrhu. Ta razmatranja nisu potrebna ako postoji regulatorni zahtjev za ispitivanje smjese.

NAČELO ISPITIVANJA

7. Mutirane stanice kod kojih nema aktivnosti enzima Hprt u HPRT testu ili aktivnosti enzima xprt u XPRT testu otporne su na citostatske učinke purin analognog 6-tiogvanina (TG). Stanice koje sadržavaju dosta Hprta (u HPRT testu) ili gpta (u XPRT testu) osjetljive su na TG, što uzrokuje inhibiciju staničnog metabolizma i sprečava daljnju diobu stanica. Tako se mutirane stanice uz prisutnost TG-a mogu razmnožavati, a normalne stanice koje sadržavaju enzim Hprt (u HPRT testu) ili gpt (u XPRT testu) ne mogu.
8. Stanice u suspenziji ili jednoslojnim kulturama izlažu se u odgovarajućem trajanju ispitivanoj kemikaliji (od tri sata do šest sati), s egzogenim izvorom metaboličke aktivacije i bez njega (vidjeti stavak 14.), te se zatim supkultiviraju da bi se utvrdila citotoksičnost i omogućila fenotipska ekspresija prije selekcije mutanata (14., 15., 16. i 17.). Citotoksičnost se utvrđuje relativnom stopom preživljavanja, tj. učinkovitošću kloniranja koja se mjeri odmah nakon tretiranja i prilagođava za mogući gubitak stanica tijekom tretiranja u usporedbi s negativnom kontrolom (stavak 18. i Dodatak 2.). Tretirane se kulture drže u mediju za rast tijekom dovoljno dugog vremenskog razdoblja koje je karakteristično za svaki tip stanice, kako bi se omogućila gotovo optimalna fenotipska ekspresija induciranih mutacija (obično najmanje 7–9 dana). Nakon fenotipske ekspresije utvrđuje se učestalost pojave mutanata nasađivanjem poznatog broja stanica u medij koji sadržava selektivni agens za otkrivanje kolonija mutanata, a u medij bez selektivnog agensa za određivanje učinkovitosti kloniranja (vijabilnost). Nakon odgovarajućeg razdoblja inkubacije kolonije se prebroje. Učestalost pojave mutanata računa se na temelju broja kolonija mutanata koji se ispravlja učinkovitošću kloniranja u trenutku selekcije mutanata.

OPIS METODE

Pripreme

Stanice

9. Vrste stanica koje se koriste u testovima HPRT i XPRT trebale bi imati dokazanu osjetljivost na kemijske mutagene, visoku učinkovitost kloniranja, stabilan kariotip i stabilnu učestalost pojave spontanij mutanata. Stanice koje se najčešće upotrebljavaju za

HPRT test uključuju linije stanica kineskog hrčka CHO, CHL i V79, stanice limfoma miša L5178Y te stanice ljudskih limfoblastoidnih stanica TK6 (18. i 19.). Za XPRT test upotrebljavaju se stanice AS52 dobivene od stanica CHO koje sadržavaju transgen gpt (i kod kojih je izbrisan gen Hprt) (20. i 21.); HPRT test ne može se provesti na stanicama AS52 jer je izbrisan gen hprt. Uporaba drugih staničnih linija trebala bi se opravdati i validirati.

10. Rutinski bi trebalo provjeravati stabilnost modalnog broja kromosoma staničnih linija te odsustvo kontaminacije mikoplazmom (22. i 23.), a stanice ne bi trebalo upotrebljavati ako su kontaminirane ili ako je promijenjen modalni broj kromosoma. Treba utvrditi uobičajeno trajanje staničnog ciklusa koje se upotrebljava u ispitnom laboratoriju i ono treba biti u skladu s objavljenim značajkama stanica. Trebalo bi provjeriti i učestalost pojave spontanih mutanata u glavnoj zalihi stanica te zalihi ne bi trebalo upotrebljavati ako učestalost pojave mutanata nije prihvatljiva.
11. Prije upotrebe u ovom ispitivanju iz kultura će možda trebati odstraniti mutirane stanice koje već postoje, npr. uzgojem u HAT mediju za HPRT test i MPS mediju za XPRT test (5. i 24.) (vidjeti Dodatak 1.). Te pročišćene stanice mogu se krioprezervirati i zatim odmrznuti za uporabu kao radni uzorci. Radni uzorak koji se odmrzne može se upotrebljavati za ispitivanje nakon što se dosegne normalno vrijeme dupliciranja. Pri provedbi XPRT testa za rutinsku kulturu stanica AS52 trebali bi se primjenjivati uvjeti kojima se osigurava održavanje transgena gpt (20.).

Uvjeti koje moraju zadovoljavati podloge i kulture

12. Za održavanje kultura trebalo bi primjenjivati prikladne uvjete za medije za uzgoj kulture i uvjete inkubacije (posude za kulture, vlažne atmosferske uvjete od 5 % CO₂ i temperaturu inkubacije od 37 °C). Stanične kulture uvijek bi se trebale održavati u uvjetima kojima se osigurava da one rastu u logaritamskoj fazi. Posebno je važno odabrati uvjete medija i kultura kojima se osiguravaju optimalni rast stanica tijekom razdoblja ekspresije i optimalna učinkovitost kloniranja kako mutiranih tako i nemutiranih stanica.

Priprema kultura

13. Stanične linije razmnožavaju se iz matičnih kultura te se nasađuju u medij za uzgoj kulture takvom gustoćom da stanice u suspenziji ili jednoslojnoj kulturi nastave eksponencijalno rasti tijekom razdoblja tretiranja i ekspresije (npr. treba izbjegavati konfluenciju kod stanica koje rastu kao jednoslojna kultura).

Metabolička aktivacija

14. Kod uporabe stanica s neodgovarajućom endogenom sposobnošću metabolizma trebalo bi upotrebljavati egzogene sustave metaboličkog djelovanja. Sustav koji se najčešće upotrebljava i automatski preporučuje, osim ako je drukčije opravdano, jest

postmitohondrijska frakcija s dodanim kofaktorom (S9), pripravljena od jetre glodavaca (obično štakora), koja je bila tretirana sredstvima za enzimsku indukciju, kao što je Aroclor 1254 (25., 26., 27. i 28.), ili mješavinom fenobarbitala i β -naftoflavona (29., 30., 31. i 32.). Upotreba navedene smjese nije u suprotnosti sa Stockholmskom konvencijom o postojanim organskim onečišćujućim tvarima (33.) i dokazano je da je za indukciju oksidaza s miješanom funkcijom jednako učinkovita kao Aroclor 1254 (29. i 31.). Frakcija S9 obično se upotrebljava u koncentracijama u rasponu od 1 do 2 % (v/v), ali može se povećati na 10 % (v/v) u konačnom ispitnom mediju. Na odabir vrste i koncentracije upotrijebljenog egzogenog sustava metaboličke aktivacije ili metaboličkog pokretača može utjecati kategorija tvari koje se ispituju (34., 35. i 36.).

Priprema ispitivane kemikalije

15. Krute ispitivane kemikalije trebalo bi pripremiti u prikladnim otapalima i prema potrebi razrijediti prije tretiranja stanica (vidjeti stavak 16.). Tekuće ispitivane kemikalije mogu se dodati izravno u ispitni sustav i/ili razrijediti prije tretiranja ispitnog sustava. Plinovite ili hlapljive ispitivane kemikalije trebalo bi ispitivati nakon što se prikladno izmijene standardni protokoli, kao što je tretiranje u hermetički zatvorenim posudama za kulture (37. i 38.). Ispitivanu kemikaliju potrebno je pripremiti neposredno prije tretiranja, osim ako je prema podacima o stabilnosti prihvatljivo skladištenje.

ISPITNI UVJETI

Otapala

16. Otapalo bi trebalo odabrati tako da se optimizira topljivost ispitivanih kemikalija bez negativnih učinaka na provedbu ispitivanja, kao što su npr. promjena rasta stanica, učinak na integritet ispitivane kemikalije, reagiranje s posudama za kulture ili oštećenje sustava metaboličke aktivacije. Preporučuje se da se, kad je god moguće, prvo uzme u obzir upotreba vodenog otapala (ili medija za uzgoj kulture). Uobičajena su otapala, na primjer, voda i dimetil sulfoksid. Općenito, organska otapala ne bi trebala prelaziti 1 % (v/v), a vodena otapala (fiziološka otopina ili voda) ne bi trebala prelaziti 10 % (v/v) u mediju za završno tretiranje. Ako se upotrebljavaju neuobičajena otapala (npr. etanol ili aceton), potrebno je opravdati njihovu uporabu podacima iz kojih se vidi da su ta otapala kompatibilna s ispitivanim kemikalijama i ispitnim sustavom te da ne djeluju genotoksično pri upotrijebljenoj koncentraciji. Ako ne postoje ti popratni podaci, važno je dodati netretirane kontrole (vidjeti Dodatak 1.) kako bi se dokazalo da odabrano otapalo ne inducira štetne ili mutagene učinke.

Mjerenje citotoksičnosti i odabir koncentracija izlaganja

17. Pri utvrđivanju najviše koncentracije ispitivane kemikalije trebalo bi izbjegavati koncentracije koje imaju sposobnost izazivanja lažno pozitivnih odgovora, kao što su koncentracije koje izazivaju prekomjernu citotoksičnost (vidjeti stavak 20.), taloženje u

mediju za uzgoj kulture (vidjeti stavak 21.) ili znatne promjene pH-vrijednosti ili osmolalnosti (vidjeti stavak 5.). Ako ispitivana kemikalija u trenutku dodavanja uzrokuje znatnu promjenu pH-vrijednosti medija, pH-vrijednost može se prilagoditi puferiranjem medija za završno tretiranje kako bi se izbjegli lažno pozitivni rezultati te održali primjereni uvjeti za uzgoj kulture.

18. Odabir koncentracije temelji se na citotoksičnosti i drugim razmatranjima (vidjeti stavke 20.–22.). Iako ocjena citotoksičnosti u početnom ispitivanju može biti korisna za bolje određivanje koncentracija koje će se upotrebljavati u glavnom pokusu, početno ispitivanje nije potrebno. Čak i ako se provodi početna ocjena citotoksičnosti, i dalje je obvezno mjerenje citotoksičnosti za svaku kulturu u glavnom pokusu. Citotoksičnost bi se trebala ocjenjivati primjenom relativne stope preživljavanja, tj. učinkovitošću kloniranja stanica koje se nasade odmah nakon tretiranja, prilagođeno za mogući gubitak stanica tijekom tretiranja, na temelju broja stanica, u usporedbi s prilagođenom učinkovitošću kloniranja u negativnim kontrolama (kojima se dodjeljuje stopa preživljavanja od 100 %) (formulu vidjeti u Dodatku 2.).
19. Potrebno je ocijeniti najmanje četiri ispitne koncentracije (ne uključujući kontrolu s otapalom i pozitivnu kontrolu) koje ispunjavaju kriterije prihvatljivosti (odgovarajuća citotoksičnost, broj stanica itd.). Iako se preporučuje upotreba usporednih kultura, za svaku se ispitivanu koncentraciju može upotrijebiti samo jedna tretirana kultura ili više njezinih ponovljenih uzoraka. Rezultati dobiveni iz više neovisnih ponovljenih kultura pri određenoj koncentraciji trebali bi se navoditi odvojeno, ali mogu se objediniti radi analize podataka (17.). Za ispitivane kemikalije koje pokazuju malu ili nikakvu citotoksičnost uglavnom će biti prikladne približno dvostruke ili trostruke koncentracije. Ako se pojavi citotoksičnost, odabranim bi ispitnim koncentracijama trebalo obuhvatiti raspon od koncentracije koja uzrokuje citotoksičnost do koncentracija pri kojima je citotoksičnost umjerena, niska ili nepostojeća. Mnoge ispitivane kemikalije imaju oštre krivulje odgovora na koncentraciju te će za obuhvaćanje cijelog raspona citotoksičnosti ili detaljno istraživanje odnosa koncentracije i odgovora možda biti potrebno upotrijebiti bliže raspoređene koncentracije i više od četiri koncentracije, posebno u situacijama u kojima je potrebno ponavljanje pokusa (vidjeti stavak 43.). Upotreba više od četiri koncentracije može biti osobito važna kad se upotrebljava jedna kultura.
20. Ako se maksimalna koncentracija temelji na citotoksičnosti, najvećom koncentracijom trebala bi se nastojati ostvariti relativna stopa preživljavanja od 20 do 10 %. Trebalo bi s oprezom tumačiti pozitivne rezultate koji se nalaze samo pri relativnoj stopi preživljavanja od 10 % ili manjoj (stavak 43.).
21. Za slabo topljive ispitivane kemikalije koje nisu citotoksične pri koncentracijama nižima od najniže koncentracije pri kojoj kemikalija nije topljiva najviša bi analizirana koncentracija trebala dovesti do zamućenosti ili taloga vidljivog golim okom ili inverznim

mikroskopom na kraju tretiranja ispitivanom kemikalijom. Čak i ako se citotoksičnost pojavi iznad najniže netopljive koncentracije, preporučuje se ispitivanje pri samo jednoj koncentraciji koja dovodi do zamućenja ili s vidljivim talogom jer lažni učinci mogu biti posljedica taloga. Pri koncentraciji zbog koje nastaje talog potrebno je osigurati da taj talog ne utječe na izvođenje ispitivanja. Može biti korisno odrediti topljivost u mediju za uzgoj kulture prije izvođenja pokusa.

22. Ako nisu zapaženi talog ili ograničavajuća citotoksičnost, najviša ispitna koncentracija trebala bi odgovarati najnižoj od sljedećih vrijednosti: 10 mM, 2 mg/ml ili 2 µl/ml (39. i 40.). Ako sastav ispitivane kemikalije nije definiran, npr. ako je riječ o tvari nepoznatog ili promjenjivog sastava, složenim reakcijskim proizvodima ili biološkim materijalima (tj. kemijskim tvarima nepoznatog ili promjenjivog sastava ili UVCB tvarima) (41.), proizvodima ekstrahiranim iz okoliša itd., možda će trebati povećati najvišu koncentraciju (npr. 5 mg/ml), u odsustvu dovoljne citotoksičnosti, kako bi se povećala koncentracija svakog sastojka. Međutim, trebalo bi napomenuti da ti zahtjevi mogu biti drukčiji za farmaceutske proizvode namijenjene ljudima (42.).

Kontrole

23. Kod svakog uvjeta pokusa potrebno je uključiti istodobne negativne kontrole (vidjeti stavak 16.) koje se sastoje samo od otapala u mediju za tretiranje i koje su tretirane na isti način kao kulture za tretiranje.
24. Istodobne pozitivne kontrole potrebne su za dokazivanje sposobnosti laboratorija za određivanje mutagena u uvjetima upotrijebljenog protokola ispitivanja i učinkovitosti egzogenog sustava metaboličke aktivacije ako je to primjenjivo. Primjeri pozitivnih kontrola navedeni su u tablici 1. u nastavku. Ako je to opravdano, mogu se koristiti alternativne tvari za pozitivnu kontrolu. S obzirom na to da je *in vitro* ispitivanje genotoksičnosti na stanicama sisavaca u dostatnoj mjeri standardizirano, ispitivanja u kojima se upotrebljavaju tretiranja s egzogenom metaboličkom aktivacijom i bez nje mogu se provoditi upotrebom samo pozitivnih kontrola koje zahtijevaju metaboličku aktivaciju. U tom će slučaju taj jedan odgovor pozitivne kontrole dokazati djelovanje sustava metaboličke aktivacije i osjetljivost ispitnog sustava. Svaku pozitivnu kontrolu trebalo bi primijeniti pri jednoj ili više koncentracija za koje se očekuje da će dovesti do ponovljivih i zamjetnih povećanja u odnosu na pozadinu kako bi se dokazala osjetljivost ispitnog sustava, a odgovor ne bi trebala dovesti u pitanje citotoksičnost koja prelazi granične vrijednosti utvrđene u ispitnoj metodi (vidjeti stavak 20).

Tablica 1.: Referentne tvari preporučene za ocjenu osposobljenosti laboratorija i za odabir pozitivnih kontrola.

Stanje metaboličke aktivacije	Lokus	Tvar i CAS br.

Odsutnost egzogene metaboličke aktivacije	<i>Hprt</i>	Etil metansulfonat [CAS br. 62-50-0] Etil nitrozourea [CAS br. 759-73-9] 4-nitrokinolin-1-oksidi [CAS br. 56-57-5]
	<i>xprt</i>	Streptonigrin [CAS br. 3930-19-6] Mitomicin C [CAS br. 50-07-7]
Prisutnost egzogene metaboličke aktivacije	<i>Hprt</i>	3-metilkolantren [CAS br. 56-49-5] 7,12-dimetilbenzantracen [CAS br. 57-97-6] Benzo[a]piren [CAS br. 50-32-8]
	<i>xprt</i>	Benzo[a]piren [CAS br. 50-32-8]

POSTUPAK

Tretiranje ispitivanom kemikalijom

25. Stanice koje se razmnožavaju tretiraju se ispitivanom kemikalijom uz prisutnost i odsutnost sustava metaboličke aktivacije. Izlaganje treba trajati odgovarajuće vrijeme (obično je primjereno od tri do šest sati).
26. Minimalni broj stanica koje se koriste za svaku ispitnu kulturu (kontrolnu i tretiranu) u svakoj fazi ispitivanja trebao bi se temeljiti na učestalosti pojave spontanijih mutanata. Opća je smjernica tretirati i pasazirati dovoljno stanica kako bi se održalo deset spontanijih mutacija u svakoj kulturi u svim fazama ispitivanja (17.). Učestalost pojave spontanijih mutanata općenito iznosi od 5 do 20×10^{-6} . Kako bi se postigla učestalost pojave spontanijih mutanata od 5×10^{-6} i kako bi se održao dovoljan broj spontanijih mutacija (10 ili više) čak i za kulture koje se tretiraju pri koncentracijama koje uzrokuju 90-postotnu citotoksičnost tijekom tretiranja (relativna stopa preživljavanja od 10 %), bilo bi potrebno tretirati najmanje 20×10^6 stanica. Osim toga, mora se kultivirati dovoljan broj stanica (ali nikad manje od dva milijuna) tijekom razdoblja ekspresije i nasaditi radi selekcije mutanata (17.).

Vrijeme fenotipske ekspresije i mjerenje učestalosti pojave mutanata

27. Nakon razdoblja tretiranja stanice se kultiviraju kako bi se omogućila ekspresija fenotipa mutanata. Obično je dovoljno od sedam do devet dana da bi se omogućila gotovo optimalna fenotipska ekspresija novoinduciranih mutanata *Hprta* i *xprta* (43. i 44.). Tijekom tog razdoblja stanice se moraju redovno supkultivirati kako bi se održao eksponencijalni rast. Nakon fenotipske ekspresije stanice se ponovno nasađuju u medij sa selektivnim agensom (6-tiogvanin) odnosno bez njega kako bi se utvrdili broj mutanata odnosno učinkovitost kloniranja u trenutku selekcije. To nasađivanje može se provesti upotrebom zdjelica za jednoslojne kulture ili ploče s mikrožajicama za stanice u suspenziji. Za selekciju mutanata stanice bi trebalo nasaditi pri gustoći kojom se osigurava optimalna regeneracija mutanata (tj. izbjegava se metabolička suradnja) (17.). Ploče se inkubiraju

tijekom odgovarajućeg vremenskog razdoblja za optimalan rast kolonije (npr. od sedam do 12 dana) i kolonije se prebrojavaju. Učestalost pojave mutanata računa se na temelju broja kolonija mutanata koji se ispravlja učinkovitošću kloniranja u trenutku selekcije mutanata (formule vidjeti u Dodatku 2.).

Osposobljenost laboratorija

28. Kako bi steklo dovoljno iskustva u izvođenju ispitivanja prije njegove rutinske primjene, laboratorij treba izvesti niz pokusa s referentnim pozitivnim tvarima koje djeluju putem različitih mehanizama (najmanje jedna aktivna s metaboličkom aktivacijom i jedna aktivna bez metaboličke aktivacije, odabrana s popisa tvari iz tablice 1.) te s različitim negativnim kontrolama (upotrebom različitih otapala/nosača). Odgovori pozitivnih i negativnih kontrola trebali bi biti u skladu s literaturom. To se ne primjenjuje na laboratorije koji već imaju iskustva, tj. one koji imaju bazu podataka o prijašnjim ispitivanjima kako je utvrđeno u stavcima od 30. do 33.
29. Odabir tvari za pozitivnu kontrolu (vidjeti tablicu 1. u stavku 25.) trebao bi se ispitati u odsutnosti i prisutnosti metaboličke aktivacije kako bi se dokazala osposobljenost za otkrivanje mutagenih kemikalija, za utvrđivanje učinkovitosti sustava metaboličke aktivacije i za dokazivanje primjerenosti uvjeta za rast stanica tijekom tretiranja, fenotipske ekspresije i selekcije mutanata te postupaka ocjenjivanja. Potrebno je izabrati raspon koncentracija odabranih tvari pri kojima će doći do ponovljivih povećanja u odnosu na pozadinske vrijednosti, koja su povezana s koncentracijom, kako bi se dokazala osjetljivost i dinamički raspon ispitnog sustava.

Podaci o prijašnjim kontrolama

30. Laboratorij bi trebao utvrditi:
 - raspon i distribuciju prijašnjih pozitivnih kontrola,
 - raspon i distribuciju prijašnjih negativnih kontrola (netretirane kulture, kontrole s otapalom).
31. Pri prvom prikupljanju podataka za distribuciju prijašnjih negativnih kontrola istodobne negativne kontrole trebale bi biti u skladu s objavljenim podacima o kontrolama (22.). Kako se budu dodavali novi eksperimentalni podaci o distribuciji kontrola, istodobne negativne kontrole trebale bi u idealnom slučaju biti unutar kontrolnih granica od 95 % te distribucije (17., 45. i 46.).
32. Baza podataka o prijašnjim negativnim kontrolama laboratorija trebala bi u početku obuhvaćati najmanje deset pokusa, ali bilo bi poželjno da se sastoji od najmanje 20 pokusa provedenih u usporedivim pokusnim uvjetima. Laboratoriji bi trebali primjenjivati metode za kontrolu kvalitete, kao što su kontrolni dijagrami (npr. C-dijagrami ili X-stupčasti dijagrami (47.)), kako bi utvrdili koliko su promjenjivi njihovi podaci o pozitivnim i

negativnim kontrolama te dokazali da je u njihovu laboratoriju metodologija „pod kontrolom” (46.). Daljnje preporuke o tome kako uspostaviti i upotrebljavati prijašnje podatke (npr. kriteriji za uključivanje podataka u prijašnje podatke i njihovo izuzimanje iz tih podataka te kriteriji prihvatljivosti za određeni pokus) nalaze se u literaturi (45.).

33. Podaci o negativnim kontrolama trebali bi se sastojati od podataka o učestalosti pojave mutanata u jednoj kulturi ili, po mogućnosti, u ponovljenim kulturama kako je opisano u stavku 23. Istodobne negativne kontrole u idealnom bi slučaju trebale biti unutar kontrolnih granica od 95 % distribucije prijašnjih podataka o negativnim kontrolama koji se nalaze u bazi podataka laboratorija (17., 45. i 46.). Ako se podaci o istodobnim negativnim kontrolama nalaze izvan kontrolnih granica od 95 %, mogu biti prihvatljivi za uključenje u distribuciju prijašnjih kontrola pod uvjetom da ti podaci nisu ekstremne netipične vrijednosti te da postoje dokazi o tome da je ispitni sustav „pod kontrolom” (vidjeti prethodno navedeno) i da nema tehničke ili ljudske pogreške.
34. Svaku izmjenu pokusnog protokola trebalo bi razmotriti s obzirom na to je li u skladu s postojećim bazama podataka laboratorija o prijašnjim kontrolama. Svaka veća nesukladnost trebala bi dovesti do uspostave nove baze podataka o prijašnjim kontrolama.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Predstavljanje rezultata

35. Predstavljanje rezultata trebalo bi uključivati sve podatke koji su potrebni za izračun citotoksičnosti (izraženo kao relativna stopa preživljavanja). Podaci za tretirane i kontrolne kulture trebali bi uključivati broj stanica na kraju tretiranja, broj stanica nasađenih odmah nakon tretmana i brojeve kolonija (ili broj jažica bez kolonija za metodu s mikrojažicama). Relativna stopa preživljavanja za svaku kulturu trebala bi se izraziti kao postotak u odnosu na istodobnu kontrolu s otapalom (definicije potražiti u Dodatku 1.).
36. Predstavljanje rezultata trebalo bi uključivati i sve podatke koji su potrebni za izračun učestalosti pojave mutanata. Podaci za tretirane i kontrolne kulture trebali bi uključivati: (1) broj stanica nasađenih sa selektivnim agensom i bez njega (kad se stanice nasađuju radi selekcije mutanata) i (2) broj izbrojanih kolonija (ili broj jažica bez kolonija za metodu s mikrojažicama) na pločama sa selektivnim agensom i bez njega. Učestalost pojave mutanata računa se na temelju broja kolonija mutanata (na pločama sa selektivnim agensom) koji se ispravlja učinkovitošću kloniranja (s ploča bez selektivnog agensa). Učestalost pojave mutanata trebala bi se izraziti kao broj mutiranih stanica po milijunu vijabilnih stanica (definicije potražiti u Dodatku 1.).
37. Potrebno je navesti podatke o pojedinačnim kulturama. Osim toga, sve je podatke potrebno sažeto prikazati u obliku tablice.

Kriteriji prihvatljivosti

38. Prihvatljivost ispitivanja temelji se na sljedećim kriterijima:

- smatra se da je istodobnu negativnu kontrolu prihvatljivo dodati u bazu podataka o prijašnjim negativnim kontrolama laboratorija kako je opisano u stavku 33.,
- istodobne pozitivne kontrole (vidjeti stavak 24.) trebale bi inducirati odgovore koji su u skladu s odgovorima generiranim u bazi podataka o prijašnjim pozitivnim kontrolama i dovesti do statistički značajnog povećanja u odnosu na istodobnu negativnu kontrolu,
- ispitana su dva pokusna uvjeta (tj. s metaboličkom aktivacijom i bez nje) osim ako je jedan doveo do pozitivnog rezultata (vidjeti stavak 25.),
- odgovarajući broj stanica i koncentracija prikladan je za analizu (stavci 25., 26. i 19.),
- kriteriji za odabir najviše koncentracije u skladu su s kriterijima opisanima u stavcima 20., 21. i 22.

Ocjenjivanje i tumačenje rezultata

39. Pod uvjetom da su ispunjeni svi kriteriji prihvatljivosti, ispitivana kemikalija smatra se jasno pozitivnom ako u bilo kojem od ispitanih pokusnih uvjeta:

- najmanje pri jednoj ispitnoj koncentraciji zapaženo je statistički značajno povećanje u odnosu na istodobnu negativnu kontrolu,
- odgovarajući test trenda pokazuje da je povećanje povezano s koncentracijom,
- bilo koji od rezultata je izvan distribucije podataka o prijašnjim negativnim kontrolama (npr. kontrolne granice od 95 % prema Poissonovoj distribuciji; vidjeti stavak 33.).

Kad su ispunjeni svi ti uvjeti, smatra se da ispitivana kemikalija može inducirati genske mutacije u uzgojenim stanicama sisavaca u tom sustavu ispitivanja. Preporuke za najprikladnije statističke metode nalaze se u literaturi (46. i 48.).

40. Pod uvjetom da su ispunjeni svi kriteriji prihvatljivosti, ispitivana kemikalija smatra se jasno negativnom ako u svim ispitanim pokusnim uvjetima:

- ni pri jednoj ispitnoj koncentraciji nije zapaženo statistički značajno povećanje u odnosu na istodobnu negativnu kontrolu,
- odgovarajući test trenda pokazuje da nema povećanja povezanog s koncentracijom,
- svi su rezultati u okviru distribucije podataka o prijašnjim negativnim kontrolama (npr. kontrolne granice od 95 % prema Poissonovoj distribuciji; vidjeti stavak 33.).

Tad se smatra da ispitivana kemikalija ne može inducirati genske mutacije u uzgojenim stanicama sisavaca u tom sustavu ispitivanja.

41. Jasan pozitivan ili negativan odgovor nije potrebno provjeravati.
42. Ako odgovor nije ni jasno pozitivan ni jasno negativan kako je prethodno opisano ili kako bi se pridonijelo utvrđivanju biološke relevantnosti rezultata, podatke bi trebalo ocjenjivati na temelju stručne prosudbe i/ili daljnjih istraživanja. Moglo bi biti korisno ponoviti pokus, eventualno u izmijenjenim pokusnim uvjetima (npr. razmak između koncentracija, drugi uvjeti metaboličke aktivacije (tj. koncentracija S9 ili podrijetlo S9)).
43. U rijetkim slučajevima, čak i nakon dodatnih istraživanja, skup podataka neće omogućiti donošenje zaključka o tome je li rezultat pozitivan ili negativan. Stoga bi se trebalo zaključiti da je odgovor na ispitivanu kemikaliju dvosmislen (tumači se da je jednako vjerojatno da je pozitivan ili negativan).

Izvešće o ispitivanju

44. Izvešće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Ispitivana kemikalija:

- izvor, broj serije, rok uporabe, ako su dostupni,
- stabilnost ispitivane kemikalije, ako je poznata,
- topljivost i stabilnost ispitivane kemikalije u otapalu, ako su poznate,
- izmjerene vrijednosti za pH, osmolalnost i taloženje u mediju za uzgoj kulture u koji je dodana ispitivana kemikalija, prema potrebi.

Tvar s jednim sastojkom:

- fizički izgled, topljivost u vodi i druga relevantna fizikalno-kemijska svojstva,
- kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv, CAS broj, SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula, čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.

Tvari s više sastojaka, UVCB tvari i smjese:

- opis (koliko je to moguće) kemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativnog udjela i relevantnih fizikalno-kemijskih svojstava sastojaka.

Otapalo:

- obrazloženje odabira otapala,
- postotak otapala u konačnom mediju za uzgoj kulture.

Stanice:

Za laboratorijske glavne kulture:

- vrsta, izvor staničnih linija,
- broj pasaža, ako je dostupan, i povijest laboratorija,
- kariotipna svojstva i/ili modalni broj kromosoma,
- metode održavanja staničnih kultura,
- odsustvo mikoplazme,
- vremena udvostručivanja stanica.

Ispitni uvjeti:

- obrazloženje za odabir koncentracija i broja kultura, uključujući npr. podatke o citotoksičnosti i ograničenja topljivosti,
- sastav medija, koncentracija CO₂, razina vlažnosti,
- koncentracija ispitivane kemikalije izražena kao konačna koncentracija u mediju za uzgoj kulture (npr. µg ili mg/ml ili mM medija za uzgoj kulture),
- koncentracija (i/ili volumen) otapala i ispitivane kemikalije koji su dodani mediju za uzgoj kulture,
- temperatura inkubacije,
- vrijeme inkubacije,
- trajanje tretiranja,
- gustoća stanica za vrijeme tretiranja,
- vrsta i sastav sustava metaboličke aktivacije (izvor S9, metoda pripreme mješavine S9, koncentracija ili volumen mješavine S9 i S9 u konačnom mediju za uzgoj kulture, kontrole kvalitete S9),
- tvari pozitivne i negativne kontrole, konačne koncentracije za svaki uvjet tretiranja,
- duljina razdoblja ekspresije (uključujući broj nasađenih stanica te režim uzgoja supkultura i dodavanja hranjivih tvari, ako je primjereno),
- identitet selektivnog agensa i njegova koncentracija,
- kriteriji prihvatljivosti ispitivanja,
- metode korištene za utvrđivanje broja vijabilnih i mutiranih stanica,
- metode mjerenja citotoksičnosti,
- sve dodatne informacije koje se odnose na citotoksičnost i upotrijebljenu metodu,
- trajanje inkubacije nakon nasađivanja,
- kriteriji prema kojima se istraživanje smatra pozitivnim, negativnim ili dvosmislenim,

- metode upotrijebljene za određivanje pH-vrijednosti, osmolalnosti i taloženja.

Rezultati:

- broj tretiranih stanica i broj supkultiviranih stanica za svaku kulturu,
- mjerenja citotoksičnosti i druga opažanja, ako postoje,
- znakovi taloženja i vrijeme utvrđivanja,
- broj stanica nasadenih na selektivni i neselektivni medij,
- broj kolonija u neselektivnom mediju i broj otpornih kolonija u selektivnom mediju te povezana učestalost pojave mutanata,
- odnos koncentracije i odgovora, ako je moguće,
- podaci o istodobnim negativnim kontrolama (s otapalom) i pozitivnim kontrolama (koncentracije i otapala),
- podaci o prijašnjim negativnim kontrolama (s otapalom) i prijašnjim pozitivnim kontrolama, zajedno s rasponima, srednjim vrijednostima i standardnim devijacijama, interval pouzdanosti (npr. 95 %) te broj podataka,
- statističke analize (za pojedinačne kulture i objedinjena ponavljanja ako je primjereno) i p-vrijednosti, ako postoje.

Rasprava o rezultatima

Zaključak

LITERATURA

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

11. Nesslany F., Simar-Meintieres S., Watzinger M., Talahari I. and Marzin D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. *Environ. Mol. Mutation Res.*, 49, 439.–452.
12. Long L.H., Kirkland D., Whitwell J. and Halliwell B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, *Mutation Res.*, 634, 177.–183.
13. Kirkland D., Aardema M., Henderson L., and Müller L. (2005). Evaluation of the Ability of a Battery of Three *In Vitro* Genotoxicity Tests to Discriminate Rodent Carcinogens and Non-Carcinogens. I: Sensitivity, Specificity and Relative Predictivity. *Mutation Res.*, 584, 1.–256.
14. Li A.P., Carver J.H., Choy W.N., Hsie A.W., Gupta R.S., Loveday K.S., O'Neill J.P., Riddle J.C., Stankowski L.F. Jr. and Yang L.L. (1987). A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay. *Mutation Res.*, 189, 135.–141.
15. Liber H.L., Yandell D.W. and Little J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus. *Mutation Res.*, 216, 9.–17.
16. Stankowski L.F. Jr., Tindall K.R. and Hsie A.W. (1986). Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Mutation in AS52 Cells. *Mutation Res.*, 160, 133.–147.
17. Arlett C.F., Smith D.M., Clarke G.M., Green M.H.L., Cole J., McGregor D.B. and Asquith J.C. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. U: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Eds.), Cambridge University Press, str. 66.–101.
18. Hsie A.W., Casciano D.A., Couch D.B., Krahn D.F., O'Neill J.P., and Whitfield B.L. (1981). The Use of Chinese Hamster Ovary Cells to Quantify Specific Locus Mutation and to Determine Mutagenicity of Chemicals; a Report of the Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 86, 193.–214.
19. Li A.P. (1981). Simplification of the CHO/HGPRT Mutation Assay Through the Growth of Chinese Hamster Ovary Cells as Unattached Cultures, *Mutation Res.*, 85, 165.–175.
20. Tindall K.R., Stankowski Jr., L.F., Machanoff R., and 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., and Schenley R. L. (1986). Evidence for Reactive Oxygen Species Inducing Mutations in Mammalian Cells. *Proc Natl Acad Sci.*, 83(24): 9616.–9620.
22. Lorge E., Moore M., Clements J., Donovan M. O., Honma M., Kohara A., Van Benthem J., Galloway S., Armstrong M.J., Thybaud V., Gollapudi B., Aardema M., Kim J., Sutter A., Kirkland D.J. (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Rukopis u pripremi).
23. Coecke S., Balls M., Bowe G., Davis J., Gstraunthaler G., Hartung T., Hay R., Merten O.W., Price A., Schechtman L., Stacey G. and Stokes W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, *ATLA*, 33, 261.–287.
24. Rosen M.P., San R.H.C. and Stich H.F. (1980). Mutagenic Activity of Ascorbate in Mammalian Cell Cultures, *Can. Lett.* 8, 299.–305.
25. Natarajan A.T., Tates A.D, Van Buul P.P.W., Meijers M. and de Vogel N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. *Mutation Res.*, 37, 83.–90.
26. Abbondandolo A., Bonatti S., Corti G., Fiorio R., Loprieno N. and Mazzaccaro A. (1977). Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine. *Mutation Res.*, 46, 365.–373.
27. Ames B.N., McCann J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 31, 347.–364.
28. Maron D.M. and Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 113, 173, 215.
29. Elliott B.M., Combes R.D., Elcombe C.R., Gatehouse D.G., Gibson G.G., Mackay J.M. and Wolf R.C. (1992) Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. *Mutagen.* 7, 175.–177.
30. Matsushima T., Sawamura M., Hara K. and Sugimura T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. U: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, de Serres F.J., Fouts J.R., Bend J.R. and Philpot R.M. (Eds), Elsevier, North-Holland, str. 85.–88.

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

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

Dodatak 1.**DEFINICIJE**

Mutageni supstitucije baznih parova: kemikalije koje uzrokuju supstituciju baznih parova u DNK-u.

Kemikalija: tvar ili smjesa.

Učinkovitost kloniranja: postotak stanica nasadenih pri malenoj gustoći koje mogu narasti u koloniju koja se može prebrojiti.

Koncentracije: znači konačne koncentracije ispitivane kemikalije u mediju za uzgoj kulture.

Citotoksičnost: za testove obuhvaćene ovom ispitnom metodom citotoksičnost se definira kao smanjenje relativne stope preživljavanja tretiranih stanica u odnosu na negativnu kontrolu (vidjeti poseban stavak).

Napredna mutacija: genska mutacija od roditeljskog tipa u mutantni oblik, koja uzrokuje promjenu ili gubitak enzimskog djelovanja ili funkcije kodiranog proteina.

Mutageni pomaka okvira očitavanja (*frameshift* mutageni): kemikalije koje uzrokuju adiciju ili deleciju jednog baznog para ili više njih u molekuli DNK.

Genotoksičnost: opći izraz kojim su obuhvaćene sve vrste oštećenja DNK ili kromosoma uključujući lomove DNK, adukte, premještanja, mutacije, aberacije kromosoma i aneuploidiju. Ne dovode sve vrste genotoksičnih učinaka do mutacija ili trajnog oštećenja kromosoma.

HAT medij: medij koji sadržava hipoksantin, aminopterin i timidin, koji se koristi za odstranjivanje Hp^rt mutanata.

Mitotska rekombinacija: rekombinacija između homolognih kromatida koja može dovesti do indukcije lomova oba lanca DNK ili gubitka heterozigotnosti, a do koje dolazi tijekom mitoze.

MPA medij: medij koji sadržava ksantin, adenin, timidin, aminopterin i mikofenolnu kiselinu, koji se koristi za odstranjivanje Xp^rt mutanata.

Mutagen: uzrokuje nasljednu promjenu slijeda (sljedova) parova baza DNK u genima ili strukture kromosoma (kromosomske aberacije).

Učestalost pojave mutanata (MF): broj uočenih mutantnih kolonija podijeljen brojem stanica nasadenih u selektivni medij, koji se ispravlja učinkovitošću kloniranja (ili vijabilnosti) u trenutku selekcije.

Vrijeme fenotipske ekspresije: vrijeme nakon tretiranja tijekom kojeg se genetske

modifikacije fiksiraju unutar genoma i postojeći genski produkti odstranjuju do te mjere da se mijenja fenotipsko svojstvo.

Relativna stopa preživljavanja (RS): relativna stopa preživljavanja upotrebljava se kao mjera citotoksičnosti povezane s tretiranjem. Relativna stopa preživljavanja je učinkovitost kloniranja stanica koje se nasade odmah nakon tretiranja, prilagođeno za mogući gubitak stanica tijekom tretiranja, u usporedbi s učinkovitošću kloniranja u negativnim kontrolama (kojima se dodjeljuje stopa preživljavanja od 100 %).

Frakcije jetre S9: supernatant homogenata jetre centrifugiran na 9 000 g, tj. ekstrakt sirove jetre.

Mješavina S9: mješavina frakcije jetre S9 i kofaktora potrebnih za djelovanje metaboličkih enzima.

Kontrola s otapalom: opći izraz za označivanje kontrolnih kultura kojima je dodano jedino otapalo koje je upotrijebljeno za otapanje ispitivane kemikalije.

Ispitivana kemikalija: svaka tvar ili smjesa koja se ispituje ovom ispitnom metodom.

Netretirana kontrola: kulture koje nisu ni s čim tretirane (tj. ni ispitivanom kemikalijom ni otapalom), ali se obrađuju istodobno i na isti način kao kulture tretirane ispitivanom kemikalijom.

UVCB: kemijske tvari nepoznatog ili promjenjivog sastava, složeni reakcijski proizvodi i biološki materijali.

Dodatak 2.**FORMULE ZA PROCJENU CITOTOKSIČNOSTI I UČESTALOSTI POJAVE MUTANATA**

Citotoksičnost se ocjenjuje relativnom stopom preživljavanja, tj. učinkovitošću kloniranja stanica koje se nasade odmah nakon tretiranja, prilagođeno za mogući gubitak stanica tijekom tretiranja, u usporedbi s prilagođenom učinkovitošću kloniranja u negativnim kontrolama (kojima se dodjeljuje stopa preživljavanja od 100 %) (vidjeti formulu za relativnu stopu preživljavanja u nastavku).

Prilagođena učinkovitost kloniranja za kulturu tretiranu ispitivanom kemikalijom računa se na sljedeći način:

$$\text{Prilagođeni CE} = \frac{\text{broj stanica na kraju tretiranja}}{\text{broj stanica na početku tretiranja}}$$

Relativna stopa preživljavanja za kulturu tretiranu ispitivanom kemikalijom računa se na sljedeći način:

$$\text{RS} = \frac{\text{prilagođeni CE u tretiranoj kulturi}}{\text{prilagođeni CE u kontroli s otapalom}} \times 100$$

Učestalost pojave mutanata je učinkovitost kloniranja kolonija mutanata u selektivnom mediju podijeljeno učinkovitošću kloniranja u neselektivnom mediju koja se mjeri za istu kulturu u trenutku selekcije.

$$\text{Učestalost pojave mutanata} = \frac{\text{učinkovitost kloniranja kolonija mutanata u selektivnom mediju}}{\text{učinkovitost kloniranja u neselektivnom mediju}}$$

Kad se za učinkovitost kloniranja upotrebljavaju ploče:

CE (učinkovitost kloniranja) = broj kolonija / broj nasađenih stanica.

Kad se za učinkovitost kloniranja upotrebljavaju ploče s mikrojažicama:

broj kolonija po jažici na pločama s mikrojažicama slijedi Poissonovu distribuciju,

Učinkovitost kloniranja = $-\text{LnP}(0)$ / broj nasađenih stanica po jažici,

pri čemu je $-\text{LnP}(0)$ vjerojatan broj praznih jažica od jažica u koje su nasađene stanice i dobiva se sljedećom formulom:

$\text{LnP}(0) = -\text{Ln}(\text{broj praznih jažica} / \text{broj jažica u koje su nasađene stanice})$ ”;

(3) u dijelu B poglavlje B.22. zamjenjuje se sljedećim:

„B.22. ISPITIVANJE DOMINANTNIH LETALNIH GENA NA GLODAVCIMA

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 478 (2016.). Ispitne metode periodično se preispituju uzimajući u obzir znanstveni napredak, promjene regulatornih potreba i razmatranja o dobrobiti životinja. U ovoj izmijenjenoj verziji ispitne metode uzima se u obzir više od trideset godina iskustva s tim ispitivanjem i mogućnost integriranja ili kombiniranja tog ispitivanja s drugim ispitivanjima toksičnosti kao što su razvojne studije ili studije reproduktivne toksičnosti ili genotoksičnosti; međutim, zbog njegovih ograničenja i upotrebe velikog broja životinja, ovo ispitivanje nije namijenjeno za upotrebu kao primarna metoda, već kao dodatna ispitna metoda koja se može upotrebljavati samo ako ne postoji alternativa za regulatorne zahtjeve. Kombiniranjem ispitivanja toksičnosti stvara se mogućnost da se u ispitivanjima toksičnosti ne upotrijebi mnogo životinja. OECD je sastavio dokument u kojem se daju sažete informacije o ispitivanju u području genetske toksikologije te pregled novijih promjena smjernica OECD-a za ispitivanje genotoksičnosti (1.).
2. Svrha je ispitivanja dominantnih letalnih gena ispitati uzrokuju li kemikalije mutacije koje su posljedica kromosomskih aberacija zametnih stanica. Osim toga, ispitivanje dominantnih letalnih gena relevantano je za ocjenu genotoksičnosti jer, iako se mogu razlikovati među vrstama, faktori *in vivo* metabolizma, farmakokinetika i procesi popravka DNK aktivni su i pridonose odgovorima. Indukcija mutacije dominantnih letalnih gena nakon izlaganja ispitivanoj kemikaliji ukazuje na činjenicu da je kemikalija djelovala na zametno tkivo ispitne životinje.
3. Mutacije dominantnih letalnih gena uzrokuju embrionalnu ili fetalnu smrt. Indukcija mutacije dominantnih letalnih gena nakon izlaganja ispitivanoj kemikaliji ukazuje na činjenicu da je kemikalija djelovala na zametne stanice ispitne životinje.
4. Test dominantnih letalnih gena koristan je kao potvrda pozitivnih rezultata ispitivanja u kojima se upotrebljavaju somatske *in vivo* krajnje točke te je relevantna krajnja točka za predviđanje rizika po ljude i rizika od genetskih bolesti koje se prenose zametnom lozom. Međutim, za taj je test potrebno mnogo životinja i sati rada; stoga je i vrlo skup te dugo traje. Budući da je spontana učestalost mutacija dominantnih letalnih gena prilično velika, osjetljivost testa za otkrivanje malih povećanja učestalosti mutacija općenito je ograničena.
5. Definicije ključnih pojmova utvrđene su u Dodatku 1.

POČETNA RAZMATRANJA

6. Ispitivanje se najčešće provodi na miševima (2., 3. i 4.), ali u određenim slučajevima mogu biti primjerene i druge vrste, kao što su štakori (5., 6., 7. i 8.), ako je to znanstveno opravdano. Dominantni letalni geni obično su rezultat velikih kromosomskih aberacija (strukturnih i numeričkih abnormalnosti) (9., 10. i 11.), ali ne mogu se isključiti genske mutacije. Mutacija dominantnih letalnih gena je mutacija do koje dolazi u zametnoj stanici automatski ili se fiksira nakon oplodnje u ranoj fazi embrija, a ne uzrokuje disfunkciju gamete, ali je smrtonosna za oplođeno jajašce ili embrij u razvoju.
7. Svaki se mužjak u odgovarajućim vremenskim intervalima uzastopno pari sa ženka koje se prethodno nisu parile. Broj parenja nakon tretiranja ovisi o krajnjoj svrsi istraživanja dominantnih letalnih gena (stavak 23.) i trebao bi osigurati da se sve faze sazrijevanja zametnih stanica mužjaka ocijene u pogledu dominantnih letalnih gena (12.).
8. Ako postoje dokazi da ispitivana kemikalija ili njezini metaboliti neće dospjeti do sjemenika, ovaj oblik ispitivanja nije prikladan.

NAČELO ISPITIVANJA

9. Obično se mužjaci izlažu ispitivanoj kemikaliji prikladnim načinom izlaganja te se pare s netretiranim ženka koje se prethodno nisu parile. Različite vrste zametnih stanica mogu se ispitati primjenom uzastopnih intervala parenja. Nakon parenja ženke se nakon odgovarajućeg razdoblja eutanaziraju i njihove se maternice pregledavaju kako bi se utvrdio broj implantata te živih i mrtvih embrija. Dominantno letalno djelovanje ispitivane kemikalije utvrđuje se usporedbom živih implantata po ženki u tretiranoj skupini sa živim implantatima po ženki u kontrolnoj skupini s nosačem/otapalom. Povećanje broja mrtvih implantata po ženki u tretiranoj skupini u odnosu na broj mrtvih implantata po ženki u kontrolnoj skupini odražava postimplantacijski gubitak induciran ispitivanom kemikalijom. Postimplantacijski gubitak računa se utvrđivanjem omjera mrtvih implantata u odnosu na njihov ukupan broj u tretiranoj skupini u usporedbi s omjerom mrtvih implantata u odnosu na njihov ukupan broj u kontrolnoj skupini. Predimplantacijski gubitak može se procijeniti usporedbom broja žutih tijela umanjenog za ukupan broj implantata ili ukupnog broja implantata po ženki u tretiranoj i kontrolnoj skupini.

PROVJERA OSPOSOBLJENOSTI LABORATORIJA

10. Osposobljenost za provedbu ovog ispitivanja trebalo bi utvrditi dokazivanjem sposobnosti reproduciranja učestalosti pojave mutacija dominantnih letalnih gena na temelju objavljenih podataka (npr. 13., 14., 15., 16., 17. i 18.) s tvarima za pozitivnu kontrolu (uključujući slabe odgovore) kao što su one navedene u tablici 1., i kontrolama s nosačem te postizanja učestalosti u negativnim kontrolama koje su u skladu s prihvatljivim rasponom podataka (vidjeti prethodna upućivanja) ili distribucijom prijašnjih kontrola laboratorija, ako su dostupni.

OPIS METODE

Pripreme

Odabir životinjske vrste

11. Trebalo bi upotrebljavati zdrave, spolno zrele životinje sojeva koji se obično upotrebljavaju u laboratorijskim istraživanjima. Obično se upotrebljavaju miševi, iako i štakori mogu biti prikladan odabir. Moguća je uporaba bilo koje druge prikladne vrste sisavaca ako je to znanstveno opravdano u izvješću.

Uvjeti smještaja i hranjenja životinja

12. U slučaju glodavaca, temperatura prostorije u kojoj se drže životinje trebala bi biti 22 °C (± 3 °C). Iako bi u idealnim okolnostima relativna vlažnost trebala biti 50–60 %, ona bi trebala biti najmanje 40 %, a poželjno je da ne prelazi 70 %, osim tijekom čišćenja prostorije. Rasvjeta bi trebala biti umjetna uz izmjenu 12 sati svjetla i 12 sati mraka. Za hranjenje se može upotrebljavati konvencionalna laboratorijska hrana uz neograničenu količinu vode za piće. Kad se ispitivana kemikalija primjenjuje ovim načinom izlaganja, na izbor prehrane može utjecati potreba da se osigura odgovarajuća primjesa ispitivane kemikalije. Prije tretiranja ili parenja glodavce bi trebalo držati u malim skupinama (najviše pet) istog spola ako se ne očekuje ili ne opazi agresivno ponašanje, po mogućnosti u čvrstim kavezima s primjereno obogaćenim okolišem. Ako je to znanstveno opravdano, životinje se mogu držati u zasebnim nastambama.

Priprema životinja

13. Zdrave, spolno zrele mužjake i ženke nasumce se raspoređuje u kontrolne skupine i skupine za tretiranje. Pojedinačne životinje označuju se na jedinstven način upotrebom humane, najmanje invazivne metode (npr. prstenovanjem, stavljanjem oznaka, mikročipiranjem ili biometrijskom identifikacijom, ali ne rezanjem prsta i uha) i prilagođavaju laboratorijskim uvjetima najmanje pet dana. Kaveze bi trebalo rasporediti tako da se učinci do kojih bi moglo doći zbog položaja kaveza svedu na minimum. Trebalo bi izbjegavati unakrsnu kontaminaciju pozitivnom kontrolom i ispitivanom kemikalijom. Na početku istraživanja razlike u tjelesnoj masi životinja trebale bi biti minimalne i ne bi trebale prelaziti ± 20 % srednje vrijednosti mase svakog spola.

Priprema doza

14. Prije nego što se doza daje životinjama, krute ispitivane tvari po potrebi treba otopiti ili suspendirati u odgovarajućim otapalima ili nosačima ili dodati hrani ili vodi za piće. Tekuće ispitivane kemikalije mogu se dozirati izravno ili razrijediti prije doziranja. Za potrebe inhaliranja, ispitivane kemikalije mogu se primijeniti u obliku plina, pare ili krutog/tekućeg aerosola, ovisno o njihovim fizikalno-kemijskim svojstvima. Ako prema podacima o stabilnosti skladištenje nije prihvatljivo i ako nisu utvrđeni prikladni uvjeti skladištenja, preparate ispitivane kemikalije trebalo bi upotrebljavati svježe.

Ispitni uvjeti

Otapalo/nosač

15. Pri upotrijebljenom volumenu doze otapalo/nosač ne smije imati toksične učinke i ne smije postojati sumnja da bi mogao kemijski reagirati s ispitivanom tvari. Ako se upotrebljavaju otapala/nosači koji nisu dobro poznati, njihovo uključivanje u ispitivanje trebalo bi potkrijepiti referentnim podacima kojima se dokazuje njihova usklađenost. Kad je god moguće, preporučuje se najprije razmotriti mogućnost primjene vodenog otapala/nosača. Primjeri uobičajeno korištenih usklađenih otapala/nosača uključuju vodu, fiziološku otopinu, otopinu metil-celuloze, otopinu natrijeve soli karboksimetilne celuloze, maslinovo ulje i kukuruzno ulje.

Pozitivne kontrole

16. Uvijek bi se trebale upotrebljavati životinje istodobnih pozitivnih kontrola, osim ako je laboratorij dokazao osposobljenost za provedbu ispitivanja te je u nedavnoj prošlosti rutinski upotrebljavao ispitivanje (npr. u posljednjih pet godina). Međutim, životinje pozitivnih kontrola nije potrebno tretirati istim putem izlaganja kao životinje koje primaju ispitivanu kemikaliju ili uzimati uzorke u svim intervalima parenja. Za tvari za pozitivnu kontrolu trebalo bi biti poznato da proizvode dominantne letalne gene u uvjetima koji se upotrebljavaju za ispitivanje. Izuzimajući tretiranje, sa životinjama u kontrolnim skupinama treba postupati jednako kao sa životinjama u tretiranim skupinama.
17. Doze tvari za pozitivnu kontrolu trebale bi se odabrati tako da proizvode slabe ili umjerene učinke kojima se kritički procjenjuju uspješnost i osjetljivost ispitivanja, ali da dosljedno dovode do pozitivnih dominantno letalnih učinaka. Primjeri tvari za pozitivnu kontrolu i primjerene doze navedeni su u tablici 1.

Tablica 1.: Primjeri tvari za pozitivnu kontrolu.

Tvar [CAS br.] (referentni br.)	Raspon učinkovitih doza (mg/kg) (vrsta glodavca)	Trajanje primjene danima) (u
Trietenmelamin [51-18-3] (15.)	0,25 (miševi)	1
Ciklofosfamid [50-18-0] (19.)	50–150 (miševi)	5
Ciklofosfamid [50-18-0] (5.)	25–100 (štakori)	1
Etil metansulfonat [62-50-0] (13.)	100–300 (miševi)	5
Monomerni akrilamid [79-06-1] (17.)	50 (miševi)	5
Klorambucil [305-03-3] (14.)	25 (miševi)	1

Negativne kontrole

18. Životinje negativne kontrole, koje se tretiraju samo s otapalom ili nosačem i koje su osim toga tretirane na jednak način kao i skupine za tretiranje, trebale bi biti uključene u svako vrijeme uzorkovanja (20.). Ako ne postoje prijašnji ili objavljeni kontrolni podaci kojima se dokazuje da odabrano otapalo ili nosač ne inducira dominantne letalne gene ili druge štetne učinke, netretirane kontrolne životinje također bi trebale biti uključene u svako vrijeme uzorkovanja kako bi se utvrdila prihvatljivost kontrole s nosačem.

POSTUPAK**Broj životinja**

19. Svaki se mužjak u odgovarajućim unaprijed utvrđenim vremenskim intervalima (npr. u tjednim intervalima, stavci 21. i 23.) uzastopno pari, po mogućnosti s jednom ženkom koja se prethodno nije parila. Broj mužjaka po skupini treba unaprijed utvrditi kako bi bio dovoljan (u kombinaciji s brojem parenih ženki u svakom intervalu parenja) za osiguravanje statističke snage potrebne kako bi se otkrilo barem udvostručenje učestalosti pojave dominantnih letalnih gena (stavak 44.)
20. Broj ženki po intervalu parenja isto treba unaprijed utvrditi izračunima statističke snage kako bi se omogućilo otkrivanje barem udvostručenja učestalosti pojave dominantnih letalnih gena (tj. dovoljan broj gravidnih ženki kako bi se ukupno dobilo najmanje 400 implantata) (20., 21., 22. i 23.) i tako da se očekuje najmanje jedan mrtvi implantat po jedinici analize (tj. skupini parenja po dozi) (24.).

Razdoblje primjene i intervali parenja

21. Broj intervala parenja koji slijedi nakon tretiranja određen je režimom tretiranja i trebao bi osigurati ocjenjivanje svih faza sazrijevanja zametnih stanica mužjaka u pogledu induciranja dominantnih letalnih gena (12. i 25.). Kod jednog tretiranja u kojem se primjenjuje do pet dnevnih doza trebalo bi provesti osam (miševi) ili deset (štakori) parenja u tjednim intervalima nakon posljednjeg tretiranja. Kod primjene više doza broj intervala parenja može se smanjiti razmjerno produljenju razdoblja primjene, ali tako da se zadrži cilj ocjenjivanja svih faza spermatogeneze (npr. kod miševa su nakon 28-dnevnog izlaganja dovoljna samo četiri tjedna parenja kako bi se ocijenile sve faze spermatogeneze). Svi režimi tretiranja i parenja trebali bi biti znanstveno opravdani.
22. Ženke bi trebale ostati s mužjacima barem tijekom jednog ciklusa estrusa (npr. kod miševa i štakora jedan tjedan obuhvaća jedan ciklus estrusa). Ženke koje se nisu parile tijekom jednodnevnog intervala mogu se upotrijebiti za sljedeći interval parenja. Ili dok ne dođe do parenja, što se utvrđuje na temelju prisutnosti sperme u vagini ili na temelju prisutnosti vaginalnog čepa.

23. Izlaganje i režim parenja koji se primjenjuju ovise o krajnjoj svrsi istraživanja dominantne letalnosti. Ako je cilj utvrditi inducira li određena kemikalija mutacije dominantnih letalnih gena automatski, tad bi prihvatljiva metoda bila izlaganje cijelog ciklusa spermatogeneze (npr. sedam tjedana kod miševa, 5–7 tretiranja tjedno) i jedno parenje na kraju ciklusa. Međutim, ako je cilj utvrditi vrstu zametnih stanica osjetljivu na induciranje dominantnih letalnih gena, prednost se daje jednom ili petodnevnom izlaganju nakon kojeg slijedi tjedno parenje.

Visine doza

24. Ako se provodi preliminarno istraživanje za određivanje raspona jer još nisu dostupni prikladni podaci koji bi pomogli u odabiru doza, trebalo bi ga provesti u istom laboratoriju primjenom iste vrste, soja, spola i režima tretiranja kao i u glavnom istraživanju (26.). Istraživanjem bi se trebala odrediti maksimalna podnošljiva doza (MTD), koja je definirana kao najviša doza koja će se podnijeti bez dokaza o toksičnosti ograničene istraživanjem, povezane s trajanjem istraživanja (na primjer, neuobičajeno ponašanje ili reakcije, manji gubitak tjelesne mase ili hematopoetska sustavna citotoksičnost), isključujući smrt ili dokaze o boli, patnji ili stresu zbog kojih se zahtijeva humana eutanazija (27.).
25. Maksimalna podnošljiva doza ne smije negativno utjecati ni na uspjeh parenja (21.).
26. Ispitivanje kemikalije s posebnim biološkim djelovanjem u slabim netoksičnim dozama (kao što su hormoni i mitogeni) i kemikalije koje pokazuju zasićenost toksikokinetičkih svojstava mogu se izuzeti iz kriterija u pogledu određivanja doza i trebale bi se procjenjivati od slučaja do slučaja.
27. Kako bi se dobile informacije o odgovoru na dozu, potpuno istraživanje trebalo bi uključivati negativnu kontrolnu skupinu i minimalno tri visine doze pri čemu je svaka uglavnom dvostruko veća od prethodne, ali najviše četverostruko. Ako ispitivana kemikalija u istraživanju za određivanje raspona ili na temelju postojećih podataka ne izaziva toksičnost, najviša doza za jednu primjenu trebala bi biti 2 000 mg/kg tjelesne mase. Međutim, ako ispitivana kemikalija uzrokuje toksičnost, MTD bi trebao biti najviša primijenjena doza i poželjno je da se primijenjenim visinama doze obuhvati raspon od maksimalne doze do doze koja izaziva malu toksičnost ili ne izaziva toksičnost. Za netoksične kemikalije granična doza za razdoblje primjene od 14 dana ili više iznosi 1 000 mg/kg tjelesne mase dnevno, a za razdoblja primjene kraća od 14 dana granična doza iznosi 2 000 mg/kg tjelesne mase dnevno.

Primjena doza

28. Pri planiranju testa u obzir bi trebalo uzeti očekivani način izlaganja kod ljudi. Stoga se, ako je to opravdano, mogu odabrati načini izlaganja kao što su unos s hranom, unos s vodom za piće, potkožna primjena, intravenozna primjena, lokalna primjena, inhalacija,

oralna primjena (oralna intubacija) ili implantacija. U svakom slučaju, način izlaganja trebalo bi odabrati tako da se osigura prikladno izlaganje ciljnog tkiva. Intraperitonealna injekcija obično se ne preporučuje jer nije način izlaganja namijenjen ljudima i trebalo bi je upotrebljavati samo uz posebno znanstveno opravdanje. Ako se ispitivana kemikalija dodaje hrani ili vodi za piće, posebno u slučaju primjene jedne doze, trebalo bi voditi računa o tome da se osigura dostatno vrijeme od unosa hrane i vode do parenja kako bi se omogućilo otkrivanje učinaka (stavak 31.). Maksimalni volumen tekućine koji se odjednom može primijeniti oralnom intubacijom ili injekcijom ovisi o veličini ispitne životinje. Taj volumen obično ne bi trebao biti veći od 1 ml/100 g tjelesne mase, osim u slučaju vodenih otopina kod kojih je dopušteno upotrijebiti maksimalno 2 ml/100 g. Primjene većih volumena od navedenog (ako je dopušteno zakonodavstvom o dobrobiti životinja) treba opravdati. Variranje ispitnih volumena treba svesti na minimum podešavanjem koncentracije kako bi se kod svih visina doza osigurao stalni volumen u odnosu na tjelesnu masu.

Opažanja

29. Najmanje jednom dnevno treba provoditi opća klinička opažanja o ispitnim životinjama i zabilježiti kliničke znakove, po mogućnosti svaki dan u isto vrijeme ili vremena, vodeći računa o razdoblju najvećeg intenziteta očekivanih učinaka nakon doziranja. Najmanje dvaput dnevno tijekom razdoblja primjene doze, kod svih životinja treba provjeriti ima li slučajeva morbiditeta ili smrtnosti. Sve bi životinje trebalo izvagati na početku istraživanja i najmanje jednom tjedno tijekom istraživanja s ponovljenim dozama te prilikom eutanazije. Unos hrane treba mjeriti najmanje jednom tjedno. Ako se ispitivana kemikalija daje s vodom za piće, unos vode trebalo bi mjeriti pri svakoj promjeni vode i najmanje jednom tjedno. Životinje koje pokazuju nesmrtonosne pokazatelje prekomjerne toksičnosti trebalo bi eutanazirati prije dovršetka razdoblja ispitivanja (27.).

Prikupljanje i obrada tkiva

30. Ženke se eutanaziraju u drugoj polovini gravidnosti, na 13. dan gestacije kod miševa i 14.–15. dan kod štakora. Maternice se pregledavaju s obzirom na dominantno letalne učinke kako bi se utvrdio broj implantata, živih i mrtvih embrija te žutih tijela.
31. Rog maternice i jajnici izlažu se kako bi se prebrojala žuta tijela, a fetusi se uklanjaju, broje i važu. Trebalo bi oprezno pregledati maternice kako bi se otkrile resorpcije koje mogu prikriti živi fetusi i kako bi se osiguralo da se nabroje sve resorpcije. Bilježi se fetalna smrtnost. Bilježi se i broj uspješno oplodjenih ženki i ukupan broj implantacija, predimplantacijskih gubitaka i postimplantacijska smrtnost (uključujući rane i kasne resorpcije). Osim toga, vidljivi fetusi mogu se čuvati u Bouinovu fiksativu najmanje dva tjedna, nakon čega slijedi pregled kojim se utvrđuju velike vanjske deformacije (28.) kako bi se dobile dodatne informacije o reproduktivnim i razvojnim učincima ispitnog agensa.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Obrada rezultata

32. Podatke treba prikazati u obliku tablice iz koje se može vidjeti broj mužjaka koji su se parili, broj gravidnih ženki i broj negravidnih ženki. Rezultate svakog parenja, uključujući identifikacijsku oznaku svakog mužjaka i ženke, treba bilježiti pojedinačno. Za svaku ženku trebalo bi navesti interval parenja, visinu doze za tretirane mužjake i broj živih i mrtvih implantata.
33. Postimplantacijski gubitak računa se utvrđivanjem omjera mrtvih implantata u odnosu na njihov ukupan broj iz tretirane skupine u usporedbi s omjerom mrtvih implantata u odnosu na njihov ukupan broj iz kontrolne skupine s nosačem/otapalom.
34. Predimplantacijski gubitak računa se kao razlika između broja žutih tijela i broja implantata ili kao smanjenje prosječnog broja implantata po ženki u usporedbi s parenjima u kontrolnoj skupini. Ako su procijenjeni gubici prije implantacije, treba ih zabilježiti.
35. Čimbenik dominantne letalnosti procjenjuje se kao: $(\text{broj postimplantacijskih smrti} / \text{ukupan broj implantacija po ženki}) \times 100$.
36. Treba izvijestiti o podacima o toksičnosti i kliničkim znakovima (u skladu sa stavkom 29.).

Kriteriji prihvatljivosti

37. Prihvatljivost ispitivanja utvrđuje se na temelju sljedećih kriterija.
 - Istodobna negativna kontrola u skladu je s objavljenim normama za podatke o prijašnjim negativnim kontrolama i podacima laboratorija o prijašnjim kontrolama, ako su dostupni (vidjeti stavke 10. i 18.).
 - Istodobne pozitivne kontrole induciraju odgovore koji su u skladu s objavljenim normama za podatke o prijašnjim pozitivnim kontrolama ili bazom podataka laboratorija o prijašnjim pozitivnim kontrolama, ako je dostupno, i dovode do statistički značajnog povećanja u usporedbi s negativnom kontrolom (vidjeti stavke 17. i 18.).
 - Analiziran je odgovarajući ukupan broj implantata i doza (stavak 20.).
 - Kriteriji za odabir najviše doze u skladu su s kriterijima opisanima u stavcima 24. i 27.

Ocjenjivanje i tumačenje rezultata

38. Treba analizirati barem tri skupine tretirane dozom da bi se prikupilo dovoljno podataka za analizu doze i odgovora.
39. Pod uvjetom da su ispunjeni svi kriteriji prihvatljivosti, ispitivana kemikalija smatra se jasno pozitivnom:

- ako najmanje jedna od ispitnih doza pokazuje statistički značajno povećanje u usporedbi s istodobnom negativnom kontrolom,
- ako je povećanje povezano s dozom u najmanje jednom pokusnom uvjetu (npr. tjedni interval parenja) kad se ocjenjuje odgovarajućim testom, i
- ako je bilo koji od rezultata izvan prihvatljivog raspona podataka o negativnim kontrolama ili distribucije podataka laboratorija o prijašnjim negativnim kontrolama (npr. kontrolne granice od 95 % prema Poissonovoj distribuciji), ako su dostupni.

Tad se smatra da ispitivana kemikalija može inducirati mutacije dominantnih letalnih gena u zametnim stanicama ispitnih životinja. Preporuke za najprikladnije statističke metode opisane su u stavku 44.; drugi preporučeni statistički pristupi mogu se pronaći i u literaturi (20., 21., 22., 24. i 29.). Upotrijebljena statistička ispitivanja trebala bi kao pokusnu jedinicu uzimati životinju.

40. Pod uvjetom da su ispunjeni svi kriteriji prihvatljivosti, ispitivana kemikalija smatra se jasno negativnom:

- ako ni pri jednoj ispitnoj dozi nije zapaženo statistički značajno povećanje u odnosu na istodobnu negativnu kontrolu,
- ako ni u jednom pokusnom uvjetu nema povećanja povezanog s dozom, i
- ako su svi rezultati unutar prihvatljivog raspona podataka o negativnim kontrolama ili podataka o prijašnjim negativnim kontrolama laboratorija (npr. kontrolne granice od 95 % prema Poissonovoj distribuciji), ako su dostupni.

Tad se smatra da ispitivana kemikalija ne može inducirati mutacije dominantnih letalnih gena u zametnim stanicama ispitnih životinja.

41. Jasan pozitivan ili negativan odgovor nije potrebno provjeriti.

42. Ako odgovor nije jasno negativan ili pozitivan i kako bi se pomoglo utvrditi biološku relevantnost rezultata (npr. slabo ili granično povećanje), podatke bi trebalo ocjenjivati na temelju stručne prosudbe i/ili daljnjih istraživanja uz upotrebu postojećih eksperimentalnih podataka, kao što su razmatranja o tome je li pozitivan rezultat izvan prihvatljivog raspona podataka o negativnim kontrolama ili podataka laboratorija o prijašnjim negativnim kontrolama (30.).

43. U rijetkim slučajevima, čak i nakon dodatnih istraživanja, skup podataka neće omogućiti donošenje zaključka o tome je li rezultat pozitivan ili negativan te će se stoga zaključiti da je dvosmislen.

44. Upotrijebljena statistička ispitivanja trebala bi kao pokusnu jedinicu uzimati mužjaka. Iako je moguće da podaci o broju (npr. broj implantata po ženki) mogu odgovarati Poissonovoj distribuciji i/ili da udjeli (npr. udio mrtvih implantata) mogu biti binomno distribuirani, ti

su podaci često previše raspršeni (31.). U skladu s tim, u statističkoj analizi prvo bi se trebao primijeniti test za veću ili manju raspršenost upotrebom testa varijance kao što je Cochranov test binomne varijance (32.) ili Taroneov $C(\alpha)$ test za binomnu veću raspršenost (31. i 33.). Ako se ne otkrije odstupanje od binomne raspršenosti, trendovi udjela u svim visinama doza mogu se ispitati upotrebom Cochran-Armitageova testa trenda (34.), a usporedba u parovima s kontrolnom skupinom može se ispitati upotrebom Fisherova egzaktnog testa (35.). Isto tako, ako se ne otkrije odstupanje od Poissonove raspršenosti, trendovi u brojevima mogu se ispitati upotrebom Poissonove regresije (36.), a usporedba u parovima s kontrolnom skupinom može se ispitati u kontekstu Poissonova modela upotrebom kontrasta u parovima (36.). Ako se otkrije znatno veća ili manja raspršenost, preporučuju se neparametarske metode (23. i 31.). One obuhvaćaju testove koji se temelje na rangovima, kao što su Jonckheere-Terpstraov test trenda (37.) i Mann-Whitneyjevi testovi (38.) za usporedbu u parovima s kontrolnom skupinom s nosačem/otapalom te testovi permutacija, ponovnog uzorkovanja i samonadopunjavanja (*bootstrap*) za trendove i usporedbe u parovima s kontrolnom skupinom (31. i 39.).

45. Pozitivni test dominantnih letalnih gena pruža dokaze o genotoksičnosti ispitivane kemikalije u zametnim stanicama tretiranog mužjaka ispitne vrste.

46. Pri procjeni biološke važnosti odgovora kao orijentacija mogu poslužiti razmatranje o tome jesu li uočene vrijednosti unutar ili izvan raspona prijašnjih kontrola (40.).

Izvešće o ispitivanju

47. Izvešće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije.

Sažetak.

Ispitivana kemikalija:

- izvor, broj serije, rok uporabe, ako su dostupni,
- stabilnost ispitivane kemikalije, ako je poznata,
- topljivost i stabilnost ispitivane kemikalije u otapalu, ako su poznate,
- izmjerene vrijednosti za pH, osmolalnost i taloženje u mediju za uzgoj kulture u koji je dodana ispitivana kemikalija, prema potrebi.

Tvar s jednim sastojkom:

- fizički izgled, topljivost u vodi i druga relevantna fizikalno-kemijska svojstva,
- kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv, CAS broj, SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula, čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.

Tvari s više sastojaka, UVCB tvari i smjese:

- opis (koliko je to moguće) kemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativnog udjela i relevantnih fizikalno-kemijskih svojstava sastojaka.

Priprema ispitivane kemikalije:

- obrazloženje za odabir nosača,
- topljivost i stabilnost ispitivane kemikalije u otapalu/nosaču, ako su poznate,
- priprema formulacija koje se unose s hranom, vodom za piće ili udisanjem,
- analitička određivanja formulacija (npr. stabilnost, homogenost, nominalne koncentracije), ako se provode.

Ispitne životinje:

- vrsta/soj te obrazloženje tog odabira,
- broj, dob i spol životinja,
- podrijetlo, uvjeti smještaja, prehrana itd.,
- metoda jedinstvenog identificiranja životinja,
- za kratkotrajna istraživanja: pojedinačna tjelesna masa mužjaka na početku i na kraju ispitivanja; za istraživanja dulja od tjedan dana: pojedinačna tjelesna masa tijekom istraživanja i unos hrane. Trebalo bi uključiti raspon tjelesne mase, srednju vrijednost i standardno odstupanje za svaku skupinu.

Ispitni uvjeti:

- podaci o pozitivnim i negativnim kontrolama (nosač/otapalo),
- podaci iz istraživanja za određivanje raspona,
- obrazloženje odabira visine doze,
- pojedinosti o pripremi ispitivane kemikalije,
- pojedinosti o primjeni ispitivane kemikalije,
- obrazloženje odabira načina primjene,
- metode mjerenja toksičnosti životinje, uključujući, ako je dostupno, histopatološke ili hematološke analize i učestalost kojom su obavljeni promatranje i vaganje životinje,
- metode kojima se provjerava je li ispitivana kemikalija dospjela u ciljno tkivo ili krvotok, ako se dobiju negativni rezultati,
- stvarna doza (mg/kg tjelesne mase/dan) izračunata na temelju koncentracije ispitivane kemikalije u hrani/vodi za piće (ppm) i unosa hrane/vode, ako je primjenjivo,

- pojedinosti o kvaliteti hrane i vode,
- pojedinosti o obogaćivanju okoliša u kavezu,
- detaljan opis režima tretiranja i uzorkovanja te obrazloženje tih odabira,
- metoda analgezije,
- metoda eutanazije,
- postupak izdvajanja i očuvanja tkiva,
- izvor i serijski brojevi sve opreme i reagensa (ako je primjenjivo),
- metode prebrojavanja dominantnih letalnih gena,
- režim parenja,
- metode korištene da bi se utvrdilo da je došlo do parenja,
- vrijeme eutanazije,
- kriteriji za ocjenjivanje dominantno letalnih učinaka, uključujući žuta tijela, implantacije, resorpcije i predimplantacijske gubitke, žive implantate i mrtve implantate.

Rezultati:

- stanje životinje prije i tijekom razdoblja ispitivanja, uključujući znakove toksičnosti,
- tjelesna masa mužjaka tijekom razdoblja tretiranja i parenja,
- broj parenih ženki,
- odnos doze i odgovora, ako je to moguće,
- podaci o istodobnim i prijašnjim negativnim kontrolama s rasponima, srednjim vrijednostima i standardnim odstupanjima,
- podaci o istodobnim pozitivnim kontrolama,
- tablični podaci za svaku ženku, uključujući: broj žutih tijela po ženki; broj implantacija po ženki; broj resorpcija i predimplantacijskih gubitaka po ženki; broj živih implantata po ženki; broj mrtvih implantata po ženki; težine fetusa,
- prethodno navedeni podaci sažeti za svako razdoblje parenja i dozu, s učestalostima pojave mutacija dominantnih letalnih gena,
- primijenjene statističke analize i metode.

Rasprava o rezultatima.

Zaključak.

LITERATURA

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

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

22. Generoso W.M. and Piegorsch W.W. (1993). Dominant Lethal Tests in Male and Female Mice. *Methods, Toxicol.*, 3A:124.–141.
23. Haseman J.K. and Soares E.R. (1976). The Distribution of Fetal Death in Control Mice and its Implications on Statistical Tests for Dominant Lethal Effects. *Mutation. Res.*, 41: 277.–288.
24. Whorton E.B. Jr. (1981). Parametric Statistical Methods and Sample Size Considerations for Dominant Lethal Experiments. The Use of Clustering to Achieve Approximate Normality, *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.*, 1:353.–360.
25. Anderson D., Anderson, D., Hodge, M.C.E., Palmer, S., and Purchase, I.F.H. (1981). Comparison of Dominant Lethal and Heritable Translocation Methodologies. *Mutation. Res.*, 85:417.–429.
26. Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. *Mutagen.*, 7:313.–319.
27. OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No.19.), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
28. Barrow M.V., Taylor W.J and Morphol J. (1969). A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Fetuses, 127, 291.–306.
29. Kirkland D.J., (Ed.)(1989). Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Cambridge University Press.
30. Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H.-J. and Thybaud, V. (2011). „Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data”, *Mutation. Res.*, 723:87.–90.
31. Lockhart A.C., Piegorsch W.W. and Bishop J.B. (1992). Assessing Over Dispersion and Dose-Response in the Male Dominant Lethal Assay. *Mutation. Res.*, 272:35.–58.
32. Cochran W.G. (1954). Some Methods for Strengthening the Common χ^2 Tests. *Biometrics*, 10:103. 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. U *Encyclopedia of Statistical Sciences*, Volume 9, Kotz S. and Johnson N. L. (Eds.), str. 334.–336. John Wiley and Sons, New York.
35. Cox D.R., Analysis of Binary Data. Chapman and Hall, London (1970).
36. Neter J.M., Kutner, H.C., Nachtsheim, J. and Wasserman, W. (1996). Applied Linear Statistical Models, Fourth Edition, poglavljja 14. i 17. McGraw-Hill, Boston.
37. Jonckheere R. (1954). A Distribution-Free K-Sample Test Against Ordered Alternatives. *Biometrika*, 41:133.–145.
38. Conover W.J. (1971). Practical Nonparametric Statistics. John Wiley and Sons, New York.
39. Efron, B. (1982). The Jackknife, the Bootstrap and Other Resampling Plans. Society for Industrial and Applied Mathematics, Philadelphia, PA.
40. Fleiss J. (1973). Statistical Methods for Rates and Proportions. John Wiley and Sons, New York.

Dodatak 1.**DEFINICIJE**

Kemikalija: tvar ili smjesa.

Žuto tijelo (tijela): struktura koja luči hormone i koja nastaje na jajniku na mjestu folikula koji je ispustio jajašce. Broj žutih tijela u jajnicima odgovara broju jajašaca koja su ovulirala.

Mutacija dominantnih letalnih gena: mutacija do koje dolazi u zametnoj stanici ili koja se fiksira nakon oplodnje, a uzrokuje embrionalnu ili fetalnu smrt.

Stopa plodnosti: broj parenih gravidnih ženki u odnosu na broj parenih ženki.

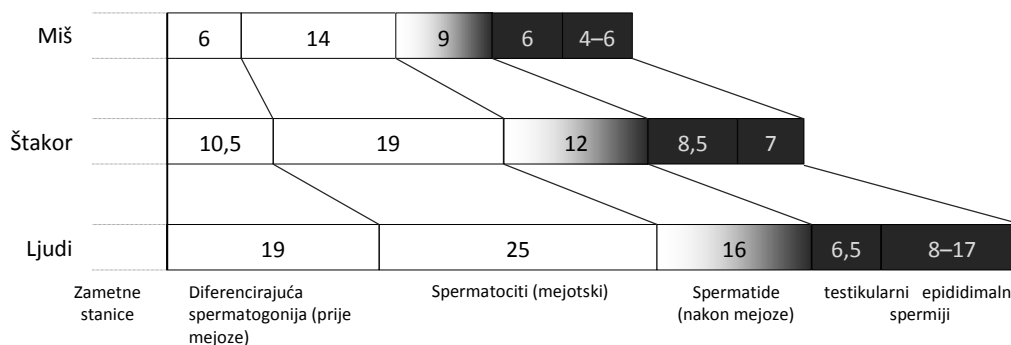
Interval parenja: vrijeme od kraja izlaganja do parenja tretiranih mužjaka. Kontrolom tog intervala mogu se procijeniti kemijski učinci na različite vrste zametnih stanica. Kod miševa koji se pare tijekom 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7. i 8. tjedna nakon kraja izlaganja mjere se učinci na spermu, kondenzirane spermatide, okrugle spermatide, spermatocyte u fazi pahitena, rane spermatocyte, diferencirane spermatogonije, diferencirajuće spermatogonije i matične spermatogonije.

Predimplantacijski gubitak: razlika između broja implantata i broja žutih tijela. Može se procijeniti i usporedbom ukupnog broja implantata po ženki u tretiranoj i kontrolnoj skupini.

Postimplantacijski gubitak: omjer mrtvih implantata u tretiranoj skupini u usporedbi s omjerom mrtvih implantata u odnosu na njihov ukupan broj u kontrolnoj skupini.

Ispitivana kemikalija: svaka tvar ili smjesa koja se ispituje ovom ispitnom metodom.

UVCB: kemijske tvari nepoznatog ili promjenjivog sastava, složeni reakcijski proizvodi i biološki materijali.

Dodatak 2.**TIJEK SPERMATOGENEZE U SISAVACA**

Slika 1.: Usporedba trajanja (u danima) razvoja muških zامةnih stanica u miševa, štakora i ljudi. Do popravka DNK ne dolazi tijekom razdoblja koja su osjenčana.

Gore je prikazan shematski prikaz spermatogeneze u miševa, štakora i ljudi (preuzeto iz Adler, 1996.). Nediferencirane spermatogonije uključuju: spermatogonije tipa A_s , A_{pr} i A_{al} (Hess i de Franca, 2008.). A_s se smatra pravom matičnom stanicom; stoga od posljednje injekcije ispitivane kemikalije do parenja mora proći najmanje 49 dana (kod miševa) kako bi se procijenili učinci na zامةne stanice.

Referentni dokumenti

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

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

(4) u dijelu B poglavlje B.23. zamjenjuje se sljedećim:

„B.23. ISPITIVANJE KROMOSOMSKIH ABERACIJA U SPERMATOGONIJAMA SISAVACA

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 483 (2016.). Ispitne metode periodično se preispituju uzimajući u obzir znanstveni napredak, promjene regulatornih potreba i razmatranja o dobrobiti životinja. U ovoj izmijenjenoj verziji ispitne metode uzimaju se u obzir godine iskustva s tim testom i mogućnost integriranja ili kombiniranja tog ispitivanja s drugim studijama toksičnosti ili genotoksičnosti. Kombiniranjem studija toksičnosti može se smanjiti broj životinja koje se upotrebljavaju u ispitivanjima toksičnosti. Ova je ispitna metoda dio niza ispitnih metoda u području genetske toksikologije. OECD je sastavio dokument u kojem se daju sažete informacije o ispitivanju u području genetske toksikologije te pregled novijih promjena smjernica OECD-a za ispitivanje genotoksičnosti (1.).
2. Svrha je *in vivo* testa kromosomskih aberacija u spermatogonijama sisavaca utvrditi kemikalije koje uzrokuju strukturne kromosomske aberacije u spermatogonijskim stanicama sisavaca (2., 3. i 4.). Osim toga, ovo je ispitivanje relevantno za ocjenu genotoksičnosti jer, iako se mogu razlikovati među vrstama, faktori *in vivo* metabolizma, farmakokinetika i procesi popravka DNK aktivni su i pridonose odgovorima. Ova ispitna metoda nije namijenjena mjerenju numeričkih abnormalnosti; test se ne upotrebljava rutinski u tu svrhu.
3. Ovim se ispitivanjem mjere strukturne kromosomske aberacije (i kromosomskog i kromatidnog tipa) u spermatogonijskim zametnim stanicama u fazi diobe te se stoga očekuje da se tim ispitivanjem može predvidjeti indukcija nasljednih mutacija u tim zametnim stanicama.
4. Definicije ključnih pojmova utvrđene su u Dodatku.

POČETNA RAZMATRANJA

5. U ovom ispitivanju obično se upotrebljavaju glodavci, ali i druge vrste mogu biti prikladne u određenim slučajevima, ako je to znanstveno opravdano. Standardni citogenetski preparati sjemenika glodavaca daju mitotske (spermatogonije) i mejotske (spermatocit) metafaze. Mitotske i mejotske metafaze utvrđuju se na temelju morfologije kromosoma (4.). Ovim se *in vivo* citogenetskim testom otkrivaju strukturne kromosomske aberacije pri spermatogonijskoj mitozu. Druge ciljane stanice nisu predmet ove ispitne metode.
6. Kako bi se moglo otkriti aberacije kromatidnog tipa u spermatogonijskim stanicama, treba ispitati prvu mitotsku diobu stanica nakon tretiranja, prije nego što se te aberacije pretvore u aberacije kromosomskog tipa u kasnijim staničnim diobama. Dodatne informacije o tretiranim

spermatocitima mogu se dobiti analizom strukturnih kromosomskih aberacija kod kromosoma tijekom mejoze u dijakinezi-metafazi I i metafazi II.

7. U sjemeniku se nalaze brojne generacije spermatogonija (5.) i te različite vrste zametnih stanica mogu biti različito osjetljive na tretiranje kemikalijama. Prema tome, uočene aberacije predstavljaju skupnu reakciju tretiranih populacija spermatogonijskih stanica. Većinu mitotskih stanica u preparatima sjemenika čine spermatogonije tipa B, koje imaju stanični ciklus od približno 26 sati (3.).
8. Ako postoje dokazi da ispitivana kemikalija ili njezini metaboliti neće dospjeti do sjemenika, ovaj oblik ispitivanja nije prikladan.

NAČELO ISPITNE METODE

9. Obično se životinje izlažu ispitivanoj kemikaliji prikladnim načinom izlaganja i eutanaziraju u odgovarajućim trenucima nakon tretiranja. Prije eutanazije životinje se tretiraju agensom za zaustavljanje metafaze (npr. kolhicinom ili Colcemidom®). Nakon toga naprave se i oboje kromosomski preparati zametnih stanica te se analizom utvrđuje je li došlo do kromosomskih aberacija metafaznih stanica.

PROVJERA OSPOSOBLJENOSTI LABORATORIJA

10. Osposobljenost za provedbu ovog testa trebalo bi utvrditi dokazivanjem sposobnosti reproduciranja očekivanih rezultata za učestalost pojave kromosomske aberacije kod spermatogonija s tvarima za pozitivnu kontrolu (uključujući slabe odgovore), kao što su one navedene u tablici 1., te postizanja učestalosti u negativnim kontrolama koje su u skladu s prihvatljivim rasponom podataka o kontrolama u objavljenoj literaturi (npr. 2., 3., 6., 7., 8., 9. i 10.) ili distribucijom prijašnjih kontrola laboratorija, ako su dostupni.

OPIS METODE

Pripreme

Odabir životinjske vrste

11. Trebalo bi upotrebljavati zdrave, mlade odrasle životinje sojeva koji se obično upotrebljavaju u laboratorijskim istraživanjima. Obično se upotrebljavaju mužjaci miševa; međutim, mogu se upotrebljavati mužjaci drugih prikladnih vrsta sisavaca ako za to postoji znanstveno opravdanje i ako se time omogućuje da se ispitivanje provodi zajedno s drugom ispitnom metodom. U izvješću bi trebalo navesti znanstveno opravdanje za uporabu drugih vrsta osim glodavaca.

Uvjeti smještaja i hranjenja životinja

12. U slučaju glodavaca, temperatura prostorije u kojoj se drže životinje trebala bi biti 22 °C (± 3 °C). Iako bi u idealnim okolnostima relativna vlažnost trebala biti 50–60 %, ona bi trebala

biti najmanje 40 %, a poželjno je da ne prelazi 70 %, osim tijekom čišćenja prostorije. Rasvjeta bi trebala biti umjetna uz izmjenu 12 sati svjetla i 12 sati mraka. Za hranjenje se može upotrebljavati konvencionalna laboratorijska hrana uz neograničenu količinu vode za piće. Kad se ispitivana kemikalija primjenjuje ovim načinom izlaganja, na izbor prehrane može utjecati potreba da se osigura odgovarajuća primjesa ispitivane kemikalije. Glodavci bi trebali biti smješteni u malim skupinama (ne više od pet po kavezu) ako se ne očekuje agresivno ponašanje, po mogućnosti u kavezima s čvrstim podom i uz prikladno obogaćivanje okoliša. Ako je to znanstveno opravdano, životinje se mogu držati u zasebnim nastambama.

Priprema životinja

13. Obično se upotrebljavaju zdravi mladi odrasli mužjaci (stari 8–12 tjedana na početku tretiranja) te se nasumce raspoređuju u kontrolne skupine i skupine za tretiranje. Pojedinačne životinje označuju se na jedinstven način upotrebom humane, najmanje invazivne metode (npr. prstenovanjem, stavljanjem oznaka, mikročipiranjem ili biometrijskom identifikacijom, ali ne rezanjem uha ili prsta) i prilagođavaju laboratorijskim uvjetima najmanje pet dana. Kaveze bi trebalo rasporediti tako da se učinci do kojih bi moglo doći zbog položaja kaveza svedu na minimum. Trebalo bi izbjegavati unakrsnu kontaminaciju pozitivnom kontrolom i ispitivanom kemikalijom. Na početku istraživanja variranje tjelesne mase pojedinačnih životinja treba biti što manje i ne smije prelaziti ± 20 %.

Priprema doza

14. Prije nego što se doza daje životinjama, krute ispitivane tvari po potrebi treba otopiti ili suspendirati u odgovarajućim otapalima ili nosačima ili dodati hrani ili vodi za piće. Tekuće ispitivane kemikalije mogu se dozirati izravno ili razrijediti prije doziranja. Za potrebe inhaliranja, ispitivane kemikalije mogu se primijeniti u obliku plina, pare ili krutog/tekućeg aerosola, ovisno o njihovim fizikalno-kemijskim svojstvima. Ako prema podacima o stabilnosti skladištenje nije prihvatljivo i ako nisu utvrđeni prikladni uvjeti skladištenja, preparate ispitivane kemikalije trebalo bi upotrebljavati svježe.

Ispitni uvjeti – otapalo/nosač

15. Pri visinama doza koje se primjenjuju otapalo/nosač ne smije imati imati toksične učinke i ne smije postojati sumnja da bi mogao kemijski reagirati s ispitivanim kemikalijama. Ako se upotrebljavaju otapala/nosači koji nisu dobro poznati, njihovo uključivanje u ispitivanje trebalo bi potkrijepiti referentnim podacima kojima se dokazuje njihova usklađenost. Kad god je moguće, preporučuje se najprije razmotriti mogućnost primjene vodenog otapala/nosača. Primjeri uobičajeno korištenih usklađenih otapala/nosača uključuju vodu, fiziološku otopinu, otopinu metil-celuloze, otopinu natrijeve soli karboksimetilne celuloze, maslinovo ulje i kukuruzno ulje. Ako ne postoje prijašnji ili objavljeni podaci o kontrolama kojima se dokazuje da odabranim atipičnim otapalom/nosačem nisu inducirane strukturne kromosomske aberacije ili drugi štetni učinci, trebalo bi provesti početno istraživanje kako bi se utvrdila prihvatljivost kontrole s otapalom/nosačem.

Pozitivne kontrole

16. Uvijek bi se trebale upotrebljavati životinje istodobnih pozitivnih kontrola, osim ako je laboratorij dokazao osposobljenost za provedbu ispitivanja te je u nedavnoj prošlosti rutinski upotrebljavao ispitivanje (npr. u posljednjih pet godina). Ako nije uključena istodobna pozitivna kontrolna skupina, u svaki pokus trebalo bi uključiti kontrole ocjenjivanja (fiksirana i nebojena predmetna stakalca). One se mogu dobiti uključivanjem u ocjenjivanje istraživanja prikladnih referentnih uzoraka koji su dobiveni i pohranjeni iz zasebnog pokusa s pozitivnom kontrolom koji se provodi periodično (npr. svakih šest do 18 mjeseci) u laboratoriju u kojem se provodi ispitivanje; na primjer, tijekom ispitivanja osposobljenosti laboratorija i redovito nakon toga, ako je potrebno.
17. Tvari za pozitivnu kontrolu trebale bi pouzdano izazvati zamjetno povećanje učestalosti stanica sa strukturnim kromosomskim aberacijama iznad spontanih razina. Doze pozitivnih kontrola trebalo bi odabrati tako da učinci budu jasni, ali da analitičar ne može odmah vidjeti identitet kodiranih uzoraka. Primjeri tvari pozitivnu kontrolu navedeni su u tablici 1.

Tablica 1.: Primjeri tvari za pozitivnu kontrolu.

Tvari [CAS br.] (referentni br.)
Ciklofosamid (monohidrat) [CAS br. 50-18-0 (CAS br. 6055-19-2)] (9.)
Cikloheksilamin [CAS br. 108-91-8] (7.)
Mitomicin C [CAS br. 50-07-7] (6.)
Monomerni akrilamid [CAS 79-06-1] (10.)
Trietilenmelamin [CAS 51-18-3] (8.)

Negativne kontrole

18. Životinje negativne kontrole, koje se tretiraju samo s otapalom ili nosačem, a inače se tretiraju jednako kao skupine za tretiranje, trebale bi biti uključene u svako vrijeme uzorkovanja. Ako ne postoje prijašnji ili objavljeni kontrolni podaci kojima se dokazuje da odabrano otapalo ili nosač ne inducira nikakve kromosomske aberacije ili druge štetne učinke, i netretirane kontrolne životinje trebale bi biti uključene u svako vrijeme uzorkovanja kako bi se utvrdila prihvatljivost kontrole s nosačem.

POSTUPAK**Broj životinja**

19. Na početku istraživanja trebalo bi utvrditi veličine skupina kako bi se po skupini osiguralo minimalno pet mužjaka. Taj se broj životinja smatra dovoljnim za dobivanje primjerene statističke snage (tj. općenito se može otkriti barem udvostručenje učestalosti pojave

kromosomske aberacije kad je razina negativne kontrole 1,0 % ili veća s 80-postotnom vjerojatnošću pri razini značajnosti od 0,05) (3. i 11.). Kao smjernica za uobičajene maksimalne zahtjeve u pogledu životinja, za istraživanje s dva vremena uzorkovanja, s tri skupine koje primaju dozu i istodobnom negativnom kontrolnom skupinom plus pozitivnom kontrolnom skupinom (pri čemu se svaka skupina sastoji od pet životinja) bilo bi potrebno 45 životinja.

Režim tretiranja

20. Ispitivane kemikalije obično se primjenjuju jednom (tj. kao jednokratno tretiranje); mogu se primjenjivati i drugi režimi doziranja uz uvjet da su znanstveno opravdani.
21. Kod skupine na koju se primjenjuje najviša doza uzorci se uzimaju dvaput nakon tretiranja. Budući da vrijeme potrebno za apsorpciju i metabolizam ispitivane kemikalije ili kemikalija, kao i njezino djelovanje na kinetiku staničnog ciklusa, mogu utjecati na optimalno vrijeme za otkrivanje kromosomskih aberacija, jedno se uzorkovanje obavlja ranije, a jedno kasnije, približno 24 sata i 48 sati nakon tretiranja. Kod ostalih doza ranije uzorke treba uzeti 24 sata nakon tretiranja (manje od trajanja staničnog ciklusa spermatogonija tipa B ili jednako tom trajanju, čime se poboljšava vjerojatnost ocjene prve metafaze nakon tretiranja), osim ako je poznato da je neko drugo vrijeme uzorkovanja primjerenije i opravdano.
22. Uzorci se mogu uzeti i u neko drugo vrijeme. Na primjer, u slučaju kemikalija koje imaju učinke neovisne o S-fazi, uzorkovanja može biti primjereno obaviti ranije (tj. u razdoblju kraćem od 24 sata).
23. Može se upotrijebiti režim ponovljenih doza tretiranja, na primjer, zajedno s ispitivanjem na drugoj krajnjoj točki kod koje se upotrebljava razdoblje primjene od 28 dana (npr. ispitna metoda B.58.); međutim, bile bi potrebne dodatne skupine životinja kako bi se uzela u obzir različita vremena uzorkovanja. U skladu s tim, primjerenost tog režima treba znanstveno opravdati od slučaja do slučaja.
24. Prije eutanazije životinjama se intraperitonealno ubrizgava odgovarajuća doza kemikalije za zaustavljanje metafaze (npr. Colcemid® ili kolhicin). Zatim se nakon odgovarajućeg vremenskog intervala životinje podvrgavaju uzorkovanju. Za miševe i štakore taj interval iznosi približno 3–5 sati.

Visine doza

25. Ako se provodi preliminarno istraživanje za određivanje raspona doza jer još nisu dostupni prikladni podaci koji bi pomogli u odabiru doza, trebalo bi ga provesti u istom laboratoriju primjenom iste vrste, soja i režima tretiranja kao i u glavnom istraživanju, u skladu s preporukama za provođenje istraživanja za određivanje raspona doza (12.). Tim bi se istraživanjem trebala odrediti maksimalna podnošljiva doza (MTD), koja se definira kao doza koja inducira blage toksične učinke povezane s trajanjem istraživanja (na primjer, neuobičajeno ponašanje ili reakcije, manji gubitak tjelesne mase ili hematopoetska sustavna citotoksičnost),

ali ne inducira smrt ili znakove boli, patnje ili stresa zbog kojih bi životinju trebalo eutanazirati (13.).

26. Najviša se doza može definirati i kao doza pri kojoj se javljaju određeni znakovi toksičnosti u spermatogonijskim stanicama (npr. smanjenje omjera spermatogonijskih mitoza u odnosu na prvu i drugu mejotsku metafazu). Navedeno smanjenje ne bi smjelo prelaziti 50 %.
27. Ispitivanje kemikalije s posebnim biološkim djelovanjem u slabim netoksičnim dozama (kao što su hormoni i mitogeni) i kemikalije koje pokazuju zasićenost toksikokinetičkih svojstava mogu se izuzeti iz kriterija u pogledu određivanja doza i trebale bi se procjenjivati od slučaja do slučaja.
28. Kako bi se dobile informacije o odgovoru na dozu, potpuno istraživanje trebalo bi uključivati negativnu kontrolnu skupinu (stavak 18.) i minimalno tri visine doze pri čemu je svaka uglavnom dvostruko veća od prethodne, ali najviše četverostruko. Ako ispitivana kemikalija u istraživanju za određivanje raspona ili na temelju postojećih podataka ne izaziva toksičnost, najviša doza za jednu primjenu trebala bi biti 2 000 mg/kg tjelesne mase. Međutim, ako ispitivana kemikalija uzrokuje toksičnost, MTD bi trebao biti najviša primijenjena doza i poželjno je da se primijenjenim visinama doze obuhvati raspon od maksimalne doze do doze koja izaziva malu toksičnost ili ne izaziva toksičnost. Ako je toksičnost ciljnog tkiva (tj. sjemenika) zapažena pri svim ispitanim visinama doza, preporučuje se daljnje istraživanje pri netoksičnim dozama. Za istraživanja čiji je cilj potpunije opisati kvantitativne informacije o odgovoru na dozu mogu biti potrebne dodatne skupine koje primaju dozu. Za određene vrste ispitivanih kemikalija (npr. za farmaceutske proizvode namijenjene ljudima) obuhvaćene posebnim zahtjevima ta se ograničenja mogu razlikovati. Ako ispitivana kemikalija uzrokuje toksičnost, trebala bi se odabrati granična doza i dvije manje doze (kako je prethodno opisano). Granična doza za razdoblje primjene od 14 dana ili više iznosi 1 000 mg/kg tjelesne mase dnevno, a za razdoblje primjene kraća od 14 dana granična doza iznosi 2 000 mg/kg tjelesne mase dnevno.

Primjena doza

29. Pri planiranju testa u obzir bi trebalo uzeti očekivani način izlaganja kod ljudi. Stoga se, ako je to opravdano, mogu odabrati načini izlaganja kao što su unos s hranom, unos s vodom za piće, lokalna primjena potkožno, intravenozna primjena, oralna primjena (oralna intubacija), udisanje ili implantacija. U svakom bi slučaju odabrani put trebao biti takav da se osigura odgovarajuća izloženost ciljnog tkiva. Intraperitonealna injekcija obično se ne preporučuje, osim ako je znanstveno opravdana, jer obično nije fiziološki odgovarajući put izloženosti kod ljudi. Ako se ispitivana kemikalija dodaje hrani ili vodi za piće, posebno u slučaju primjene jedne doze, trebalo bi voditi računa o tome da se osigura dostatno vrijeme od unosa hrane i vode do uzorkovanja kako bi se omogućilo otkrivanje učinaka (vidjeti stavak 33.). Maksimalni volumen tekućine koji se odjednom može primijeniti oralnom intubacijom ili injekcijom ovisi o veličini ispitne životinje. Taj volumen obično ne bi trebao biti veći od 1 ml/100 g tjelesne mase, osim u

slučaju vodenih otopina kod kojih je dopušteno upotrijebiti maksimalno 2 ml/100 g tjelesne mase. Primjene većih volumena od navedenog (ako je dopušteno zakonodavstvom o dobrobiti životinja) treba opravdati. Variranje ispitnih volumena treba svesti na minimum podešavanjem koncentracije kako bi se kod svih visina doza osigurao stalni volumen u odnosu na tjelesnu masu.

Opažanja

30. Najmanje jednom dnevno treba provoditi opća klinička opažanja o ispitnim životinjama i zabilježiti kliničke znakove, po mogućnosti svaki dan u isto vrijeme ili vremena, vodeći računa o razdoblju najvećeg intenziteta očekivanih učinaka nakon doziranja. Najmanje dvaput dnevno kod svih životinja treba provjeriti ima li slučajeva morbiditeta ili smrtnosti. Sve životinje trebalo bi izvagati na početku istraživanja, najmanje jednom tjedno tijekom istraživanja s ponovljenim dozama, i prilikom eutanazije. U istraživanjima koja traju najmanje tjedan dana trebalo bi najmanje jednom tjedno mjeriti unos hrane. Ako se ispitivana kemikalija daje s vodom za piće, trebalo bi mjeriti unos vode pri svakoj promjeni vode i najmanje jednom tjedno. Životinje koje pokazuju nesmrtonosne pokazatelje prekomjerne toksičnosti trebalo bi eutanazirati prije dovršetka razdoblja ispitivanja (13.).

Kromosomski pripravek

31. Odmah po eutanaziji životinje napravi se suspenzija zametnih stanica iz jednog ili oba sjemenika, koja se izlaže hipotoničkoj otopini i fiksira primjenom utvrđenih protokola (npr. 2., 14. i 15.). Zatim se stanice razmažu po mikroskopskom stakalcu i oboje (16. i 17.). Sva bi stakalca trebalo kodirati tako da analitičar ne zna njihov identitet.

Analiza

32. Za svaku životinju treba pregledati najmanje 200 dobro raširenih metafaza (3. i 11.). Ako je učestalost u prijašnjim negativnim kontrolama $< 1\%$, trebalo bi pregledati više od 200 stanica po životinji kako bi se povećala statistička snaga (3.). Trebale bi se upotrebljavati metode bojenja koje omogućuju utvrđivanje centromera.
33. Aberacije kromosomskog i kromatidnog tipa trebalo bi zabilježiti odvojeno i klasificirati prema podtipovima (lomovi, zamjene). Prekide bi trebalo zabilježiti, ali ne i uzimati u obzir, prilikom utvrđivanja inducira li kemikalija znatna povećanja učestalosti stanica s kromosomskim aberacijama. U postupcima koji se primjenjuju u laboratoriju trebalo bi osigurati da analizu kromosomskih aberacija provode dobro osposobljeni analitičari. Uzimajući u obzir da postupci pripreme predmetnih stakalaca često za posljedicu imaju lom jednog dijela metafaza uz posljedični gubitak kromosoma, stanice koje se pregledavaju trebale bi stoga sadržavati broj centromera koji nije manji od $2n \pm 2$, pri čemu je n haploidan broj kromosoma za tu vrstu.
34. Iako je svrha ovog ispitivanja otkrivanje strukturnih kromosomskih aberacija, važno je zabilježiti učestalost poliploidnih stanica i stanica s endoredupliciranim kromosomima ako se opaze te pojave (vidjeti stavak 44.).

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Obrada rezultata

35. Podatke o pojedinačnim životinjama trebalo bi prikazati u tabličnom obliku. Za svaku životinju treba odrediti broj stanica sa strukturnim kromosomskim aberacijama i broj kromosomskih aberacija po stanici. Aberacije kromatidnog i kromosomskog tipa, klasificirane prema podtipovima (lomovi, zamjene), trebalo bi navesti odvojeno, s njihovim brojem i učestalošću za pokusne i kontrolne skupine. Prekidi se bilježe zasebno. Iako se bilježi učestalost kromosomskih prekida, ona se općenito ne uključuje u analizu ukupne učestalosti strukturnih kromosomskih aberacija. Postotak poliploidnih stanica i stanica s endoredupliciranim kromosomima bilježi se ako su zapažene takve stanice.
36. Treba izvijestiti o podacima o toksičnosti i kliničkim znakovima (u skladu sa stavkom 30.).

Kriteriji prihvatljivosti

37. Prihvatljivost ispitivanja utvrđuje se na temelju sljedećih kriterija.
- Istodobna negativna kontrola u skladu je s objavljenim normama za podatke o negativnim kontrolama iz prijašnjih istraživanja, kod kojih se obično očekuje $> 0\%$ i $\leq 1,5\%$ stanica s kromosomskim aberacijama, i podacima o prijašnjim kontrolama laboratorija, ako su dostupni (vidjeti stavke 10. i 18.).
 - Istodobne pozitivne kontrole induciraju odgovore koji su u skladu s objavljenim normama za podatke o prijašnjim pozitivnim kontrolama ili bazom podataka laboratorija o prijašnjim podacima o pozitivnoj kontroli, ako je dostupna, i dovode do statistički značajnog povećanja u usporedbi s negativnom kontrolom (vidjeti stavke 17. i 18.).
 - Analiziran je odgovarajući broj stanica i doza (vidjeti stavke 28. i 32.).
 - Kriteriji za odabir najviše doze u skladu su s kriterijima opisanima u stavicama 25. i 26.
38. Ako se promatraju i mitozu i mejozu, omjer spermatogonijskih mitozu u odnosu na prvu i drugu mejotsku metafazu treba utvrditi kao mjerilo citotoksičnosti za sve tretirane životinje i životinje negativne kontrole, na ukupnom uzorku od 100 stanica u fazi diobe po životinji. Ako se promatra samo mitozu, potrebno je utvrditi mitotski indeks u barem 1 000 stanica za svaku životinju.

Ocjenjivanje i tumačenje rezultata

39. Treba analizirati barem tri skupine tretirane dozom da bi se prikupili odgovarajući podaci za analizu doze i odgovora.
40. Pod uvjetom da su ispunjeni svi kriteriji prihvatljivosti, ispitivana kemikalija smatra se jasno pozitivnom:

- ako najmanje jedna od ispitnih doza pokazuje statistički značajno povećanje u usporedbi s istodobnom negativnom kontrolom,
- ako je u najmanje jednom vremenu uzorkovanja to povećanje povezano s dozom, te
- ako je bilo koji od rezultata izvan prihvatljivog raspona podataka o negativnim kontrolama ili distribucije podataka o prijašnjim negativnim kontrolama laboratorija (npr. kontrolne granice od 95 % prema Poissonovoj distribuciji), ako su dostupni.

Tad se smatra da ispitivana kemikalija može inducirati kromosomske aberacije spermatogonijskih stanica ispitnih životinja. Preporuke o najprikladnijim statističkim metodama dostupne su i u literaturi (11. i 18.). Upotrijebljena statistička ispitivanja trebala bi kao pokusnu jedinicu uzimati životinju.

41. Pod uvjetom da su ispunjeni svi kriteriji prihvatljivosti, ispitivana kemikalija smatra se jasno negativnom:

- ako ni pri jednoj ispitnoj dozi nije zapaženo statistički značajno povećanje u odnosu na istodobnu negativnu kontrolu,
- ako ni u jednom pokusnom uvjetu nema povećanja povezanog s dozom, te
- ako su svi rezultati unutar prihvatljivog raspona podataka o negativnim kontrolama ili podataka o prijašnjim negativnim kontrolama laboratorija (npr. kontrolne granice od 95 % prema Poissonovoj distribuciji), ako su dostupni.

Tad se smatra da ispitivana kemikalija ne može inducirati kromosomske aberacije spermatogonijskih stanica ispitnih životinja. Preporuke o najprikladnijim statističkim metodama dostupne su i u literaturi (11. i 18.). Negativan rezultat ne isključuje mogućnost da kemikalija može inducirati kromosomske aberacije u kasnijim fazama razvoja koje se ne istražuju, ili genske mutacije.

42. Jasan pozitivan ili jasan negativan odgovor nije potrebno provjeriti.

43. Ako odgovor nije jasan negativan ili pozitivan i kako bi se pomoglo utvrditi biološku relevantnost rezultata (npr. slabo ili granično povećanje), podatke bi trebalo ocjenjivati na temelju stručne prosudbe i/ili daljnjih istraživanja uz upotrebu postojećih eksperimentalnih podataka, kao što su razmatranja o tome je li pozitivan rezultat izvan prihvatljivog raspona podataka o negativnim kontrolama ili podataka laboratorija o prijašnjim negativnim kontrolama (19.).

44. U rijetkim slučajevima, čak i nakon dodatnih istraživanja, skup podataka neće omogućiti donošenje zaključka o tome je li rezultat pozitivan ili negativan te će se stoga zaključiti da je dvosmislen.

45. Povećanje broja poliploidnih stanica može značiti da ispitivana kemikalija može inhibirati mitotske procese i inducirati numeričke kromosomske aberacije (20.). Povećanje broja stanica s

endoredupliciranim kromosomima može značiti da ispitivana kemikalija može inhibirati progresiju staničnog ciklusa (21. i 22.), a to je drugačiji mehanizam induciranja numeričkih kromosomskih promjena od inhibiranja mitotskih procesa (vidjeti stavak 2.). Stoga bi učestalost poliploidnih stanica i stanica s endoredupliciranim kromosomima trebalo zabilježiti odvojeno.

Izvješće o ispitivanju

46. Izvješće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Sažetak.

Ispitivana kemikalija:

- izvor, broj serije, rok uporabe, ako su dostupni,
- stabilnost ispitivane kemikalije, ako je poznata,
- topljivost i stabilnost ispitivane kemikalije u otapalu, ako su poznate,
- izmjerene vrijednosti za pH, osmolalnost i taloženje u mediju za uzgoj kulture u koji je dodana ispitivana kemikalija, prema potrebi.

Tvar s jednim sastojkom:

- fizički izgled, topljivost u vodi i druga relevantna fizikalno-kemijska svojstva,
- kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv, CAS broj, SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula, čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.

Tvari s više sastojaka, UVCB tvari i smjese:

- opis (koliko je to moguće) kemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativnog udjela i relevantnih fizikalno-kemijskih svojstava sastojaka.

Priprema ispitivane kemikalije:

- obrazloženje za odabir nosača,
- topljivost i stabilnost ispitivane kemikalije u otapalu/nosaču,
- priprema formulacija koje se unose s hranom, vodom za piće ili udisanjem,
- analitička određivanja formulacija (tj. stabilnost, homogenost, nominalne koncentracije),
- ako se provode.

Ispitne životinje:

- vrsta/soj te obrazloženje njihove uporabe,
- broj i dob životinja,
- podrijetlo, uvjeti smještaja, prehrana itd.,

- metoda jedinstvenog identificiranja životinja,
- za kratkotrajna istraživanja: pojedinačna tjelesna masa životinja na početku i na kraju ispitivanja; za istraživanja dulja od tjedan dana: pojedinačna tjelesna masa tijekom istraživanja i unos hrane. Trebalo bi uključiti raspon tjelesne mase, srednju vrijednost i standardno odstupanje za svaku skupinu.

Ispitni uvjeti:

- podaci o pozitivnim i negativnim kontrolama (nosač/otapalo),
- podaci iz istraživanja o utvrđivanju raspona, ako je provedeno,
- obrazloženje odabira visine doze,
- obrazloženje odabira načina primjene,
- pojedinosti o pripremi ispitivane kemikalije,
- pojedinosti o primjeni ispitivane kemikalije,
- obrazloženje za vremena usmrćivanja životinja,
- metode mjerenja toksičnosti životinje, uključujući, ako je dostupno, histopatološke ili hematološke analize i učestalost kojom su obavljani promatranje i vaganje životinje,
- metode kojima se provjerava je li ispitivana kemikalija dospjela u ciljno tkivo ili krvotok, ako se dobiju negativni rezultati,
- stvarna doza (mg/kg tjelesne mase/dan) izračunata na temelju koncentracije ispitivane kemikalije u hrani/vodi za piće (ppm) i unosa hrane/vode, ako je primjenjivo,
- pojedinosti o kvaliteti hrane i vode,
- detaljan opis režima tretiranja i uzorkovanja te obrazloženje tih odabira,
- metoda eutanazije,
- metoda analgezije (ako se primjenjuje),
- postupci izdvajanja tkiva,
- naziv (identifikacijska oznaka) kemikalije za zaustavljanje metafaze, njezina koncentracija i trajanje primjene,
- metode pripreme predmetnih stakalaca,
- kriteriji za ocjenu aberacija,
- broj analiziranih stanica po životinji,
- kriteriji prema kojima se istraživanje smatra pozitivnim, negativnim ili dvosmislenim.

Rezultati:

- stanje životinje prije i tijekom razdoblja ispitivanja, uključujući znakove toksičnosti,

- mase tijela i organa prije usmrćivanja (ako se primjenjuje više tretiranja, mase tijela izmjerene tijekom režima tretiranja),
- znakovi toksičnosti,
- mitotski indeks,
- omjer spermatogonijskih mitotskih stanica u odnosu na prvu i drugu mejotsku metafazu, ili drugi dokaz izloženosti ciljnom tkivu,
- vrsta i broj aberacija, navedeni za svaku životinju zasebno,
- ukupan broj aberacija po skupini sa srednjim vrijednostima i standardnim odstupanjima,
- broj stanica s aberacijama po skupini sa srednjim vrijednostima i standardnim odstupanjima,
- odnos doze i odgovora, ako je to moguće,
- primijenjene statističke analize i metode,
- podaci o istodobnim negativnim kontrolama,
- podaci o prijašnjim negativnim kontrolama, zajedno s rasponima, srednjim vrijednostima, standardnim devijacijama i intervalom pouzdanosti od 95 % (ako je dostupan) ili objavljeni podaci o prijašnjim negativnim kontrolama koji se upotrebljavaju za prihvatljivost rezultata ispitivanja,
- podaci o istodobnim pozitivnim kontrolama,
- promjene ploidijske ako su zapažene, uključujući učestalost poliploidnih i/ili endoredupliciranih stanica.

Rasprava o rezultatima

Zaključak

LITERATURA

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

12. Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and 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.), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
14. Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978). A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes. *Mutation Res.*, 52, 207.–209.
15. Hsu, T.C., Elder, F. and 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., and Ford, C.E. (1964). An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 3, 289.–294.
17. Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. and Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetics Assays, U: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, str. 115.–141.
18. Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. and Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays U: D.J. Kirkland (Ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, str. 184.–232.
19. Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H.-J. and Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data. *Mutation Res.*, 723, 87.–90.
20. Warr T.J., Parry E.M. and Parry J.M. (1993). A Comparison of Two *In Vitro* Mammalian Cell Cytogenetic Assays for the Detection of Mitotic Aneuploidy Using 10 Known or Suspected Aneugens, *Mutation Res.*, 287, 29.–46.
21. Huang, Y., Change, C. and Trosko, J.E. (1983). Aphidicolin-Induced Endoreduplication in Chinese Hamster Cells. *Cancer Res.*, 43, 1362.–1364.
22. Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese Hamster Cells during Alpha-Radiation Induced G2 Arrest. *Mutation Res.*, 119, 403.–413.

Dodatak

DEFINICIJE

Aneuploidija: svako odstupanje od uobičajenog diploidnog (ili haploidnog) broja kromosoma za jedan kromosom ili više njih, ali ne za cijelu skupinu ili skupine kromosoma (poliploidija).

Centromera: područje ili područja kromosoma s kojima su tijekom stanične diobe povezane niti diobenog vretena, čime se omogućuje uredno kretanje kromosoma kćeri prema polovima stanica kćeri.

Kemikalija: tvar ili smjesa.

Raznolikost kromosoma: raznolikost oblika kromosoma (npr. metacentrični, akrocentrični itd.) i njihovih veličina.

Aberacija kromatidnog tipa: strukturno oštećenje kromosoma izraženo kao lom pojedinačnih kromatida ili lom i ponovno spajanje kromatida.

Aberacija kromosomskog tipa: strukturno oštećenje kromosoma izraženo kao lom ili lom i ponovno spajanje obiju kromatida na istom mjestu.

Klastogen: svaka kemikalija koja uzrokuje strukturne kromosomske aberacije u populacijama stanica ili organizama.

Prekid: akromatska lezija manja od širine jedne kromatide i s minimalnim odklonom kromatida.

Genotoksičnost: opći izraz kojim su obuhvaćene sve vrste oštećenja DNK ili kromosoma uključujući lomove, delecije, adukte, modifikacije i povezivanje nukleotida, premještanja, mutacije, aberacije kromosoma i aneuploidiju. Ne dovode sve vrste genotoksičnih učinaka do mutacija ili trajnog oštećenja kromosoma.

Mitotski indeks: omjer stanica u metafazi podijeljen s ukupnim brojem stanica zapaženih u populaciji stanica; pokazatelj stupnja proliferacije te populacije.

Mitoza: dioba stanične jezgre koja je obično podijeljena na profazu, prometafazu, metafazu, anafazu i telofazu.

Mutagen: uzrokuje nasljednu promjenu slijeda (sljedova) parova baza DNK u genima ili strukture kromosoma (kromosomske aberacije).

Numerička abnormalnost: promjena u broju kromosoma u odnosu na normalni broj koji je karakterističan za korištene životinje.

Poliploidija: višekratnik haploidnog broja kromosoma (n) osim diploidnog broja (tj. $3n$, $4n$ itd.).

Strukturna aberacija: promjena u strukturi kromosoma koja se može otkriti mikroskopskim pregledom diobe stanica u metafazi, zapažena kao delecije i fragmenti, zamjene.

Ispitivana kemikalija: svaka tvar ili smjesa koja se ispituje ovom ispitnom metodom.

UVCB: kemijske tvari nepoznatog ili promjenjivog sastava, složeni reakcijski proizvodi i biološki materijali.”;

(5) u dijelu B poglavlje B.40. zamjenjuje se sljedećim:

„B.40. NAGRIZANJE KOŽE *IN VITRO*: ISPITNA METODA TRANSKUTANOG ELEKTRIČNOG OTPORA (TER)

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 430 (2015.). Nagrizanje kože odnosi se na izazivanje ireverzibilnog oštećenja kože koje se manifestira kao vidljiva nekroza koja kroz epidermu prodire u dermu nakon primjene ispitivane kemikalije [kako je utvrđeno Globalno usklađenim sustavom razvrstavanja i označivanja kemikalija (GHS) Ujedinjenih naroda (UN) (1.) i Uredbom (EZ) br. 1272/2008 o razvrstavanju, označivanju i pakiranju tvari i smjesa (CLP)¹ Europske unije]. Ova ažurirana ispitna metoda B.40. pruža *in vitro* postupak kojim se omogućuje utvrđivanje nagrizajućih i nenagrizajućih tvari i smjesa u skladu s UN GHS-om (1.) i CLP-om.
2. Procjena nagrizajućeg djelovanja na kožu obično je obuhvaćala primjenu laboratorijskih životinja (ispitna metoda B.4., ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 404 koja je izvorno donesena 1981. i revidirana 1992., 2002. i 2015.) (2.). Uz sadašnju ispitnu metodu B.40., validirane su i donesene druge ispitne metode *in vitro* za ispitivanje potencijala kemikalija da uzrokuju nagrizanje kože, kao što su ispitna metoda B.40.bis (ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 431) (3.) i ispitna metoda B.65. (ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 435) (4.), kojima se mogu utvrditi i potkategorije korozivnih kemikalija ako je potrebno. Doneseno je nekoliko validiranih ispitnih metoda *in vitro*, kao što je ispitna metoda B.46. (ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 439 (5.)), koje treba upotrebljavati za ispitivanje nadraživosti kože. U Smjernicama OECD-a o integriranim pristupima ispitivanju i procjeni (IATA) za nagrizanje i nadraživanje kože opisano je nekoliko modula u kojima se grupiraju različiti izvori informacija i alati za analizu te se pružaju smjernice o i. načinu integriranja i uporabe postojećih podataka o ispitivanju i podataka koji se dobivaju bez ispitivanja za procjenu potencijala kemikalija da uzrokuju nadraživanje i nagrizanje kože te ii. predlaganju pristupa kad je potrebno daljnje ispitivanje (6.).
3. Ova se ispitna metoda bavi konačnim učinkom nagrizanja kože na zdravlje ljudi. Temelji se na ispitnoj metodi transkutanog električnog otpora (TER) na koži štakora kod koje se upotrebljavaju diskovi kože kako bi se identificirale nagrizajuće tvari prema njihovoj

¹ Uredba (EZ) br. 1272/2008 Europskog parlamenta i Vijeća od 16. prosinca 2008. o razvrstavanju, označivanju i pakiranju tvari i smjesa, o izmjeni i stavljanju izvan snage Direktive 67/548/EEZ i Direktive 1999/45/EZ i o izmjeni Uredbe (EZ) br. 1907/2006, SL L 353/1, 31.12.2008.

sposobnosti da dovedu do gubitka integriteta i funkcije barijere normalnog *stratum corneum*. Odgovarajuća smjernica OECD-a za ispitivanje izvorno je donesena 2004. i ažurirana je 2015. kako bi se odnosila na smjernice o IATA-i.

4. Kako bi se u regulatorne svrhe ocijenilo *in vitro* ispitivanje nagrivanja kože provedene su predvalidacijske studije (7.) nakon čega je slijedila službena validacijska studija ispitne metode TER-a na koži štakora za procjenu nagrivanja kože (8., 9., 10. i 11.). Rezultati tih studija doveli su do preporuke da bi se ispitna metoda TER-a (imenovana validiranom referentnom metodom) mogla upotrebljavati u regulatorne svrhe za procjenu *in vivo* nagrivačkog djelovanja na kožu (12., 13. i 14.).
5. Prije nego što se predložena slična ili izmijenjena ispitna metoda TER-a *in vitro* za nagrivanje kože, koja nije validirana referentna metoda, može upotrijebiti u regulatorne svrhe, trebalo bi utvrditi njezinu pouzdanost, relevantnost (točnost) i ograničenja za njezinu predloženu uporabu kako bi se osigurala njezina sličnost s validiranom referentnom metodom, u skladu sa zahtjevima izvedbe (15.). OECD-ovo uzajamno prihvaćanje podataka jamčit će se samo nakon što se svaka predložena nova ili ažurirana ispitna metoda koja je u skladu sa zahtjevima izvedbe pregleda i uključi u odgovarajuću smjernicu OECD-a za ispitivanje.

DEFINICIJE

6. Upotrijebljene definicije navedene su u Dodatku.

POČETNA RAZMATRANJA

7. Validacijskom studijom (10.) i drugim objavljenim studijama (16. i 17.) utvrđeno je da se ispitnom metodom TER-a na koži štakora mogu razlikovati poznate tvari s nagrivačkim djelovanjem na kožu od tvari koje na kožu ne djeluju nagrivačke uz ukupnu osjetljivost od 94 % (51/54) i specifičnost od 71 % (48/68) za bazu podataka od 122 tvari.
8. Ova se ispitna metoda bavi nagrivanjem kože *in vitro*. Omogućuje identifikaciju ispitivanih kemikalija koje ne djeluju nagrivačke i onih koje djeluju nagrivačke u skladu s UN GHS-om ili CLP-om. Ograničenje ove ispitne metode, kako je pokazano validacijskim studijama (8., 9., 10. i 11.), jest to što ne omogućuje daljnje razvrstavanje nagrivačkih tvari i smjesa u skladu s UN GHS-om ili CLP-om. Primjenjivim regulatornim okvirom utvrdit će se način upotrebe ove ispitne metode. Iako se ovom ispitnom metodom ne dobivaju primjerene informacije o nadraživanju kože, trebalo bi napomenuti da se ispitna metoda B.46. posebno bavi učinkom koji nadraživanje kože *in vitro* ima na zdravlje (5.). Za potpunu evaluaciju lokalnih učinaka na kožu nakon jednostrukog dermalnog izlaganja potrebno je proučiti Smjernice OECD-a o IATA-i (6.).
9. Tijekom validacijske studije na kojoj se temelji ova ispitna metoda ispitan je širok raspon kemikalija koje uglavnom čine tvari, a empirijskom bazom podataka validacijske studije bilo je obuhvaćeno 60 tvari koje su obuhvaćale širok raspon kemijskih razreda (8. i 9.). Na temelju

svih podataka koji su dostupni, ispitna metoda primjenjiva je na širok raspon kemijskih razreda i agregatnih stanja, uključujući tekućine, polukrute i krute tvari te voskove. Međutim, budući da za posebna agregatna stanja nisu lako raspoložive ispitivane stavke s odgovarajućim referentnim podacima, trebalo bi napomenuti da je tijekom validacije procijenjen relativno malen broj voskova i nagrizajućih krutih tvari. Tekućine mogu biti vodene i bezvodne; krute tvari mogu biti topljive ili netopljive u vodi. U slučajevima u kojima se može dokazati da se ispitna metoda ne može primijeniti za ispitivanje specifične kategorije tvari, tu ispitnu metodu ne bi trebalo upotrebljavati za tu specifičnu kategoriju tvari. Osim toga, pretpostavlja se da se ova ispitna metoda može primijeniti na smjese kao proširenje njezine primjenjivosti na tvari. Međutim, budući da smjese obuhvaćaju široki spektar kategorija i sastava te da su trenutačno dostupne samo ograničene informacije o ispitivanju smjesa, u slučajevima u kojima se može dokazati da se ispitna metoda ne može primijeniti za ispitivanje specifične kategorije smjesa (npr. primjenom strategije koju su predložili Eskes i dr., 2012.) (18.), ispitnu metodu ne bi trebalo upotrebljavati za tu specifičnu kategoriju smjesa. Prije nego što se ova ispitna metoda primijeni na smjesi radi dobivanja podataka za predviđenu regulatornu svrhu, potrebno je razmotriti mogu li se te, ako se mogu, zašto se njome mogu dobiti primjereni rezultati za tu svrhu. Ta razmatranja nisu potrebna ako postoji regulatorni zahtjev za ispitivanje smjese. Plinovi i aerosoli još nisu ocijenjeni u validacijskim studijama (8. i 9.). Iako je moguće da se oni mogu ispitati upotrebom ispitne metode TER-a, trenutačnom ispitnom metodom nije omogućeno ispitivanje plinova i aerosola.

NAČELO ISPITIVANJA

10. Ispitivana kemikalija primjenjuje se u trajanju do 24 sata na epidermalne površine diskova kože u dvodijelnom ispitnom sustavu u kojem diskovi kože djeluju kao pregrada između dva odjeljka. Diskovi kože uzeti su od humano usmrćenih štakora u dobi od 28 do 30 dana. Nagrizajuće kemikalije identificirane su prema sposobnosti da dovedu do gubitka integriteta i funkcije barijere normalnog *stratum corneum*, što se mjeri kao smanjenje TER vrijednosti ispod razine praga (16.) (vidjeti stavak 32.). Za TER vrijednosti za kožu štakora, vrijednost praga u iznosu od 5 k Ω odabrana je na temelju mnogobrojnih podataka za širok raspon tvari kod kojih je velika većina vrijednosti jasno bila ili znatno iznad (često > 10 k Ω), ili znatno ispod (često < 3 k Ω) te vrijednosti (16.). Općenito, ispitivane kemikalije koje na životinje ne djeluju nagrizajuće, već su nadražujuće ili nenadražujuće, ne smanjuju TER ispod te vrijednosti praga. Nadalje, uporaba drugih preparata kože ili druge opreme može modificirati vrijednost praga, što znači da je potrebna dodatna validacija.
11. U ispitni postupak ugrađena je i faza vezanja boje kojom se potvrđuju pozitivni rezultati za TER u vrijednostima od približno 5 k Ω . Postupkom vezanja boje određuje se može li se povećanje ionske permeabilnosti pripisati fizičkom uništenju *stratum corneum*. Pokazalo se da se TER metodom uz primjenu kože štakora može predvidjeti nagrizajuće djelovanje *in vivo* kod kunića koji su procjenjivani ispitnom metodom B.4. (2.).

DOKAZIVANJE OSPOSOBLJENOSTI

12. Prije rutinske upotrebe ispitne metode TER-a na koži štakora koja je u skladu s ovom ispitnom metodom laboratoriji bi trebali dokazati tehničku osposobljenost pravilnim utvrđivanjem kategorije dvanaest tvari koje služe za dokazivanje osposobljenosti koje su preporučene u tablici 1. U slučajevima u kojima nije dostupna navedena tvar ili ako je to opravdano, može se upotrijebiti druga tvar za koju su dostupni primjereni referentni *in vivo* i *in vitro* podaci (npr. s popisa referentnih kemikalija (16.)) pod uvjetom da se primjenjuju isti kriteriji za odabir kao oni opisani u tablici 1.

Tablica 1.: Popis tvari koje služe za dokazivanje osposobljenosti¹

Tvar	CAS br.	Kemijski razred ²	Kat. sustava UN GHS-a ili CLP-a na temelju <i>in vivo</i> rezultata ³	Kat. VRM-a na temelju <i>in vitro</i> rezultata	Agregatno stanje	pH ⁴
Tvari koje djeluju nagrizajuće <i>in vivo</i>						
N,N'-dimetil dipropilentriamin	10563-29-8	organska baza	1.A	6 x C	Tekuće	8,3
1,2-diaminopropan	78-90-0	organska baza	1.A	6 x C	Tekuće	8,3
Sumporna kiselina (10 %)	7664-93-9	anorganska kiselina	(1.A/1.B/1.C	5 x C 1x NC	Tekuće	1,2
Kalijev hidroksid (10 % aq.)	1310-58-3	anorganska baza	(1.A/1.B/1.C	6 x C	Tekuće	13,2
Oktanska (kaprilna) kiselina	124-07-2	organska kiselina	1.B/1.C	4 x C 2 x NC	Tekuće	3,6
2-tert-butilfenol	88-18-6	fenol	1.B/1.C	4 x C 2 x NC	Tekuće	3,9
Tvari koje ne djeluju nagrizajuće <i>in vivo</i>						
Izostearinska kiselina	2724-58-5	organska kiselina	NC	6 x NC	Tekuće	3,6
4-amino-1,2,4-triazol	584-13-4	organska baza	NC	6 x NC	Kruto	5,5
Fenetil bromid	103-63-9	elektrofil	NC	6 x NC	Tekuće	3,6
4-(metiltio)-benzaldehyd	3446-89-7	elektrofil	NC	6 x NC	Tekuće	6,8
1,9-dekadien	1647-16-1	neutralne organske kemikalije	NC	6 x NC	Tekuće	3,9
Tetrakloretilen	127-18-4	neutralne organske kemikalije	NC	6 x NC	Tekuće	4,5

Kratice: aq = vodena otopina; CAS br. = registarski broj Službe za podatke o kemijskim tvarima; VRM = validirana referentna metoda; ND = nije utvrđeno.

¹ Tvari koje služe za dokazivanje osposobljenosti, prvo razvrstane na tvari koje djeluju nagrizajuće i one koje ne djeluju nagrizajuće, zatim prema potkategoriji nagrizanja i potom kemijskom razredu, odabrane su među tvarima koje su upotrijebljene u ECVAM-ovoj validacijskoj studiji ispitne metode TER-a na koži štakora (8. i 9.). Osim ako je drukčije navedeno, tvari su ispitane na razini čistoće koja se dobiva kad se kupe od komercijalnog izvora (8.). Odabir je uključivao, u mjeri u kojoj je to moguće, tvari: i. koje su reprezentativne za raspon nagrizajućih odgovora (npr. tvari koje ne djeluju nagrizajuće; tvari sa slabim do jakim nagrizajućim djelovanjem) koji se mogu izmjeriti ili predvidjeti validiranom referentnom metodom; ii. koje su reprezentativne za kemijske razrede koji su korišteni u validacijskoj studiji; iii. koje odražavaju svojstva učinkovitosti validirane referentne metode; iv. koje imaju dobro utvrđene kemijske strukture; v. koje induciraju konačne rezultate u *in vivo* referentnoj ispitnoj metodi; vi. koje su komercijalno dostupne; i vii. koje nisu povezane s neprimjereno visokim troškovima zbrinjavanja.

² Kemijski razred koji su dodijelili Barratt i dr. (8.).

³ Odgovarajuće ambalažne skupine UN-a I., II. i III. za kategorije 1.A, 1.B odnosno 1.C UN GHS-a ili CLP-a.

⁴ pH-vrijednosti dobivene su iz Fentem i dr. (9.) te Barratt i dr. (8.).

POSTUPAK

13. Dostupni su standardni operativni postupci za ispitne metode TER-a na koži štakora za ispitivanje nagrizanja kože (19). Ispitne metode TER-a na koži štakora obuhvaćene ovom ispitnom metodom trebale bi biti u skladu sa sljedećim uvjetima.

Životinje

14. Trebali bi se upotrebljavati štakori jer je osjetljivost njihove kože na tvari u ovoj ispitnoj metodi prethodno dokazana (12.) te je jedini izvor kože koji je službeno validiran (8. i 9.). Dob (u kojoj se koža prikuplja) i soj štakora posebno su važni kako bi se osiguralo da folikuli dlake budu u latentnoj fazi prije početka rasta odraslih dlaka.
15. Dlaka na leđima i bokovima mladih, približno 22 dana starih mužjaka ili ženki štakora (soja Wistar ili nekog usporedivog soja) pažljivo se ukloni malim škarama. Životinje se zatim operu nježnim brisanjem, a očišćena se površina umoči u antibiotsku otopinu (koja sadržava, primjerice, streptomycin, penicilin, kloramfenikol i amfotericin u koncentracijama koje su učinkovite u inhibiciji rasta bakterija). Životinje se ponovno operu antibioticima trećeg ili četvrtog dana nakon prvog pranja i koriste u roku od tri dana nakon drugog pranja, kad se *stratum corneum* oporavi od odstranjivanja dlake.

Priprema diskova kože

16. Životinje se humano usmrte kad su stare 28–30 dana; ta je dob veoma važna. Sa svake životinje odstrani se bočna koža na leđima s koje se opreznim ljuštenjem oguli prekomjerna potkožna mast. Odstrane se diskovi kože, u promjeru svaki približno 20 mm. Prije uporabe diskova koža se može skladištiti ako se pokaže da su podaci za pozitivnu i negativnu kontrolu istovjetni podacima dobivenima sa svježom kožom.
17. Po jedan disk stavi se preko jednog kraja teflonske (politetrafluoretilenske) cijevi, osiguravajući da je epidermalna površina u dodiru s cijevi. Gumeni O-prsten pritisne se preko ruba cijevi kako bi se učvrstila koža, a višak tkiva se odreže. Gumeni O-prsten zatim se dužinom ruba teflonske cijevi oprezno zabrtvi petrolejskim gelom. Cijev se uvede u prihvatnu komoru koja

sadržava otopinu MgSO_4 (154 mM) u kojoj je pridržava opružna štipaljka (slika 1.). Disk kože treba potpuno potopiti u otopinu MgSO_4 . Od kože jednog štakora može se dobiti čak 10–15 diskova kože. Dimenzije cijevi i O-prstena prikazane su na slici 2.

18. Prije početka ispitivanja mjeri se TER na dva kožna diska kao postupak kojim se kontrolira kvaliteta kože svake životinje. Kako bi se preostali diskovi te kože mogli koristiti u ispitnoj metodi, oba kontrolna diska moraju dati vrijednosti električnog otpora veće od 10 k Ω . Ako je vrijednost otpora manja od 10 k Ω , preostale diskove te kože treba baciti.

Primjena ispitivane kemikalije i kontrolnih tvari

19. Za svaki ciklus (pokus) treba koristiti istodobne pozitivne i negativne kontrole kako bi se osigurala odgovarajuća uspješnost pokusnog modela. Za svaki ciklus (pokus) treba koristiti diskove kože jedne životinje. Kao ispitivane kemikalije pozitivne i negativne kontrole predlažu se 10 M klorovodična kiselina odnosno destilirana voda.
20. Tekuće ispitivane kemikalije (150 μl) primjenjuju se ravnomjerno na epidermalnu površinu unutar cijevi. Kod ispitivanja krutih materijala, dovoljna količina krute tvari primjenjuje se ravnomjerno na disk kako bi se osigurala pokrivenost cijele epiderme. Na krutu tvar dodaje se deionizirana voda (150 μl) i cijev se pažljivo protrese. Za postizanje maksimalnog dodira s kožom, krute tvari možda treba zagrijati na 30 $^{\circ}\text{C}$ kako bi se ispitivana tvar rastopila ili omekšala ili samljati kako bi se dobio zrnati materijal ili prah.
21. Za svako ispitivanje i kontrolnu kemikaliju koriste se tri diska kože u svakom ciklusu ispitivanja (pokus). Ispitivane kemikalije primjenjuju se 24 sata na temperaturi 20–23 $^{\circ}\text{C}$. Ispitivana kemikalija uklanja se ispiranjem pod mlazom vode iz slavine čija temperatura nije viša od sobne temperature sve dok se ne odstrani sav materijal.

Mjerenja transkutanog električnog otpora (TER)

22. Impedancija kože mjeri se kao transkutani električni otpor (TER) upotrebom Wheatstoneova mjernog mosta na niskonaponsku izmjeničnu struju (18.). Opće su specifikacije mosta radni napon 1–3 volta, izmjenična struja sinusnog ili pravokutnog oblika 50–1 000 Hz i mjerno područje od najmanje 0,1–30 k Ω . Mjerni most koji je korišten u validacijskoj studiji mjerio je induktivitet, kapacitivnost i otpor do vrijednosti 2 000 H, 2 000 μF odnosno 2 M Ω , kod frekvencija od 100 Hz ili 1 kHz, primjenom serijskih ili paralelnih vrijednosti. U svrhu testa otkrivanja nagrizajućeg djelovanja, mjerenja transkutanog električnog otpora bilježe se pri frekvenciji od 100 Hz primjenom serijskih vrijednosti. Prije mjerenja električnog otpora, površinska napetost kože smanjuje se dodavanjem dovoljnog volumena 70-postotnog etanola koji se nanosi na epidermu. Nakon nekoliko sekundi etanol se uklanja iz cijevi, a tkivo se hidratizira dodavanjem 3 ml otopine MgSO_4 (154 mM). Elektrode mjernog mosta postavljaju se na obje strane diska kože kako bi se izmjerio otpor u k Ω /disk kože (slika 1.). Dimenzije elektrode i duljina elektrode izložene ispod krokodilskih štipaljki prikazane su na slici 2. Štipaljka na unutarnjoj elektrodi za vrijeme mjerenja otpora stoji na vrhu teflonske cijevi kako

bi se osiguralo da u otopinu MgSO_4 bude uronjena stalno ista duljina elektrode. Vanjska elektroda postavlja se unutar komore na način da stoji na dnu komore. Razmak između opružne štipaljke i dna teflonske cijevi održava se nepromjenjivim (slika 2.) jer ta udaljenost utječe na dobivene vrijednosti otpora. Zbog toga, razmak između unutarnje elektrode i diska kože treba biti nepromjenjiv i minimalan (1–2 mm).

23. Ako je izmjerena vrijednost otpora veća od 20 k Ω , to može biti posljedica preostalog sloja ispitivane kemikalije na epidermalnoj površini diska kože. Ponovno treba pokušati ukloniti taj sloj, primjerice, tako da se teflonska cijev zatvori pritiskom prsta zaštićenog rukavicom i protrese približno deset sekundi; otopina MgSO_4 baca se i mjerenje otpora ponavlja se s novom otopinom MgSO_4 .
24. Svojstva i dimenzije ispitnog uređaja i primijenjen ispitni postupak mogu utjecati na dobivene vrijednosti transkutanog električnog otpora. Prag od 5 k Ω za nagrizajuće djelovanje određen je iz podataka dobivenih konkretnim uređajem i postupkom opisanim u ovoj ispitnoj metodi. Ako se ispitni uvjeti izmijene ili se primijeni drukčiji uređaj, mogu vrijediti drugačiji pragovi i kontrolne vrijednosti. Stoga je potrebno kalibrirati metodologiju i vrijednosti praga otpora ispitivanjem niza tvari koje služe za dokazivanje osposobljenosti odabranih među tvarima koje su korištene u validacijskoj studiji (8. i 9.) ili kemikalijama koje su iz kemijski sličnih razreda kao tvari koje se istražuju. Niz odgovarajućih tvari koje služe za dokazivanje osposobljenosti utvrđen je u tablici 1.

Metode vezanja boje

25. Izlaganje određenih nenagrizajućih materijala može rezultirati smanjenjem otpora na vrijednost ispod praga od 5 k Ω koja dopušta prolazak iona kroz *stratum corneum*, čime se električni otpor smanjuje (9.). Na primjer, neutralne organske tvari i tvari koje imaju površinski aktivna svojstva (uključujući deterdžente, emulgatore i druge površinski aktivne tvari) mogu iz kože odstraniti lipide i time povećati propusnost barijere za ione. Znači, ako su vrijednosti TER-a koje proizvode te kemikalije manje od 5 k Ω ili približno 5 k Ω bez vidljivog oštećenja diskova kože, na kontrolnom i tretiranom tkivu treba provesti procjenu penetracije boje kako bi se odredilo jesu li te dobivene vrijednosti TER rezultat povećane propusnosti kože ili nagrizanja kože (7. i 9.). Ako se radi o nagrizajućem djelovanju, odnosno o pucanju *stratum corneum*, boja sulforodamin B, kad se nanese na površinu kože, brzo prodire i boji potkožno tkivo. Ta konkretna boja stabilna je na širok raspon tvari i na nju ne utječe postupak ekstrakcije opisan u nastavku.

Primjena i odstranjivanje boje sulforodamina B

26. Nakon procjene vrijednosti TER, magnezijev sulfat evakui se iz cijevi i koža se pažljivo pregleda s obzirom na vidljiva oštećenja. Ako nema očitih velikih oštećenja (npr. perforacija), 150 μl 10-postotne (w/v) otopine boje sulforodamina B (Acid Red 52; C.I. 45100; CAS broj 3520-42-1) u destiliranoj vodi primjenjuje se na epidermalnu površinu svakog diska kože tijekom dva sata. Zatim se ti diskovi kože približno deset sekundi ispiru vodom iz slavine čija

temperatura nije viša od sobne temperature kako bi se time uklonio višak boje ili nevezana boja. Svaki disk kože oprezno se skine s teflonske cijevi i stavi u tikvicu (npr. tikvicu od 20 ml za scintilaciju) koja sadržava deioniziranu vodu (8 ml). Tikvice se nježno tresu pet minuta kako bi se odstranila eventualna preostala nevezana boja. Zatim se ponavlja postupak ispiranja, nakon kojega se diskovi kože skidaju i stavljaju u tikvice koje sadržavaju 5 ml 30-postotnog (w/v) natrijevog dodecil-sulfata (SDS) u destiliranoj vodi i ostave se inkubirati preko noći na 60 °C.

27. Nakon inkubacije, svaki disk kože skida se i baca, a preostala otopina centrifugira se osam minuta na 21 °C (relativna centrifugalna sila ~175 x g). Uzorak od 1 ml supernatanta razrijedi se u omjeru 1:5 (v/v) [tj. 1 ml + 4 ml] s 30-postotnim (w/v) natrijevim dodecil-sulfatom (SDS) u destiliranoj vodi. Optička gustoća (OD) otopine mjeri se na 565 nm.

Izračun sadržaja boje

28. Sadržaj boje sulforodamin B po disku računa se iz vrijednosti optičke gustoće (OD) (9.) (koeficijent molarne ekstinkcije sulforodamina B na 565 nm = $8,7 \times 10^4$; molekulska masa = 580). Sadržaj boje određuje se za svaki disk kože primjenom odgovarajuće kalibracijske krivulje, zatim se za ponovljene pokuse izračunava srednja vrijednost sadržaja boje.

Kriteriji prihvatljivosti

29. Srednji rezultati TER vrijednosti prihvatljivi su ako su vrijednosti istodobne pozitivne i negativne kontrole unutar prihvatljivih raspona za predmetnu laboratorijsku metodu ispitivanja. Prihvatljivi rasponi otpora za metodologiju i uređaj iz prethodnog teksta navedeni su u sljedećoj tablici:

Kontrola	Tvar	Raspon otpora (kΩ)
Pozitivna	10 M klorovodična kiselina	0,5–1,0
Negativna	Destilirana voda	10–25

30. Srednji rezultati vezanja boje prihvatljivi su pod uvjetom da su vrijednosti istodobne kontrole unutar prihvatljivih raspona za predmetnu metodu. Predloženi prihvatljivi rasponi sadržaja boje za kontrolne tvari za metodologiju i uređaj iz prethodnog teksta navedeni su u sljedećoj tablici:

Kontrola	Tvar	Raspon sadržaja boje (µg/disku)
Pozitivna	10 M klorovodična kiselina	40–100
Negativna	Destilirana voda	15–35

Tumačenje rezultata

31. Granična vrijednost TER-a koja služi za razlikovanje nagrizaćućih od nenagrizaćućih ispitivanih kemikalija utvrđena je tijekom optimizacije ispitne metode, ispitana tijekom predvalidacijske faze i potvrđena u službenoj validacijskoj studiji.
32. Model predviđanja za ispitnu metodu TER-a na koži štakora za ispitivanje nagrizaćuća kože (9. i 19.), povezan sa sustavom razvrstavanja UN GHS-om ili CLP-om naveden je u nastavku.

Ispitivana kemikalija ne smatra se nagrizaćućom za kožu:

- i) ako je srednja vrijednost TER-a postignuta za ispitivanu kemikaliju veća od ($>$) 5 k Ω ; ili
 - ii) ako je srednja vrijednost TER-a postignuta za ispitivanu kemikaliju manja od ili jednaka ($\leq$) 5 k Ω ; i
- ako diskovi kože ne pokazuju vidljivo oštećenje (npr. perforaciju), i
 - ako je srednja vrijednost sadržaja boje diska manja od ($<$) srednje vrijednosti sadržaja boje diska iz istodobne pozitivne kontrole s 10 M HCl (vidjeti stavak 30. za vrijednosti pozitivne kontrole).

Ispitivana kemikalija smatra se nagrizaćućom za kožu:

- i) ako je srednja vrijednost TER-a postignuta za ispitivanu kemikaliju manja od ili jednaka ($\leq$) 5 k Ω i ako su diskovi kože vidljivo oštećeni (npr. perforirani); ili
 - ii) ako je srednja vrijednost TER-a postignuta za ispitivanu kemikaliju manja od ili jednaka ($\leq$) 5 k Ω ; i
- ako diskovi kože ne pokazuju vidljivo oštećenje (npr. perforaciju), ali
 - srednja vrijednost sadržaja boje diska veća je ili jednaka ($\geq$) srednjoj vrijednosti sadržaja boje diska iz istodobne pozitivne kontrole s 10 M HCl (vidjeti stavak 30. za vrijednosti pozitivne kontrole).

33. Ciklus ispitivanja (pokusi) koji obuhvaća najmanje tri ponovljena diska kože trebao bi biti dovoljan za ispitivanu kemikaliju ako je razvrstavanje nedvosmisleno. Međutim, u slučajevima graničnih rezultata, kao što su neusklađena ponovljena mjerenja i/ili srednja vrijednost TER-a od $5 \pm 0,5$ k Ω , trebalo bi razmotriti drugi neovisni ciklus ispitivanja (pokusi), a i treći ciklus u slučaju neusklađenih rezultata između prva dva ciklusa ispitivanja (pokusa).

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Podaci

34. Po mogućnosti, vrijednosti otpora (k Ω) i vrijednosti sadržaja boje (μ g/disku) za ispitivanu kemikaliju te za pozitivne i negativne kontrole treba zabilježiti u tabličnom obliku, uključujući podatke za svaki pojedinačni ponovljeni disk u svakom ciklusu ispitivanja (pokusu) i srednje vrijednosti $\pm$ standardno odstupanje. Treba zabilježiti sve ponovljene pokuse. Uočeno oštećenje na diskovima kože trebalo bi zabilježiti za svaku ispitivanu kemikaliju.

Izvešće o ispitivanju

35. Izvješće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Ispitivana kemikalija i kontrolne tvari:

- tvar s jednim sastojkom: kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv, CAS broj, SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula, čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.,
- tvar s više sastojaka, UVCB tvar i smjesa: opis (koliko je to moguće) kemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativnog udjela i relevantnih fizikalno-kemijskih svojstava sastojaka,
- fizički izgled, topljivost u vodi i druga relevantna fizikalno-kemijska svojstva,
- izvor, broj serije, ako su dostupni,
- tretiranje ispitivane kemikalije/kontrolne tvari prije ispitivanja, ako je primjenljivo (npr. grijanje, mljevenje),
- stabilnost ispitivane kemikalije, rok uporabe ili datum za ponovnu analizu ako je poznat,
- uvjeti skladištenja.

Ispitne životinje:

- soj i spol koji je upotrijebljen,
- dob životinja kad su upotrijebljene kao donorske životinje,
- podrijetlo, uvjeti smještaja, prehrana itd.,
- pojedinosti o preparatu kože.

Ispitni uvjeti:

- kalibracijske krivulje za ispitni uređaj,
- kalibracijske krivulje za provođenje testa vezanja boje, pojas koji se upotrebljava za mjerenje optičke gustoće (OD) i raspon linearnosti OD-a uređaja za mjerenje (npr. spektrofotometra), ako je primjereno,
- pojedinosti o ispitnom postupku upotrijebljenom za mjerenja TER-a,
- pojedinosti o ispitnom postupku za procjenu vezivanja boje, ako je primjereno,
- upotrijebljene ispitne doze, trajanje razdoblja izlaganja i temperature izlaganja,
- pojedinosti o postupku ispiranja upotrijebljenom nakon razdoblja izlaganja,
- broj ponovljenih diskova kože upotrijebljenih po ispitivanoj kemikaliji i kontrolama (pozitivna i negativna kontrola),
- opis svih izmjena ispitnog postupka,
- upućivanje na prijašnje podatke za predmetni model. To bi, među ostalim, trebalo uključivati:

- i) prihvatljivost vrijednosti TER-a pozitivnih i negativnih kontrola (u $k\Omega$) u odnosu na raspone otpora pozitivnih i negativnih kontrola;
 - ii) prihvatljivost vrijednosti sadržaja boje pozitivnih i negativnih kontrola (u $\mu g/disku$) u odnosu na raspone sadržaja boje pozitivnih i negativnih kontrola;
 - iii) prihvatljivost rezultata ispitivanja u odnosu na prijašnju varijabilnost među ponovljenim diskovima kože,
- opis primijenjenih kriterija za odlučivanje/modela predviđanja.

Rezultati:

- tablični podaci iz testova za utvrđivanje vrijednosti TER-a i vezivanja boje (ako je primjereno) za pojedinačne ispitivane kemikalije i kontrole, za svaki ciklus ispitivanja (pokusi) i svaki ponovljeni disk kože (pojedinačne životinje i pojedinačni uzorci kože), srednje vrijednosti, standardne devijacije (SD) i koeficijenti varijacije (CV),
- opis svih uočenih učinaka,
- utvrđeno razvrstavanje, s upućivanjem na primijenjeni model predviđanja/kriterije odlučivanja.

Rasprava o rezultatima

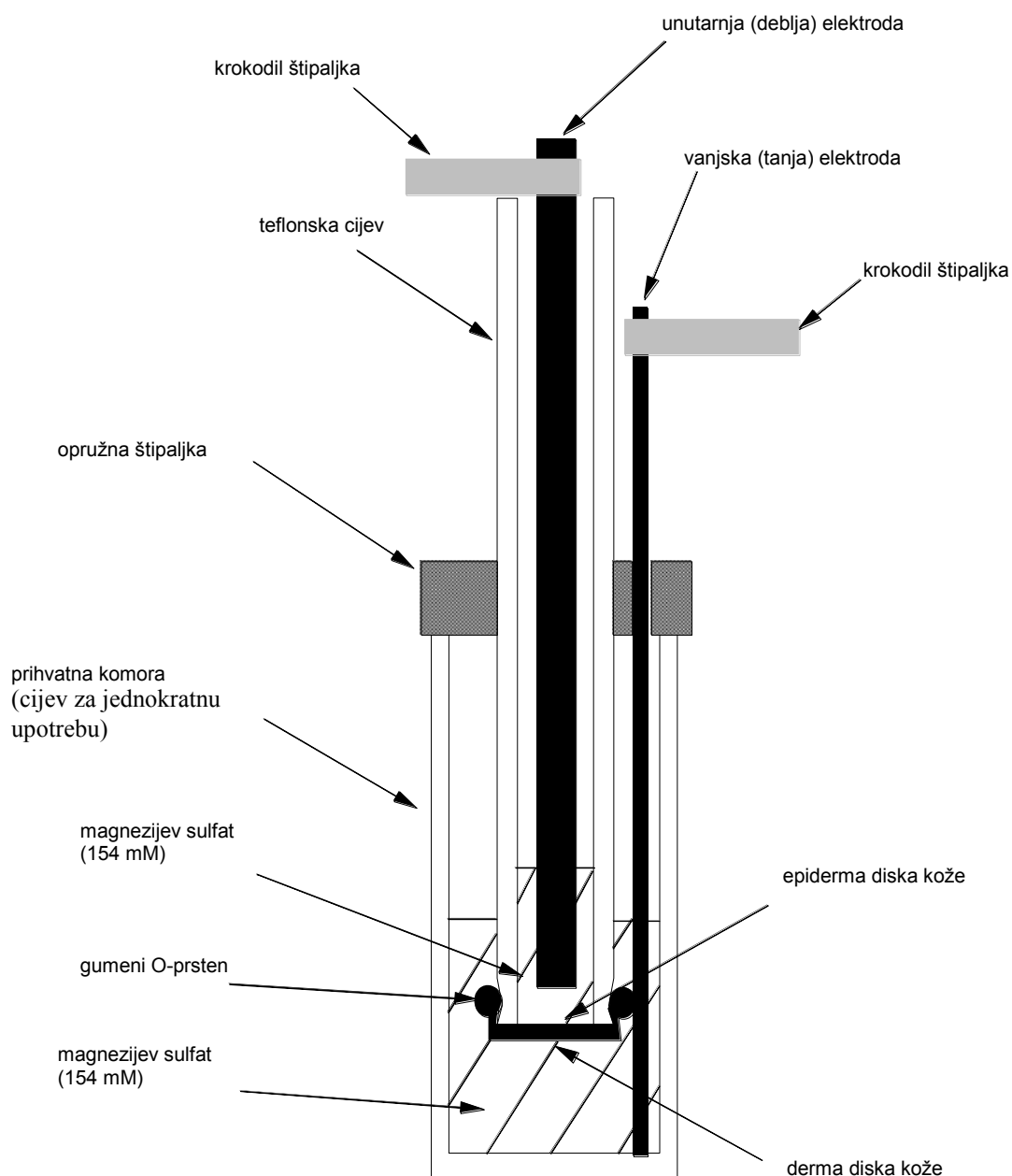
Zaključci

LITERATURA

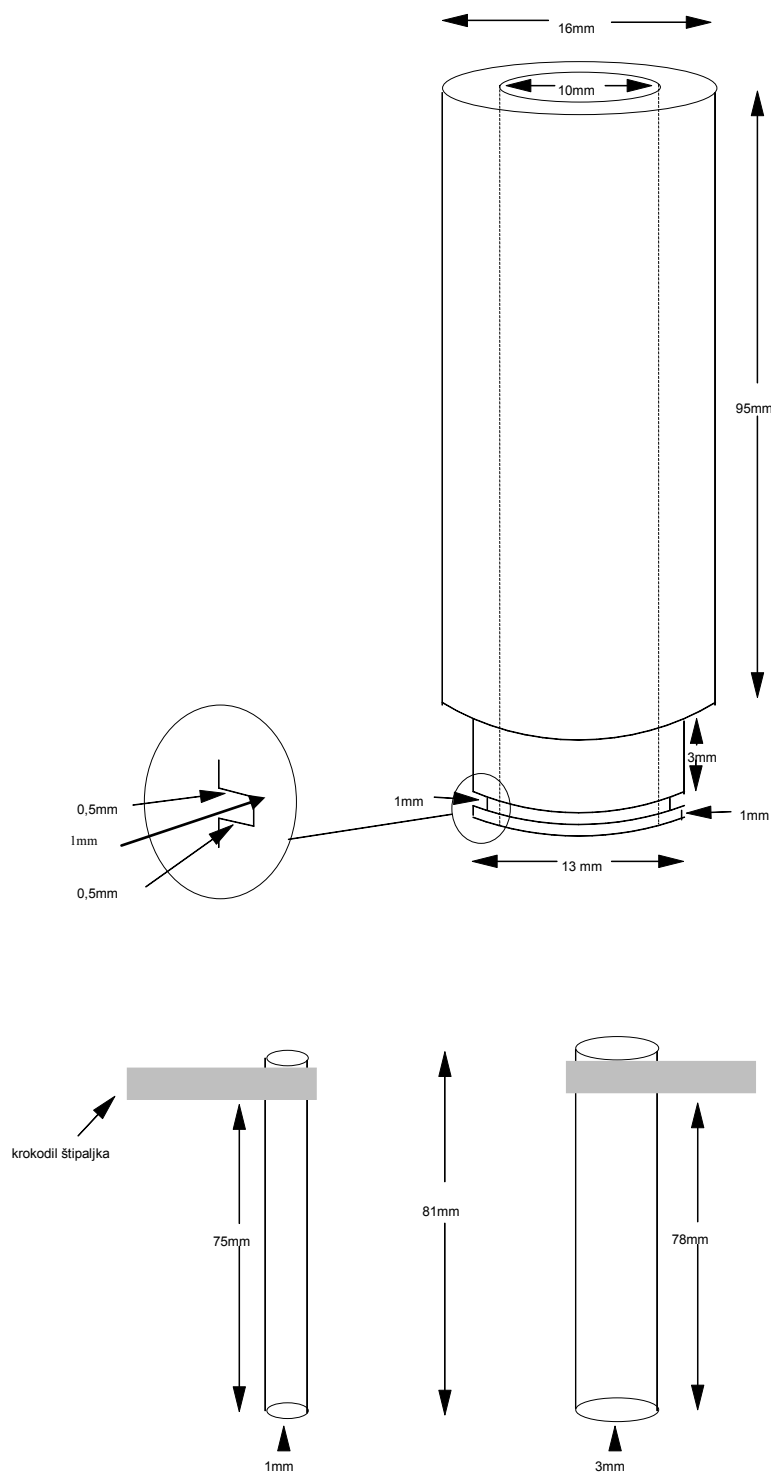
1. Ujedinjeni narodi (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, UN New York i Ženeva, 2013. Dostupno na: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html].
2. Poglavlje B.4. ovog Priloga, Akutno nadraživanje/nagrizanje kože.
3. Poglavlje B.40.bis ovog Priloga, Model kože *in vitro*.
4. Poglavlje B.65. ovog Priloga, *In vitro* ispitna metoda s membranskom barijerom.
5. Poglavlje B.46. ovog Priloga, Nadraživanje kože *in vitro*: ispitna metoda na modelu rekonstruirane ljudske epiderme.
6. OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
7. Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile D.J., Gardner J.R., Gordon V.C., Hildebrand B., Lewis R.W., Liebsch M., Logemann P., Osborne R., Ponc M., Regnier J.F., Steiling W., Walker A.P., and Balls M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 6. *ATLA* 23, 219.–255.
8. Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., and Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and Distribution of the Test Chemicals. *Toxic.In Vitro* 12, 471.–482.
9. Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Holzhütter H.-G., and Liebsch M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests For Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxic.In Vitro* 12, 483.–524.
10. Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., Bruner L., Combes R.D., Ekwall B., Fielder R.J., Guillouzo A., Lewis R.W., Lovell D.P., Reinhardt C.A., Repetto G., Sladowski D., Spielmann H., and Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops. *ATLA* 23, 129.–147.
11. ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, SAD.

12. EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), izdao ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3. travnja 1998.
13. ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275.–280.
14. ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (2002). ICCVAM Evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication No 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, SAD.
15. OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 430. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 218. Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
16. Oliver G.J.A., Pemberton M.A., and Rhodes C. (1986). An *In Vitro* Skin Corrosivity Test -Modifications and Validation. *Fd. Chem. Toxicol.* 24, 507.–512.
17. Botham P.A., Hall T.J., Dennett R., McCall J.C., Basketter D.A., Whittle E., Cheeseman M., Esdaile D.J., and 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. and Depallens O. (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul.Toxicol.Pharmacol.* 62, 393.–403.
19. TER SOP (December 2008). *INVITTOX* Protocol (No 115) Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test.
20. OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 34), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

SLIKA 1.: UREĐAJ ZA TEST TRANSKUTANOG ELEKTRIČNOG OTPORA (TER) NA KOŽI ŠTAKORA



SLIKA 2.: DIMENZIJE UPOTRIJEBLJENE TEFLONSKE (POLITETRAFLUORETILENSKE – PTFE) I PRIHVATNE CIJEVI I ELEKTRODA



Kritički faktori uređaja prikazanog na gornjoj slici:

- unutarnji promjer teflonske (PTFE) cijevi,

- duljina elektroda u odnosu na teflonsku i prihvatnu cijev; duljina bi trebala biti takva da elektrode ne dodiruju disk kože i da je elektrode pri standardnoj duljini u dodiru s otopinom MgSO_4 ,
- količina otopine MgSO_4 u prihvatnoj cijevi trebala bi omogućiti dubinu tekućine u odnosu na razinu u teflonskoj cijevi, kako je prikazano na slici 1.,
- disk kože treba biti dobro pričvršćen na teflonsku cijev, kako bi izmjereni električni otpor vjerno odražavao svojstva kože.

Dodatak

DEFINICIJE

Točnost: stupanj podudarnosti između rezultata ispitne metode i prihvaćenih referentnih vrijednosti. Ona je mjerilo učinkovitosti ispitne metode i jedan od aspekata relevantnosti. Pojam je često međusobno zamjenjiv s pojmom „podudarnost” u smislu udjela točnih ishoda ispitne metode (20.).

C: nagrizajuće.

Kemikalija: tvar ili smjesa.

Podudarnost: mjerilo učinkovitosti ispitne metode za ispitne metode koje daju kategorijski rezultat i jedan je od aspekata relevantnosti. Pojam je ponekad međusobno zamjenjiv s pojmom točnosti i definira se kao udio svih ispitanih kemikalija koje su pravilno razvrstane kao pozitivne ili negativne. Podudarnost u velikoj mjeri ovisi o prisutnosti pozitivnih rezultata u vrstama ispitivane kemikalije (20.).

GHS (Globalno usklađeni sustav razvrstavanja i označivanja kemikalija (UN)): sustav za razvrstavanje kemikalija (tvari i smjesa) prema standardiziranim vrstama i stupnjevima fizičkih opasnosti te opasnosti za zdravlje i okoliš, kojim su obuhvaćena odgovarajuća komunikacijska sredstva kao što su piktogrami, oznake opasnosti, oznake upozorenja, oznake obavijesti i sigurnosno-tehnički listovi, kojima se prenose informacije o njihovim štetnim učincima u cilju zaštite ljudi (uključujući poslodavce, radnike, prijevoznike, potrošače i interventno osoblje) i okoliša (1.).

IATA: integrirani pristup ispitivanju i procjeni.

Smjesa: smjesa ili otopina koja se sastoji od dviju ili više tvari.

Tvar s jednim sastojkom: tvar, definirana količinskim sastavom, u kojoj je jedan glavni sastojak prisutan u koncentraciji od najmanje 80 % (w/w).

Tvar s više sastojaka: tvar, definirana količinskim sastavom, u kojoj je više od jednog glavnog sastojka prisutno u koncentraciji od 10 % (w/w) ili većoj te manjoj od 80 % (w/w). Tvar s više sastojaka rezultat je procesa proizvodnje. Smjesa i tvar s više sastojaka razlikuju se po tome što se smjesa dobiva miješanjem dviju ili više tvari bez kemijske reakcije. Tvar s više sastojaka rezultat je kemijske reakcije.

NC: nije nagrizajuće.

OD: optička gustoća.

PC: pozitivna kontrola; ponovljeni uzorak koji sadržava sve komponente ispitnog sustava i tretiran je s tvari za koju je poznato da inducira pozitivan odgovor. Kako bi se osigurala mogućnost procjene varijabilnosti odgovora pozitivne kontrole tijekom vremena, pozitivan odgovor ne bi smio biti presnažan.

Zahtjevi izvedbe (PS): zahtjevi koji se temelje na validiranoj ispitnoj metodi i pružaju temelj za ocjenjivanje usporedivosti predložene, funkcionalno i mehanicistički slične, ispitne metode. Uključuju: i. ključne elemente ispitne metode; ii. minimalni popis referentnih kemikalija odabranih među kemikalijama koje se upotrebljavaju za dokazivanje prihvatljive učinkovitosti validirane ispitne metode; te iii. slične razine pouzdanosti i točnosti, utemeljene na rezultatima dobivenim za validiranu ispitnu metodu, koje se prilikom ocjenjivanja trebaju dokazati predloženom ispitnom metodom koristeći minimalni popis referentnih kemikalija.

Relevantnost: opis odnosa između ispitne metode i istraživanog učinka te je li ispitivanje prikladno i korisno za određenu svrhu. Pokazuje u kojoj se mjeri ispitnom metodom točno mjeri ili predviđa istraživani biološki učinak. Relevantnost uključuje razmatranje o točnosti (podudarnosti) ispitne metode (20.).

Pouzdanost: pokazuje u kojoj se mjeri ispitna metoda može obnovljivo primijeniti unutar jednog laboratorija i između više laboratorija tijekom vremena uz primjenu istog protokola. Ocjenjuje se izračunavanjem obnovljivosti unutar jednog laboratorija i između više laboratorija (20.).

Osjetljivost: udio svih pozitivnih/aktivnih kemikalija koje su pravilno razvrstane primjenom ispitne metode. To je mjera točnosti ispitne metode koja daje kategorijske rezultate i važan je čimbenik za ocjenu relevantnosti ispitne metode (20.).

Nagrivanje kože *in vivo*: uzrokovanje ireverzibilnog oštećenja kože, točnije, vidljive nekroze koja kroz epidermu prodire u dermu nakon što je ispitivana kemikalija primjenjivana u trajanju do najviše četiri sata. Za nagrizanje kože tipična je pojava čireva, krvarenja, krvavih krasta te, do kraja opažanja od 14 dana, gubitak boje kože zbog nestajanja pigmenta, cijele površine zahvaćene alopecijom (gubitak dlake) i ožiljci. Za ocjenjivanje sumnjivih lezija treba razmotriti mogućnost histopatoloških pretraga.

Specifičnost: udio svih negativnih/neaktivnih kemikalija koje su pravilno razvrstane primjenom ispitne metode. To je mjera točnosti ispitne metode koja daje kategorijske rezultate i važan je čimbenik za ocjenu relevantnosti ispitne metode (20.).

Tvar: kemijski element i njegovi spojevi u prirodnome stanju ili dobiveni proizvodnim postupkom, što uključuje i aditive koji su nužni za održavanje stabilnosti proizvoda te nečistoće koje proizlaze iz primijenjenoga postupka, ali isključuje otapala koja se mogu izdvojiti bez utjecaja na stabilnost tvari ili promjene njezina sastava.

Ciklus (ispitivanja): jedna ispitivana kemikalija koja se istodobno ispituje na najmanje tri ponovljena diska kože.

Ispitivana kemikalija: svaka tvar ili smjesa koja se ispituje ovom ispitnom metodom.

Transkutani električni otpor (TER): mjera električne impedancije kože, izražena kao vrijednost otpora u kiloomima. Jednostavna, robusna metoda za procjenu funkcije barijere bilježenjem prolazaka iona kroz kožu primjenom Wheatstoneova mosta.

UVCB: tvari nepoznatog ili promjenjivog sastava, složeni reakcijski proizvodi ili biološki materijali.”;

(6) u dijelu B poglavlje B.40.*bis* zamjenjuje se sljedećim:

„B.40.*bis* NAGRIZANJE KOŽE *IN VITRO*: ISPITNA METODA NA MODELU REKONSTRUIRANE LJUDSKE EPIDERME (RhE)

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 431 (2016.). Nagrizanje kože odnosi se na izazivanje ireverzibilnog oštećenja kože koje se manifestira kao vidljiva nekroza koja kroz epidermu prodire u dermu nakon primjene ispitivane kemikalije [kako je utvrđeno Globalno usklađenim sustavom razvrstavanja i označivanja kemikalija (GHS) Ujedinjenih naroda (UN) (1.) i Uredbom (EZ) br. 1272/2008 o razvrstavanju, označivanju i pakiranju tvari i smjesa (CLP)¹ Europske unije]. Ova ažurirana ispitna metoda B.40.*bis* pruža *in vitro* postupak kojim se omogućuje utvrđivanje nagrizaćih i nenagrizaćih tvari i smjesa u skladu s UN GHS-om i CLP-om. Omogućuje i djelomično daljnje razvrstavanje nagrizaćih tvari.
2. Procjena potencijala kemikalija da uzrokuju nagrizanje kože obično je uključivala upotrebu laboratorijskih životinja (ispitna metoda B.4., ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 404; izvorno donesena 1981. i revidirana 1992., 2002. i 2015.) (2.). Uz sadašnju ispitnu metodu B.40.*bis* validirane su i donesene još dvije ispitne metode *in vitro* za ispitivanje potencijala kemikalija da uzrokuju nagrizanje kože – ispitna metoda B.40. (ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 430) (3.) i ispitna metoda B.65. (ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 435) (4.). Nadalje, donesena je ispitna metoda *in vitro* B.46. (ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 439) (5.) za ispitivanje potencijala nadraživanja kože. U Smjernicama OECD-a o integriranim pristupima ispitivanju i procjeni (IATA) za nagrizanje i nadraživanje kože opisano je nekoliko modula u kojima se grupiraju izvori informacija i alati za analizu te se pružaju smjernice o i. načinu integriranja i uporabe postojećih podataka o ispitivanju i podataka koji se dobivaju bez ispitivanja za procjenu potencijala kemikalija da uzrokuju nadraživanje i nagrizanje kože te ii. predlaganju pristupa kad je potrebno daljnje ispitivanje (6.).
3. Ova se ispitna metoda bavi konačnim učinkom nagrivanja kože na zdravlje ljudi. U njoj se upotrebljava rekonstruirana ljudska epiderma (RhE) (dobivena iz ljudskih netransformiranih epidermalnih keratinocita) koja vjerno oponaša histološka, morfološka, biokemijska i fiziološka svojstva gornjih slojeva ljudske kože, tj. epiderme. Odgovarajuća smjernica OECD-a za ispitivanje izvorno je donesena 2004. i ažurirana 2013. kako bi se uključile dodatne ispitne

¹ Uredba (EZ) br. 1272/2008 Europskog parlamenta i Vijeća od 16. prosinca 2008. o razvrstavanju, označivanju i pakiranju tvari i smjesa, o izmjeni i stavljanju izvan snage Direktive 67/548/EEZ i Direktive 1999/45/EZ i o izmjeni Uredbe (EZ) br. 1907/2006, SL L 353/1, 31.12.2008.

metode u kojima se upotrebljavaju modeli RhE-a i mogućnost upotrebe metoda koje podržavaju daljnje razvrstavanje nagrizajućih kemikalija, a 2015. je ažurirana radi upućivanja na smjernice o IATA-i i uvođenja alternativnog postupka za mjerenje vijabilnosti.

4. Ova ispitna metoda obuhvaća četiri validirana komercijalno dostupna modela RhE-a. Predvalidacijske studije (7.), nakon kojih je slijedila službena validacijska studija za procjenu nagrizanja kože (8., 9. i 10.), provedene su (11. i 12.) za dva ta komercijalno dostupna ispitna modela – standardni model EpiSkin™ i test nagrizajućeg djelovanja na kožu EpiDerm™ (EPI-200) (dalje u tekstu „Validirane referentne metode – VRM-ovi”). Ishod tih studija doveo je do preporuke da bi se dvije prethodno navedene validirane referentne metode mogle upotrebljavati u regulatorne svrhe za razlikovanje nagrizajućih tvari (C) od nenagrizajućih tvari (NC) i da bi se EpiSkin™ osim toga mogao upotrebljavati za daljnje razvrstavanje nagrizajućih tvari (13., 14. i 15.). Druga dva komercijalno dostupna ispitna modela RhE za utvrđivanje nagrizanja kože *in vitro* pokazala su rezultate slične validiranoj referentnoj metodi EpiDerm™ u skladu s validacijom na temelju zahtjeva izvedbe (16., 17. i 18.). To su SkinEthic™ RHE¹ i epiCS® (prethodni naziv EST-1000) te se i oni mogu upotrebljavati u regulatorne svrhe za razlikovanje nagrizajućih tvari od nenagrizajućih tvari (19. i 20.). Postvalidacijskim studijama koje su proveli proizvođači modela RhE od 2012. do 2014. s poboljšanim protokolom u kojem su ispravljene interferencije neodređene redukcije MTT-a koje uzrokuju ispitivane kemikalije poboljšana je učinkovitost razlikovanja nagrizajućih i nenagrizajućih tvari, ali i daljnjeg razvrstavanja nagrizajućih tvari (21. i 22.). Provedene su daljnje statističke analize postvalidacijskih podataka s modelima EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE i EpiCS® kako bi se identificirali alternativni modeli predviđanja koji poboljšavaju prediktivnu sposobnost daljnjeg razvrstavanja (23.).
5. Prije nego što se predložena slična ili izmijenjena ispitna metoda RhE *in vitro* za nagrizanje kože, koja nije validirana referentna metoda, može upotrijebiti u regulatorne svrhe, trebalo bi utvrditi njezinu pouzdanost, relevantnost (točnost) i ograničenja za njezinu predloženu uporabu kako bi se osigurala njezina sličnost s validiranom referentnom metodom, u skladu sa zahtjevima izvedbe (24.) utvrđenima u skladu s načelima Smjernice OECD-a br. 34 (25.). Uzajamno prihvaćanje podataka jamčit će se samo nakon što se svaka predložena nova ili ažurirana ispitna metoda koja je u skladu sa zahtjevima izvedbe pregleda i uključi u odgovarajuću smjernicu za ispitivanje. Ispitni modeli uključeni u tu smjernicu za ispitivanje mogu se upotrijebiti za ispunjavanje zahtjeva zemalja u pogledu rezultata ispitivanja ispitne metode *in vitro* za nagrizanje kože, uz ostvarivanje koristi od uzajamnog prihvaćanja podataka.

¹ Kratica RhE (= rekonstruirana ljudska epiderma) upotrebljava se za sve modele koji se temelje na tehnologiji RhE. Kratica RHE koja se upotrebljava u kombinaciji s modelom SkinEthic™ znači isto, ali piše se velikim slovima kao dio naziva te specifične ispitne metode, kako je stavljena na tržište.

DEFINICIJE

6. Upotrijebljene definicije navedene su u Dodatku 1.

POČETNA RAZMATRANJA

7. Ova ispitna metoda omogućuje utvrđivanje nagrizajućih i nenagrizajućih tvari i smjesa u skladu s UN GHS-om i CLP-om. Ovom se ispitnom metodom podržava daljnje razvrstavanje nagrizajućih tvari i smjesa na neobaveznu potkategoriju 1.A, u skladu s UN GHS-om (1.), te kombinaciju potkategorija 1.B i 1.C (21., 22. i 23.). Ograničenje je ove metode to što ne omogućuje razlikovanje potkategorije 1.B i potkategorije 1.C s nagrizajućim djelovanjem na kožu u skladu s UN GHS-om i CLP-om zbog ograničenog skupa poznatih kemikalija iz potkategorije 1.C s nagrizajućim djelovanjem *in vivo*. Ispitnim modelima EpiSkin™, EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE i epiCS® mogu se odrediti daljnje potkategorije (tj. 1.A naspram 1.B i 1.C naspram NC).
8. Širok raspon kemikalija, koje uglavnom čine pojedinačne tvari, ispitan je u validaciji kojom se podupiru ispitni modeli uključeni u ovu ispitnu metodu kada se upotrebljavaju za utvrđivanje nagrizajućih i nenagrizajućih kemikalija; empirijska baza podataka validacijske studije uključivala je 60 kemikalija koje su obuhvaćale širok raspon kemijskih razreda (8., 9. i 10.). Subjekti koji su razvili ispitnu metodu proveli su ispitivanje radi dokazivanja osjetljivosti, specifičnosti, točnosti i obnovljivosti unutar laboratorija testa za daljnje razvrstavanje, a rezultate je pregledao OECD (21., 22. i 23.). Na temelju svih podataka koji su dostupni, ispitna metoda primjenjiva je na širok raspon kemijskih razreda i agregatnih stanja, uključujući tekućine, polukrute i krute tvari te voskove. Tekućine mogu biti vodene i bezvodne; krute tvari mogu biti topljive ili netopljive u vodi. Krute tvari prije primjene treba samljeti u sitni prah kad god je to moguće; nije potrebno nikakvo drugo prethodno tretiranje uzorka. U slučajevima u kojima se može dokazati da se ispitni modeli uključeni u ispitnu metodu ne mogu primijeniti za ispitivanje specifične kategorije ispitivanih kemikalija, te modele ne bi trebalo upotrebljavati za tu specifičnu kategoriju ispitivanih kemikalija. Osim toga, pretpostavlja se da se ova ispitna metoda može primijeniti na smjese kao proširenje njezine primjenjivosti na tvari. Međutim, budući da smjese obuhvaćaju široki spektar kategorija i sastava te da su trenutačno dostupne samo ograničene informacije o ispitivanju smjesa, u slučajevima u kojima se može dokazati da se ispitna metoda ne može primijeniti za ispitivanje specifične kategorije smjesa (npr. primjenom strategije predložene u 26.), ispitnu metodu ne bi trebalo upotrebljavati za tu specifičnu kategoriju smjesa. Prije nego što se ova ispitna metoda primijeni na smjesi radi dobivanja podataka za predviđenu regulatornu svrhu, potrebno je razmotriti mogu li se te, ako se mogu, zašto se njome mogu dobiti primjereni rezultati za tu svrhu. Ta razmatranja nisu potrebna ako postoji regulatorni zahtjev za ispitivanje smjese. Plinovi i aerosoli još nisu ocijenjeni u validacijskim studijama (8., 9. i 10.). Iako je moguće da se oni mogu ispitati upotrebom tehnologije RhE, trenutačnom ispitnom metodom nije omogućeno ispitivanje plinova i aerosola.

9. Ispitivane kemikalije koje apsorbiraju svjetlost u istom rasponu kao i MTT formazan i ispitivane kemikalije koje mogu izravno reducirati vitalnu boju MTT (na MTT formazan) mogu ometati mjerenje vijabilnosti tkiva te se kod njih trebaju upotrebljavati prilagođene kontrole za ispravke. Vrsta prilagođenih kontrola koja može biti potrebna mijenjat će se ovisno o vrsti interferencije koju proizvodi ispitivana kemikalija i postupku koji se upotrebljava za mjerenje MTT formazana (vidjeti stavke 25.–31.).
10. Iako se ovom ispitnom metodom ne dobivaju primjerene informacije o nadraživanju kože, trebalo bi napomenuti da se ispitna metoda B.46. posebno bavi učinkom nadraživosti kože na zdravlje *in vitro* i temelji se na istom ispitnom sustavu RhE uz upotrebu drugog protokola (5.). Za potpunu evaluaciju lokalnih učinaka na kožu nakon jednostrukog dermalnog izlaganja potrebno je proučiti Smjernice OECD-a o integriranim pristupima ispitivanju i procjeni (6.). Taj pristup IATA obuhvaća provođenje *in vitro* ispitivanja za dokazivanje nagrizajućeg (kako je opisano u ovoj ispitnoj metodi) i nadražujućeg djelovanja na kožu prije eventualnog provođenja ispitivanja na živim životinjama. Podrazumijeva se da upotreba ljudske kože podliježe nacionalnim i međunarodnim etičkim pitanjima i uvjetima.

NAČELO ISPITIVANJA

11. Ispitivana se kemikalija lokalno nanosi na trodimenzionalni model RhE, koji čine netransformirani ljudski epidermalni keratinociti uzgojeni u svrhu dobivanja višeslojnog, visoko izdiferenciranog modela ljudske epiderme. Sastoji se od organiziranih bazalnih, trnastih i zrnatih slojeva te višeslojnog rožnatog sloja (*stratum corneum*) koji između stanica sadržava lamelarne masne slojeve koji predstavljaju glavne razrede lipida analogne onima koji se susreću *in vivo*.
12. Ispitna metoda RhE temelji se na pretpostavci da nagrizajuće kemikalije mogu penetrirati kroz *stratum corneum* putem difuzije ili erozije te su citotoksične za stanice ispod tog sloja. Vijabilnost stanica mjeri se enzimskom konverzijom vitalne boje MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid, tiazolil plavo tetrazolijev bromid; CAS broj 298-93-1] u sol plavog formazana koja se kvantitativno mjeri nakon ekstrakcije iz tkiva (27.). Nagrizajuće kemikalije prepoznaju se po tome što smanjuju vijabilnost stanica ispod definiranih pragova (vidjeti stavke 35. i 36.). Pokazalo se da se ispitnom metodom za utvrđivanje nagrizanja kože koja se temelji na modelu RhE može predvidjeti nagrizajuće djelovanje na kožu *in vivo* koje je procijenjeno kod kunića u skladu s ispitnom metodom B.4. (2.).

DOKAZIVANJE OSPOSOBLJENOSTI

13. Prije rutinske primjene bilo kojeg od četiriju validiranih ispitnih modela RhE koji su u skladu s ovom ispitnom metodom laboratoriji bi trebali dokazati tehničku osposobljenost pravilnim utvrđivanjem kategorije dvanaest tvari koje služe za dokazivanje osposobljenosti koje su navedene u tablici 1. U slučaju upotrebe metode za daljnje razvrstavanje trebalo bi dokazati i

pravilno daljnje razvrstavanje. U slučajevima u kojima nije dostupna navedena tvar ili ako je to opravdano, može se upotrijebiti druga tvar za koju su dostupni primjereni referentni *in vivo* i *in vitro* podaci (npr. s popisa referentnih kemikalija (24.)) pod uvjetom da se primjenjuju isti kriteriji za odabir kao oni opisani u tablici 1.

Tablica 1.: Popis tvari koje služe za dokazivanje osposobljenosti¹

Tvar	CAS br.	Kemijski razred ²	Kat. sustava UN GHS-a ili CLP-a na temelju <i>in vivo</i> rezultata ³	Kat. VRM-a na temelju <i>in vitro</i> rezultata ⁴	Redukcija MTT-a ⁵	Agregatno stanje
Tvari koje djeluju nagrizajuće <i>in vivo</i> iz potkategorije 1.A						
Bromoctena kiselina	79-08-3	Organska kiselina	1.A	(3) 1.A	--	Kruto
Borov trifluorid dihidrat	13319-75-0	Anorganska kiselina	1.A	(3) 1.A	--	Tekuće
Fenol	108-95-2	Fenol	1.A	(3) 1.A	--	Kruto
Dikloracetil-klorid	79-36-7	Elektrofil	1.A	(3) 1.A	--	Tekuće
Kombinacija tvari koje djeluju nagrizajuće <i>in vivo</i> iz potkategorija 1.B i 1.C						
Monohidrat glioksilne kiseline	563-96-2	Organska kiselina	1.B i 1.C	(3) 1.B i 1.C	--	Kruto
Mliječna kiselina	598-82-3	Organska kiselina	1.B i 1.C	(3) 1.B i 1.C	--	Tekuće
Etanolamin	141-43-5	Organska baza	1.B	(3) 1.B i 1.C	Da	Viskozno
Klorovodična kiselina (14,4 %)	7647-01-0	Anorganska kiselina	1.B i 1.C	(3) 1.B i 1.C	--	Tekuće
Tvari koje ne djeluju nagrizajuće <i>in vivo</i>						
Fenetil bromid	103-63-9	Elektrofil	NC	(3) NC	Da	Tekuće
4-amino-1,2,4-triazol	584-13-4	Organska baza	NC	(3) NC	--	Kruto
4-(metiltio)-benzaldehyd	3446-89-7	Elektrofil	NC	(3) NC	Da	Tekuće
Laurinska kiselina	143-07-7	Organska kiselina	NC	(3) NC	--	Kruto

Kratice: CAS br. = registarski broj Službe za podatke o kemijskim tvarima; VRM = validirana referentna metoda; NC = Nije nagrizajuća tvar

¹ Tvari koje služe za dokazivanje osposobljenosti, prvo razvrstane na tvari koje djeluju nagrizajuće i one koje ne djeluju nagrizajuće, zatim prema potkategoriji nagrizanja i potom kemijskom razredu, odabrane su među tvarima koje su upotrijebljene u ECVAM-ovoj validacijskoj studiji modela EpiSkin™ i EpiDerm™ (8., 9. i 10.) te iz postvalidacijskih studija na temelju podataka koje su dostavili subjekti koji su razvili EpiSkin™ (22.), EpiDerm™, SkinEthic™ i epiCS® (23.). Osim ako je drukčije navedeno, tvari su ispitane na razini čistoće koja se dobiva kad se kupe od komercijalnog izvora (8. i 10.). Odabir uključuje, u mjeri u kojoj je to moguće, tvari: i. koje su reprezentativne za raspon nagrizajućih odgovora (npr. tvari koje ne djeluju nagrizajuće, tvari sa slabim do jakim nagrizajućim djelovanjem) koji se mogu izmjeriti ili predvidjeti validiranim referentnim metodama; ii. koje su reprezentativne za kemijske razrede koji su korišteni u validacijskim studijama; iii. koje imaju dobro utvrđene kemijske strukture; iv. koje induciraju ponovljive rezultate u validiranoj referentnoj metodi; v. koje induciraju konačne rezultate u *in vivo* referentnoj ispitnoj metodi; vi. koje su komercijalno dostupne; i vii. koje nisu povezane s neprimjereno visokim troškovima zbrinjavanja.

² Kemijski razred koji su dodijelili Barratt i dr. (8.).

³ Odgovarajuće ambalažne skupine UN-a I., II. i III. za kategorije 1.A, 1.B odnosno 1.C UN GHS-a ili CLP-a.

⁴ Predviđanja VRM *in vitro* navedena u ovoj tablici dobivena su ispitnim modelima EpiSkin™ i EpiDerm™ (VRM-ovim) tijekom postvalidacijskog ispitivanja koje su obavili subjekti koji su razvili ispitnu metodu.

⁵ Vrijednosti vijabilnosti dobivene ECVAM-ovim validacijskim studijama nagrizanja kože nisu ispravljene za izravnu redukciju MTT-a (u validacijskim studijama nisu provedene usmrćene kontrolne skupine). Međutim, postvalidacijski podaci subjekata koji su razvili ispitnu metodu prikazani u ovoj tablici dobiveni su prilagođenim kontrolama (23.).

14. U okviru dokazivanja osposobljenosti preporučuje se da korisnik po primitku provjeri svojstva barijere tkiva u skladu sa specifikacijama proizvođača modela RhE. To je posebno važno ako se tkiva šalju na velike udaljenosti/tijekom dugih vremenskih razdoblja. Nakon što se metoda uspješno uspostavi i nakon što se dokaže osposobljenost u pogledu njezine uporabe, takva rutinska provjera neće biti potrebna. Međutim, kod rutinske uporabe ispitne metode preporučuje se daljnje ocjenjivanje svojstava barijere u pravilnim vremenskim intervalima.

POSTUPAK

15. U nastavku se nalazi opći opis elemenata i postupaka u vezi s metodom na temelju rekonstruirane ljudske epiderme za potrebe ocjenjivanja nadraživanja kože obuhvaćenih ovom ispitnom metodom. Modeli RhE koji su podržani kao znanstveno valjani za upotrebu u ovoj ispitnoj metodi, tj. modeli EpiSkin™ (standardni model), EpiDerm™ (EPI-200), SkinEthic™ RHE i epiCS® (16., 17., 19., 28., 29., 30., 31., 32. i 33.) mogu se nabaviti iz komercijalnih izvora. Dostupni su standardni operativni postupci za ta četiri modela RhE (34., 35., 36. i 37.), a glavni elementi ispitne metode sažeti su u Dodatku 2. Preporučuje se da se pri provedbi i upotrebi jednog od tih modela u laboratoriju prouči relevantni standardni operativni postupak. Ispitivanje s četiri ispitna modela RhE obuhvaćena ovom ispitnom metodom trebalo bi biti u skladu sa sljedećim:

ELEMENTI ISPITNE METODE RHE

Opći uvjeti

16. Za rekonstruiranje epitela treba koristiti netransformirane ljudske keratinocyte. Ispod funkcionalnog rožnatog sloja (*stratum corneum*) nalaze se višestruki slojevi vijabilnih epitelnih stanica (bazalni sloj, trnasti sloj, zrnati sloj). I sam rožnati sloj višeslojan je te sadržava esencijalni profil lipida kao čvrstu funkcionalnu barijeru koja je sposobna zaustaviti brzi prodor citotoksičnih referentnih kemikalija, npr. natrijev dodecil-sulfat (SDS) ili Triton X-100. Funkciju barijere trebalo bi dokazati i može se ocijeniti određivanjem koncentracije pri kojoj referentna kemikalija smanjuje vijabilnost tkiva za 50 % (IC₅₀) nakon fiksnog vremena izlaganja ili određivanjem vremena izlaganja koje je potrebno da se vijabilnost stanica smanji za 50 % (ET₅₀) nakon primjene referentne kemikalije u unaprijed određenoj fiksnoj koncentraciji (vidjeti stavak 18.). Model RhE mora biti dovoljno nepropustan da spriječi prolazak materijala oko rožnatog sloja do vijabilnog tkiva jer bi to dovelo do lošeg modeliranja

izlaganja kože. Model RhE ne smije biti onečišćen bakterijama, virusima, mikoplazmama ili gljivicama.

Funkcionalni uvjeti

Vijabilnost

17. Za kvantifikaciju vijabilnosti tkiva upotrebljava se MTT test (27.). Vijabilne stanice modela tkiva RhE reduciraju vitalnu boju MTT u talog plavog MTT formazana koji se zatim ekstrahira iz tkiva izopropanolom (ili sličnim otapalom). Optička gustoća (OD) samog ekstrakcijskog otapala treba biti dovoljno mala tj. $OD < 0,1$. Ekstrahirani MTT formazan može se kvantificirati upotrebom mjerenja standardne apsorbancije (OD) ili postupkom HPLC/UPLC spektrofotometrije (38.). Korisnici modela RhE trebali bi osigurati da svaka šarža modela RhE koji se upotrebljava ispunjava utvrđene kriterije za negativnu kontrolu. Raspon prihvatljivosti (gornja i donja granica) za vrijednosti optičke gustoće negativne kontrole trebao bi utvrditi subjekt koji je razvio model RhE ili dobavljač tog modela. Rasponi prihvatljivosti za vrijednosti optičke gustoće negativne kontrole za četiri validirana ispitna modela RhE uključena u ovu ispitnu metodu navedeni su u tablici 2. Korisnik HPLC/UPLC spektrofotometrije trebao bi upotrebljavati raspone optičke gustoće negativne kontrole navedene u tablici 2. kao kriterij prihvatljivosti za negativnu kontrolu. Potrebno je dokumentirati da su tkiva obrađena negativnom kontrolom stabilna u kulturi (tj. daju slična mjerenja optičke gustoće) za vrijeme trajanja izlaganja.

Tablica 2.: Rasponi prihvatljivosti vrijednosti optičke gustoće negativne kontrole za kontrolu kvalitete šarži

	Donja granica prihvatljivosti	Gornja granica prihvatljivosti
EpiSkin™ (standardna metoda)	> 0,6	< 1,5
EpiDerm™ SCT (EPI-200)	> 0,8	< 2,8
SkinEthic™ RHE	> 0,8	< 3,0
epiCS®	> 0,8	< 2,8

Funkcija barijere

18. Rožnati sloj sa svojim sastavom lipida trebao bi biti sposoban zaustaviti brzi prodor određenih citotoksičnih referentnih kemikalija (npr. SDS ili Triton X-100), procijenjeno na temelju IC₅₀ ili ET₅₀ (tablica 3.). Subjekt koji je razvio model RhE ili njegov prodavatelj trebao bi pri dostavi tkiva krajnjem korisniku dokazati funkciju barijere svake šarže modela RhE koji se upotrebljava (vidjeti stavak 21.).

Morfologija

19. U izvedbi histološkog pregleda modela RhE mora se dokazati da je struktura slična višeslojnoj strukturi ljudske epiderme koja sadržava bazalni sloj, trnasti sloj, zrnati sloj i rožnati sloj te

pokazuje profil lipida sličan profilu lipida ljudske epiderme. Subjekt koji je razvio model RhE ili njegov prodavatelj trebao bi pri dostavi tkiva krajnjem korisniku dostaviti histološko ispitivanje svake šarže modela RhE koji se upotrebljava kojim se dokazuje odgovarajuća morfologija tkiva (vidjeti stavak 21.).

Obnovljivost

20. Korisnici ispitnih metoda trebali bi dokazati obnovljivost ispitnih metoda tijekom vremena primjenom pozitivnih i negativnih kontrola. Nadalje, ispitna metoda trebala bi se upotrebljavati samo ako subjekt koji je razvio model RhE ili dobavljač dostavi podatke kojima se dokazuje obnovljivost tijekom vremena primjenom kemikalija koje djeluju nagrizajuće i onih koje ne djeluju nagrizajuće, npr. s popisa tvari koje služe za dokazivanje osposobljenosti (tablica 1.). U slučaju upotrebe ispitne metode za daljnje razvrstavanje trebalo bi dokazati i obnovljivost u pogledu potkategorija.

Kontrola kvalitete (KK)

21. Model RhE trebao bi se upotrebljavati samo ako subjekt koji ga je razvio ili dobavljač dokaže da svaka šarža upotrijebljenog modela RhE ispunjava definirane kriterije za odobrenje proizvoda, među kojima su najvažniji oni za *vijabilnost* (stavak 17.), *funkciju barijere* (stavak 18.) i *morfologiju* (stavak 19.). Ti se podaci trebaju dostaviti korisnicima ispitne metode tako da ih mogu uključiti u izvješće o ispitivanju. Za pouzdano predviđanje nagrizajućeg razvrstavanja prihvatljivi su isključivo rezultati dobiveni sa šaržama tkiva koje ispunjavaju kontrolu kvalitete. Raspon prihvatljivosti (gornja i donja granica) za IC₅₀ ili ET₅₀ utvrđuje subjekt koji je razvio model RhE ili dobavljač tog modela. Rasponi prihvatljivosti za četiri validirana ispitna modela navedeni su u tablici 3.

Tablica 3.: Kriteriji za kontrolu kvalitete šarže

	Donja granica prihvatljivosti	Gornja granica prihvatljivosti
EpiSkin™ (standardna metoda) (18-satno tretiranje SDS-om) (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 sati	ET ₅₀ = 8,7 sati
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (35.)	ET ₅₀ = 4,0 sati	ET ₅₀ = 10,0 sati
epiCS® (1 % Triton X-100) (36.)	ET ₅₀ = 2,0 sati	ET ₅₀ = 7,0 sati

Primjena ispitivane kemikalije i kontrolnih kemikalija

22. Za svaku ispitnu kemikaliju i kontrole trebala bi se upotrijebiti barem dva ponovljena tkiva za svako vrijeme izlaganja. I kod tekućina i kemikalija u krutom stanju treba primijeniti dovoljnu količinu ispitivane kemikalije kako bi se ravnomjerno pokrila površina epiderme tako da se izbjegne beskonačna doza, tj. trebalo bi upotrijebiti najmanje $70 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ ili $30 \text{ mg}/\text{cm}^2$ kemikalije. Ovisno o modelima, površinu epiderme trebalo bi navlažiti deioniziranom ili destiliranom vodom prije primjene kemikalija u krutom stanju kako bi se poboljšao kontakt ispitivane kemikalije s površinom epiderme (34., 35., 36. i 37.). Kad je god moguće, kemikalije u krutom stanju treba ispitivati u obliku sitnog praha. Metodu primjene treba prilagoditi ispitivanoj kemikaliji (vidjeti npr. upućivanja (34.–37.)). Na kraju razdoblja izlaganja ispitivanu kemikaliju treba pažljivo oprati s epiderme vodenom puferskom otopinom ili 0,9-postotnom NaCl. Ovisno o tome koji se od četiri validirana ispitna modela RhE upotrebljava, upotrebljavaju se dva ili tri razdoblja izlaganja po ispitivanoj kemikaliji (za sva četiri valjana modela RhE: 3 min. i 1 sat; za EpiSkin™ dodatno vrijeme izlaganja od četiri sata). Ovisno o tome koji se ispitni model RhE upotrebljava i razdoblju izlaganja koje se procjenjuje, temperatura inkubacije tijekom izlaganja može varirati od sobne temperature do 37°C .
23. U svakom bi se ciklusu trebale upotrebljavati istodobne negativne i pozitivne kontrole kako bi se dokazalo da su vijabilnost (s negativnim kontrolama), funkcija barijere i posljedična osjetljivost tkiva (s pozitivnim kontrolama) unutar prihvatljivog raspona utvrđenog na temelju rezultata prijašnjih ispitivanja. Kao kemikalija pozitivne kontrole predlaže se ledena octena kiselina ili 8N KOH, ovisno o modelu RhE koji se upotrebljava. Trebalo bi napomenuti da 8N KOH izravno reducira MTT pa će možda biti potrebne prilagođene kontrole kako je opisano u stavcima 25. i 26. Kao negativna kontrolna tvar predlaže se 0,9-postotna NaCl (w/v) ili voda.

Mjerenja vijabilnosti stanica

24. MTT test je kvantitativni test koji bi se trebao upotrebljavati za mjerenje vijabilnosti stanica na temelju ove ispitne metode (27.). Uzorak tkiva stavlja se u otopinu MTT odgovarajuće koncentracije (0,3 ili 1 mg/ml) i ostavi u njoj tri sata. Nataloženi plavi formazan zatim se ekstrahira iz tkiva s pomoću otapala (npr. izopropanol, kiseli izopropanol) i koncentracija formazana mjeri se određivanjem vrijednosti OD na 570 nm uz pojas propuštanja do najviše $\pm 30 \text{ nm}$ ili postupkom HPLC/UPLC spektrofotometrije (vidjeti stavke 30. i 31.) (38.).
25. Ispitivane kemikalije mogu ometati MTT test izravnom redukcijom MTT-a u plavi formazan i/ili interferencijom s bojom ako ispitivana kemikalija apsorbira, prirodno ili zbog postupaka tretiranja, u istom rasponu optičke gustoće formazana ($570 \pm 30 \text{ nm}$, uglavnom plave i ljubičaste kemikalije). Treba upotrijebiti dodatne kontrole kako bi se utvrdila i ispravila moguća interferencija do koje dovode te ispitivane kemikalije, kao što su kontrola nespecifične redukcije MTT-a (NSMTT) i kontrola nespecifične boje (NSC) (vidjeti stavke od 26. do 30.). To je osobito važno kada se određena ispitivana kemikalija ne ispere u potpunosti s tkiva ili prodre u epidermu te je stoga prisutna u tkivima pri provođenju MTT testa vijabilnosti.

Podroban opis načina na koji se ispravljaju izravna redukcija MTT-a i interferencija bojila dostupan je u standardnim operativnim postupcima za ispitne modele (34., 35., 36. i 37.).

26. Kako bi se identificirale tvari koje izravno reduciraju MTT, svaku bi ispitivanu kemikaliju trebalo dodati u svježe pripremljeni medij MTT (34., 35., 36. i 37.). Ako smjesa MTT-a koja sadržava ispitivanu kemikaliju postane plava/ljubičasta, pretpostavlja se da ispitivana kemikalija izravno reducira MTT i treba se provesti daljnja funkcionalna provjera nevijabilne epiderme, neovisno o upotrebi mjerenja standardne apsorbancije (OD) ili postupka HPLC/UPLC spektrofotometrije. U toj dodatnoj funkcionalnoj provjeri upotrebljavaju se mrtva tkiva kod kojih je prisutna samo preostala metabolička aktivnost, ali koja apsorbiraju sličnu količinu ispitivane kemikalije kao vijabilna tkiva. Svaka kemikalija koja reducira MTT primjenjuje se na barem dva ponovljena mrtva tkiva po vremenu izlaganja, koja se podvrgavaju cijelom ispitivanju nagrizanja kože. Prava vijabilnost tkiva zatim se računa kao postotak vijabilnosti tkiva koji se dobiva iz živih tkiva izloženih tvari koja reducira MTT umanjenom za postotak nespecifične redukcije MTT-a dobivene s mrtvim tkivima izloženima istoj tvari koja reducira MTT, izračunano u odnosu na negativnu kontrolu koja se provodi istodobno kad i ispitivanje koje se ispravlja (%NSMTT).
27. Kako bi se identificirala potencijalna interferencija obojenih ispitivanih kemikalija ili ispitivanih kemikalija koje se oboje u dodiru s vodom ili izopropanolom te kako bi se odlučilo jesu li potrebne dodatne kontrole, trebalo bi provesti spektralnu analizu ispitivane kemikalije u vodi (okoliš tijekom izlaganja) i/ili izopropanolu (otopina za ekstrahiranje). Ako ispitivana kemikalija u vodi i/ili izopropanolu apsorbira svjetlost u rasponu od 570 ± 30 nm, trebalo bi provesti daljnje kontrole bojila ili bi, kao alternativu, trebalo primijeniti postupak HPLC/UPLC spektrofotometrije; u potonjem slučaju te kontrole nisu potrebne (vidjeti stavke 30. i 31.). Pri provedbi mjerenja standardne apsorbancije (OD) svaka interferirajuća obojena ispitivana kemikalija primjenjuje se na najmanje dva ponovljena uzorka vijabilnog tkiva po vremenu izlaganja, koji se podvrgavaju cijelom ispitivanju nagrizanja kože, ali se u koraku inkubacije MTT-a inkubiraju medijem, a ne otopinom MTT-a, kako bi nastala kontrola nespecifične boje (NSC_{living}). Kontrolu NSC_{living} treba provoditi istodobno po vremenu izlaganja po obojenoj ispitivanoj kemikaliji (u svakom ciklusu) zbog svojstvene biološke varijabilnosti živih tkiva. Prava vijabilnost tkiva zatim se računa kao postotak vijabilnosti tkiva koji se dobiva iz živih tkiva izloženih interferirajućoj ispitivanoj kemikaliji i inkubiranih otopinom MTT-a, umanjeno za postotak nespecifične boje dobiven sa živim tkivima izloženima interferirajućoj ispitivanoj kemikaliji i inkubiranim medijem bez MTT-a, što se provodi istodobno kad i ispitivanje koje se ispravlja (%NSC_{living}).
28. Za ispitivane kemikalije za koje se utvrdi da uzrokuju i izravnu redukciju MTT-a (vidjeti stavak 26.) i interferenciju s bojom (vidjeti stavak 27.) pri mjerenju standardne apsorbancije (OD) bit će potreban i treći skup kontrola, uz kontrole NSMTT i NSC_{living} opisane u prethodnim stavcima. To je obično slučaj kod tamno obojenih ispitivanih kemikalija koje ometaju MTT test (npr. plave, ljubičaste ili crne kemikalije) jer njihova intrinzična boja sprečava procjenu njihove

sposobnosti da izravno reduciraju MTT, kako je opisano u stavku 26. Te se ispitivane kemikalije mogu vezati i na živa i na mrtva tkiva te se stoga kontrolom NSMTT može ispraviti ne samo potencijalna izravna redukcija MTT-a ispitivanom kemikalijom, već i interferencija s bojom koja je posljedica vezanja ispitivane kemikalije na mrtva tkiva. To bi moglo dovesti do dvostrukog ispravka za interferenciju s bojom jer se kontrolom NSC_{living} već ispravlja interferencija s bojom koja je posljedica vezanja ispitivane kemikalije na živa tkiva. Kako bi se izbjegao mogući dvostruki ispravak za interferenciju s bojom, treba provesti treću kontrolu za nespecifičnu boju u mrtvim tkivima (NSC_{killed}). U toj dodatnoj kontroli ispitivana kemikalija primjenjuje se na najmanje dva ponovljena uzorka mrtvog tkiva po vremenu izlaganja, koja se podvrgavaju cijelom postupku ispitivanja, ali se u koraku inkubacije MTT-a inkubiraju medijem, a ne otopinom MTT-a. Dovoljna je jedna kontrola NSC_{killed} po ispitivanoj kemikaliji neovisno o broju provedenih neovisnih ispitivanja/ciklusa, ali treba je provoditi istodobno s kontrolom NSMTT i, ako je moguće, s istom šaržom tkiva. Prava vijabilnost tkiva zatim se računa kao postotak vijabilnosti tkiva koji se dobiva iz živih tkiva izloženih ispitivanoj kemikaliji umanjeno za %NSMTT i %NSC_{living} te uvećano za postotak nespecifične boje dobiven s mrtvim tkivima izloženima interferirajućoj ispitivanoj kemikaliji i inkubiranim medijem bez MTT-a, izračunano u odnosu na negativnu kontrolu koja se provodi istodobno kad i ispitivanje koje se ispravlja (%NSC_{killed}).

29. Važno je napomenuti da nespecifična redukcija MTT-a i nespecifične interferencije s bojom mogu povećati očitavanja ekstrakta tkiva izvan raspona linearnosti spektrofotometra. Na temelju toga svaki bi laboratorij prije početka ispitivanja ispitivanih kemikalija u regulatorne svrhe trebao utvrditi raspon linearnosti svojeg spektrofotometra s MTT formazanom (CAS # 57360-69-7) iz komercijalnog izvora. Točnije, mjerenje standardne apsorbancije (OD) upotrebom spektrofotometra primjereno je za procjenu tvari koje izravno reduciraju MTT i ispitivanih kemikalija koje interferiraju s bojom ako je optička gustoća ekstrakata tkiva dobivena ispitivanom kemikalijom bez ikakvih ispravaka za izravnu redukciju MTT-a i/ili interferenciju s bojom unutar linearnog raspona spektrofotometra ili ako je neispravljenim postotkom vijabilnosti dobivenim ispitivanom kemikalijom ona već utvrđena kao nagrizajuća (vidjeti stavke 35. i 36.). Ipak, rezultate za ispitivane kemikalije koji daju %NSMTT i/ili %NSC_{living} > 50 % negativne kontrole trebalo bi oprezno tumačiti.
30. Kod obojenih ispitivanih kemikalija koje nisu kompatibilne s mjerenjem standardne apsorbancije (OD) zbog prejake interferencije s MTT testom, za mjerenje MTT formazana može se upotrijebiti alternativni postupak HPLC/UPLC spektrofotometrije (vidjeti stavak 31.) (37.). Sustav HPLC/UPLC spektrofotometrije omogućuje izdvajanje MTT formazana iz ispitivane kemikalije prije njegove kvantifikacije (38.). Zato pri upotrebi HPLC/UPLC spektrofotometrije nikad nisu potrebne kontrole NSC_{living} ili NSC_{killed}, neovisno o kemikaliji koja se ispituje. Kontrole NSMTT ipak bi se trebale upotrijebiti ako se sumnja u to da ispitivana kemikalija izravno reducira MTT ili ima boju koja sprečava procjenu sposobnosti izravne redukcije MTT-a (kako je opisano u stavku 26.). Ako se za mjerenje MTT formazana upotrebljava HPLC/UPLC spektrofotometrija, postotak vijabilnosti tkiva računa se kao postotak

površine pika MTT formazana dobiven sa živim tkivima izloženima ispitivanoj kemikaliji u odnosu na pik MTT formazana dobiven s istodobnom negativnom kontrolom. Za ispitivane kemikalije koje mogu izravno reducirati MTT prava vijabilnost tkiva računa se kao postotak vijabilnosti tkiva dobiven sa živim tkivima izloženima ispitivanoj kemikaliji umanjen za %NSMTT. Naposljetku, treba napomenuti da se ne mogu procijeniti tvari koje izravno reduciraju MTT i koje ujedno mogu i interferirati s bojom, koje se zadržavaju u tkivima nakon tretiranja i reduciraju MTT toliko jako da dovode do optičke gustoće (upotrebom standardnog mjerenja optičke gustoće) ili površina pika (upotrebom UPLC/HPLC spektrofotometrije) ispitivanih ekstrakata tkiva koji su izvan raspona linearnosti spektrofotometra, iako do toga dolazi samo u iznimno rijetkim slučajevima.

31. HPLC/UPLC spektrofotometrija može se upotrebljavati i sa svim vrstama ispitivanih kemikalija (obojenima, neobojenima, koje reduciraju MTT i koje ga ne reduciraju) za mjerenje MTT formazana (38.). Zbog raznolikosti sustava HPLC/UPLC spektrofotometrije, kvalifikaciju sustava HPLC/UPLC spektrofotometrije trebalo bi dokazati prije njegove upotrebe za kvantificiranje MTT formazana iz ekstrakata tkiva tako da sustav ispuni kriterije prihvatljivosti za skup standardnih parametara kvalifikacije u skladu s parametrima opisanim u smjernicama američke Uprave za hranu i lijekove o validaciji bioanalitičkih metoda namijenjenih industriji (38. i 39.). Ti ključni parametri i njihovi kriteriji prihvatljivosti prikazani su u Dodatku 4. Kad se ispune kriteriji prihvatljivosti definirani u Dodatku 4., smatra se da je sustav HPLC/UPLC spektrofotometrije kvalificiran i spreman za mjerenje MTT formazana u pokusnim uvjetima opisanim u ovoj ispitnoj metodi.

Kriteriji prihvatljivosti

32. Za svaku ispitnu metodu u kojoj se upotrebljavaju valjani modeli RhE, tkiva tretirana negativnom kontrolom trebala bi pokazivati optičku gustoću koja odražava kvalitetu tkiva, kako je opisano u tablici 2., i ne bi trebala biti ispod prethodno utvrđenih granica. Tkiva tretirana pozitivnom kontrolom, tj. ledenom octenom kiselinom ili 8N KOH, trebala bi odražavati sposobnost tkiva da odgovore na nagrizajuću kemikaliju u uvjetima ispitnog modela (vidjeti Dodatak 2.). Varijabilnost između ponovljenih uzoraka tkiva ispitivane kemikalije i/ili kontrolnih kemikalija trebala bi biti unutar prihvaćenih ograničenja za svaki zahtjev valjanog modela RhE (vidjeti Dodatak 2.) (npr. razlika u vijabilnosti između sva ponovljena uzorka tkiva ne bi trebala biti veća od 30 %). Ako negativna ili pozitivna kontrola uključena u ciklus bude izvan prihvaćenih raspona, smatra se da ciklus ne ispunjava zahtjeve i treba ga ponoviti. Ako je varijabilnost ispitivanih kemikalija izvan definiranih raspona, trebalo bi ponoviti ispitivanje.

Tumačenje rezultata i model predviđanja

33. Vrijednosti optičke gustoće za svaku ispitivanu kemikaliju trebalo bi koristiti za izračun postotka vijabilnosti u odnosu na negativnu kontrolu, koja je određena kao 100 %. U slučaju upotrebe HPLC/UPLC spektrofotometrije postotak vijabilnosti tkiva računa se kao postotak površine pika MTT formazana dobiven sa živim tkivima izloženima ispitivanoj kemikaliji u odnosu na pik MTT formazana dobiven s istodobnom negativnom kontrolom. Granične

vrijednosti vijabilnosti stanica, izražene postotkom, koje služe za razlikovanje nagrizajućih od nenagrizajućih ispitivanih kemikalija (ili za razlikovanje različitih potkategorija nagrizajućeg djelovanja) navedene su u nastavku u stavcima 35. i 36. za svaki ispitni model obuhvaćen ovom ispitnom metodom i trebale bi se upotrebljavati za tumačenje rezultata.

34. Jedan ciklus ispitivanja koji obuhvaća najmanje dva ponovljena uzorka tkiva trebao bi biti dovoljan za ispitivanu kemikaliju ako je dobiveno razvrstavanje nedvosmisleno. Međutim, u slučajevima graničnih rezultata, kao što su neusklađena ponovljena mjerenja, može se razmotriti drugi ciklus, a i treći ciklus u slučaju neusklađenih rezultata između prva dva ciklusa.
35. Model predviđanja za ispitni model EpiSkin™ za ispitivanje nagrizanja kože (9., 34. i 22.), povezan sa sustavom razvrstavanja UN GHS-om ili CLP-om, prikazan je u tablici 4.

Tablica 4.: Model predviđanja za EpiSkin™

Vijabilnost mjerena u točkama vremena izlaganja (t = 3, 60 i 240 minuta)	Predviđanje koje treba razmotriti
< 35 % nakon 3 min. izlaganja	Nagrizajuće: • Neobavezna potkategorija 1.A*
≥ 35 % nakon 3 min. izlaganja I < 35 % nakon 60 min. izlaganja II ≥ 35 % nakon 60 min. izlaganja I < 35 % nakon 240 minuta izlaganja	Nagrizajuće: • Kombinacija neobaveznih potkategorija 1.B i 1.C
≥ 35 % nakon 240 min. izlaganja	Nije nagrizajuće

*) Prema podacima koji su generirani kako bi se procijenila korisnost ispitnih modela RhE za potporu daljnjem razvrstavanju, pokazalo se da približno 22 % rezultata u potkategoriji 1.A dobivenih ispitnim modelom EpiSkin™ možda zapravo čine tvari/smjese iz potkategorije 1.B ili 1.C (prestrogo razvrstavanje) (vidjeti Dodatak 3.).

36. Modeli predviđanja za ispitne modele EpiDerm™ SCT (10., 23. i 35.), SkinEthic™ RHE (17., 18., 23. i 36.) i epiCS® (16., 23. i 37.) za ispitivanje nagrizanja kože povezani sa sustavom razvrstavanja UN GHS-om ili CLP-om prikazani su u tablici 5.:

Tablica 5.: EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE i epiCS®

Vijabilnost mjerena u točkama vremena izlaganja (t = 3 i 60 minuta)	Predviđanje koje treba razmotriti
KORAK 1 za EpiDerm™ SCT, za SkinEthic™ RHE i epiCS®	
< 50 % nakon 3 min. izlaganja	Nagrizajuće
≥ 50 % nakon 3 min. izlaganja I < 15 % nakon 60 min. izlaganja	Nagrizajuće
≥ 50 % nakon 3 min. izlaganja I ≥ 15 % nakon 60 min. izlaganja	Nije nagrizajuće

KORAK 2 za EpiDerm™ SCT – za tvari/smjese identificirane kao nagrizajuće u koraku 1	
< 25 % nakon 3 min. izlaganja	Neobavezna potkategorija 1.A*
≥ 25 % nakon 3 min. izlaganja	Kombinacija neobaveznih potkategorija 1.B i 1.C
KORAK 2 za SkinEthic™ RHE – za tvari/smjese identificirane kao nagrizajuće u koraku 1	
< 18 % nakon 3 min. izlaganja	Neobavezna potkategorija 1.A*
≥ 18 % nakon 3 min. izlaganja	Kombinacija neobaveznih potkategorija 1.B i 1.C
KORAK 2 za epiCS® – za tvari/smjese identificirane kao nagrizajuće u koraku 1	
< 15 % nakon 3 min. izlaganja	Neobavezna potkategorija 1.A*
≥ 15 % nakon 3 min. izlaganja	Kombinacija neobaveznih potkategorija 1.B i 1.C

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Podaci

37. Podatke pojedinačnih ponavljanja uzoraka tkiva u svakom ispitivanju (npr. vrijednosti OD i izračunani postotak vijabilnosti stanica za svaku ispitanu kemikaliju, zajedno s razvrstavanjem) treba prikazati u tabličnom obliku, uključujući eventualne podatke iz ponovljenih pokusa. Osim toga, treba navesti srednje vrijednosti i raspone vijabilnosti te koeficijente varijacije između ponovljenih uzoraka tkiva za svako ispitivanje. Za svaku ispitanu kemikaliju treba navesti zapažene interakcije tvari koje reduciraju MTT ili obojenih ispitivanih kemikalija s MTT reagensom.

Izvešće o ispitivanju

38. Izvešće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Ispitivana kemikalija i kontrolne kemikalije:

- tvar s jednim sastojkom: kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv, CAS broj, SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula, čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.,
- tvar s više sastojaka, UVCB tvar i smjesa: opis (koliko je to moguće) kemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativnog udjela i relevantnih fizikalno-kemijskih svojstava sastojaka,
- fizički izgled, topljivost u vodi i bilo koja druga relevantna fizikalno-kemijska svojstva,
- izvor, broj serije, ako su dostupni,
- tretiranje ispitivane kemikalije/kontrolne tvari prije ispitivanja, ako je primjenljivo (npr. grijanje, mljevenje),

- stabilnost ispitivane kemikalije, rok uporabe ili datum za ponovnu analizu ako je poznat,
- uvjeti skladištenja.

Model RhE i protokol koji se upotrebljavaju te obrazloženje odabira (ako je primjenjivo)

Ispitni uvjeti:

- model RhE koji se upotrebljava (uključujući broj šarže),
- informacije o kalibraciji mjernog uređaja (npr. spektrofotometar), valna duljina i pojas propuštanja (ako je primjenjivo) koji se upotrebljavaju za kvantifikaciju MTT formazana te raspon linearnosti mjernog uređaja,
- opis metode koja se upotrebljava za kvantifikaciju MTT formazana,
- opis kvalifikacije sustava HPLC/UPLC spektrofotometrije, ako je primjenjivo,
- potpune popratne informacije o konkretnom upotrijebljenom modelu RhE, uključujući njegove radne značajke. To bi, među ostalim, trebalo uključivati:
 - i) vijabilnost;
 - ii) funkciju barijere;
 - iii) morfologiju;
 - iv) obnovljivost i prediktivnu sposobnost;
 - v) kontrole kvalitete modela,
- upućivanje na prijašnje podatke za predmetni model. To bi, među ostalim, trebalo uključivati:
- prihvatljivost podataka o kontroli kvalitete s upućivanjem na prijašnje podatke o šarži,
- dokazivanje osposobljenosti za izvođenje ispitne metode prije rutinske upotrebe ispitivanjem tvari koje služe za dokazivanje osposobljenosti.

Ispitni postupak:

- pojedinosti o upotrijebljenom ispitnom postupku (uključujući postupke ispiranja upotrijebljene nakon razdoblja izlaganja),
- doze upotrijebljenih ispitivanih kemikalija i kontrolnih kemikalija,
- trajanje razdoblja izlaganja i temperature izlaganja,
- oznake kontrola koje se koriste za tvari koje izravno reduciraju MTT i/ili ispitivane kemikalije za bojenje, ako je primjenjivo,
- broj ponavljanja uzoraka tkiva upotrijebljenih po ispitivanoj kemikaliji i kontrolama (pozitivna kontrola, negativna kontrola te NSMTT, NSCliving i NSCKilled, ako je primjenjivo) po vremenu izlaganja,

- opis primijenjenih kriterija za odlučivanje/modela predviđanja na temelju upotrijebljenog RhE modela,
- opis mogućih izmjena ispitne metode (uključujući postupke ispiranja).

Kriteriji prihvatljivosti ciklusa i ispitivanja:

- srednje vrijednosti i rasponi prihvatljivosti pozitivnih i negativnih kontrola na temelju prijašnjih podataka,
- prihvatljiva varijabilnost između ponovljenih uzoraka tkiva za pozitivne i negativne kontrole,
- prihvatljiva varijabilnost između ponovljenih uzoraka tkiva za ispitivanu kemikaliju.

Rezultati:

- tablični prikaz podataka za pojedinačne ispitivane kemikalije i kontrole, za svako razdoblje izlaganja, svaki ciklus i svako ponovljeno mjerenje, uključujući optičku gustoću ili površinu pika MTT formazana, postotak vijabilnosti tkiva, srednji postotak vijabilnosti tkiva, razlike između ponovljenih uzoraka, standardne devijacije i/ili koeficijente varijacije, ako je primjenjivo,
- ako je primjenjivo, rezultati kontrola upotrijebljenih za tvari koje izravno reduciraju MTT i/ili ispitivane kemikalije za bojenje, uključujući optičku gustoću ili površinu pika MTT formazana, %NSMTT, %NSCliving, %NSCKilled, razlike između ponovljenih uzoraka tkiva, standardne devijacije i/ili koeficijente varijacije (ako je primjenjivo) te konačni točni postotak vijabilnosti tkiva,
- rezultati dobiveni s ispitivanom kemikalijom/kemikalijama i kontrolnim kemikalijama u odnosu na utvrđene kriterije prihvatljivosti za ciklus i ispitivanje,
- opis drugih uočenih učinaka,
- utvrđeno razvrstavanje, s upućivanjem na primijenjeni model predviđanja/kriterije odlučivanja.

Rasprava o rezultatima

Zaključci

LITERATURA

1. UN (2013). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth Revised Edition, UN New York i Ženeva. Dostupno na: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.
2. Poglavlje B.4. ovog Priloga, Akutno nadraživanje/nagrizanje kože.
3. Poglavlje B.40. ovog Priloga, Nagrizanje kože *in vitro*.
4. Poglavlje B.65. ovog Priloga, *In vitro* ispitna metoda s membranskom barijerom.
5. Poglavlje B.46. ovog Priloga, Nadraživanje kože *in vitro*: ispitna metoda na modelu rekonstruirane ljudske epiderme.
6. OECD (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
7. Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile D.J., Gardner J.R., Gordon V.C., Hildebrand B., Lewis R.W., Liebsch M., Logemann P., Osborne R., Ponc M., Regnier J.F., Steiling W., Walker A.P., and Balls M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The report and Recommendations of ECVAM Workshop 6. *ATLA* 23:219.–255.
8. Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., and Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and Distribution of the Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 12:471.–482.
9. Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Holzhutter H.-G., and Liebsch M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxicol. in Vitro* 12:483.–524.
10. Liebsch M., Traue D., Barrabas C., Spielmann H., Uphill P., Wilkins S., Wiemann C., Kaufmann T., Remmele M. and 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. et Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops, *ATLA* 23:129.–147.

12. ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, SAD.
13. ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (2002). ICCVAM evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication No 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, SAD.
14. EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the EpiSkin™ Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), izdao ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3. travnja 1998.
15. EC-ECVAM (2000). Statement on the Application of the EpiDerm™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, izdao ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC14), 21. ožujka 2000.
16. Hoffmann J., Heisler E., Karpinski S., Losse J., Thomas D., Siefken W., Ahr H.J., Vohr H.W. and 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., and 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. and Fraissinette A.B. (2010). Adaptation of the Validated SkinEthic™ Reconstructed Human Epidermis (RHE) Skin Corrosion Test Method to 0.5 cm² Tissue Sample. *Toxicol. In Vitro* 24: 1379.–1385.
19. EC-ECVAM (2006). Statement on the Application of the SkinEthic™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, izdao ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC25), 17 studenoga 2006.
20. EC-ECVAM (2009). ESAC Statement on the Scientific Validity of an *In-Vitro* Test Method for Skin Corrosivity Testing: the EST-1000, izdao ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30), 12. lipnja 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). Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

22. Alépée N., Grandidier M.H., and 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., and Fuchs, H. (2015). Two Novel Prediction Models Improve Predictions of Skin Corrosive Sub-categories by Test Methods of OECD Test Guideline No 431. *Toxicol. In Vitro* 29:2055.–2080.
24. OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Epidermis (RHE) Test Methods For Skin Corrosion in Relation to OECD TG 431. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 219). Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
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), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
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*. U: *In Vitro Skin Toxicology*. Rougier A., Goldberg A.M and Maibach H.I. (Eds): 133.–140.
29. Cannon C. L., Neal P.J., Southee J.A., Kubilus J. and 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 and Mommaas M. (2000). Lipid and Ultrastructural Characterization of Reconstructed Skin Models. *Inter. J. Pharmaceu.* 203:211.–225.
31. Tinois E., Tillier, J., Gaucherand, M., Dumas, H., Tardy, M. and Thivolet J. (1991). *In Vitro* and Post - Transplantation Differentiation of Human Keratinocytes Grown on the Human Type IV Collagen Film of a Bilayered Dermal Substitute. *Exp. Cell Res.* 193:310.–319.
32. Parenteau N.L., Bilbo P, Nolte CJ, Mason VS and Rosenberg M. (1992). The Organotypic Culture of Human Skin Keratinocytes and Fibroblasts to Achieve Form and Function. *Cytotech.* 9:163.–171.

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

Dodatak 1.

DEFINICIJE

Točnost: stupanj podudarnosti između rezultata ispitne metode i prihvaćenih referentnih vrijednosti. Ona je mjerilo učinkovitosti ispitne metode i jedan od aspekata relevantnosti. Pojam je često međusobno zamjenjiv s pojmom „podudarnost” u smislu udjela točnih ishoda ispitne metode (25.).

Vijabilnost stanica: parametar za mjerenje ukupne aktivnosti populacije stanica, npr. sposobnost staničnih mitohondrijskih dehidrogenaza da reduciraju vitalnu boju MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid, tiazolil plavo), koji, ovisno o krajnjoj točki koja se mjeri i planu ispitivanja, korelira s ukupnim brojem i/ili vitalnošću živih stanica.

Kemikalija: tvar ili smjesa.

Podudarnost: mjerilo učinkovitosti ispitne metode za ispitne metode koje daju kategorijski rezultat i jedan je od aspekata relevantnosti. Pojam je ponekad međusobno zamjenjiv s pojmom točnosti i definira se kao udio svih ispitanih kemikalija koje su pravilno razvrstane kao pozitivne ili negativne. Podudarnost u velikoj mjeri ovisi o prisutnosti pozitivnih rezultata u vrstama ispitivane kemikalije (25.).

ET₅₀: može se procijeniti utvrđivanjem vremena izlaganja potrebnog za smanjenje vijabilnosti stanica za 50 % nakon primjene referentne kemikalije u određenoj, fiksnoj koncentraciji; vidjeti i IC₅₀.

GHS (Globalno usklađeni sustav razvrstavanja i označivanja kemikalija): sustav za razvrstavanje kemikalija (tvari i smjesa) prema standardiziranim vrstama i stupnjevima fizičkih opasnosti te opasnosti za zdravlje i okoliš, kojim su obuhvaćena odgovarajuća komunikacijska sredstva kao što su piktoگرامi, oznake opasnosti, oznake upozorenja, oznake obavijesti i sigurnosno-tehnički listovi, kojima se prenose informacije o njihovim štetnim učincima u cilju zaštite ljudi (uključujući poslodavce, radnike, prijevoznike, potrošače i interventno osoblje) i okoliša (1.).

HPLC: tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti.

IATA: integrirani pristup ispitivanju i procjeni.

IC₅₀: može se procijeniti utvrđivanjem koncentracije pri kojoj referentna kemikalija smanjuje vijabilnost tkiva za 50 % (IC₅₀) nakon fiksnog vremena izlaganja; vidjeti i ET₅₀.

Beskonačna doza: količina ispitivane kemikalije primijenjena na epidermu koja je veća od količine potrebne da bi se potpuno i ravnomjerno pokrila površina epiderme. **Smjesa:** smjesa ili otopina koja se sastoji od dviju ili više tvari koje u njoj ne reagiraju.

Tvar s jednim sastojkom: tvar, definirana količinskim sastavom, u kojoj je jedan glavni sastojak prisutan u koncentraciji od najmanje 80 % (w/w).

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid; tiazolil plavo tetrazolijev bromid.

Tvar s više sastojaka: tvar, definirana količinskim sastavom, u kojoj je više od jednog glavnog sastojka prisutno u koncentraciji većoj od 10 % (w/w) te manjoj od 80 % (w/w). Tvar s više sastojaka rezultat je procesa proizvodnje. Smjesa i tvar s više sastojaka razlikuju se po tome što se smjesa dobiva miješanjem dviju ili više tvari bez kemijske reakcije. Tvar s više sastojaka rezultat je kemijske reakcije.

NC: nije nagrizajuće.

Kontrola NSC_{killed}: kontrola nespecifične boje u mrtvim tkivima.

Kontrola NSC_{living}: kontrola nespecifične boje u živim tkivima.

NSMTT: nespecifična redukcija MTT-a.

OD: optička gustoća.

PC: pozitivna kontrola; ponovljeni uzorak koji sadržava sve komponente ispitnog sustava i tretiran je kemikalijom za koju je poznato da inducira pozitivan odgovor. Kako bi se osigurala mogućnost procjene varijabilnosti odgovora pozitivne kontrole tijekom vremena, pozitivan odgovor ne bi smio biti presnažan.

Zahtjevi izvedbe (PS): zahtjevi koji se temelje na validiranoj ispitnoj metodi i pružaju temelj za ocjenjivanje usporedivosti predložene, funkcionalno i mehanicistički slične, ispitne metode. Uključuju: i. ključne elemente ispitne metode; ii. minimalni popis referentnih kemikalija odabranih među kemikalijama koje se upotrebljavaju za dokazivanje prihvatljive učinkovitosti validirane ispitne metode; te iii. slične razine pouzdanosti i točnosti, utemeljene na rezultatima dobivenim za validiranu ispitnu metodu, koje se prilikom ocjenjivanja trebaju dokazati predloženom ispitnom metodom koristeći minimalni popis referentnih kemikalija (25.).

Relevantnost: opis odnosa između ispitne metode i istraživnog učinka te je li ispitivanje prikladno i korisno za određenu svrhu. Pokazuje u kojoj se mjeri ispitnom metodom točno mjeri ili predviđa istraživani biološki učinak. Relevantnost uključuje razmatranje o točnosti (podudarnosti) ispitne metode (25.).

Pouzdanost: pokazuje u kojoj se mjeri ispitna metoda može obnovljivo primijeniti unutar jednog laboratorija i između više laboratorija tijekom vremena uz primjenu istog protokola. Ocjenjuje se izračunavanjem obnovljivosti unutar jednog laboratorija i između više laboratorija (25.).

Ciklus: ciklus se sastoji od jedne ispitivane kemikalije ili više njih, koje se ispituju istodobno s negativnom i pozitivnom kontrolom.

Osjetljivost: udio svih pozitivnih/aktivnih kemikalija koje su pravilno razvrstane primjenom ispitne metode. To je mjera točnosti ispitne metode koja daje kategorijske rezultate i važan je čimbenik za ocjenu relevantnosti ispitne metode (25.).

Nagrizanje kože *in vivo*: uzrokovanje ireverzibilnog oštećenja kože, točnije, vidljive nekroze koja kroz epidermu prodire u dermu nakon što je ispitivana kemikalija primjenjivana u trajanju do najviše četiri sata. Za nagrizanje kože tipična je pojava čireva, krvarenja, krvavih krasta te, do kraja opažanja od 14 dana, gubitak boje kože zbog nestajanja pigmenta, cijele površine zahvaćene alopecijom (gubitak dlake) i ožiljci. Za ocjenjivanje sumnjivih lezija treba razmotriti mogućnost histopatoloških pretraga.

Specifičnost: udio svih negativnih/neaktivnih kemikalija koje su pravilno razvrstane primjenom ispitne metode. To je mjera točnosti ispitne metode koja daje kategorijske rezultate i važan je čimbenik za ocjenu relevantnosti ispitne metode (25.).

Tvar: kemijski element i njegovi spojevi u prirodnome stanju ili dobiveni proizvodnim postupkom, što uključuje i aditive koji su nužni za održavanje stabilnosti proizvoda te nečistoće koje proizlaze iz primijenjenoga postupka, ali isključuje otapala koja se mogu izdvojiti bez utjecaja na stabilnost tvari ili promjene njezina sastava. **Ispitivana kemikalija:** svaka tvar ili smjesa koja se ispituje ovom ispitnom metodom.

UPLC: tekućinska kromatografija iznimno visoke djelotvornosti.

UVCB: tvari nepoznatog ili promjenjivog sastava, složeni reakcijski proizvodi i biološki materijali.

Dodatak 2.

GLAVNI ELEMENTI ISPITNIH MODELA RHE KOJI SU VALIDIRANI ZA ISPITIVANJE NAGRIZANJA KOŽE

Elementi ispitnog modela	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Površina modela	0,38 cm ²	0,63 cm ²	0,5 cm ²	0,6 cm ²
Broj ponavljanja uzoraka tkiva	Najmanje dva po vremenu izlaganja	2–3 po vremenu izlaganja	Najmanje dva po vremenu izlaganja	Najmanje dva po vremenu izlaganja

Elementi ispitnog modela	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Doze tretiranja za i primjena	<u>Tekućine i viskozne kemikalije</u>: 50 µl ± 3 µl (131,6 µl/cm²) <u>Krute tvari</u>: 20 ± 2 mg (52,6 mg/cm²) + 100 µl ± 5 µl otopine NaCl (9 g/l) <u>Voskovi/ljepljive tvari</u>: 50 ± 2 mg (131,6 mg/cm²) s najlonskom mrežom	<u>Tekućine</u>: 50 µl (79,4 µl/cm²) s najlonskom mrežom ili bez nje <i>Kompatibilnost ispitivane kemikalije s najlonskom mrežom prije ispitivanja</i> <u>Polukrute tvari</u>: 50 µl (79,4 µl/cm²) <u>Krute tvari</u>: 25 µl H₂O (ili po potrebi više) + 25 mg (39,7 mg/cm²) <u>Voskovi</u>: ravni komad nalik disku promjera otprilike 8 mm koji se stavlja na tkivo navlaženo s 15 µl H₂O.	<u>Tekućine i viskozne kemikalije</u>: 40 µl ± 3 µl (80 µl/cm²) s najlonskom mrežom <i>Kompatibilnost ispitivane kemikalije s najlonskom mrežom prije ispitivanja</i> <u>Krute tvari</u>: 20 µl ± 2 µl H₂O + 20 ± 3 mg (40 mg/cm²) <u>Voskovi/ljepljive tvari</u>: 20 ± 3 mg (40 mg/cm²) s najlonskom mrežom	<u>Tekućine</u>: 50 µl (83,3 µl/cm²) s najlonskom mrežom <i>Kompatibilnost ispitivane kemikalije s najlonskom mrežom prije ispitivanja</i> <u>Polukrute tvari</u>: 50 µl (83,3 µl/cm²) <u>Krute tvari</u>: 25 mg (41,7 mg/cm²) + 25 µl H₂O (ili po potrebi više) <u>Voskovi</u>: ravni komad nalik kolačiću promjera otprilike 8 mm koji se stavlja na tkivo navlaženo s 15 µl H₂O
Prethodna provjera izravne redukcije MTT-a	50 µl (tekućine) ili 20 mg (krute tvari) + 2 ml MTT 0,3 mg/ml otopine za 180 ± 5 min na 37 °C, 5 % CO₂, relativna vlažnost od 95 % → ako otopina postane plava/ljubičasta, treba provesti prilagođene kontrole usmrćivanjem vodom	50 µl (tekućine) ili 25 mg (krute tvari) + 1 ml MTT 1 mg/ml otopine za 60 min na 37 °C, 5 % CO₂, relativna vlažnost od 95 % → ako otopina postane plava/ljubičasta, treba provesti prilagođene kontrole usmrćivanjem zamrzavanjem	40 µl (tekućine) ili 20 mg (krute tvari) + 1 ml MTT 1 mg/ml otopine za 180 ± 15 min na 37 °C, 5 % CO₂, relativna vlažnost od 95 % → ako otopina postane plava/ljubičasta, treba provesti prilagođene kontrole usmrćivanjem zamrzavanjem	50 µl (tekućine) ili 25 mg (krute tvari) + 1 ml MTT 1 mg/ml otopine za 60 min na 37 °C, 5 % CO₂, relativna vlažnost od 95 % → ako otopina postane plava/ljubičasta, treba provesti prilagođene kontrole usmrćivanjem zamrzavanjem

Elementi ispitnog modela	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Prethodna provjera za interferenciju s bojom	10 µl (tekućine) ili 10 mg (krute tvari) + 90 µl H ₂ O miješano 15 min na sobnoj temperaturi → ako otopina postane obojena, trebalo bi provesti prilagođene kontrole na živom tkivu	50 µl (tekućine) ili 25 mg (krute tvari) + 300 µl H ₂ O za 60 min na 37 °C, 5 % CO ₂ , relativna vlažnost od 95 % → ako otopina postane obojena, trebalo bi provesti prilagođene kontrole na živom tkivu	40 µl (tekućine) ili 20 mg (krute tvari) + 300 µl H ₂ O miješano 60 min na sobnoj temperaturi → ako je ispitivana kemikalija obojena, trebalo bi provesti prilagođene kontrole na živom tkivu	50 µl (tekućine) ili 25 mg (krute tvari) + 300 µl H ₂ O za 60 min na 37 °C, 5 % CO ₂ , relativna vlažnost od 95 % → ako otopina postane obojena, trebalo bi provesti prilagođene kontrole na živom tkivu
Vrijeme i temperatura izloženosti	3 min, 60 min (± 5 min) i 240 min (± 10 min) U ventiliranim ormarima Sobna temperatura (18–28 °C)	3 min na sobnoj temperaturi i 60 min na 37 °C, 5 % CO ₂ , relativna vlažnost od 95 %	3 min na sobnoj temperaturi i 60 min na 37 °C, 5 % CO ₂ , relativna vlažnost od 95 %	3 min na sobnoj temperaturi i 60 min na 37 °C, 5 % CO ₂ , relativna vlažnost od 95 %
Ispiranje	25 ml 1 x PBS (2 ml/odbacivanje)	20 puta uz stalan lagani tok 1 x PBS-a	20 puta uz stalan lagani tok 1 x PBS-a	20 puta uz stalan lagani tok 1 x PBS-a
Negativna kontrola	50 µl otopine NaCl (9 g/l) Ispituje se sa svakim vremenom izlaganja	50 µl H ₂ O Ispituje se sa svakim vremenom izlaganja	40 µl H ₂ O Ispituje se sa svakim vremenom izlaganja	50 µl H ₂ O Ispituje se sa svakim vremenom izlaganja
Pozitivna kontrola	50 µl ledene octene kiseline Ispituje se samo četiri sata	50 µl 8N KOH Ispituje se sa svakim vremenom izlaganja	40 µl 8N KOH Ispituje se samo 1 sat	50 µl 8N KOH Ispituje se sa svakim vremenom izlaganja

Elementi ispitnog modela	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Otopina MTT-a	2 ml 0,3 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
Vrijeme i temperatura inkubacije MTT-a	180 min (± 15 min) na 37 °C, 5 % CO ₂ , relativna vlažnost od 95 %	180 min na 37 °C, 5 % CO ₂ , relativna vlažnost od 95 %	180 min (±15 min) na 37 °C, 5 % CO ₂ , relativna vlažnost od 95 %	180 min na 37 °C, 5 % CO ₂ , relativna vlažnost od 95 %
Ekstrakcijsko otapalo	500 µl zakiseljenog izopropanola (0,04 N HCl u izopropanolu) (potpuno uronjeno izolirano tkivo)	2 ml izopropanola (ekstrakcija s vrha i dna umetka)	1,5 ml izopropanola (ekstrakcija s vrha i dna umetka)	2 ml izopropanola (ekstrakcija s vrha i dna umetka)
Vrijeme i temperatura ekstrakcije	Preko noći na sobnoj temperaturi, zaštićeno od svjetla	Preko noći bez protresanja na sobnoj temperaturi ili 120 min uz protresanje (~ 120 rpm) na sobnoj temperaturi	Preko noći bez protresanja na sobnoj temperaturi ili 120 min uz protresanje (~ 120 rpm) na sobnoj temperaturi	Preko noći bez protresanja na sobnoj temperaturi ili 120 min uz protresanje (~ 120 rpm) na sobnoj temperaturi
Očitavanje optičke gustoće	570 nm (545–595 nm) bez referentnog filtra	570 nm (ili 540 nm) bez referentnog filtra	570 nm (540–600 nm) bez referentnog filtra	540–570 nm bez referentnog filtra
Kontrola kvalitete tkiva	18-satno tretiranje SDS-om 1,0 mg/ml ≤ IC ₅₀ ≤ 3,0 mg/ml	Tretiranje s 1 % Triton X-100 4,08 sati ≤ ET ₅₀ ≤ 8,7 sati	Tretiranje s 1 % Triton X-100 4,0 sati ≤ ET ₅₀ ≤ 10,0 sati	Tretiranje s 1 % Triton X-100 2,0 sati ≤ ET ₅₀ ≤ 7,0 sati

Elementi ispitnog modela	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Kriteriji prihvatljivosti	1. Srednja optička gustoća ponovljenih uzoraka tkiva tretiranih negativnom kontrolom (NaCl) trebala bi biti $\geq 0,6$ i $\leq 1,5$ za svako vrijeme izlaganja. 2. Srednja vijabilnost ponovljenih uzoraka tkiva izloženih pozitivnoj kontroli (ledena octena kiselina) na četiri sata, izražena kao postotak negativne kontrole, trebala bi biti ≤ 20 %. 3. U rasponu vijabilnosti 20–100 % i za optičku gustoću $\geq 0,3$, razlika u vijabilnosti između dva ponovljena uzorka tkiva ne bi trebala biti veća od 30 %.	1. Srednja optička gustoća ponovljenih uzoraka tkiva tretiranih negativnom kontrolom (H₂O) trebala bi biti $\geq 0,8$ i $\leq 2,8$ za svako vrijeme izlaganja. 2. Srednja vijabilnost ponovljenih uzoraka tkiva izloženih pozitivnoj kontroli (8N KOH) na 1 sat, izražena kao postotak negativne kontrole, trebala bi biti < 15 %. 3. U rasponu vijabilnosti 20–100 % koeficijent varijacije između ponovljenih uzoraka tkiva trebao bi biti ≤ 30 %.	1. Srednja optička gustoća ponovljenih uzoraka tkiva tretiranih negativnom kontrolom (H₂O) trebala bi biti $\geq 0,8$ i $\leq 3,0$ za svako vrijeme izlaganja. 2. Srednja vijabilnost ponovljenih uzoraka tkiva izloženih pozitivnoj kontroli (8N KOH) na jedan sat (i četiri sata ako je primjenjivo), izražena kao postotak negativne kontrole, trebala bi biti < 15 %. 3. U rasponu vijabilnosti 20–100 % i za optičku gustoću $\geq 0,3$, razlika u vijabilnosti između dva ponovljena uzorka tkiva ne bi trebala biti veća od 30 %.	1. Srednja optička gustoća ponovljenih uzoraka tkiva tretiranih negativnom kontrolom (H₂O) trebala bi biti $\geq 0,8$ i $\leq 2,8$ za svako vrijeme izlaganja. 2. Srednja vijabilnost ponovljenih uzoraka tkiva izloženih pozitivnoj kontroli (8N KOH) na 1 sat, izražena kao postotak negativne kontrole, trebala bi biti < 20 %. 3. U rasponu vijabilnosti 20–100 % i za optičku gustoću $\geq 0,3$, razlika u vijabilnosti između dva ponovljena uzorka tkiva ne bi trebala biti veća od 30 %.

Dodatak 3.

UČINKOVITOST ISPITNIH MODELA ZA DALJNJE RAZVRSTAVANJE

U tablici u nastavku navedena je učinkovitost četiriju ispitnih modela izračunana na temelju skupa od 80 kemikalija koje su ispitala četiri subjekta koja su razvila testove. Izračune je provelo tajništvo OECD-a, a pregledala ih je i potvrdila stručna podskupina (21. i 23.).

Ispitnim modelima EpiSkin™, EpiDerm™, SkinEthic™ i epiCS® mogu se odrediti daljnje potkategorije (tj. 1.A naspram 1.B i 1.C naspram NC).

Učinkovitost, stope prestrogog i preblagog razvrstavanja te točnost (prediktivna sposobnost) četiriju ispitnih modela na temelju skupa od 80 kemikalija koje su ispitane u dva ili tri ciklusa u svakom ispitnom modelu:

STATISTIČKI PODACI O PREDVIĐANJIMA DOBIVENI NA CIJELOM SKUPU KEMIKA LIJA				
(n = 80 kemikalija ispitivanih u dva neovisna ciklusa za epiCS® ili tri neovisna ciklusa za EpiDerm™ SCT, EpiSkin™ i SkinEthic™ RHE, tj. 159* odnosno 240 razvrstavanja)				
*jedna je kemikalija metodom epiCS® ispitana jednom zbog nedostupnosti (23.)				
	EpiSkin™	EpiDerm™	SkinEthic™	epiCS®
Prestroga razvrstavanja:				
1.B i 1.C prestrogo razvrstani kao 1.A	21,50 %	29,0 %	31,2 %	32,8 %
NC prestrogo razvrstan kao 1.B i 1.C	20,7 %	23,4 %	27,0 %	28,4 %
NC prestrogo razvrstan kao 1.A	0,00 %	2,7 %	0,0 %	0,00 %
Ispr. prestrogog razvrstavanja	20,7 %	26,1 %	27,0 %	28,4 %
Opća stopa prestrogog razvrstavanja (sve kategorije)	17,9 %	23,3 %	24,5 %	25,8 %
Preblaga razvrstavanja:				
1.A preblago razvrstan kao 1.B i 1.C	16,7 %	16,7 %	16,7 %	12,5 %
1.A preblago razvrstan kao NC	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
1.B i 1.C preblago razvrstani kao NC	2,2 %	0,00 %	7,5 %	6,6 %
Opća stopa preblagog razvrstavanja (sve kategorije)	3,3 %	2,5 %	5,4 %	4,4 %
Točna razvrstavanja:				
1.A točno razvrstan	83,3 %	83,3 %	83,3 %	87,5 %

1.B i 1.C točno razvrstani	76,3 %	71,0 %	61,3 %	60,7 %
NC točno razvrstan	79,3 %	73,9 %	73,0 %	71,62 %
Ukupna točnost	78,8 %	74,2 %	70 %	69,8 %

NC: nije nagrizajuće

Dodatak 4.

Ključni parametri i kriteriji prihvatljivosti za kvalifikaciju sustava HPLC/UPLC spektrofotometrije za mjerenje MTT formazana ekstrahiranog iz tkiva RhE

Parametar	Protokol izveden iz smjernica Uprave za hranu i lijekove (FDA) (37. i 38.)	Kriteriji prihvatljivosti
Selektivnost	Analiza izopropanola, slijepe probe na živom tkivu (ekstrakt izopropanola iz živih tkiva RhE bez ikakvog tretiranja), slijepe probe na mrtvom tkivu (ekstrakt izopropanola iz mrtvih tkiva RhE bez ikakvog tretiranja)	$Površina_{interference} \leq 20 \%$ $površine_{LLOQ}^1$
Preciznost	Kontrole kvalitete (tj. MTT formazan pri 1,6 µg/ml, 16 µg/ml i 160 µg/ml) u izopropanolu (n = 5)	$CV \leq 15 \%$ ili $\leq 20 \%$ za LLOQ
Točnost	Kontrole kvalitete u izopropanolu (n = 5)	$\%Dev \leq 15 \%$ ili $\leq 20 \%$ za LLOQ
Učinak matrice	Kontrole kvalitete u slijepoj probi na živom tkivu (n = 5)	$85 \% \leq$ učinak matrice kao $\% \leq 115 \%$
Prijenos	Analiza izopropanola nakon standardnog ULOQ ²	$Površina_{interference} \leq 20 \%$ $površine_{LLOQ}$
Obnovljivost (u danu)	3 neovisne kalibracijske krivulje (na temelju šest uzastopnih razrjeđivanja 1/3 MTT formazana u izopropanolu, počevši s ULOQ-om, tj. 200 µg/ml) Kontrole kvalitete u izopropanolu (n = 5)	Kalibracijske krivulje: $\%Dev \leq 15 \%$ ili $\leq 20 \%$ za LLOQ Kontrole kvalitete: $\%Dev \leq 15 \%$ i $CV \leq 15 \%$
Obnovljivost (među danima)	Prvi dan: 1 kalibracijska krivulja i kontrole kvalitete u izopropanolu (n = 3)	
	Drugi dan: 1 kalibracijska krivulja i kontrole kvalitete u izopropanolu (n = 3) Treći dan: 1 kalibracijska krivulja i kontrole kvalitete u izopropanolu (n = 3)	
Kratkoročna stabilnost MTT formazana u ekstraktu tkiva RhE	Kontrole kvalitete u slijepoj probi na živom tkivu (n = 3) analizirane na dan pripreme i nakon 24 sata skladištenja na sobnoj temperaturi	$\%Dev \leq 15 \%$
Dugoročna stabilnost MTT formazana u ekstraktu tkiva RhE, ako je potrebno	Kontrole kvalitete u slijepoj probi na živom tkivu (n = 3) analizirane na dan pripreme i nakon nekoliko dana skladištenja na utvrđenoj temperaturi (npr. 4 °C, –20 °C, –80 °C)	$\%Dev \leq 15 \%$

1LLOQ: donja granica kvantifikacije, definirana tako da obuhvaća vijabilnost tkiva od 1 do 2 %, tj. 0,8 µg/ml.

2ULOQ: gornja granica kvantifikacije, definirana tako da bude barem dva puta veća od najviše očekivane koncentracije MTT formazana u ekstraktima izopropanola iz negativnih kontrola, tj. 200 µg/ml.”;

(7) u dijelu B poglavlje B.46. zamjenjuje se sljedećim:

„B.46. NADRAŽIVANJE KOŽE *IN VITRO*: ISPITNA METODA NA MODELU REKONSTRUIRANE LJUDSKE EPIDERME

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 439 (2015.). Nadraživanje kože odnosi se na izazivanje reverzibilnog oštećenja kože nakon primjene ispitivane kemikalije u trajanju do četiri sata [kako je utvrđeno Globalno usklađenim sustavom razvrstavanja i označivanja kemikalija (GHS) Ujedinjenih naroda (UN)] (1.) i Uredbom (EZ) br. 1272/2008 o razvrstavanju, označivanju i pakiranju tvari i smjesa (CLP)¹ Europske unije. Ovom se ispitnom metodom pruža *in vitro* postupak koji se može upotrebljavati za identificiranje opasnosti nadražujućih kemikalija (tvari i smjesa) u skladu s 2. kategorijom UN GHS-a/CLP-a (2.). U regijama koje nisu donijele neobavezu 3. kategoriju UN GHS-a (blago nadražujuće kemikalije) ova se ispitna metoda može upotrebljavati i za identifikaciju nerazvrstanih kemikalija. Ovisno o regulatornom okviru i sustavu razvrstavanja koji se upotrebljava, ova se ispitna metoda stoga može upotrebljavati kako bi se utvrdilo nadražuje li kemikalija kožu, kao samostalno zamjensko ispitivanje za *in vivo* ispitivanje nadraživanja kože ili kao djelomično zamjensko ispitivanje u okviru strategije ispitivanja (3.).
2. Procjena nadraživanja kože dosad je obično obuhvaćala primjenu laboratorijskih životinja [ispitna metoda B.4., ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 404 koja je izvorno donesena 1981. i revidirana 1992., 2002. i 2015.] (4.). Za ispitivanje nagrizanja donesene su tri validirane ispitne metode *in vitro* – ispitna metoda B.40. (ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 430), ispitna metoda B.40.*bis* (ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 431) i ispitna metoda B.65. (ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 435) (5., 6. i 7.). U Smjernicama OECD-a o integriranim pristupima ispitivanju i procjeni (IATA) za nagrizanje i nadraživanje kože opisano je nekoliko modula u kojima se grupiraju izvori informacija i alati za analizu te se pružaju smjernice o i. načinu integriranja i uporabe postojećih podataka o ispitivanju i podataka koji se dobivaju bez ispitivanja za procjenu potencijala kemikalija da uzrokuju nadraživanje i nagrizanje kože te ii. predlaganju pristupa kad je potrebno daljnje ispitivanje (3.).

¹ Uredba (EZ) br. 1272/2008 Europskog parlamenta i Vijeća od 16. prosinca 2008. o razvrstavanju, označivanju i pakiranju tvari i smjesa, o izmjeni i stavljanju izvan snage Direktive 67/548/EEZ i Direktive 1999/45/EZ i o izmjeni Uredbe (EZ) br. 1907/2006, SL L 353/1, 31.12.2008.

3. Ova se ispitna metoda bavi konačnim učinkom nadraživanja kože na zdravlje ljudi. Temelji se na *in vitro* ispitnom sustavu rekonstruirane ljudske epiderme (RhE) koja vjerno oponaša biokemijska i fiziološka svojstva gornjih slojeva ljudske kože, tj. epiderme. U ispitnom sustavu RhE ljudski netransformirani epidermalni keratinociti upotrebljavaju se kao izvor stanica za rekonstrukciju modela epiderme s reprezentativnom histologijom i citoarhitekturom. Dostupni su zahtjevi izvedbe (PS) kako bi se olakšala validacija i procjena sličnih i izmijenjenih ispitnih metoda koje se temelje na modelu RhE, u skladu s načelima Smjernice OECD-a br. 34 (8. i 9.). Odgovarajuća smjernica za ispitivanje izvorno je donesena 2010. i ažurirana 2013. kako bi se uključili dodatni modeli RhE, a 2015. ažurirana je kako bi se uputilo na smjernice o IATA-i i uveo alternativni postupak za mjerenje vijabilnosti.
4. Za četiri komercijalno dostupna *in vitro* ispitna modela dovršene su predvalidacijske, optimizacijske i validacijske studije (10., 11., 12., 13., 14., 15., 16., 17., 18., 19., 20., 21., 22., 23., 24., 25., 26., 27. i 28.) na temelju ispitnog sustava RhE (osjetljivost od 80 %, specifičnost od 70 % i točnost od 75 %). Ta četiri ispitna modela uključena su u ovu smjernicu za ispitivanje i navedena su u Dodatku 2., u kojem se navode i informacije o vrsti validacijske studije koja je upotrijebljena za validaciju odgovarajućih ispitnih metoda. Kako je navedeno u Dodatku 2., za razvoj ove ispitne metode i zahtjeva izvedbe upotrijebljena je validirana referentna metoda (VRM) (8.).
5. OECD-ovo uzajamno prihvaćanje podataka jamčit će se samo za ispitne modele koji su validirani u skladu sa zahtjevima izvedbe (8.) ako je OECD pregledao i donio te ispitne modele. Ispitni modeli uključeni u ovu ispitnu metodu i odgovarajuća smjernica OECD-a za ispitivanje mogu se upotrebljavati bez razlike za ispunjavanje zahtjeva zemalja u pogledu rezultata ispitivanja iz ispitnih metoda *in vitro* za nadraživanje kože, uz ostvarivanje koristi od uzajamnog prihvaćanja podataka.
6. Definicije pojmova upotrijebljenih u ovom dokumentu navedene su u Dodatku 1.

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

7. Ograničenje je ove ispitne metode, kako je pokazala cjelokupna prospektivna validacijska studija u kojoj su procijenjene i okarakterizirane ispitne metode RhE (16.), to što ne omogućuje razvrstavanje kemikalija na neobaveznu 3. kategoriju UN GHS-a (blago nadražujuće kemikalije) (1.). Stoga se o načinu upotrebe ove ispitne metode odlučuje regulatornim okvirom zemalja članica. Kad je riječ o EU-u, u CLP-u nije donesena 3. kategorija. Za potpunu evaluaciju lokalnih učinaka na kožu nakon jednostrukog dermalnog izlaganja potrebno je proučiti Smjernice OECD-a o integriranim pristupima ispitivanju i procjeni (3.). Podrazumijeva se da upotreba ljudske kože podliježe nacionalnim i međunarodnim etičkim pitanjima i uvjetima.

8. Ova se ispitna metoda bavi konačnim učinkom nadraživanja kože na zdravlje ljudi. Iako se ovom ispitnom metodom ne dobivaju primjerene informacije o nagrizanju kože, trebalo bi napomenuti da se ispitna metoda B.40.bis (ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 431) za nagrizanje kože temelji na istom ispitnom sustavu RhE uz upotrebu drugog protokola (6.). Ova se ispitna metoda temelji na modelima RhE koristeći ljudske keratinocyte koji stoga predstavljaju *in vitro* ciljni organ vrste koja se proučava. Pored toga neposredno uključuje početnu fazu upalne kaskade/mehanizma djelovanja (oštećenje stanica i tkiva koje dovodi do lokalizirane ozljede) koja se javlja tijekom nadraživanja *in vivo*. Tijekom validacijske studije na kojoj se temelji ova ispitna metoda ispitan je širok raspon kemikalija, a bazom podataka validacijske studije bilo je obuhvaćeno ukupno 58 kemikalija (16., 18. i 23.). Ispitna metoda primjenjiva je na krute tvari, tekućine, polukrute tvari i voskove. Tekućine mogu biti vodene i bezvodne; krute tvari mogu biti topljive ili netopljive u vodi. Krute tvari prije primjene treba samljeti u sitni prah kad god je to moguće; nije potrebno nikakvo drugo prethodno tretiranje uzorka. Plinovi i aerosoli još nisu ocijenjeni u validacijskoj studiji (29.). Iako je moguće da se oni mogu ispitati upotrebom tehnologije RhE, trenutačnom ispitnom metodom nije omogućeno ispitivanje plinova i aerosola.
9. Prije nego što se ova ispitna metoda primijeni na smjesi radi dobivanja podataka za predviđenu regulatornu svrhu, potrebno je razmotriti mogu li se te, ako se mogu, zašto se njome mogu dobiti primjereni rezultati za tu svrhu. Ta razmatranja nisu potrebna ako postoji regulatorni zahtjev za ispitivanje smjese. Međutim, budući da smjese obuhvaćaju široki spektar kategorija i sastava te da su trenutačno dostupne samo ograničene informacije o ispitivanju smjesa, u slučajevima u kojima se može dokazati da se ispitna metoda ne može primijeniti za ispitivanje specifične kategorije smjesa (npr. primjenom strategije koju su predložili Eskes i dr., 2012. (30.)), ispitnu metodu ne bi trebalo upotrebljavati za tu specifičnu kategoriju smjesa. Slično tome, trebalo bi o tome voditi računa ako se za određene kemijske razrede ili fizikalno-kemijska svojstva utvrdi da nisu primjenjivi na trenutačnu ispitnu metodu.
10. Ispitivane kemikalije koje apsorbiraju svjetlost u istom rasponu kao i MTT formazan i ispitivane kemikalije koje mogu izravno reducirati vitalnu boju MTT (na MTT formazan) mogu ometati mjerenje vijabilnosti stanica te se kod njih trebaju upotrebljavati prilagođene kontrole za ispravke (vidjeti stavke 28.–34.).
11. Jedan ciklus ispitivanja koji obuhvaća tri ponovljena uzorka tkiva trebao bi biti dovoljan za ispitivanu kemikaliju ako je razvrstavanje nedvosmisleno. Međutim, u slučajevima graničnih rezultata, kao što su neusklađena ponovljena mjerenja i/ili srednji postotak vijabilnosti od $50 \pm 5 \%$, trebalo bi razmotriti drugi ciklus, a i treći ciklus u slučaju neusklađenih rezultata između prva dva ciklusa.

NAČELO ISPITIVANJA

12. Ispitivana se kemikalija lokalno nanosi na trodimenzionalni model RhE, koji čine netransformirani ljudski epidermalni keratinociti uzgojeni u svrhu dobivanja višeslojnog, visoko izdiferenciranog modela ljudske epiderme. Sastoji se od organiziranih bazalnih, trnastih i zrnatih slojeva te višeslojnog rožnatog sloja (*stratum corneum*) koji između stanica sadržava lamelarne masne slojeve koji predstavljaju glavne razrede lipida analogne onima koji se susreću *in vivo*.
13. Kemijski inducirano nadraživanje kože, koje se uglavnom očituje u pojavi eritema i edema, rezultat je kaskade događaja koja započinje prodiranjem kemikalija u rožnati sloj gdje mogu oštetiti niže slojeve keratinocita i druge stanice kože. Oštećene stanice mogu otpuštati upalne posrednike ili inducirati upalnu kaskadu koja djeluje i na stanice derme, a posebno stromalne i endotelne stanice krvnih žila. Zamijećeni eritemi i edemi (29.) posljedica su dilatacije i povećane propusnosti endotelnih stanica. Točnije, ako u *in vitro* ispitnom sustavu ne postoji nikakva vaskularizacija, metode na temelju rekonstruirane ljudske epiderme mjere početne događaje u kaskadi, npr. oštećenje stanica/tkiva (16. i 17.) upotrebom vijabilnosti stanica kao očitavanja.
14. Vijabilnost stanica u modelima RhE mjeri se enzimskom konverzijom vitalne boje MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid, tiazolil plavo; CAS broj 298-93-1] u sol plavog formazana koja se kvantitativno mjeri nakon ekstrakcije iz tkiva (31.). Nadražujuće kemikalije prepoznaju se po tome što smanjuju vijabilnost stanica ispod definiranih pragova (tj. $\leq 50\%$ za 2. kategoriju UN GHS-a). Ovisno o regulatornom okviru i primjenjivosti ispitne metode, ispitivane kemikalije kod kojih je vijabilnost stanica iznad definiranog praga mogu se smatrati tvarima koje ne nadražuju (tj. $> 50\%$, bez kategorije).

DOKAZIVANJE OSPOSOBLJENOSTI

15. Prije rutinske primjene bilo kojeg od četiriju validiranih ispitnih modela koji su u skladu s ovom ispitnom metodom (Dodatak 2.) laboratoriji bi trebali dokazati tehničku osposobljenost upotrebom deset tvari koje služe za dokazivanje osposobljenosti koje su navedene u tablici 1. U slučajevima u kojima, na primjer, navedena tvar nije dostupna, može se upotrijebiti druga tvar za koju su dostupni primjereni referentni *in vivo* i *in vitro* podaci (npr. s popisa referentnih kemikalija (8.)) pod uvjetom da se primjenjuju isti kriteriji za odabir kao oni opisani u tablici 1. Upotrebu alternative tvari koja služi za dokazivanje osposobljenosti trebalo bi opravdati.
16. U okviru ispitivanja osposobljenosti preporučuje se da korisnici po primitku provjere svojstva barijere tkiva u skladu sa specifikacijama proizvođača modela RhE. To je posebno važno ako se tkiva šalju na velike udaljenosti/tijekom dugih vremenskih razdoblja. Nakon što se metoda uspješno uspostavi te nakon što se stekne i dokaže osposobljenost u pogledu njezine uporabe, takva rutinska provjera neće biti potrebna. Međutim, kod rutinske uporabe

ispitne metode preporučuje se daljnje ocjenjivanje svojstava barijere u pravilnim vremenskim intervalima.

Tablica 1.: Tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti¹

Tvar	CAS br.	Rezultat ocjenjivanja <i>in vivo</i> ²	Agregatno stanje	Kategorija sustava UN GHS-a
NERAZVRSTANE TVARI (bez kategorije prema UN GHS-u)				
naftalenoctena kiselina	86-87-3	0	Kruto	Bez kat.
izopropanol	67-63-0	0,3	Tekuće	Bez kat.
metil-stearat	112-61-8	1	Kruto	Bez kat.
heptilbutirat	5870-93-9	1,7	Tekuće	Bez kat. (Neobavezna 3. kat.) ³
heksilsalicilat	6259-76-3	2	Tekuće	Bez kat. (Neobavezna 3. kat.) ³
RAZVRSTANE TVARI (2. kategorija sustava UN GHS-a)				
ciklamen-aldehid	103-95-7	2,3	Tekuće	2. kat.
1-bromheksan	111-25-1	2,7	Tekuće	2. kat.
kalijev hidroksid (5 % aq.)	1310-58-3	3	Tekuće	2. kat.
1-metil-3-fenil-1-piperazin	5271-27-2	3,3	Kruto	2. kat.
heptanal	111-71-7	3,4	Tekuće	2. kat.

1 Tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti su podskupina tvari koje se upotrebljavaju u validacijskoj studiji, a odabir se temelji na sljedećim kriterijima: i. kemijske tvari komercijalno su dostupne; ii. reprezentativne su za cijelo područje vrijednosti nadraživanja prema Draizeu (od nenadražujuće do jako nadražujuće); iii. imaju dobro definiranu kemijsku strukturu; iv. reprezentativne su za kemijsku funkcionalnost koja je korištena u validacijskom postupku; v. dovele su do ponovljivih rezultata *in vitro* u više ispitivanja i više laboratorija; vi. točno su predviđene *in vitro* i vii. nemaju ekstremni toksični profil (npr. kancerogeno ili reproduktivno toksično djelovanje) i nisu povezane s neprimjereno visokim troškovima zbrinjavanja.

2 Rezultat ocjenjivanja *in vivo* u skladu s ispitnom metodom B.4. (4.).

3 U okviru ove ispitne metode neobavezna 3. kategorija UN GHS-a (blago nadražujuće kemikalije) (1.) smatra se kao „bez kategorije”.

POSTUPAK

17. U nastavku se nalazi opis elemenata i postupaka u vezi s ispitnom metodom RhE za potrebe ocjenjivanja nadraživanja kože (vidjeti i Dodatak 3. za parametre povezane sa svakim ispitnim modelom). Dostupni su standardni operativni postupci za četiri modela koja su usklađena s ovom ispitnom metodom (32., 33., 34. i 35.).

ELEMENTI ISPITNE METODE RHE

Opći uvjeti

18. Za rekonstruiranje epitela treba koristiti netransformirane ljudske keratinocyte. Ispod funkcionalnog rožnatog sloja (*stratum corneum*) nalaze se višestruki slojevi vijabilnih epitelih stanica (bazalni sloj, trnasti sloj, zrnati sloj). I sam rožnati sloj je višeslojan te sadržava esencijalni profil lipida kao čvrstu funkcionalnu barijeru koja je sposobna zaustaviti brzi prodor citotoksičnih referentnih kemikalija, npr. natrijev dodecil-sulfat (SDS) ili Triton X-100. Funkciju barijere trebalo bi dokazati i može se ocijeniti određivanjem koncentracije referentne kemikalije pri kojoj se smanjuje vijabilnost tkiva za 50 % (IC₅₀) nakon fiksnog vremena izlaganja ili određivanjem vremena izlaganja koje je potrebno da se vijabilnost stanica smanji za 50 % (ET₅₀) nakon primjene referentne kemikalije u unaprijed određenoj fiksnoj koncentraciji. Model RhE mora biti dovoljno nepropustan da spriječi prolazak materijala oko rožnatog sloja do vijabilnog tkiva jer bi to dovelo do lošeg modeliranja izlaganja kože. Model RhE ne smije biti onečišćen bakterijama, virusima, mikoplazmama ili gljivicama.

Funkcionalni uvjeti

Vijabilnost

19. Za kvantifikaciju vijabilnosti upotrebljava se MTT test (31.). Vijabilne stanice modela tkiva RhE mogu reducirati vitalnu boju MTT u talog plavog MTT formazana, koji se zatim ekstrahira iz tkiva izopropanolom (ili sličnim otapalom). Optička gustoća (OD) samog ekstrakcijskog otapala treba biti dovoljno mala, tj. OD < 0,1. Ekstrahirani MTT formazan može se kvantificirati upotrebom mjerenja standardne apsorbancije (OD) ili postupkom HPLC/UPLC spektrofotometrije (36.). Korisnici modela RhE trebali bi osigurati da svaka šarža modela RhE koji se upotrebljava ispunjava utvrđene kriterije za negativnu kontrolu. Raspon prihvatljivosti (gornja i donja granica) za vrijednosti optičke gustoće negativne kontrole (u uvjetima ispitne metode za ocjenjivanje nadraživanja kože) utvrđuje subjekt koji je razvio model RhE ili dobavljač tog modela. Rasponi prihvatljivosti za četiri validirana modela RhE uključena u ovu ispitnu metodu navedeni su u tablici 2. Korisnik HPLC/UPLC spektrofotometrije trebao bi upotrebljavati raspone optičke gustoće negativne kontrole navedene u tablici 2. kao kriterij prihvatljivosti za negativnu kontrolu. Potrebno je dokumentirati da su tkiva obrađena negativnom kontrolom stabilna u kulturi (tj. daju slična mjerenja vijabilnosti) za vrijeme trajanja ispitnog izlaganja.

Tablica 2.: Rasponi prihvatljivosti za vrijednosti optičke gustoće negativne kontrole ispitnih modela uključenih u ovu ispitnu metodu

	Donja granica prihvatljivosti	Gornja granica prihvatljivosti
EpiSkin™ (standardna metoda)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	≥ 0,8	≤ 2,8
SkinEthic™ RHE	≥ 0,8	≤ 3,0
LabCyte EPI-MODEL24 SIT	≥ 0,7	≤ 2,5

Funkcija barijere

20. Rožnati sloj i njegov sastav lipida trebao bi biti sposoban zaustaviti brzi prodor citotoksičnih referentnih kemikalija, npr. SDS ili Triton X-100, procijenjeno na temelju IC_{50} ili ET_{50} (tablica 3.).

Morfologija

21. U izvedbi histološkog pregleda modela RhE treba se dokazati da je struktura slična strukturi ljudske epiderme (uključujući višeslojni rožnati sloj).

Obnovljivost

22. Rezultati pozitivne i negativne kontrole ispitne metode trebaju dokazati obnovljivost tijekom vremena.

Kontrola kvalitete (KK)

23. Model RhE trebao bi se upotrebljavati samo ako subjekt koji ga je razvio ili dobavljač dokaže da svaka šarža upotrijebljenog modela RhE ispunjava definirane kriterije za odobrenje proizvoda, među kojima su najvažniji *vijabilnost* (stavak 19.), *funkcija barijere* (stavak 20.) i *morfologija* (stavak 21.). Ti bi se podaci trebali dostaviti korisnicima ispitne metode tako da ih mogu uključiti u izvješće o ispitivanju. Raspon prihvatljivosti (gornja i donja granica) za IC_{50} ili ET_{50} trebao bi utvrditi subjekt koji je razvio model RhE ili dobavljač tog modela. Za pouzdano predviđanje razvrstavanja nadražujućih učinaka prihvatljivi su isključivo rezultati dobiveni s tkivima koja ispunjavaju zadane kriterije. Rasponi prihvatljivosti za četiri ispitna modela uključena u ovu smjernicu za ispitivanje navedeni su u tablici 3.

Tablica 3.: Kriteriji za kontrolu kvalitete šarže ispitnih modela uključenih u ovu ispitnu metodu

	Donja granica prihvatljivosti	Gornja granica prihvatljivosti
EpiSkin™ (standardna metoda) (18-satno tretiranje SDS-om) (32.)	$IC_{50} = 1,0$ mg/ml	$IC_{50} = 3,0$ mg/ml
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1 % Triton X-100) (33.)	$ET_{50} = 4,0$ h	$ET_{50} = 8,7$ h
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (34.)	$ET_{50} = 4,0$ h	$ET_{50} = 10,0$ h
LabCyte EPI-MODEL24 SIT (18-satno tretiranje SDS-om) (35.)	$IC_{50} = 1,4$ mg/ml	$IC_{50} = 4,0$ mg/ml

Primjena ispitivane kemikalije i kontrolnih kemikalija

24. Za svaku ispitivanu kemikaliju i za kontrole trebalo bi upotrijebiti najmanje tri ponovljena uzorka u svakom ciklusu. I kod tekućina i kemikalija u krutom stanju treba primijeniti dovoljnu količinu ispitivane kemikalije kako bi se ravnomjerno pokrila površina epiderme tako da se izbjegne beskonačna doza, tj. trebalo bi upotrijebiti dozu od 26 do 83 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ili

mg/cm² (vidjeti Dodatak 3.). Kod kemikalija u krutom stanju površinu epiderme trebalo bi navlažiti deioniziranom ili destiliranom vodom prije primjene kako bi se poboljšao kontakt između ispitivane kemikalije i površine epiderme. Kad god je to moguće, kemikalije u krutom stanju treba ispitivati u obliku sitnog praha. U određenim se slučajevima kao pomoć pri nanošenju može upotrijebiti najlonska mreža (vidjeti Dodatak 3.). Na kraju razdoblja izlaganja ispitivanu kemikaliju treba pažljivo isprati s površine epiderme vodenom puferskom otopinom ili 0,9-postotnom NaCl. Ovisno o ispitnom modelu RhE koji se upotrebljava, razdoblje izlaganja kreće se od 15 do 60 minuta, a temperatura inkubacije od 20 do 37 °C. Ta razdoblja izlaganja i temperature optimiziraju se za svaku pojedinačnu ispitnu metodu RhE i predstavljaju različita intrinzična svojstva ispitnih modela (npr. funkciju barijere) (vidjeti Dodatak 3.).

25. U svakom bi se ciklusu trebale upotrebljavati istodobne negativne i pozitivne kontrole kako bi se dokazalo da su vijabilnost (upotrebom negativne kontrole), funkcija barijere i posljedična osjetljivost tkiva (upotrebom pozitivne kontrole) unutar prihvatljivog raspona utvrđenog na temelju rezultata prijašnjih ispitivanja. Predlaže se da se kao pozitivna kontrola koristi 5-postotna vodena otopina SDS. Predložene su negativne kontrole voda ili fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom (PBS).

Mjerenja vijabilnosti stanica

26. Prema ispitnom postupku od ključne je važnosti da se mjerenje vijabilnosti ne provodi neposredno nakon izlaganja ispitivanoj kemikaliji, već nakon dovoljno dugog razdoblja inkubacije nakon tretiranja tijekom koje se oprana tkiva drže u svježem mediju. Ova faza ostavlja dovoljno vremena da se tkivo oporavi od blagih citotoksičnih učinaka, ali i da se pojave jasni znakovi citotoksičnih učinaka. U fazi optimizacije testa dvaju ispitnih modela na temelju RhE na kojima se temelji ova ispitna metoda pokazalo se da optimalno razdoblje inkubacije nakon tretiranja iznosi 42 sata (11., 12., 13., 14. i 15.).
27. MTT test je standardizirana kvantitativna metoda koja bi se trebala upotrebljavati za mjerenje vijabilnosti stanica na temelju ove ispitne metode. Taj je test prikladan za trodimenzionalni model tkiva. Uzorak tkiva stavi se u otopinu MTT odgovarajuće koncentracije (npr. 0,3–1 mg/ml) i ostavi u njoj tri sata. Vijabilne stanice pretvaraju MTT u plavi formazan. Nataloženi plavi formazan zatim se ekstrahira iz tkiva s pomoću otapala (npr. izopropanol, kiseli izopropanol) i koncentracija formazana izmjeri se određivanjem vrijednosti OD na 570 nm uz pojas propuštanja do najviše ±30 nm ili upotrebom postupka HPLC/UPLC spektrofotometrije (vidjeti stavak 34.) (36.).
28. Optička svojstva ispitivane kemikalije ili njezino kemijsko djelovanje na MTT (npr. kemikalije mogu spriječiti ili obrnuti proces nastajanja boje, ali ga i izazvati) mogu ometati test i dovesti do pogrešne procjene vijabilnosti. To se može dogoditi kad se određena ispitivana kemikalija ne spere u potpunosti s tkiva ili proдре u epidermu. Ako ispitivana

kemikalija izravno djeluje na MTT (npr. redukcijom MTT-a), prirodno je obojena ili se oboji tijekom tretiranja tkiva, treba upotrijebiti dodatne kontrole kako bi se utvrdila i ispravila interferencija ispitivane kemikalije s mjernom tehnikom koja se koristi za mjerenje vijabilnosti (vidjeti stavke 29. i 33.) Podroban opis načina na koji se ispravljaju izravna redukcija MTT-a i interferencije bojila dostupan je u standardnim operativnim postupcima za četiri validirana modela uključena u ovu ispitnu metodu (32., 33., 34. i 35.).

29. Kako bi se identificirale kemikalije koje izravno reduciraju MTT, svaku bi ispitivanu kemikaliju trebalo dodati u svježe pripremljenu otopinu MTT-a. Ako smjesa MTT-a koja sadržava ispitivanu kemikaliju postane plava/ljubičasta, pretpostavlja se da ispitivana kemikalija izravno reducira MTT i treba se provesti daljnja funkcionalna provjera nevijabilnih tkiva RhE, neovisno o upotrebi mjerenja standardne apsorbancije (OD) ili postupka HPLC/UPLC spektrofotometrije. U toj dodatnoj funkcionalnoj provjeri upotrebljavaju se mrtva tkiva kod kojih je prisutna samo preostala metabolička aktivnost, ali koja apsorbiraju ispitivanu kemikaliju na sličan način kao vijabilna tkiva. Svaka ispitivana kemikalija koja reducira MTT primjenjuje se na najmanje dva ponovljena uzorka mrtvog tkiva koji se podvrgavaju cijelom postupku ispitivanja kako bi se dobila nespecifična redukcija MTT-a (NSMTT) (32., 33., 34. i 35.). Dovoljna je jedna kontrola NSMTT po ispitivanoj kemikaliji neovisno o broju provedenih neovisnih ispitivanja/ciklusa. Prava vijabilnost tkiva zatim se računa kao postotak vijabilnosti tkiva koji se dobiva iz živih tkiva izloženih tvari koja reducira MTT umanjenom za postotak nespecifične redukcije MTT-a dobivene s mrtvim tkivima izloženima istoj tvari koja reducira MTT, izračunano u odnosu na negativnu kontrolu koja se provodi istodobno kad i ispitivanje koje se ispravlja (%NSMTT).
30. Kako bi se identificirala potencijalna interferencija obojenih ispitivanih kemikalija ili ispitivanih kemikalija koje se oboje kad dođu u dodir s vodom ili izopropanolom i odlučilo jesu li potrebne dodatne kontrole, trebalo bi provesti spektralnu analizu ispitivane kemikalije u vodi (okoliš tijekom izlaganja) i/ili izopropanolu (otopina za ekstrakciju). Ako ispitivana kemikalija u vodi i/ili izopropanolu apsorbira svjetlost u rasponu od 570 ± 30 nm, trebalo bi provesti daljnje kontrole bojila ili bi, kao alternativu, trebalo primijeniti postupak HPLC/UPLC spektrofotometrije; u potonjem slučaju te kontrole nisu potrebne (vidjeti stavke 33. i 34.). Pri provedbi mjerenja standardne apsorbancije (OD), svaka interferirajuća obojena ispitivana kemikalija primjenjuje se na najmanje dva ponovljena uzorka vijabilnog tkiva, koji se podvrgavaju cijelom postupku ispitivanja, ali se u koraku inkubacije MTT-a inkubiraju medijem, a ne otopinom MTT-a, kako bi nastala kontrola nespecifične boje (NSC_{living}). Kontrolu NSC_{living} treba obavljati istodobno s ispitivanjem obojene ispitivane kemikalije, a u slučaju više ispitivanja treba provesti neovisnu kontrolu NSC_{living} sa svakim provedenim ispitivanjem (u svakom ciklusu) zbog svojstvene biološke varijabilnosti živih tkiva. Prava vijabilnost tkiva zatim se računa kao postotak vijabilnosti tkiva koji se dobiva iz živih tkiva izloženih interferirajućoj ispitivanoj

kemikaliji i inkubiranih s otopinom MTT-a, umanjeno za postotak nespecifične boje dobiven sa živim tkivima izloženima interferirajućoj ispitivanoj kemikaliji i inkubiranima s medijem bez MTT-a, što se provodi istodobno kad i ispitivanje koje se ispravlja (%NSC_{living}).

31. Za ispitivane kemikalije za koje se utvrdi da uzrokuju i izravnu redukciju MTT-a (vidjeti stavak 29.) i interferenciju s bojom (vidjeti stavak 30.) pri mjerenju standardne apsorbancije (OD) bit će potreban i treći skup kontrola, uz kontrole NSMTT i NSC_{living} opisane u prethodnim stavcima. To je obično slučaj kod tamno obojenih ispitivanih kemikalija koje interferiraju s MTT testom (npr. plave, ljubičaste ili crne kemikalije) jer njihova intrinzična boja sprečava procjenu njihove sposobnosti da izravno reduciraju MTT, kako je opisano u stavku 29. Te se ispitivane kemikalije mogu vezati i na živa i na mrtva tkiva te se stoga kontrolom NSMTT može ispraviti ne samo potencijalna izravna redukcija MTT-a ispitivanom kemikalijom, već i interferencija s bojom koja je posljedica vezanja ispitivane kemikalije na mrtva tkiva. To bi moglo dovesti do dvostrukog ispravka za interferenciju s bojom jer se kontrolom NSC_{living} već ispravlja interferencija s bojom koja je posljedica vezanja ispitivane kemikalije na živa tkiva. Kako bi se izbjegao mogući dvostruki ispravak za interferenciju s bojom, treba provesti treću kontrolu za nespecifičnu boju u mrtvim tkivima (NSC_{killed}). U toj dodatnoj kontroli ispitivana kemikalija primjenjuje se na najmanje dva ponovljena uzorka mrtvog tkiva, koja se podvrgavaju cijelom postupku ispitivanja, ali se u koraku inkubacije MTT-a inkubiraju medijem, a ne otopinom MTT-a. Dovoljna je jedna kontrola NSC_{killed} po ispitivanoj kemikaliji neovisno o broju provedenih neovisnih ispitivanja/ciklusa, ali treba je provoditi istodobno s kontrolom NSMTT i, ako je moguće, s istom šaržom tkiva. Prava vijabilnost tkiva zatim se računa kao postotak vijabilnosti tkiva koji se dobiva iz živih tkiva izloženih ispitivanoj kemikaliji umanjeno za %NSMTT i %NSC_{living} te uvećano za postotak nespecifične boje dobiven s mrtvim tkivima izloženima interferirajućoj ispitivanoj kemikaliji i inkubiranim medijem bez MTT-a, izračunano u odnosu na negativnu kontrolu koja se provodi istodobno kad i ispitivanje koje se ispravlja (%NSC_{killed}).
32. Važno je napomenuti da nespecifična redukcija MTT-a i nespecifične interferencije s bojom mogu povećati očitavanja ekstrakta tkiva izvan raspona linearnosti spektrofotometra. Na temelju toga svaki bi laboratorij prije početka ispitivanja ispitivanih kemikalija u regulatorne svrhe trebao utvrditi raspon linearnosti svojeg spektrofotometra s MTT formazanom (CAS # 57360-69-7) iz komercijalnog izvora. Mjerenje standardne apsorbancije (OD) upotrebom spektrofotometra primjereno je za procjenu tvari koje izravno reduciraju MTT i ispitivanih kemikalija koje interferiraju s bojom ako je optička gustoća ekstrakata tkiva dobivena ispitivanom kemikalijom bez ikakvih ispravaka za izravnu redukciju MTT-a i/ili interferencija s bojom unutar linearnog raspona spektrofotometra ili ako je neispravljeni postotak vijabilnosti dobiven ispitivanom kemikalijom već $\leq 50\%$. Ipak, rezultate za ispitivane kemikalije koji daju %NSMTT i/ili

$\%NSC_{\text{living}} \geq 50 \%$ negativne kontrole trebalo bi oprezno tumačiti jer je to granična vrijednost koja se upotrebljava za razlikovanje razvrstanih i nerazvrstanih kemikalija (vidjeti stavak 36.).

33. Kod obojenih ispitivanih kemikalija koje nisu kompatibilne s mjerenjem standardne apsorbancije (OD) zbog prejake interferencije s MTT testom, za mjerenje MTT formazana može se upotrijebiti alternativni postupak HPLC/UPLC spektrofotometrije (vidjeti stavak 34.) (36.). Sustav HPLC/UPLC spektrofotometrije omogućuje izdvajanje MTT formazana iz ispitivane kemikalije prije njegove kvantifikacije (36.). Zato pri upotrebi HPLC/UPLC spektrofotometrije nikada nisu potrebne kontrole NSC_{living} i NSC_{killed} , neovisno o kemikaliji koja se ispituje. Kontrole $NSMTT$ ipak bi se trebale upotrijebiti ako se sumnja u to da ispitivana kemikalija izravno reducira MTT ili ima boju koja sprečava procjenu sposobnosti izravne redukcije MTT-a (kako je opisano u stavku 29.). Ako se za mjerenje MTT formazana upotrebljava HPLC/UPLC spektrofotometrija, postotak vijabilnosti tkiva računa se kao postotak površine pika MTT formazana dobiven sa živim tkivima izloženima ispitivanoj kemikaliji u odnosu na pik MTT formazana dobiven s istodobnom negativnom kontrolom. Za ispitivane kemikalije koje mogu izravno reducirati MTT prava vijabilnost tkiva računa se kao postotak vijabilnosti tkiva dobiven sa živim tkivima izloženima ispitivanoj kemikaliji umanjen za $\%NSMTT$. Naposljetku, treba napomenuti da se ne mogu procijeniti tvari koje izravno reduciraju MTT i koje ujedno mogu interferirati s bojom, koje se zadržavaju u tkivima nakon tretiranja i reduciraju MTT toliko jako da dovode do optičke gustoće (upotrebom mjerenja standardne optičke gustoće) ili površina pika (upotrebom UPLC/HPLC spektrofotometrije) ispitivanih ekstrakata tkiva koji su izvan raspona linearnosti spektrofotometra, iako do toga dolazi samo u iznimno rijetkim slučajevima.
34. HPLC/UPLC spektrofotometrija može se upotrebljavati i sa svim vrstama ispitivanih kemikalija (obojenima i neobojenima, koje reduciraju MTT i koje ga ne reduciraju) za mjerenje MTT formazana (36.). Zbog raznolikosti sustava HPLC/UPLC spektrofotometrije, kvalifikaciju sustava HPLC/UPLC spektrofotometrije trebalo bi dokazati prije njegove upotrebe za kvantificiranje MTT formazana iz ekstrakata tkiva tako da sustav ispuni kriterije prihvatljivosti za skup standardnih parametara kvalifikacije u skladu s parametrima opisanima u smjernicama američke Uprave za hranu i lijekove o validaciji bioanalitičkih metoda namijenjenih industriji (36. i 37.). Ti ključni parametri i njihovi kriteriji prihvatljivosti prikazani su u Dodatku 4. Kad se ispune kriteriji prihvatljivosti definirani u Dodatku 4., smatra se da je sustav HPLC/UPLC spektrofotometrije kvalificiran i spreman za mjerenje MTT formazana u pokusnim uvjetima opisanima u ovoj ispitnoj metodi.

Kriteriji prihvatljivosti

35. U svakoj ispitnoj metodi u kojoj se upotrebljavaju valjane šarže modela RhE (vidjeti stavak 23.) vrijednost optičke gustoće tkiva tretiranih negativnom kontrolom trebala bi ukazivati na kvalitetu tkiva nakon što su dovršeni svi koraci dopreme i preuzimanja te svi postupci protokola. Vrijednosti optičke gustoće kontrola ne bi smjele biti ispod prijašnjih propisanih granica. Isto tako, tkiva tretirana pozitivnom kontrolom, tj. 5-postotnom vodenom otopinom SDS, trebaju pokazivati sposobnost da reagiraju na nadražujuću kemikaliju u uvjetima ispitne metode (vidjeti Dodatak 3., a za daljnje informacije i standardne operativne postupke četiriju ispitnih modela uključenih u ovu smjernicu za ispitivanje (32., 33., 34. i 35.)). Povezane i odgovarajuće mjere varijabilnosti između tkiva u ponavljanjima, tj. standardne devijacije, trebaju biti unutar granica prihvatljivosti utvrđenih za ispitni model koji se upotrebljava (vidjeti Dodatak 3.).

Tumačenje rezultata i model predviđanja

36. Vrijednosti optičke gustoće dobivene sa svakom ispitivanom kemikalijom mogu se koristiti za izračun postotka vijabilnosti normaliziranog u odnosu na negativnu kontrolu, koja je određena kao 100 %. U slučaju upotrebe HPLC/UPLC spektrofotometrije postotak vijabilnosti tkiva računa se kao postotak površine pika MTT formazana dobiven sa živim tkivima izloženima ispitivanoj kemikaliji u odnosu na pik MTT formazana dobiven s istodobnom negativnom kontrolom. Potrebno je jasno utvrditi i dokumentirati graničnu vrijednost postotka vijabilnosti stanica koja se koristi za razlikovanje nadražujućih kemikalija od nerazvrstanih ispitivanih kemikalija te statistički postupak ili postupke koji su korišteni za ocjenjivanje rezultata i identifikaciju nadražujućih kemikalija te dokazati njihovu prikladnost (informacije potražiti u standardnim operativnim postupcima ispitnih modela). Granične vrijednosti za predviđanje nadraživanja navedene su u nastavku:

- smatra se da je za ispitivanu kemikaliju potrebno razvrstavanje i označivanje u skladu s UN GHS-om ili CLP-om (2. kategorija ili 1. kategorija) ako je srednji postotak vijabilnosti tkiva nakon izlaganja i inkubacije nakon tretiranja manji ili jednak ($\leq$) 50 %. Budući da se ispitnim modelima RhE obuhvaćenima ovom ispitnom metodom ne mogu razlikovati 1. i 2. kategorija sustava UN GHS-a ili CLP-a, bit će potrebne dodatne informacije o nagrizanju kože kako bi se odlučilo o konačnom razvrstavanju [vidjeti i Smjernice OECD-a o IATA-i (3.)]. Ako se utvrdi da ispitivana kemikalija nije nagrizajuća (npr. na temelju ispitne metode TM.40., B.40.bis ili B.65.) i pokazuje vijabilnost tkiva nakon izlaganja i inkubacije nakon tretiranja manju od ili jednaku ($\leq$) 50 %, ispitivana kemikalija smatra se nadražujućom za kožu u skladu s 2. kategorijom UN GHS-a ili CLP-a,
- ovisno o regulatornom okviru zemalja članica, može se smatrati da ispitivana kemikalija nije nadražujuća za kožu u skladu s oznakom „bez kategorije” UN GHS-a ili CLP-a ako je vijabilnost tkiva nakon izlaganja i inkubacije nakon tretiranja viša od ($>$) 50 %.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Podaci

37. Podatke pojedinačnih ponavljanja uzoraka tkiva u svakom ciklusu (npr. vrijednosti OD i podatke o izračunanom postotku vijabilnosti stanica za svaku ispitanu kemikaliju, zajedno s razvrstavanjem) treba prikazati u tabličnom obliku, uključujući eventualne podatke iz ponovljenih pokusa. Osim toga, trebalo bi prijaviti i srednje vrijednosti $\pm$ standardno odstupanje za svaki ciklus. Za svaku ispitanu kemikaliju treba navesti zapažene interakcije s MTT reagensom i obojenim ispitivanim kemikalijama.

Izvešće o ispitivanju

38. Izvešće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Ispitivana kemikalija i kontrolne kemikalije:

- tvar s jednim sastojkom: kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv, CAS broj, SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula, čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.,
- tvar s više sastojaka, UVCB tvar i smjesa: opis (koliko je to moguće) kemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativnog udjela i relevantnih fizikalno-kemijskih svojstava sastojaka,
- fizički izgled, topljivost u vodi i bilo koja druga relevantna fizikalno-kemijska svojstva,
- izvor, broj serije, ako su dostupni,
- tretiranje ispitivane kemikalije/kontrolnih kemikalija prije ispitivanja, ako je primjenljivo (npr. grijanje, mljevenje),
- stabilnost ispitivane kemikalije, rok uporabe ili datum za ponovnu analizu ako je poznat,
- uvjeti skladištenja.

Model RhE i protokol koji se upotrebljavaju (te obrazloženje odabira, ako je primjenljivo)

Ispitni uvjeti:

- model RhE koji se upotrebljava (uključujući broj šarže),
- informacije o kalibraciji mjernog uređaja (npr. spektrofotometar), valna duljina i pojas propuštanja (ako je primjenljivo) koji se upotrebljavaju za kvantifikaciju MTT formazana te raspon linearnosti mjernog uređaja, opis metode koja se upotrebljava za kvantifikaciju MTT formazana,
- opis kvalifikacije sustava HPLC/UPLC spektrofotometrije, ako je primjenljivo, potpune popratne informacije o konkretnom modelu RhE koji je korišten, uključujući njegove radne značajke. To bi, među ostalim, trebalo uključivati:

i. vijabilnost;

- ii. funkciju barijere;
- iii. morfologiju;
- iv. obnovljivost i prediktivnost;
- v. kontrole kvalitete (KK) modela,
- upućivanje na prijašnje podatke za predmetni model. To bi, među ostalim, trebalo uključivati prihvatljivost podataka o kontroli kvalitete s upućivanjem na prijašnje podatke o šarži,
- dokazivanje osposobljenosti za izvođenje ispitne metode prije rutinske upotrebe ispitivanjem tvari koje služe za dokazivanje osposobljenosti.

Ispitni postupak:

- pojedinosti o upotrijebljenom ispitnom postupku (uključujući postupke ispiranja upotrijebljene nakon razdoblja izlaganja), doza upotrijebljene ispitne kemikalije i kontrola,
- trajanje i temperatura izlaganja i razdoblja inkubacije nakon izlaganja,
- oznake kontrola koje se koriste za tvari koje izravno reduciraju MTT i/ili ispitivane kemikalije za bojenje, ako je primjenjivo,
- broj ponavljanja uzoraka tkiva upotrijebljenih po ispitivanoj kemikaliji i kontrolama (pozitivna kontrola, negativna kontrola i NSMTT, NSC_{living} i NSC_{killed}, ako je primjenjivo),
- opis primijenjenih kriterija za odlučivanje/modela predviđanja na temelju upotrijebljenog RhE modela,
- opis mogućih izmjena ispitne metode (uključujući postupke ispiranja).

Kriteriji prihvatljivosti ciklusa i ispitivanja:

- srednje vrijednosti i rasponi prihvatljivosti pozitivnih i negativnih kontrola na temelju prijašnjih podataka, prihvatljiva varijabilnost između ponovljenih uzoraka tkiva za pozitivne i negativne kontrole,
- prihvatljiva varijabilnost između ponovljenih uzoraka tkiva za ispitivanu kemikaliju.

Rezultati:

- tablični prikaz podataka za pojedinačnu ispitivanu kemikaliju, za svaki ciklus i svako ponovljeno mjerenje, uključujući optičku gustoću ili površinu pika MTT formazana, postotak vijabilnosti tkiva, srednji postotak vijabilnosti tkiva i standardnu devijaciju,
- ako je primjenjivo, rezultati kontrola upotrijebljenih za tvari koje izravno reduciraju MTT i/ili ispitivane kemikalije za bojenje, uključujući optičku gustoću ili površinu pika MTT formazana, %NSMTT, %NSC_{living}, %NSC_{killed}, standardnu devijaciju te konačni točni postotak vijabilnosti tkiva,

- rezultati dobiveni s ispitivanom kemikalijom/kemikalijama i kontrolama u odnosu na utvrđene kriterije prihvatljivosti za ciklus i ispitivanje,
- opis drugih uočenih učinaka,
- utvrđeno razvrstavanje, s upućivanjem na primijenjeni model predviđanja/kriterije odlučivanja.

Rasprava o rezultatima

Zaključci

LITERATURA

1. Ujedinjeni narodi (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, UN New York i Ženeva, 2013. Dostupno na: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.
2. EURL-ECVAM (2009). Statement on the “Performance Under UN GHS of Three *In Vitro* Assays for Skin Irritation Testing and the Adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM Skin Irritation Performance Standards”, izdao ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 9. travnja 2009. Dostupno na: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC31_skin-irritation-statement_20090922.pdf.
3. OECD (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 203), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
4. Poglavlje B.4. ovog Priloga, Akutno nadraživanje/nagrizanje kože.
5. Poglavlje B.40. ovog Priloga, Nagrizanje kože *in vitro*: transkutani električni otpor (TER).
6. Poglavlje B.40.bis ovog Priloga, Nagrizanje kože *in vitro*: ispitna metoda na modelu rekonstruirane ljudske epiderme (RhE).
7. Poglavlje B.65. ovog Priloga, *In vitro* ispitna metoda s membranskom barijerom.
8. OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human *Epidermis* (RhE) Test Methods for Skin Irritation in Relation to TG 439. Environment, health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 220). Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
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), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
10. Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J. M. and Botham, P. (2001). A Prevalidation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation, Results and Evaluation by the Management Team, *Toxicol. in Vitro* 15, 57.–93.

11. Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C. and Roguet, R. (2002). Refinement of the EPISKIN Protocol for the Assessment of Acute Skin Irritation of Chemicals: Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study, *Toxicol. in Vitro* 16, 765.–770.
12. Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. and Spielmann, H. (2004). Optimisation of the EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests, *ALTEX* 21, 107.–114.
13. Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. and Spielmann, H. (2005), The EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests – An Assessment of the Performance of the Optimised Test, *ATLA* 33, 351.–367.
14. Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. and Rubinstein, G. (2005). The *In Vitro* Acute Skin Irritation of Chemicals: Optimisation of the EPISKIN Prediction Model Within the Framework of the ECVAM Validation Process, *ATLA* 33, 329.–349.
15. Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. and Worth, A. (2002). Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation, The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2, *ATLA* 30, 109.–129.
16. Spielmann, H., 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. and Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test, *ATLA* 35, 559.–601.
17. Hoffmann S. (2006). ECVAM Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the Primary Endpoint MTT and the Secondary Endpoint IL1- α .
18. Eskes C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals, *ATLA* 35, 603.–619.
19. Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonnaud, E. and Leclaire, J. (2007). *In Vitro* Acute Skin Irritancy of Chemicals Using the Validated EPISKIN Model in a Tiered Strategy - Results and Performances with 184 Cosmetic Ingredients, *ALTEX*, 14, 351.–358.

20. EURL-ECVAM (2007). Statement on the Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation, izdao ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27. travnja 2007. Dostupno na: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC26_statement_SkinIrritation_20070525_C.pdf.
21. EURL-ECVAM. (2007). Performance Standards for Applying Human Skin Models to *In Vitro* Skin Irritation Testing. *Napomena: ovo su izvorni zahtjevi izvedbe korišteni za validaciju dviju ispitnih metoda. Ti zahtjevi izvedbe više se ne bi trebali upotrebljavati jer je sad dostupna ažurirana verzija (8.)*.
22. EURL-ECVAM. (2008). Statement on the Scientific Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation Testing, izdao ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC29), 5. studenoga 2008. https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication/ESAC_Statement_SkinEthic-EpiDerm-FINAL-0812-01.pdf.
23. OECD (2010). Explanatory Background Document to the OECD Draft Test Guideline on *In Vitro* Skin Irritation Testing. Environment, Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, (No 137), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
24. Katoh, M., Hamajima, F., Ogasawara, T. and 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. and 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), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
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), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
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. and 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. and Schröder, K.R. (2004). *In Vitro* Skin Irritation: Fact and Future. State of the Art Review of Mechanisms and Models, *Toxicol. In Vitro* 18, 231.–243.
 30. Eskes, C. *et al.* (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul.Toxicol.Pharmacol.* 62, 393.–403.
 31. Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *J. Immunol. Methods* 65, 55.–63.
 32. EpiSkin™ (February 2009). SOP, Version 1.8 ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ Test Method 15 min - 42 hours for the Prediction of acute Skin Irritation of Chemicals.
 33. EpiDerm™ (Revised March 2009). SOP, Version 7.0, Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ Skin Irritation Test (EPI-200-SIT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm (EPI-200).
 34. SkinEthic™ RHE (February 2009) SOP, Version 2.0, SkinEthic Skin Irritation Test-42bis Test Method for the Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals: 42 Minutes Application + 42 Hours Post-Incubation.
 35. LabCyte (June 2011). EPI-MODEL24 SIT SOP, Version 8.3, Skin Irritation Test Using the Reconstructed Human Model “LabCyte EPI-MODEL24”.
 36. Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., and 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. Rukopis u pripremi.
 37. US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Svibanj 2001. Dostupno na: [<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>].
 38. Harvell, J.D., Lamminstausta, K., and Maibach, H.I. (1995). Irritant Contact Dermatitis, u: Practical Contact Dermatitis, str. 7.–18. (Ed. Guin J. D.). McGraw-Hill, New York.
 39. EURL-ECVAM (2009). Performance Standards for *In Vitro* Skin Irritation Test Methods Based on Reconstructed Human Epidermis (RhE). *Napomena*:

ovo je trenutačna verzija ECVAM-ovih zahtjeva izvedbe, ažuriranih 2009. s obzirom na provedbu UN GHS-a. Ti zahtjevi izvedbe više se ne bi trebali upotrebljavati jer je sad dostupna ažurirana verzija (8.) koja se odnosi na ovu smjernicu za ispitivanje.

40. EURL-ECVAM. (2009). ESAC Statement on the Performance Standards (PS) for *In Vitro* Skin Irritation Testing Using Reconstructed Human Epidermis, izdao ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 8. srpnja 2009.
41. EK (2001.) Direktiva Komisije 2001/59/EZ od 6. kolovoza 2001. o dvadeset osmoj prilagodbi tehničkom napretku Direktive Vijeća 67/548/EEZ o usklađivanju zakona i drugih propisa u odnosu na razvrstavanje, pakiranje i označivanje opasnih tvari, *Službeni list Europske unije* L225, 1.–333.

Dodatak 1.

DEFINICIJE

Točnost: stupanj podudarnosti između rezultata ispitne metode i prihvaćenih referentnih vrijednosti. Ona je mjerilo učinkovitosti ispitne metode i jedan od aspekata relevantnosti. Pojam je često međusobno zamjenjiv s pojmom „podudarnost” u smislu udjela točnih ishoda ispitne metode (9.).

Vijabilnost stanica: parametar za mjerenje ukupne aktivnosti populacije stanica, npr. sposobnost staničnih mitohondrijskih dehidrogenaza da reduciraju vitalnu boju MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid, tiazolil plavo), koji, ovisno o krajnjoj točki koja se mjeri i planu ispitivanja, korelira s ukupnim brojem i/ili vitalnošću živih stanica.

Kemikalija: znači tvar ili smjesa.

Podudarnost: mjerilo učinkovitosti za ispitne modele koji daju kategorijski rezultat i jedan je od aspekata relevantnosti. Pojam je ponekad međusobno zamjenjiv s pojmom točnosti i definira se kao udio svih ispitanih kemikalija koje su pravilno razvrstane kao pozitivne ili negativne. Podudarnost u velikoj mjeri ovisi o prisutnosti pozitivnih rezultata u vrstama ispitivane kemikalije (9.).

ET₅₀: može se procijeniti utvrđivanjem vremena izlaganja potrebnog za smanjenje vijabilnosti stanica za 50 % nakon primjene referentne kemikalije u određenoj, fiksnoj koncentraciji; vidjeti i IC₅₀.

GHS (Globalno usklađeni sustav Ujedinjenih naroda (UN) za razvrstavanje i označivanje kemikalija): sustav za razvrstavanje kemikalija (tvari i smjesa) prema standardiziranim vrstama i stupnjevima fizičkih opasnosti te opasnosti za zdravlje i okoliš, kojim su obuhvaćena odgovarajuća komunikacijska sredstva kao što su piktogrami, oznake opasnosti, oznake upozorenja, oznake obavijesti i sigurnosno-tehnički listovi, kojima se prenose informacije o njihovim štetnim učincima u cilju zaštite ljudi (uključujući poslodavce, radnike, prijevoznike, potrošače i interventno osoblje) i okoliša (1.).

HPLC: tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti.

IATA: integrirani pristup ispitivanju i procjeni.

IC₅₀: može se procijeniti utvrđivanjem koncentracije pri kojoj referentna kemikalija smanjuje vijabilnost tkiva za 50 % (IC₅₀) nakon fiksnog vremena izlaganja; vidjeti i ET₅₀.

Beskonačna doza: količina ispitivane kemikalije primijenjena na epidermu koja je veća od količine potrebne da bi se potpuno i ravnomjerno pokrila površina epiderme.

Smjesa: smjesa ili otopina koja se sastoji od dviju ili više tvari.

Tvar s jednim sastojkom: tvar, definirana količinskim sastavom, u kojoj je jedan glavni sastojak prisutan u koncentraciji od najmanje 80 % (w/w).

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid; tiazolil plavo tetrazolijev bromid.

Tvar s više sastojaka: tvar, definirana količinskim sastavom, u kojoj je više od jednog glavnog sastojka prisutno u koncentraciji od 10 % (w/w) ili većoj te manjoj od 80 % (w/w). Tvar s više sastojaka rezultat je procesa proizvodnje. Smjesa i tvar s više sastojaka razlikuju se po tome što se smjesa dobiva miješanjem dviju ili više tvari bez kemijske reakcije. Tvar s više sastojaka rezultat je kemijske reakcije.

NSC_{killed}: nespecifična boja u mrtvim tkivima.

NSC: nespecifična boja u živim tkivima.

NSMTT: nespecifična redukcija MTT-a.

Zahtjevi izvedbe (PS): zahtjevi koji se temelje na validiranoj ispitnoj metodi i pružaju temelj za ocjenjivanje usporedivosti predložene, funkcionalno i mehanicistički slične, ispitne metode. Uključuju: i. ključne elemente ispitne metode; ii. minimalni popis referentnih kemikalija odabranih među kemikalijama koje se upotrebljavaju za dokazivanje prihvatljive učinkovitosti validirane ispitne metode; i iii. usporedive razine točnosti i pouzdanosti koje mora pokazati predložena ispitna metoda kod ocjenjivanja primjenom minimalnog popisa referentnih kemikalija u odnosu na validiranu ispitnu metodu (9.).

PC: pozitivna kontrola; ponovljeni uzorak koji sadržava sve komponente ispitnog sustava i tretiran je kemikalijom za koju je poznato da inducira pozitivan odgovor. Kako bi se osigurala mogućnost procjene varijabilnosti odgovora pozitivne kontrole tijekom vremena, pozitivan odgovor ne bi smio biti presnažan.

Relevantnost: opis odnosa između ispitivanja i istraživanih učinka te je li ispitivanje prikladno i korisno za određenu svrhu. Pokazuje u kojoj se mjeri ispitivanjem točno mjeri ili predviđa istraživani biološki učinak. Relevantnost uključuje razmatranje o točnosti (podudarnosti) ispitne metode (9.).

Pouzdanost: pokazuje u kojoj se mjeri ispitna metoda može obnovljivo primijeniti unutar jednog laboratorija i između više laboratorija tijekom vremena uz primjenu istog protokola. Ocjenjuje se izračunavanjem obnovljivosti unutar jednog laboratorija i između više laboratorija (9.).

Zamjensko ispitivanje: ispitivanje koje zamjenjuje rutinsko i prihvaćeno ispitivanje za određivanje opasnosti i/ili procjenu rizika, za koje je utvrđeno da osigurava istovjetnu ili bolju zaštitu zdravlja ljudi, zdravlja životinja ili okoliša u odnosu na prihvaćeno ispitivanje u svim mogućim okolnostima ispitivanja i za sve kemikalije (9.).

Ciklus: ciklus se sastoji od jedne ispitivane kemikalije ili više njih, koje se ispituju istodobno s negativnom i pozitivnom kontrolom.

Osjetljivost: udio svih pozitivnih/aktivnih ispitivanih kemikalija koje su pravilno razvrstane primjenom ispitivanja. To je mjera točnosti ispitne metode koja daje kategorijske rezultate i važan je čimbenik za ocjenu relevantnosti ispitne metode (9.).

Nadraživanje kože *in vivo*: izazivanje reverzibilnog oštećenja kože nakon primjene ispitivane kemikalije u trajanju do najviše četiri sata. Nadraživanje kože lokalna je reakcija pogođenog tkiva kože i javlja se ubrzo nakon podražaja (38.). Uzrokuje ju lokalna upalna reakcija koja uključuje unutarnji (nespecifični) imunološki sustav tkiva kože. Njezina je glavna značajka reverzibilan proces koji uključuje upalne reakcije i većinu karakterističnih kliničkih znakova nadraživanja (eritem, edem, svrbež i bol) koji se povezuju s upalnim procesom.

Specifičnost: udio svih negativnih/neaktivnih ispitivanih kemikalija koje su pravilno razvrstane primjenom testa. To je mjera točnosti ispitne metode koja daje kategorijske rezultate i važan je čimbenik za ocjenu relevantnosti ispitne metode (9.).

Tvar: kemijski element i njegovi spojevi u prirodnome stanju ili dobiveni proizvodnim postupkom, što uključuje i aditive koji su nužni za održavanje stabilnosti proizvoda te nečistoće koje proizlaze iz primijenjenoga postupka, ali isključuje otapala koja se mogu izdvojiti bez utjecaja na stabilnost tvari ili promjene njezina sastava.

Ispitivana kemikalija: svaka tvar ili smjesa koja se ispituje ovom ispitnom metodom.

UPLC: tekućinska kromatografija iznimno visoke djelotvornosti.

UVCB: tvari nepoznatog ili promjenjivog sastava, složeni reakcijski proizvodi i biološki materijali.

Dodatak 2.

ISPITNI MODELI UKLJUČENI U OVU ISPITNU METODU

Br.	Naziv ispitnog modela	Vrsta validacijske studije	Referentni dokumenti
1	EpiSkin™	Cjelokupna prospektivna validacijska studija (2003.–2007.). Elementi ovog modela upotrijebljeni su kako bi se definirali ključni elementi ispitne metode izvornih i ažuriranih ECVAM-ovih zahtjeva izvedbe (39., 40. i 21.)*. Osim toga, podaci dobiveni metodom koji se odnose na identifikaciju nerazvrstanih i razvrstanih tvari činili su glavnu osnovu za određivanje vrijednosti specifičnosti i osjetljivosti izvornih zahtjeva izvedbe*.	(2., 10., 11., 14., 15., 16., 17., 18., 19., 20., 21., 23., 32., 39. i 40.)
2	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	EpiDerm™ (<i>izvorno</i>): ispitni model prvo je podvrgnut cjelokupnoj prospektivnoj validaciji zajedno s modelom br. 1 iz 2003.–2007. Elementi ovog modela upotrijebljeni su kako bi se definirali ključni elementi ispitnih metoda izvornih i ažuriranih ECVAM-ovih zahtjeva izvedbe (39., 40. i 21.)*. EpiDerm™ SIT (EPI-200) : Izmjena izvornog modela EpiDerm™ validirana je 2008. upotrebom izvornih ECVAM-ovih zahtjeva izvedbe (21.)*.	(2., 10., 12., 13., 15., 16., 17., 18., 20., 21., 23., 33., 39. i 40.) (2., 21., 22., 23. i 33.)
3	SkinEthic™ RHE	Validacijska studija na temelju izvornih ECVAM-ovih zahtjeva izvedbe (21.) iz 2008.*	(2., 21., 22., 23. i 31.)
4	LabCyte EPI-MODEL24 SIT	Validacijska studija (2011.–2012.) na temelju zahtjeva izvedbe iz Smjernice OECD-a za ispitivanje 439 (8.), koji se temelje na ažuriranim ECVAM-ovim zahtjevima izvedbe* (39. i 40.).	(24., 25., 26., 27., 28., 35., 39. i 40.) te zahtjevima izvedbe ove smjernice za ispitivanje (8.)*

*) Izvorni ECVAM-ovi zahtjevi izvedbe (21.) razvijeni su 2007. nakon dovršetka prospektivne validacijske studije (16.) u kojoj je procijenjena učinkovitost ispitnih modela br. 1 i 2 s obzirom na sustav razvrstavanja kako je opisan u 28. izmjeni Direktive EU-a o opasnim tvarima (41.). UN GHS-a (1.) i CLP EU-a uvedeni su 2008., pri čemu se granična vrijednost za razlikovanje nerazvrstanih i razvrstanih tvari zapravo pomaknula s rezultata ocjenjivanja *in vivo* od 2,0 na 2,3. Kako bi se prilagodili tom izmijenjenom regulatornom zahtjevu, vrijednosti točnosti i popis referentnih kemikalija ECVAM-ovih zahtjeva izvedbe ažurirani su 2009. (2., 39. i 40.). Kao i izvorni zahtjevi izvedbe, i ažurirani zahtjevi izvedbe u velikoj su se mjeri temeljili na podacima iz modela br. 1 i 2 (16.), ali su se uz to upotrebljavali i podaci o referentnim kemikalijama iz modela br. 3. Ažurirani ECVAM-ovi zahtjevi izvedbe iz 2010. upotrebljavali su se za propisivanje zahtjeva izvedbe povezanih s ovom smjernicom za ispitivanje (8.). Za potrebe ove ispitne metode validiranom referentnom metodom smatra se EpiSkin™ jer se koristio za razvoj svih kriterija zahtjeva izvedbe. Podrobne informacije o validacijskim studijama, skup dobivenih podataka i kontekst za potrebne prilagodbe zahtjeva izvedbe koje su posljedica provedbe UN GHS-a i CLP-a dostupne su u referentnom dokumentu s objašnjenjima uz odgovarajuću Smjernicu OECD-a za ispitivanje 439 (23.).

SIT: ispitivanje nadraživanja kože

RHE: rekonstruirana ljudska epiderma

Dodatak 3.

PARAMETRI PROTOKOLA SPECIFIČNI ZA SVAKI ISPITNI MODEL UKLJUČEN U OVU ISPITNU METODU

Modeli RhE imaju vrlo slične protokole i u svakom se modelu upotrebljava razdoblje nakon inkubacije od 42 sata (32., 33. 34. i 35.). Varijacije se uglavnom odnose na tri parametra povezana s različitim funkcijama barijere ispitnih modela i navedene su u nastavku: A) vrijeme i volumen prije inkubacije; B) primjena ispitne kemikalije i C) volumen nakon inkubacije.

	EpiSkin™ (standardna metoda)	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	SkinEthic RHE™	LabCyte EPI-MODEL24 SIT
A) Predinkubacija				
Vrijeme inkubacije	18–24 h	18–24 h	< 2 h	15–30 h
Volumen medija	2 ml	0,9 ml	0,3 ili 1 ml	0,5 ml
B) Primjena ispitivane kemikalije				
Za tekućine	10 µl (26 µl/cm²)	30 µl (47 µl/cm²)	16 µl (32 µl/cm²)	25 µl (83 µl/cm²)
Za krute tvari	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)
Upotreba najlonske mreže	Ne upotrebljava se	Prema potrebi	Primijenjena	Ne upotrebljava se
Ukupno vrijeme primjene	15 minuta	60 minuta	42 minute	15 minuta
Temperatura primjene	ST	a) na sobnoj temperaturi 25 minuta b) na 37 °C 35 minuta	ST	ST
C) Volumen nakon inkubacije				
Volumen medija	2 ml	0,9 ml x 2	2 ml	1 ml
D) Najveća prihvatljiva varijabilnost				
Standardna devijacija između ponovljenih uzoraka tkiva	SD ≤ 18	SD ≤ 18	SD ≤ 18	SD ≤ 18

ST: sobna temperatura

DV: destilirana voda

DPBS: Dulbeccova fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom

Dodatak 4.

KLJUČNI PARAMETRI I KRITERIJI PRIHVATLJIVOSTI ZA KVALIFIKACIJU SUSTAVA HPLC/UPLC SPEKTROFOTOMETRIJE ZA MJERENJE MTT FORMAZANA EKSTRAHIRANOG IZ TKIVA RHE

Parametar	Protokol izveden iz smjernica Uprave za hranu i lijekove (FDA) (36. i 37.)	Kriteriji prihvatljivosti
Selektivnost	Analiza izopropanola, slijepe probe na živom tkivu (ekstrakt izopropanola iz živih tkiva RhE bez ikakvog tretiranja), slijepe probe na mrtvom tkivu (ekstrakt izopropanola iz mrtvih tkiva RhE bez ikakvog tretiranja)	$Površina_{interference} \leq 20 \% površine_{LLOQ}^1$
Preciznost	Kontrole kvalitete (tj. MTT formazan pri 1,6 µg/ml, 16 µg/ml i 160 µg/ml) u izopropanolu (n = 5)	$CV \leq 15 \%$ ili $\leq 20 \%$ za LLOQ
Točnost	Kontrole kvalitete u izopropanolu (n = 5)	$\%Dev \leq 15 \%$ ili $\leq 20 \%$ za LLOQ
Učinak matrice	Kontrole kvalitete u slijepoj probi na živom tkivu (n = 5)	$85 \% \leq$ učinak matrice kao $\% \leq 115 \%$
Prijenos	Analiza izopropanola nakon standardnog ULOQ ²	$Površina_{interference} \leq 20 \% površine_{LLOQ}$
Obnovljivost (u danu)	3 neovisne kalibracijske krivulje (na temelju šest uzastopnih razrjeđivanja 1/3 MTT formazana u izopropanolu, počevši s ULOQ-om, tj. 200 µg/ml) Kontrole kvalitete u izopropanolu (n = 5)	Kalibracijske krivulje: $\%Dev \leq 15 \%$ ili $\leq 20 \%$ za LLOQ
Obnovljivost (među danima)	Prvi dan: 1 kalibracijska krivulja i kontrole kvalitete u izopropanolu (n = 3) Drugi dan: 1 kalibracijska krivulja i kontrole kvalitete u izopropanolu (n = 3) Treći dan: 1 kalibracijska krivulja i kontrole kvalitete u izopropanolu (n = 3)	Kontrole kvalitete: $\%Dev \leq 15 \%$ i $CV \leq 15 \%$
Kratkoročna stabilnost MTT formazana u ekstraktu tkiva RhE	Kontrole kvalitete u slijepoj probi na živom tkivu (n = 3) analizirane na dan pripreme i nakon 24 sata skladištenja na sobnoj temperaturi	$\%Dev \leq 15 \%$
Dugoročna stabilnost MTT formazana u ekstraktu tkiva RhE, ako je potrebno	Kontrole kvalitete u slijepoj probi na živom tkivu (n = 3) analizirane na dan pripreme i nakon nekoliko dana skladištenja na utvrđenoj temperaturi (npr. 4 °C, -20 °C, -80 °C)	$\%Dev \leq 15 \%$

¹LLOQ: donja granica kvantifikacije, definirana tako da obuhvaća vijabilnost tkiva od 1 do 2 %, tj. 0,8 µg/ml.

² ULOQ: gornja granica kvantifikacije, definirana tako da bude barem dva puta veća od najviše očekivane koncentracije MTT formazana u ekstraktima izopropanola iz negativnih kontrola, tj. 200 µg/ml.”;

(8) u dijelu B dodaju se sljedeća poglavlja:

„B.63. TEST PROBIRA ZA REPRODUKTIVNU/RAZVOJNU TOKSIČNOST

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 421 (TG) (2016.). Smjernice OECD-a za ispitivanje kemikalija periodično se preispituju uzimajući u obzir znanstveni napredak. Izvorna smjernica za test probira 421 donesena je 1995. na temelju protokola za preliminarni test probira za reproduktivnu toksičnost o kojem se raspravljalo na dva sastanka stručnjaka u Londonu 1990. (1.) i Tokiju 1992. (2.).
2. Ova je ispitna metoda ažurirana relevantnim krajnjim učincima endokrinih ometača, kao nastavno djelovanje na aktivnost visokog prioriteta koju je OECD pokrenuo 1998. kako bi revidirao postojeće smjernice za ispitivanje i razvio nove smjernice za probir i ispitivanje potencijalnih endokrinih ometača (3.). Na primjer, Smjernica OECD-a za ispitivanje 407 (28-dnevno ispitivanje oralne toksičnosti na glodavcima uz primjenu ponovljenih doza, poglavlje B.7. ovog Priloga) poboljšana je 2008. parametrima koji su primjereni za otkrivanje endokrine aktivnosti ispitivanih kemikalija. Ažuriranjem Smjernice za ispitivanje 421 nastojalo se uključiti određene relevantne krajnje učinke endokrinih ometača u ispitne smjernice za probir ako razdoblja izlaganja obuhvaćaju neka od osjetljivih razdoblja tijekom razvoja (prenatalna razdoblja ili rana postnatalna razdoblja).
3. Odabrani dodatni relevantni krajnji učinci endokrinih ometača, koji su i dio Smjernice za ispitivanje 443 (produljena studija reproduktivne toksičnosti na jednoj generaciji, poglavlje B.56. ovog Priloga), uključeni su u Smjernicu za ispitivanje 421 na temelju studije izvedivosti koja se bavi znanstvenim i tehničkim pitanjima povezanim s njihovim uključivanjem te mogućim prilagodbama plana ispitivanja koje su potrebne za njihovo uključivanje (4.).
4. Ova je ispitna metoda osmišljena za dobivanje ograničenih informacija o učincima ispitivane kemikalije na reproduktivnost mužjaka i ženki, kao što su funkcija gonada, ponašanje kod parenja, začeće, razvoj zametka i parturicija. Ona nije alternativa i ne zamjenjuje postojeće ispitne metode B.31., B.34., B.35. ili B.56.

POČETNA RAZMATRANJA

5. Ova se ispitna metoda za probir može upotrebljavati za dobivanje početnih informacija o mogućim učincima na reprodukciju i/ili razvoj, u ranoj fazi procjene toksikoloških svojstava kemikalija ili za zabrinjavajuće kemikalije. Može se upotrebljavati i kao dio testova početnog probira za postojeće kemikalije za koje je dostupno malo ili nimalo toksikoloških informacija, kao istraživanje o utvrđivanju raspona doze za opsežnije

reproduktivne/razvojne studije ili ako se smatra relevantnom iz drugih razloga. Pri provođenju istraživanja treba slijediti opća načela i razmatranja navedena u OECD-ovoj Smjernici br. 19 o priznavanju, procjeni i korištenju kliničkih znakova kao humanih krajnjih točaka za pokusne životinje koje se upotrebljavaju u ocjenama sigurnosti (5.).

6. Ovom se ispitnom metodom ne dobivaju potpune informacije o svim aspektima reprodukcije i razvoja. Točnije, metoda pruža samo ograničena sredstva za otkrivanje postnatalnih manifestacija prenatalnog izlaganja ili učinaka koji se mogu inducirati tijekom postnatalnog izlaganja. Zbog (među ostalim) relativno malog broja životinja u skupinama koje primaju dozu, selektivnosti krajnjih učinaka i kratkog trajanja istraživanja ovom metodom neće se dobiti dokazi za konačne tvrdnje o nepostojanju učinaka. Osim toga, ako ne postoje podaci iz drugih ispitivanja reproduktivne/razvojne toksičnosti, pozitivni rezultati korisni su za početnu procjenu opasnosti i pridonose odlukama u pogledu potrebe za dodatnim ispitivanjem i njegova vremenskog okvira.
7. Rezultate dobivene parametrima povezanim s endokrinim sustavom treba promatrati u kontekstu „OECD-ova konceptualnog okvira za ispitivanje i procjenu endokrino disruptivnih kemikalija” (6.). U tom Konceptualnom okviru poboljšana Smjernica OECD-a za ispitivanje 421 nalazi se na razini 4. kao *in vivo* test i pruža podatke o štetnim učincima na relevantne endokrine krajnje točke. Međutim, endokrini signal ne mora se sam po sebi smatrati dovoljnim dokazom da je ispitivana kemikalija endokrini ometač.
8. U ovoj ispitnoj metodi pretpostavlja se oralna primjena ispitivane kemikalije. Ako se upotrebljavaju drugi načini izlaganja, mogu biti potrebne prilagodbe.
9. Prije nego što se ova ispitna metoda primijeni na smjesi radi dobivanja podataka za predviđenu regulatornu svrhu, potrebno je razmotriti mogu li se te, ako se mogu, zašto se njome mogu dobiti primjereni rezultati za tu svrhu. Ta razmatranja nisu potrebna ako postoji regulatorni zahtjev za ispitivanje smjese.
10. Upotrijebljene definicije navedene su u Dodatku 1.

NAČELO ISPITIVANJA

11. Ispitivana kemikalija primjenjuje se u gradiranim dozama na nekoliko skupina mužjaka i ženki. Na mužjake treba primjenjivati dozu najmanje četiri tjedna te do dana i uključujući dan prije planiranog usmrćivanja (to uključuje najmanje dva tjedna prije parenja, tijekom razdoblja parenja i približno dva tjedna poslije parenja). S obzirom na ograničeno razdoblje doziranja prije parenja u mužjaka, plodnost možda neće biti osobito osjetljiv pokazatelj testikularne toksičnosti. Stoga je od ključne važnosti podroban histološki pregled sjemenika. Kombinacija razdoblja doziranja prije parenja od dva tjedna i naknadno promatranje parenja/plodnosti s ukupnim razdobljem doziranja od najmanje četiri tjedna,

nakon čega slijedi detaljna histopatologija muških gonada smatraju se dovoljnim da bi se omogućilo otkrivanje većine učinaka na plodnost mužjaka i spermatogenezu.

12. Ženkama dozu treba davati tijekom cijelog istraživanja. To uključuje dva tjedna prije parenja (pri čemu je cilj obuhvatiti najmanje dva cijela ciklusa estrusa), promjenjivo vrijeme do začeća, trajanje graviditeta i najmanje 13 dana nakon okota, do dana i uključujući dan prije planiranog usmrćivanja.
13. Trajanje istraživanja, nakon aklimatizacije i procjene ciklusa estrusa prije doziranja, ovisi o ponašanju ženki i iznosi približno 63 dana [najmanje 14 dana prije parenja, (do) 14 dana parenja, 22 dana gestacije, 13 dana laktacije].
14. Tijekom razdoblja primjene životinje se svakodnevno pažljivo promatraju radi uočavanja znakova toksičnosti. Životinje koje uginu ili su usmrćene tijekom razdoblja ispitivanja podvrgavaju se obdukciji, a na kraju ispitivanja preživjele se životinje usmrćuju i podvrgavaju obdukciji.

OPIS METODE

Odabir životinjske vrste

15. Ova ispitna metoda osmišljena je za upotrebu na štakorima. Ako se parametri navedeni u ovoj ispitnoj metodi istražuju na drugoj vrsti glodavaca, treba pružiti detaljno obrazloženje. U međunarodnom validacijskom programu za određivanje endokrinih ometača u Smjernici OECD-a za ispitivanje 407 (koja odgovara poglavlju B.7. ovog Priloga) primjenjivali su se samo štakori. Sojeve slabe plodnosti ili poznate po velikoj učestalosti razvojnih defekata ne bi trebalo koristiti. Treba koristiti zdrave životinje koje se prethodno nisu parile i nisu sudjelovale u pokusima. Ispitne životinje treba opisati u pogledu vrste, soja, spola, mase i dobi. Na početku istraživanja razlike u tjelesnoj masi korištenih životinja trebale bi biti minimalne i ne bi trebale prelaziti 20 % srednje vrijednosti tjelesne mase svakog spola. Kad se istraživanje provodi kao preliminarno istraživanje u odnosu na dugotrajno istraživanje ili istraživanje cijele generacije, prednost se daje primjeni životinja istog soja i podrijetla u oba istraživanja.

Smještaj i hranjenje

16. Svi postupci trebaju biti usklađeni s lokalnim standardima brige o životinjama u laboratoriju. Temperatura u prostoriji u kojoj se drže pokusne životinje treba biti 22 °C (± 3 °). Iako bi relativna vlaga trebala biti najmanje 30 %, a poželjno je da ne prelazi 70 %, osim tijekom čišćenja prostorije, cilj bi trebao biti 50–60 %. Rasvjeta treba biti umjetna uz izmjenu 12 sati svjetla i 12 sati mraka. Za hranjenje se može upotrebljavati konvencionalna laboratorijska hrana uz neograničenu količinu vode za piće. Na izbor prehrane može utjecati potreba da se osigura odgovarajuća mješavina ispitivane kemikalije kad se ona daje na taj način.

17. Životinje trebaju biti smještene u malim skupinama istoga spola; ako je to znanstveno opravdano, životinje se mogu držati u zasebnim nastambama. U slučaju skupnog smještaja, u jednom kavezu ne smije biti smješteno više od pet životinja. Postupci parenja trebali bi se odvijati u kavezima koji odgovaraju toj svrsi. Gravidne ženke treba smjestiti u posebne kaveze i treba im osigurati materijale za izradu gnijezda. Ženke se tijekom laktacije smještaju pojedinačno s njihovom mladunčadi.
18. Treba redovito analizirati ima li u hrani kontaminanata. Uzorak hrane treba sačuvati do kraja izrade izvješća.

Priprema životinja

19. Zdrave, mlade odrasle životinje nasumce se raspoređuju u kontrolne skupine i skupine za tretiranje. Kaveze bi trebalo rasporediti tako da se učinci do kojih bi moglo doći zbog položaja kaveza svedu na minimum. Životinje se označuju na jedinstven način i drže u kavezima najmanje pet dana prije početka istraživanja kako bi se prilagodile laboratorijskim uvjetima.

Priprema doza

20. Preporučuje se da se ispitivana kemikalija daje oralno osim ako se neki drugi načini primjene smatraju prikladnijima. Ako se odabere oralna primjena, ispitivana kemikalija obično se primjenjuje oralnom intubacijom; međutim, u određenim slučajevima, ispitivane kemikalije mogu se primijeniti i s hranom ili vodom za piće.
21. Prema potrebi, ispitivana se kemikalija otapa ili suspendira u odgovarajućem nosaču. Preporučuje se da se, kad je god moguće, u obzir najprije uzme vodena otopina/suspenzija pa zatim otopina/emulzija u ulju (npr. kukuruzno ulje) te zatim moguća otopina u drugim nosačima. Za nosače koji nisu voda moraju biti poznata toksična svojstva nosača. Treba utvrditi stabilnost i homogenost ispitivane kemikalije u nosaču.

POSTUPAK

Broj i spol životinja

22. Preporučuje se da se u svakoj skupini započne s najmanje deset mužjaka i 12–13 ženki. Ženke će se prije izlaganja procijeniti u pogledu ciklusa estrusa i životinje koje ne pokažu uobičajeni ciklus od četiri do pet dana neće se uključiti u istraživanje; stoga se preporučuje više ženki kako bi se dobilo deset ženki po skupini. Osim u slučaju znatnih toksičnih učinaka, očekuje se da će se tako dobiti najmanje osam gravidnih ženki po skupini, a to je obično najmanji prihvatljivi broj gravidnih ženki po skupini. Cilj je dobiti dovoljno gravidnih životinja i potomaka kako bi se osigurala valjana procjena potencijala ispitivane kemikalije da utječe na plodnost, gravidnost, ponašanje ženki (majki) i potomaka koji sišu te rast i razvoj potomstva F_1 od začeća do 13. dana nakon okota.

Doziranje

23. Općenito, treba upotrijebiti najmanje tri ispitne skupine i jednu kontrolnu skupinu. Visine doze mogu se temeljiti na informacijama iz ispitivanja akutne toksičnosti ili na rezultatima istraživanja s ponovljenim dozama. Osim tretiranja ispitivanom kemikalijom, sa životinjama u kontrolnoj skupini treba postupati na isti način kao sa životinjama iz ispitne skupine. Ako se pri primjeni ispitivane kemikalije koristi nosač, volumen nosača koji primi kontrolna skupina treba biti jednak najvećem upotrijebljenom volumenu.
24. Visine doza treba odabrati uzimajući u obzir sve postojeće podatke o toksičnosti i (toksiko)kinetici koji su dostupni. Treba uzeti u obzir i da je moguća razlika u osjetljivosti između gravidnih ženki i ženki koje nisu gravidne. Najvišu dozu treba odabrati s ciljem induciranja toksičnih učinaka, ali ne i smrti ili velike patnje životinja. Nakon toga treba odabrati slijed postupnog smanjivanja visine doze kako bi se dokazali svi odgovori povezani s doziranjem te da se kod najniže doze ne opažaju štetni učinci (NOAEL). Za određivanje sve nižih doza često su najpogodniji dvostruki do četverostruki intervali, i često je bolje dodati četvrtu ispitnu skupinu nego da između doziranja budu jako veliki intervali (npr. iznad faktora 10).
25. Ako se opaze znakovi opće toksičnosti (npr. smanjena tjelesna masa, učinci na jetri, srcu, plućima ili bubrezima itd.) ili druge promjene koje ne moraju biti toksični odgovori (npr. smanjeno uzimanje hrane, povećanje jetre), uočene učinke na endokrinim krajnjim točkama treba tumačiti s oprezom.

Granični test

26. Ako istraživanje provedeno oralnom primjenom jedne doze od najmanje 1 000 mg/kg tjelesne mase na dan, ili kod davanja doze s hranom ili vodom za piće, primjenom doze koja se u ekvivalentnom postotku daje s hranom ili vodom za piće u skladu s postupcima opisanima u ovom istraživanju, ne proizvede uočljive toksične učinke i ako na temelju podataka iz strukturno srodnih tvari ne treba očekivati toksičnost, može se smatrati da provođenje potpune studije s nekoliko visina doza nije neophodno. Granični test je relevantan samo ako izloženost ljudi ne ukazuje na potrebu za primjenom veće oralne doze. Za druge vrste primjene doza, kao što su inhalacija ili dermalna primjena, maksimalna koncentracija koja se može postići često je određena fizikalno-kemijskim svojstvima ispitivanih kemikalija.

Primjena doza

27. Životinjama se svakodnevno daje ispitivana kemikalija sedam dana tjedno. U slučaju primjene oralnom intubacijom ispitivanu kemikaliju treba životinjama dati u jednoj dozi s pomoću želučane sonde ili prikladne intubacijske kanile. Maksimalni volumen tekućine koji se može jednokratno dati ovisi o veličini ispitne životinje. Taj volumen ne smije biti veći od 1 ml/100 g tjelesne mase, osim kad se radi o vodenim otopinama koje dopuštaju

primjenu volumena od 2 ml/100 g tjelesne mase. Osim u slučaju nadražujućih ili nagrizajućih ispitivanih kemikalija kod kojih se štetni učinci obično javljaju pri višim koncentracijama, varijabilnost ispitnog volumena treba prilagođavanjem koncentracije svesti na najmanju moguću mjeru kako bi se zajamčio stalni volumen pri svim visinama doza.

28. Kod ispitivane kemikalije koja se primjenjuje s hranom ili vodom za piće važno je osigurati da količine ispitivane kemikalije ne utječu na uravnoteženi unos hrane ili vode. Kad se ispitivana kemikalija daje s hranom, može se koristiti ili stalna koncentracija u odnosu na količinu hrane (ppm) ili stalna visina doze u odnosu na tjelesnu masu životinje; treba navesti iskorištenu opciju. Za ispitivanu kemikaliju koja se primjenjuje oralnom intubacijom, dozu treba davati u podjednako vrijeme ili vremena svakog dana i prilagoditi je najmanje jednom tjedno kako bi se održala stalna visina doze s obzirom na tjelesnu masu životinje.

Plan pokusa

29. Doziranje životinja oba spola trebalo bi započeti najmanje dva tjedna prije parenja, nakon aklimatizacije od najmanje pet dana te nakon što se ženke proberu u pogledu normalnog ciklusa estrusa (u razdoblju od dva tjedna prije tretiranja). Istraživanje treba planirati tako da procjena ciklusa estrusa počne ubrzo nakon što životinje postignu punu spolnu zrelost. To se može malo razlikovati za različite sojeve štakora u različitim laboratorijima, npr. deset tjedana kod štakora soja Sprague Dawley i 12 tjedana kod soja Wistar. Ženke s potomstvom trebalo bi usmrtniti 13. dana nakon okota ili ubrzo nakon toga. Dan okota (tj. kad se dovrši parturicija) definira se kao nulti dan nakon okota. Ženke koje ne pokazuju znakove kopulacije usmrćuju se 24–26 dana nakon posljednjeg dana razdoblja parenja. Doziranje se nastavlja kod oba spola tijekom razdoblja parenja. Mužjake bi i dalje trebalo dozirati nakon razdoblja parenja barem dok ne istekne ukupno razdoblje doziranja od 28 dana. Zatim se usmrćuju ili se zadržavaju i nastavljaju dozirati radi mogućeg provođenja drugog parenja ako se to smatra primjerenim.
30. Svakodnevno doziranje roditeljskih ženki trebalo bi se nastaviti tijekom cijele gravidnosti i najmanje do 13. dana nakon okota, uključujući i taj dan, ili dan prije usmrćivanja. Kod istraživanja u kojima se ispitivana kemikalija primjenjuje inhalacijom i/ili dermalnim putem doziranje bi se trebalo nastaviti barem do 19. dana gestacije, uključujući i taj dan, i s doziranjem bi se trebalo ponovno početi što prije, a najkasnije na 4. postnatalni dan (PND).
31. Dijagram plana pokusa prikazan je u Dodatku 2.

Postupak parenja

32. U ovom bi se istraživanju obično trebalo upotrebljavati parenje 1:1 (jedan mužjak na jednu ženku). Iznimke se mogu javiti ako dođe do smrti mužjaka. Ženku bi trebalo smjestiti s istim mužjakom dok se ne uoče znakovi kopulacije ili dok ne isteknu dva tjedna. Svako

jutro ženke treba pregledati s obzirom na prisutnost sperme ili vaginalnog čepa. Nultim danom graviditeta smatra se dan kad je potvrđeno parenje (pronađen je vaginalni čep ili sperma). Ako je parenje neuspješno, može se razmotriti mogućnost ponovnog parenja ženki s dokazanim mužjacima iste skupine.

Veličina legla

33. Četiri dana nakon okota veličina svakog legla može se prilagoditi nasumičnim selekcijskim uklanjanjem suvišnih mladunaca tako da se po jednom leglu po mogućnosti ostavi četiri ili pet mladunaca svakog spola ovisno o uobičajenoj veličini legla soja štakora koji se upotrebljavaju. Uzorke krvi treba prikupiti od dva dodatna mladunca, objediniti ih i upotrijebiti za određivanje razina seruma T4. Nije prihvatljivo selektivno uklanjanje mladunaca, npr. prema tjelesnoj masi ili anogenitalnom razmaku. Kad je god broj muških ili ženskih mladunaca takav da nije moguće imati četiri ili pet mladunaca svakog spola po leglu, prihvatljivo je djelomično prilagođavanje (npr. šest mužjaka i četiri ženke). Mladunci se ne uklanjaju ako bi se veličina legla time smanjila ispod cilja izdvajanja mladunaca (osam ili deset mladunaca po leglu). Ako je dostupan samo jedan mladunac povrh cilja izdvajanja mladunaca, uklanja se samo jedan mladunac i od njega se uzima krv za moguću procjenu seruma T4.
34. Ako se veličina legla ne prilagođava, 4. dana nakon okota usmrćuju se dva mladunca po leglu i uzimaju se uzorci krvi radi mjerenja koncentracija seruma hormona štitnjače. Ako je moguće, ta dva mladunca po leglu trebale bi biti ženke kako bi se mužjaci sačuvali za procjenu zadržavanja bradavica osim ako uklanjanjem tih mladunaca više ne bi ostalo ženki za procjenu pri završetku ispitivanja. Mladunci se neće uklanjati ako bi se time veličina legla smanjila na manje od osam ili deset mladunaca po leglu (ovisno o uobičajenoj veličini legla kod soja štakora koji se upotrebljava). Ako je dostupan samo jedan mladunac povrh uobičajene veličine legla, uklanja se samo jedan mladunac i od njega se uzima krv za moguću procjenu seruma T4.

Opažanja uživo

Klinička opažanja

35. Tijekom cijelog razdoblja ispitivanja treba provoditi opća klinička opažanja barem jednom dnevno te češće ako se uoče znakovi toksičnosti. Poželjno ih je provoditi u isto vrijeme ili vremena svakog dana vodeći računa o razdoblju najvećeg intenziteta očekivanih učinaka nakon doziranja. Treba zabilježiti značajne promjene ponašanja, znakove otežane ili produljene parturicije i sve znakove toksičnosti, uključujući smrtnost. Te bi bilješke trebale uključivati vrijeme početka, stupanj i trajanje znakova toksičnosti.

Tjelesna masa i unos hrane/vode

36. Mužjake i ženke treba vagati prvog dana primjene doze, a zatim najmanje jednom tjedno i zadnji dan. Tijekom graviditeta ženke bi trebalo vagati 0., 7., 14. i 20. dana te u roku od 24

sata od parturicije (0. ili 1. dan nakon okota) te barem 4. i 13. dana nakon okota. Ta opažanja treba unijeti u izvješće za svaku odraslu životinju posebno.

37. Tijekom razdoblja prije parenja, graviditeta i laktacije unos hrane trebalo bi mjeriti najmanje jednom tjedno. Mjerenje unosa hrane tijekom parenja nije obvezno. Trebalo bi mjeriti i unos vode tijekom tih razdoblja ako se ispitivana kemikalija primjenjuje s vodom za piće.

Ciklusi estrusa

38. Cikluse estrusa trebalo bi pratiti prije početka tretiranja kako bi se za studiju izabrale ženke s uobičajenim ciklusom (vidjeti stavak 22.). Svakodnevno bi se trebali pratiti i vaginalni brisovi od početka razdoblja tretiranja do pojave znakova parenja. Ako postoji zabrinutost u pogledu učinaka akutnog stresa koji bi mogli izmijeniti cikluse estrusa kad se počnu primjenjivati doze, laboratoriji mogu izlagati ispitne životinje dva tjedna, zatim svaki dan prikupiti vaginalne brisove kako bi pratili ciklus estrusa najmanje dva tjedna tijekom razdoblja prije parenja, uz stalno praćenje tijekom razdoblja parenja do pojave znakova parenja. Ako se uzimaju vaginalne/cervikalne stanice, treba paziti da se ne poremeti mukoza jer to može inducirati lažnu trudnoću (7. i 8.).

Parametri potomaka

39. Vrijeme gestacije treba zabilježiti i računati od nultog dana graviditeta. Svako leglo nakon okota treba što prije pregledati kako bi se utvrdio broj i spol mladunaca, mrtvorodenih, živorodenih, patuljastih životinja (mladunci koji su znatno manji od odgovarajućih kontrolnih mladunaca) i prisutnost velikih abnormalnosti.
40. Žive mladunce trebalo bi prebrojati i odrediti njihov spol te bi legla trebalo izvagati u roku od 24 sata od parturicije (0. ili 1. dan nakon okota) te barem 4. i 13. dana nakon okota. Uz opažanja opisana u stavku 35. trebalo bi zabilježiti i svako abnormalno ponašanje potomaka.
41. Treba izmjeriti anogenitalni razmak u svakog mladunca na isti postnatalni dan, od nultog do 4. postnatalnog dana. Tjelesnu masu mladunaca treba utvrditi na dan mjerenja anogenitalnog razmaka, a njega treba normalizirati u odnosu na veličinu mladunca (najbolje kubni korijen tjelesne mase (9.)). Broj bradavica/areola u mužjaka mladunaca trebalo bi utvrditi 12. ili 13. postnatalnog dana, kako se preporučuje u Smjernici OECD-a 151 (10.).

Klinička biokemija

42. Uzorci krvi uzimaju se s utvrđenog mjesta na temelju sljedećeg rasporeda:

- od najmanje dva mladunca po leglu 4. dana nakon okota ako broj mladunaca to omogućuje (vidjeti stavke 33.–34.),

- od svih ženki (majki) i najmanje dva mladunaca po leglu pri završetku ispitivanja 13. dana, i
- od svih odraslih mužjaka pri završetku ispitivanja.

Svi uzorci krvi spremaju se u odgovarajućim uvjetima. Uzorci krvi mladunaca i odraslih mužjaka uzeti 13. dana procjenjuju se u pogledu razina seruma hormona štitnjače (T4). Daljnja procjena hormona T4 u uzorcima krvi ženki (majki) i mladunaca uzetih 4. dana obavlja se po potrebi. Moguće je i mjerenje drugih hormona ako je to relevantno. Krv mladunaca može se izvaditi po leglu radi analiza hormona štitnjače. Hormone štitnjače (T4 i TSH) po mogućnosti bi trebalo mjeriti kao „ukupni broj”.

43. Sljedeći čimbenici mogu utjecati na varijabilnost i apsolutne koncentracije za određivanje hormona:

- vrijeme usmrćivanja zbog dnevne varijacije koncentracije hormona,
- metoda usmrćivanja radi izbjegavanja pretjeranog stresa za životinje koji može utjecati na koncentraciju hormona,
- pribori za određivanje hormona koji se mogu razlikovati po njihovim standardnim krivuljama.

44. Uzorke plazme koji su posebno namijenjeni određivanju hormona treba uzeti u usporedivo doba dana. Brojčane vrijednosti dobivene analizom koncentracija hormona razlikuju se ovisno o različitom, komercijalno dostupnom priboru.

Patologija

Makroskopska nekropsija

45. U trenutku usmrćivanja ili u slučaju smrti tijekom istraživanja, odrasle životinje treba makroskopski pregledati radi otkrivanja bilo kakvih abnormalnosti ili patoloških promjena. Posebnu pozornost treba obratiti na organe reproduktivnog sustava. Broj mjesta za implantaciju treba zabilježiti. Vaginalne briseve treba pregledati ujutro na dan nekropsije kako bi se utvrdila faza ciklusa estrusa i omogućila korelacija s histopatologijom jajnika.
46. Sjemenike i sjemene kanaliće (epididimis) te prostatu i sjemene mjehuriće s koagulacijskim žlijezdama, kao cjelinu, svih odraslih mužjaka treba po potrebi obrezivanjem osloboditi od svih prijanjajućih tkiva te ih treba izvagati u mokrom stanju što prije nakon seciranja kako bi se spriječilo njihovo sušenje. Osim toga, mase neobaveznih organa mogle bi uključivati kompleks anusnog podizača i bulbokavernoznog mišića, Cowperove žlijezde i glans penisa kod mužjaka te jajnike u paru (mokra masa) i maternicu (uključujući cerviks) kod ženki; ako se uključuju, te bi mase trebalo prikupiti što prije nakon seciranja.

47. Mrtve mladunce i mladunce koje se usmrte 13. dana nakon okota, ili ubrzo nakon toga, trebalo bi pažljivo pregledati kako bi se utvrdile barem vanjske velike abnormalnosti. Posebnu pozornost treba posvetiti vanjskim reproduktivnim genitalijama koje se pregledava kako bi se utvrdili mogući znakovi promijenjenog razvoja. Na 13. bi se dan trebala sačuvati štitnjača jednog muškog i jednog ženskog mladunca po leglu.
48. Treba sačuvati jajnike, sjemenike, sekundarne spolne organe (maternica i cerviks, sjemeni kanalići, prostata, sjemeni mjehurići zajedno s koagulirajućim žlijezdama), štitnjaču i sve organe koji pokazuju makroskopske lezije svih odraslih životinja. Za rutinski pregled sjemenika i sjemenih kanalića ne preporučuje se fiksiranje u formalinu. Za ta je tkiva prihvatljiva metoda upotreba Bouinova fiksativa ili izmijenjenog Davidsonova fiksativa (11.). Vezivna ovojnica može se nježno i plitko punktirati na oba pola organa iglom koja omogućuje brzu penetraciju fiksativa.

Histopatologija

49. Treba obaviti detaljan histološki pregled jajnika, sjemenika i sjemenih kanalića (uz poseban naglasak na faze spermatogeneze i histopatologiju strukture intersticijskih stanica sjemenika) životinja iz skupine koja je primala najveću dozu i iz kontrolne skupine. Po potrebi se mogu pregledati i ostali sačuvani organi, uključujući štitnjaču mladunaca i odraslih životinja. Masa štitnjače može se odrediti nakon fiksacije. Obrezivanje također treba obaviti vrlo pažljivo te samo nakon fiksacije kako bi se izbjeglo oštećenje tkiva. Oštećena tkiva mogu kompromitirati histopatološku analizu. Ispitivanja treba proširiti na životinje iz drugih skupina doziranja ako su u skupini s najvećom dozom uočene promjene. Smjernice o histopatologiji (11.) pružaju dodatne detaljne informacije o sekciji, fiksaciji, seciranju i histopatologiji endokrinih tkiva.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Podaci

50. Treba navesti podatke za svaku pojedinačnu životinju. Osim toga, sve podatke treba sažeti u obliku tablice, tako da se za svaku ispitnu skupinu navede broj životinja na početku ispitivanja, broj životinja koje su uginule tijekom ispitivanja ili su usmrćene iz humanih razloga, vrijeme smrti ili humanog usmrćenja, broj plodnih životinja, broj gravidnih ženki, broj životinja koje pokazuju znakove toksičnosti, opis uočenih znakova toksičnosti, uključujući vrijeme prve pojave, trajanje i ozbiljnost toksičnih učinaka, vrste histopatoloških promjena i sve relevantne podatke o leglu. Format sažetog izvješća u obliku tablice koji se pokazao vrlo korisnim za procjenu reproduktivnog/razvojnog učinka naveden je u Dodatku 3.
51. Zbog ograničenih dimenzija istraživanja, statističke analize kojima se nastoji ispitati važnost rezultata imaju ograničenu vrijednost za mnoge krajnje točke, osobito za reproduktivne krajnje točke. Ako se upotrebljavaju statističke analize, odabrana metoda

trebala bi biti primjerena za distribuciju varijable koja se ispituje i treba je odabrati prije početka istraživanja. Statistička analiza anogenitalnog razmaka i zadržavanja bradavica trebala bi se temeljiti na podacima za pojedinačne mladunce, uzimajući u obzir učinke na leglo. Ako je primjereno, jedinicu analize čini leglo. Statistička analiza tjelesne mase mladunaca trebala bi se temeljiti na podacima za pojedinačne mladunce, uzimajući u obzir veličinu legla. Zbog toga što su skupine male, kao pomoć u tumačenju istraživanja mogu biti korisni podaci iz prijašnjih kontrola (npr. za veličinu legla) ako su dostupni.

Ocjena rezultata

52. Nalaze ovog istraživanja toksičnosti treba ocijeniti s obzirom na uočene učinke, nekropsiju i mikroskopske nalaze. Evaluacija treba obuhvatiti odnos između doze ispitivane kemikalije i prisutnosti ili izostanka, učestalosti i ozbiljnosti abnormalnosti, uključujući makrolezije, identificirane ciljne organe, neplodnost, kliničke abnormalnosti, promjene sposobnosti reprodukcije i legla, promjene tjelesne mase, učinke na smrtnost i sve ostale toksične učinke.
53. Zbog kratkog razdoblja tretiranja mužjaka, pri procjeni učinaka na reprodukciju mužjaka uz podatke o plodnosti trebalo bi razmotriti histopatologiju sjemenika i sjemenih kanalića. Kao pomoć u tumačenju istraživanja može biti korisna i upotreba podataka o prijašnjim kontrolama u vezi s reprodukcijom/razvojem (npr. za veličinu legla, anogenitalni razmak, zadržavanje bradavica, razine seruma T4) ako su dostupni.
54. Radi kontrole kvalitete predlaže se da se prikupljaju podaci o prijašnjim kontrolama te da se izračunaju koeficijenti varijacije za brojčane podatke, posebno za parametre povezane s otkrivanjem endokrinih ometača. Ti se podaci mogu upotrijebiti za uspoređivanje kad se ocjenjuju konkretna istraživanja.

Izvješće o ispitivanju

55. Izvješće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Ispitivana kemikalija:

- izvor, broj serije, rok uporabe, ako su dostupni,
- stabilnost ispitivane kemikalije, ako je poznata.

Tvar s jednim sastojkom:

- fizički izgled, topljivost u vodi i druga relevantna fizikalno-kemijska svojstva,
- kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv, CAS broj, SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula, čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.

Tvari s više sastojaka, UVCB tvari i smjese:

- opis (koliko je to moguće) kemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativnog udjela i relevantnih fizikalno-kemijskih svojstava sastojaka.

Nosač (po potrebi):

- obrazloženje odabira nosača ako nije riječ o vodi.

Ispitne životinje:

- korištena vrsta/soj,
- broj, dob i spol životinja,
- podrijetlo, uvjeti smještaja, prehrana itd.,
- pojedinačna tjelesna masa životinja na početku ispitivanja,
- obrazloženje odabira vrste ako se ne radi o štakorima.

Ispitni uvjeti:

- obrazloženje odabira visine doze,
- pojedinosti o formulaciji ispitivane kemikalije/pripremanju hrane, postignuta koncentracija, stabilnost i homogenost pripravka,
- pojedinosti o primjeni ispitivane kemikalije,
- preračunavanje koncentracije ispitivane kemikalije u hrani/vodi za piće (ppm) u stvarnu dozu (mg/kg tjelesne težine/dan), prema potrebi,
- pojedinosti o kvaliteti hrane i vode,
- detaljan opis postupka nasumičnog odabira mladunaca za izdvajanje ako se ono obavlja.

Rezultati:

- tjelesna masa/promjene tjelesne mase,
- unos hrane i unos vode, ako su dostupni,
- podaci o toksičnom odgovoru po spolu i dozi, uključujući plodnost, gestaciju i sve druge znakove toksičnosti,
- duljina gestacije,
- toksični ili drugi učinci na reprodukciju, potomstvo, rast nakon rođenja itd.,
- vrsta, stupanj i trajanje uočenih kliničkih promjena (reverzibilne ili ireverzibilne),
- broj odraslih ženki s normalnim ili abnormalnim ciklusom estrusa i trajanje ciklusa,
- broj živorođenih i gubitaka nakon implantacija,
- podaci o tjelesnoj masi mladunaca,

- anogenitalni razmak svih mladunaca (i tjelesna masa na dan mjerenja anogenitalnog razmaka),
- zadržavanje bradavica kod mužjaka mladunaca,
- razine hormona štitnjače, u mladunaca starih 13 dana i odraslih mužjaka (i u ženki (majki) i mladunaca starih 4 dana ako se mjeri),
- broj mladunaca s jako izraženim abnormalnostima, ukupna procjena vanjskih genitalija, broj patuljastih životinja,
- vrijeme smrti tijekom istraživanja ili je li životinja preživjela do kraja,
- broj implantacija, veličina i masa legla u trenutku evidentiranja,
- tjelesna masa u trenutku usmrćenja i podaci o masi organa za roditeljske životinje,
- nalazi nekropsije,
- iscrpan opis histopatoloških nalaza,
- podaci o apsorpciji (ako su dostupni),
- statistička obrada rezultata, prema potrebi.

Rasprava o rezultatima.

Zaključci.

Tumačenje rezultata

56. Istraživanjem će se pružiti procjene reproduktivne/razvojne toksičnosti povezane s primjenom ponovljenih doza (vidjeti stavke 5. i 6.). Mogla bi dati naznaku u vezi s tim treba li provesti daljnja ispitivanjima i daje smjernice za osmišljavanje naknadnih istraživanja. Za pomoć pri tumačenju rezultata u pogledu reprodukcije i razvoja (12.) treba pogledati Smjernicu OECD-a 43. U Smjernici OECD-a br. 106 o histološkoj procjeni endokrinih i reproduktivnih ispitivanja na glodavcima (11.) navedene su informacije o pripremi i procjeni (endokrinih) organa i vaginalnih brisova koje mogu biti korisne za ovu smjernicu za ispitivanje.

LITERATURA

1. OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Na zahtjev dostupno kod Organizacije za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
2. OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokio, 27–29. listopada 1992. Na zahtjev dostupno kod Organizacije za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
3. OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10. – 11. ožujka 1998. Na zahtjev dostupno kod Organizacije za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
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), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
5. OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations. Series on Testing and Assessment, (No 19), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
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), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
7. Goldman, J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M. and Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, Birth Defects Research, Part B, 80 (2), 84.–97.
8. Sadleir R.M.F.S (1979). Cycles and Seasons, in Auston C.R. and Short R.V. (eds.), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.
9. Gallavan R.H. Jr, Holson J.F., Stump D.G., Knapp J.F. and Reynolds V.L. (1999). Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights, Reproductive Toxicology, 13: 383.–390.
10. OECD (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment,

Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 151), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

11. OECD (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No106), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
12. OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 43), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

Dodatak 1.

DEFINICIJE (VIDJETI I SMJERNICU OECD-A 150 (6.))

Androgeni učinak je sposobnost kemikalije da djeluje kao prirodni androgeni hormon (npr. testosteron) u organizmu sisavaca.

Antiandrogeni učinak je sposobnost kemikalije da potiskuje djelovanje prirodnog androgenog hormona (npr. testosterona) u organizmu sisavaca.

Antiestrogeni učinak je sposobnost kemikalije da potiskuje djelovanje prirodnog estrogenog hormona (npr. estradiol 17 β) u organizmu sisavaca.

Antitiroidna aktivnost je sposobnost kemikalije da potiskuje djelovanje prirodnog hormona štitnjače (npr. T₃) u organizmu sisavaca.

Kemikalija je tvar ili smjesa.

Razvojna toksičnost: manifestacija reproduktivne toksičnosti koju čine prenatalni, postnatalni, strukturni ili funkcionalni poremećaji potomstva.

Doziranje je opći pojam koji obuhvaća dozu, njezinu učestalost i trajanje doziranja.

Doza je količina ispitivane kemikalije koja se primjenjuje. Doza se izražava kao masa ispitivane kemikalije po jedinici tjelesne mase ispitne životinje po danu (npr. mg/kg tjelesne mase po danu) ili kao stalna koncentracija u hrani.

Evidentna toksičnost je opći naziv koji opisuje jasne znakove toksičnosti nakon primjene ispitivane kemikalije. Ti bi znakovi trebali biti dovoljni za utvrđivanje opasnosti i trebaju biti takvi da se za primjenu povišene doze može očekivati da će rezultirati razvojem ozbiljnih znakova toksičnosti i mogućom smrtnošću.

Ometanje plodnosti čine poremećaji muških ili ženskih reproduktivnih funkcija ili reproduktivne sposobnosti.

Toksičnost kod majke: štetni učinci na gravidne ženke do kojih dolazi specifično (izravni učinak) ili nespecifično (neizravni učinak).

NOAEL je kratica za visinu doze bez vidljivih štetnih učinaka. To je najviša doza pri kojoj se ne opažaju nikakvi štetni učinci povezani s tretiranjem.

Estrogeni učinak je sposobnost kemikalije da djeluje kao prirodni estrogeni hormon (npr. estradiol 17 β) u organizmu sisavaca.

Reproduktivna toksičnost predstavlja štetne učinke na potomstvo i/ili oštećenje muške i ženske reproduktivne funkcije ili sposobnosti.

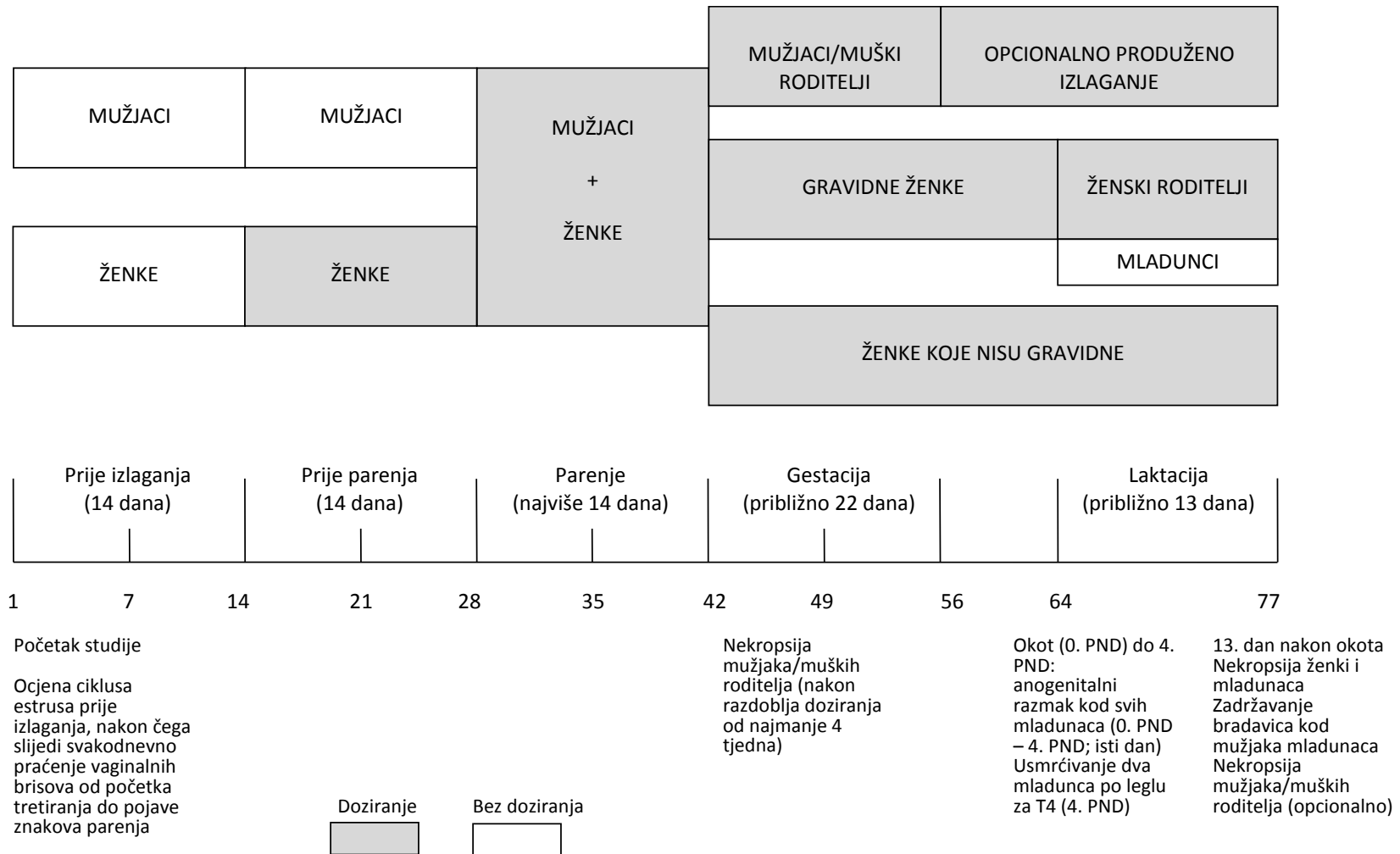
Ispitivana kemikalija je svaka tvar ili smjesa koja se ispituje ovom ispitnom metodom.

Tiroidna aktivnost je sposobnost kemikalije da djeluje kao prirodni hormon štitnjače (npr. T₃) u organizmu sisavaca.

Validacija je znanstveni postupak s ciljem karakterizacije operativnih zahtjeva i ograničenja ispitne metode te pokazivanja njezine pouzdanosti i relevantnosti za određenu svrhu.

Dodatak 2.

DIJAGRAM PLANA POKUSA IZ KOJEG SE VIDI MAKSIMALNO TRAJANJE STUDIJE, NA TEMELJU CIJELOG 14-DNEVNOG RAZDOBLJA PARENJA



Dodatak 3.

SAŽETO IZVJEŠĆE U OBLIKU TABLICE O UČINCIMA NA REPRODUKCIJU/RAZVOJ

OPAŽANJA	VRIJEDNOSTI				
Doziranje (jedinice)	0 (kontrola)	.. .	.. .	.. .	.. .
Formirani parovi (N)					
Ciklus estrusa (barem srednja vrijednost duljine i učestalost nepravilnih ciklusa)					
Ženke koje pokazuju znakove kopulacije (N)					
Ženke koje su postale gravidne (N)					
Dani začeća 1–5 (N)					
Dani začeća 6– . . . ⁽¹⁾ (N)					
Graviditet ≤ 21 dan (N)					
Graviditet = 22 dana (N)					
Graviditet ≥ 23 dana (N)					
Ženke (majke) sa živim mladuncima (N)					
Ženke (majke) sa živim mladuncima 4. dana nakon okota (N)					
Implantati po ženki (majci) (srednja vrijednost)					
Živi mladunci po ženki (majci) pri okotu (srednja vrijednost)					
Živi mladunci po ženki (majci) 4. dana (srednja vrijednost)					
Omjer spolova (m/ž) pri okotu (srednja vrijednost)					
Omjer spolova (m/ž) 4. dana (srednja vrijednost)					
Masa legla pri okotu (srednja vrijednost)					
Masa legla 4. dana (srednja vrijednost)					

⁽¹⁾ posljednji dan razdoblja parenja

Masa mladunaca pri okotu (srednja vrijednost)					
Masa mladunaca u trenutku mjerenja anogenitalnog razmaka (srednja vrijednost za mužjake i srednja vrijednost za ženke)					
Anogenitalni razmak na isti postnatalni dan, dan okota – 4. dan (srednja vrijednost za mužjake i ženke, naznaka postnatalnog dana)					
Masa mladunaca 4. dana (srednja vrijednost)					
Zadržavanje bradavica kod mužjaka mladunaca 13. dana (srednja vrijednost)					
Masa mladunaca 13. dana (srednja vrijednost)					
ABNORMALNI MLADUNCI					
Ženke (majke) s 0					
Ženke (majke) s 1					
Ženke (majke) s ≥ 2					
GUBITAK POTOMAKA					
Prenatalno/nakon implantacije (implantacije umanjene za broj živorođenih)					
Ženke s 0					
Ženke s 1					
Ženke s 2					
Ženke s ≥ 3					
Postnatalno (broj živorođenih umanjen za broj živih mladunaca 13. dana nakon okota)					
Ženke s 0					
Ženke s 1					
Ženke s 2					
Ženke s ≥ 3					

B.64. KOMBINIRANO ISTRAŽIVANJE TOKSIČNOSTI S PONOVLJENIM DOZAMA S TESTOM PROBIRA ZA REPRODUKTIVNU/RAZVOJNU TOKSIČNOST

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 422 (TG) (2016.). Smjernice OECD-a za ispitivanje kemikalija periodično se preispituju uzimajući u obzir znanstveni napredak. Izvorna smjernica za test probira 422 donesena je 1996. na temelju protokola za kombinirani test s ponovljenim dozama i testa probira za reproduktivnu/razvojnu toksičnost o kojem se raspravljalo na dva sastanka stručnjaka u Londonu 1990. (1.) i Tokiju 1992. (2.).
2. U ovoj se ispitnoj metodi kombinira dio koji se odnosi na probir za reproduktivnu/razvojnu toksičnost, koji se temelji na iskustvu koje su zemlje članice stekle upotrebom izvorne metode o postojećim kemikalijama koje se proizvode u velikim količinama i na temelju istraživačkih ispitivanja s tvarima za pozitivnu kontrolu (3. i 4.), te dio koji se odnosi na toksičnost s ponovljenim dozama, u skladu sa Smjernicom OECD-a za ispitivanje 407 (28-dnevno ispitivanje oralne toksičnosti na glodavcima uz primjenu ponovljenih doza; odgovara poglavlju B.7. ovog Priloga).
3. Ova je ispitna metoda ažurirana relevantnim krajnjim točkama endokrinih ometača, kao nastavno djelovanje na aktivnost visokog prioriteta koju je OECD pokrenuo 1998. kako bi revidirao postojeće smjernice za ispitivanje i razvio nove smjernice za probir i ispitivanje potencijalnih endokrinih ometača (5.). U tom kontekstu Smjernica za ispitivanje 407 (koja odgovara poglavlju B.7. ovog Priloga) poboljšana je 2008. parametrima koji su primjereni za otkrivanje endokrine aktivnosti ispitivanih kemikalija. Ažuriranjem Smjernice za ispitivanje 422 nastojalo se uključiti određene relevantne krajnje točke endokrinih ometača u ispitne smjernice za probir kod kojih razdoblja izlaganja obuhvaćaju neka od osjetljivih razdoblja tijekom razvoja (prenatalna razdoblja ili rana postnatalna razdoblja).
4. Odabrane dodatne relevantne krajnje točke endokrinih ometača, koje su i dio Smjernice za ispitivanje 443 (produljena studija reproduktivne toksičnosti na jednoj generaciji, koja odgovara poglavlju B.56. ovog Priloga), uključeni su u Smjernicu za ispitivanje 422 na temelju studije izvedivosti koja se bavi znanstvenim i tehničkim pitanjima povezanim s njihovim uključivanjem te mogućim prilagodbama plana ispitivanja koje su potrebne za njihovo uključivanje (6.).
5. Ova je ispitna metoda osmišljena za dobivanje ograničenih informacija o učincima ispitivane kemikalije na reproduktivnost mužjaka i ženki, kao što su funkcija gonada, ponašanje kod parenja, začecje, razvoj zametka i parturicija. Ona nije alternativa i ne zamjenjuje postojeće ispitne metode B.31., B.34., B.35. ili B.56.

POČETNA RAZMATRANJA

6. Pri procjeni i ocjenjivanju toksičnih svojstava ispitivane kemikalije određivanje oralne toksičnosti uz primjenu ponavljanih doza može se provesti nakon dobivanja početnih informacija o toksičnosti iz ispitivanja akutne toksičnosti. To istraživanje pruža informacije o mogućim opasnostima po zdravlje do kojih bi moglo doći zbog ponovljenog izlaganja tijekom relativno ograničenog vremenskog razdoblja. Ta metoda obuhvaća osnovno istraživanje toksičnosti s ponovljenim dozama koje se može upotrijebiti za kemikalije za koje nije opravdano 90-dnevno istraživanje (npr. ako proizvedena količina ne prelazi određene granice) ili kao preliminarno istraživanje za dugotrajno istraživanje. Pri provođenju istraživanja treba slijediti osnovna načela i razmatranja navedena u OECD-ovoj Smjernici br. 19 o priznavanju, procjeni i korištenju kliničkih znakova kao humanih krajnjih točaka za pokusne životinje koje se upotrebljavaju u ocjenama sigurnosti (7.).
7. Nadalje, obuhvaća test probira za reproduktivnu/razvojnu toksičnost i stoga se može upotrebljavati i za dobivanje početnih informacija o mogućim učincima na mušku i žensku reproduktivnu uspješnost kao što su funkcija gonada, ponašanje kod parenja, začeće, razvoj zametka i parturicija, u ranoj fazi procjene toksikoloških svojstava ispitivanih kemikalija ili za zabrinjavajuće ispitivane kemikalije. Ovom se ispitnom metodom ne dobivaju potpune informacije o svim aspektima reprodukcije i razvoja. Točnije, metoda pruža samo ograničena sredstva za otkrivanje postnatalnih manifestacija prenatalnog izlaganja ili učinaka koji se mogu inducirati tijekom postnatalnog izlaganja. Zbog (među ostalim) selektivnosti krajnjih točaka i kratkog trajanja istraživanja ovom metodom neće se dobiti dokazi za konačne tvrdnje o nepostojanju reproduktivnih/razvojnih učinaka. Osim toga, ako ne postoje podaci iz drugih ispitivanja reproduktivne/razvojne toksičnosti, pozitivni rezultati korisni su za početnu procjenu opasnosti i pridonose odlukama u pogledu potrebe za dodatnim ispitivanjem i njegova vremenskog okvira.
8. Rezultate dobivene parametrima povezanima s endokrinim sustavom treba promatrati u kontekstu „OECD-ova konceptualnog okvira za ispitivanje i procjenu endokrino disruptivnih kemikalija” (8.). U tom konceptualnom okviru poboljšana Smjernica OECD-a za ispitivanje 422 nalazi se na razini 4. kao *in vivo* test i pruža podatke o štetnim učincima na relevantne endokrine krajnje točke. Međutim, endokrini signal ne mora se sam po sebi smatrati dovoljnim dokazom da je ispitivana kemikalija endokrini ometač.
9. Ova ispitna metoda naglasak stavlja i na neurološke učinke kao specifičnu krajnju točku, a naglašava i potrebu za pozornim kliničkim opažanjem životinja kako bi se dobilo što više informacija. Cilj je ove metode identificirati kemikalije koje imaju neurotoksički potencijal, što može zahtijevati daljnja detaljna istraživanja tog aspekta. Osim toga, metoda može pokazati i osnovne imunološke učinke.
10. Ako ne postoje podaci iz drugih istraživanja sustavne toksičnosti, reproduktivne/razvojne toksičnosti, neurotoksičnosti i/ili imunotoksičnosti, pozitivni rezultati korisni su za početnu procjenu opasnosti i pridonose odlukama u pogledu potrebe za dodatnim ispitivanjem i

njegova vremenskog okvira. Ispitivanje može biti osobito korisno kao dio OECD-ova podatkovnog skupa za informacije o probiru (SIDS) za procjenu postojećih kemikalija za koje je dostupno malo ili nimalo toksikoloških informacija i može služiti kao alternativa provođenju dvaju zasebnih ispitivanja toksičnosti s ponovljenim dozama (Smjernica OECD-a za ispitivanje 407, koja odgovara poglavlju B.7. ovog Priloga) odnosno reproduktivne/razvojne toksičnosti (Smjernica OECD-a za ispitivanje 421, koja odgovara poglavlju B.63. ovog Priloga). Može se upotrebljavati i kao istraživanje o utvrđivanju raspona doze za opsežnija reproduktivna/razvojna istraživanja ili ako se smatra relevantnim iz drugih razloga.

11. Općenito se pretpostavlja da postoje razlike u osjetljivosti između gravidnih životinja i onih koje nisu gravidne. Stoga u ovom kombiniranom testu može biti teže odrediti visine doza koje su primjerene i za procjenu opće sustavne toksičnosti i specifične reproduktivne/razvojne toksičnosti nego kod zasebnog provođenja pojedinačnih ispitivanja. Nadalje, tumačenje rezultata ispitivanja u pogledu opće sustavne toksičnosti može biti teže nego kod provođenja zasebnog istraživanja s ponovljenim dozama, osobito ako se serumski i histopatološki parametri ne procjenjuju u isto vrijeme tijekom istraživanja. Zbog te tehničke složenosti za provođenje ovog kombiniranog testa probira potrebno je znatno iskustvo u području ispitivanja toksičnosti. S druge strane, osim manjeg broja životinja koje sudjeluju, kombinirani test može pružiti bolji način za razlikovanje izravnih učinaka na reprodukciju/razvoj od učinaka koji su sekundarni u odnosu na druge (sustavne) učinke.
12. U ovom je ispitivanju razdoblje doziranja dulje nego kod uobičajenog 28-dnevnog istraživanja s ponovljenim dozama. Međutim, upotrebljava se manje životinja svakog spola po skupini u usporedbi sa situacijom u kojoj se uz test probira za reproduktivnu/razvojnu toksičnost provodi uobičajeno 28-dnevno istraživanje s ponovljenim dozama.
13. U ovoj ispitnoj metodi pretpostavlja se oralna primjena ispitivane kemikalije. Ako se upotrebljavaju drugi načini izlaganja, mogu biti potrebne prilagodbe.
14. Prije nego što se ova ispitna metoda primijeni na smjesi radi dobivanja podataka za predviđenu regulatornu svrhu, potrebno je razmotriti mogu li se te, ako se mogu, zašto se njome mogu dobiti primjereni rezultati za tu svrhu. Ta razmatranja nisu potrebna ako postoji regulatorni zahtjev za ispitivanje smjese.
15. Upotrijebljene definicije navedene su u Dodatku 1.

NAČELO ISPITIVANJA

16. Ispitivana kemikalija primjenjuje se u gradiranim dozama na nekoliko skupina mužjaka i ženki. Na mužjake treba primjenjivati dozu najmanje četiri tjedna, do dana i uključujući dan prije planiranog usmrćivanja (to uključuje najmanje dva tjedna prije parenja, tijekom

razdoblja parenja i približno dva tjedna poslije parenja). S obzirom na ograničeno razdoblje doziranja prije parenja u mužjaka, plodnost možda neće biti osobito osjetljiv pokazatelj testikularne toksičnosti. Stoga je od ključne važnosti detaljan histološki pregled sjemenika. Kombinacija razdoblja doziranja prije parenja od dva tjedna i naknadno promatranje parenja/plodnosti s ukupnim razdobljem doziranja od najmanje četiri tjedna, nakon čega slijedi detaljna histopatologija muških gonada smatraju se dovoljnim da bi se omogućilo otkrivanje većine učinaka na plodnost mužjaka i spermatogenezu.

17. Ženkama dozu treba davati tijekom cijelog istraživanja. To uključuje dva tjedna prije parenja (pri čemu je cilj obuhvatiti najmanje dva cijela ciklusa estrusa), promjenjivo vrijeme do začeća, trajanje graviditeta i najmanje 13 dana nakon okota, do dana i uključujući dan prije planiranog usmrćivanja.
18. Trajanje istraživanja, nakon aklimatizacije i procjene ciklusa estrusa prije doziranja, ovisi o ponašanju ženki i iznosi približno 63 dana [najmanje 14 dana prije parenja, (do) 14 dana parenja, 22 dana gestacije, 13 dana laktacije].
19. Tijekom razdoblja primjene životinje se svakodnevno pažljivo promatraju radi uočavanja znakova toksičnosti. Životinje koje ugibaju ili su usmrćene tijekom ispitivanja podvrgavaju se obdukciji, a na kraju ispitivanja preživjele se životinje usmrćuju i podvrgavaju obdukciji.

OPIS METODE

Odabir životinjske vrste

20. Ova ispitna metoda osmišljena je za upotrebu na štakorima. Ako se parametri navedeni u ovoj Smjernici za ispitivanje 422 istražuju na drugoj vrsti glodavaca, treba pružiti detaljno obrazloženje. U međunarodnom validacijskom programu za određivanje endokrinih ometača o Smjernici za ispitivanje 407 primjenjivali su se samo štakori. Sojeve slabe plodnosti ili poznate po velikoj učestalosti razvojnih defekata ne bi trebalo koristiti. Treba koristiti zdrave životinje koje se prethodno nisu parile i nisu sudjelovale u pokusima. Ispitne životinje treba opisati u pogledu vrste, soja, spola, mase i dobi. Na početku istraživanja razlike u tjelesnoj masi korištenih životinja trebale bi biti minimalne i ne bi trebale prelaziti ± 20 % srednje vrijednosti tjelesne mase svakog spola. Ako se istraživanje provodi kao preliminarno istraživanje u odnosu na dugotrajno istraživanje ili istraživanje cijele generacije, prednost se daje primjeni životinja istog soja i podrijetla u oba istraživanja.

Smještaj i hranjenje

21. Svi postupci trebaju biti usklađeni s lokalnim standardima brige o životinjama u laboratoriju. Temperatura u prostoriji u kojoj se drže pokusne životinje treba biti 22 °C (± 3 °C). Relativna vlaga trebala bi iznositi najmanje 30 %, a poželjno je da ne prelazi

70 %, osim tijekom čišćenja prostorije. Rasvjeta treba biti umjetna uz izmjenu 12 sati svjetla i 12 sati mraka. Za hranjenje se može upotrebljavati konvencionalna laboratorijska hrana uz neograničenu količinu vode za piće. Na izbor prehrane može utjecati potreba da se osigura odgovarajuća mješavina ispitivane kemikalije kad se ona daje na taj način.

22. Životinje trebaju biti smještene u malim skupinama istoga spola; ako je to znanstveno opravdano, životinje se mogu držati u zasebnim nastambama. U slučaju skupnog smještaja, u jednom kavezu ne smije biti smješteno više od pet životinja. Postupci parenja trebali bi se odvijati u kavezima koji odgovaraju toj svrsi. Gravidne ženke treba smjestiti u posebne kaveze i treba im osigurati materijale za izradu gnijezda. Ženke se tijekom laktacije smještaju pojedinačno s njihovom mladunčadi.
23. Treba redovito analizirati ima li u hrani kontaminanata. Uzorak hrane treba sačuvati do kraja izrade izvješća.

Priprema životinja

24. Zdrave, mlade odrasle životinje nasumce se odabiru i raspoređuju u skupine za tretiranje i kaveze. Kaveze bi trebalo rasporediti tako da se učinci do kojih bi moglo doći zbog položaja kaveza svedu na minimum. Životinje se označuju na jedinstven način i drže u kavezima najmanje pet dana prije početka istraživanja kako bi se prilagodile laboratorijskim uvjetima.

Priprema doza

25. Preporučuje se da se ispitivana kemikalija daje oralno osim ako se neki drugi načini primjene smatraju prikladnijima. Ako se odabere oralna primjena, ispitivana kemikalija obično se daje oralnom intubacijom; međutim, u određenim slučajevima, ispitivane kemikalije mogu se primijeniti i s hranom ili vodom za piće.
26. Prema potrebi, ispitivana se kemikalija otapa ili suspendira u odgovarajućem nosaču. Kad je god moguće, preporuča se najprije razmotriti mogućnost primjene vodene otopine/suspenzije, zatim mogućnost primjene otopine/suspenzije u ulju (npr. kukuruzno ulje) i tek na kraju mogućnost otapanja u ostalim nosačima. Za nosače bez vodene otopine moraju biti poznata toksična svojstva nosača. Treba utvrditi stabilnost i homogenost ispitivane kemikalije u nosaču.

POSTUPAK

Broj i spol životinja

27. Preporučuje se da se u svakoj skupini započne s najmanje deset mužjaka i 12–13 ženki. Ženke će se prije izlaganja procijeniti u pogledu ciklusa estrusa pa se životinje koje ne pokažu uobičajeni ciklus od četiri do pet dana neće uključiti u istraživanje; stoga se preporučuje više ženki kako bi se dobilo deset ženki po skupini. Osim u slučaju znatnih

toksičnih učinaka, očekuje se da će se tako dobiti najmanje osam gravidnih ženki po skupini, a to je obično najmanji prihvatljivi broj gravidnih ženki po skupini. Cilj je dobiti dovoljno gravidnih životinja i potomaka kako bi se osigurala valjana procjena potencijala ispitivane kemikalije da utječe na plodnost, gravidnost, ponašanje ženki (majki) i potomaka koji sišu te rast i razvoj potomstva F₁ od začeca do 13. dana nakon okota. Ako se planira usmrćivanje životinja u međuvremenu, navedeni broj treba povećati za broj životinja predviđenih za usmrćivanje prije završetka istraživanja. Treba razmotriti mogućnost uključivanja dodatne satelitske skupine od pet životinja svakoga spola u kontrolnu skupinu i skupinu koja će primiti najvišu dozu radi opažanja reverzibilnosti, postojanosti ili zakašnjelog nastupa sustavnih toksičnih učinaka najmanje 14 dana nakon tretiranja. Životinje iz satelitskih skupina neće se pariti i stoga se ne upotrebljavaju za procjenu reproduktivne/razvojne toksičnosti.

Doziranje

28. Općenito, treba upotrijebiti najmanje tri ispitne skupine i jednu kontrolnu skupinu. Ako nisu dostupni prikladni podaci o općoj toksičnosti, može se provesti istraživanje o utvrđivanju raspona (životinje istog soja i podrijetla) kako bi se pomoglo pri određivanju visina doze koje će se primjenjivati. Osim tretiranja ispitivanom kemikalijom, sa životinjama u kontrolnoj skupini treba postupati na isti način kao sa životinjama iz ispitne skupine. Ako se pri primjeni ispitivane kemikalije koristi nosač, volumen nosača koji primi kontrolna skupina treba biti jednak najvećem upotrijebljenom volumenu.
29. Visine doza treba odabrati uzimajući u obzir sve postojeće podatke o toksičnosti i (toksiko)kinetici koji su dostupni. Treba uzeti u obzir i da je moguća razlika u osjetljivosti između gravidnih ženki i ženki koje nisu gravidne. Najvišu dozu treba odabrati s ciljem induciranja toksičnih učinaka, ali ne i smrti ili očite patnje. Nakon toga, treba odabrati slijed postupnog smanjivanja visine doze kako bi se dokazali svi odgovori povezani s doziranjem te da kod najniže doze nema štetnih učinaka. Često je optimalno doze primijeniti u dvostrukim do četverostrukim intervalima te je često bolje dodati i četvrtu ispitnu skupinu nego između primjene doza koristiti veoma velike vremenske intervale (npr. iznad faktora 10).
30. Ako se opaze znakovi opće toksičnosti (npr. smanjena tjelesna masa, učinci na jetri, srcu, plućima ili bubrezima itd.) ili druge promjene koje ne moraju biti toksični odgovori (npr. smanjeno uzimanje hrane, povećanje jetre), uočene učinke na endokrinim krajnjim točkama treba tumačiti s oprezom.

Granični test

31. Ako istraživanje provedeno oralnom primjenom jedne doze od najmanje 1 000 mg/kg tjelesne mase na dan ili, kod davanja doze s hranom, primjenom doze koja se u ekvivalentnom postotku daje s hranom ili vodom za piće (na temelju određivanja tjelesne

mase), u skladu s postupcima opisanima za ovo istraživanje, ne proizvede uočljive toksične učinke i ako na temelju podataka iz strukturno srodnih tvari ne treba očekivati toksičnost, može se smatrati da provođenje potpunog istraživanja s nekoliko visina doza nije neophodno. Granični test je relevantan samo ako izloženost ljudi ne ukazuje na potrebu za primjenom veće doze. Za druge vrste primjene doza, kao što su inhalacija ili dermalna primjena, maksimalno izlaganje koje se može postići često je određeno fizikalno-kemijskim svojstvima ispitivanih kemikalija.

Primjena doza

32. Životinjama se svakodnevno daje ispitivana kemikalija sedam dana tjedno. U slučaju primjene oralnom intubacijom ispitivanu kemikaliju treba dati životinjama u jednoj dozi s pomoću želučane sonde ili prikladne intubacijske kanile. Maksimalni volumen tekućine koji se može jednokratno dati ovisi o veličini ispitne životinje. Taj volumen ne smije biti veći od 1 ml/100 g tjelesne mase, osim kad se radi o vodenim otopinama koje dopuštaju primjenu volumena od 2 ml/100 g tjelesne mase. Osim u slučaju nadražujućih ili nagrizajućih ispitivanih kemikalija kod kojih se štetni učinci obično javljaju pri višim koncentracijama, varijabilnost ispitnog volumena treba prilagođavanjem koncentracije svesti na najmanju moguću mjeru kako bi se zajamčio stalni volumen pri svim visinama doza.
33. Kod ispitivanih kemikalija koje se primjenjuju s hranom ili vodom za piće važno je osigurati da količine ispitivane kemikalije ne utječu na uravnoteženi unos hrane ili vode. Kad se ispitivana kemikalija daje s hranom, može se koristiti ili stalna koncentracija u odnosu na količinu hrane (ppm) ili stalna visina doze u odnosu na tjelesnu masu životinje; treba navesti iskorištenu opciju. Za ispitivanu kemikaliju koja se daje oralnom intubacijom, dozu treba davati u podjednako vrijeme ili vremena svakog dana i prilagoditi je najmanje jednom tjedno kako bi se održala stalna visina doze s obzirom na tjelesnu masu životinje. Kad se prije dugotrajnog ili potpunog istraživanja reproduktivne toksičnosti provodi kombinirano preliminarno istraživanje, u oba istraživanja prehrana životinja treba biti slična.

Plan pokusa

34. Doziranje životinja oba spola trebalo bi započeti dva tjedna prije parenja, nakon aklimatizacije od najmanje pet dana te nakon što se ženke proberu u pogledu normalnog ciklusa estrusa (u razdoblju od dva tjedna prije tretiranja). Istraživanje treba planirati tako da procjena ciklusa estrusa počne ubrzo nakon što životinje postignu punu spolnu zrelost. To se može malo razlikovati za različite sojeve štakora u različitim laboratorijima, npr. deset tjedana kod štakora soja Sprague Dawley i 12 tjedana kod soja Wistar. Ženke (majke) s potomstvom trebalo bi usmrtniti 13. dana nakon okota ili ubrzo nakon toga. Kako bi se omogućio post ženki (majki) preko noći prije uzimanja krvi (ako se prednost daje toj opciji), ženke i njihovi potomci ne moraju se nužno usmrtniti istog dana. Dan okota (tj. kada

se dovrši parturicija) definira se kao nulti dan nakon okota. Ženke koje ne pokazuju znakove kopulacije usmrćuju se 24–26 dana nakon posljednjeg dana razdoblja parenja. Doziranje se nastavlja kod oba spola tijekom razdoblja parenja. Mužjake bi i dalje trebalo dozirati nakon razdoblja parenja barem dok ne istekne ukupno razdoblje doziranja od 28 dana. Zatim se usmrćuju ili se zadržavaju i nastavljaju dozirati radi mogućeg provođenja drugog parenja ako se to smatra primjerenim.

35. Svakodnevno doziranje roditeljskih ženki trebalo bi se nastaviti tijekom cijele gravidnosti i najmanje do 13. dana nakon okota, uključujući i taj dan, ili dan prije usmrćivanja. Kod istraživanja u kojima se ispitivana kemikalija primjenjuje inhalacijom i/ili dermalnim putem doziranje bi se trebalo nastaviti barem do 19. dana gestacije, uključujući i taj dan, i s doziranjem bi se trebalo ponovno početi što prije, a najkasnije na 4. postnatalni dan (PND).
36. Životinje u satelitskoj skupini za koje se planira naknadno opažanje, ako su uključene, ne pare se. One se trebaju držati još najmanje 14 dana nakon prvog planiranog usmrćivanja ženki (majki), bez tretiranja, kako bi se otkrili zakašnjeni toksični učinci, postojanost toksičnih učinaka ili oporavak od toksičnih učinaka.
37. Dijagram plana pokusa prikazan je u Dodatku 2.

Ciklusi estrusa

38. Cikluse estrusa trebalo bi pratiti prije početka tretmana kako bi se za istraživanje odabrale ženke s uobičajenim ciklusom (vidjeti stavak 27.). Svakodnevno bi se trebali pratiti i vaginalni brisovi od početka razdoblja tretiranja do pojave znakova parenja. Ako postoji zabrinutost u pogledu učinaka akutnog stresa koji bi mogli izmijeniti cikluse estrusa kad se počnu primjenjivati doze, laboratoriji mogu izlagati ispitne životinje dva tjedna, zatim svaki dan prikupiti vaginalne brisove kako bi pratili ciklus estrusa najmanje dva tjedna tijekom razdoblja prije parenja, uz stalno praćenje tijekom razdoblja parenja do pojave znakova parenja. Ako se uzimaju vaginalne/cervikalne stanice, treba paziti da se ne poremeti mukoza, što bi moglo inducirati lažnu trudnoću (8. i 9.).

Postupak parenja

39. U ovom bi se istraživanju obično trebala upotrebljavati parenja 1:1 (jedan mužjak na jednu ženku). Iznimke se mogu javiti ako dođe do smrti mužjaka. Ženku bi trebalo smjestiti s istim mužjakom dok se ne uoče znakovi kopulacije ili dok ne isteknu dva tjedna. Svako jutro ženke treba pregledati u pogledu prisutnosti sperme ili vaginalnog čepa. Nultim danom graviditeta smatra se dan kad je potvrđeno parenje (pronađen je vaginalni čep ili sperma). Ako je parenje bilo neuspješno, može se razmotriti mogućnost ponovnog parenja ženki s dokazanim mužjacima iste skupine.

Veličina legla

40. Četiri dana nakon okota veličina svakog legla može se prilagoditi nasumičnim selekcijskim uklanjanjem suvišnih mladunaca tako da se po jednom leglu po mogućnosti ostavi četiri ili pet mladunaca svakog spola ovisno o uobičajenoj veličini legla soja štakora koji se upotrebljavaju. Uzorke krvi treba prikupiti od dva suvišna mladunca, objediniti ih i upotrijebiti za određivanje razina seruma T4. Nije prihvatljivo selektivno uklanjanje mladunaca, npr. prema tjelesnoj masi ili anogenitalnom razmaku. Kad je god broj muških ili ženskih mladunaca takav da nije moguće imati četiri ili pet mladunaca svakog spola po leglu, prihvatljivo je djelomično prilagođavanje (npr. šest mužjaka i četiri ženke). Mladunci se ne uklanjaju ako bi se veličina legla time smanjila ispod cilja izdvajanja mladunaca (osam ili deset mladunaca po leglu). Ako je dostupan samo jedan mladunac povrh cilja izdvajanja mladunaca, uklanja se samo jedan mladunac i od njega se uzima krv za moguću procjenu seruma T4.
41. Ako se veličina legla ne prilagođava, 4. dana nakon okota usmrćuju se dva mladunca po leglu i uzimaju se uzorci krvi radi mjerenja koncentracija seruma hormona štitnjače. Ako je moguće, ta dva mladunca po leglu trebale bi biti ženke kako bi se mužjaci sačuvali za procjenu zadržavanja bradavica, osim ako uklanjanjem tih mladunaca više ne bi ostalo ženki za procjenu pri završetku ispitivanja. Mladunci se neće uklanjati ako bi se time veličina legla smanjila na manje od osam ili deset mladunaca po leglu (ovisno o uobičajenoj veličini legla kod soja štakora koji se upotrebljava). Ako je dostupan samo jedan mladunac povrh uobičajene veličine legla, uklanja se samo jedan mladunac i od njega se uzima krv za moguću procjenu seruma T4.

Opažanja

42. Opća klinička opažanja treba provoditi najmanje jednom dnevno, po mogućnosti svaki dan u isto vrijeme ili vremena, vodeći računa o razdoblju najvećeg intenziteta očekivanih učinaka nakon doziranja. Zdravstveno stanje životinja treba zabilježiti. Barem dvaput dnevno sve životinje treba pregledati radi otkrivanja mogućih simptoma morbiditeta i smrtnosti.
43. Jednom prije prvog izlaganja i barem jednom tjedno nakon toga treba obaviti detaljno kliničko opažanje stanja svih roditeljskih životinja (to će omogućiti utvrđivanje promjena u stanju istih subjekata). Ta opažanja treba obavljati izvan kaveza u kojima se životinje drže, u standardnom ograđenom prostoru i, po mogućnosti, svaki dan u isto vrijeme. Rezultate opažanja treba pažljivo bilježiti, pri čemu je najbolje koristiti se sustavom ocjenjivanja koji je jasno definirao laboratorij koji obavlja ispitivanje. Treba poduzeti sve što je potrebno kako bi se osiguralo da odstupanja u uvjetima ispitivanja budu minimalna te da opažanja po mogućnosti provode promatrači koji nisu upoznati s tretiranjem. Znakovi koji se bilježe trebaju, među ostalim, uključivati promjene na koži, dlaci, očima, sluznicama, pojavu iscjedaka, izlučine i autonomne aktivnosti (npr. lakrimacija (lučenje suza), piloerekcija, veličina zjenica, nepravilnosti u disanju). Treba zabilježiti i promjene u hodu, držanju i

reakcijama na postupanje sa životinjama, kao i pojavu kloničkih ili toničkih pokreta, stereotipije (npr. pretjerano njegovanje krzna, ponavljano kretanje u krug), otežane ili produljene parturicije ili neobičnog ponašanja (npr. samoozljeđivanje, hodanje unatrag) (10.).

44. U određenom trenutku tijekom istraživanja treba procijeniti osjetilnu reaktivnost na podražaje raznih vrsta (npr. auditivne, vizualne i proprioceptivne podražaje) (8., 9. i 11.), jakost stiska (12.) i motornu aktivnost (13.) u pet mužjaka i pet ženki nasumično odabranih iz svake skupine. Daljnje pojedinosti o postupcima koji se mogu primjenjivati navedene su u odgovarajućoj referentnoj literaturi. Međutim, mogu se primjenjivati i drugi postupci koji nisu u njoj navedeni. Kod mužjaka bi se ta funkcionalna opažanja trebala provoditi pred kraj razdoblja doziranja, neposredno prije planiranog usmrćivanja, ali prije uzimanja uzoraka krvi za hematologiju ili kliničku kemiju (vidjeti stavke 53.–56., uključujući bilješku 1.). Ženke bi tijekom tih funkcionalnih ispitivanja trebale biti u fiziološki sličnom stanju i po mogućnosti bi ih trebalo ispitati jednom tijekom posljednjeg tjedna laktacije (npr. od 6. do 13. dana laktacije), neposredno prije planiranog usmrćivanja. Vrijeme razdvajanja ženki (majki) i mladunaca trebalo bi se smanjiti u mjeri u kojoj je to moguće.
45. Funkcionalna opažanja koja se obavljaju jednom pred kraj istraživanja mogu se izostaviti ako se istraživanje provodi kao preliminarno istraživanje za naknadno (90-dnevno) istraživanje subkroničnosti ili dugotrajno istraživanje. U tom slučaju funkcionalna opažanja treba uključiti u to sljedeće istraživanje. S druge strane, dostupnost podataka o funkcionalnim opažanjima iz tog istraživanja uz primjenu ponovljenih doza može biti od pomoći pri odabiru visina doza u naknadnom istraživanju subkroničnosti ili dugotrajnom istraživanju.
46. U iznimnim slučajevima funkcionalna opažanja mogu izostati i kod skupina koje inače pokazuju simptome toksičnosti do mjere koja bi znatno ometala uspješnost funkcionalnog ispitivanja.
47. Vrijeme gestacije treba zabilježiti i računati od nultog dana graviditeta. Svako leglo nakon okota treba što prije pregledati kako bi se utvrdio broj i spol mladunaca, mrtvorodenih, živorodenih, patuljastih životinja (mladunci koji su znatno manji od odgovarajućih kontrolnih mladunaca) i prisutnost velikih abnormalnosti.
48. Žive mladunce trebalo bi prebrojati i odrediti njihov spol te bi legla trebalo izvagati u roku od 24 sata od parturicije (0. ili 1. dan nakon okota) te barem 4. i 13. dana nakon okota. Uz opažanja roditeljskih životinja (vidjeti stavke 43. i 44.) trebalo bi zabilježiti i svako abnormalno ponašanje potomaka.
49. Treba izmjeriti anogenitalni razmak u svakog mladunca na isti postnatalni dan, od nultog do 4. postnatalnog dana. Tjelesnu masu mladunaca treba utvrditi na dan mjerenja anogenitalnog razmaka, a njega treba normalizirati u odnosu na veličinu mladunca

(najbolje kubni korijen tjelesne mase (14.)). Broj bradavica/areola u mužjaka mladunaca trebalo bi utvrditi 12. ili 13. postnatalnog dana, kako se preporučuje u Smjernici OECD-a 151 (15.).

Tjelesna masa i unos hrane/vode

50. Mužjake i ženke treba vagati prvog dana primjene doze, a zatim najmanje jednom tjedno i zadnji dan. Tijekom graviditeta ženke bi trebalo vagati 0., 7., 14. i 20. dana te u roku od 24 sata od parturicije (0. ili 1. dan nakon okota) te barem 4. i 13. dana nakon okota. Ta opažanja treba unijeti u izvješće za svaku odraslu životinju posebno.
51. Tijekom razdoblja prije parenja, graviditeta i laktacije unos hrane trebalo bi mjeriti najmanje jednom tjedno. Mjerenje unosa hrane tijekom parenja nije obvezno. Trebalo bi mjeriti i unos vode tijekom tih razdoblja ako se ispitivana kemikalija primjenjuje tim putem.

Hematologija

52. Na pet mužjaka i pet ženki koji se nasumično odaberu iz svake skupine trebalo bi jednom tijekom istraživanja provesti sljedeće hematološke preglede: hematokrit, koncentracija hemoglobina, broj eritrocita, retikulociti, ukupni i diferencijalni broj leukocita, broj trombocita i mjerenje vremena/potencijala zgrušavanja krvi. Ostala određivanja koja treba provesti ako ispitivana kemikalija ili njezini navodni metaboliti imaju ili se sumnja da imaju oksidacijska svojstva obuhvaćaju koncentraciju methemoglobina i Heinzova tjelešca.
53. Uzorke krvi treba uzeti na specificiranom mjestu. Ženke bi tijekom uzimanja uzoraka trebale biti u fiziološki sličnom stanju. Kako bi se izbjegle praktične poteškoće povezane s varijabilnosti početka gestacije, krv se kod ženki može uzimati na kraju razdoblja prije parenja kao alternativa uzimanju uzoraka neposredno prije ili kao dio postupka za eutanaziju životinja. Uzorke krvi mužjaka po mogućnosti bi trebalo uzimati neposredno prije ili kao dio postupka za eutanaziju životinja. Kao alternativa, krv se kod mužjaka može uzimati i na kraju razdoblja prije parenja ako je tom vremenu uzorkovanja dana prednost kod ženki.
54. Uzorke krvi trebalo bi pohraniti u primjerenim uvjetima.

Klinička biokemija

55. Kliničko-biokemijske pretrage za istraživanje glavnih toksičnih učinaka u tkivima i posebno učinaka na bubrege i jetru treba obaviti na uzorcima krvi dobivenima od pet mužjaka i pet ženki odabranih iz svake skupine. Preporučuje se da životinje tijekom noći

pred uzimanje uzoraka krvi poste¹. Pretrage koje se rade na plazmi ili serumu trebale bi obuhvatiti mjerenje natrija, kalija, glukoze, ukupne količine kolesterola, ureje, kreatinina, ukupne količine proteina i albumina te najmanje dva enzima koji su pokazatelji hepatocelularnih učinaka (kao što su alanin aminotransferaza, aspartat aminotransferaza i sorbitol dehidrogenaza) te žučne kiseline. Mjerenja dodatnih enzima (jetrenog ili drugog podrijetla) i bilirubina mogu u određenim okolnostima pružiti korisne informacije.

56. Uzorci krvi uzimaju se s utvrđenog mjesta na temelju sljedećeg rasporeda:

- od najmanje dva mladunca po leglu 4. dana nakon okota ako broj mladunaca to omogućuje (vidjeti stavke 40.–41.),
- od svih ženki (majki) i najmanje dva mladunaca po leglu pri završetku ispitivanja 13. dana, i
- od svih odraslih mužjaka pri završetku ispitivanja.

Svi uzorci krvi spremaju se u odgovarajućim uvjetima. Uzorci krvi mladunaca i odraslih mužjaka uzeti 13. dana procjenjuju se u pogledu razina seruma hormona štitnjače (T4). Daljnja procjena hormona T4 u uzorcima krvi ženki (majki) i mladunaca uzetih 4. dana obavlja se po potrebi. Moguće je i mjerenje drugih hormona ako je to relevantno. Krv mladunaca može se izvaditi po leglu radi analiza hormona štitnjače. Hormone štitnjače (T4 i TSH) po mogućnosti bi trebalo mjeriti kao „ukupni broj”.

57. U zadnjem tjednu istraživanja, po izboru, mogu se obaviti analize urina pet nasumično odabranih mužjaka iz svake skupine dobivenog prikupljanjem u određenim vremenskim razmacima: izgled, količina, osmolalnost ili specifična težina, pH, protein, glukoza i krv/krvne stanice.

58. Osim toga, treba razmisliti i o ispitivanju serumskih markera koji označavaju opće oštećenja tkiva. Ostale pretrage, koje bi trebalo obaviti ako poznata svojstva ispitivane kemikalije mogu ili se sumnja da bi mogla utjecati na povezane metaboličke profile uključuju utvrđivanje razine kalcija, fosfata, triglicerida natašte, glukoze natašte, razine

¹ Post tijekom noći preporučuje se za niz mjerenja u serumu i plazmi, a najviše za glukozu. Glavni je razlog tome činjenica da bi povećana varijabilnost, do koje bi neizbježno došlo u slučaju da se životinjama hrana ne uskrati, vjerojatno prikrila suptilnije učinke i otežala tumačenje rezultata. S druge pak strane, post preko noći može utjecati na opći metabolizam (gravidnih) životinja, ometati laktaciju i ponašanje tijekom dojenja, a posebno u studijama o hranjenju moglo bi ometati dnevno izlaganje ispitivanoj kemikaliji. Ako se primjenjuje post preko noći, klinička biokemijska određivanja u mužjaka treba obaviti nakon provođenja funkcionalnih opažanja u 4. tjednu istraživanja. Ženke (majke) bi trebalo zadržati još jedan dan nakon uklanjanja mladunaca (npr. 13. postnatalnog dana). Ženke (majke) bi trebale postiti tijekom noći od laktacijskog dana 13.–14. te se uzorak krvi uzet prije usmrćivanja upotrebljava za kliničko-kemijske parametre.

specifičnih hormona, methemoglobina i aktivnosti kolinesteraze. Njih treba identificirati od slučaja do slučaja.

59. Sljedeći čimbenici mogu utjecati na varijabilnost i apsolutne koncentracije za određivanje hormona:
- vrijeme usmrćivanja zbog dnevne varijacije koncentracije hormona,
 - metoda usmrćivanja radi izbjegavanja pretjeranog stresa za životinje koji može utjecati na koncentraciju hormona,
 - pribori za određivanje hormona koji se mogu razlikovati po njihovim standardnim krivuljama.
60. Uzorke plazme koji su posebno namijenjeni određivanju hormona treba uzeti u usporedivo doba dana. Brojčane vrijednosti dobivene analizom koncentracija hormona razlikuju se ovisno o različitom, komercijalno dostupnom priboru.
61. Ako su prijašnji polazni podaci neprikladni, u obzir treba uzeti određivanje hematoloških i kliničkih biokemijskih varijabli prije početka doziranja ili po mogućnosti na skupini životinja koje nisu uključene u pokusne skupine. Kod ženki se podaci moraju dobiti od životinja koje doje.

PATOLOGIJA

Makroskopska nekropsija

62. Sve odrasle životinje korištene u istraživanju trebale bi se podvrgnuti kompletnoj, detaljnoj makroskopskoj nekropsiji koja obuhvaća pažljiv pregled vanjske površine tijela, svih otvora te lubanjske, prsne i trbušne šupljine i njihova sadržaja. Posebnu pozornost treba obratiti na organe reproduktivnog sustava. Broj mjesta za implantaciju treba zabilježiti. Vaginalne briseve treba pregledati na dan nekropsije kako bi se utvrdila faza ciklusa estrusa i omogućila korelacija s histopatologijom ženskih reproduktivnih organa.
63. Sjemenike i sjemene kanaliće te prostatu i sjemene mjehuriće s koagulacijskim žlijezdama, kao cjelinu, svih odraslih mužjaka treba po potrebi obrezivanjem osloboditi od svih prijanjajućih tkiva te ih treba izvagati u mokrom stanju što prije nakon seciranja kako bi se spriječilo njihovo sušenje. Osim toga, mase neobaveznih organa mogle bi uključivati kompleks anusnog podizača i bulbokavernoznog mišića, Cowperove žlijezde i glans penisa kod mužjaka te jajnike u paru (mokra masa) i maternicu (uključujući cerviks) kod ženki; ako se uključuju, te bi mase trebalo prikupiti što prije nakon seciranja. Treba sačuvati jajnike, sjemenike, sjemene kanaliće, sekundarne spolne organe i sve organe koji pokazuju makroskopske lezije svih odraslih životinja.

64. Štitnjača svih odraslih mužjaka i ženki te jednog mužjaka i jedne ženke starih 13 dana iz svakog legla trebala bi se sačuvati u najprimjerenijem sredstvu za fiksiranje radi planiranog kasnijeg histopatološkog pregleda. Masa štitnjače može se odrediti nakon fiksacije. Obrezivanje također treba obaviti vrlo pažljivo te samo nakon fiksacije kako bi se izbjeglo oštećenje tkiva. Oštećena tkiva mogu kompromitirati histopatološku analizu. Uzorke krvi treba uzeti na specificiranom mjestu i pohraniti u odgovarajućim uvjetima neposredno prije ili kao dio postupka za eutanaziju životinja (vidjeti stavak 56.).
65. Osim toga, kod najmanje pet odraslih mužjaka i ženki nasumično odabranih iz svake skupine (osim onih za koje je utvrđeno da su na umoru i/ili su eutanazirani prije kraja istraživanja) s jetre, bubrega, nadbubrežnih žlijezda, timusa, slezene, mozga i srca treba obrezati sve prijanjajuće tkivo, prema potrebi, te ih još mokre izvagati što prije nakon seciranja kako bi se spriječilo da se osuše. Sljedeća tkiva treba sačuvati u sredstvu za fiksiranje koje je najprimjerenije i za vrstu tkiva i za planirani kasniji histopatološki pregled: sve makrolezije, mozak (reprezentativne regije uključujući veliki mozak, mali mozak i medulu/most), leđnu moždinu, oko, želudac, tanko i debelo crijevo (uključujući Peyerove ploče), jetru, bubrege, nadbubrežne žlijezde, slezenu, srce, timus, dušnik i pluća (preparirane upuhivanjem fiksativa i zatim uranjanjem), spolne žlijezde (sjemenike i jajnike), sekundarne spolne organe (maternicu i cerviks, sjemene kanaliće, prostatu, sjemene mjehuriće s koagulacijskim žlijezdama), vaginu, mokraćni mjehur, limfne čvorove (osim najbližeg drenažnog čvora treba uzeti još jedan limfni čvor na temelju laboratorijskog iskustva (16.)), periferni živac (ishijadični ili tibijalni) po mogućnosti smješten uz mišić, skeletni mišić i kost, s leđnom moždinom (sekcija ili, kao alternativna, svježe pripremljen aspirat koštane srži). Preporučuje se da se sjemenici fiksiraju uranjanjem u Bouinov ili izmijenjeni Davidsonov fiksativ (16., 17. i 18.); za ta se tkiva ne preporučuje fiksacija u formalinu. Vezivna ovojnica može se nježno i plitko punktirati na oba pola organa iglom koja omogućuje brzu penetraciju fiksativa. Klinički i drugi nalazi mogu ukazati na potrebu za ispitivanjem dodatnih tkiva. Treba sačuvati i sve organe za koje se na temelju saznanja o svojstvima ispitivane kemikalije smatra da bi mogli biti ciljni.
66. Sljedeća tkiva mogu dati dragocjenu indikaciju za učinke na endokrini sustav: spolne žlijezde (jajnici i sjemenici), sekundarni spolni organi (maternica s cerviksom, sjemeni kanalići, sjemeni mjehurići s koagulacijskim žlijezdama, dorzolateralna i ventralna prostata), vagina, hipofiza, muška mliječna žlijezda i nadbubrežna žlijezda. Promjene u muškim mliječnim žlijezdama nisu dovoljno dokumentirane, ali taj parametar može biti vrlo osjetljiv na tvari s estrogenskim djelovanjem. Opažanja organa/tkiva koja nisu navedena u stavku 65. nisu obvezna.
67. Mrtve mladunce i mladunce koje se usmrti 13. dana nakon okota, ili ubrzo nakon toga, trebalo bi pažljivo pregledati kako bi se utvrdile barem vanjske velike abnormalnosti.

Posebnu pozornost treba posvetiti vanjskim reproduktivnim genitalijama koje se pregledava kako bi se utvrdili mogući znakovi promijenjenog razvoja.

Histopatologija

68. Na sačuvanim organima i tkivima odabranih životinja iz kontrolne skupine i skupina tretiranih visokim dozama treba napraviti kompletan histopatološki pregled (uz poseban naglasak na faze spermatogeneze kod muških spolnih žlijezdi i histopatologiju strukture intersticijskih stanica sjemenika). Po potrebi se mogu pregledati štitnjače mladunaca i preostalih odraslih životinja. Ta ispitivanja treba proširiti na životinje drugih skupina doziranja ako su u skupini s visokom dozom uočene promjene povezane s tretiranjem. Smjernica o histopatologiji (10.) pruža dodatne detaljne informacije o sekciji, fiksaciji, seciranju i histopatologiji endokrinih tkiva.
69. Treba pregledati sve makrolezije. Kako bi se pomoglo pojasniti NOAEL-e, treba pregledati ciljne organe kod skupina tretiranih ostalim dozama, osobito u skupinama kod kojih se tvrdi da pokazuju NOAEL.
70. Ako se koristi satelitska skupina, treba napraviti histopatološki pregled tkiva i organa kod kojih su u tretiranim skupinama uočeni učinci.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Podaci

71. Treba navesti podatke za svaku pojedinačnu životinju. Osim toga, sve podatke treba sažeti u obliku tablice, tako da se za svaku ispitnu skupinu navede broj životinja na početku ispitivanja, broj životinja koje su uginule tijekom ispitivanja ili su eutanazirane iz humanih razloga, vrijeme smrti ili eutanazije, broj plodnih životinja, broj gravidnih ženki, broj životinja koje pokazuju znakove toksičnosti, opis uočenih znakova toksičnosti, uključujući vrijeme pojavljivanja, trajanje i ozbiljnost toksičnih učinaka, vrste histopatoloških promjena i sve relevantne podatke o leglu. Format sažetog izvješća u obliku tablice koji se pokazao vrlo korisnim za procjenu reproduktivnih/razvojnih učinaka naveden je u Dodatku 3.
72. Ako je moguće, brojčane rezultate treba ocijeniti odgovarajućom i opće prihvaćenom statističkom metodom. Za usporedbe učinaka unutar raspona visina doza trebala bi se izbjeći uporaba višestrukih t-testova. Statističke metode treba odabrati u fazi planiranja istraživanja. Statistička analiza anogenitalnog razmaka i zadržavanja bradavica trebala bi se temeljiti na podacima za pojedinačne mladunce, uzimajući u obzir učinke na leglo. Ako je primjereno, jedinicu analize čini leglo. Statistička analiza tjelesne mase mladunaca trebala bi se temeljiti na podacima za pojedinačne mladunce, uzimajući u obzir veličinu legla. Zbog ograničenih dimenzija istraživanja, statističke analize kojima se nastoji ispitati važnost rezultata imaju ograničenu vrijednost za mnoge krajnje točke, osobito za

reproduktivne krajnje točke. Nisu primjerene neke od često korištenih metoda, osobito parametrijska ispitivanja za mjerenje središnje tendencije. Ako se upotrebljavaju statističke analize, odabrana metoda trebala bi biti primjerena za distribuciju varijable koja se ispituje te je treba odabrati prije početka istraživanja.

Ocjena rezultata

73. Nalaze ovog istraživanja toksičnosti treba ocijeniti s obzirom na uočene učinke, nekropsiju i mikroskopske nalaze. Evaluacija treba obuhvatiti odnos između doze ispitivane kemikalije i prisutnosti ili izostanka, učestalosti i ozbiljnosti abnormalnosti, uključujući makrolezije, identificirane ciljne organe, neplodnost, kliničke abnormalnosti, promjene sposobnosti reprodukcije i legla, promjene tjelesne mase, učinke na smrtnost i sve ostale toksične učinke.
74. Zbog kratkog razdoblja tretiranja mužjaka, uz podatke o plodnosti trebalo bi razmotriti i histopatologiju sjemenika i sjemenih kanalića pri procjeni učinaka na reprodukciju mužjaka. Kao pomoć u tumačenju istraživanja može biti korisna i upotreba podataka o prijašnjim kontrolama u pogledu reprodukcije/razvoja (npr. za veličinu legla, anogenitalni razmak, zadržavanje bradavica, razine seruma T4), ako su dostupni.
75. Radi kontrole kvalitete predlaže se prikupljanje podataka o prijašnjim kontrolama te izračunavanje koeficijenata varijacije za brojčane podatke, posebno za parametre povezane s otkrivanjem endokrinih ometača. Ti se podaci mogu upotrijebiti za uspoređivanje kad se ocjenjuju konkretna istraživanja.

Izvješće o ispitivanju

76. Izvješće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Ispitivana kemikalija:

- izvor, broj serije, rok uporabe, ako su dostupni,
- stabilnost ispitivane kemikalije, ako je poznata.

Tvar s jednim sastojkom:

- fizički izgled, topljivost u vodi i druga relevantna fizikalno-kemijska svojstva,
- kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv, CAS broj, SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula, čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.

Tvari s više sastojaka, UVCB tvari i smjese:

- opis (koliko je to moguće) kemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativnog udjela i relevantnih fizikalno-kemijskih svojstava sastojaka.

Nosač (po potrebi):

- obrazloženje odabira nosača ako nije riječ o vodi.

Ispitne životinje:

- korištena vrsta/soj,
- broj, dob i spol životinja,
- podrijetlo, uvjeti smještaja, prehrana itd.,
- pojedinačna tjelesna masa životinja na početku ispitivanja,
- obrazloženje odabira vrste ako se ne radi o štakorima.

Ispitni uvjeti:

- obrazloženje odabira visine doze,
- pojedinosti o formulaciji ispitivane kemikalije/pripremanju hrane, postignuta koncentracija, stabilnost i homogenost pripravka,
- pojedinosti o primjeni ispitivane kemikalije,
- preračunavanje koncentracije ispitivane kemikalije u hrani/vodi za piće (ppm) u stvarnu dozu (mg/kg tjelesne težine/dan), prema potrebi,
- pojedinosti o kvaliteti hrane i vode,
- detaljan opis postupka nasumičnog odabira mladunaca za izdvajanje ako se ono obavlja.

Rezultati:

- tjelesna masa/promjene tjelesne mase,
- unos hrane i unos vode, po potrebi,
- podaci o toksičnom odgovoru po spolu i dozi, uključujući plodnost, gestaciju i sve druge znakove
- toksičnosti,
- duljina gestacije,
- toksični ili drugi učinci na reprodukciju, potomstvo, rast nakon rođenja itd.,
- vrsta, stupanj i trajanje uočenih kliničkih promjena (reverzibilne ili ireverzibilne),
- ocjena osjetilne aktivnosti, jakosti stiska i motorne aktivnosti,
- hematološka ispitivanja s odgovarajućim referentnim vrijednostima,
- klinička biokemijska ispitivanja s odgovarajućim referentnim vrijednostima,
- broj odraslih ženki s normalnim ili abnormalnim ciklusom estrusa i trajanje ciklusa,

- broj živorođenih i gubitaka nakon implantacije,
- broj mladunaca s jako izraženim abnormalnostima, ukupna procjena vanjskih genitalija, broj patuljastih životinja,
- vrijeme smrti tijekom istraživanja ili je li životinja preživjela do kraja,
- broj implantacija, veličina i masa legla u trenutku evidentiranja,
- podaci o tjelesnoj masi mladunaca,
- anogenitalni razmak svih mladunaca (i tjelesna masa na dan mjerenja anogenitalnog razmaka),
- zadržavanje bradavica kod mužjaka mladunaca,
- razine hormona štitnjače, u mladunaca starih 13 dana i odraslih mužjaka (te u ženki (majki) i mladunaca starih 4 dana ako se mjeri),
- tjelesna masa u trenutku usmrćenja i podaci o masi organa za roditeljske životinje,
- nalazi nekropsije,
- iscrpan opis histopatoloških nalaza,
- podaci o apsorpciji (ako su dostupni),
- statistička obrada rezultata, prema potrebi.

Rasprava o rezultatima

Zaključci

Tumačenje rezultata

77. U ovom će se istraživanju pružiti procjene reproduktivne/razvojne toksičnosti povezane s primjenom ponovljenih doza. Točnije, s obzirom na to da je naglasak stavljen i na opću toksičnost i na krajnje točke reproduktivne/razvojne toksičnosti, rezultati istraživanja omogućit će razlikovanje reproduktivnih/razvojnih učinaka koji se javljaju kad nema opće toksičnosti i onih koji se javljaju samo kod doza koje su toksične i za roditeljske životinje (vidjeti stavke 7.–11.). Mogla bi dati naznaku u vezi s tim treba li provesti daljnja ispitivanjima i dati smjernice za osmišljavanje naknadnih istraživanja. Za pomoć pri tumačenju rezultata u pogledu reprodukcije i razvoja (19.) treba pogledati Smjernicu OECD-a 43. U Smjernici OECD-a 106 o histološkoj procjeni endokrinih i reproduktivnih ispitivanja na glodavcima (16.) navedene su informacije o pripremi i procjeni (endokrinih) organa i vaginalnih brisova koje mogu biti korisne za ovu ispitnu metodu.

LITERATURA

1. OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Na zahtjev dostupno kod Organizacije za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
2. OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokio, 27–29. listopada 1992. . Na zahtjev dostupno kod Organizacije za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
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. and 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. and Tobe M. (1992). Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test (OECD): Familiarization Using Cyclophosphamide. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 18, 89.–95.
5. OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10.–11. ožujka 1998., Na zahtjev dostupno kod Organizacije za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
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), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
7. OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 19), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
8. Goldman J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M. and Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, *Birth Defects Research*, Part B, 80 (2), 84.–97.

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

Series on Testing and Assessment (No 43), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

20. OECD (2011), Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (No 150), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

Dodatak 1.

DEFINICIJE (VIDJETI I (20.) SMJERNICU OECD-A 150)

Androgeni učinak je sposobnost kemikalije da djeluje kao prirodni androgeni hormon (npr. testosteron) u organizmu sisavaca.

Antiandrogeni učinak je sposobnost kemikalije da potiskuje djelovanje prirodnog androgenog hormona (npr. testosterona) u organizmu sisavaca.

Antiestrogeni učinak je sposobnost kemikalije da potiskuje djelovanje prirodnog estrogenog hormona (npr. estradiol 17 β) u organizmu sisavaca.

Antitiroidna aktivnost je sposobnost kemikalije da potiskuje djelovanje prirodnog hormona štitnjače (npr. T₃) u organizmu sisavaca.

Kemikalija je tvar ili smjesa.

Razvojna toksičnost: manifestacija reproduktivne toksičnosti koju čine prenatalni, postnatalni, strukturni ili funkcionalni poremećaji potomstva.

Doza je količina ispitivane kemikalije koja se primjenjuje. Doza se izražava kao masa ispitivane kemikalije po jedinici tjelesne mase ispitne životinje po danu (npr. mg/kg tjelesne mase po danu) ili kao stalna koncentracija u hrani.

Doziranje je opći pojam koji obuhvaća dozu, njezinu učestalost i trajanje doziranja.

Evidentna toksičnost je opći naziv koji opisuje jasne znakove toksičnosti nakon primjene ispitivane kemikalije. Ti bi znakovi trebali biti dovoljni za utvrđivanje opasnosti i trebaju biti takvi da se za primjenu povišene doze može očekivati da će rezultirati razvojem ozbiljnih znakova toksičnosti i mogućom smrtnošću.

Ometanje plodnosti čine poremećaji muških ili ženskih reproduktivnih funkcija ili reproduktivne sposobnosti.

Toksičnost kod majke: štetni učinci na gravidne ženke do kojih dolazi specifično (izravni učinak) ili nespecifično (neizravni učinak) i koji su povezani sa stanjem gravidnosti.

NOAEL je kratica za visinu doze bez vidljivih štetnih učinaka. To je najviša doza pri kojoj se ne opažaju nikakvi štetni učinci povezani s tretiranjem.

Estrogeni učinak je sposobnost kemikalije da djeluje kao prirodni estrogeni hormon (npr. estradiol 17 β) u organizmu sisavaca.

Reproduktivna toksičnost predstavlja štetne učinke na potomstvo i/ili oštećenje muške i ženske reproduktivne funkcije ili sposobnosti.

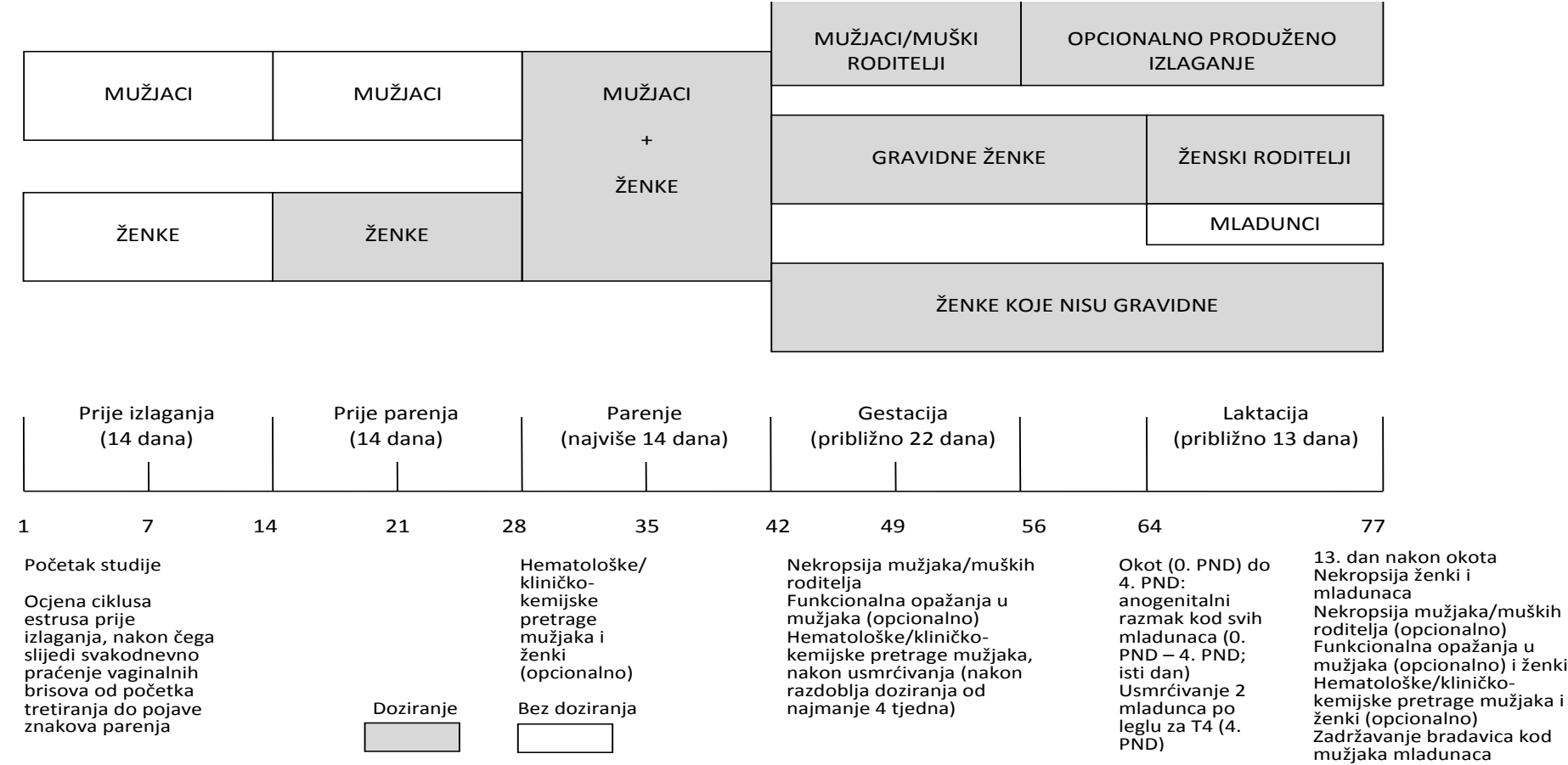
Ispitivana kemikalija je svaka tvar ili smjesa koja se ispituje ovom ispitnom metodom.

Tiroidna aktivnost je sposobnost kemikalije da djeluje kao prirodni hormon štitnjače (npr. T_3) u organizmu sisavaca.

Validacija je znanstveni postupak s ciljem karakterizacije operativnih zahtjeva i ograničenja ispitne metode te pokazivanja njezine pouzdanosti i relevantnosti za određenu svrhu.

Dodatak 2.

DIJAGRAM PLANA POKUSA IZ KOJEG SE VIDI MAKSIMALNO TRAJANJE STUDIJE, NA TEMELJU CIJELOG 14-DNEVNOG RAZDOBLJA PARENJA



Dodatak 3.

SAŽETO IZVJEŠĆE U OBLIKU TABLICE O UČINCIMA NA REPRODUKCIJU/RAZVOJ

OPAŽANJA	VRIJEDNOSTI				
	0 (kontrola)	...	...	...	...
Formirani parovi (N)					
Ciklus estrusa (barem srednja vrijednost duljine i učestalost nepravilnih ciklusa)					
Ženke koje pokazuju znakove kopulacije (N)					
Ženke koje su postale gravidne (N)					
Dani začeća 1–5 (N)					
Dani začeća 6–... ⁽¹⁾ (N)					
Graviditet ≤ 21 dan (N)					
Graviditet = 22 dana (N)					
Graviditet ≥ 23 dana (N)					
Ženke (majke) sa živim mladuncima (N)					
Ženke (majke) sa živim mladuncima 4. dana nakon okota (N)					
Implantati po ženki (majci) (srednja vrijednost)					
Živi mladunci po ženki (majci) pri okotu (srednja vrijednost)					
Živi mladunci po ženki (majci) 4. dana (srednja vrijednost)					
Omjer spolova (m/ž) pri okotu (srednja vrijednost)					
Omjer spolova (m/ž) 4. dana (srednja vrijednost)					
Masa legla pri okotu (srednja vrijednost)					
Masa legla 4. dana (srednja vrijednost)					
Masa mladunaca pri okotu (srednja vrijednost)					
Masa mladunaca u trenutku mjerenja anogenitalnog razmaka (srednja vrijednost za mužjake i srednja vrijednost za ženke)					
Anogenitalni razmak na isti postnatalni dan, dan okota – 4. dan (srednja vrijednost za mužjake i ženke, naznaka postnatalnog dana)					
Masa mladunaca 4. dana (srednja vrijednost)					
Masa mladunaca 13. dana (srednja vrijednost)					
Zadržavanje bradavica kod mužjaka mladunaca 13. dana (srednja vrijednost)					

⁽¹⁾ Posljednji dan razdoblja parenja

ABNORMALNI MLADUNCI					
Ženke (majke) s 0					
Ženke (majke) s 1					
Ženke (majke) s ≥ 2					
GUBITAK POTOMAKA					
Prenatalno (implantacije umanjene za broj živorođenih)					
Ženke s 0					
Ženke s 1					
Ženke s 2					
Ženke s ≥ 3					
Postnatalno (broj živorođenih umanjen za broj živih mladunaca 13. dana nakon okota)					
Ženke s 0					
Ženke s 1					
Ženke s 2					
Ženke s ≥ 3					

B.65. *IN VITRO* ISPITNA METODA ZA NAGRIZANJE KOŽE S MEMBRANSKOM BARIJEROM

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 435 (TG) (2015.). Nagrizanje kože odnosi se na izazivanje ireverzibilnog oštećenja kože koje se manifestira kao vidljiva nekroza koja kroz epidermu prodire u dermu nakon primjene ispitivane kemikalije, kako je utvrđeno Globalno usklađenim sustavom razvrstavanja i označivanja kemikalija (GHS) Ujedinjenih naroda (UN) (1.) i Uredbom (EZ) br. 1272/2008 o razvrstavanju, označivanju i pakiranju tvari i smjesa (CLP)¹ Europske unije. Ova ispitna metoda, ekvivalentna ažuriranoj Smjernici OECD-a za ispitivanje 435, pruža *in vitro* ispitnu metodu za nagrizanje kože s membranskom barijerom koja se može upotrebljavati za identifikaciju nagrizajućih kemikalija. U ispitnoj metodi upotrebljava se umjetna membrana koja je osmišljena tako da reagira na nagrizajuće kemikalije na sličan način kao i životinjska koža *in situ*.
2. Nagrizajuće djelovanje na kožu tradicionalno se procjenjivalo primjenom ispitivane kemikalije na kožu živih životinja i procjenom razmjera oštećenja tkiva nakon određenog vremenskog razdoblja (2.). Uz sadašnju ispitnu metodu donesen je niz drugih *in vitro* ispitnih metoda (3. i 4.) kao alternativa standardnom *in vivo* postupku na koži kunića (poglavlje B.4. ovog Priloga; ekvivalentan Smjernici OECD-a za ispitivanje 404) koji se upotrebljava za identifikaciju nagrizajućih kemikalija (2.). U stupnjevanoj strategiji ispitivanja i ocjenjivanja UN GHS-a za procjenu i razvrstavanje nagrizanja kože te u Smjernicama OECD-a o integriranim pristupima ispitivanju i procjeni (IATA) za nadraživanje/nagrizanje kože preporučuje se upotreba validiranih i prihvaćenih *in vitro* ispitnih metoda u okviru modula 3. i 4. (1. i 5.). U IATA-i je opisano nekoliko modula u kojima se grupiraju izvori informacija i alati za analizu te se pružaju smjernice o i. načinu integriranja i uporabe postojećih podataka o ispitivanju i podataka koji se dobivaju bez ispitivanja za procjenu potencijala kemikalija da uzrokuju nadraživanje i nagrizanje kože te ii. predlaganju pristupa kada je potrebno daljnje ispitivanje, među ostalim i ako se dobiju negativni rezultati (5.). U tom modularnom pristupu pozitivni rezultati iz *in vitro* ispitnih metoda mogu se upotrebljavati za razvrstavanje kemikalije kao nagrizajuće bez potrebe za

¹ Uredba (EZ) br. 1272/2008 Europskog parlamenta i Vijeća od 16. prosinca 2008. o razvrstavanju, označivanju i pakiranju tvari i smjesa, o izmjeni i stavljanju izvan snage Direktive 67/548/EEZ i Direktive 1999/45/EZ i o izmjeni Uredbe (EZ) br. 1907/2006, SL L 353/1, 31.12.2008.

ispitivanjem na životinjama, čime se smanjuje i poboljšava upotreba životinja te se izbjegavaju bol i patnja do kojih može doći kada bi se u tu svrhu upotrebljavale životinje.

3. Dovršene su validacijske studije za *in vitro* model membranske barijere koji je komercijalno dostupan pod nazivom Corrositex® (6., 7. i 8.) i koji pokazuje ukupnu točnost predviđanja nagrivanja kože od 79 % (128/163), osjetljivost od 85 % (76/89) i specifičnost od 70 % (52/74) za bazu podataka od 163 tvari i smjesa (7.). Na temelju njezine potvrđene valjanosti, ova je validirana referentna metoda (VRM) preporučena za upotrebu kao dio stupnjevane strategije ispitivanja za procjenu potencijalne opasnosti kemikalija da uzrokuju nagrivanje kože (5. i 7.). Prije nego što se *in vitro* model membranske barijere za nagrivanje kože može upotrijebiti u regulatorne svrhe, trebalo bi utvrditi njegovu pouzdanost, relevantnost (točnost) i ograničenja za njegovu predloženu uporabu kako bi se osigurala njegova sličnost s validiranom referentnom metodom (9.), u skladu s unaprijed utvrđenim zahtjevima izvedbe (10.). OECD-ovo uzajamno prihvaćanje podataka jamčit će se samo nakon što se svaka predložena nova ili ažurirana metoda koja je u skladu sa zahtjevima izvedbe pregleda i uključi u ekvivalentnu smjernicu OECD-a za ispitivanje. Smjernica OECD-a za ispitivanje 435 trenutačno obuhvaća samo jednu *in vitro* metodu i ovu ispitnu metodu – komercijalno dostupan model Corrositex®.
4. Ostale ispitne metode za ispitivanje nagrivanja kože temelje se na upotrebi rekonstituirane ljudske kože (Smjernica OECD-a za ispitivanje 431) (3.) i izolirane kože štakora (Smjernica OECD-a za ispitivanje 430) (4.). Ova smjernica za ispitivanje omogućuje i daljnje razvrstavanje nagrivačkih kemikalija u tri potkategorije nagrivanja prema UN GHS-u i tri ambalažne skupine UN-a za prijevoz u pogledu opasnosti od nagrivanja. Ova Smjernica za ispitivanje izvorno je donesena 2006. i ažurirana je 2015. kako bi se odnosila na smjernice o IATA-i i kako bi se ažurirao popis tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti.

DEFINICIJE

5. Upotrijebljene definicije navedene su u Dodatku.

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

6. Ispitivanje opisano u ovoj ispitnoj metodi omogućuje identifikaciju nagrivačkih ispitivanih kemikalija i daljnje razvrstavanje nagrivačkih ispitivanih kemikalija u skladu s UN GHS-om/CLP-om (tablica 1.). Osim toga, ta se ispitna metoda može upotrebljavati kako bi se donijele odluke o nagrivačkom i nenagrivačkom svojstvu određenih razreda kemikalija,

npr. organskih i anorganskih kiselina, derivata kiselina¹ i baza u svrhu ispitivanja određenih vrsta prijevoza (7., 11. i 12.). Ova ispitna metoda opisuje opći postupak koji je sličan validiranoj referentnoj ispitnoj metodi (7.). Iako se ovom ispitnom metodom ne dobivaju primjerene informacije o nadraživanju kože, trebalo bi napomenuti da se ispitna metoda B.46. (ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 439) posebno bavi učinkom nadraženosti kože na zdravlje *in vitro* (13.). Za potpunu evaluaciju lokalnih učinaka na kožu nakon jednostrukog dermalnog izlaganja potrebno je proučiti Smjernice OECD-a o integriranim pristupima ispitivanju i procjeni (5.).

Tablica 1.: Kategorija „nagrizajuće za kožu” s potkategorijama prema UN GHS-u (1.)

Kategorija nagrizajućeg djelovanja (1. kategorija) (za tijela koja se ne koriste potkategorijama)	Potkategorije potencijalno nagrizajućeg djelovanja ² (za tijela koja se koriste potkategorijama, uključujući Uredbu o CLP-u)	Nagrizajuće kod ≥ 1 od 3 životinje	
		Izloženost	Opažanje
Nagrizajuće	Potkategorija nagrizajućeg djelovanja 1.A	≤ 3 minute	≤ 1 sat
	Potkategorija nagrizajućeg djelovanja 1.B	> 3 minute / ≤ 1 sat	≤ 14 dana
	Potkategorija nagrizajućeg djelovanja 1.C	> 1 sat / ≤ 4 sata	≤ 14 dana

7. Ograničenje validirane referentne metode (7.) je to što mnoge kemikalije koje ne djeluju nagrizajuće i neke kemikalije koje djeluju nagrizajuće možda neće ispuniti uvjete za ispitivanje na temelju rezultata početnog ispitivanja kompatibilnosti (vidjeti stavak 13.). Vodene otopine kemikalija čija je pH-vrijednost u rasponu od 4,5 do 8,5 često ne ispunjavaju uvjete za ispitivanje; međutim, 85 % ispitanih kemikalija u tom pH-rasponu nije djelovalo nagrizajuće u ispitivanjima na životinjama (7.). *In vitro* metoda s membranskom barijerom može se upotrebljavati za ispitivanje krutih tvari (topljivih ili netopljivih u vodi), tekućina (vodenih i bezvodnih) i emulzija. Međutim, ispitivane kemikalije koje ne uzrokuju uočljivu promjenu u ispitivanju kompatibilnosti (tj. promjenu

¹ „Derivat kiseline” je nespecifična oznaka razreda i općenito se definira kao kiselina koja je nastala iz kemikalije izravno, modifikacijom ili djelomičnom zamjenom. Taj razred obuhvaća anhidride, halo kiseline, soli i druge vrste kemikalija.

² Za EU se u Uredbi o CLP-u primjenjuju tri potkategorije nagrizanja kože – 1.A, 1.B i 1.C.

boje u detekcijskom sustavu za kemikalije (CDS) validirane referentne ispitne metode) ne mogu se ispitati primjenom metode s membranskom barijerom i trebale bi se ispitati drugim ispitnim metodama.

NAČELO ISPITIVANJA

8. Ispitni sustav sastoji se od dvije sastavnice: sintetičke makromolekularne biološke barijere i detekcijskog sustava za kemikalije; u ovoj se ispitnoj metodi detekcijskim sustavom za kemikalije otkriva oštećenje membranske barijere koje uzrokuju nagrizajuće ispitivane kemikalije nakon primjene ispitivane kemikalije na površinu sintetičke makromolekularne membranske barijere (7.), uz pretpostavku da se to odvija istim mehanizmima nagražanja koji djeluju i na živu kožu.
9. Prodiranje kroz membransku barijeru može se mjeriti različitim postupcima ili detekcijskim sustavima za kemikalije, uključujući promjenu boje pH-indikatorske boje ili nekog drugog svojstva otopine indikatora ispod barijere.
10. Trebalo bi se utvrditi da je membranska barijera valjana, tj. relevantna i pouzdana za predviđenu upotrebu. To uključuje i osiguravanje dosljednosti različitih pripravaka u pogledu svojstava barijere, npr. sposobnost očuvanja barijere u dodiru s nenagrizajućim kemikalijama, sposobnost razvrstavanja nagrizajućih svojstava kemikalija prema različitim potkategorijama nagrizajućeg djelovanja prema UN GHS-u (1.). Odluka o razvrstavanju temelji se na vremenu koje je kemikaliji potrebno da prođe kroz membransku barijeru do otopine indikatora.

DOKAZIVANJE OSPOSoblJENOSTI

11. Prije rutinske upotrebe *in vitro* metode s membranskom barijerom koja je u skladu s ovom ispitnom metodom laboratoriji bi trebali dokazati tehničku osposobljenost pravilnim utvrđivanjem kategorije dvanaest tvari za dokazivanje osposobljenosti koje su preporučene u tablici 2. U slučajevima u kojima nije dostupna navedena tvar ili ako je to opravdano, može se upotrijebiti druga tvar za koju su dostupni primjereni referentni *in vivo* i *in vitro* podaci (npr. s popisa referentnih kemikalija (10.)) pod uvjetom da se primjenjuju isti kriteriji za odabir kako su opisani u tablici 1.

Tablica 2.: Tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti¹

Tvar ²	CAS br.	Kemijski razred	<i>In vivo</i> potkategorija prema UN GHS-u ³	<i>In vitro</i> potkategorija prema UN GHS-u ³
Borov trifluorid dihidrat	13319-75-0	Anorganske kiseline	1.A	1.A

Dušična kiselina	7697-37-2	Anorganske kiseline	1.A	1.A
Fosforov pentaklorid	10026-13-8	Prekursori anorganskih kiselina	1.A	1.A
Valeril klorid	638-29-9	Kloridi kiselina	1.B	1.B
Natrijev hidroksid	1310-73-2	Anorganske baze	1.B	1.B
1-(2-aminoetil)piperazin	140-31-8	Alifatski amini	1.B	1.B
Benzensulfonil klorid	98-09-9	Kloridi kiselina	1.C	1.C
<i>N,N</i> -dimetil-benzilamin	103-83-3	Anilini	1.C	1.C
Tetraetilenpentamin	112-57-2	Alifatski amini	1.C	1.C
Eugenol	97-53-0	Fenoli	NC	NC
Nonil akrilat	2664-55-3	Akrlati/metakrilati	NC	NC
Natrijev bikarbonat	144-55-8	Anorganske soli	NC	NC

¹ Dvanaest prethodno navedenih tvari sadržavaju tri tvari iz svake od triju potkategorija nagrizajućih tvari i tri nenagrizajuće tvari prema UN GHS-u, iako su dostupne kod komercijalnih dobavljača, a potkategorija prema UN GHS-u temelji se na rezultatima visokokvalitetnog *in vivo* ispitivanja. Te su tvari preuzete s popisa od 40 referentnih tvari koje su uključene na minimalni popis kemikalija koje su identificirane za dokazivanje točnosti i pouzdanosti ispitnih metoda koje su strukturno i funkcionalno slične validiranoj referentnoj ispitnoj metodi i odabrane su među 163 referentne kemikalije koje su se izvorno koristile za validaciju ispitne metode (Corrositex[®]) (7., 10. i 14.). Tim se procesom odabira nastojalo uključiti, u mjeri u kojoj je to moguće, kemikalije: koje su bile reprezentativne za raspon nagrizajućih odgovora (npr. tvari koje ne djeluju nagrizajuće, nagrizajuće tvari ambalažne skupine UN-a I., II. i III.) koji se mogu izmjeriti ili predvidjeti validiranom referentnom ispitnom metodom; koje su bile reprezentativne za kemijske razrede koji su korišteni tijekom procesa validacije; koje imaju dobro utvrđene kemijske strukture; koje su inducirale ponovljive rezultate u validiranoj referentnoj ispitnoj metodi; koje su inducirale konačne rezultate u *in vivo* referentnom ispitivanju; koje su bile komercijalno dostupne; i koje nisu bile povezane s neprimjereno visokim troškovima zbrinjavanja (14.).

² Tvari ispitane čiste ili čistoće ≥ 90 %.

³ Odgovarajuće ambalažne skupine UN-a I., II. i III. za potkategorije 1.A, 1.B odnosno 1.C UN GHS-a. NC: nije nagrizajuće.

POSTUPAK

12. U sljedećim se stavcima opisuju sastavnice i postupci ispitne metode s umjetnom membranskom barijerom za procjenu nagrizajućeg djelovanja (7. i 15.) na temelju važeće validirane referentne metode, tj. komercijalno dostupnog modela Corrositex[®]. Membranska barijera i otopine za utvrđivanje kompatibilnosti/otopine indikatora i otopine za razvrstavanje mogu se izraditi, pripremiti ili nabaviti iz komercijalnih izvora, kao što je slučaj s validiranom referentnom metodom – Corrositex[®]. Dostupan je uzorak protokola ispitne metode za validiranu referentnu ispitnu metodu (7.). Ispitivanje bi se trebalo

provoditi na temperaturi okoline (17–25 °C) i sastavnice bi trebale biti u skladu sa sljedećim uvjetima.

Ispitivanje kompatibilnosti ispitivane kemikalije

13. Prije provedbe ispitivanja s membranskom barijerom provodi se ispitivanje kompatibilnosti kako bi se utvrdilo može li detekcijski sustav za kemikalije otkriti ispitivanu kemikaliju. Ako detekcijski sustav za kemikalije ne otkrije kemikaliju, ispitna metoda s membranskom barijerom nije primjerena za procjenu potencijalnog nagrizajućeg djelovanja te ispitivane kemikalije i trebalo bi upotrijebiti drugu ispitnu metodu. Detekcijski sustav za kemikalije i uvjeti izlaganja koji se upotrebljavaju za ispitivanje kompatibilnosti trebali bi odražavati izlaganje u kasnijem ispitivanju s membranskom barijerom.

Test kategorizacije ispitivane kemikalije s obzirom na vremenski okvir

14. Ako je to primjereno za ispitnu metodu, ispitivanu kemikaliju koja je u ispitivanju kompatibilnosti ispunila uvjete treba podvrgnuti testu kategorizacije s obzirom na vremenski okvir, tj. testu probira kojim se razlikuju slabe i jake kiseline i baze. Na primjer, u validiranoj referentnoj metodi test kategorizacije s obzirom na vremenski okvir služi za određivanje koji bi se od dva vremenska okvira trebao upotrijebiti na temelju toga je li otkrivena znatna kisela ili alkalna rezerva. Za utvrđivanje nagrizajućeg djelovanja i potkategorije nagrizajućeg djelovanja na kožu prema UN GHS-u trebalo bi upotrijebiti dva različita vremenska okvira, na temelju kisele ili alkalne rezerve ispitivane kemikalije.

SASTAVNICE ISPITNE METODE S MEMBRANSKOM BARIJEROM

Membranska barijera

15. Membranska barijera ima dvije sastavnice: proteinski makromolekularni vodeni gel i propusnu potpurnu membranu. Proteinski gel trebao bi biti nepropustan za tekućine i krute tvari, ali trebao bi moći korodirati i postati propustan. Potpuno izrađenu membransku barijeru trebalo bi pohraniti u unaprijed utvrđenim uvjetima za koje se pokazalo da onemogućuju pogoršanje kvalitete gela, npr. sušenje, rast mikroba, pomicanje, pucanje, koje bi narušilo njegovu učinkovitost. Treba utvrditi prihvatljivo vrijeme skladištenja te se pripravnici membranske barijere ne koriste nakon tog razdoblja.
16. Propusna potporna membrana pruža mehaničku potporu proteinskom gelu tijekom procesa geliranja i izlaganja ispitivanoj kemikaliji. Potporna membrana trebala bi spriječiti ulegnuće ili pomicanje gela i biti propusna za sve ispitivane kemikalije.
17. Proteinski gel, koji se sastoji od proteina, npr. keratina, kolagena, ili mješavine proteina, čini matricu gela i služi kao cilj za ispitivanu kemikaliju. Proteinski materijal stavlja se na površinu potporne membrane i ostavlja se da se stvori gel prije nego što se membranska

barijera stavi na otopinu indikatora. Proteinski gel posvud bi trebao biti jednake debljine i gustoće te ne bi trebao sadržavati mjehuriće zraka ili nedostatke koji bi mogli utjecati na njegov funkcionalni integritet.

Detekcijski sustav za kemikalije (CDS)

18. Otopina indikatora (ista otopina koja se upotrebljavala za ispitivanje kompatibilnosti) treba reagirati u prisutnosti ispitivane kemikalije. Treba se koristiti pH-indikatorskom bojom ili kombinacijom boja, npr. krezol crvenilom i metiloranžom, koja će promijeniti boju u prisutnosti ispitivane kemikalije. Sustav mjerenja može biti vizualni ili elektronički.
19. Detekcijski sustavi razvijeni za otkrivanje prolazaka ispitivane kemikalije kroz membransku barijeru treba procijeniti u pogledu relevantnosti i pouzdanosti kako bi se utvrdio raspon kemikalija koje se mogu otkriti i kvantitativna ograničenja otkrivanja.

PROVOĐENJE TESTA

Sastavljanje sastavnica ispitne metode

20. Membranska barijera postavlja se u bočicu (ili cijev) koja sadržava otopinu indikatora tako da je potporna membrana potpuno u kontaktu s otopinom indikatora i da nisu prisutni mjehurići zraka. Treba paziti da se osigura integritet barijere.

Primjena ispitivane kemikalije

21. Primjerena količina ispitivane kemikalije, npr. 500 µl tekućine ili 500 mg krute tvari fino usitnjene u prah (7.) pažljivo se u slojevima nanosi na gornju površinu membranske barijere i ravnomjerno raspoređuje. Za svaku ispitivanu kemikaliju i njezine odgovarajuće kontrole priprema se odgovarajući broj ponovljenih uzoraka, npr. četiri (7.), (vidjeti stavke od 23. do 25.). Evidentira se vrijeme primjene ispitivane kemikalije na membransku barijeru. Kako bi se osiguralo da se kratka vremena nagrizanja točno evidentiraju, vremena primjene ispitivane kemikalije na ponovljene bočice postupno se mijenjaju.

Mjerenje prodiranja kroz membransku barijeru

22. Svaka se bočica primjereno prati i evidentira se vrijeme prve promjene otopine indikatora, tj. prodiranja kroz barijeru, te se utvrđuje vrijeme koje je proteklo od primjene do prodiranja kroz membransku barijeru.

Kontrole

23. Kod ispitivanja u kojima se s ispitivanom kemikalijom upotrebljava nosač ili otapalo, nosač ili otapalo treba biti kompatibilno sa sustavom membranske barijere, tj. ne smije izmijeniti integritet sustava membranske barijere ni nagrizajuće djelovanje ispitivane kemikalije. Ako je primjenjivo, kontrolu otapala (ili nosača) treba ispitati istodobno kad i

ispitivanu kemikaliju kako bi se dokazala kompatibilnost otapala sa sustavom membranske barijere.

24. Pozitivnu (nagrizajuću) kontrolu sa srednje nagrizajućom aktivnosti, npr. 110 ± 15 mg natrijeva hidroksida (potkategorija 1.B nagrizajućeg djelovanja prema UN GHS-u) (7.) treba ispitati istodobno kad i ispitivanu kemikaliju kako bi se procijenilo funkcionira li ispitni sustav zadovoljavajuće. Za procjenu relativnog potencijala za nagrizajuće djelovanje nagrizajuće ispitivane kemikalije može biti korisna druga pozitivna kontrola iz istog kemijskog razreda kao ispitivana kemikalija. Treba odabrati pozitivnu kontrolu ili kontrole srednje nagrizajućeg djelovanja (npr. potkategorija 1.B prema UN GHS-u) kako bi se otkrile promjene u vremenu prodiranja koje mogu biti neprihvatljivo dulje ili kraće od utvrđene referentne vrijednosti, što ukazuje na to da ispitni sustav ne funkcionira pravilno. Korisnost kemikalija koje djeluju iznimno nagrizajuće (potkategorija 1.A prema UN GHS-u) ili koje ne djeluju nagrizajuće u tu je svrhu ograničena. Nagrizajuća kemikalija iz potkategorije 1.B prema UN GHS-u omogućila bi otkrivanje predugog ili prekratkog vremena prodiranja. Kemikalija slabo nagrizajućeg djelovanja (potkategorija 1.C prema UN GHS-u) mogla bi se upotrijebiti kao pozitivna kontrola za mjerenje sposobnosti ispitne metode da dosljedno razlikuje kemikalije koje imaju slabo nagrizajuće djelovanje od kemikalija koje ne djeluju nagrizajuće. Neovisno o tome koji se pristup primjenjuje, treba razviti prihvatljivi raspon odgovora pozitivne kontrole na temelju prijašnjeg raspona vremena prodiranja za primijenjenu pozitivnu kontrolu ili kontrole, kao što je srednja vrijednost $\pm 2-3$ standardne devijacije. U svakoj studiji treba utvrditi točno vrijeme prodiranja za pozitivnu kontrolu kako bi se mogle otkriti devijacije koje su izvan prihvatljivog raspona.
25. Negativnu (nenagrizajuću) kontrolu, npr. 10-postotnu limunsku kiselinu, 6-postotnu propionsku kiselinu (7.) isto bi trebalo ispitati istodobno kad i ispitivanu kemikaliju kao još jednu mjeru kontrole kvalitete za dokazivanje funkcionalnog integriteta membranske barijere.

Kriteriji prihvatljivosti istraživanja

26. U skladu s utvrđenim vremenskim parametrima za svaku potkategoriju nagrizajućeg djelovanja prema UN GHS-u, vrijeme (u minutama) koje protekne od primjene ispitivane kemikalije na membransku barijeru do prodiranja kroz barijeru služi za predviđanje nagrizajućeg djelovanja ispitivane kemikalije. Da bi se istraživanje smatralo prihvatljivim, istodobna pozitivna kontrola trebala bi pokazati očekivano vrijeme reakcije prodiranja (npr. vrijeme prodiranja od osam do 16 minuta za natrijev hidroksid ako se upotrebljava kao pozitivna kontrola), istodobna negativna kontrola ne bi trebala djelovati nagrizajuće, a ako je uključena, istodobna kontrola s otapalom ne bi trebala djelovati nagrizajuće ni izmijeniti potencijal za nagrizajuće djelovanje ispitivane kemikalije. Laboratoriji bi prije rutinske primjene metode koja ispunjava zahtjeve ove ispitne metode trebali dokazati

tehničku osposobljenost primjenom 12 tvari preporučenih u tablici 2. Za nove *me-too* metode koje se razviju na temelju ove ispitne metode i koje su strukturno i funkcionalno slične validiranoj referentnoj metodi (14.) trebaju se upotrebljavati unaprijed definirani zahtjevi izvedbe kako bi se dokazala pouzdanost i točnost nove metode prije njezine primjene za ispitivanje u regulatorne svrhe (10.).

Tumačenje rezultata i razvrstavanje ispitivanih kemikalija prema nagrizajećem djelovanju

27. Vrijeme (u minutama) koje protekne od primjene ispitivane kemikalije na membransku barijeru do prodiranja kroz barijeru služi za razvrstavanje ispitivane kemikalije u potkategorije nagrizajećeg djelovanja prema UN GHS-u (1.) i, ako je primjenjivo, u ambalažne skupine UN-a (16.). Granične vrijednosti vremena za svaku od tri potkategorije nagrizajećeg djelovanja utvrđuju se za svaku predloženu ispitnu metodu. U konačnim odlukama o graničnim vremenima treba uzeti u obzir potrebu da se smanji preblago razvrstavanje opasnosti od nagrizajećeg djelovanja (tj. lažno negativni rezultati). U ovoj smjernici za ispitivanje trebala bi se koristiti granična vremena za Corrositex®, kako su navedena u tablici 3., jer je to jedina ispitna metoda koja je trenutačno obuhvaćena ovom smjernicom za ispitivanje (7.).

Tablica 3.: Model predviđanja Corrositex®

Srednje vrijeme prodiranja (min.)		Predviđanje prema sustavu UN GHS ³
Ispitivana kemikalija 1. kategorije ¹ (utvrđeno testom kategorizacije, koji je dio metode)	Ispitivana kemikalija 2. kategorije ² (utvrđeno testom kategorizacije, koji je dio metode)	
0–3 min	0–3 min	Nagrizajuće, neobavezna potkategorija 1.A
> 3 do 60 min	> 3 do 30 min	Nagrizajuće, neobavezna potkategorija 1.B
> 60 do 240 min	> 30 do 60 min	Nagrizajuće, neobavezna potkategorija 1.C
> 240 min	> 60 min	Nije nagrizajuće

¹ Ispitivana kemikalija s velikom kiselom/alkalnom rezervom (6.)

² Ispitivana kemikalija s malom kiselom/alkalnom rezervom (6.)

³ Potkategorije 1.A, 1.B i 1.C UN GHS-a odgovaraju ambalažnim skupinama UN-a I., II. odnosno III.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Podaci

28. Vrijeme (u minutama) koje prođe od primjene ispitivane kemikalije i pozitivne kontrole ili kontrola do prodiranja barijere treba prikazati u tabličnom obliku kao podatke o pojedinačnim ponovljenim uzorcima te srednje vrijednosti $\pm$ standardna devijacija za svaki pokus.

Izvješće o ispitivanju

29. Izvješće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Ispitivana kemikalija i kontrolne tvari:

- tvar s jednim sastojkom: kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv, CAS broj, SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula, čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.,
- tvar s više sastojaka, UVCB tvar i smjesa: opis (koliko je to moguće) kemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativnog udjela i relevantnih fizikalno-kemijskih svojstava sastojaka,
- fizički izgled, topljivost u vodi i dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva,
- izvor, broj serije, ako su dostupni,
- tretiranje ispitivane kemikalije/kontrolne tvari prije ispitivanja, ako je primjenljivo (npr. grijanje, mljevenje),
- stabilnost ispitivane kemikalije, rok uporabe ili datum za ponovnu analizu ako je poznat,
- uvjeti skladištenja.

Nosač:

- identifikacijska oznaka, koncentracija (prema potrebi), upotrijebljeni volumen,
- obrazloženje za odabir nosača.

Upotrijebljeni in vitro model membranske barijere i protokol, uključujući dokazanu točnost i pouzdanost

Ispitni uvjeti:

- opis korištenog uređaja i postupaka pripreme,
- podrijetlo i sastav korištene *in vitro* membranske barijere,
- sastav i svojstva otopine indikatora,
- metoda detekcije,
- količina ispitivane kemikalije i kontrolne tvari,

- broj ponavljanja,
- opis i obrazloženje testa kategorizacije s obzirom na vremenski okvir,
- način primjene,
- vremena opažanja,
- opis primijenjenih kriterija ocjenjivanja i razvrstavanja,
- dokazivanje osposobljenosti za izvođenje ispitne metode prije rutinske upotrebe ispitivanjem kemikalija za dokazivanje tehničke osposobljenosti.

Rezultati:

- tablični prikaz pojedinačnih neobrađenih podataka o pojedinačnim ispitnim i kontrolnim uzorcima za svako ponavljanje,
- opis drugih uočenih učinaka,
- utvrđeno razvrstavanje, s upućivanjem na primijenjeni model predviđanja/kriterije odlučivanja.

Rasprava o rezultatima

Zaključci

LITERATURA

1. Ujedinjeni narodi (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), First Revised Edition, UN New York i Ženeva, 2013. Dostupno na: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.
2. Poglavlje B.4. ovog Priloga, Akutno nadraživanje/nagrizanje kože.
3. Poglavlje B.40.bis ovog Priloga, Nagrizanje kože *in vitro*: ispitna metoda na modelu rekonstruirane ljudske epiderme (RhE).
4. Poglavlje B.40. ovog Priloga, Nagrizanje kože *in vitro*: transkutani električni otpor (TER).
5. OECD (2015). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 203). Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
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. and Liebsch, M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. Toxicology *In Vitro* 12, 483.–524.
7. ICCVAM (1999). Corrositex®. An *In Vitro* Test Method for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by ICCVAM, NTP and NICEATM. NIEHS, NIH Publication (No 99-4495).
8. Gordon V.C., Harvell J.D. and Maibach H.I. (1994). Dermal Corrosion, the Corrositex® System: A DOT Accepted Method to Predict Corrosivity Potential of Test Materials. *In vitro* Skin Toxicology-Irritation, Phototoxicity, Sensitization. Alternative Methods in Toxicology 10, 37.–45.
9. OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications. Series on testing and Assessment (No 34).
10. OECD (2014). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 435. Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz. Dostupno na: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/PerfStand-TG430-June14.pdf>.

11. ECVAM (2001). Statement on the Application of the CORROSITEX® Assay for Skin Corrosivity Testing. 15th Meeting of ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC), Ispira, Italija. ATLA 29, 96.–97.
12. U.S. DOT (2002). Exemption DOT-E-10904 (Fifth Revision). (20. rujna 2002.). Washington, D.C., U.S. DOT.
13. Poglavlje B.46. ovog Priloga, Nadraživanje kože *in vitro*: ispitna metoda na modelu rekonstruirane ljudske epiderme. ICCVAM (2004). ICCVAM Recommended Performance Standards for *In Vitro* Test Methods for Skin Corrosion. NIEHS, NIH Publication No 04-4510. Dostupno na: http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/dermal_docs/ps/ps044510.pdf.
14. U.S. EPA (1996). Method 1120, Dermal Corrosion. Dostupno na: <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/1120.pdf>.
15. Ujedinjeni narodi (UN) (2013). UN Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Model Regulations, 18th Revised Edition (Part, Chapter 2.8), UN, 2013. Dostupno na: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/unrec/rev18/English/Rev18_Volume1_Part2.pdf.

Dodatak

DEFINICIJE

Točnost: stupanj podudarnosti rezultata ispitne metode i prihvaćenih referentnih vrijednosti. Ona je mjerilo učinkovitosti ispitne metode i jedan od aspekata relevantnosti. Pojam je često međusobno zamjenjiv s pojmom „podudarnost” u smislu udjela točnih ishoda ispitne metode (9.).

Kemikalija: tvar ili smjesa.

Detekcijski sustav za kemikalije (CDS): vizualni ili elektronički sustav mjerenja s otopinom indikatora koja reagira u prisutnosti ispitivane kemikalije, npr. promjenom pH-indikatorske boje ili kombinacije boja, koja će promijeniti boju u prisutnosti ispitivane kemikalije ili drugim vrstama kemijskih ili elektrokemijskih reakcija.

Podudarnost: mjerilo učinkovitosti ispitne metode za ispitne metode koje daju kategorijski rezultat i jedan je od aspekata relevantnosti. Pojam je ponekad međusobno zamjenjiv s pojmom točnosti i definira se kao udio svih ispitanih kemikalija koje su pravilno razvrstane kao pozitivne ili negativne. Podudarnost u velikoj mjeri ovisi o prisutnosti pozitivnih rezultata u vrstama ispitivane kemikalije (9.).

GHS (Globalno usklađeni sustav razvrstavanja i označivanja kemikalija): sustav za razvrstavanje kemikalija (tvari i smjesa) prema standardiziranim vrstama i stupnjevima fizičkih opasnosti te opasnosti za zdravlje i okoliš, kojim su obuhvaćena odgovarajuća komunikacijska sredstva kao što su piktogrami, oznake opasnosti, oznake upozorenja, oznake obavijesti i sigurnosno-tehnički listovi, kojima se prenose informacije o njihovim štetnim učincima u cilju zaštite ljudi (uključujući poslodavce, radnike, prijevoznike, potrošače i interventno osoblje) i okoliša (1.).

IATA: integrirani pristup ispitivanju i procjeni.

Smjesa: smjesa ili otopina koja se sastoji od dviju ili više tvari.

Tvar s jednim sastojkom: tvar, definirana količinskim sastavom, u kojoj je jedan glavni sastojak prisutan u koncentraciji od najmanje 80 % (w/w).

Tvar s više sastojaka: tvar, definirana količinskim sastavom, u kojoj je više od jednog glavnog sastojka prisutno u koncentraciji od 10 % (w/w) ili većoj te manjoj od 80 % (w/w). Tvar s više sastojaka rezultat je procesa proizvodnje. Smjesa i tvar s više sastojaka razlikuju se po tome što se smjesa dobiva miješanjem dviju ili više tvari bez kemijske reakcije. Tvar s više sastojaka rezultat je kemijske reakcije.

NC: nije nagrizajuće.

Zahtjevi izvedbe: zahtjevi koji se temelje na validiranoj ispitnoj metodi i pružaju temelj za ocjenjivanje usporedivosti predložene, funkcionalno i mehanicistički slične, ispitne metode. Obuhvaćaju: i. ključne elemente ispitne metode; ii. minimalni popis referentnih kemikalija

odabranih među kemikalijama koje se upotrebljavaju za dokazivanje prihvatljive učinkovitosti validirane ispitne metode te iii. slične razine pouzdanosti i točnosti, utemeljene na rezultatima dobivenim za validiranu ispitnu metodu, koje se prilikom ocjenjivanja trebaju dokazati predloženom ispitnom metodom koristeći minimalni popis referentnih kemikalija (9.).

Relevantnost: opis odnosa između ispitne metode i istraživanog učinka te je li ispitivanje prikladno i korisno za određenu svrhu. Pokazuje u kojoj se mjeri ispitnom metodom točno mjeri ili predviđa istraživani biološki učinak. Relevantnost uključuje razmatranje o točnosti (podudarnosti) ispitne metode (9.).

Pouzdanost: pokazuje u kojoj se mjeri ispitna metoda može obnovljivo primijeniti unutar jednog laboratorija i između više laboratorija tijekom vremena uz primjenu istog protokola. Ocjenjuje se izračunavanjem obnovljivosti unutar jednog laboratorija i između više laboratorija (9.).

Osjetljivost: udio svih pozitivnih/aktivnih kemikalija koje su pravilno razvrstane primjenom ispitne metode. To je mjera točnosti ispitne metode koja daje kategorijske rezultate i važan je čimbenik za ocjenu relevantnosti ispitne metode (9.).

Nagrizanje kože *in vivo*: uzrokovanje ireverzibilnog oštećenja kože, točnije, vidljive nekroze koja kroz epidermu dopijeva u dermu nakon što je ispitivana kemikalija primjenjivana u trajanju do najviše četiri sata. Za nagrizanje kože tipična je pojava čireva, krvarenja, krvavih krasta te, do kraja opažanja od 14 dana, gubitak boje kože zbog nestajanja pigmenta, cijele površine zahvaćene alopecijom (gubitak dlake) i ožiljci. Za ocjenjivanje sumnjivih lezija treba razmotriti mogućnost histopatoloških pretraga.

Specifičnost: udio svih negativnih/neaktivnih kemikalija koje su pravilno razvrstane primjenom ispitne metode. To je mjera točnosti ispitne metode koja daje kategorijske rezultate i važan je čimbenik za ocjenu relevantnosti ispitne metode (9.).

Tvar: kemijski element i njegovi spojevi u prirodnom stanju ili dobiveni proizvodnim postupkom, što uključuje i aditive koji su nužni za održavanje stabilnosti proizvoda te nečistoće koje proizlaze iz primijenjenoga postupka, ali isključuje otapala koja se mogu izdvojiti bez utjecaja na stabilnost tvari ili promjene njezina sastava.

Ispitivana kemikalija: svaka tvar ili smjesa koja se ispituje ovom ispitnom metodom.

UVCB: tvari nepoznatog ili promjenjivog sastava, složeni reakcijski proizvodi ili biološki materijali.

B.66. IN VITRO TESTOVI TRANSAKTIVACIJE SA STABILNOM TRANSFEKCIJOM ZA OTKRIVANJE AGONISTA I ANTAGONISTA ESTROGENSKIH RECEPTORA

OPĆI UVOD

Smjernica OECD-a za ispitivanje koja se temelji na uspješnosti

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 455 (TG) (2016.). Smjernica za ispitivanje 455 je smjernica za ispitivanje koja se temelji na uspješnosti (PBTG) i u njoj se opisuje metodologija *in vitro* testova transaktivacije sa stabilnom transfekcijom za otkrivanje agonista i antagonista estrogenskih receptora (ER TA testovi). Sastoji se od nekoliko mehanicistički i funkcionalno sličnih ispitnih metoda za identifikaciju agonista i antagonista estrogenskih receptora (tj. ER α i/ili ER β) i trebala bi olakšati razvoj novih sličnih ili izmijenjenih ispitnih metoda u skladu s načelima za validaciju utvrđenima u Vodiču OECD-a o validaciji i međunarodnom prihvatanju novih ili ažuriranih ispitnih metoda za procjenu opasnosti (1.). Potpuno validirane referentne ispitne metode (Dodatak 2. i Dodatak 3.) koje čine osnovu ove smjernice za ispitivanje koja se temelji na uspješnosti uključuju:
 - test TA sa stabilnom transfekcijom (STTA) (2.) uz primjenu stanične linije (h) ER α -HeLa-9903, i
 - test VM7Luc ER TA (3.) uz primjenu stanične linije VM7Luc4E2¹, koja većinom izražava receptor hER α uz određeni doprinos receptora hER β (4. i 5.).

Za razvoj i validaciju sličnih testova za iste konačne učinke opasnosti dostupni su zahtjevi izvedbe (6. i 7.) te bi ih trebalo upotrebljavati. Oni omogućuju pravovremenu izmjenu PBTG-a 455 kako bi se novi slični testovi mogli dodati u ažurirani PBTG; međutim, slični testovi dodat će se samo nakon što ih OECD pregleda i složi se da su ispunjeni zahtjevi izvedbe. Testovi uključeni u Smjernicu za ispitivanje 455 mogu se upotrebljavati bez razlike za ispunjavanje zahtjeva zemalja članica OECD-a u pogledu rezultata ispitivanja transaktivacije estrogenskih receptora, uz ostvarivanje koristi od OECD-ova uzajamnog prihvatanja podataka.

¹ Prije lipnja 2016. ta je stanična linija bila određena kao stanična linija BG1Luc. Stanice BG-1 izvorno su opisali Geisinger i dr. (1998.) (35.), a kasnije su ih okarakterizirali istraživači iz NIEHS-a (*National Institute of Environmental Health Sciences*) (36.). Relativno nedavno otkriveno je da postoje dvije različite varijante stanica BG-1 kojima se istraživači koriste – BG-1 Fr i BG-1 NIEHS. Temeljita analiza, uključujući DNK ispitivanje, tih dviju varijanti staničnih linija BG-1 koju su proveli Li i suradnici (2014.) (37.) pokazala je da je BG-1 Fr jedinstven i da BG-1 NIEHS, tj. izvorna stanična linija koja se koristila za razvoj testa, nije stanična linija humanog karcinoma jajnika BG1, već varijanta stanične linije humanog karcinoma dojke MCF7. Stanična linija upotrijebljena u tom testu, koja se izvorno nazivala BG1Luc4E2 (38.), sad će se zvati VM7Luc4E2 („V” = varijanta; „M7” = stanice MCF7). Isto tako, test se sad zove VM7Luc ER TA. Iako se time mijenja podrijetlo stanične linije na kojoj se test temelji, ne utječe se na objavljene validacijske studije ni na korisnost i primjenu ovog testa za probir estrogenskih/antiestrogenskih kemikalija.

Kontekst i načela testova uključenih u ovu ispitnu metodu

2. OECD je 1998. pokrenuo aktivnost visokog prioriteta revizije postojećih i razvoja novih smjernica za ispitivanje za probir i ispitivanje potencijalnih endokrino disruptivnih kemikalija. OECD-ov konceptualni okvir (CF) za ispitivanje i procjenu potencijalnih endokrino disruptivnih kemikalija revidiran je 2012. Izvorni i revidirani konceptualni okviri uključeni su kao prilozi Vodiču OECD-a o standardiziranim ispitnim smjernicama za ocjenu kemikalija u pogledu endokrine disrupcije (8.). Konceptualni okvir sastoji se od pet razina, a svaka razina odgovara različitoj razini biološke složenosti. Testovi ER transaktivacije (TA) opisani u ovoj ispitnoj metodi testovi su 2. razine, koja uključuje „*in vitro* testove koji pružaju podatke o odabranim endokrinim mehanizmima/putovima”. Ova je ispitna metoda namijenjena *in vitro* testovima transaktivacije (TA) koji su osmišljeni za identifikaciju agonista i antagonista estrogenskih receptora (ER).
3. Interakcija estrogena i estrogenskih receptora može utjecati na transkripciju gena koje kontrolira estrogen, a to može dovesti do indukcije ili inhibicije staničnih procesa, među ostalim i onih koji su potrebni za proliferaciju stanica, normalni razvoj fetusa i reproduktivnu funkciju (9., 10. i 11.). Poremećaj uobičajenih estrogenskih sustava mogao bi izazvati štetne učinke za normalni razvoj (ontogeneza), reproduktivno zdravlje i integritet reproduktivnog sustava.
4. *In vitro* TA testovi temelje se na izravnoj ili neizravnoj interakciji tvari sa specifičnim receptorom koji regulira transkripciju proizvoda reporterskog gena. Ti se testovi u velikoj mjeri upotrebljavaju za procjenu genske ekspresije koju reguliraju specifični receptori u jezgri, kao što su estrogenski receptori (12., 13., 14., 15. i 16.). Predloženi su za otkrivanje estrogenske transaktivacije koju regulira estrogenski receptor (17., 18. i 19.). Postoje najmanje dvije glavne podvrste estrogenskih receptora u jezgri, α i β , a kodiraju ih posebni geni. Pojedini proteini imaju različite biološke funkcije te različitu distribuciju u tkivima i afinitete vezanja liganda (20., 21., 22., 23., 24., 25. i 26.). Jezgreni ER α posreduje u klasičnom estrogenskom odgovoru (27., 28., 29. i 30.) pa je stoga većina modela koji se trenutačno razvijaju za mjerenje aktivacije ili inhibicije estrogenskog receptora specifična za ER α . Testovi se upotrebljavaju za identifikaciju kemikalija koje aktiviraju (ili inhibiraju) estrogenski receptor nakon vezivanja liganda, nakon čega se kompleks receptora i liganda veže na specifične elemente DNK odgovora i transaktivira reporterski gen, što dovodi do povećane stanične ekspresije markerskog proteina. U tim se testovima mogu koristiti različiti reporterski odgovori. U sustavima koji se temelje na luciferazi, enzim luciferaza pretvara supstrat luciferina u bioluminiscentni proizvod koji se može kvantitativno izmjeriti s pomoću luminometra. Drugi primjeri uobičajenih reporterskih gena uključuju fluorescentni protein i gen *LacZ*, koji kodira β -galaktozidazu, enzim koji može pretvoriti bezbojni supstrat X-gal (5-bromo-4-kloro-indolil-galaktopiranozid) u plavi proizvod koji se može kvantificirati spektrofotometrom. Ti se reporterski geni

mogu procijeniti brzo i jeftino primjenom komercijalno dostupnog pribora za ispitivanje.

5. Validacijske studije STTA i VM7Luc TA testova pokazale su relevantnost i pouzdanost tih testova za predviđenu svrhu (3., 4., 5. i 30.). Zahtjevi izvedbe za ER TA testove koji se temelje na luminiscenciji u kojima se upotrebljavaju stanične linije mliječnih žlijezda uključene su u Evaluacijsko izvješće ICCVAM-a o ispitnoj metodi LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA): *in vitro* test za identifikaciju agonističkog ili antagonističkog djelovanja kemikalije na ljudski estrogenski receptor (3.). Ti su zahtjevi izvedbe izmijenjeni kako bi se mogli primjenjivati i na STTA i VM7Luc TA testove (2.).
6. Definicije i kratice upotrijebljene u ovoj ispitnoj metodi opisuju se u Dodatku 1.

Područje primjene TA testova i ograničenja povezana s njima

7. Ovi se testovi predlažu u svrhu probira i utvrđivanja prioriteta, ali u njima se mogu dobiti i mehanicističke informacije koje se mogu upotrijebiti u pristupu snage dokaza. Bave se transaktivacijom koju inducira kemijsko vezanje na receptore estrogena u *in vitro* sustavu. Stoga rezultate ne bi trebalo izravno ekstrapolirati na signalizaciju kompleksa i regulaciju netaknutog endokrinog sustava *in vivo*.
8. Transaktivacija koju posreduju receptori estrogena smatra se jednim od ključnih mehanizama endokrine disrupcije (ED), iako postoje i drugi mehanizmi preko kojih može doći do endokrine disrupcije, uključujući: i. interakcije s ostalim receptorima i enzimskim sustavima u endokrinom sustavu; ii. sintezu hormona; iii. metaboličku aktivaciju i/ili inaktivaciju hormona; iv. distribuciju hormona u ciljna tkiva i v. uklanjanje hormona iz tijela. Ni jedan test u okviru ove ispitne metode ne bavi se tim načinima djelovanja.
9. Ova se ispitna metoda bavi sposobnošću kemikalija da aktiviraju (tj. djeluju kao agonisti) i da potiskuju (tj. djeluju kao antagonisti) transkripciju koja ovisi o receptorima estrogena. Određene kemikalije mogu pokazati i agonističko i antagonističko djelovanje ovisno o vrsti stanica i poznate su kao selektivni modulatori estrogenskih receptora (SERM-ovi). Kemikalije koje su u ovim testovima negativne mogle bi se procijeniti u testovima vezivanja na estrogenski receptor prije nego što se zaključi da se kemikalija ne veže na receptor. Osim toga, u ovim će se testovima vjerojatno dobiti samo podaci o aktivnosti polazne molekule, imajući na umu ograničene metaboličke mogućnosti *in vitro* staničnih sustava. Budući da su se u validaciji upotrebljavale samo pojedinačne tvari, nije se razmatrala primjenjivost za ispitivanje smjesa. Unatoč tomu, ova je ispitna metoda u teoriji primjenjiva za ispitivanje tvari s više sastojaka, UVCB tvari i smjesa. Prije nego što se ova ispitna metoda primijeni na tvari s više sastojaka, UVCB tvari ili smjesi radi dobivanja podataka za predviđenu regulatornu svrhu, potrebno je razmotriti mogu li se te, ako se mogu, zašto se njome mogu dobiti primjereni

rezultati za tu svrhu. Ta razmatranja nisu potrebna ako postoji regulatorni zahtjev za ispitivanje smjese.

10. U informativne svrhe u tablici 1. navedeni su rezultati ispitivanja agonista za 34 tvari koje su ispitane u obje potpuno validirane ispitne metode opisane u ovoj ispitnoj metodi. Od tih tvari 26 ih je razvrstano kao definitivni agonisti receptora estrogena, a osam ih je bilo negativno na temelju objavljenih izvješća, uključujući *in vitro* testove za vezanje receptora estrogena i transaktivaciju i/ili uterotrofni test (2., 3., 18., 31., 32., 33. i 34.). U tablici 2. navedeni su rezultati ispitivanja antagonista za 15 tvari koje su ispitane u obje potpuno validirane ispitne metode opisane u ovoj ispitnoj metodi. Od tih tvari četiri su razvrstane kao definitivni/pretpostavljeni antagonisti receptora estrogena, a deset ih je bilo negativno na temelju objavljenih izvješća, uključujući *in vitro* testove za vezanje receptora estrogena i transaktivaciju (2., 3., 18. i 31.). S obzirom na podatke sažete u tablicama 1. i 2., postojalo je 100-postotno slaganje obiju referentnih ispitnih metoda o razvrstavanju svih tvari osim jedne tvari (mifepristona) u testu antagonista i svaka je tvar točno razvrstana kao agonist/antagonist receptora estrogena ili kao negativna tvar. Dodatne informacije o ovoj skupini kemikalija i o dodatnim kemikalijama koje su ispitane u STTA i VM7Luc ER TA testovima tijekom validacijskih studija navedene su u zahtjevima izvedbe za testove ER TA (6. i 7.), Dodatak 2. (tablice 1., 2. i 3.).

Tablica 1.: Pregled rezultata iz STTA i VM7Luc ER TA testova za tvari ispitane u oba testa agonista i razvrstane kao agonisti estrogenskog receptora (POZ) ili negativne tvari (NEG)

	Tvar	CAS br.	STTA test1			VM7Luc ER TA test2		Izvor podataka za razvrstavanje4		
			ER TA aktivnost	Vrijednost PC10 (M)	Vrijednost PC50 ^b (M)	ER TA aktivnost	Vrijednost EC50 b, 3 (M)	Ostali ER TA-ovi ^c	Vezanje ER-a	Uterotrofni
1	17β-estradiol ^a	50-28-2	POZ	$< 1,00 \times 10^{-11}$	$< 1,00 \times 10^{-11}$	POZ	$5,63 \times 10^{-12}$	POZ (227/227)	POZ	POZ
2	17α-estradiol ^a	57-91-0	POZ	$7,24 \times 10^{-11}$	$6,44 \times 10^{-10}$	POZ	$1,40 \times 10^{-9}$	POZ (11/11)	POZ	POZ
3	17α-etinilestradiol ^a	57-63-6	POZ	$< 1,00 \times 10^{-11}$	$< 1,00 \times 10^{-11}$	POZ	$7,31 \times 10^{-12}$	POZ (22/22)	POZ	POZ
4	17β-trenbolon	10161-33-8	POZ	$1,78 \times 10^{-8}$	$2,73 \times 10^{-7}$	POZ	$4,20 \times 10^{-8}$	POZ (2/2)	NI	NI
5	19-nortestosteron ^a	434-22-0	POZ	$9,64 \times 10^{-9}$	$2,71 \times 10^{-7}$	POZ	$1,80 \times 10^{-6}$	POZ (4/4)	POZ	POZ
6	4-kumilfenol ^a	599-64-4	POZ	$1,49 \times 10^{-7}$	$1,60 \times 10^{-6}$	POZ	$3,20 \times 10^{-7}$	POZ (5/5)	POZ	NI
7	4-tert-oktilfenol ^a	140-66-9	POZ	$1,85 \times 10^{-9}$	$7,37 \times 10^{-8}$	POZ	$3,19 \times 10^{-8}$	POZ (21/24)	POZ	POZ
8	Apigenin ^a	520-36-5	POZ	$1,31 \times 10^{-7}$	$5,71 \times 10^{-7}$	POZ	$1,60 \times 10^{-6}$	POZ (26/26)	POZ	NI
9	Atrazin ^a	1912-24-9	NEG	–	–	NEG	–	NEG (30/30)	NEG	NI
10	Bisfenol A ^a	80-05-7	POZ	$2,02 \times 10^{-8}$	$2,94 \times 10^{-7}$	POZ	$5,33 \times 10^{-7}$	POZ (65/65)	POZ	POZ
11	Bisfenol B ^a	77-40-7	POZ	$2,36 \times 10^{-8}$	$2,11 \times 10^{-7}$	POZ	$1,95 \times 10^{-7}$	POZ (6/6)	POZ	POZ
12	Benzil-butil-ftalat ^a	85-68-7	POZ	$1,14 \times 10^{-6}$	$4,11 \times 10^{-6}$	POZ	$1,98 \times 10^{-6}$	POZ (12/14)	POZ	NEG
13	Kortikosteron ^a	50-22-6	NEG	–	–	NEG	–	NEG (6/6)	NEG	NI
14	Kumestrol ^a	479-13-0	POZ	$1,23 \times 10^{-9}$	$2,00 \times 10^{-8}$	POZ	$1,32 \times 10^{-7}$	POZ (30/30)	POZ	NI
15	Daidzein ^a	486-66-8	POZ	$1,76 \times 10^{-8}$	$1,51 \times 10^{-7}$	POZ	$7,95 \times 10^{-7}$	POZ (39/39)	POZ	POZ
16	Dietilstilbestrol ^a	56-53-1	POZ	$< 1,00 \times 10^{-11}$	$2,04 \times 10^{-11}$	POZ	$3,34 \times 10^{-11}$	POZ (42/42)	POZ	NI
17	Di- <i>n</i> -butil-ftalat	84-74-2	POZ	$4,09 \times 10^{-6}$		POZ	$4,09 \times 10^{-6}$	POZ (6/11)	POZ	NEG
18	Etil paraben	120-47-8	POZ	$5,00 \times 10^{-6}$	(bez PC50)	POZ	$2,48 \times 10^{-5}$	POZ		NI
19	Estron ^a	53-16-7	POZ	$3,02 \times 10^{-11}$	$5,88 \times 10^{-10}$	POZ	$2,34 \times 10^{-10}$	POZ (26/28)	POZ	POZ
20	Genistein ^a	446-72-0	POZ	$2,24 \times 10^{-9}$	$2,45 \times 10^{-8}$	POZ	$2,71 \times 10^{-7}$	POZ (100/102)	POZ	POZ
21	Haloperidol	52-86-8	NEG	–	–	NEG	–	NEG (2/2)	NEG	NI
22	Kemferol ^a	520-18-3	POZ	$1,36 \times 10^{-7}$	$1,21 \times 10^{-6}$	POZ	$3,99 \times 10^{-6}$	POZ (23/23)	POZ	NI
23	Kepon ^a	143-50-0	POZ	$7,11 \times 10^{-7}$	$7,68 \times 10^{-6}$	POZ	$4,91 \times 10^{-7}$	POZ (14/18)	POZ	NI
24	Ketokonazol	65277-42-1	NEG	–	–	NEG	–	NEG (2/2)	NEG	NI

25	Linuron ^a	330-55-2	NEG	–	–	NEG	–	NEG (8/8)	NEG	NI
26	Mezo-heksestrol ^a	84-16-2	POZ	$< 1,00 \times 10^{-11}$	$2,75 \times 10^{-11}$	POZ	$1,65 \times 10^{-11}$	POZ (4/4)	POZ	NI
27	Metil testosteron ^a	58-18-4	POZ	$1,73 \times 10^{-7}$	$4,11 \times 10^{-6}$	POZ	$2,68 \times 10^{-6}$	POZ (5/6)	POZ	NI
28	Morin	480-16-0	POZ	$5,43 \times 10^{-7}$	$4,16 \times 10^{-6}$	POZ	$2,37 \times 10^{-6}$	POZ (2/2)	POZ	NI
29	Noretinodrel ^a	68-23-5	POZ	$1,11 \times 10^{-11}$	$1,50 \times 10^{-9}$	POZ	$9,39 \times 10^{-10}$	POZ (5/5)	POZ	NI
30	<i>p,p'</i> -metoksiklor ^a	72-43-5	POZ	$1,23 \times 10^{-6}$	(bez PC50) ^b	POZ	$1,92 \times 10^{-6}$	POZ (24/27)	POZ	POZ
31	Fenobarbital ^a	57-30-7	NEG	–	–	NEG	–	NEG (2/2)	NEG	NI
32	Reserpin	50-55-5	NEG	–	–	NEG	–	NEG (4/4)	NEG	NI
33	Spironolakton ^a	52-01-7	NEG	–	–	NEG	–	NEG (4/4)	NEG	NI
34	Testosteron	58-22-0	POZ	$2,82 \times 10^{-8}$	$9,78 \times 10^{-6}$	POZ	$1,75 \times 10^{-5}$	POZ (5/10)	POZ	NI

Kratice: CAS br. = registarski broj Službe za podatke o kemijskim tvarima; M = molarno; EC50 = pola najveće učinkovite koncentracije ispitivane tvari; NEG = negativno; POZ = pozitivno; NI = nije ispitano; PC10 (i PC50) = koncentracija ispitivane tvari pri kojoj odgovor iznosi 10 % (ili 50 % za PC50) odgovora koji inducira pozitivna kontrola (E2, 1nM) na svakoj ploči.

a Uobičajene tvari ispitane u STTA i VM7Luc ER TA testovima koje su određene kao agonisti receptora estrogena ili negativne tvari i upotrijebljene za procjenu točnosti u validacijskoj studiji testa VM7Luc ER TA (ICCVAM-ovo evaluacijsko izvješće o testu VM7Luc ER TA, tablica 4-1 (3.)).

b Najveća koncentracija ispitana bez ograničenja zbog citotoksičnosti ili netopljivosti bila je 1×10^{-5} M (STTA test) i 1×10^{-3} M (VM7Luc ER TA test).

c Broj u zagradi označava rezultate ispitivanja razvrstane kao pozitivni (POZ) ili negativni (NEG) u odnosu na ukupni broj studija na koje se upućuje.

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

2 ICCVAM-ovo evaluacijsko izvješće o ispitnoj metodi LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA): *in vitro* metoda za identifikaciju agonista i antagonista estrogenskih receptora (3.)

3 Srednje vrijednosti EC50 izračunane su s pomoću vrijednosti koje se naveli laboratoriji koji su provodili validacijsku studiju testa VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM i Hiyoshi) (3.).

4 Razvrstavanje kao agonist estrogenskog receptora ili negativna tvar temeljilo se na informacijama iz ICCVAM-ovih osnovnih dokumenata za preispitivanje (BRD; *Background Review Documents*) za ispitne metode vezivanja receptora estrogena i transaktivacije (31.) te informacijama dobivenima iz publikacija koje su objavljene i pregledane nakon dovršetka ICCVAM-ovih BRD-ova (2., 3., 18., 31., 33. i 34.).

Napomene: u svakom testu u okviru ove ispitne metode ne koriste se ista mjerenja. U nekim se situacijama ne može izračunati EC₅₀ jer nije generirana cijela krivulja doza i reakcija. Dok je u STTA testu vrijednost PC10 ključno mjerenje, mogu postojati i drugi primjeri u kojima će PCx dati korisne informacije.

Tablica 2.: Usporedba rezultata iz STTA i VM7Luc ER TA testova za tvari ispitane u oba testa antagonista i razvrstane kao antagonisti estrogenskog receptora (POZ) ili negativne tvari (NEG)

	Tvar ^a	CAS br.	ER STTA test ¹		VM7Luc ER TA test ²		Mogući učinci testa ER STTA ⁴	ICCVAM-ovo ⁵ sporazumno razvrstavanje	Kemijski razred prema MeSH-u ⁶	Razred proizvoda ⁷
			ER TA aktivnost	Vrijednost IC ₅₀ ^b (M)	ER TA aktivnost	Vrijednost IC ₅₀ ^{b,3} (M)				
1	4-hidroksitamoksifen	68047-06-3	POZ	$3,97 \times 10^{-9}$	POZ	$2,08 \times 10^{-7}$	umjereno POZ	POZ	Ugljikovodik (ciklički)	Farmaceutski proizvod
2	Dibenzo[a,h]antracen	53-70-3	POZ	Bez IC ₅₀	POZ	Bez IC ₅₀	POZ	PP	Policiklički spoj	Laboratorijska kemikalija, prirodni proizvod
3	Mifepriston	84371-65-3	POZ	$5,61 \times 10^{-6}$	NEG	–	blago POZ	NEG	Steroid	Farmaceutski proizvod
4	Raloksifen HCl	82640-04-8	POZ	$7,86 \times 10^{-10}$	POZ	$1,19 \times 10^{-9}$	umjereno POZ	POZ	Ugljikovodik (ciklički)	Farmaceutski proizvod
5	Tamoksifen	10540-29-1	POZ	$4,91 \times 10^{-7}$	POZ	$8,17 \times 10^{-7}$	POZ	POZ	Ugljikovodik (ciklički)	Farmaceutski proizvod
6	17β-estradiol	50-28-2	NEG	–	NEG	–	PN	PN	Steroid	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
7	Apigenin	520-36-5	NEG	–	NEG	–	NEG	NEG	Heterociklički spoj	Boja, prirodni proizvod, farmaceutski međuproizvod
8	Atrazin	1912-24-9	NEG	–	NEG	–	NEG	PN	Heterociklički spoj	Herbicid
9	Di- <i>n</i> -butil-ftalat	84-74-2	NEG	–	NEG	–	NEG	NEG	Ester, ftalna kiselina	Kozmetički sastojak, industrijska kemikalija, plastifikator
10	Fenarimol	60168-88-9	NEG	–	NEG	–	nije ispitano	PN	Heterociklički spoj, pirimidin	Fungicid
11	Flavon	525-82-6	NEG	–	NEG	–	PN	PN	Flavonoid, heterociklički spoj	Prirodni proizvod, farmaceutski proizvod
12	Flutamid	13311-84-7	NEG	–	NEG	–	NEG	PN	Amid	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
13	Genistein	446-72-0	NEG	–	NEG	–	PN	NEG	Flavonoid, heterociklički spoj	Prirodni proizvod, farmaceutski proizvod
14	<i>p</i> - <i>n</i> -nonilfenol	104-40-5	NEG	–	NEG	–	nije ispitano	NEG	Fenol	Kemijski međuproizvod
15	Resveratrol	501-36-0	NEG	–	NEG	–	PN	NEG	Ugljikovodik (ciklički)	Prirodni proizvod

Kratice: CAS br. = registarski broj Službe za podatke o kemijskim tvarima; M = molarno; IC₅₀ = pola najveće inhibitorne koncentracije ispitivane tvari; NEG = negativno; PN = pretpostavlja se da je negativno; POZ = pozitivno; PP = pretpostavlja se da je pozitivno.

^a Uobičajene tvari ispitane u STTA i VM7Luc ER TA testovima koje su određene kao antagonisti receptora estrogena ili negativne tvari i upotrijebljene za procjenu točnosti u validacijskoj studiji testa VM7Luc ER TA (2. i 3.).

^b Najveća koncentracija ispitana bez ograničenja zbog citotoksičnosti ili netopljivosti bila je 1 × 10⁻³ M (STTA test) i 1 × 10⁻⁵ M (VM7Luc ER TA test).

¹ Validacijsko izvješće o testu transkripcijske aktivacije sa stabilnom transfekcijom za otkrivanje aktivnosti posredovane receptorima estrogena, dio B (2.).

² ICCVAM-ovo evaluacijsko izvješće o ispitnoj metodi LUMI-CELL ER (VM7Luc ER TA): *in vitro* metoda za identifikaciju agonista i antagonista estrogenskih receptora (3.).

³ Srednje vrijednosti IC₅₀ izračunane su s pomoću vrijednosti koje se naveli laboratoriji koji su provodili validacijsku studiju testa VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM i Hiyoshi) (3.).

⁴ ER STTA aktivnost koja se očekuje na temelju njihovih učinaka koji su već prijavljeni i poznati iz prijašnjih podataka CERI-ja o testu vezivanja na estrogenske receptore, iz uterotrofnog testa i informacija prikupljenih iz objavljene literature (2.).

⁵ Razvrstavanje kao antagonist receptora estrogena ili negativna tvar temeljilo se na informacijama iz ICCVAM-ovih osnovnih dokumenata za preispitivanje (BRD; *Background Review Documents*) za testove vezivanja receptora estrogena i transaktivacije (31.) te informacijama dobivenima iz publikacija koje su objavljene i pregledane nakon dovršetka ICCVAM-ovih BRD-ova (2., 3., 18. i 31.).

⁶ Tvari su raspoređene u jedan kemijski razred ili više njih primjenom oznaka medicinskog nazivlja američke Nacionalne medicinske knjižnice (MeSH) – međunarodno priznate standardne sheme razvrstavanja (dostupno na <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁷ Tvari su raspoređene u jedan razred proizvoda ili više njih primjenom baze podataka o opasnim tvarima američke Nacionalne medicinske knjižnice (dostupno na <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).

SASTAVNICE ER TA TESTA

Ključne sastavnice testa

11. Ova ispitna metoda primjenjuje se na testove u kojima se upotrebljava model stabilno transficiranog ili endogenog receptora ER α i stabilno transficiranog reporterskog gena koje kontrolira jedan element odgovora estrogena ili više njih; međutim, mogu biti prisutni i drugi receptori kao što je ER β . To su ključne sastavnice testa.

Kontrole

12. Treba opisati osnovu za predložene istodobne referentne norme za svaki test agonista i antagonista. Istodobne kontrole (negativna, otapalo i pozitivna), prema potrebi, znak su da test djeluje u ispitnim uvjetima i osnova su za usporedbe među pokusima; obično su dio kriterija prihvatljivosti za određeni pokus (1.).

Standardni postupci kontrole kvalitete

13. Standardne postupke kontrole kvalitete treba provoditi kako je opisano za svaki test kako bi se osiguralo da stanična linija ostane stabilna tijekom višestrukih pasaža, da ne sadržava mikoplazme (tj. nije kontaminirana bakterijama) i da zadrži sposobnost da tijekom vremena daje očekivane odgovore posredovane estrogenskim receptorima. Stanične linije nadalje bi trebalo provjeriti u pogledu točnog identiteta i ostalih kontaminanata (npr. gljivice, kvasac i virusi).

Dokazivanje osposobljenosti laboratorija

14. Prije ispitivanja nepoznatih kemikalija primjenom bilo kojeg od testova u okviru ove ispitne metode, svaki laboratorij treba dokazati osposobljenost za primjenu testa. Kako bi dokazao osposobljenost, svaki bi laboratorij trebao ispitati 14 tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti navedenih u tablici 3. za test agonista i 10 tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti iz tablice 4. za test antagonista. To ispitivanje osposobljenosti potvrdit će i osjetljivost ispitnog sustava. Popis tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti podskup je referentnih tvari koje su navedene u zahtjevima izvedbe za ER TA testove (6.). Te su tvari komercijalno dostupne, čine razrede kemikalija koji se obično povezuju s aktivnošću agonista ili antagonista receptora estrogena, pokazuju primjeren raspon jakosti koji se očekuje za agoniste/antagoniste receptora estrogena (tj. slabi do jaki) i uključuju negativne tvari. Ispitivanje tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti treba se ponoviti barem dvaput na različite dane. Osposobljenost se dokazuje točnim razvrstavanjem (pozitivno/negativno) svake tvari za dokazivanje osposobljenosti. Pri učenju testova svaki tehničar treba dvaput ponoviti ispitivanje osposobljenosti. Ovisno o vrsti stanica neke se od tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti mogu ponašati kao SERM-ovi i pokazivati aktivnosti i kao agonisti i antagonisti. Međutim, tvari za dokazivanje tehničke

osposobljenosti u tablicama 3. i 4. razvrstane su prema poznatoj dominantnoj aktivnosti koja bi se trebala koristiti za procjenu osposobljenosti.

15. Kako bi se dokazala uspješnost i u svrhe kontrole kvalitete svaki bi laboratorij trebao izraditi bazu podataka prijašnjih agonista i antagonista s podacima o referentnoj normi (npr. 17β -estradiol i tamoksifen), pozitivnim i negativnim kontrolnim kemikalijama i kontroli s otapalom (npr. DMSO). Za početak, bazu podataka treba izraditi iz najmanje deset neovisnih ciklusa ispitivanja agonista (npr. 17β -estradiola) i deset neovisnih ciklusa ispitivanja antagonista (npr. tamoksifena). Rezultate iz budućih analiza tih referentnih normi i kontrola s otapalom treba dodati kako bi se povećala baza podataka i osigurala dosljednost i uspješnost laboratorija u provedbi biotestova tijekom vremena.

Tablica 3.: Popis (14) tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti za test agonista⁸

Br. ⁷	Tvar	CAS br.	Predviđeni odgovor ¹	STTA test			VM7Luc ER TA test		Kemijski razred prema MeSH-u ⁵	Razred proizvoda ⁶
				Vrijednost PC ₁₀ (M) ²	Vrijednost PC ₅₀ (M) ²	Raspon ispitnih konc. (M)	Vrijednost EC ₅₀ u VM7Luc (M) ³	Najviša konc. za studiju o utvrđivanju raspona (M) ⁴		
14	Dietilstilbestrol	56-53-1	POZ	$< 1,00 \times 10^{-11}$	$2,04 \times 10^{-11}$	$10^{-14} - 10^{-8}$	$3,34 \times 10^{-11}$	$3,73 \times 10^{-4}$	Ugljikovodik (ciklički)	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
12	17 α -estradiol	57-91-0	POZ	$4,27 \times 10^{-11}$	$6,44 \times 10^{-10}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1,40 \times 10^{-9}$	$3,67 \times 10^{-3}$	Steroid	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
15	Mezo-heksestrol	84-16-2	POZ	$< 1,00 \times 10^{-11}$	$2,75 \times 10^{-11}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1,65 \times 10^{-11}$	$3,70 \times 10^{-3}$	Ugljikovodik (ciklički), fenol	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
11	4-tert-oktilfenol	140-66-9	POZ	$1,85 \times 10^{-9}$	$7,37 \times 10^{-8}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$3,19 \times 10^{-8}$	$4,85 \times 10^{-3}$	Fenol	Kemijski međuprodukt
9	Genistein	446-72-0	POZ	$2,24 \times 10^{-9}$	$2,45 \times 10^{-8}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$2,71 \times 10^{-7}$	$3,70 \times 10^{-4}$	Flavonoid, heterociklički spoj	Prirodni proizvod, farmaceutski proizvod
6	Bisfenol A	80-05-7	POZ	$2,02 \times 10^{-8}$	$2,94 \times 10^{-7}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$5,33 \times 10^{-7}$	$4,38 \times 10^{-3}$	Fenol	Kemijski međuprodukt
2	Kemferol	520-18-3	POZ	$1,36 \times 10^{-7}$	$1,21 \times 10^{-6}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$3,99 \times 10^{-6}$	$3,49 \times 10^{-3}$	Flavonoid, heterociklički spoj	Prirodni proizvod
3	Benzil-butil-ftalat	85-68-7	POZ	$1,14 \times 10^{-6}$	$4,11 \times 10^{-6}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1,98 \times 10^{-6}$	$3,20 \times 10^{-4}$	Karboksilna kiselina, ester, ftalna kiselina	Plastifikator, industrijska kemikalija
4	p,p'-metoksiklor	72-43-5	POZ	$1,23 \times 10^{-6}$	–	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1,92 \times 10^{-6}$	$2,89 \times 10^{-3}$	Ugljikovodik (halogenirani)	Pesticid, veterinarski proizvod
1	Etil paraben	120-47-8	POZ	$5,00 \times 10^{-6}$	–	$10^{-11} - 10^{-5}$	$2,48 \times 10^{-5}$	$6,02 \times 10^{-3}$	Karboksilna kiselina, fenol	Farmaceutski proizvod, konzervansi
17	Atrazin	1912-24-9	NEG	–	–	$10^{-10} - 10^{-4}$	–	$4,64 \times 10^{-4}$	Heterociklički spoj	Herbicid
20	Spironolakton	52-01-7	NEG	–	–	$10^{-11} - 10^{-5}$	–	$2,40 \times 10^{-3}$	Lakton, steroid	Farmaceutski proizvod
21	Ketokonazol	65277-42-1	NEG	–	–	$10^{-11} - 10^{-5}$	–	$9,41 \times 10^{-5}$	Heterociklički spoj	Farmaceutski proizvod
22	Reserpin	50-55-5	NEG	–	–	$10^{-11} - 10^{-5}$	–	$1,64 \times 10^{-3}$	Heterociklički spoj, indol	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod

Kratice: CAS br. = registarski broj Službe za podatke o kemijskim tvarima; EC₅₀ = pola najveće učinkovite koncentracije ispitivane tvari; NEG = negativno; POZ = pozitivno; PC₁₀ (i PC₅₀) = koncentracija ispitivane tvari pri kojoj odgovor iznosi 10 % (ili 50 % za PC₅₀) odgovora koji inducira pozitivna kontrola (E2, 1nM) na svakoj ploči.

- 1 Razvrstavanje kao pozitivno ili negativno u pogledu aktivnosti agonista receptora estrogena temeljilo se na ICCVAM-im osnovnim dokumentima za preispitivanje (BRD) za testove vezivanja receptora estrogena i transaktivacije (31.) te empirijskim podacima i drugim informacijama dobivenima iz studija na koje se upućuje koje su objavljene i pregledane nakon dovršetka ICCVAM-ovih
BRD-ova
(2., 3., 18., 31., 32., 33. i 34.).
- 2 Vrijednosti navedene u dokumentu *Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line* (30.).
- 3 Srednje vrijednosti EC50 izračunane su s pomoću vrijednosti koje se naveli laboratoriji koji su provodili validacijsku studiju testa VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM i Hiyoshi) (3.).
- 4 Navedene koncentracije bile su najviše koncentracije ispitane (studija o utvrđivanju raspona) tijekom validacije testa VM7Luc ER TA. Ako su se koncentracije iz različitih laboratorija razlikovale, navedena je najveća koncentracija. Vidjeti tablicu 4-10 ICCVAM-ova evaluacijskog izvješća o ispitnoj metodi; ispitna metoda LUMI-Cell®ER (VM7Luc ER TA): *in vitro* test za identifikaciju agonističkog ili antagonističkog djelovanja kemikalije na ljudski estrogenski receptor (3.).
- 5 Tvari su raspoređene u jedan kemijski razred ili više njih primjenom oznaka medicinskog nazivlja američke Nacionalne medicinske knjižnice (MeSH) – međunarodno priznate standardne sheme razvrstavanja (dostupno na: <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).
- 6 Tvari su raspoređene u jedan razred proizvoda ili više njih primjenom baze podataka o opasnim tvarima američke Nacionalne medicinske knjižnice (dostupno na: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).
- 7 Iz tablice 1. (Popis referentnih kemikalija (22.) za procjenu točnosti agonista estrogenskog receptora) zahtjeva izvedbe (6.)
- 8 Ako tvar za dokazivanje tehničke osposobljenosti više nije komercijalno dostupna, može se upotrijebiti tvar koja je jednako razvrstana te je usporedive jakosti, načina djelovanja i kemijskog razreda.

Tablica 4.: Popis (10) tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti za test antagonista

	Tvar ^a	CAS br.	ER STTA test ¹			VM7Luc ER TA test ²			Mogući učinci testa ER STTA ¹	ICCVAM-ovo ⁵ sporazumno razvrstavanje	Kemijski razred prema MeSH-u ⁶	Razred proizvoda ⁷
			ER TA aktivnost	IC ₅₀ (M)	Raspon ispitnih konc. (M)	ER TA aktivnost	IC ₅₀ ³ (M)	Najviša konc. za studiju o utvrđivanju raspona (M) ⁴				
1	4-hidroksitamoksifen	68047-06-3	POZ	$3,97 \times 10^{-9}$	$10^{-12} - 10^{-7}$	POZ	$2,08 \times 10^{-7}$	$2,58 \times 10^{-4}$	umjereno POZ	POZ	Ugljikovodik (ciklički)	Farmaceutski proizvod
2	Raloksifen HCl	82640-04-8	POZ	$7,86 \times 10^{-10}$	$10^{-12} - 10^{-7}$	POZ	$1,19 \times 10^{-9}$	$1,96 \times 10^{-4}$	umjereno POZ	POZ	Ugljikovodik (ciklički)	Farmaceutski proizvod
3	Tamoksifen	10540-29-1	POZ	$4,91 \times 10^{-7}$	$10^{-10} - 10^{-5}$	POZ	$8,17 \times 10^{-7}$	$2,69 \times 10^{-4}$	POZ	POZ	Ugljikovodik (ciklički)	Farmaceutski proizvod
4	17β-estradiol	50-28-2	NEG	–	$10^{-9} - 10^{-4}$	NEG	–	$3,67 \times 10^{-3}$	vjerojatno negativno*	PN	Steroid	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
5	Apigenin	520-36-5	NEG	–	$10^{-9} - 10^{-4}$	NEG	–	$3,70 \times 10^{-4}$	NEG	NEG	Heterociklički spoj	Boja, prirodni proizvod, farmaceutski međuprodukt
6	Di- <i>n</i> -butil-ftalat	84-74-2	NEG	–	$10^{-8} - 10^{-3}$	NEG	–	$3,59 \times 10^{-3}$	NEG	NEG	Ester, ftalna kiselina	Kozmetički sastojak, industrijska kemikalija, plastifikator
7	Flavon	525-82-6	NEG	–	$10^{-8} - 10^{-3}$	NEG	–	$4,50 \times 10^{-4}$	vjerojatno negativno*	PN	Flavonoid, heterociklički spoj	Prirodni proizvod, farmaceutski proizvod
8	Genistein	446-72-0	NEG	–	$10^{-9} - 10^{-4}$	NEG	–	$3,70 \times 10^{-4}$	vjerojatno negativno*	NEG	Flavonoid, heterociklički spoj	Prirodni proizvod, farmaceutski proizvod
9	<i>p-n</i> -nonilfenol	104-40-5	NEG	–	$10^{-9} - 10^{-4}$	NEG	–	$4,54 \times 10^{-4}$	nije ispitano	NEG	Fenol	Kemijski međuprodukt
10	Resveratrol	501-36-0	NEG	–	$10^{-8} - 10^{-3}$	NEG	–	$4,38 \times 10^{-4}$	vjerojatno negativno*	NEG	Ugljikovodik (ciklički)	Prirodni proizvod

Kratice: CAS br. = registarski broj Službe za podatke o kemijskim tvarima; M = molarno; IC₅₀ = pola najveće inhibitorne koncentracije ispitivane tvari; NEG = negativno; PN = pretpostavlja se da je negativno; POZ =

pozitivno.

* Klasificirano kao negativno u skladu s pregledom literature (2.).

^a Uobičajene tvari ispitane u STTA i VM7Luc ER TA testovima koje su određene kao antagonisti receptora estrogena ili negativne tvari i upotrijebljene za procjenu točnosti u validacijskoj studiji testa VM7Luc ER TA (2. i 3.).

¹ Validacijsko izvješće o testu transkripcijske aktivacije sa stabilnom transfekcijom za otkrivanje aktivnosti posredovane receptorima estrogena, dio B (2.).

² ICCVAM-ovo evaluacijsko izvješće o ispitnoj metodi LUMI-CELL ER (VM7Luc ER TA): *in vitro* metoda za identifikaciju agonista i antagonista estrogenskih receptora (3.)

³ Srednje vrijednosti IC₅₀ izračunane su s pomoću vrijednosti koje se naveli laboratoriji koji su provodili validacijsku studiju testa VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM i Hiyoshi) (3.).

4 Navedene koncentracije bile su najviše koncentracije ispitane (studija o utvrđivanju raspona) tijekom validacije testa VM7Luc ER TA. Ako su se koncentracije iz različitih laboratorija razlikovale, navedena je najveća koncentracija. Vidjeti tablicu 4-11 ICCVAM-ova evaluacijskog izvješća o ispitnoj metodi; ispitna metoda LUMI-Cell®ER (VM7Luc ER TA): *in vitro* test za identifikaciju agonističkog ili antagonističkog djelovanja kemikalije na ljudski estrogenski receptor (3.).

⁵ Razvrstavanje kao antagonist receptora estrogena ili negativna tvar temeljilo se na informacijama iz ICCVAM-ih osnovnih dokumenata za preispitivanje (BRD) za ispitne metode vezivanja receptora estrogena i transaktivacije (31.) te informacijama dobivenima iz publikacija koje su objavljene i pregledane nakon dovršetka ICCVAM-ovih BRD-ova (2., 3., 18. i 31.).

⁶ Tvari su raspoređene u jedan kemijski razred ili više njih primjenom oznaka medicinskog nazivlja američke Nacionalne medicinske knjižnice (MeSH) – međunarodno priznate standardne sheme razvrstavanja (dostupno na <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁷ Tvari su raspoređene u jedan razred proizvoda ili više njih primjenom baze podataka o opasnim tvarima američke Nacionalne medicinske knjižnice (dostupno na <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).

Kriteriji prihvatljivosti ciklusa ispitivanja

16. Prihvaćanje ili odbijanje ciklusa ispitivanja temelji se na procjeni rezultata dobivenih za referentne norme i kontrole koje se koriste za svaki pokus. Vrijednosti za PC₅₀ (EC₅₀) ili IC₅₀ za referentne norme trebaju ispunjavati kriterije prihvatljivosti kako su predviđeni za odabrani test (za STTA vidjeti Dodatak 2., za VM7Luc ER TA vidjeti Dodatak 3.) i sve pozitivne/negativne kontrole trebale bi se točno razvrstati za svaki prihvaćeni pokus. Sposobnost dosljedne provedbe testa treba dokazati razvojem i održavanjem baze s prijašnjim podacima za referentne norme i kontrole (vidjeti stavak 15.). Kao mjera obnovljivosti unutar jednog laboratorija mogu se koristiti standardne devijacije (SD) ili koeficijenti varijacije (CV) za srednje vrijednosti parametara prilagođavanja krivulje referentnih normi. Osim toga, treba ispuniti sljedeća načela u pogledu kriterija prihvatljivosti:

- potrebno je dovoljno podataka za kvantitativnu procjenu aktivacije (za test agonista) ili potiskivanja (za test antagonista) estrogenskog receptora (tj. učinkovitost i jakost),
- srednja reporterska aktivnost za referentnu koncentraciju referentnog estrogena treba biti barem minimum utvrđen u testovima u odnosu na aktivnost kontrole s nosačem (otapalom) kako bi se osigurala primjerena osjetljivost. Za STTA i VM7Luc ER TA testove to je četiri puta više od srednje kontrole s nosačem na svakoj ploči,
- ispitane koncentracije trebale bi biti unutar područja topljivosti ispitivanih kemikalija i ne bi smjele pokazivati citotoksičnost.

Analiza podataka

17. Za razvrstavanje pozitivnih i negativnih odgovora treba upotrebljavati utvrđeni postupak za tumačenje podataka za svaki test.

18. Ispunjavanje kriterija prihvatljivosti (stavak 16.) znači da test pravilno funkcionira, ali time se ne osigurava da će svaki pojedinačni ciklus ispitivanja dati točne rezultate. Ponavljanje rezultata prvog ciklusa najbolji je znak toga da su dobiveni točni podaci. Ako se u dva ciklusa dobiju ponovljivi rezultati (npr. rezultati u oba ciklusa ispitivanja pokazuju da je ispitivana kemikalija pozitivna), ne treba provoditi treći ciklus.

19. Ako se u dva ciklusa ne dobiju ponovljivi rezultati (npr. ispitivana kemikalija pozitivna je u jednom ciklusu, a negativna u drugom) ili ako je potreban veći stupanj sigurnosti u pogledu ishoda testa, treba provesti najmanje tri neovisna ciklusa. U tom se slučaju razvrstavanje temelji na dva sukladna rezultata od tri.

Opći kriteriji za tumačenje podataka

20. Trenutačno ne postoji općeprihvaćena metoda za tumačenje ER TA podataka. Međutim, i kvalitativne (npr. pozitivno/negativno) i/ili kvantitativne (npr. EC₅₀, PC₅₀, IC₅₀) procjene aktivnosti posredovane estrogenskim receptorima trebaju se temeljiti na empirijskim

podacima i valjanoj znanstvenoj prosudbi. Ako je moguće, pozitivne rezultate treba karakterizirati razmjer učinka u usporedbi s kontrolom nosača (otapala) ili referentnim estrogenom te koncentracija pri kojoj se javlja učinak (npr. EC₅₀, PC₅₀, RPC_{Max}, IC₅₀ itd.).

Izvešće o ispitivanju

21. Izvešće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Test:

- korišteni test,
- kontrolna/referentna norma/ispitivana kemikalija,
- izvor, broj serije, rok uporabe, ako su dostupni,
- stabilnost ispitivane kemikalije, ako je poznata,
- topljivost i stabilnost ispitivane kemikalije u otapalu ako su poznate,
- izmjerene vrijednosti za pH, osmolalnost i taloženje u mediju za uzgoj kulture u koju je dodana ispitivana kemikalija, prema potrebi.

Tvar s jednim sastojkom:

- fizički izgled, topljivost u vodi i druga relevantna fizikalno-kemijska svojstva,
- kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv, CAS broj, SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula, čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.

Tvari s više sastojaka, UVCB tvari i smjese:

- opis (koliko je to moguće) kemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativnog udjela i relevantnih fizikalno-kemijskih svojstava sastojaka.

Otapalo/nosač:

- karakterizacija (priroda, dobavljač i serija),
- obrazloženje za odabir otapala/nosača,
- topljivost i stabilnost ispitivane kemikalije u otapalu/nosaču, ako su poznate.

Stanice:

- vrsta i izvor stanica:
 - je li estrogenski receptor izražen endogeno? Ako nije, koji su receptori transficirani,
 - korišteni konstrukti reporterskih gena (uključujući izvornu vrstu),

- metoda transfekcije,
 - metoda odabira za održavanje stabilne transfekcije (ako je primjenjivo),
 - je li metoda transfekcije relevantna za stabilne linije,
- broj pasaža stanica (od odmrzavanja),
 - broj pasaža stanica pri odmrzavanju,
 - metode održavanja staničnih kultura.

Ispitni uvjeti:

- ograničenja topljivosti,
- opis metoda primijenjenih za procjenu vijabilnosti,
- sastav medija, koncentracija CO₂,
- koncentracije ispitivane kemikalije,
- volumen dodanog nosača i ispitivane kemikalije,
- temperatura i vlažnost inkubacije,
- trajanje tretiranja,
- gustoća stanica na početku i za vrijeme tretiranja,
- pozitivne i negativne referentne norme,
- reporterski reagensi (naziv proizvoda, dobavljač i serija),
- kriteriji na temelju kojih se ciklusi ispitivanja smatraju pozitivnim, negativnim ili dvosmislenim.

Provjera prihvatljivosti:

- multiplikacijski faktori indukcije za svaku ploču testa i ispunjavaju li najmanju vrijednost za test na temelju prijašnjih kontrola,
- stvarne vrijednosti za kriterije prihvatljivosti, npr. log₁₀EC₅₀, log₁₀PC₅₀, logIC₅₀ i vrijednosti Hillova nagiba za istodobne pozitivne kontrole/referentne norme.

Rezultati:

- neobrađeni i normirani podaci,
- najveća razina multiplikacijskog faktora indukcije,
- podaci o citotoksičnosti,
- ako postoji, najniža učinkovita koncentracija (LEC),

- vrijednosti RPC_{Max} , PC_{Max} , PC_{50} , IC_{50} i/ili EC_{50} , prema potrebi,
- odnos koncentracije i odgovora, ako je moguće,
- statističke analize, ako postoje, te mjera pogreške i pouzdanosti (npr. SEM, SD, CV ili interval 95-postotne pouzdanosti) te opis načina na koji se došlo do tih vrijednosti.

Rasprava o rezultatima

Zaključak

LITERATURA

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), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
2. OECD (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 225), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
3. ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method, an *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.
4. Pujol P. *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, *Cancer. Res.*, 58(23): str. 5367.–73.
5. Rogers J.M. and Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In Vitro and Molecular Toxicology: Journal of Basic and Applied Research*, 13(1): str. 67.–82.
6. OECD (2012). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Agonists (for TG 455). Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 173), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
7. OECD (2015). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Antagonists. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 174), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
8. OECD (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
9. Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept. *Climacteric*, 5 Suppl 2: str. 20.–6.

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

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

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

Dodatak 1.

DEFINICIJE I KRATICE

Kriteriji prihvatljivosti: minimalne norme za provedbu eksperimentalnih kontrola i referentnih normi. Da bi se pokus smatrao valjanim, trebali bi biti ispunjeni svi kriteriji prihvatljivosti.

Točnost (podudarnost): stupanj podudarnosti između rezultata testa i prihvaćenih referentnih vrijednosti. Ona je mjerilo učinkovitosti testa i jedan od aspekata relevantnosti. Pojam je često međusobno zamjenjiv s pojmom „podudarnost” u smislu udjela točnih ishoda testa (1.).

Agonist: tvar koja daje odgovor, npr. transkripciju, kada se veže na specifični receptor.

Antagonist: vrsta liganda na receptor ili kemikalije koja sama po sebi ne izaziva biološki odgovor nakon vezivanja na receptor, ali blokira ili ublažava odgovore posredovane agonistima.

Antiestrogno djelovanje: sposobnost kemikalije da potiskuje djelovanje 17 β -estradiola kojim se posreduje preko estrogenskog receptora.

Morfologija stanica: oblik i izgled stanica uzgojenih u monosloju jedne jažice ploče s kulturom tkiva. Stanice koje umiru često pokazuju abnormalnu morfologiju stanica.

CF: OECD-ov konceptualni okvir za ispitivanje i procjenu endokrino disruptivnih kemikalija.

Tretiranje ugljenom/dekstranom: tretiranje seruma koji se koristi u staničnoj kulturi. Tretiranjem ugljenom/dekstranom (koje se često naziva „stripiranje”) uklanjaju se endogeni hormoni i proteini koji vežu hormone.

Kemikalija: tvar ili smjesa.

Citotoksičnost: štetni učinci na staničnu strukturu ili funkciju koji naposljetku mogu uzrokovati smrt stanice i mogu se odraziti u smanjenju broja stanica prisutnih u jažici na kraju razdoblja izlaganja ili smanjenje kapaciteta za mjeru stanične funkcije u usporedbi s istodobnom kontrolom s nosačem.

CV: koeficijent varijacije.

DCC-FBS: fetalni goveđi serum tretiran ugljenom premazanim dekstranom.

DMEM: Dulbeccov modificirani Eagleov medij.

DMSO: dimetilsulfoksid.

E2: 17 β -estradiol.

EC₅₀: pola najveće učinkovite koncentracije ispitivane kemikalije.

ED: endokrina disrupcija.

hER α : ljudski estrogenski receptor alfa.

hER β : ljudski estrogenski receptor beta.

EFM: medij bez estrogena. Dulbeccov modificirani Eagleov medij (DMEM) obogaćen s 4,5 % FBS-a tretiranog ugljenom premazanim dekstranom, 1,9 % L-glutamina i 0,9 % mješavine penicilina i streptomycina.

ER: estrogenski receptor.

ERE: element odgovora estrogena.

Estrogeno djelovanje: sposobnost kemikalije da oponaša 17 β -estradiol u pogledu sposobnosti da se veže na receptore estrogena i da ih aktivira. Ovom se ispitnom metodom može otkriti estrogeno djelovanje posredovano receptorom hER α .

ERTA: transaktivacija estrogenskog receptora.

FBS: fetalni goveđi serum.

HeLa: imortalizirana stanična linija humanog cervikalnog karcinoma.

HeLa9903: podklon stanice HeLa u koji su stabilno transficirani hER α i reporterski gen za luciferazu.

IC₅₀: pola najveće učinkovite koncentracije inhibitorne ispitivane kemikalije.

ICCVAM: Međuagencijski koordinacijski odbor za validaciju alternativnih metoda (*The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*).

Obnovljivost između laboratorija: mjera u kojoj različiti kvalificirani laboratoriji mogu dobiti kvalitativno i kvantitativno slične rezultate primjenom istog protokola i ispitivanjem istih tvari. Obnovljivost između laboratorija utvrđuje se tijekom predvalidacijskih i validacijskih procesa te pokazuje mjeru u kojoj se test može uspješno prenositi među laboratorijima, a poznata je i kao interlaboratorijska obnovljivost (1.).

Obnovljivost unutar laboratorija: utvrđivanje mjere u kojoj kvalificirane osobe u istom laboratoriju mogu uspješno ponoviti rezultate primjenom specifičnog protokola u različito vrijeme. Poznata je i kao intralaboratorijska obnovljivost (1.).

LEC: najniža učinkovita koncentracija najniža je koncentracija ispitivane kemikalije koja dovodi do odgovora (tj. najniža koncentracija ispitivane kemikalije pri kojoj je multiplikacijski faktor indukcije statistički različit od istodobne kontrole s nosačem).

I ja također test: kolokvijalni izraz za test koji je strukturno i funkcionalno sličan validiranoj i prihvaćenoj referentnoj ispitnoj metodi. Izraz se često koristi u istom značenju kao slična

ispitna metoda.

MT: metalotionein.

MMTV: virus mišjeg tumora dojke.

OHT: 4-hidroksitamoksifen.

PBTG: smjernica za ispitivanje koja se temelji na uspješnosti.

PC (pozitivna kontrola): jako aktivna tvar, po mogućnosti 17 β -estradiol, koja se uključuje u sva ispitivanja kako bi se pomoglo osigurati pravilno funkcioniranje testa.

PC₁₀: koncentracija ispitivane kemikalije pri kojoj izmjerena aktivnost u testu agonista iznosi 10 % maksimalne aktivnosti koju inducira pozitivna kontrola (1 nM E2 za STTA test) na svakoj ploči.

PC₅₀: koncentracija ispitivane kemikalije pri kojoj izmjerena aktivnost u testu agonista iznosi 50 % maksimalne aktivnosti koju inducira pozitivna kontrola (E2 u referentnoj koncentraciji utvrđenoj u ispitnoj metodi) na svakoj ploči.

PC_{Max}: koncentracija ispitivane kemikalije koja inducira RPC_{Max}

Zahtjevi izvedbe: zahtjevi koji se temelje na validiranoj ispitnoj metodi i pružaju temelj za ocjenjivanje usporedivosti predložene, funkcionalno i mehanicistički slične, ispitne metode. Oni obuhvaćaju: 1. ključne elemente testa; 2. minimalni popis referentnih kemikalija odabranih između kemikalija koje se koriste za dokazivanje prihvatljive učinkovitosti validirane ispitne metode, i 3. slične razine točnosti i pouzdanosti, utemeljene na rezultatima dobivenim za validiranu ispitnu metodu, koje se prilikom ocjenjivanja trebaju dokazati predloženim testom koristeći minimalni popis referentnih kemikalija (1.).

Tvari za dokazivanje osposobljenosti: podskupina referentnih tvari iz zahtjeva izvedbe kojima se laboratoriji mogu koristiti kako bi dokazali tehničku osposobljenost za provođenje standardizirane ispitne metode. Kriteriji za odabir tih tvari obično uključuju to da predstavljaju cijeli raspon odgovora, da su komercijalno dostupni i da su za njih dostupni visokokvalitetni referentni podaci.

Osposobljenost: dokazana sposobnost za pravilno provođenje testa prije ispitivanja nepoznatih tvari.

Referentni estrogen (pozitivna kontrola, PC): 17 β -estradiol (E2, CAS 50-28-2).

Referentna norma: referentna tvar koja se upotrebljava za dokazivanje primjerenosti testa. 17 β -estradiol referentna je norma za STTA i VM7Luc ER TA testove.

Referentne ispitne metode: testovi na kojima se temelji PBTG 455.

Relevantnost: opis odnosa između testa i istraživanog učinka te je li test prikladan i koristan

za određenu svrhu. Pokazuje u kojoj se mjeri testom točno mjeri ili predviđa istraživani biološki učinak. Relevantnost uključuje razmatranje o točnosti (podudarnosti) testa (1.).

Pouzdanost: pokazuje u kojoj se mjeri test može obnovljivo primijeniti unutar jednog laboratorija i između više laboratorija tijekom vremena uz primjenu istog protokola. Ocjenjuje se izračunavanjem obnovljivosti unutar jednog laboratorija i između više laboratorija.

RLU: relativne jedinice svjetlosti.

RNK: ribonukleinska kiselina.

RPC_{Max}: maksimalna razina odgovora koju inducira ispitivana kemikalija, izražena kao postotak odgovora koji inducira 1 nM E2 na istoj ploči.

RPMI: medij RPMI 1640 obogaćen s 0,9 % mješavine penicilina i streptomicina te 8,0 % fetalnog goveđeg seruma (FBS).

Ciklus: pojedinačni pokus kojim se ocjenjuje kemijsko djelovanje na temelju biološkog ishoda testa. Svaki je ciklus potpuni pokus koji se provodi na jažicama s ponavljanjem sa stanicama koje se istodobno nasađuju iz zajedničke banke stanica.

Neovisni ciklus: zaseban, neovisan pokus kojim se ocjenjuje kemijsko djelovanje na temelju biološkog ishoda testa, upotrebom stanica iz različite banke i svježe razrijeđenih kemikalija, koji se provodi na različite dane ili ih provode različiti članovi osoblja na isti dan.

SD: standardna devijacija.

Osjetljivost: udio svih pozitivnih/aktivnih tvari koje su pravilno razvrstane primjenom testa. To je mjera točnosti za test koji daje kategorijske rezultate i važan je čimbenik za ocjenu relevantnosti testa (1.).

Specifičnost: udio svih negativnih/neaktivnih tvari koje su pravilno razvrstane primjenom ispitivanja. To je mjera točnosti za test koji daje kategorijske rezultate i važan je čimbenik za ocjenu relevantnosti testa (1.).

Stabilna transfekcija: kada se DNK transficira u uzgojene stanice tako da je stabilno integriran u genom stanica, što dovodi do stabilne ekspresije transficiranih gena. Klonovi stabilno transficiranih stanica odabiru se na temelju stabilnih markera (npr. otpornost na G418).

STTA test: test transaktivacije sa stabilnom transfekcijom, test transkripcijske aktivacije estrogenog receptora α primjenom stanične linije HeLa 9903.

Studija: sveukupni eksperimentalni rad koji se obavlja radi procjene pojedinačne, specifične tvari primjenom specifičnog testa. Studija obuhvaća sve korake, uključujući razrjeđivanja ispitne tvari u ispitnom mediju, preliminarne cikluse za određivanje raspona, sve potrebne iscrpne cikluse, analize podataka, osiguranje kvalitete, procjene citotoksičnosti itd. Dovršetak studije omogućuje razvrstavanje aktivnosti ispitivane kemikalije prema cilju toksičnosti (tj.

aktivno, neaktivno ili nejednoznačno) koji se procjenjuje korištenim testom te procjenu jakosti u odnosu na pozitivnu referentnu kemikaliju.

Tvar: Na temelju Uredbe REACH¹² tvar se definira kao kemijski element i njegovi spojevi u prirodnom stanju ili dobiveni proizvodnim postupkom, uključujući i dodatke (aditive) koji su nužni za održavanje stabilnosti te nečistoće koje proizlaze iz primijenjenog postupka, ali isključujući otapala koja se mogu izdvojiti bez utjecaja na stabilnost tvari i promjene njezina sastava. Vrlo slična definicija koristi se i u kontekstu sustava UN GHS (1.).

TA (Transaktivacija): pokretanje sinteze molekula mRNA kao odgovor na specifični kemijski signal, kao što je vezivanje estrogena na estrogenski receptor.

Test: u kontekstu ove ispitne metode test je jedna od metodologija koje su prihvaćene kao valjane u pogledu ispunjavanja utvrđenih kriterija uspješnosti. Sastavnice testa uključuju, na primjer, specifičnu staničnu liniju s povezanim uvjetima rasta, specifični medij u kojem se provodi ispitivanje, uvjete postavljanja ploča, raspored i razrjeđenja ispitivanih kemikalija i sve ostale potrebne mjere za kontrolu kvalitete i povezane korake procjene podataka.

Ispitivana kemikalija: svaka tvar ili smjesa koja se ispituje ovom ispitnom metodom.

Transkripcija: sinteza molekula mRNA.

UVCB: kemijske tvari nepoznatog ili promjenjivog sastava, složeni reakcijski proizvodi i biološki materijali.

Validirana ispitna metoda: test za koji su provedene validacijske studije za utvrđivanje relevantnosti (uključujući točnost) i pouzdanosti za specifičnu namjenu. Važno je napomenuti da validirana ispitna metoda možda neće biti u dovoljnoj mjeri uspješna s obzirom na točnost i pouzdanost da bi je se moglo smatrati prihvatljivom za predloženu namjenu (1.).

Validacija: proces kojim se utvrđuju pouzdanost i relevantnost određenog pristupa, metode, testa, procesa ili procjene za definiranu svrhu (1.)

VC (kontrola s nosačem): otapalo koje se upotrebljava za otapanje ispitnih i kontrolnih kemikalija ispituje se samo kao nosač, bez otopljene kemikalije.

VM7: imortalizirana stanica adenokarcinoma koja endogeno eksprimira estrogenski receptor.

¹² Uredba (EZ) br. 1907/2006 Europskog parlamenta i Vijeća od 18. prosinca 2006. o registraciji, evaluaciji, autorizaciji i ograničavanju kemikalija (REACH) i osnivanju Europske agencije za kemikalije te o izmjeni Direktive 1999/45/EZ i stavljanju izvan snage Uredbe Vijeća (EEZ) br. 793/93 i Uredbe Komisije (EZ) br. 1488/94 kao i Direktive Vijeća 76/769/EEZ i direktiva Komisije 91/155/EEZ, 93/67/EEZ, 93/105/EZ i 2000/21/EZ (SL L 304, 22.11.2007., str. 1.).

VM7Luc4E2: Stanična linija VM7Luc4E2 izvedena je iz VM7 imortaliziranih humanih stanica adenokarcinoma koje endogeno ekspimiraju oba oblika estrogenskog receptora (ER α i ER β) i stabilno su transficirane plazmidom pGudLuc7.ERE. Taj plazmid sadržava četiri primjerka sintetičkog oligonukleotida koji sadržava element odgovora estrogena uzlazno od promotora virusa mišjeg tumora dojke (MMTV) i gen za luciferazu krijesnice.

Slaba pozitivna kontrola: slabo aktivna tvar odabrana s popisa referentnih kemikalija koja se uključuje u sva ispitivanja kako bi se pomoglo osigurati pravilno funkcioniranje testa.

Dodatak 2.

TEST TRANSAKTIVACIJE STABILNO TRANSFICIRANOG LJUDSKOG ESTROGENSKOG RECEPTORA-A ZA OTKRIVANJE ESTROGENSKOG AGONISTIČKOG I ANTAGONISTIČKOG DJELOVANJA KEMIKA LIJA PRIMJENOM STANIČNE LINIJE HERA-HELA-9903

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA (VIDJETI I OPĆI UVOD)

1. U ovom testu transaktivacije (TA) upotrebljava se stanična linija hER α -HeLa-9903 radi otkrivanja estrogenskog agonističkog djelovanja kojim posreduje ljudski estrogenski receptor alfa (hER α). Validacijska studija testa transaktivacije sa stabilnom transfekcijom (STTA) koju je proveo CERi (Japanski institut za procjenu i istraživanje kemikalija) primjenom stanične linije hER α -HeLa-9903 za otkrivanje estrogenskog agonističkog i antagonističkog djelovanja kojim posreduje ljudski estrogenski receptor alfa (hER α) pokazala je relevantnost i pouzdanost testa za predviđenu svrhu (1.).
2. Ovaj je test posebno osmišljen za otkrivanje transaktivacije kojom posreduje hER α mjerenjem kemiluminiscencije kao krajnje točke. Međutim, pri koncentracijama fitoestrogena većima od 1 μ M zabilježeni su signali luminiscencije kojima ne posreduju receptori zbog pretjerane aktivacije reporterskog gena za luciferazu (2. i 3.). Iako krivulja doza – odgovor pokazuje da do stvarne aktivacije sustava estrogenskog receptora dolazi pri manjim koncentracijama, ekspresiju luciferaze dobivenu pri visokim koncentracijama fitoestrogena ili sličnih spojeva za koje se pretpostavlja da poput fitoestrogena dovode do pretjerane aktivacije reporterskog gena za luciferazu treba pažljivo ispitati sustavima ER TA testova sa stabilnom transfekcijom (Dodatak 1.).
3. Prije upotrebe ovog testa u regulatorne svrhe treba pročitati odjeljke „OPĆI UVOD” i „SASTAVNICE ER TA TESTA”. Definicije i kratice upotrijebljene u ovoj Smjernici za ispitivanje navedene su u Dodatku 2.1.

NAČELO TESTA (VIDJETI I OPĆI UVOD)

4. Test se upotrebljava za signalizaciju vezivanja estrogenskog receptora s ligandom. Nakon vezivanja s ligandom kompleks receptora i liganda translocira u jezgru, gdje se veže na specifične elemente DNK odgovora i transaktivira reporterski gen za luciferazu krijesnice, što dovodi do povećane stanične ekspresije enzima luciferaze. Luciferin je supstrat koji enzim luciferaze pretvara u bioluminiscentni proizvod koji se može kvantitativno izmjeriti s pomoću luminometra. Aktivnost luciferaze može se procijeniti brzo i jeftino primjenom nekoliko komercijalno dostupnih pribora za ispitivanje.

5. U ispitnom sustavu upotrebljava se stanična linija hER α -HeLa-9903, koja se dobiva iz humanog cervikalnog tumora, s dva stabilno umetnuta konstrukta: i. konstruktom za ekspresiju hER α (kodiranje cijelog ljudskog receptora) i ii. konstruktom reporterskog gena za luciferazu krijesnice koji nosi pet tandemskih ponavljanja elementa vitelogenina koji reagira na estrogen (ERE) koje pokreće TATA element promotora gena za mišji metalotionein (MT). Pokazalo se da je mišji MT TATA genski konstrukt najuspješniji pa se često upotrebljava. Stoga ova stanična linija hER α -HeLa-9903 može mjeriti sposobnost ispitivane kemikalije da inducira transaktivaciju genske ekspresije luciferaze kojom posreduje hER α .
6. U slučaju testa agonista estrogenskog receptora, tumačenje podataka temelji se na tome je li maksimalna razina odgovora koju inducira ispitivana kemikalija jednaka ili veća od odgovora agonista koji iznosi 10 % odgovora koji inducira koncentracija pozitivne kontrole 17 β -estradiola (E2) s najvećim učinkom (1 nM) (tj. PC₁₀). U slučaju testa antagonista estrogenskog receptora, tumačenje podataka temelji se na tome pokazuje li odgovor smanjenje aktivnosti od najmanje 30 % u odnosu na odgovor koji inducira kontrola s dodanom poznatom količinom tvari (*spike-in*) (25 pM E2) bez pojave citotoksičnosti. O analizi i tumačenju podataka podrobno se raspravlja u stavcima od 34. do 48.

POSTUPAK

Stanične linije

7. Za test bi se trebala upotrebljavati stabilno transficirana stanična linija hER α -HeLa-9903. Stanična linija može se dobiti iz banke stanica JCRB-a (*Japanese Collection of Research Bioresources*, Japanska zbirka istraživačkih bioresursa)¹³ nakon potpisivanja sporazuma o prijenosu materijala (MTA).
8. U ispitivanju se trebaju upotrebljavati samo stanice koje ne sadržavaju mikoplazmu. RT-PCR (lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu) preferirana je metoda za osjetljivo otkrivanje zaraze mikoplazmom (4., 5. i 6.).

Stabilnost stanične linije

9. Kako bi se pratila stabilnost stanične linije, kao referentne norme za test agonista treba upotrebljavati E2, 17 α -estradiol, 17 α -metiltestosteron i kortikosteron te treba izmjeriti cijelu krivulju koncentracija – odgovor u rasponu ispitne koncentracije navedenom u tablici 1.

¹³ JCRB Cell Bank: National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Asagi Saito, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Japan Faks: +81 726419812.

barem jednom kod svake provedbe testa, a rezultati bi se trebali slagati s rezultatima navedenima u tablici 1.

10. U slučaju testa antagonista, pri svakom ciklusu treba istodobno mjeriti cijele krivulje koncentracije za dvije referentne norme, tamoksifen i flutamid. Treba pratiti točno kvalitativno razvrstavanje tih dviju kemikalija kao pozitivnih i negativnih.

Stanična kultura i uvjeti nasadiivanja

11. Stanice treba održavati u Eagleovu minimalnom esencijalnom mediju (EMEM) bez fenolne crvene, obogaćenom sa 60 mg/l antibiotika kanamicina i 10 % fetalnog goveđeg seruma tretiranog ugljenom premazanim dekstranom (DCC-FBS), u inkubatoru CO₂ (5 % CO₂) na 37 ± 1 °C. Kada se postigne konfluencija od 75 do 90 %, može se uzgojiti supkultura po 10 ml 0,4 x 10⁵ – 1 x 10⁵ stanica/ml za zdjelicu sa staničnom kulturom od 100 mm. Stanice treba suspendirati u 10 % medija FBS-EMEM (što je isto kao i EMEM s DCC-FBS-om) i zatim nasaditi u jažice mikroploče pri gustoći od 1 x 10⁴ stanica/(100 µl x jažica). Stanice zatim treba predinkubirati u inkubatoru s 5 % CO₂ na 37 ± 1 °C u trajanju od tri sata prije izlaganja kemikaliji. U plastičnoj opremi ne smije biti estrogene aktivnosti.
12. Kako bi se održao integritet odgovora, stanice treba uzgajati za više od jedne pasaže od zamrznute matične zalihe u kondicioniranom mediju i ne bi se trebale uzgajati za više od 40 pasaža. Za staničnu liniju hERα-HeLa-9903 to će trajati manje od tri mjeseca. Međutim, uspješnost stanica može se smanjiti ako se one uzgajaju u uvjetima koji nisu primjereni za uzgoj kulture.
13. DCC-FBS se može pripremiti kako je opisano u Dodatku 2.2. ili se može nabaviti iz komercijalnih izvora.

Kriteriji prihvatljivosti

Pozitivne i negativne referentne norme za test agonista estrogenskog receptora

14. Prije i tijekom provođenja studije treba potvrditi osjetljivost ispitnog sustava primjenom odgovarajućih koncentracija jakog estrogena: E2, slabog estrogena (17α-estradiol), vrlo slabog agonista (17α-metiltestosteron) i negativne tvari (kortikosteron). Vrijednosti prihvatljivog raspona izvedene iz validacijske studije (1.) navedene su u tablici 1. Ove četiri paralelne referentne norme treba uključiti u svaki pokus i rezultati bi trebali biti unutar prihvatljivih ograničenja. Ako nisu, treba utvrditi uzrok neispunjavanja kriterija prihvatljivosti (npr. rukovanje stanicama, serum i antibiotici za kvalitetu i koncentracija) te ponoviti test. Kada se ispune kriteriji prihvatljivosti, ključna je dosljedna upotreba materijala za uzgoj stanica kako bi se osigurala minimalna varijabilnost vrijednosti EC₅₀, PC₅₀ i PC₁₀. S pomoću četiriju paralelnih referentnih normi, koje treba uključiti u svaki pokus (proveden u istim uvjetima, uključujući materijale, razinu pasaže stanica i tehničare), može se osigurati osjetljivost testa jer vrijednosti PC₁₀ triju pozitivnih referentnih normi trebaju biti unutar

prihvatljivog raspona, isto kao i vrijednosti PC₅₀ i EC₅₀ ako se mogu izračunati (vidjeti tablicu 1.).

Tablica 1.: Vrijednosti prihvatljivog raspona četiriju referentnih normi za test agonista estrogenskog receptora

Naziv	logPC ₅₀	logPC ₁₀	logEC ₅₀	Hillov nagib	Raspon ispitivanja
17β-estradiol (E2) CAS br.: 50-28-2	-11,4 ~ -10,1	< -11	-11,3 ~ -10,1	0,7 ~ 1,5	10 ⁻¹⁴ ~ 10 ⁻⁸ M
17α-estradiol CAS br.: 57-91-0	-9,6 ~ -8,1	-10,7 ~ -9,3	-9,6 ~ -8,4	0,9 ~ 2,0	10 ⁻¹² ~ 10 ⁻⁶ M
Kortikosteron CAS br.: 50-22-6	–	–	–	–	10 ⁻¹⁰ ~ 10 ⁻⁴ M
17α-metiltestosteron CAS br.: 58-18-4	-6,0 ~ -5,1	-8,0 ~ -6,2	–	–	10 ⁻¹¹ ~ 10 ⁻⁵ M

Pozitivne i negativne referentne norme za test antagonista estrogenskog receptora

15. Prije i tijekom provođenja studije treba potvrditi osjetljivost ispitnog sustava primjenom odgovarajućih koncentracija pozitivne tvari (tamoksifen) i negativne tvari (flutamid). Vrijednosti prihvatljivog raspona izvedene iz validacijske studije (1.) navedene su u tablici 2. Ove dvije paralelne referentne norme treba uključiti u svaki pokus i rezultati bi trebali biti procijenjeni točnima, kako je prikazano u kriterijima. Ako nisu, treba utvrditi uzrok neispunjavanja kriterija (npr. rukovanje stanicama, serum i antibiotici za kvalitetu i koncentracija) te ponoviti test. Osim toga, treba izračunati vrijednosti IC₅₀ za pozitivnu tvar (tamoksifen) i rezultati bi trebali biti unutar utvrđenih prihvatljivih ograničenja. Kada se ispune kriteriji prihvatljivosti, ključna je dosljedna upotreba materijala za uzgoj stanica kako bi se osigurala minimalna varijabilnost vrijednosti IC₅₀. S pomoću tih dviju paralelnih referentnih normi, koje treba uključiti u svaki pokus (proveden u istim uvjetima, uključujući materijale, razinu pasaže stanica i tehničare), može se osigurati osjetljivost testa (vidjeti tablicu 2.).

Tablica 2.: Kriteriji i vrijednosti prihvatljivog raspona dviju referentnih normi za test antagonista estrogenskog receptora

Naziv	Kriteriji	LogIC ₅₀	Raspon ispitivanja
Tamoksifen CAS br.: 10540-29-1	Pozitivno: treba izračunati IC ₅₀	-5,942 ~ -7,596	10 ⁻¹⁰ ~ 10 ⁻⁵ M
Flutamid CAS br.: 13311-84-7	Negativno: ne treba izračunati IC ₃₀	–	10 ⁻¹⁰ ~ 10 ⁻⁵ M

Pozitivne kontrole i kontrole s nosačem

16. Pozitivnu kontrolu (PC) za test agonista estrogenskog receptora (1 nM E2) i za test antagonista estrogenskog receptora (10 μM tamoksifena) treba ispitati najmanje u tri

ponavljanja na svakoj ploči. Nosač koji se upotrebljava za otapanje ispitivane kemikalije treba ispitati kao kontrolu s nosačem (VC) barem u tri ponavljanja na svakoj ploči. Osim te kontrole s nosačem, ako se u pozitivnoj kontroli upotrebljava nosač različit od onoga koji se upotrebljava s ispitivanom kemikalijom, treba ispitati drugu kontrolu s nosačem u najmanje tri ponavljanja na istoj ploči s pozitivnom kontrolom.

Kriteriji kvalitete za test agonista estrogenskog receptora

17. Srednja aktivnost luciferaze u pozitivnoj kontroli (1 nM E2) treba biti barem četiri puta veća od srednje vrijednosti u kontroli s nosačem na svakoj ploči. Kriterij se utvrđuje na temelju pouzdanosti vrijednosti krajnjih točaka iz validacijske studije (prema prijašnjim podacima četiri do 30 puta više).
18. Kad je riječ o kontroli kvalitete testa, multiplikacijski faktor indukcije koji odgovara vrijednosti PC_{10} istodobne pozitivne kontrole (1 nM E2) trebao bi biti veći od 1 + 2 standardne devijacije vrijednosti multiplikacijskog faktora indukcije (= 1) istodobne kontrole s nosačem. U svrhu određivanja prioriteta, vrijednost PC_{10} može biti korisna za pojednostavnjenje potrebne analize podataka u usporedbi sa statističkom analizom. Iako statistička analiza pruža podatke o značajnosti, ta analiza nije kvantitativan parametar u pogledu potencijala koji se temelji na koncentraciji i stoga je manje korisna u svrhu određivanja prioriteta.

Kriteriji kvalitete za test antagonista estrogenskog receptora

19. Srednja aktivnost luciferaze u kontroli s dodanom poznatom količinom tvari (*spike-in*) (25 nM E2) treba biti barem četiri puta veća od srednje vrijednosti u kontroli s nosačem na svakoj ploči. Kriterij se utvrđuje na temelju pouzdanosti vrijednosti krajnjih točaka iz validacijske studije.
20. Kad je riječ o kontroli kvalitete testa, relativna transkripcijska aktivacija (RTA) 1 nM E2 treba biti veća od 100 %, RTA 1 μ M 4-hidroksitamoksifena (OHT) treba biti manji od 40,6 % i RTA 100 μ M digitonina (Dig) treba biti manji od 0 %.

Dokazivanje osposobljenosti laboratorija (vidjeti stavak 14. i tablice 3. i 4. u odjeljku „SASTAVNICE ER TA TESTA” ove ispitne metode).

Nosač

21. Kao istodobnu kontrolu s nosačem treba upotrijebiti dimetilsulfoksid (DMSO) ili primjereno otapalo, u istoj koncentraciji koja se upotrebljava za različite pozitivne i negativne kontrole i ispitivane kemikalije. Ispitivane kemikalije treba otopiti u otapalu koje otapa ispitivanu kemikaliju te se može miješati s medijem za stanice. Primjereni su nosači voda, etanol (čistoće od 95 % do 100 %) i DMSO. Ako se upotrebljava DMSO, ne bi se trebalo koristiti više od 0,1 % (v/v). Za sve bi nosače trebalo dokazati da najveći volumen koji se upotrebljava nije citotoksičan i da ne utječu na uspješnost testa.

Priprema ispitivanih kemikalija

22. Ispitivane kemikalije obično treba otopiti u DMSO-u ili drugom primjerenom otapalu i serijski razrijediti istim otapalom u omjeru 1 : 10 kako bi se pripremile otopine za razrjeđivanje s medijem.

Topljivost i citotoksičnost: razmatranja o utvrđivanju raspona

23. Treba provesti preliminarno ispitivanje kako bi se utvrdio primjereni raspon koncentracije kemikalije koja se ispituje i kako bi se utvrdilo postoje li određeni problemi povezani s topljivosti i citotoksičnosti ispitivane kemikalije. Kemikalije se u početku ispituju do najveće koncentracije od 1 µl/ml, 1 mg/ml ili 1 mM, ovisno o tome što je najmanje. Na temelju mjere citotoksičnosti ili nedovoljne topljivosti uočene u preliminarnom ispitivanju, u prvom definitivnom ciklusu kemikaliju treba ispitati po log-serijskim razrjeđenjima, počevši od najveće prihvatljive koncentracije (npr. 1 mM, 100 µM, 10 µM itd.) i zabilježiti zamućenje, talog ili citotoksičnost. Koncentracije u drugom, a prema potrebi i trećem ciklusu treba po potrebi prilagoditi radi bolje karakterizacije krivulje koncentracija – odgovor i kako bi se izbjegle koncentracije za koje se utvrdi da nisu topljive ili da induciraju preveliku citotoksičnost.
24. Kod agonista i antagonista estrogenskog receptora prisutnost povećanih razina citotoksičnosti može znatno izmijeniti ili eliminirati uobičajeni sigmoidni odgovor i treba je uzeti u obzir pri tumačenju podataka. Treba upotrebljavati metode za ispitivanje citotoksičnosti koje mogu dati informacije o 80-postotnoj vijabilnosti stanica, uz primjenu primjerenog testa na temelju iskustva laboratorija.
25. Ako rezultati ispitivanja citotoksičnosti pokazuju da je koncentracija ispitivane kemikalije smanjila broj stanica za 20 % ili više, ta se koncentracija treba smatrati citotoksičnom, a koncentracije koje su jednake citotoksičnoj koncentraciji ili veće treba isključiti iz procjene.

Izlaganje kemikaliji i organizacija testne ploče

26. Postupak za razrjeđivanja kemikalija (koraci 1. i 2.) i izlaganje stanica (korak 3.) može se provoditi na sljedeći način.

Korak 1.: Svaku ispitivanu kemikaliju treba serijski razrijediti u DMSO-u ili primjerenom otapalu i dodati u jažice mikrotitracijske pločice kako bi se dobile konačne serijske koncentracije kako su utvrđene u preliminarnom ispitivanju za utvrđivanje raspona (obično u serijama, na primjer 1 mM, 100 µM, 10 µM, 1 µM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM i 10 pM (10^{-3} – 10^{-11} M)) za ispitivanje u tri ponavljanja.

Korak 2.: razrjeđivanje kemikalija: prvo razrijediti 1,5 µl ispitivane kemikalije u otapalu na volumen od 500 µl medija.

Korak 3.: izlaganje stanica kemikaliji: dodati 50 µl razrijeđene kemikalije s medijem

(pripremljene u koraku 2.) u testnu jažicu koja sadržava 10^4 stanica/100 μ l/jažica.

Preporučeni konačni volumen medija potrebnog za svaku jažicu iznosi 150 μ l. Ispitni uzorci i referentne norme mogu se rasporediti kako je prikazano u tablici 3. i tablici 4.

Tablica 3.: Primjer rasporeda koncentracija na pločama za referentne norme na testnoj ploči za agonist estrogenskog receptora

Redak	17 α -metiltestosteron			Kortikosteron			17 α -estradiol			E2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 μ M)	→	→	100 μ M	→	→	1 μ M	→	→	10 nM	→	→
B	konc. 2 (1 μ M)	→	→	10 μ M	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	1 μ M	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	konc. 7 (10 pM)	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: kontrola s nosačem (0,1 % DMSO); PC: pozitivna kontrola (1 nM E2)

27. Referentne norme (E2, 17 α -estradiol, 17 α -metil testosteron i kortikosteron) treba ispitati u svakom ciklusu (tablica 3.). Jažice s pozitivnom kontrolom tretirane s 1 nM E2 koje mogu proizvesti najveću indukciju E2 te jažice s kontrolom nosača tretirane samo DMSO-om (ili primjerenim otapalom) treba uključiti u svaku testnu ploču u ispitivanju (tablica 4.). Ako se u istom pokusu upotrebljavaju stanice iz različitih izvora (npr. različiti broj pasaže, različita serija itd.), referentne norme trebaju se ispitati za svaki izvor stanica.

Tablica 4.: Primjer rasporeda koncentracija na pločama za ispitivane kemikalije i kemikalije za kontrolu na testnoj ploči u testu agonista estrogenskog receptora

Redak	Ispitivana kemikalija 1			Ispitivana kemikalija 2			Ispitivana kemikalija 3			Ispitivana kemikalija 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 μ M)	→	→	1 mM	→	→	1 μ M	→	→	10 nM	→	→
B	konc. 2 (1 μ M)	→	→	100 μ M	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	10 μ M	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	1 μ M	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	10 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	konc. 7 (10 pM)	→	→	1 nM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: kontrola s nosačem (0,1 % DMSO); PC: pozitivna kontrola (1 nM E2)

Tablica 5.: Primjer rasporeda koncentracija na pločama za referentne norme na testnoj ploči u testu antagonista estrogenskog receptora

Redak	Tamoksifen			Flutamid			Ispitivana kemikalija 1			Ispitivana kemikalija 2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 μ M)	→	→	10 μ M	→	→	10 μ M	→	→	10 μ M	→	→

B	konc. 2 (1 μ M)	→	→	1 μ M	→	→	1 μ M	→	→	1 μ M	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1 % DMSO-a	→	→	→	→	→	1 μ M OHT-a	→	→	100 μ M digitonina (Dig)	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: kontrola s nosačem (0,1 % DMSO); PC: pozitivna kontrola (1 nM E2); OHT: 4-hidroksitamoksifena; Dig: digitonin.

 = dodano 25 pM E2

28. Kako bi se procijenilo antagonističko djelovanje kemikalija, u testne jažice koje se nalaze u recima od A do G treba dodati 25 pM E2. Referentne norme (tamoksifen i flutamid) treba ispitati u svakom ciklusu. Svaka testna ploča u ispitivanju treba uključivati jažice s pozitivnom kontrolom tretirane s 1 nM E2 koje se mogu upotrijebiti kao kontrola kvalitete za staničnu liniju hER α -HeLa-9903, jažice s kontrolom nosača tretirane DMSO-om (ili odgovarajućim otapalom), jažice s 0,1 % DMSO-a tretirane dodatkom DMSO-a i E2 koje odgovaraju kontroli s dodanom poznatom količinom tvari („*spike-in*” kontrola), jažice tretirane s konačnom koncentracijom 1 μ M OHT-a te jažice tretirane s 100 μ M digitonina (tablica 5.). Kod kasnijih testnih ploča treba se slijediti isti raspored na ploči bez jažica iz referentnih normi (tablica 6.). Ako se u istom pokusu upotrebljavaju stanice iz različitih izvora (npr. različiti broj pasaže, različita serija itd.), referentne norme trebaju se ispitati za svaki izvor stanica.

Tablica 6.: Primjer rasporeda koncentracija na pločama za ispitivane kemikalije i kemikalije za kontrolu na testnoj ploči za antagonist estrogenskog receptora

Reda k	Ispitivana kemikalija 1			Ispitivana kemikalija 2			Ispitivana kemikalija 3			Ispitivana kemikalija 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 μ M)	→	→	10 μ M	→	→	10 μ M	→	→	10 μ M	→	→
B	konc. 2 (1 μ M)	→	→	1 μ M	→	→	1 μ M	→	→	1 μ M	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1 % DMSO-a	→	→	→	→	→	1 μ M OHT-a	→	→	100 μ M digitonina (Dig)	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: kontrola s nosačem (0,1 % DMSO); PC: pozitivna kontrola (1 nM E2); OHT: 4-hidroksitamoksifen, Dig: digitonin.

 : dodano 25 pM E2

29. Prema potrebi treba potvrditi izostanak rubnih učinaka, a ako se sumnja na rubne učinke, treba promijeniti raspored na ploči kako bi se izbjegli ti učinci. Na primjer, može se upotrijebiti raspored na ploči koji isključuje rubne jažice.
30. Nakon dodavanja kemikalija testne ploče treba inkubirati u inkubatoru s 5 % CO₂ na 37 ± 1 °C od 20 do 24 sata kako bi se inducirali proizvodi reporterskog gena.
31. Posebnu pozornost treba posvetiti spojevima koji su jako hlapljivi. U tim slučajevima kontrolne jažice koje se nalaze u blizini mogu dati lažno pozitivne rezultate i to treba uzeti u obzir u kontekstu očekivanih i prijašnjih vrijednosti kontrola. U nekim slučajevima u kojima hlapljivost može biti problem mogu se upotrijebiti poklopci za ploče kako bi se tijekom ispitivanja učinkovito izolirale pojedinačne jažice pa se stoga u tim slučajevima preporučuje njihova upotreba.
32. Ponavljanja konačnih ispitivanja za istu kemikaliju treba provoditi na različite dane kako bi se osigurala neovisnost.

Test luciferaze

33. Za test se može upotrijebiti komercijalni reagens za test luciferaze [npr. Steady-Glo® Luciferase Assay System (Promega, E2510 ili ekvivalentno)) ili standardni sustav testa luciferaze (npr. Promega, E1500 ili ekvivalentno) pod uvjetom da su ispunjeni kriteriji prihvatljivosti. Reagens za test treba odabrati na temelju osjetljivosti luminometra koji se koristi. Ako se koristi standardni sustav testa luciferaze, prije dodavanja supstrata treba upotrijebiti reagens za liziranje stanične kulture. Reagens za luciferazu treba primijeniti prema uputama proizvođača.

ANALIZA PODATAKA

Test agonista estrogenskog receptora

34. Kad je riječ o testu agonista estrogenskog receptora, da bi se dobila relativna transkripcijska aktivnost u odnosu na pozitivnu kontrolu (1 nM E2), signali luminiscencije s iste ploče mogu se analizirati prema sljedećim koracima (prihvatljivi su i drugi ekvivalentni matematički postupci):

Korak 1. Izračunati srednju vrijednost za kontrolu s nosačem.

Korak 2. Oduzeti srednju vrijednost kontrole s nosačem od vrijednosti svake jažice kako bi se podaci normalizirali.

Korak 3. Izračunati srednju vrijednost za normaliziranu pozitivnu kontrolu.

Korak 4. Podijeliti normaliziranu vrijednost svake jažice na ploči srednjom vrijednošću normalizirane pozitivne kontrole (PC = 100 %).

Konačna vrijednost svake jažice relativna je transkripcijska aktivnost za tu jažicu u usporedbi s odgovorom pozitivne kontrole.

Korak 5. Izračunati srednju vrijednost relativne transkripcijske aktivnosti za svaku koncentracijsku skupinu ispitivane kemikalije. Odgovor ima dvije dimenzije: prosječnu transkripcijsku aktivnost (odgovor) i koncentraciju pri kojoj dolazi do odgovora (vidjeti sljedeći odjeljak).

Razmatranja o indukciji vrijednosti EC₅₀, PC₅₀ i PC₁₀

35. Za izračun vrijednosti EC₅₀ potrebna je cijela krivulja koncentracija – odgovor, ali to se ne može uvijek postići ili nije praktično zbog ograničenja raspona ispitne koncentracije (na primjer, zbog citotoksičnosti ili poteškoća s topljivosti). Međutim, budući da su EC₅₀ i najveća razina indukcije (koja odgovara najvećoj vrijednosti Hillove jednadžbe) informativni parametri, treba ih navesti kada je to moguće. Za izračun vrijednosti EC₅₀ i najveće razine indukcije treba koristiti primjereni statistički softver (npr. statistički softver Graphpad Prism). Ako je na podatke o koncentraciji i odgovoru primjenjiva Hillova logistička jednadžba, vrijednost EC₅₀ treba izračunati prema sljedećoj jednadžbi (7.):

$Y = \text{dno} + (\text{vrh} - \text{dno}) / (1 + 10^{\exp((\log \text{EC}_{50} - X) \times \text{Hillov nagib}))}$ pri čemu je:

X logaritam koncentracije, a

Y odgovor te Y počinje na dnu i kreće se do vrha sigmoidne krivulje. Dno je u Hillovoj logističkoj jednadžbi utvrđeno na nulu.

36. Za svaku ispitivanu kemikaliju treba navesti sljedeće:

RPC_{Max} (maksimalna razina odgovora koju inducira ispitivana kemikalija, izražena kao postotak odgovora koji inducira 1 nM E2 na istoj ploči) te PC_{Max} (koncentracija povezana s vrijednosti RPC_{Max}) i,

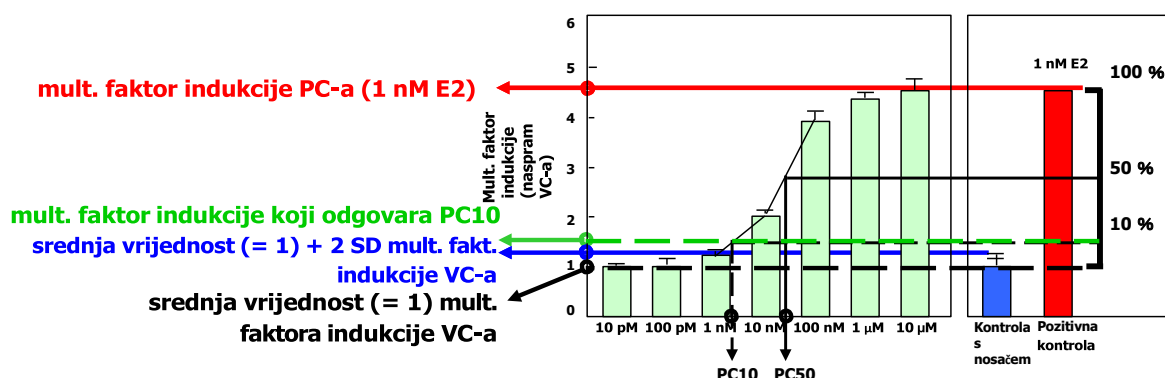
u slučaju pozitivnih kemikalija, koncentracije koje induciraju PC₁₀ i, ako je primjereno, PC₅₀.

37. Vrijednost PC_x može se izračunati interpolacijom između dvije točke na koordinatama X-Y, jedne neposredno iznad i jedne neposredno ispod vrijednosti PC_x. Ako podatkovne točke koje se nalaze neposredno iznad i ispod vrijednosti PC_x imaju koordinate (a,b) i (c,d), vrijednost PC_x može se izračunati prema sljedećoj jednadžbi:

$$\log[\text{PC}_x] = \log[c] + (x - d) / (d - b)$$

38. Opisi vrijednosti PC navedeni su na slici 1. u nastavku.

Slika 1.: Primjer načina na koji se izvode vrijednosti pozitivne kontrole. PC (1 nM E2) stavlja se na svaku testnu ploču



Test antagonista estrogenskog receptora

39. Kad je riječ o testu antagonista estrogenskog receptora, da bi se dobila relativna transkripcijska aktivnost u odnosu na kontrolu s dodanom poznatom količinom tvari (*spike-in*) (25 nM E2), signali luminiscencije s iste ploče mogu se analizirati prema sljedećim koracima (prihvatljivi su i drugi ekvivalentni matematički postupci).

Korak 1. Izračunati srednju vrijednost za kontrolu s nosačem.

Korak 2. Oduzeti srednju vrijednost kontrole s nosačem od vrijednosti svake jažice kako bi se podaci normalizirali. Korak 3. Izračunati srednju vrijednost za normaliziranu kontrolu s dodanom poznatom količinom tvari (*spike-in*).

Korak 4. Podijeliti normaliziranu vrijednost svake jažice na ploči srednjom vrijednošću normalizirane kontrole s dodanom poznatom količinom tvari (*spike-in* kontrola = 100 %).

Konačna vrijednost svake jažice relativna je transkripcijska aktivnost za tu jažicu u usporedbi s odgovorom kontrole s dodanom poznatom količinom tvari.

Korak 5. Izračunati srednju vrijednost relativne transkripcijske aktivnosti za svako tretiranje.

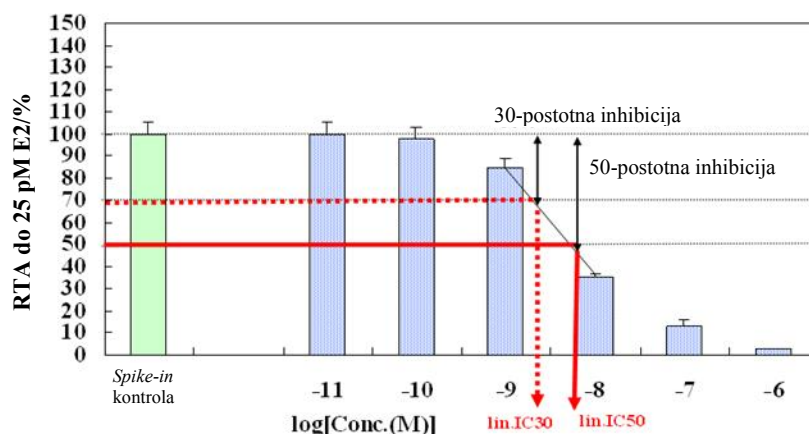
Razmatranja o indukciji vrijednosti IC₃₀ i IC₅₀

40. U slučaju pozitivnih kemikalija treba navesti koncentracije koje induciraju IC₃₀ i, ako je primjereno, IC₅₀.

41. Vrijednost IC_x može se izračunati interpolacijom između dvije točke na koordinatama X-Y, jedne neposredno iznad i jedne neposredno ispod vrijednosti IC_x. Ako podatkovne točke koje se nalaze neposredno iznad i ispod vrijednosti IC_x imaju koordinate (c,d) i (a,b), vrijednost IC_x može se izračunati prema sljedećoj jednadžbi:

$$\ln IC_x = a - (b - (100 - x)) (a - c) / (b - d)$$

Slika 2.: Primjer načina na koji se izvode vrijednosti IC. Kontrola s dodanom poznatom količinom tvori (*spike-in*) (25 pM E2) stavlja se na svaku testnu ploču



RTA: relativna transkripcijska aktivnost

42. Rezultati se trebaju temeljiti na dva (ili tri) neovisna ciklusa. Ako se u dva ciklusa dobiju usporedivi, a time i ponovljivi rezultati, ne mora se provoditi treći ciklus. Da bi bili prihvatljivi, rezultati trebaju:

- ispunjavati kriterije prihvatljivosti (vidjeti stavke od 14. do 20. o kriterijima prihvatljivosti),
- biti ponovljivi.

Kriteriji za tumačenje podataka

Tablica 7.: Kriteriji za donošenje pozitivne i negativne odluke u testu agonista estrogenskog receptora

Pozitivna	Ako se dobije vrijednost RPC_{Max} koja je jednaka ili veća od 10 % odgovora pozitivne kontrole u najmanje dva od dva provedena ciklusa ili u dva od tri provedena ciklusa.
Negativna	Ako se ne uspije dobiti vrijednost RPC_{Max} koja iznosi barem 10 % odgovora pozitivne kontrole u dva od dva provedena ciklusa ili u dva od tri provedena ciklusa.

Tablica 8.: Kriteriji za donošenje pozitivne i negativne odluke u testu antagonista estrogenskog receptora

Pozitivna	Ako se IC_{30} izračuna u najmanje dva od dva provedena ciklusa ili u dva od tri provedena ciklusa.
Negativna	Ako se IC_{30} ne uspije izračunati u dva od dva provedena ciklusa ili u dva od tri provedena ciklusa.

43. Kriteriji za tumačenje podataka navedeni su u tablicama 7. i 8. Pozitivne rezultate karakterizirat će i razmjer učinka i koncentracija pri kojoj dolazi do učinka. Oba ta cilja ostvaruju se izražavanjem rezultata kao koncentracije pri kojoj se postiže 50 % (PC_{50}) ili

10 % (PC₁₀) vrijednosti PC za test agonista te se inhibira 50 % (IC₅₀) ili 30 % (IC₃₀) vrijednosti kontrole s dodanom poznatom količinom tvari (*spike-in*) za test antagonista. Međutim, ispitivana kemikalija određuje se kao pozitivna ako je najveći odgovor koji ona inducira (RPC_{Max}) jednak ili veći od 10 % odgovora pozitivne kontrole u najmanje dva od dva provedena ciklusa ili dva od tri provedena ciklusa, dok se ispitivana kemikalija smatra negativnom ako RPC_{Max} ne uspije ostvariti 10 % odgovora pozitivne kontrole u dva od dva provedena ciklusa ili u dva od tri provedena ciklusa.

44. Vrijednosti PC₁₀, PC₅₀ i PC_{Max} u testu agonista estrogenskog receptora te IC₃₀ i IC₅₀ u testu antagonista estrogenskog receptora mogu se izračunati s pomoću proračunske tablice koja je dostupna sa Smjernicom za ispitivanje na javnom *web*-mjestu OECD-a¹.
45. Trebalo bi biti dovoljno dobiti vrijednosti PC₁₀ ili PC₅₀ i IC₃₀ ili IC₅₀ najmanje dva puta. Međutim, ako osnovica za podatke u istom rasponu koncentracije koja iz toga proizađe pokazuje varijabilnost s neprihvatljivo visokim koeficijentom varijacije (CV; %), podaci se ne mogu smatrati pouzdanima i treba utvrditi izvor velike varijabilnosti. Koeficijent varijacije neobrađenih podataka iz tri ponavljanja (tj. podaci o intenzitetu fluorescencije) podatkovnih točaka koje se upotrebljavaju za izračun vrijednosti PC₁₀ treba biti manji od 20 %.
46. Ispunjavanje kriterija prihvatljivosti znači da sustav testa pravilno funkcionira, ali time se ne osigurava da će svaki pojedinačni ciklus dati točne rezultate. Ponavljanje rezultata prvog ciklusa najbolje je jamstvo toga da su dobiveni točni podaci.
47. U slučaju testa agonista estrogenskog receptora, ako je za ispitivanje za pozitivne ispitivane kemikalije, osobito za kemikalije PC10-PC49 te kemikalije za koje se sumnja da pretjerano stimuliraju luciferazu, potrebno više informacija u svrhu probira i utvrđivanja prioriteta ove smjernice za ispitivanje, upotrebom antagonista ER α može se potvrditi da je uočena aktivnost luciferaze isključivo odgovor specifičan za ER α (vidjeti Dodatak 2.1.).

IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

48. Vidjeti stavak 20. odjeljka „SASTAVNICE ER TA TESTA”.

LITERATURA

¹ <http://www.oecd.org/env/testguidelines>

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 (No 225), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
2. Escande A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol.*, 71, 1459.–1469.
3. Kuiper G.G., *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, *Endocrinol.*, 139, 4252.–4263.
4. Spaepen M., *et al.* (1992). Detection of Bacterial and Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Polymerase Chain Reaction, *FEMS Microbiol. Lett.*, 78(1), 89.–94.
5. Kobayashi H., *et al.* (1995). Rapid Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Enzymatic Detection of Polymerase Chain Reaction (PCR) Products, *J. Vet. Med. Sci.*, 57(4), 769.–771.
6. Dussurget O. and Roulland-Dussoix D. (1994). Rapid, Sensitive PCR-Based Detection of Mycoplasmas in Simulated Samples of Animal Sera, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(3), 953.–9.
7. De Lean A., Munson P.J. and Rodbard D. (1978). Simultaneous Analysis of Families of Sigmoidal Curves: Application to Bioassay, Radioligand Assay, and Physiological Dose-Response Curves, *Am. J. Physiol.*, 235, E97.–E102.

Dodatak 2.1.

LAŽNO POZITIVNI REZULTATI: PROCJENA SIGNALA LUMINISCENCIJE KOJIMA NE POSREDOJU RECEPTORI

1. Lažno pozitivne rezultate u testu agonista estrogenskog receptora može uzrokovati aktivacija gena luciferaze koja nije posredovana estrogenskim receptorom ili izravna aktivacija genskog produkta ili nepovezana fluorescencija. Na takve učinke upućuje nepotpuna ili neobična krivulja doza – odgovor. Ako se sumnja na takve učinke, treba ispitati učinak antagonista estrogenskog receptora (npr. 4-hidroksitamoksifena (OHT) pri koncentraciji koja nije toksična) na odgovor. U tu svrhu možda neće biti primjeren čisti antagonist ICI 182780 jer dovoljna koncentracija antagonista ICI 182780 može smanjiti vrijednost kontrole s nosačem, a to će utjecati na analizu podataka.
2. Kako bi se osigurala valjanost ovog pristupa, na istoj se ploči mora ispitati:
 - agonističko djelovanje nepoznate kemikalije sa/bez 10 μ M OHT-a,
 - kontrola s nosačem (tri ponavljanja),
 - OHT (tri ponavljanja),
 - 1 nM E2 (tri ponavljanja) kao agonistička pozitivna kontrola,
 - 1 nM E2 + OHT (tri ponavljanja).

Kriteriji za tumačenje podataka

Napomena: sve jažice treba tretirati istom koncentracijom nosača.

- Ako tretiranje antagonistom estrogenskog receptora NE utječe na agonističko djelovanje nepoznate kemikalije, ona se razvrstava kao „negativna”.
- Ako je agonističko djelovanje nepoznate kemikalije potpuno inhibirano, primjenjuju se kriteriji za donošenje odluke.
- Ako je agonističko djelovanje pri najmanjoj koncentraciji jednako ili veće od odgovora PC₁₀, nepoznata kemikalija inhibirana je jednako ili više od odgovora PC₁₀. Računa se razlika u odgovorima između jažica koje nisu tretirane i koje su tretirane agonistom estrogenskog receptora i tu razliku treba smatrati stvarnim odgovorom i koristiti za izračun odgovarajućih parametara kako bi se omogućilo donošenje odluke o razvrstavanju.

Analiza podataka

Provjeriti zahtjeve izvedbe.

Provjeriti koeficijent varijacije između jažica tretiranih u istim uvjetima.

1. Izračunati srednju vrijednost kontrole s nosačem.
2. Oduzeti srednju vrijednost kontrole s nosačem od vrijednosti svake jažice koja **nije** tretirana OHT-om.
3. Izračunati srednju vrijednost OHT-a.
4. Oduzeti srednju vrijednost kontrole s nosačem od vrijednosti svake jažice koja je tretirana OHT-om.
5. Izračunati srednju vrijednost pozitivne kontrole.
6. Izračunati relativnu transkripcijsku aktivnost svih ostalih jažica u odnosu na pozitivnu kontrolu.

Dodatak 2.2.

PRIPREMA SERUMA TRETIRANOG UGLJENOM PREMAZANIM DEKSTRANOM (DCC)

1. Tretiranje seruma ugljenom premazanim dekstranom (DCC) opća je metoda za uklanjanje estrogenih spojeva iz seruma koji se dodaje mediju za stanice kako bi se isključio pristrani odgovor povezan s preostalim estrogenom u serumu. Ovim se postupkom može tretirati 500 ml fetalnog goveđeg seruma (FBS).

Sastavnice

2. Bit će potrebni sljedeći materijali i oprema:

Materijali

Aktivni ugljen

Dekstran

Magnezijev klorid heksahidrat ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)

Saharoza

1 M puferske otopine HEPES (pH 7,4)

Ultračista voda dobivena sustavom za filtriranje

Oprema

Staklena posuda obrađena u autoklavu (veličinu treba prilagoditi po potrebi)
Opća laboratorijska centrifuga (u kojoj se temperatura može postaviti na 4 °C)

Postupak

3. Sljedeći postupak prilagođen je za upotrebu epruveta za centrifugiranje od 50 ml.

[Dan 1.] Pripremiti suspenziju ugljena premazanog dekstranom s 1 l ultračiste vode koja sadržava 1,5 mM MgCl_2 , 0,25 M saharoze, 2,5 g ugljena, 0,25 g dekstrana i 5 mM HEPES-a te miješati preko noći na 4 °C.

[Dan 2.] Uliti suspenziju u epruvete za centrifugiranje od 50 ml i centrifugirati deset minuta na 10 000 o/min i temperaturi od 4 °C. Ukloniti supernatant i pohraniti polovinu sedimenta ugljena na temperaturi od 4 °C za upotrebu na dan 3. Suspendirati drugu polovinu ugljena s FBS-om koji je postupno odmrznut kako bi se izbjeglo taloženje i inaktiviran toplinom 30 minuta na 56 °C, a zatim prenijeti u staklenu posudu obrađenu u autoklavu kao što je Erlenmeyerova tikvica. Ovu suspenziju lagano miješati preko noći na temperaturi od 4 °C.

[Dan 3.] Uliti suspenziju s FBS-om u epruvete za centrifugiranje i centrifugirati deset minuta

na 10 000 o/min i temperaturi od 4 °C. Prikupiti FBS i prenijeti ga u novi sediment ugljena pripremljen i pohranjen na dan 2. Suspendirati sediment ugljena i preko noći lagano miješati tu suspenziju na 4 °C u staklenoj posudi obrađenoj u autoklavu.

[Dan 4.] Uliti suspenziju i centrifugirati je deset minuta na 10 000 o/min i temperaturi od 4 °C te sterilizirati supernatant filtriranjem kroz sterilni filter od 0,2 µm. Ovaj FBS tretiran DCC-om treba pohraniti na –20 °C i može se upotrijebiti u roku od godinu dana.

DODATAK 3.

TEST TRANSAKTIVACIJE ESTROGENSKOG RECEPTORA ZA OTKRIVANJE AGONISTA I ANTAGONISTA ESTROGENSKOG RECEPTORA PRIMJENOM STANIČNE LINIJE VM7LUC

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA (VIDJETI I OPĆI UVOD)

1. U ovom se testu upotrebljava stanična linija VM7Luc4E2¹. Validirali su ga NICEATM (Nacionalni toksikološki program Međuagencijskog centra za evaluaciju alternativnih toksikoloških metoda) i ICCVAM (Međuagencijski koordinacijski odbor za validaciju alternativnih metoda) (1.). Stanične linije VM7Luc uglavnom eksprimiraju endogeni ER α i manju količinu endogenog ER β (2., 3. i 4.).
2. Ovaj je test primjenjiv na velik raspon tvari pod uvjetom da se one mogu otopiti u dimetilsulfoksidu (DMSO; CAS br. 67-68-5), da ne reagiraju s DMSO-om ili medijem za uzgoj stanične kulture te da nisu citotoksične pri koncentracijama koje se ispituju. Ako nije moguće upotrijebiti DMSO, može se upotrijebiti drugi nosač kao što su etanol ili voda (vidjeti stavak 12.). Dokazana uspješnost testa (ant)agonista VM7Luc ER TA ukazuje na to da podaci koju se dobiju primjenom tog testa mogu dati informacije o mehanizmima djelovanja kojima posreduje estrogenski receptori te bi ga se moglo uzeti u obzir pri utvrđivanju prioriteta tvari za daljnje ispitivanje.
3. Ovaj je test posebno osmišljen za otkrivanje transaktivacije kojom posreduju hER α i hER β mjerenjem kemiluminiscencije kao krajnje točke. Kemiluminiscencija se često upotrebljava u biotestovima jer daje dovoljno snažan signal u odnosu na pozadinu (10). Međutim, aktivnost luciferaze krijesnica u testovima na staničnoj osnovi mogu poremetiti tvari koje inhibiraju enzim luciferaze, što uzrokuje i prividnu inhibiciju ili povećanu luminiscenciju zbog stabilizacije proteina (10). Osim toga, kod nekih luciferaznih testova reporterskog gena estrogenskog receptora pri koncentracijama fitoestrogena većima od 1 μ M zabilježeni su

¹ Prije lipnja 2016. ta je stanična linija bila određena kao stanična linija BG1Luc. Stanice BG-1 izvorno su opisali Geisinger i dr. (1998.) (12.), a kasnije su ih okarakterizirali istraživači iz NIEHS-a (*National Institute of Environmental Health Sciences*) (13.). Relativno nedavno otkriveno je da postoje dvije različite varijante stanica BG-1 kojima se istraživači koriste – BG-1 Fr i BG-1 NIEHS. Temeljita analiza, uključujući DNK ispitivanje, tih dviju varijanti staničnih linija BG-1 koju su proveli Li i suradnici (2014.) (14.) pokazala je da je BG-1 Fr jedinstven i da BG-1 NIEHS, tj. izvorna stanična linija koja se koristila za razvoj testa, nije stanična linija humanog karcinoma jajnika BG1, već varijanta stanične linije humanog karcinoma dojke MCF7. Stanična linija upotrijebljena u ovom testu, koja se izvorno nazivala BG1Luc4E2 (15.), sada se određuje kao VM7Luc4E2 („V” = varijanta; „M7” = stanice MCF7). Isto tako, test se sada određuje kao VM7Luc ER TA. Iako se time mijenja podrijetlo stanične linije na kojoj se test temelji, ne utječe se na objavljene validacijske studije niti na korisnost i primjenu ovog testa za probir estrogenskih/antiestrogenskih kemikalija.

signali luminiscencije kojima ne posreduju receptori zbog pretjerane aktivacije reporterskog gena za luciferazu ((9) (11)). Iako krivulja doza – odgovor pokazuje da do stvarne aktivacije sustava estrogenskog receptora dolazi pri manjim koncentracijama, ekspresiju luciferaze dobivenu pri visokim koncentracijama fitoestrogena ili sličnih spojeva za koje se pretpostavlja da poput fitoestrogena dovode do pretjerane aktivacije reporterskog gena za luciferazu treba pažljivo ispitati sustavima ER TA testova sa stabilnom transfekcijom (see Appendix 2).

4. Prije upotrebe ovog testa u regulatorne svrhe treba pročitati odjeljke „OPĆI UVOD” i „SASTAVNICE ER TA TESTA”. Definicije i kratice upotrijebljene u ovoj ispitnoj metodi opisuju se u Dodatku 1.

NAČELO TESTA (VIDJETI I OPĆI UVOD)

5. Test se upotrebljava kako bi se označilo vezivanje estrogenskog receptora i liganda, nakon čega kompleks receptora i liganda translocira u jezgru. U jezgri se kompleks receptora i liganda veže na specifične elemente DNK odgovora i transaktivira reporterski gen (*luc*), što dovodi do nastanka luciferaze i kasnije emisije svjetla, koja se može kvantificirati s pomoću luminometra. Aktivnost luciferaze može se procijeniti brzo i jeftino primjenom nekoliko komercijalno dostupnih pribora za ispitivanje. U testu VM7Luc ER TA upotrebljava se stanična linija humanog adenokarcinoma dojke koja reagira na estrogenski receptor, VM7, koja je stabilno transficirana konstruktom reporterskog gena *luc* krijesnice koji kontroliraju četiri elementa odgovora estrogena postavljena uzlazno od promotora virusa mišjeg tumora dojke (MMTV) kako bi se otkrile tvari s *in vitro* agonističkim ili antagonističkim djelovanjem na estrogenski receptor. Taj promotor MMTV-a pokazuje samo manju unakrsnu reaktivnost s ostalim steroidnim i nesteroidnim hormonima (8.). Kriteriji za tumačenje podataka detaljno su opisani u stavku 41. Ukratko, pozitivni odgovor utvrđuje se na temelju krivulje koncentracija – odgovor, koja sadržava najmanje tri točke sa stupcima pogreške koje se ne preklapaju (srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija) te promjene amplitude (normalizirana relativna jedinica svjetlosti (RLU)) od najmanje 20 % najveće vrijednosti za referentnu normu (17 β -estradiol [E2; CAS br. 50-28-2] za test agonista, raloksifen HCl [Ral; CAS br. 84449-90-1]/E2 za test antagonista).

POSTUPAK

Stanična linija

6. Za test bi se trebala upotrebljavati stabilno transficirana stanična linija VM7Luc4E2. Stanična linija trenutno je dostupna samo sklapanjem tehničkog sporazuma o licenciranju s ustanovom University of California, Davis, Kalifornija, SAD¹ i društvom Xenobiotic Detection Systems Inc., Durham, Sjeverna Karolina, SAD².

Stabilnost stanične linije

7. Kako bi se održali stabilnost i integritet stanične linije, stanice treba uzgajati za više od jedne pasaže od zamrznute matične zalihe u mediju za održavanje stanica (vidjeti stavak 9.). Stanice se ne bi trebale uzgajati za više od 30 pasaža. Za staničnu liniju VM7Luc4E2 30 pasaža trajat će približno tri mjeseca.

Stanična kultura i uvjeti nasađivanja

8. Treba poštovati postupke utvrđene u Smjernicama za dobru praksu za stanične kulture (5. i 6.) kako bi se osigurala kvaliteta svih materijala i metoda te tako održali integritet, valjanost i obnovljivost svih provedenih aktivnosti.
9. Stanice VM7Luc4E2 održavaju se u mediju RPMI 1640 obogaćenom s 0,9 % mješavine penicilina i streptomicina i 8,0 % fetalnog goveđeg seruma (FBS) u namjenskom inkubatoru kulture tkiva na $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, vlažnosti od $90\text{ } \% \pm 5\text{ } \%$ i s $5,0\text{ } \% \pm 1\text{ } \% \text{ CO}_2$ u zraku.
10. Kada se dosegne konfluencija od $\sim 80\text{ } \%$, uzgaja se supkultura stanica VM7Luc4E2 koje se kondicioniraju na okolinu bez estrogena 48 sati prije nasađivanja na ploče s 96 jažica radi izlaganja ispitivanim kemikalijama i analize indukcije aktivnosti luciferaze koja ovisi o estrogenu. Medij bez estrogena (EFM) sadržava Dulbeccov modificirani Eagleov medij (DMEM) obogaćen s 4,5 % FBS-a tretiranog ugljenom premazanim dekstranom, 1,9 % L-glutamina i 0,9 % mješavine penicilina i streptomicina. U plastičnoj opremi ne smije biti estrogene aktivnosti [vidjeti detaljni protokol (7.)].

Kriteriji prihvatljivosti

11. Prihvaćenje ili odbijanje ispitivanja temelji se na procjeni rezultata referentne norme i kontrole iz svakog pokusa provedenog na pločici s 96 jažica. Svaka referentna norma ispituje se s više koncentracija i koristi se više uzoraka svake referentne i kontrolne koncentracije.

¹ Michael S. Denison, Ph.D. Professor, Dept. of Environmental Toxicology, 4241 Meyer Hall, One Shields Ave, University of California, Davis, CA 95616, e-pošta: msdenison@ucdavis.edu, (530) 754-8649.

² Xenobiotic Detection Systems Inc. 1601 East Geer Street, Suite S, Durham NC, 27704 SAD, e-pošta: info@dioxins.com, telefon: 919-688-4804, faks: 919-688-4404.

Rezultati se uspoređuju s kontrolama kvalitete (KK) u pogledu tih parametara koji su izvedeni iz baza prijašnjih podataka o agonistima i antagonistima koje je izradio svaki laboratorij tijekom dokazivanja osposobljenosti. Baze prijašnjih podataka kontinuirano se dopunjuju vrijednostima referentnih normi i kontrola. Promjene u opremi ili laboratorijskim uvjetima možda će zahtijevati ažuriranje baza prijašnjih podataka.

Test agonista

Ispitivanje za utvrđivanje raspona

- Indukcija: indukciju na ploči treba mjeriti tako da se prosječna vrijednost relativne jedinice svjetlosti (RLU) najveće referentne norme E2 podijeli prosječnom vrijednosti RLU kontrole s DMSO-om. Obično se postiže peterostruka indukcija, ali u svrhu prihvaćanja indukcija bi trebala biti četverostruka ili veća.
- Rezultati kontrole s DMSO-om: vrijednosti RLU kontrole s otapalom trebale bi biti do 2,5 puta standardne devijacije srednje vrijednosti RLU prijašnje kontrole s otapalom.
- Pokus koji ne ispuni bilo koji kriterij prihvatljivosti treba odbaciti i ponoviti.

Iscrpno ispitivanje

Obuhvaća kriterije prihvatljivosti iz ispitivanja za utvrđivanje raspona agonista i sljedeće:

- rezultate referentne norme: krivulja koncentracija – odgovor referentne norme E2 trebala bi imati sigmoidni oblik i barem tri vrijednosti koje se nalaze na linearnom dijelu krivulje koncentracija – odgovor,
- rezultate pozitivne kontrole: vrijednosti RLU kontrole s metoksiklorom trebale bi biti veće od srednje vrijednosti DMSO-a uvećane za tri standardne devijacije srednje vrijednosti DMSO-a,
- pokus koji ne ispuni bilo koji kriterij prihvatljivosti treba odbaciti i ponoviti.

Test antagonista

Ispitivanje za utvrđivanje raspona

- Smanjenje: smanjenje na ploči mjeri se tako da se prosječna vrijednost relativne jedinice svjetlosti (RLU) najveće referentne norme Ral/E2 podijeli prosječnom vrijednosti RLU kontrole s DMSO-om. Obično se postiže peterostruko smanjenje, ali u svrhu prihvaćanja smanjenje bi trebalo biti trostruko ili veće.
- Rezultati kontrole s E2: vrijednosti RLU kontrole s E2 trebale bi biti do 2,5 puta standardne devijacije srednje vrijednosti RLU prijašnje kontrole s E2.
- Rezultati kontrole s DMSO-om: vrijednosti RLU kontrole s DMSO-om trebale bi biti do 2,5 puta standardne devijacije srednje vrijednosti RLU prijašnje kontrole s otapalom.
- Pokus koji ne ispuni bilo koji kriterij prihvatljivosti odbacuje se i ponavlja.

Iscrpno ispitivanje

Obuhvaća kriterije prihvatljivosti iz ispitivanja za utvrđivanje raspona antagonista i sljedeće:

- rezultate referentne norme: krivulja koncentracija – odgovor referentne norme Ral/E2 trebala bi imati sigmoidni oblik i barem tri vrijednosti koje se nalaze na linearnom dijelu krivulje koncentracija – odgovor,
- rezultate pozitivne kontrole: vrijednosti RLU kontrole s tamoksifenom/E2 trebale bi biti manje od srednje vrijednosti kontrole s E2 umanjene za tri standardne devijacije srednje vrijednosti kontrole s E2,
- pokus koji ne ispuni bilo koji kriterij prihvatljivosti odbacuje se i ponavlja.

Referentne norme, pozitivne kontrole i kontrole s nosačem

Kontrola s nosačem (testovi agonista i antagonista)

12. Nosač koji se upotrebljava za otapanje ispitivanih kemikalija treba ispitati kao kontrolu s nosačem. Nosač koji se koristio tijekom validacije testa VM7Luc ER TA bio je 1-postotni (v/v) dimetilsulfoksid (DMSO, CAS br. 67-68-5) (vidjeti stavak 24.). Ako se upotrebljava nosač koji nije DMSO, sve referentne norme, kontrole i ispitivane kemikalije treba prema potrebi ispitati u istom nosaču.

Referentna norma (utvrđivanje raspona agonista)

13. Referentnu normu čini E2 (CAS br. 50-28-2). Za ispitivanje za utvrđivanje raspona referentna norma sastoji se od serijskog razrjeđivanja četiriju koncentracija E2 ($1,84 \times 10^{-10}$, $4,59 \times 10^{-11}$, $1,15 \times 10^{-11}$ i $2,87 \times 10^{-12}$ M), pri čemu se svaka koncentracija ispituje u dvostrukim jažicama.

Referentna norma (iscrpno ispitivanje agonista)

14. E2 za iscrpno ispitivanje sastoji se od serijskog razrjeđivanja u omjeru 1 : 2 koje se sastoji od 11 koncentracija (u rasponu od $3,67 \times 10^{-10}$ do $3,59 \times 10^{-13}$ M) E2 u dvostrukim jažicama.

Referentna norma (utvrđivanje raspona antagonista)

15. Referentna norma kombinacija je tvari Ral (CAS br. 84449-90-1) i E2 (CAS br. 50-28-2). Ral/E2 za ispitivanje za utvrđivanje raspona sastoji se od serijskog razrjeđivanja triju koncentracija tvari Ral ($3,06 \times 10^{-9}$, $7,67 \times 10^{-10}$ i $1,92 \times 10^{-10}$ M) i fiksne koncentracije ($9,18 \times 10^{-11}$ M) E2 u dvostrukim jažicama.

Referentna norma (iscrpno ispitivanje antagonista)

16. Ral/E2 za iscrpno ispitivanje sastoji se od serijskog razrjeđivanja tvari Ral u omjeru 1 : 2 (u rasponu od $2,45 \times 10^{-8}$ do $9,57 \times 10^{-11}$ M) i fiksne koncentracije ($9,18 \times 10^{-11}$ M) E2, a obuhvaća devet koncentracija tvari Ral/E2 u dvostrukim jažicama.

Slaba pozitivna kontrola (agonist)

17. Slabu pozitivnu kontrolu čini $9,06 \times 10^{-6}$ M *p,p'*-metoksiklora (metoksiklor; CAS br. 72-43-5) u EFM-u.

Slaba pozitivna kontrola (antagonist)

18. Slaba pozitivna kontrola sastoji se od tamoksifena (CAS br. 10540-29-1) $3,36 \times 10^{-6}$ M s $9,18 \times 10^{-11}$ M E2 u EFM-u.

Kontrola s E2 (samo za test antagonista)

19. Kontrolu s E2 čini $9,18 \times 10^{-11}$ M E2 u EFM-u i koristi se kao osnovna negativna kontrola.

Multiplikacijski faktor indukcije (agonist)

20. Indukcija aktivnosti luciferaze referentne norme (E2) mjeri se tako da se prosječna vrijednost RLU najveće referentne norme E2 podijeli prosječnom vrijednosti RLU kontrole s DMSO-om i rezultat bi trebao biti veći od četverostruke vrijednosti.

Multiplikacijski faktor smanjenja (antagonist)

21. Srednja aktivnost luciferaze za referentnu normu (Ral/E2) mjeri se tako da se prosječna vrijednost RLU najveće referentne norme Ral/E2 podijeli prosječnom vrijednosti RLU kontrole s DMSO-om i trebala bi biti veća od trostruke vrijednosti.

Dokazivanje osposobljenosti laboratorija (vidjeti stavak 14. i tablice 3. i 4. u odjeljku „SASTAVNICE ER TA TESTA” ove ispitne metode)

Nosač

22. Ispitivane kemikalije treba otopiti u otapalu koje otapa tu ispitivanu kemikaliju te se može miješati s medijem za stanice. Primjereni su nosači voda, etanol (čistoće od 95 % do 100 %) i DMSO. Ako se upotrebljava DMSO, ne bi se trebalo koristiti više od 1 % (v/v). Za sve bi nosače trebalo dokazati da najveći volumen koji se upotrebljava nije citotoksičan i da ne utječe na uspješnost testa. Referentne norme i kontrole otapaju se u 100-postotnom otapalu i zatim se razrjeđuju na odgovarajuće koncentracije u EFM-u.

Priprema ispitivanih kemikalija

23. Ispitivane kemikalije otapaju se u 100-postotnom DMSO-u (ili odgovarajućem otapalu) i zatim se razrjeđuju na odgovarajuće koncentracije u EFM-u. Sve ispitivane kemikalije trebalo bi ostaviti tako da se njihova temperatura izjednači sa sobnom temperaturom prije nego što ih se otopi i razrijedi. Za svaki pokus treba pripremiti svježe otopine ispitivane kemikalije. U otopinama ne smije biti primjetan talog ili zamućenje. Uzorci referentne norme i kontrole mogu se pripremati zbirno; međutim, za svaki pokus treba pripremiti svježu konačnu referentnu normu, razrjeđivanja kontrole i ispitivane kemikalije i treba ih upotrijebiti u roku od 24 sata od pripreme.

Topljivost i citotoksičnost: razmatranja o utvrđivanju raspona

24. Ispitivanje za utvrđivanje raspona sastoji se od serijskih razrjeđivanja u sedam točaka u omjeru 1 : 10 i provodi se dvaput. Ispitivane kemikalije prvo se ispituju do najveće

koncentracije od 1 mg/ml (~ 1 mM) za test agonista i 20 µg/ml (~ 10 µM) za test antagonista. Pokusi za utvrđivanje raspona provode se kako bi se utvrdilo sljedeće:

- početne koncentracije ispitivane kemikalije koje će se upotrebljavati tijekom iscrpnog ispitivanja,
- razrjeđivanja ispitivane kemikalije (1 : 2 ili 1 : 5) koja će se upotrebljavati tijekom iscrpnog ispitivanja.

25. U protokole za test agonista i antagonista uključena je procjena vijabilnosti stanica/citotoksičnosti (7.) te se ona uključuje u test za utvrđivanje raspona i iscrpno ispitivanje. Metoda citotoksičnosti upotrijebljena za procjenu vijabilnosti stanica tijekom validacije testa VM7Luc ER TA (1.) bila je metoda razmjernog kvalitativnog vizualnog opažanja; međutim, za utvrđivanje citotoksičnosti može se upotrijebiti kvantitativna metoda (vidjeti protokol (7.)). Ne mogu se upotrebljavati podaci iz koncentracija ispitivane kemikalije koje uzrokuju smanjenje vijabilnosti veće od 20 %.

Izlaganje ispitivanoj kemikaliji i organizacija testne ploče

26. Stanice se broje i nasađuju na ploče s kulturom tkiva s 96 jažica (2 x 10⁵ stanica po jažici) u EFM-u i inkubiraju se 24 sata kako bi se omogućilo da se stanice pričvrste na ploču. EFM se uklanja i zamjenjuje ispitivanim i referentnim kemikalijama u EFM-u te se inkubira 19–24 sata. Posebnu pozornost treba posvetiti tvarima koje su jako hlapljive jer kontrolne jažice koje se nalaze u blizini mogu dati lažno pozitivne rezultate. U tim slučajevima mogu pomoći „poklopci za ploče” kojima se učinkovito izoliraju pojedinačne jažice pa se stoga preporučuje njihova upotreba.

Ispitivanja za utvrđivanje raspona

27. U ispitivanjima za utvrđivanje raspona upotrebljavaju se sve jažice ploče s 96 jažica kako bi se dvaput ispitalo do šest ispitivanih kemikalija kao serijska razrjeđivanja u sedam točaka u omjeru 1 : 10 (vidjeti [slike 1. i 2.](#)).

- U ispitivanju za utvrđivanje raspona *agonista* upotrebljavaju se četiri koncentracije E2 u dva ponavljanja kao referentna norma i četiri jažice s ponavljanjem za kontrolu s DMSO-om.
- U ispitivanju za utvrđivanje raspona *antagonista* upotrebljavaju se tri koncentracije tvari Ral/E2 s $9,18 \times 10^{-11}$ M E2 u dva ponavljanja kao referentna norma i tri jažice s ponavljanjem za kontrole s E2 i DMSO-om.

Slika 1.: Raspored na ploči s 96 jažica kod ispitivanja za utvrđivanje raspona agonista

	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

Kratice: E2-1 do E2-4 = koncentracije referentne norme E2 (od visoke do niske); TC1-1 do TC1-7 = koncentracije (od visoke do niske) ispitivane kemikalije 1 (TC1); TC2-1 do TC2-7 = koncentracije (od visoke do niske) ispitivane kemikalije 2 (TC2); TC3-1 do TC3-7 = koncentracije (od visoke do niske) ispitivane kemikalije 3 (TC3); TC4-1 do TC4-7 = koncentracije (od visoke do niske) ispitivane kemikalije 4 (TC4); TC5-1 do TC5-7 = koncentracije (od visoke do niske) ispitivane kemikalije 5 (TC5); TC6-1 do TC6-7 = koncentracije (od visoke do niske) ispitivane kemikalije 6 (TC6); VC = kontrola s nosačem (DMSO (1 % v/v EFM-a)).

Slika 2.: Raspored na ploči s 96 jažica kod ispitivanja za utvrđivanje raspona antagonista

	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

Kratice: E2 = kontrola s E2; Ral-1 do Ral-3 = koncentracije raloksifena/referentne norme E2 (od visoke do niske); TC1-1 do TC1-7 = koncentracije (od visoke do niske) ispitivane kemikalije 1 (TC1); TC2-1 do TC2-7 = koncentracije (od visoke do niske) ispitivane kemikalije 2 (TC2); TC3-1 do TC3-7 = koncentracije (od visoke do niske) ispitivane kemikalije 3 (TC3); TC4-1 do TC4-7 = koncentracije (od visoke do niske) ispitivane kemikalije 4 (TC4); TC5-1 do TC5-7 = koncentracije (od visoke do niske) ispitivane kemikalije 5 (TC5); TC6-1 do TC6-7 = koncentracije (od visoke do niske) ispitivane kemikalije 6 (TC6); VC = kontrola s nosačem (DMSO [1 % v/v EFM-a]).

Napomena: Sve ispitivane kemikalije ispituju se s $9,18 \times 10^{-11}$ M E2.

28. Preporučeni konačni volumen medija potrebnog za svaku jažicu iznosi 200 μ l. Trebaju se upotrebljavati samo ispitne ploče kod kojih vijabilnost stanica u svim jažicama iznosi 80 % ili više.

29. Utvrđivanje početne koncentracije za iscrpno ispitivanje **agonista** posebno je opisano u protokolu za agoniste (7.). Ukratko, primjenjuju se sljedeći kriteriji:

- ako na krivulji koncentracije ispitivane kemikalije nema točaka koje su veće od srednje vrijednosti uvećane za tri standardne devijacije kontrole s DMSO-om, iscrpno ispitivanje provest će se upotrebom serijskog razrjeđivanja u 11 točaka u omjeru 1 : 2, počevši od najviše topljive koncentracije,
- ako na krivulji koncentracije ispitivane kemikalije postoje točke koje su veće od srednje vrijednosti uvećane za tri standardne devijacije kontrole s DMSO-om, početna koncentracija koja se u iscrpnom ispitivanju upotrebljava za plan razrjeđivanja od 11 točaka treba biti jedan log viša od koncentracije koja je dala najvišu prilagođenu vrijednost RLU u ispitivanju za utvrđivanje raspona. Plan razrjeđivanja od 11 točaka temeljit će se na omjeru 1 : 2 ili 1 : 5 u skladu sa sljedećim kriterijima:

serijsko razrjeđivanje od 11 točaka u omjeru 1 : 2 treba upotrijebiti ako će nastali raspon koncentracija obuhvaćati cijeli raspon odgovora na temelju krivulje koncentracija – odgovor koja je nastala u ispitivanju za utvrđivanje raspona. U suprotnom treba upotrijebiti razrjeđivanje u omjeru 1 : 5,

- ako ispitivana kemikalija u ispitivanju za utvrđivanje raspona pokaže dvofazičnu krivulju koncentracija – odgovor, obje faze treba utvrditi i u iscrpnom ispitivanju.

30. Utvrđivanje početnih koncentracija za iscrpno ispitivanje **antagonista** posebno je opisano u protokolu za antagoniste (7.). Ukratko, primjenjuju se sljedeći kriteriji:

- ako na krivulji koncentracije ispitivane kemikalije nema točaka koje su manje od srednje vrijednosti umanjene za tri standardne devijacije kontrole E2, iscrpno ispitivanje provest će se upotrebom serijskog razrjeđivanja u 11 točaka u omjeru 1 : 2, počevši od najviše topljive koncentracije,
- ako na krivulji koncentracije ispitivane kemikalije postoje točke koje su manje od prosječne vrijednosti umanjene za tri standardne devijacije kontrole s E2, početna koncentracija koja se u iscrpnom ispitivanju upotrebljava za plan razrjeđivanja od 11 točaka treba biti jedna od sljedećih opcija:
 - koncentracija koja daje najmanju prilagođenu vrijednost RLU u testu za utvrđivanje raspona,
 - najviša topljiva koncentracija (vidjeti protokol za antagoniste (7.), slika 14-2.),
 - najniža citotoksična koncentracija (vidjeti protokol za antagoniste (7.), slika 14-3. za povezani primjer),
- plan razrjeđivanja od 11 točaka temeljit će se na serijskom razrjeđivanju u omjeru 1 : 2 ili 1 : 5 u skladu sa sljedećim kriterijima:

serijsko razrjeđivanje od 11 točaka u omjeru 1 : 2 treba upotrijebiti ako će nastali raspon koncentracija obuhvaćati cijeli raspon odgovora na temelju krivulje koncentracija – odgovor koja je nastala u ispitivanju za utvrđivanje raspona. U suprotnom treba upotrijebiti razrjeđivanje u omjeru 1 : 5.

Iscrpno ispitivanje

31. Iscrpno ispitivanje sastoji se od serijskih razrjeđivanja od 11 točaka (serijska razrjeđivanja u omjeru 1 : 2 ili 1 : 5 na temelju početne koncentracije za kriterije iscrpnih testova), pri čemu se svaka koncentracija ispituje u trostrukim jažicama ploče s 96 jažica (vidjeti slike 3. i 4.).
- U iscrpnom ispitivanju *agonista* kao referentna norma upotrebljava se 11 koncentracija E2 u dva ponavljanja. Svaka ploča uključuje četiri jažice s ponavljanjem za kontrolu s DMSO-om i četiri jažice s ponavljanjem za kontrolu s metoksiklorom ($9,06 \times 10^{-6}$ M).
 - U iscrpnom ispitivanju *antagonista* kao referentna norma upotrebljava se devet koncentracija tvori Ral/E2 s $9,18 \times 10^{-11}$ M E2 u dva ponavljanja, s četiri jažice s ponavljanjem za kontrolu $9,18 \times 10^{-11}$ M E2, četiri jažice s ponavljanjem za kontrolu s DMSO-om i četiri jažice s ponavljanjem za tamoksifen $3,36 \times 10^{-6}$ M.

Slika 3.: Raspored na ploči s 96 jažica kod iscrpnog ispitivanja agonista

	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

Kratice: TC11-1 do TC1-11 = koncentracije ispitivane kemikalije 1 (od visoke do niske); TC2-1 do TC2-11 = koncentracije ispitivane kemikalije 2 (od visoke do niske); E2-1 do E2-11 = koncentracije referentne norme E2 (od visoke do niske); Meth = slaba pozitivna kontrola p,p' metoksiklor; VC = kontrola s nosačem DMSO (1 % v/v) u EFM-u.

Slika 4.: Raspored na ploči s 96 jažica kod iscrpnog ispitivanja antagonista

	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

Kratice: E2 = kontrola s E2; Ral-1 do Ral-9 = koncentracije raloksifena/referentne norme E2 (od visoke do niske); Tam = slaba pozitivna kontrola s tamoksifenom/E2; TC1-1 do TC1-11 = koncentracije (od visoke do niske) ispitivane kemikalije 1 (TC1); TC2-1 do TC2-11 = koncentracije (od visoke do niske) ispitivane kemikalije 2 (TC2); VC = kontrola s nosačem (DMSO [1 % v/v EFM-a]).

Napomena: kako je navedeno, sve referentne i ispitivane jažice sadržavaju fiksnu koncentraciju E2 ($9,18 \times 10^{-11}$ M).

32. Ponavljanja iscrpnih ispitivanja za istu kemikaliju treba provoditi na različite dane kako bi se osigurala neovisnost. Treba provesti barem dva iscrpna ispitivanja. Ako su rezultati testova kontradiktorni (npr. jedan je test pozitivan, a drugi negativan) ili ako jedan od testova nije primjeren, treba provesti treći dodatni test.

Mjera luminiscencije

33. Luminiscencija se mjeri u rasponu od 300 do 650 nm, upotrebom ubrizgavajućeg luminometra sa softverom koji kontrolira volumen ubrizgavanja i interval mjerenja (7.). Emisija svjetlosti iz svake jažice izražava se kao RLU po jažici.

ANALIZA PODATAKA

Utvrđivanje vrijednosti EC₅₀/IC₅₀

34. Vrijednost EC₅₀ (pola najveće učinkovite koncentracije ispitivane kemikalije [agonisti]) i vrijednost IC₅₀ (pola najveće inhibitorne koncentracije ispitivane kemikalije [antagonisti]) utvrđuju se na temelju podataka o koncentraciji i odgovoru. Za ispitivane kemikalije koje su pozitivne pri jednoj koncentraciji ili njih više, koncentracija ispitivane kemikalije koja uzrokuje pola najvećeg odgovora (IC₅₀ ili EC₅₀) računa se upotrebom analize Hillove funkcije ili primjerene alternative. Hillova funkcija logistički je matematički model s četiri parametra kojim se povezuju koncentracija ispitivane kemikalije i odgovor (obično u obliku sigmoidne krivulje) primjenom sljedeće jednadžbe:

$$Y = dno + \frac{(vrh - dno)}{1 + 10^{(lgEC_{50} - X)Hillov\ nagib}}$$

pri čemu je:

Y = odgovor (tj. RLU-ovi)

X = logaritam koncentracije

dno = najmanji odgovor

vrh = najveći odgovor

lg EC₅₀ (ili lg IC₅₀) = logaritam od X kao odgovor koji se nalazi točno između vrha i dna

Hillov nagib = kosina krivulje.

Modelom se računa najbolja vrijednost za parametre vrha, dna, Hillova nagiba te vrijednosti IC₅₀ i EC₅₀. Za izračun vrijednosti EC₅₀ i IC₅₀ treba upotrijebiti primjereni statistički softver (npr. statistički softver Graphpad Prism^R).

Utvrđivanje netipičnih vrijednosti

35. Dobro statističko prosuđivanje moglo bi se olakšati uključivanjem (ali ne i isključivo) Q testa (vidjeti protokole za agoniste i antagoniste (7.) o utvrđivanju „neupotrebljivih” jažica koje će se isključiti iz analiza podataka).
36. Za ponovljene uzorke referentne norme E2 (dva uzorka) bilo koja prilagođena vrijednost RLU za ponovljeni uzorak pri određenoj koncentraciji E2 smatra se netipičnom vrijednosti ako je za više od 20 % veća ili manja od prilagođene vrijednosti RLU te koncentracije iz baze prijašnjih podataka.

Prikupljanje i prilagodba podataka luminometra za ispitivanje za utvrđivanje raspona

37. Neobrađene podatke iz luminometra treba prenijeti u predložak proračunske tablice koja je izrađena za test. Treba utvrditi postoje li netipične podatkovne točke koje treba ukloniti. (Vidjeti kriterije prihvatljivosti ispitivanja za parametre koji se utvrđuju u analizama.) Trebalo bi provesti sljedeće izračune.

Agonist

- Korak 1. Izračunati srednju vrijednost za kontrolu s nosačem DMSO.
- Korak 2. Oduzeti srednju vrijednost kontrole s nosačem DMSO od vrijednosti svake jažice kako bi se podaci normalizirali.
- Korak 3. Izračunati srednji multiplikacijski faktor indukcije za referentnu normu (E2).
- Korak 4. Izračunati srednju vrijednost EC₅₀ za ispitivane kemikalije.

Antagonist

- Korak 1. Izračunati srednju vrijednost za kontrolu s nosačem DMSO.
- Korak 2. Oduzeti srednju vrijednost kontrole s nosačem DMSO od vrijednosti svake jažice kako bi se podaci normalizirali.
- Korak 3. Izračunati srednji multiplikacijski faktor smanjenja za referentnu normu (Ral/E2).
- Korak 4. Izračunati srednju vrijednost za referentnu normu E2.
- Korak 5. Izračunati srednju vrijednost IC₅₀ za ispitivane kemikalije.

Prikupljanje i prilagodba podataka luminometra za iscrpna ispitivanja

38. Neobrađene podatke iz luminometra treba prenijeti u predložak proračunske tablice koja je izrađena za test. Treba utvrditi postoje li netipične podatkovne točke koje treba ukloniti. (Vidjeti kriterije prihvatljivosti ispitivanja za parametre koji se utvrđuju u analizama.) Provode se sljedeći izračuni:

Agonist

- Korak 1. Izračunati srednju vrijednost za kontrolu s nosačem DMSO.
- Korak 2. Oduzeti srednju vrijednost kontrole s nosačem DMSO od vrijednosti svake jažice kako bi se podaci normalizirali.
- Korak 3. Izračunati srednji multiplikacijski faktor indukcije za referentnu normu (E2).
- Korak 4. Izračunati srednju vrijednost EC₅₀ za E2 i ispitivane kemikalije.
- Korak 5. Izračunati srednju prilagođenu vrijednost RLU za metoksiklor.

Antagonist

- Korak 1. Izračunati srednju vrijednost za kontrolu s nosačem DMSO.
- Korak 2. Oduzeti srednju vrijednost kontrole s nosačem DMSO od vrijednosti svake jažice kako bi se podaci normalizirali.
- Korak 3. Izračunati srednji multiplikacijski faktor indukcije za referentnu normu (Ral/E2).
- Korak 4. Izračunati srednju vrijednost IC₅₀ za Ral/E2 i ispitivane kemikalije.
- Korak 5. Izračunati srednju prilagođenu vrijednost RLU za tamoksifen.

Korak 6. Izračunati srednju vrijednost za referentnu normu E2.

Kriteriji za tumačenje podataka

39. Test VM7Luc ER TA dio je pristupa snage dokaza kako bi se pomoglo utvrditi prioritetne tvari za *in vivo* ispitivanje endokrine disrupcije. Dio ovog postupka za utvrđivanje prioriteta bit će razvrstavanje ispitivane kemikalije kao pozitivne ili negativne u pogledu agonističkog ili antagonističkog djelovanja na estrogenski receptor. Kriteriji za donošenje pozitivne i negativne odluke koji su upotrijebljeni u validacijskoj studiji testa VM7Luc ER TA opisani su u tablici 1.

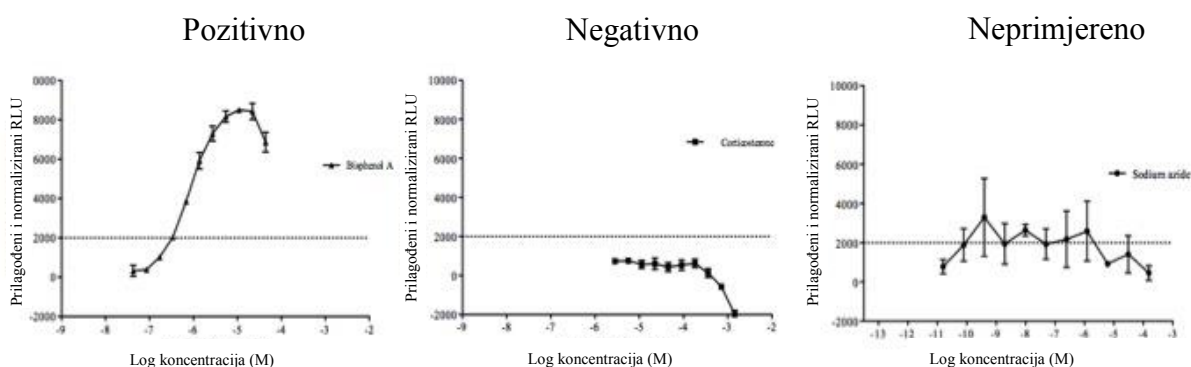
Tablica 1.: Kriteriji za donošenje pozitivne i negativne odluke

AGONISTIČKO DJELOVANJE	
Pozitivno	- Sve ispitivane kemikalije razvrstane kao <i>pozitivne</i> na agonističko djelovanje na estrogenski receptor trebaju imati krivulju koncentracija – odgovor koja se sastoji od osnovice, nakon koje dolazi pozitivan nagib i završava platoom ili najvišom točkom. U nekim se slučajevima mogu utvrditi samo dva svojstva (osnovica – nagib ili nagib – najviša točka). - Linija koja označava pozitivan nagib treba sadržavati najmanje tri točke sa stupcima pogreške koje se ne preklapaju (srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija). Isključene su točke koje čine osnovicu, ali linearni dio krivulje može uključivati najvišu točku ili prvu točku platoa. - Za razvrstavanje kemikalije kao pozitivne potrebna je amplituda odgovora (razlika između osnovice i najviše točke) od najmanje 20 % najveće vrijednosti za referentnu normu, E2 (tj. 2 000 RLU-ova ili više ako je najveća vrijednost odgovora referentnih normi [E2] prilagođena na 10 000 RLU-ova). - Ako je moguće, treba izračunati vrijednost EC₅₀ za svaku pozitivnu ispitivanu kemikaliju.
Negativno	Prosječni prilagođeni RLU za određenu koncentraciju jednak je ili manji od srednje vrijednosti RLU kontrole s DMSO-om uvećane za tri standardne devijacije RLU-a DMSO-a.
Neprimjereno	Podaci koji se ne mogu tumačiti kao valjani za pokazivanje prisutnosti ili izostanka aktivnosti zbog velikih kvalitativnih ili kvantitativnih ograničenja smatraju se neprimjerenima i ne mogu se koristiti za utvrđivanje je li ispitivana kemikalija pozitivna ili negativna. Kemikalije treba ponovno ispitati.
ANTAGONISTIČKO DJELOVANJE	

Pozitivno	- Podaci o ispitivanoj kemikaliji daju krivulju koncentracija – odgovor koja se sastoji od osnovice, nakon koje dolazi negativan nagib. - Linija koja označava negativan nagib treba sadržavati najmanje tri točke sa stupcima pogreške koje se ne preklapaju; isključene su točke koje čine osnovicu, ali linearni dio krivulje može uključivati prvu točku platoa. - Trebalo bi postojati smanjenje aktivnosti od najmanje 20 % najveće vrijednosti za referentnu normu, tvar Ral/E2 (tj. 8 000 RLU-ova ili manje ako je najveća vrijednost odgovora referentne norme [Ral/E2] prilagođena na 10 000 RLU-ova). - Najviše koncentracije ispitivane kemikalije koje nisu citotoksične trebale bi biti 1×10^{-5} M ili niže. - Ako je moguće, treba izračunati vrijednost IC_{50} za svaku pozitivnu ispitivanu kemikaliju.
Negativno	Sve podatkovne točke iznad su vrijednosti EC_{80} (80 % odgovora E2 ili 8 000 RLU-ova), pri koncentracijama nižima od $1,0 \times 10^{-5}$ M.
Neprimjereno	Podaci koji se ne mogu tumačiti kao valjani za pokazivanje prisutnosti ili izostanka aktivnosti zbog velikih kvalitativnih ili kvantitativnih ograničenja smatraju se neprimjerenima i ne mogu se koristiti za utvrđivanje je li ispitivana kemikalija pozitivna ili negativna. Kemikaliju treba ponovno ispitati.

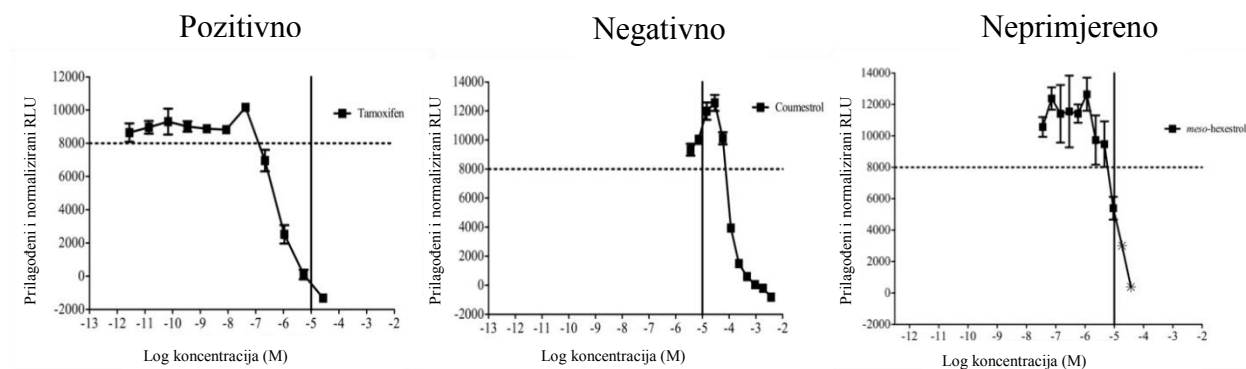
40. Ako je moguće, pozitivne rezultate karakterizirat će i razmjer učinka i koncentracija pri kojoj dolazi do učinka. Primjeri pozitivnih, negativnih i neprimjerenih podataka prikazani su na slikama 5. i 6.

Slika 5.: Primjeri agonista: pozitivni, negativni i neprimjereni podaci



Isprekidana linija pokazuje 20 % odgovora E2, 2 000 prilagođenih i normaliziranih RLU-ova.

Slika 6.: Primjeri antagonista: pozitivni, negativni i neprimjereni podaci



Isprekidana linija pokazuje 80 % odgovora Ral/E2, 8 000 prilagođenih i normaliziranih RLU-ova.

Puna linija pokazuje $1,00 \times 10^{-5}$ M. Da bi se odgovor smatrao pozitivnim, treba se nalaziti ispod linije 8 000 RLU-ova i pri koncentracijama nižima od $1,00 \times 10^{-5}$ M.

Koncentracije označene zvjezdicama na grafikonu mezo-heksestrola pokazuju rezultate vijabilnosti od „2” ili veće.

Rezultati ispitivanja za mezo-heksestrol smatraju se neprimjerenim podacima jer se do jedinog odgovora koji se nalazi ispod 8 000 RLU-ova dolazi pri $1,00 \times 10^{-5}$ M.

41. Vrijednosti EC_{50} i IC_{50} mogu se izračunati primjenom Hillove funkcije s četiri parametra (više pojedinosti potražiti u protokolima za agoniste i antagoniste (7.)). Ispunjavanje kriterija prihvatljivosti znači da sustav pravilno funkcionira, ali time se ne osigurava da će svaki pojedinačni ciklus dati točne rezultate. Ponavljanje rezultata prvog ciklusa najbolje je jamstvo toga da su dobiveni točni podaci (vidjeti stavak 19. odjeljka „SASTAVNICE ER TA TESTA”).

IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

42. Vidjeti stavak 20. odjeljka „SASTAVNICE ER TA TESTA”.

LITERATURA

1. ICCVAM. (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.
2. Monje P., Boland R. (2001). Subcellular Distribution of Native Estrogen Receptor α and β Isoforms in Rabbit Uterus and Ovary, *J. Cell Biochem.*, 82(3): 467.–479.
3. Pujol P., *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, *Cancer Res.*, 58(23): 5367.–5373.
4. Weihua Z., *et al.* (2000). Estrogen Receptor (ER) β , a Modulator of ER α in the Uterus, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(11): 936.–5941.
5. Balls M., *et al.* (2006). The Importance of Good Cell Culture Practice (GCCP), *ALTEX*, 23(Suppl): str. 270.–273.
6. Coecke S., *et al.* (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice: a Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, *Alternatives to Laboratory Animals*, 33: str. 261.–287.
7. ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report, The LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals, NIH Publication No 11-7850.
8. Rogers J.M., Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In Vitro Mol. Toxicol.*, 13(1):67.–82.
9. Escande A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol.*, 71(10):1459.–69.
10. Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, *Chemistry and Biology*, 17(6):646.–57.

11. Kuiper G.G, *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, *Endocrinology*, 139(10):4252.–63.
12. Geisinger, *et al.* (1989). Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, *Cancer* 63, 280.–288.
13. Baldwin, *et al.* (1998). BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Animal*, 34, 649.–654.
14. Li, Y., *et al.* (2014). Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, *Mol. Endo.* 28, 2072.–2081.
15. Rogers, J.M. and Denison, M.S. (2000). Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals, *In Vitro & Molec. Toxicol.* 13, 67.–82.

DODATAK 4.

TEST TRANSAKTIVACIJE STABILNO TRANSFICIRANOG LJUDSKOG ESTROGENSKOG RECEPTORA-A ZA OTKRIVANJE ESTROGENSKOG AGONISTIČKOG I ANTAGONISTIČKOG DJELOVANJA KEMIKA LIJA PRIMJENOM STANIČNE LINIJE ERA CALUX

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA (VIDJETI I OPĆI UVOD)

1. U testu transaktivacije ER α CALUX upotrebljava se humana stanična linija U2OS radi otkrivanja estrogenskog agonističkog i antagonističkog djelovanja kojim posreduje ljudski estrogenski receptor alfa (hER α). Validacijska studija biotesta sa stabilno transficiranim stanicama ER α CALUX koju je proveo BioDetection Systems BV (Amsterdam, Nizozemska) pokazala je relevantnost i pouzdanost testa za predviđenu svrhu (1.). Stanična linija ER α CALUX eksprimira samo stabilno transficirani humani ER α (2. i 3.).
2. Ovaj je test posebno osmišljen za otkrivanje transaktivacije kojom posreduje hER α mjerenjem bioluminiscencije kao krajnje točke. Bioluminiscencija se često upotrebljava u biotestovima zbog visokog omjera signala i šuma (4.).
3. Postoje izvješća o tome da koncentracije fitoestrogena veće od 1 μ M pretjerano aktiviraju reporterski gen za luciferazu, što dovodi do luminiscencije kojom ne posreduju receptori (5., 6. i 7.). Stoga veće koncentracije fitoestrogena ili drugih sličnih spojeva koji mogu pretjerano aktivirati ekspresiju luciferaze treba pažljivo ispitati testovima transaktivacije stabilno transficiranog estrogenskog receptora (vidjeti Dodatak 2.).
4. Prije upotrebe ovog testa u regulatorne svrhe treba pročitati odjeljke „OPĆI UVOD” i „SASTAVNICE ER TA TESTA”. Definicije i kratice upotrijebljene u ovoj ispitnoj metodi opisuju se u Dodatku 1.

NAČELO TESTA (VIDJETI I OPĆI UVOD)

5. Biotest se upotrebljava kako bi se procijenilo vezivanje estrogenskog receptora i liganda te kasnija translokacija kompleksa receptora i liganda u jezgru. U jezgri se kompleks receptora i liganda veže na specifične elemente DNK odgovora i transaktivira reporterski gen za luciferazu krijesnice, što dovodi do povećane stanične ekspresije enzima luciferaze. Nakon dodavanja supstrata luciferaze luciferinu, luciferin se pretvara u bioluminescentan proizvod. Proizvedeno svjetlo može se jednostavno uočiti i kvantificirati s pomoću luminometra.
6. U ispitnom sustavu upotrebljavaju se stabilno transficirane stanice ER α CALUX. Stanice ER α CALUX potječu od stanične linije U2OS humanog osteoblastičnog osteosarkoma. Humane stanice U2OS stabilno su transficirane konstruktima 3xHRE-TATA-Luc i pSG5-

neo-hER α upotrebom metode zajedničkog taloženja s kalcijevim fosfatom. Stanična linija U2OS odabrana je kao najbolji kandidat za reportersku staničnu liniju koja reagira na estrogen (i ostale steroidne hormone) na temelju opažanja da stanična linija U2OS pokazuje slabu endogenu aktivnost receptora ili je uopće ne pokazuje. Odsustvo endogenih receptora procijenjeno je upotrebom samo reporterskih plazmida za luciferazu, koji nisu pokazali nikakvu aktivnost kada su dodani ligandi na receptor. Nadalje, ta je stanična linija dala snažne odgovore posredovane hormonima kada su privremeno uvedeni srodni receptori (2., 3. i 8.).

7. Ispitivanje kemikalija radi utvrđivanja estrogene ili antiestrogene aktivnosti upotrebom stanične linije ER α CALUX uključuje ciklus predprobira i iscrpne cikluse. Tijekom ciklusa predprobira utvrđuju se topljivost, citotoksičnost i rafinirani raspon koncentracija ispitivanih kemikalija za iscrpno ispitivanje. Tijekom iscrpnih ciklusa rafinirani rasponi koncentracija ispitivanih kemikalija ispituju se biotestovima ER α CALUX, nakon čega slijedi razvrstavanje ispitivanih kemikalija u pogledu agonizma ili antagonizma.
8. Kriteriji za tumačenje podataka posebno su opisani u stavku 59. Ukratko, ispitivana kemikalija smatra se pozitivnom za agonizam ako barem dvije uzastopne koncentracije ispitivane kemikalije pokažu odgovor koji iznosi 10 % najvećeg odgovora referentne norme 17 β -estradiol ili više (PC₁₀). Ispitivana kemikalija smatra se pozitivnom za antagonizam ako barem dvije uzastopne koncentracije ispitivane kemikalije pokažu odgovor koji iznosi 80 % najvećeg odgovora referentne norme tamoksifena ili manje (PC₈₀).

POSTUPAK

Stanične linije

9. Za test bi se trebala upotrebljavati stabilno transficirana stanična linija U2OS ER α CALUX. Stanična linija može se dobiti od društva BioDetection Systems BV, Amsterdam, Nizozemska, sklapanjem tehničkog sporazuma o licenciranju.
10. Treba upotrebljavati samo stanične kulture u kojima nema mikoplazme. Šarže stanica koje se upotrebljavaju trebaju imati potvrdu da nisu kontaminirane mikoplazmom ili prije upotrebe treba provesti test na mikoplazmu. Za osjetljivo otkrivanje zaraze mikoplazmom treba upotrijebiti RT-PCR (lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu) (9.).

Stabilnost stanične linije

11. Kako bi se održali stabilnost i integritet stanica CALUX, stanice treba pohraniti u tekućem dušiku (–80 °C). Nakon odmrzavanja stanica kako bi se razvila nova kultura, stanice treba supkultivirati barem dva puta prije nego što ih se upotrijebi za procjenu estrogenskog agonističkog i antagonističkog djelovanja kemikalija. Stanice se ne bi se trebale supkultivirati za više od 30 pasaža.

12. Kako bi se pratila stabilnost stanične linije tijekom vremena, treba potvrditi osjetljivost ispitnog sustava za agonizam i antagonizam procjenom vrijednosti EC_{50} ili IC_{50} referentne norme. Osim toga, treba pratiti relativnu indukciju pozitivnog kontrolnog uzorka (PC) i negativnog kontrolnog uzorka (NC). Rezultati bi trebali biti u skladu s kriterijima prihvatljivosti za agonistički (tablica 3.C) ili antagonistički biotest $ER\alpha$ CALUX (tablica 4.C). Referentne norme, pozitivne i negativne kontrole navedene su u tablici 1. za agonistički oblik i tablici 2. za antagonistički oblik.

Stanična kultura i uvjeti nasadivanja

13. Stanice U2OS treba uzgajati u mediju za uzgoj (medij DMEM/F12 (1 : 1) s fenol crvenom kao indikatorom pH-vrijednosti, obogaćenom fetalnim goveđim serumom (7,5 %), neesencijalnim aminokiselinama (1 %), s 10 jedinica/ml penicilina, streptomicina i geneticina (G-418) kao markerom za selekciju). Stanice treba staviti u inkubator CO_2 (5 % CO_2) na 37 °C uz 100-postotnu vlažnost. Kada stanice dosegnu konfluenciju od 85 do 95 %, treba ih supkultivirati ili pripremiti za nasadivanje na mikrotitracijske ploče s 96 jažica. U potonjem slučaju, stanice treba ponovno suspendirati u koncentraciji 1×10^5 stanica/ml u mediju za test bez estrogena (DMEM/F12 (1 : 1) bez fenol crvene, obogaćenom fetalnim goveđim serumom tretiranim ugljenom premazanim dekstranom (5 % v/v), neesencijalnim aminokiselinama (1 % v/v), s 10 jedinica/ml penicilina i streptomicina) te nasaditi u jažice mikrotitracijskih ploča s 96 jažica (100 μ l homogenizirane suspenzije stanica). Stanice treba predinkubirati u inkubatoru CO_2 (5 % CO_2 , 37 °C, 100-postotna vlažnost) 24 sata prije izlaganja. U plastičnoj opremi ne smije biti estrogena.

Kriteriji prihvatljivosti

14. Agonističko i antagonističko djelovanje ispitivanih kemikalija ispituju se u nizovima ispitivanja. Niz ispitivanja sastoji se od najviše šest mikrotitracijskih ploča. Svaki niz ispitivanja sadržava najmanje jednu cijelu seriju razrjeđivanja referentne norme, pozitivan kontrolni uzorak, negativan kontrolni uzorak i kontrole s otapalom. Na slikama 1. i 2. prikazan je raspored ploča za nizove ispitivanja agonizma i antagonizma.
15. Svako razrjeđivanje referentnih normi, ispitivane kemikalije, sve kontrole s otapalom te pozitivne i negativne kontrole treba analizirati u tri ponavljanja. Svaka analiza triju ponavljanja treba ispuniti zahtjeve navedene u tablici 3.A i tablici 4.A.
16. Cijela serija razrjeđivanja referentne norme (17β -estradiol za agonizam; tamoksifen za antagonizam) mjeri se na prvoj ploči u svakom nizu ispitivanja. Kako bi se rezultati analize preostalih pet mikrotitracijskih ploča mogli usporediti s prvom mikrotitracijskom pločom koja sadržava cijelu krivulju koncentracija – odgovor referentne norme, sve bi ploče trebale sadržavati tri kontrolna uzorka: kontrolu s otapalom, najvišu koncentraciju ispitane referentne norme i približnu koncentraciju EC_{50} (agonizam) ili IC_{50} (antagonizam) referentne

norme. Omjer prosječnih kontrolnih uzoraka na prvoj ploči i preostalih pet ploča treba ispunjavati zahtjeve navedene u tablici 3.C (agonizam) ili tablici 4.C (antagonizam).

17. Za sve mikrotitracijske ploče u nizu ispitivanja računa se z-faktor (10.). Z-faktor treba izračunati upotrebom odgovora pri najvišoj i najnižoj koncentraciji referentne norme. Mikrotitracijska ploča smatra se valjanom ako ispunjava zahtjeve kako su navedeni u tablici 3.C (agonizam) ili tablici 4.C (antagonizam).
18. Referentna norma treba pokazati sigmoidnu krivulju doza – odgovor. EC₅₀ ili IC₅₀ izvedeni iz odgovora serije razrjeđivanja referentne norme trebaju ispunjavati zahtjeve kako su navedeni u tablici 3.C (agonizam) ili tablici 4.C (antagonizam).
19. Svaki niz ispitivanja treba sadržavati pozitivni i negativni kontrolni uzorak. Izračunana relativna indukcija i pozitivnog i negativnog kontrolnog uzorka treba ispunjavati zahtjeve kako su navedeni u tablici 3.C (agonizam) ili tablici 4.C (antagonizam).
20. Tijekom svih mjerenja faktor indukcije najviše koncentracije referentne norme treba izmjeriti tako da se prosječni najviši odgovor u obliku relativne jedinice svjetlosti (RLU) na referentnu normu 17β-estradiol podijeli prosječnim odgovorom u obliku RLU-a na referentnu kontrolu s otapalom. Taj faktor indukcije treba ispuniti minimalne zahtjeve za multiplikacijski faktor indukcije kako je navedeno u tablici 3.C (agonizam) ili tablice 4.C (antagonizam).
21. Valjanima se smatraju samo mikrotitracijske ploče koje ispunjavaju sve prethodno navedene kriterije prihvatljivosti i samo se one mogu koristiti za procjenu odgovora ispitivanih kemikalija.
22. Kriteriji prihvatljivosti primjenjivi su i na predprobir i na iscrpne cikluse.

Tablica 1.: Koncentracije referentne norme, pozitivne kontrole (PC) i negativne kontrole (NC) za agonistički biotest CALUX

	Tvar	CAS br.	Raspon ispitivanja (M)
Referentna norma	17β-estradiol	50-28-2	$1,0 * 10^{-13} - 1,0 * 10^{-10}$
Pozitivna kontrola (PC)	17α-metiltestosteron	58-18-4	$3,0 * 10^{-06}$
Negativna kontrola (NC)	kortikosteron	50-22-6	$1,0 * 10^{-08}$

Tablica 2.: Koncentracije referentne norme, pozitivne kontrole (PC) i negativne kontrole (NC) za antagonistički biotest CALUX

	Tvar	CAS br.	Raspon ispitivanja (M)

Referentna norma	tamoksifen	10540-29-1	$3,0 * 10^{-09} - 1,0 * 10^{-05}$
Pozitivna kontrola (PC)	4-hidroksitamoksifen	68047-06-3	$1,0 * 10^{-09}$
Negativna kontrola (NC)	resveratrol	501-36-0	$1,0 * 10^{-05}$

Tablica 3.: Kriteriji prihvatljivosti za agonistički biotest ER α CALUX

A – pojedinačni uzorci na ploči		Kriterij
1	Najveći % standardne devijacije jažica s tri ponavljanja (za NC, PC, svako razrjeđivanje ispitivane kemikalije i referentne norme, osim C0)	< 15 %
2	Najveći % standardne devijacije jažica s tri ponavljanja (za kontrole s otapalom referentne norme i ispitivane kemikalije (C0, SC))	< 30 %
3	Najveće propuštanje LDH-a, kao mjera citotoksičnosti	< 120 %
B – unutar jedne mikrotitracijske ploče		
4	Omjer kontrole s otapalom referentne norme (C0; ploča 1) i kontrole s otapalom ispitivane kemikalije (SC; od ploče 2 do ploče x)	0,5 do 2,0
5	Omjer približ. vrijednosti EC50 i najviših koncentracija referentne norme na ploči 1 i približ. vrijednosti EC50 i najviših koncentracija referentne norme na ploči 2 do ploče x (C4, C8)	0,70 do 1,30
6	Z-faktor za svaku ploču	> 0,6
C – unutar jednog niza analiza (sve ploče u jednom nizu)		
7	Sigmoidna krivulja referentne norme	Da (17 β -estradiol)
8	Raspon EC50 referentne norme 17 β -estradiol	$4 * 10^{-12} - 4 * 10^{-11}$ M
9	Najmanji multiplikacijski faktor indukcije najviše koncentracije 17 β -estradiola, s obzirom na kontrolu s otapalom referentne norme	5
10	Relativna indukcija (%) PC-a	> 30 %
11	Relativna indukcija (%) NC-a	< 10 %

Približ. približno; PC: pozitivna kontrola; NC: negativna kontrola; SC: kontrola s otapalom ispitivane kemikalije; C0: kontrola s otapalom referentne norme; SD: standardna devijacija; LDH: laktat dehidrogenaza.

Tablica 4.: Kriteriji prihvatljivosti za antagonistički biotest ER α CALUX

A – pojedinačni uzorci na ploči	Kriterij

1	Najveći % standardne devijacije trostrukih jažica (za NC, PC, svako razrjeđivanje ispitivane kemikalije i referentne norme, kontrolu s otapalom (C0))	< 15 %
2	Najveći % standardne devijacije trostrukih jažica (za kontrolu s nosačem (VC) i najvišu koncentraciju referentne norme (C8))	< 30 %
3	Najveće propuštanje LDH-a, kao mjera citotoksičnosti	< 120 %

B – unutar jedne mikrotitracijske ploče

4	Omjer kontrole s otapalom referentne norme (C0; ploča 1) i kontrole s otapalom ispitivane kemikalije (SC; od ploče 2 do ploče x)	0,70 do 1,30
5	Omjer približ. vrijednosti IC50 koncentracija referentne norme na ploči 1 i približ. vrijednosti IC50 koncentracija referentne norme na ploči 2 do ploče x (C4)	0,70 do 1,30
6	Omjer najviših koncentracija referentne norme na ploči 1 i najviših koncentracija referentne norme na ploči 2 do ploče x (C8)	0,50 do 2,0
7	Z-faktor za svaku ploču	> 0,6

C – unutar jednog niza analiza (sve ploče u jednom nizu)

8	Sigmoidna krivulja referentne norme	Da (tamoksifen)
9	Raspon IC50 referentne norme (tamoksifen)	$1 \cdot 10^{-8} - 1 \cdot 10^{-7}$ M
10	Najmanji multiplikacijski faktor indukcije kontrole s otapalom referentne norme, s obzirom na najvišu koncentraciju tamoksifena	2,5
11	Relativna indukcija (%) PC-a	< 70 %
12	Relativna indukcija (%) NC-a	> 85 %

Približ. približno; PC: pozitivna kontrola; NC: negativna kontrola; VC: kontrola s nosačem (kontrola s otapalom bez fiksne koncentracije referentne norme agonista); SC: kontrola s otapalom ispitivane kemikalije; C0: kontrola s otapalom referentne norme; SD: standardna devijacija; LDH: laktat dehidrogenaza.

Kontrola s otapalom/nosačem, referentne norme, pozitivne kontrole, negativne kontrole

23. I za ciklus predprobira i za iscrpne cikluse treba upotrebljavati istu kontrolu s otapalom/nosačem, referentne norme, pozitivne i negativne kontrole. Osim toga, koncentracija referentnih normi, pozitivnih i negativnih kontrola treba biti ista.

Kontrola s otapalom

24. Otapalo koje se upotrebljava za otapanje ispitivanih kemikalija treba ispitati kao kontrolu s otapalom. Tijekom validacije biotesta ER α CALUX kao nosač se upotrebljavao dimetilsulfoksid (DMSO, 1 % (v/v); CAS br. 67-68-5). Ako se upotrebljava otapalo koje nije DMSO, sve referentne norme, kontrole i ispitivane kemikalije treba ispitati u istom nosaču. Potrebno je napomenuti da kontrola s otapalom za antagonističke studije sadržava fiksnu koncentraciju 17 β -estradiola – referentne norme agonista (približno koncentracija EC₅₀). Kako bi se ispitalo otapalo koje se upotrebljava u antagonističkim studijama, treba pripremiti i ispitati kontrolu s nosačem.

Kontrola s nosačem (antagonizam)

25. Kod ispitivanja antagonizma medij za test obogaćuje se fiksnom koncentracijom 17 β -estradiola – referentne norme agonista (približno koncentracija EC₅₀). Kako bi se ispitalo otapalo koje se upotrebljava za otapanje ispitivanih kemikalija za antagonizam, treba pripremiti medij za test bez fiksne koncentracije 17 β -estradiola – referentne norme agonista. Taj se kontrolni uzorak označava kao kontrola s nosačem. Tijekom validacije biotesta ER α CALUX kao nosač se upotrebljavao dimetilsulfoksid (DMSO, 1 % (v/v); CAS br. 67-68-5). Ako se upotrebljava otapalo koje nije DMSO, sve referentne norme, kontrole i ispitivane kemikalije treba ispitati u istom nosaču.

Referentne norme

26. Referentnu normu agonista čini 17 β -estradiol (tablica 1.). Referente norme sastoje se od serije razrjeđivanja osam koncentracija 17 β -estradiola ($1,0 \cdot 10^{-13}$, $3,0 \cdot 10^{-13}$, $1,0 \cdot 10^{-12}$, $3,0 \cdot 10^{-12}$, $6,0 \cdot 10^{-12}$, $1,0 \cdot 10^{-11}$, $3,0 \cdot 10^{-11}$, $1,0 \cdot 10^{-10}$ M).
27. Referentnu normu antagonista čini tamoksifen (tablica 2.). Referente norme sastoje se od serije razrjeđivanja osam koncentracija tamoksifena ($3,0 \cdot 10^{-9}$, $1,0 \cdot 10^{-8}$, $3,0 \cdot 10^{-8}$, $1,0 \cdot 10^{-7}$, $3,0 \cdot 10^{-7}$, $1,0 \cdot 10^{-6}$, $3,0 \cdot 10^{-6}$, $1,0 \cdot 10^{-5}$ M). Svaka koncentracija referentne norme antagonista inkubira se zajedno s fiksnom koncentracijom 17 β -estradiola – referentnom normom agonista ($3,0 \cdot 10^{-12}$ M).

Pozitivna kontrola

28. Pozitivnu kontrolu za agonističke studije čini 17 α -metiltestosteron (tablica 1.).

29. Pozitivnu kontrolu za antagonističke studije čini 4-hidroksitamoksifen (tablica 2.). Pozitivna kontrola antagonista inkubira se zajedno s fiksnom koncentracijom 17β -estradiola – referentnom normom agonista ($3,0 \cdot 10^{-12}$ M).

Negativna kontrola

30. Negativnu kontrolu za agonističke studije čini kortikosteron (tablica 1.).
31. Negativnu kontrolu za antagonističke studije čini resveratrol (tablica 2.). Negativna kontrola antagonista inkubira se zajedno s fiksnom koncentracijom 17β -estradiola – referentnom normom agonista ($3,0 \cdot 10^{-12}$ M).

Dokazivanje osposobljenosti laboratorija (vidjeti stavak 14. i tablice 3. i 4. u odjeljku „SASTAVNICE ER TA TESTA” ove ispitne metode)

Nosač

32. Otapalo koje se upotrebljava za otapanje ispitivanih kemikalija treba potpuno otopiti ispitivanu kemikaliju i mora se moći miješati s medijem za stanice. Primjerena su otapala DMSO, voda i etanol (čistoće od 95 % do 100 %). Ako se kao otapalo upotrebljava DMSO, najviša koncentracija DMSO-a tijekom inkubacije ne treba biti veća od 1 % (v/v). Otapalo prije upotrebe treba ispitati kako bi se utvrdilo da nije citotoksično i da ne utječe na uspješnost testa.

Priprema referentnih normi, pozitivnih kontrola, negativnih kontrola i ispitivanih kemikalija

33. Referentne norme, pozitivne kontrole, negativne kontrole i ispitivane kemikalije otapaju se u 100-postotnom DMSO-u (ili primjerenom otapalu). U istom otapalu zatim treba pripremiti i primjerena (serijska) razrjeđivanja. Prije otapanja sve tvari treba ostaviti tako da se njihova temperatura izjednači sa sobnom temperaturom. U svježe pripremljenim glavnim otopinama referentnih normi, pozitivnih kontrola, negativnih kontrola i ispitivanih kemikalija ne smije biti primjetan talog ili zamućenje. Uzorci referentne norme i kontrole mogu se pripremati zbirno. Prije svakog pokusa treba pripremiti glavne otopine ispitivanih kemikalija. Za svaki pokus treba pripremiti svježa konačna razrjeđivanja referentnih normi, pozitivnih kontrola, negativnih kontrola i ispitivanih kemikalija te ih treba upotrijebiti u roku od 24 sata od pripreme.

Topljivost, citotoksičnost i utvrđivanje raspona

34. Tijekom ciklusa predprobira utvrđuje se topljivost ispitivanih kemikalija u odabranom otapalu. Priprema se najviša koncentracija glavne otopine od 0,1 M. Ako se pri toj koncentraciji pojave poteškoće s topljivosti, treba pripremiti glavne otopine niže koncentracije dok se ispitivane kemikalije potpuno ne otope. Tijekom ciklusa predprobira ispituju se serijska razrjeđivanja ispitivane kemikalije u omjeru 1 : 10. Najveća koncentracija u testu za ispitivanje agonista i antagonista iznosi 1 mM. Nakon predprobira izvodi se

primjereni rafinirani raspon koncentracija za ispitivanje kemikalije koji treba ispitati tijekom iscrpnih ciklusa. U iscrpnom ispitivanju trebaju se ispitati razrjeđivanja od 1x, 3x, 10x, 30x, 100x, 300x, 1 000x i 3 000x.

35. Ispitivanje citotoksičnosti uključeno je u protokol za test agonista i antagonista (11.). Ispitivanje citotoksičnosti uključeno je i u ciklus predprobira i u iscrpne cikluse. Metoda upotrijebljena za procjenu citotoksičnosti tijekom validacije biotesta ER α CALUX bio je test propuštanja laktat dehidrogenaze (LDH) u kombinaciji s kvalitativnim vizualnim pregledom stanica (vidjeti Dodatak 4.1.) nakon izlaganja ispitivanim kemikalijama. Međutim, za utvrđivanje citotoksičnosti mogu se upotrijebiti druge kvantitativne metode (npr. kolorimetrijski test na temelju tetrazolija (MTT) ili biotest citotoksičnosti CALUX). Općenito, koncentracije ispitivane kemikalije koje pokazu smanjenje vijabilnosti stanica veće od 20 % smatraju se citotoksičnima i stoga se ne mogu upotrijebiti za procjenu podataka. Kad je riječ o testu propuštanja LDH-a, koncentracija ispitivane kemikalije smatra se citotoksičnom ako je postotak propuštanja LDH-a veći od 120 %.

Izlaganje ispitivanoj kemikaliji i organizacija testne ploče

36. Nakon tripsinizacije konfluentne tikvice uzgojenih stanica, stanice se ponovno suspendiraju pri koncentraciji od 1×10^5 stanica/ml u mediju za test bez estrogena. Sto μ l stanica koje su ponovno suspendirane nasađuju se u unutarnje jažice mikrotitracijske ploče s 96 jažica. Vanjske jažice pune se s 200 μ l fiziološke otopine puferirane fosfatnim puferom (PBS) (vidjeti slike 1. i 2.). Nasađene stanice predinkubiraju se 24 sata u inkubatoru CO₂ (5 % CO₂, 37 °C, 100-postotna vlažnost).
37. Nakon predinkubacije ploče se pregledavaju kako bi se vizualno utvrdile citotoksičnost (vidjeti Dodatak 4.1.), kontaminacija i konfluencija. Za ispitivanje se koriste samo ploče na kojima nema vizualnih znakova citotoksičnosti, kontaminacije i kod kojih konfluencija iznosi najmanje 85 %. Medij iz unutarnjih jažica pažljivo se uklanja i zamjenjuje s 200 μ l medija za test bez estrogena koji sadržava primjerene serije razrjeđivanja referentnih normi, ispitivanih kemikalija, pozitivnih kontrola, negativnih kontrola i kontrola s otapalom (tablica 5.: studije agonista; tablica 6.: studije antagonista). Sve referentne norme, ispitivane kemikalije, pozitivne kontrole, negativne kontrole i kontrole s otapalom ispituju se u tri ponavljanja. Na slici 1. prikazan je raspored na ploči za ispitivanje agonista. Na slici 2. prikazan je raspored na ploči za ispitivanje antagonista. Raspored na ploči za predprobir isti je kao i za iscrpno ispitivanje. Kod ispitivanja antagonista sve unutarnje jažice, osim jažica za kontrolu s nosačem (VC), sadržavaju i fiksnu koncentraciju 17 β -estradiola – referentne norme agonista ($3,0 \times 10^{-12}$ M). Treba napomenuti da referentne norme C8 i C4 treba dodati svakoj ploči s ispitivanom kemikalijom.
38. Nakon izlaganja stanica svim kemikalijama, mikrotitracijske ploče s 96 jažica treba inkubirati još 24 sata u inkubatoru CO₂ (5 % CO₂, 37 °C, 100-postotna vlažnost).

Slika 1.: Raspored na mikrotitracijskoj ploči s 96 jažica za predprobir i procjenu agonističkog učinka

Ploča 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												

Kasnije ploče

	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 = otapalo referentne norme.

C(1 – 8) = serije razrjeđivanja (1 – 8, koncentracije od niže do više) referentne norme.

PC = pozitivna kontrola.

NC = negativna kontrola.

TCx-(1 – 8) = razrjeđivanja (1 – 8, koncentracije od niže do više) ispitivane kemikalije za ciklus predprobira i procjenu agonističkog učinka ispitivane kemikalije x.

SC = kontrola s otapalom ispitivane kemikalije (po mogućnosti isto otapalo kao i pod C0, ali moguće iz druge šarže).

Siva polja: = vanjske jažice, napunjene s 200 µl PBS-a.

Slika 2.: Raspored na mikrotitracijskoj ploči s 96 jažica za antagonistički predprobir i procjenu antagonističkog učinka

Ploča 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												

Kasnije ploče

	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 = otapalo referentne norme.

C(1 – 8) = serije razrjeđivanja (1 – 8, koncentracije od niže do više) referentne norme.

NC = negativna kontrola.

PC = pozitivna kontrola.

TCx-(1 – 8) = razrjeđivanja (1 – 8, koncentracije od niže do više) ispitivane kemikalije za ciklus predprobira i procjenu agonističkog učinka ispitivane kemikalije x.

SC = kontrola s otapalom ispitivane kemikalije (po mogućnosti isto otapalo kao i pod C0, ali moguće iz druge šarže).

VC = kontrola s nosačem (kontrola s otapalom bez fiksne koncentracije referentne norme agonista – 17β-estradiola).

Siva polja: = vanjske jažice, napunjene s 200 μl PBS-a.

Napomena: sve unutarnje jažice, osim jažica za kontrolu s nosačem (VC), sadržavaju i fiksnu koncentraciju 17β-estradiola – referentne norme agonista ($3,0 \cdot 10^{-12}$ M).

Mjerenje luminiscencije

39. Mjerenje luminiscencije detaljno je opisano u protokolu za test agonista i antagonista (10.). Medij treba ukloniti iz jažica i stanice treba lizirati nakon 24 sata inkubacije kako bi se otvorila stanična membrana i omogućilo mjerenje aktivnosti luciferaze.

40. Kod mjerenja luminiscencije za taj je postupak potreban luminometar s dva ubrizgavača. Reakcija luciferaze pokreće se ubrizgavanjem supstrata luciferina. Reakcija se zaustavlja dodavanjem 0,2 M NaOH. Reakcija se zaustavlja kako bi se spriječilo prenošenje luminiscencije iz jedne jažice u drugu.

41. Emisija svjetlosti iz svake jažice izražava se kao relativna jedinica svjetlosti (RLU) po jažici.

Ciklus predprobira

42. Rezultati analize predprobira upotrebljavaju se za utvrđivanje rafiniranog raspona koncentracija ispitivanih kemikalija za iscrpna ispitivanja. Procjena rezultata analize predprobira i utvrđivanja rafiniranog raspona koncentracije ispitivanih kemikalija za iscrpno ispitivanje detaljno je opisana u protokolu za test agonista i antagonista (10.). Ovdje je naveden kratak sažetak postupaka za utvrđivanje raspona koncentracije ispitivanih kemikalija za ispitivanje agonista i antagonista. Smjernice o dizajnu serijskog razrjeđivanja potražiti u tablicama 5. i 6.

Odabir koncentracija za procjenu agonističkih učinaka

43. Tijekom ciklusa predprobira ispitivane kemikalije treba ispitati upotrebom serija razrjeđivanja kako je prikazano u tablicama 5. (agonizam) i 6. (antagonizam). Sve

koncentracije treba ispitati u trostrukim jažicama u skladu s rasporedom na ploči kako je prikazano na slici 1. (agonizam) ili slici 2. (antagonizam).

44. Valjanima se smatraju samo rezultati analize koji ispunjavaju kriterije prihvatljivosti (tablica 3.) i samo se oni mogu koristiti za procjenu odgovora ispitivanih kemikalija. Ako jedna mikrotitracijska ploča ili više mikrotitracijskih ploča u analitičkoj seriji ne ispune kriterije prihvatljivosti, te mikrotitracijske ploče treba ponovno analizirati. Ako prva ploča koja sadržava cijelu seriju razrjeđivanja referentne norme ne ispuni kriterije prihvatljivosti, mora se ponovno analizirati cijeli niz ispitivanja (šest ploča).
45. Treba prilagoditi početne raspone koncentracija ispitivanih kemikalija i ponoviti ciklus predprobira:
- ako se uoči citotoksičnost. Postupak predprobira treba ponoviti s nižim koncentracijama ispitivane kemikalije koje nisu toksične,
 - ako predprobir ispitivane kemikalije ne pokaže cijelu krivulju doza – odgovor jer ispitane koncentracije uzrokuju najveću indukciju. Ciklus predprobira treba ponoviti s nižim koncentracijama ispitivane kemikalije.
46. Kada se opazi valjani odgovor na dozu, treba odabrati (najnižu) koncentraciju pri kojoj se opazi najveća indukcija i koja ne pokazuje citotoksičnost. Najviša koncentracija ispitivane kemikalije koju treba ispitati u iscrpnim ciklusima treba biti tri puta veća od te odabrane koncentracije.
47. Treba pripremiti cijelu rafiniranu seriju razrjeđivanja ispitivane kemikalije u skladu s koracima razrjeđivanja kako su navedeni u tablici 5., počevši od najviše koncentracije kako je prethodno utvrđena.
48. Ispitivanu kemikaliju koja ne izazove nikakav agonistički učinak treba ispitati u iscrpnim ciklusima, počevši od najviše koncentracije koja nije citotoksična, a koja je utvrđena tijekom predprobira.

Odabir koncentracija za procjenu antagonističkih učinaka

49. Valjanima se smatraju samo rezultati analize koji ispunjavaju kriterije prihvatljivosti (tablica 4.) i samo se oni mogu koristiti za procjenu odgovora ispitivanih kemikalija. Ako jedna mikrotitracijska ploča ili više mikrotitracijskih ploča u analitičkoj seriji ne ispune kriterije prihvatljivosti, te mikrotitracijske ploče treba ponovno analizirati. Ako prva ploča koja sadržava cijelu seriju razrjeđivanja referentne norme ne ispuni kriterije prihvatljivosti, mora se ponovno analizirati cijeli niz ispitivanja (šest ploča).
50. Treba prilagoditi početne raspone koncentracija ispitivanih kemikalija i ponoviti ciklus predprobira:

- ako se uoči citotoksičnost. Postupak predprobira treba ponoviti s nižim koncentracijama ispitivane kemikalije koje nisu toksične,
 - ako predprobir ispitivane kemikalije ne pokaže cijelu krivulju doza – odgovor jer ispitane koncentracije uzrokuju najveću inhibiciju. Predprobir treba ponoviti s nižim koncentracijama ispitivane kemikalije.
51. Kada se pronade valjani odgovor na dozu treba odabrati (najnižu) koncentraciju pri kojoj se uoči najveća inhibicija i koja ne pokazuje citotoksičnost. Najviša koncentracija ispitivane kemikalije koju treba ispitati u iscrpnim ciklusima treba biti tri puta veća od te odabrane koncentracije.
52. Treba pripremiti cijelu rafiniranu seriju razrjeđivanja ispitivane kemikalije u skladu s koracima razrjeđivanja kako su navedeni u tablici 6., počevši od najviše koncentracije kako je prethodno utvrđena.
53. Ispitivane kemikalije koje ne izazovu nikakve antagonističke učinke treba ispitati u iscrpnim ciklusima, počevši od najviše koncentracije koja nije citotoksična, a koja je ispitana tijekom predprobira.

Iscrpní ciklusi

54. Nakon odabira rafiniranih raspona koncentracija ispitivane kemikalije treba iscrpno ispitati upotrebom serija razrjeđivanja kako je prikazano u tablicama 5. (agonizam) i 6. (antagonizam). Sve koncentracije treba ispitati u trostrukim jažicama u skladu s rasporedom na ploči kako je prikazano na slici 1. (agonizam) ili slici 2. (antagonizam).
55. Valjanima se smatraju samo rezultati analize koji ispunjavaju kriterije prihvatljivosti (tablice 3. i 4.) i samo se oni mogu koristiti za procjenu odgovora ispitivanih kemikalija. Ako jedna mikrotitracijska ploča ili više mikrotitracijskih ploča u analitičkoj seriji ne ispune kriterije prihvatljivosti, te mikrotitracijske ploče treba ponovno analizirati. Ako prva ploča koja sadržava cijelu seriju razrjeđivanja referentne norme ne ispuni kriterije prihvatljivosti, mora se ponovno analizirati cijeli niz ispitivanja (šest ploča).

Tablica 5.: Koncentracija i razrjeđivanja referentnih normi, kontrola i ispitivanih kemikalija koje se koriste za ispitivanje agonista

Referentni 17β- estradiol konc. (M)		TCx – ciklus predprobira – razrjeđivanje		TCx – iscrpni ciklus – razrjeđivanje		Kontrole konc. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	PC	3,0 * 10 ⁻⁰⁶
C1	1,0 * 10 ⁻¹³	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	NC	1,0 * 10 ⁻⁰⁸
C2	3,0 * 10 ⁻¹³	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	1,0 * 10 ⁻¹²	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	3,0 * 10 ⁻¹²	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x		

C5	$6,0 * 10^{-12}$	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x		
C6	$1,0 * 10^{-11}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x		
C7	$3,0 * 10^{-11}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x		
C8	$1,0 * 10^{-10}$						

TCx – ispitivana kemikalija x

PC – pozitivna kontrola (17 α -metiltestosteron)

NC – negativna kontrola (kortikosteron)

C0 – kontrola s otapalom referentne norme

SC – kontrola s otapalom ispitivane kemikalije

Tablica 6.: Koncentracija i razrjeđivanja referentnih normi, kontrola i ispitivanih kemikalija koje se koriste za ispitivanje antagonista

Referentni tamoksifen konc. (M)		TCx – ciklus predprobira – razrjeđivanje		TCx – iscrpni ciklus – razrjeđivanje		Kontrole konc. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	PC	$1,0 * 10^{-09}$
C1	$3,0 * 10^{-09}$	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	NC	$1,0 * 10^{-05}$
C2	$1,0 * 10^{-08}$	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	$3,0 * 10^{-08}$	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	$1,0 * 10^{-07}$	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x	Obogaćeni agonist konc. (M)	
C5	$3,0 * 10^{-07}$	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x		
C6	$1,0 * 10^{-06}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x		
C7	$3,0 * 10^{-06}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x	17 β - estradiol	$3,0 * 10^{-12}$
C8	$1,0 * 10^{-05}$						

TCx – ispitivana kemikalija x

PC – pozitivna kontrola (4-hidroksitamoksifen)

NC – negativna kontrola (resveratrol)

C0 – kontrola s otapalom referentne norme

SC – kontrola s otapalom ispitivane kemikalije

VC – kontrola s nosačem (ne sadržava fiksnu koncentraciju 17 β -estradiola – referentne norme agonista ($3,0 * 10^{-12}$ M))

Prikupljanje i analiza podataka

56. Nakon ciklusa predprobira i iscrpnih ciklusa treba utvrditi EC₁₀, EC₅₀, PC₁₀, PC₅₀ i najveću indukciju (TCx_{max}) ispitivane kemikalije za agonističko ispitivanje. Za antagonističko ispitivanje treba izračunati IC₂₀, IC₅₀, PC₈₀, PC₅₀ i najmanju indukciju (TCx_{min}). Na slikama 3. (agonizam) i 4. (antagonizam) nalazi se grafički prikaz tih parametara. Potrebni parametri računaju se na temelju relativne indukcije svake ispitivane kemikalije (u odnosu na najveću indukciju referentne norme (= 100 %)). Za procjenu podataka treba upotrebljavati nelinearnu regresiju (varijabilan nagib, četiri parametra) prema sljedećoj jednadžbi:

$$Y = dno + \frac{(vrh - dno)}{(1 + 10^{((lgEC_{50} - X) * Hillov \text{ nagib}))}}$$

pri čemu je:

X = log doze ili koncentracije

Y = odgovor (relativna indukcija (%))

Vrh = najveća indukcija (%)

Dno = najmanja indukcija (%)

LogEC₅₀ = log koncentracije pri kojoj se uočava 50 % najvećeg odgovora

Hillov nagib = faktor nagiba Hillova nagiba

57. Neobrađene podatke iz luminometra, izražene kao relativne jedinice svjetlosti (RLU-ovi), treba prenijeti u proračunsku tablicu za analizu podataka koja je izrađena za cikluse predprobira i iscrpne cikluse. Neobrađeni podaci trebaju ispunjavati kriterije prihvatljivosti kako su navedeni u tablicama 3.A i 3.B (agonizam) ili 4.A i 4.B (antagonizam). Ako neobrađeni podaci ispunjavaju kriterije prihvatljivosti, provode se sljedeći koraci za izračun kako bi se utvrdili potrebni parametri.

Agonizam

- Oduzeti prosječni RLU kontrole s otapalom referentne norme od svakog sirovog podatka iz analize referentnih normi.
- Oduzeti prosječni RLU za kontrolu s otapalom ispitivane kemikalije od svakog sirovog podatka iz analize ispitivanih kemikalija.
- Izračunati relativnu indukciju svake koncentracije referentne norme. Postaviti indukciju najviše koncentracije referentne norme na 100 %.
- Izračunati relativnu indukciju svake koncentracije ispitivane kemikalije u usporedbi s najvišom koncentracijom referentne norme kao 100 %.
- Procijeniti rezultate analize nakon nelinearne regresije (varijabilan nagib, četiri parametra).
- Utvrditi EC₅₀ i EC₁₀ referentne norme.
- Utvrditi EC₅₀ i EC₁₀ ispitivanih kemikalija.
- Utvrditi najveću relativnu indukciju ispitivane kemikalije (TC_{max}).
- Utvrditi PC₁₀ i PC₅₀ ispitivanih kemikalija.

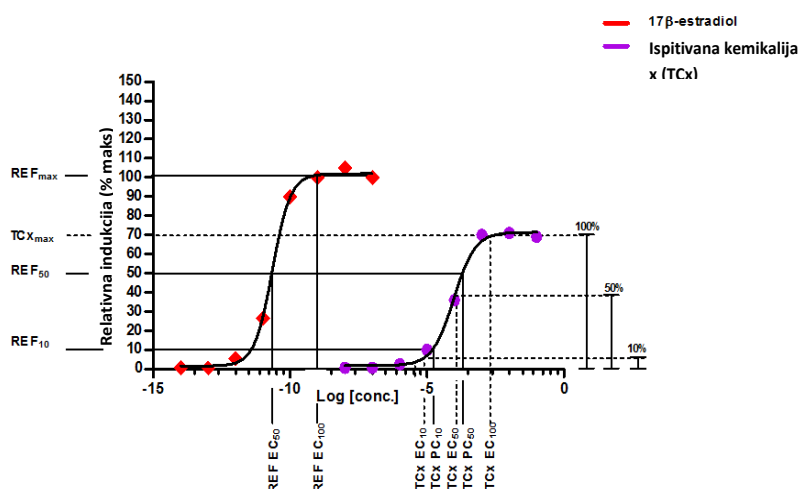
Kod ispitivanih kemikalija ne može se uvijek dobiti cijela krivulja doza – odgovor, na primjer zbog citotoksičnosti ili poteškoća s topljivosti. Stoga se ne mogu utvrditi vrijednosti EC₅₀, EC₁₀ i PC₅₀. U tom se slučaju mogu utvrditi samo vrijednosti PC₁₀ i TC_{max}.

Antagonizam

- Oduzeti prosječni RLU najviše koncentracije referentne norme od svakog sirovog podatka iz analize referentnih normi.

- Oduzeti prosječni RLU najviše koncentracije referentne norme od svakog sirovog podatka iz analize ispitivanih kemikalija.
- Izračunati relativnu indukciju svake koncentracije referentne norme. Postaviti indukciju najniže koncentracije referentne norme na 100 %.
- Izračunati relativnu indukciju svake koncentracije ispitivane kemikalije u usporedbi s najnižom koncentracijom referentne norme kao 100 %.
- Procijeniti rezultate analize nakon nelinearne regresije (varijabilan nagib, četiri parametra).
- Utvrditi IC_{50} i IC_{20} referentne norme.
- Utvrditi IC_{50} i IC_{20} ispitivanih kemikalija.
- Utvrditi najmanju relativnu indukciju ispitivane kemikalije (TC_{min}).
- Utvrditi PC_{80} i PC_{50} ispitivanih kemikalija.

Slika 3.: Pregled parametara koji se utvrđuju u testu agonista



EC_{10} = koncentracija tvari pri kojoj se opaža 10 % njezina najvećeg odgovora.

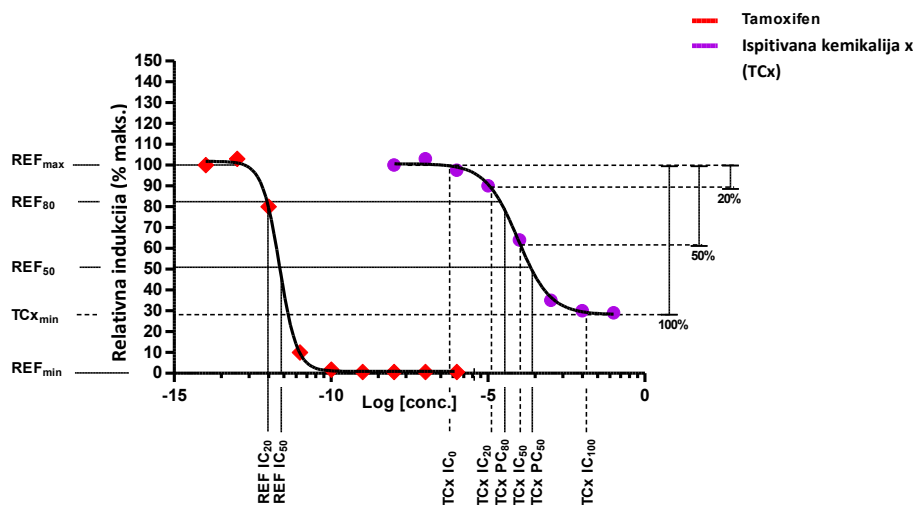
EC_{50} = koncentracija tvari pri kojoj se opaža 50 % njezina najvećeg odgovora.

PC_{10} = koncentracija ispitivane kemikalije pri kojoj je njezin odgovor jednak vrijednosti EC_{10} referentne norme.

PC_{50} = koncentracija ispitivane kemikalije pri kojoj je njezin odgovor jednak vrijednosti EC_{50} referentne norme.

TCX_{max} = najveća relativna indukcija ispitivane kemikalije.

Slika 4.: Pregled parametara koji se utvrđuju u testu antagonista



IC₂₀ = koncentracija tvari pri kojoj se opaža 80 % njezina najvećeg odgovora (20-postotna inhibicija).

IC₅₀ = koncentracija tvari pri kojoj se opaža 50 % njezina najvećeg odgovora (50-postotna inhibicija).

PC₈₀ = koncentracija ispitivane kemikalije pri kojoj je njezin odgovor jednak vrijednosti IC₂₀ referentne norme.

PC₅₀ = koncentracija ispitivane kemikalije pri kojoj je njezin odgovor jednak vrijednosti IC₅₀ referentne norme.

TC_{xmin} = najmanja relativna indukcija ispitivane kemikalije.

Kod ispitivanih kemikalija ne može se uvijek dobiti cijela krivulja doza – odgovor, na primjer zbog citotoksičnosti ili poteškoća s topljivosti. Stoga se ne mogu utvrditi vrijednosti IC₅₀, IC₂₀ i PC₅₀. U tom se slučaju mogu utvrditi samo vrijednosti PC₂₀ i TC_{min}.

58. Rezultati se trebaju temeljiti na dva (ili tri) neovisna ciklusa. Ako se u dva ciklusa dobiju usporedivi, a time i ponovljivi rezultati, ne mora se provoditi treći ciklus. Da bi bili prihvatljivi, rezultati trebaju:

- ispunjavati kriterije prihvatljivosti (vidjeti stavke od 14. do 22. o kriterijima prihvatljivosti),
- biti ponovljivi.

Kriteriji za tumačenje podataka

59. Za tumačenje podataka i odluku o tome smatra li se ispitivana kemikalija pozitivnom ili negativnom treba primjenjivati sljedeće kriterije.

Agonizam

U svakom iscrpnom ciklusu ispitivana kemikalija smatra se **pozitivnom**:

1. ako je TC_{max} jednak ili veći od 10 % najvećeg odgovora referentne norme (REF_{10});
2. ako su najmanje dvije uzastopne koncentracije ispitivane kemikalije jednake vrijednosti REF_{10} ili veće od nje.

U svakom iscrpnom ciklusu ispitivana kemikalija smatra se **negativnom**:

1. ako TC_{max} nije veći od 10 % najvećeg odgovora referentne norme (REF_{10});
2. ako su manje od dvije koncentracije ispitivane kemikalije jednake vrijednosti REF_{10} ili veće od nje.

Antagonizam

U svakom iscrpnom ciklusu ispitivana kemikalija smatra se **pozitivnom**:

1. ako je TC_{min} jednak ili manji od 80 % najvećeg odgovora referentne norme ($REF_{80} = 20$ -postotna inhibicija);
2. ako su najmanje dvije uzastopne koncentracije ispitivane kemikalije jednake vrijednosti REF_{80} ili manje od nje.

U svakom iscrpnom ciklusu ispitivana kemikalija smatra se **negativnom**:

1. ako je TC_{min} veći od 80 % najvećeg odgovora referentne norme ($REF_{80} = 20$ -postotna inhibicija);
2. ako su manje od dvije koncentracije ispitivane kemikalije jednake vrijednosti REF_{80} ili manje od nje.

60. Kako bi se opisala jakost pozitivnog odgovora ispitivane kemikalije, treba navesti razmjer učinka (agonizam: TC_{max} ; antagonizam: TC_{min}) i koncentraciju pri kojoj dolazi do učinka (agonizam: EC_{10} , EC_{50} , PC_{10} , PC_{50} ; antagonizam: IC_{20} , IC_{50} , PC_{80} , PC_{50}).

IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

61. Vidjeti stavak 20. odjeljka „SASTAVNICE ER TA TESTA”.

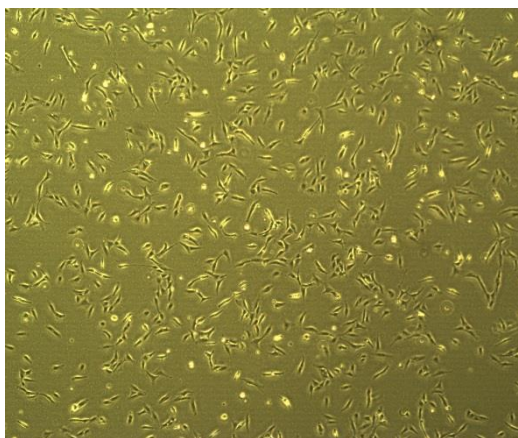
LITERATURA

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). Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
2. Sonneveld E, Jansen HJ, Riteco JA, Brouwer A, van der Burg B. (2005). Development of androgen- and estrogen-responsive bioassays, members of a panel of human cell line-based highly selective steroid-responsive bioassays. *Toxicol Sci.* 83(1), 136.–148.
3. Quaedackers ME, van den Brink CE, Wissink S, Schreurs RHMM, Gustafsson JA, van der Saag PT, and van der Burg B. (2001). 4-Hydroxytamoxifen trans-represses nuclear factor-kB Activity in human osteoblastic U2OS cells through estrogen receptor (ER) α and not through ER β . *Endocrinology* 142(3), 1156.–1166.
4. Thorne N, Inglese J and Auld DS. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, Chemistry and Biology 17(6):646.–57.
5. Escande A, Pillon A, Servant N, Cravedi JP, Larrea F, Muhn P, Nicolas JC, Cavaillès V and Balaguer P. (2006). Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta. *Biochem. Pharmacol.*, 71, 1459.–1469.
6. Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B and Gustafsson JA. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinol.*, 139, 4252.–4263.
7. Sotoca AM, Bovee TFH, Brand W, Velikova N, Boeren S, Murk AJ, Vervoort J, Rietjens IMCM. (2010). Superinduction of estrogen receptor mediated gene expression in luciferase based reporter gene assays is mediated by a post-transcriptional mechanism. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 122, 204.–211.
8. Sonneveld E, Riteco JAC, Jansen HJ, Pieterse B, Brouwer A, Schoonen WG, and van der Burg B. (2006). Comparison of *in vitro* and *in vivo* screening models for androgenic and estrogenic activities. *Toxicol. Sci.*, 89(1), 173.–187.
9. Kobayashi H, Yamamoto K, Eguchi M, Kubo M, Nakagami S, Wakisaka S, Kaizuka M and Ishii H. (1995). Rapid detection of mycoplasma

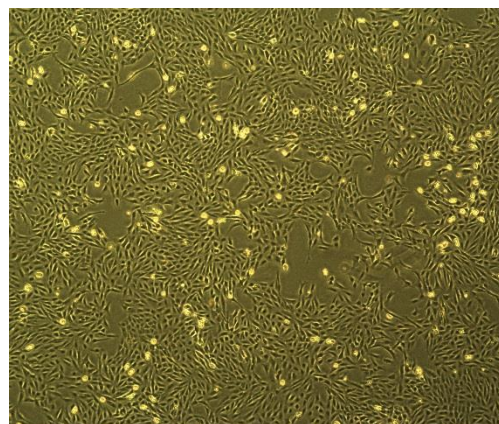
contamination in cell cultures by enzymatic detection of polymerase chain reaction (PCR) products. *J. Vet. Med. Sci.*, 57(4), 769.–771.

10. Zhang J-H, Chung TDY, and Oldenburg KR. (1999). A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J. Biomol. Scr.*, 4, 67.–73.
11. Besselink H, Middelhof I, and Felzel, E. (2014). Transactivation assay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential using ER α CALUX cells. BioDetection Systems BV (BDS). Amsterdam, Nizozemska.

Dodatak 4.1.: Vizualni pregled vijabilnosti stanica

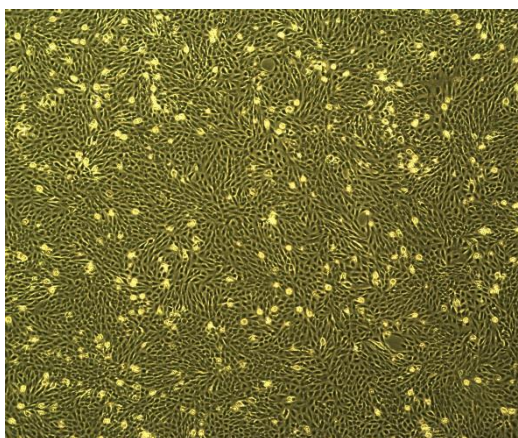


Konfluencija < 5 %. Stanice su tek nasadene. 100-postotna vijabilnost stanica.
Razvrstavanje: „nije citotoksično”



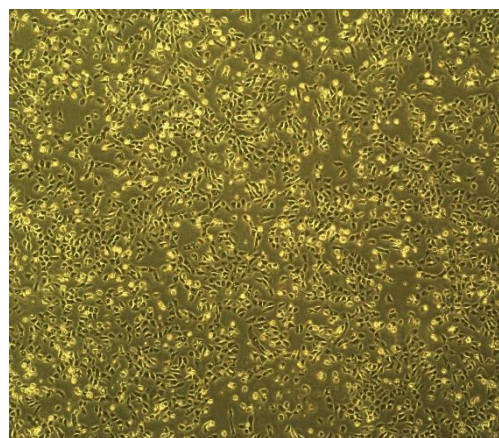
Konfluencija > 85 %. U ovoj se fazi stanice izlažu ispitivanim kemikalijama. Vijabilnost stanica > 95 %.

Razvrstavanje: „nije citotoksično”

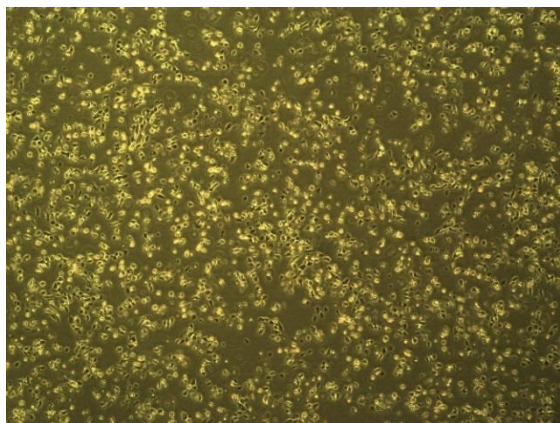


Konfluencija > 95 %. Stanice su sabijene i počinju prerastati. Vijabilnost stanica > 95 %.

Razvrstavanje: „nije citotoksično”



Vijabilnost stanica < 25 %. Stanice se počinju odvajati i smanjuje se kontakt među stanicama. Stanice postaju okrugle. Razvrstavanje: „citotoksično”



Vijabilnost stanica $< 5\%$. Stanice su potpuno odvojene i prekinut je kontakt među stanicama. Stanice postaju okrugle. Razvrstavanje: „citotoksično”

B.67. *IN VITRO* ISPITIVANJA GENSKIH MUTACIJA STANICA SISAVACA UPOTREBOM GENA ZA TIMIDIN KINAZU

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 490 (2016.). Ispitne metode periodično se preispituju i revidiraju uzimajući u obzir znanstveni napredak, regulatorne potrebe i dobrobit životinja. Test limfoma miša (MLA) i test TK6 u kojima se upotrebljava lokus timidin kinaze (TK) izvorno su bili dio ispitne metode B.17. Kasnije je Stručna skupina za MLA Međunarodne radionice o ispitivanju genotoksičnosti (IWGT) razvila međunarodno usklađene preporuke za kriterije prihvatljivosti testova i tumačenje podataka za MLA (1., 2., 3., 4. i 5.) i te su preporuke uključene u ovu novu ispitnu metodu B.67. Ova je ispitna metoda napisana za MLA i za test TK6 jer se i u njemu upotrebljava lokus timidin kinaze. Dok se MLA često upotrebljava u regulatorne svrhe, TK6 se upotrebljava mnogo rjeđe. Treba napomenuti da te dvije stanične linije nisu međusobno zamjenjive unatoč sličnosti između krajnjih točaka te se u regulatornim programima s pravom može dati prednost jednoj od tih metoda za određenu regulatornu upotrebu. Na primjer, u validaciji testa MLA pokazala se primjerenost tog testa za otkrivanje genskih mutacija, ali i sposobnost ispitivanih kemikalija da induciraju strukturno oštećenje kromosoma. Ova je ispitna metoda dio niza ispitnih metoda u području genetske toksikologije. OECD je sastavio dokument u kojem se daju sažete informacije o ispitivanju u području genetske toksikologije te pregled novijih promjena smjernica OECD-a za ispitivanje genotoksičnosti (6.).
2. Svrha je *in vitro* testova genskih mutacija stanica sisavaca otkrivanje genskih mutacija induciranih (uzrokovanih) kemikalijama. Stanične linije koje se upotrebljavaju u ovim testovima mjere napredne mutacije na reporterskim genima, točnije genu za endogenu timidin kinazu (*TK* za ljudske stanice i *Tk* za stanice glodavaca, koje se u ovoj ispitnoj metodi zajedno nazivaju *TK*). Ova ispitna metoda namijenjena je za upotrebu s dvjema staničnim linijama: staničnom linijom limfoma miša L5178Y TK^{+/-}-3.7.2C (obično se naziva L5178Y) i staničnom linijom ljudskih limfoblastoida TK6 (obično se naziva TK6). Iako se te dvije stanične linije razlikuju po svojem podrijetlu, rastu stanica, statusu p53 itd., testovi mutacija gena *TK* mogu se provesti na sličan način za obje vrste stanica, kako je opisano u ovoj ispitnoj metodi.
3. Autosomalna i heterozigotna priroda gena za timidin kinazu omogućuje opažanje vijabilnih kolonija čijim stanicama nedostaje enzim timidin kinaza nakon mutacije iz TK^{+/-} u TK^{-/-}. Taj nedostatak može biti posljedica genetskih pojava koje utječu na gen *TK*, uključujući i genske mutacije (točkaste mutacije, mutacije pomaka okvira očitavanja, manje delecije itd.) i kromosomske pojave (velike delecije, premještanja

kromosoma i mitotske rekombinacije). Potonje pojave eksprimiraju se kao gubitak heterozigotnosti, a to je uobičajena genetska promjena gena supresora tumora u karcinogenezi kod ljudi. U teoriji se testom MLA može otkriti gubitak cijelog kromosoma koji nosi gen *TK*, što je posljedica oštećenja diobenog vretena i/ili mitotskog nerazdvajanja. Doista, kombinacija citogenetske i molekularne analize jasno pokazuje da su neki mutanti *TK* u testu MLA posljedica nerazdvajanja. Međutim, analiza snage dokaza ukazuje na to da ispitivanja mutacija gena *TK* ne mogu pouzdano otkriti aneugene kada se primjenjuju standardni kriteriji citotoksičnosti (kako je opisano u ovoj ispitnoj metodi) i stoga nije primjereno upotrebljavati te testove za otkrivanje aneugena (7., 8. i 9.).

4. U testovima mutacije gena *TK* nastaju dva različita razreda fenotipa mutanata *TK*: mutanti koji rastu normalno istom brzinom kao i heterozigotne stanice *TK*-a i mutanti koji rastu sporo i imaju produljeno vrijeme udvostručivanja. Mutanti koji rastu normalno i mutanti koji rastu sporo prepoznaju se kao mutanti u velikim kolonijama i mutanti u malim kolonijama u testu MLA te kao mutanti u kolonijama koje se javljaju rano i koje se javljaju kasno u testu *TK6*. Molekularna i citogenetska svojstva mutanata u velikim i malim kolonijama u testu MLA podrobno su ispitana (8., 10., 11., 12. i 13.). Podrobno su ispitana i molekularna i citogenetska svojstva mutanata koji se javljaju rano i koji se javljaju kasno u testu *TK6* (14., 15., 16. i 17.). Mutanti koji rastu sporo za obje vrste stanica pretrpjeli su genetsko oštećenje koje pogađa gene koji navodno reguliraju rast u blizini lokusa timidin kinaze, što dovodi do produljenih vremena udvostručivanja i nastanka kolonija koje se javljaju kasno ili malih kolonija (18.). Indukcija mutanata koji rastu sporo povezuje se s kemikalijama koje izazivaju velike strukturne promjene na razini kromosoma. Stanice kojima nisu oštećeni geni koji navodno reguliraju rast u blizini lokusa timidin kinaze rastu brzinom koja je slična roditeljskim stanicama i postaju mutanti koji rastu normalno. Indukcija mutanata koji prvenstveno rastu normalno povezana je s kemikalijama koje prvenstveno djeluju kao mutageni koji uzrokuju točkaste mutacije. Stoga je od ključne važnosti izbrojiti i mutante koji rastu sporo i one koji rastu normalno kako bi se dobili svi mutanti i određeni uvid u vrste oštećenja (mutageni u odnosu na klastogene) koje inducira ispitivana kemikalija (10., 12., 18. i 19.).
5. Smjernica za ispitivanje o ispitnoj metodi organizirana je tako da se daju opće informacije koje se primjenjuju i na MLA i *TK6* te specijalizirane smjernice za pojedinačne testove.
6. Upotrijebljene definicije navedene su u Dodatku 1.

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

7. Testovi koji se obavljaju *in vitro* obično zahtijevaju primjenu egzogenog (vanjskog) izvora metaboličke aktivacije. Egzogenim sustavom metaboličke aktivacije ne oponašaju se u cijelosti *in vivo* uvjeti.
8. Trebalo bi voditi računa o tome da se izbjegnu uvjeti koji bi mogli dovesti do lažno pozitivnih rezultata (odnosno moguće interakcije s ispitnim sustavom) koji nisu uzrokovani interakcijom ispitivane kemikalije i genetskog materijala stanice; takvi uvjeti uključuju promjene pH-vrijednosti ili osmolalnosti, interakciju s komponentama medija (20. i 21.) ili prekomjerne razine citotoksičnosti (22., 23. i 24.). Citotoksičnost koja premašuje preporučene najviše razine citotoksičnosti, kako su definirane u stavku 28., smatra se prekomjernom za MLA i TK6. Osim toga, treba napomenuti da ispitivane kemikalije koje su analogne timidinu ili se ponašaju kao da su analogne timidinu mogu povećati učestalost pojave mutanata selektivnim rastom spontanijih pozadinskih mutanata tijekom tretiranja stanica te su za primjerenu procjenu potrebne dodatne ispitne metode (25.).
9. U slučaju proizvedenih nanomaterijala mogu biti potrebne posebne prilagodbe ove ispitne metode, ali one nisu opisane u ovoj ispitnoj metodi.
10. Prije nego što se ova ispitna metoda primijeni za ispitivanje smjese radi dobivanja podataka za predviđenu regulatornu svrhu, potrebno je razmotriti mogu li se njome dobiti primjereni rezultati za tu svrhu te ako mogu, zašto. Ta razmatranja nisu potrebna ako postoji regulatorni zahtjev za ispitivanje smjese.
11. Mutirane stanice bez aktivnosti enzima timidin kinaze otporne su na citostatske učinke analoga primidona, trifluorotimidina (TFT), zbog mutacije $TK^{+/-}$ u $TK^{-/-}$. Stanice koje sadržavaju dosta $TK-a$ osjetljive su na TFT, što uzrokuje inhibiciju staničnog metabolizma i sprečava daljnju diobu stanica. Tako se mutirane stanice uz prisutnost TFT-a mogu razmnožavati i stvarati vidljive kolonije, dok stanice koje sadržavaju enzim TK ne mogu.

NAČELO ISPITIVANJA

12. Stanice u suspenziji izlažu se u odgovarajućem trajanju ispitivanoj kemikaliji (vidjeti stavak 33.), s egzogenim izvorom metaboličke aktivacije i bez njega (vidjeti stavak 19.), te se zatim supkultiviraju da bi se utvrdila citotoksičnost i omogućila fenotipska ekspresija prije selekcije mutanata. Citotoksičnost se utvrđuje relativnim ukupnim rastom (RTG – vidjeti stavak 25.) za MLA i relativnom stopom preživljavanja (RS – vidjeti stavak 26.) za TK6. Tretirane se kulture drže u mediju za rast tijekom dovoljno dugog razdoblja, koje je karakteristično za svaki tip stanice (vidjeti stavak 37.), što omogućuje skoro optimalnu fenotipsku ekspresiju induciranih mutacija. Nakon fenotipske ekspresije učestalost pojave mutanata utvrđuje se

našadivanjem poznatog broja stanica u medij koji sadržava selektivni agens kako bi se otkrile kolonije mutanata odnosno u medij bez selektivnog agensa kako bi se odredila učinkovitost kloniranja (vijabilnost). Nakon odgovarajućeg razdoblja inkubacije kolonije se prebroje. Učestalost pojave mutanata računa se na temelju broja kolonija mutanata koji se ispravlja učinkovitošću kloniranja u trenutku selekcije mutanata.

OPIS METODE

Pripreme

Stanice

13. Za MLA: budući da je MLA razvijen i opisan za upotrebu podlinije $TK^{+/-}$ -3.7.2C stanica L5178Y, za MLA se mora upotrebljavati upravo ta podlinija. Stanična linija L5178Y izvedena je iz limfoma timusa DBA-2 miša induciranog metilkolantrenom (26.). Clive i suradnici tretirali su stanice L5178Y (koje je Clive odredio kao $TK^{+/+}$ -3) etil metansulfonatom i izolirali klon $TK^{-/-}$ (određen kao $TK^{-/-}$ -3.7) primjenom bromodeoksiuridina kao selektivnog agensa. Iz klona $TK^{-/-}$ izolirani su spontani klon $TK^{+/-}$ (određen kao $TK^{+/-}$ -3.7.2.) i podklon (određen kao $TK^{+/-}$ -3.7.2C) te su opisani za upotrebu u testu MLA (27.). Objavljen je kariotip za staničnu liniju (28., 29., 30. i 31.). Modalni je broj kromosoma 40. Postoji jedan metacentrični kromosom (t12;13) koji treba brojiti kao jedan kromosom. Lokus timidin kinaze miša nalazi se na distalnom kraju kromosoma 11. Stanična linija L5178Y $TK^{+/-}$ -3.7.2C ima mutacije na oba alela p53 i proizvodi protein mutanta p53 (32. i 33.). Status p53 stanične linije $TK^{+/-}$ -3.7.2C vjerojatno omogućuje da se testom otkrije veliko oštećenje (17.).
14. Za TK6: TK6 je stanična linija ljudskih limfoblastoida. Roditeljsku staničnu liniju čini WI-L2, stanična linija transformirana Epstein-Barrovim virusom, koja je izvorno izvedena iz petogodišnjeg mušjaka s hereditarnom sferocitozom. Prvi izolirani klon, HH4, mutageniran je mutagenom ICR191 i stvorena je heterozigotna stanična linija $TK-a$ - TK6 (34.). Stanice TK6 skoro su diploidne i reprezentativni je kariotip 47, XY, 13+, t(14; 20), t(3; 21) (35.). Lokus ljudske timidin kinaze nalazi se na dugom kraku kromosoma 17. TK6 je stanična linija kompetentna u pogledu p53 jer ima slijed p53 divljeg tipa na oba alela i eksprimira samo protein p53 divljeg tipa (36.).
15. I kod testa MLA i testa TK6 preporučuje se da laboratorij koji obavlja ispitivanje osigura odsustvo kontaminacije mikoplazmom, odredi kariotip stanica ili oboji kromosome koji imaju lokus timidin kinaze te da provjeri vremena udvostručenja populacije kada se glavni uzorak prvi put stvara ili nadopunjuje. Trebalo bi utvrditi uobičajeno trajanje staničnog ciklusa upotrijebljenih stanica u ispitnom laboratoriju i ono bi trebalo biti usklađeno s objavljenim svojstvima stanica (16., 19. i 37.). Taj glavni uzorak treba pohraniti na temperaturi od -150°C ili nižoj i upotrebljavati za pripremu svih radnih uzoraka stanica.

16. Prije stvaranja velikog broja krioprezerviranih radnih uzoraka ili neposredno prije upotrebe u pokusu iz kultura će možda trebati odstraniti mutirane stanice koje postoje otprije [osim ako je učestalost pojave mutanata (MF) u kontroli s otapalom već unutar prihvatljivog raspona – vidjeti tablicu 2. za test MLA)]. To se postiže upotrebom metotreksata (aminopterin) kako bi se izdvojile stanice koje ne sadržavaju timidin kinazu te dodavanjem timidina, hipoksantina i glicina (L5178Y) ili 2'-deoksicitidina (TK6) kulturi kako bi se osigurao optimalan rast stanica kompetentnih u pogledu timidin kinaze (19., 38., 39. i 40.) za test TK6. Opći savjeti o dobroj praksi za održavanje staničnih kultura i savjeti specifični za stanice L5178Y i TK6 mogu se naći u literaturi (19., 31., 37., 39. i 41.). Za laboratorije koji trebaju matične uzorke za započinjanje testa MLA ili TK6 ili za dobivanje novih matičnih uzoraka dostupan je repozitorij stanica koje su dobro opisane (37.).

Uvjeti koje moraju zadovoljavati mediji i kulture

17. U oba bi testa u svrhu održavanja kultura trebalo primijeniti prikladne uvjete za medij za uzgoj kulture i uvjete inkubacije (npr. posude za kulture, vlažne atmosferske uvjete od 5 % CO₂ i temperaturu inkubacije od 37 °C). Stanične kulture uvijek bi se trebale održavati u uvjetima kojima se osigurava da one rastu u logaritamskoj fazi. Posebno je važno odabrati uvjete u pogledu medija i kultura kojima se osiguravaju optimalan rast stanica tijekom razdoblja ekspresije i kloniranje kako mutiranih tako i nemutiranih stanica. Za MLA i TK6 važno je i da uvjeti kulture osiguraju optimalan rast TK mutanata i u velikim kolonijama/mutanata koji se javljaju rano i mutanata u malim kolonijama/mutanata koji se javljaju kasno. Više pojedinosti o kulturi, uključujući potrebu da se konjski serum pravilno inaktivira toplinom ako se tijekom selekcije mutanata upotrebljava medij RPMI, dostupno je u literaturi (19., 31., 38., 39., 40. i 42.).

Priprema kultura

18. Stanice se razmnožavaju iz matičnih kultura te se nasađuju u medij za uzgoj kulture takvom gustoćom da kulture u suspenziji nastave eksponencijalno rasti tijekom razdoblja tretiranja i ekspresije.

Metabolička aktivacija

19. Kod uporabe stanica L5178Y i TK6 trebalo bi upotrebljavati egzogene sustave metaboličkog djelovanja jer te stanice nemaju odgovarajuću endogenu metaboličku sposobnost. Sustav koji se najčešće upotrebljava i automatski preporučuje, osim ako je drukčije opravdano, jest postmitohondrijska frakcija s dodanim kofaktorom (S9), pripravljena od jetre glodavaca (općenito štakora), koja je bila tretirana sredstvima za indukciju enzima, kao što je Aroclor 1254 (43., 44. i 45.), ili mješavinom fenobarbitala i β -naftoflavona (46., 47., 48., 49., 50. i 51.). Upotreba navedene smjese nije u suprotnosti sa Stockholmskom konvencijom o postojećim organskim

onečišćujućim tvarima (52.) i dokazano je da je jednako učinkovita za indukciju oksidaza s miješanom funkcijom kao Aroclor 1254 (45., 46., 47., 48. i 49.). Frakcija S9 obično se upotrebljava u koncentracijama u rasponu od 1 do 2 %, ali može se povećati na 10 % (v/v) u konačnom ispitnom mediju. Na odabir vrste i koncentracije upotrijebljenog egzogenog sustava metaboličke aktivacije ili metaboličkog pokretača može utjecati kategorija ispitivanih kemikalija.

Priprema ispitivane kemikalije

20. Prije tretiranja stanica krute ispitivane kemikalije trebalo bi pripremiti u prikladnim otapalima i prema potrebi razrijediti (vidjeti stavak 21.). Tekuće ispitivane kemikalije mogu se dodati izravno u ispitni sustav i/ili razrijediti prije tretiranja ispitnog sustava. Plinovite ili hlapljive ispitivane kemikalije trebalo bi ispitivati nakon što se prikladno izmijene standardni protokoli, kao što je tretiranje u hermetički zatvorenim posudama za kulture (53., 54. i 55.). Ispitivanu kemikaliju potrebno je pripremiti neposredno prije tretiranja, osim ako je prema podacima o stabilnosti prihvatljivo skladištenje.

ISPITNI UVJETI

Otapala

21. Otapalo bi trebalo odabrati tako da se optimizira topljivost ispitivane kemikalije bez negativnih učinaka na provedbu testa, kao što su npr. promjena rasta stanica, učinak na integritet ispitivane kemikalije, reagiranje s posudama za kulture ili oštećenje sustava metaboličke aktivacije. Preporučuje se da se, kada god je to moguće, prvo uzme u obzir upotreba vodenog otapala (ili medija za uzgoj kulture). Uobičajena su otapala voda ili dimetilsulfoksid. Općenito, organska otapala ne bi trebala prelaziti 1 % (v/v), dok vodena otapala (fiziološka otopina ili voda) ne bi trebala prelaziti 10 % (v/v) u mediju za završno tretiranje. Upotrebu neuobičajenih otapala (npr. etanola ili acetona) potrebno je opravdati podacima koji govore da su ta otapala kompatibilna s ispitivanim kemikalijama i ispitnim sustavom te da ne djeluju genotoksično pri upotrijebljenoj koncentraciji. Ako ne postoje takvi popratni podaci, važno je dodati netretirane kontrole (vidjeti Dodatak 1., Definicije) kako bi se dokazalo da odabrano otapalo nema štetne ili mutagene učinke.

MJERENJE CITOTOKSIČNOSTI I ODABIR KONCENTRACIJA TRETIRANJA

22. Pri utvrđivanju najviše koncentracije ispitivane kemikalije trebalo bi izbjegavati koncentracije koje imaju sposobnost izazivanja lažno pozitivnih odgovora, kao što su koncentracije koje izazivaju prekomjernu citotoksičnost (vidjeti stavak 28.), taloženje u mediju za uzgoj kulture (vidjeti stavak 29.) ili znatne promjene pH-vrijednosti ili osmolalnosti (vidjeti stavak 8.). Ako ispitivana kemikalija u trenutku dodavanja uzrokuje znatnu promjenu pH-vrijednosti medija, pH-vrijednost može se prilagoditi

puferiranjem medija za završno tretiranje kako bi se izbjegli lažno pozitivni rezultati te održali primjereni uvjeti za uzgoj kulture.

23. Odabir koncentracije temelji se na citotoksičnosti i drugim razmatranjima (vidjeti stavke 27.–30.). Iako ocjena citotoksičnosti u početnom ispitivanju može biti korisna za bolje određivanje koncentracija koje će se upotrebljavati u glavnom pokusu, početno ispitivanje nije potrebno. Čak i ako se provodi početna ocjena citotoksičnosti, i dalje je obvezno mjerenje citotoksičnosti za svaku kulturu u glavnom pokusu. Ako se provodi pokus za utvrđivanje raspona, on treba obuhvatiti širok raspon koncentracija i može se završiti 1. dana nakon tretiranja ili nastaviti na 2. dan ekspresije i do selekcije mutanata (ako se pokaže da su upotrijebljene koncentracije primjerene).
24. Citotoksičnost treba utvrditi za svaku pojedinačnu ispitnu kulturu i kontrolnu kulturu: metode za MLA (2.) i TK6 (15.) utvrđene su međunarodno prihvaćenom praksom.
25. I za verziju testa MLA s agarom i s mikrojažicama citotoksičnost treba procijeniti upotrebom relativnog ukupnog rasta (RTG), koji su izvorno definirali Clive i Spector 1975. (2.). Ta mjera uključuje relativni rast u suspenziji (RSG: ispitna kultura u usporedbi s kontrolom s otapalom) tijekom tretiranja stanica, vrijeme ekspresije i relativnu učinkovitost kloniranja (RCE: ispitna kultura u usporedbi s kontrolom s otapalom) u trenutku odabira mutanata (2.). Treba napomenuti da RSG obuhvaća bilo kakav gubitak stanica do kojeg dolazi u ispitnoj kulturi tijekom tretiranja (formule potražiti u Dodatku 2.).
26. Za TK6: citotoksičnost bi se trebala ocjenjivati primjenom relativne stope preživljavanja (RS), tj. učinkovitošću kloniranja stanica koje se nasade odmah nakon tretiranja, prilagođeno za mogući gubitak stanica tijekom tretiranja, na temelju broja stanica u usporedbi s negativnom kontrolom (kojoj se dodjeljuje stopa preživljavanja od 100 %) (formulu vidjeti u Dodatku 2.).
27. Potrebno je ocijeniti najmanje četiri ispitne koncentracije (ne uključujući kontrolu s otapalom i pozitivnu kontrolu) koje ispunjavaju kriterije prihvatljivosti (odgovarajuća citotoksičnost, broj stanica itd.). Iako se preporučuje upotreba usporednih kultura, za svaku se ispitivanu koncentraciju može upotrijebiti samo jedna tretirana kultura ili više njezinih ponovljenih uzoraka. Rezultati dobiveni iz ponovljenih kultura pri određenoj koncentraciji trebali bi se navoditi odvojeno, ali mogu se objediniti radi analize podataka (55.). Za ispitivane kemikalije koje pokazuju malu ili nikakvu citotoksičnost uglavnom će biti prikladne približno dvostruke ili trostruke koncentracije. Ako se pojavi citotoksičnost, treba odabrati koncentracije koje obuhvaćaju raspon citotoksičnosti od koncentracije koja uzrokuje citotoksičnost kako je opisano u stavku 28. te uključujući koncentracije pri kojima se javlja umjerena citotoksičnost i one pri kojima je citotoksičnost mala ili je nema. Mnoge ispitivane

kemikalije imaju oštre krivulje odgovora na koncentraciju te će za obuhvaćanje cijelog raspona citotoksičnosti ili detaljno istraživanje odgovora na koncentracije možda biti potrebno upotrijebiti sličnije koncentracije i više od četiri koncentracije, posebno u situacijama u kojima je potrebno ponavljanje pokusa (vidjeti stavak 70.). Upotreba više od četiri koncentracije može biti osobito važna kada se upotrebljava jedna kultura.

28. Ako se maksimalna koncentracija temelji na citotoksičnosti, najvećom koncentracijom trebao bi se nastojati ostvariti relativni ukupni rast od 20 do 10 % za MLA i relativna stopa preživljavanja od 20 do 10 % za TK6 (stavak 67.).
29. Za slabo topljive ispitivane kemikalije koje nisu citotoksične pri koncentracijama nižima od najniže koncentracije pri kojoj kemikalija nije topljiva najviša bi analizirana koncentracija trebala dovesti do zamućenosti ili taloga vidljivog golim okom ili inverznim mikroskopom na kraju tretiranja ispitivanom kemikalijom. Čak i ako se citotoksičnost pojavi iznad najniže netopljive koncentracije, preporučuje se ispitivanje pri samo jednoj koncentraciji koja dovodi do zamućenja ili s vidljivim talogom jer lažni učinci mogu biti posljedica taloga. Budući da se u testovima MLA i TK6 upotrebljavaju kulture u suspenziji, posebnu pozornost treba posvetiti tome da se osigura da talog ne utječe na izvođenje ispitivanja. Može biti korisno i odrediti topljivost u mediju za uzgoj kulture prije izvođenja pokusa.
30. Ako nisu uočeni talog ili ograničavajuća citotoksičnost, najviša ispitna koncentracija trebala bi odgovarati najnižoj od sljedećih vrijednosti: 10 mM, 2 mg/ml ili 2 µl/ml (57. i 58.). Ako sastav ispitivane kemikalije nije definiran, npr. ako je riječ o tvarima nepoznatog ili promjenjivog sastava, složenim reakcijskim proizvodima ili biološkim materijalima (tj. kemijske tvari nepoznatog ili promjenjivog sastava ili UVCB tvari), proizvodima ekstrahiranim iz okoliša itd., najvišu koncentraciju može biti potrebno povećati (npr. 5 mg/ml) u odsustvu dovoljne citotoksičnosti, a kako bi se povećala koncentracija svakog sastojka. Međutim, trebalo bi napomenuti da ti zahtjevi mogu biti drukčiji za farmaceutske proizvode namijenjene ljudima (59.).

Kontrole

31. Kod svakog uvjeta pokusa potrebno je uključiti i istodobne negativne kontrole (vidjeti stavak 21.) koje se sastoje samo od otapala u mediju za tretiranje i koje su tretirane na isti način kao i kulture za tretiranje.
32. Istodobne pozitivne kontrole potrebne su za dokazivanje sposobnosti laboratorija za određivanje mutagena u uvjetima upotrijebljenog protokola ispitivanja, učinkovitosti egzogenog sustava metaboličke aktivacije (ako je to primjenjivo) i za dokazivanje primjerenog otkrivanja i malih TK mutanata/mutanata koji se javljaju kasno i velikih TK mutanata/mutanata koji se javljaju rano. Primjeri pozitivnih kontrola navedeni su

u tablici 1. u nastavku. Ako je to opravdano, mogu se koristiti alternativne tvari za pozitivnu kontrolu. S obzirom na to da je *in vitro* ispitivanje genotoksičnosti na stanicama sisavaca u dostatnoj mjeri standardizirano za kratkotrajna tretiranja (od tri do četiri sata) koja se istodobno provode s metaboličkom aktivacijom i bez nje uz isto trajanje tretiranja, upotreba pozitivnih kontrola može se ograničiti na mutagene tvari koje zahtijevaju metaboličku aktivaciju. U tom će slučaju taj jedan odgovor pozitivne kontrole dokazati djelovanje sustava metaboličke aktivacije i osjetljivost ispitnog sustava. Ako se upotrebljava, dugotrajno tretiranje (tj. 24 sata bez S9) trebalo bi imati svoju pozitivnu kontrolu jer će se trajanje tretiranja razlikovati od ispitivanja u kojem se primjenjuje metabolička aktivacija. Svaku pozitivnu kontrolu trebalo bi primijeniti pri jednoj ili više koncentracija za koje se očekuje da će dovesti do ponovljivih i zamjetnih povećanja u odnosu na pozadinu kako bi se dokazala osjetljivost ispitnog sustava, a odgovor ne bi trebala dovesti u pitanje citotoksičnost koja prelazi granične vrijednosti utvrđene u ovoj ispitnoj metodi (vidjeti stavak 28).

Tablica 1.: Referentne tvari preporučene za ocjenu osposobljenosti laboratorija i za odabir pozitivnih kontrola

Kategorija	Tvar	CAS br.
1. Mutageni aktivni bez metaboličke aktivacije		
Metil metansulfonat	66-27-3	
Mitomycin C	50-07-7	
4-nitrokinolin-N-oksid	56-57-5	
2. Mutageni koji zahtijevaju metaboličku aktivaciju		
Benzo(a)piren	50-32-8	
Ciklofosfamid (monohidrat)	50-18-0 (6055-19-2)	
7,12-dimetilbenzantracen	57-97-6	
3-metilkolantren	56-49-5	

POSTUPAK

Tretiranje ispitivanom kemikalijom

33. Stanice koje se razmnožavaju tretiraju se ispitivanom kemikalijom uz prisustvo i odsustvo sustava metaboličke aktivacije. Izlaganje treba trajati odgovarajuće vrijeme (obično je primjereno od tri do četiri sata). Međutim, trebalo bi napomenuti da ti zahtjevi mogu biti drukčiji za farmaceutske proizvode namijenjene ljudima (59.). Kod testa MLA u slučajevima kada se kratkotrajnim tretiranjem dobiju negativni rezultati, a postoje informacije koje ukazuju na potrebu za duljim tretiranjem (npr. nukleozidni

analizi, slabo topljive kemikalije (5. i 59.)), treba razmotriti provođenje testa s duljim tretiranjem, tj. 24 sata bez S9.

34. Minimalni broj stanica koje se koriste za svaku ispitnu kulturu (kontrolnu i tretiranu) u svakoj fazi ispitivanja trebao bi se temeljiti na učestalosti pojave spontanih mutanata. Opća je smjernica tretirati i pasažirati dovoljno stanica u svakoj pokusnoj kulturi kako bi se održalo najmanje deset, ali po mogućnosti 100 spontanih mutanata u svim fazama testa (tretiranje, fenotipska ekspresija i selekcija mutanata) (56.).
35. Za test MLA preporučuje se prihvatljiva učestalost spontanih mutanata od $35\text{--}140 \times 10^{-6}$ (verzija s agarom) i $50\text{--}170 \times 10^{-6}$ (verzija s mikrojažicama) (vidjeti tablicu 2.). Da bi se dobilo najmanje deset, a po mogućnosti 100 spontanih mutanata koje će preživjeti tretiranje, za svaku ispitnu kulturu treba tretirati najmanje 6×10^6 stanica. Tretiranjem tog broja stanica i održavanjem dovoljnog broja stanica tijekom ekspresije i kloniranja za selekciju mutanata dobiva se dovoljan broj spontanih mutanata (deset ili više) tijekom svih faza pokusa, čak i za kulture tretirane pri koncentracijama koje uzrokuju 90-postotnu citotoksičnost (kako je izmjereno relativnim ukupnim rastom od 10 %) (19., 38. i 39.).
36. Za test TK6 učestalost spontanih mutanata općenito iznosi od 2 do 10×10^{-6} . Da bi se dobilo najmanje deset spontanih mutanata koje će preživjeti tretiranje, za svaku kulturu treba tretirati najmanje 20×10^6 stanica. Tretiranjem tog broja stanica dobiva se dovoljan broj spontanih mutanata (deset ili više), čak i za kulture tretirane pri koncentracijama koje uzrokuju 90-postotnu citotoksičnost tijekom tretiranja (relativna stopa preživljavanja od 10 %). Osim toga, mora se kultivirati dovoljan broj stanica tijekom razdoblja ekspresije i nasaditi radi selekcije mutanata (60.).

Vrijeme fenotipske ekspresije i mjerenje citotoksičnosti i učestalosti pojave mutanata

37. Na kraju razdoblja tretiranja stanice se kultiviraju u zadanom vremenskom razdoblju kako bi se omogućila gotovo optimalna fenotipska ekspresija novoinduciranih mutacija; specifično za svaku staničnu liniju. Za test MLA razdoblje fenotipske ekspresije iznosi dva dana. Za test TK6 razdoblje fenotipske ekspresije iznosi od tri do četiri dana. Ako se upotrebljava tretiranje u trajanju od 24 sata, razdoblje ekspresije počinje nakon kraja tretiranja.
38. Tijekom razdoblja fenotipske ekspresije stanice se prebrojavaju svakog dana. Kod testa MLA svakodnevno brojanje stanica upotrebljava se za izračun svakodnevnog rasta u suspenziji (SG). Nakon dvodnevnog razdoblja ekspresije stanice se suspendiraju u mediju sa selektivnim agensom ili bez njega radi utvrđivanja broja mutacija (ploče za odabir) i učinkovitosti kloniranja (ploče za vijabilnost). Za test MLA postoje dvije jednako prihvatljive metode za kloniranje selekcije mutanata; u jednoj se upotrebljava meki agar, a u drugom tekući medij u pločama s 96 jažica (19.,

38. i 39.). Kloniranje u testu TK6 provodi se upotrebom tekućih medija i ploča s 96 jažica (16.).
39. Za *TK* mutante kao selektivni agens preporučuje se samo trifluorotimidin (TFT) (61).
40. Kod testa MLA agarne ploče i ploče s mikrojažicama prebrojavaju se nakon 10–12 dana inkubacije. Kod testa TK6 kolonije u pločama s mikrojažicama ocjenjuju se nakon 10–14 dana kako bi se uočili mutanti koji se javljaju rano. Kako bi se obnovili TK6 mutanti koji rastu sporo (koji se javljaju kasno), stanicama treba ponovno dodati medij za uzgoj i TFT nakon što se prebroje mutanti koji se javljaju rano i zatim inkubirati ploče dodatnih 7–10 dana (62.). Za pojedinosti o prebrojavanju *TK* mutanata koji rastu sporo i onih koji rastu normalno vidjeti stavke 42. i 44.
41. Odgovarajući izračuni za dva testa, uključujući i dvije metode (agar i mikrojažice) za test MLA, nalaze se u Dodatku 2. Kod metode testa MLA u kojoj se upotrebljava agar, za izračun učestalosti pojave mutanata kolonije se prebrojavaju i broj kolonija mutanata prilagođava se s obzirom na učinkovitost kloniranja. Kod verzije testova MLA i TK6 s mikrojažicama, učinkovitost kloniranja i za ploče za selekciju i za ploče za učinkovitost kloniranja (63.) utvrđuje se u skladu s Poissonovom distribucijom. Učestalost pojave mutanata računa se iz tih dviju učinkovitosti kloniranja.

Opis kolonije mutanata

42. Kod testa MLA, ako je ispitivana kemikalija pozitivna (vidjeti stavke od 62. do 63.), opisivanje kolonije razvrstavanjem po veličini kolonije ili po njezinom rastu treba provesti na najmanje jednoj od ispitnih kultura (obično najviša prihvatljiva pozitivna koncentracija) te na negativnim i pozitivnim kontrolama. Ako je ispitivana kemikalija negativna (vidjeti stavak 64.), opisivanje kolonije mutanata treba provesti na negativnim i pozitivnim kontrolama. Kod metode testa MLA s mikrojažicama mutanti koji tvore male kolonije definiraju se kao mutanti koji prekrivaju manje od 25 % promjera jažice, a mutanti koji tvore velike kolonije kao oni koji prekrivaju više od 25 % promjera jažice. Kod metode s agarom za prebrojavanje kolonija mutanata i razvrstavanje kolonija po veličini upotrebljava se automatski brojač kolonija. Pristupi razvrstavanju kolonija po veličini detaljno su opisani u literaturi (19., 38. i 40.). Opis kolonija na negativnoj i pozitivnoj kontroli potreban je kako bi se dokazalo da su studije provedene na primjeren način.
43. Ne može se utvrditi da je ispitivana kemikalija negativna ako se u pozitivnoj kontroli pravilno ne otkriju i mutanti koji tvore velike kolonije i oni koji tvore male kolonije. Opis kolonije može se upotrijebiti za davanje općih informacija o sposobnosti ispitivane kemikalije da uzrokuje točkaste mutacije i/ili kromosomske pojave (stavak 4.).

44. TK6: mutanti koji rastu normalno i oni koji rastu sporo razlikuju se prema različitim vremenima inkubacije (vidjeti stavak 40.) Kod testa TK6 mutanti koji se javljaju rano i oni koji se javljaju kasno obično se ocjenjuju za sve kulture, uključujući negativne i pozitivne kontrole. Opis kolonija negativne i pozitivne kontrole potreban je kako bi se dokazalo da su studije provedene na primjeren način. Ne može se utvrditi da je ispitivana kemikalija negativna ako se u pozitivnoj kontroli pravilno ne otkriju i mutanti koji se javljaju rano i mutanti koji se javljaju kasno. Opis kolonije može se upotrijebiti za davanje općih informacija o sposobnosti ispitivane kemikalije da uzrokuje točkaste mutacije i/ili kromosomske pojave (stavak 4.).

Osposobljenost laboratorija

45. Kako bi dokazao da ima dovoljno iskustva u izvođenju testa prije njegove rutinske primjene, laboratorij treba izvesti niz pokusa s referentnim pozitivnim tvarima koje djeluju putem različitih mehanizama (najmanje jedna aktivna s metaboličkom aktivacijom i jedna aktivna bez metaboličke aktivacije, odabrana s popisa tvari iz tablice 1.) te s različitim negativnim kontrolama (uključujući netretirane kulture i različita otapala/nosače). Odgovori pozitivnih i negativnih kontrola trebali bi biti u skladu s literaturom. Taj se zahtjev ne odnosi na laboratorije s iskustvom, odnosno laboratorije s bazom prijašnjih podataka koja je stavljena na raspolaganje u skladu s definicijom iz stavaka 47.–50. Kod testa MLA vrijednosti koje se dobiju i za pozitivne i za negativne kontrole trebaju biti u skladu s preporukama IWGT-a (vidjeti tablicu 2.).
46. Odabir tvari za pozitivnu kontrolu (vidjeti tablicu 1.) trebao bi se ispitati s kratkim i dugim tretiranjima (ako se upotrebljavaju duga tretiranja) u odsustvu metaboličke aktivacije i kratkim tretiranjima u prisustvu metaboličke aktivacije kako bi se dokazala osposobljenost za otkrivanje mutagenih kemikalija, za utvrđivanje djelotvornosti sustava metaboličke aktivacije i za dokazivanje primjerenosti uvjeta za rast stanica tijekom tretiranja, fenotipske ekspresije i selekcije mutanata te postupaka ocjenjivanja. Potrebno je izabrati raspon koncentracija odabranih tvari pri kojima će doći do ponovljivih povećanja u odnosu na pozadinu, koja su povezana s koncentracijom, kako bi se dokazala osjetljivost i dinamički raspon ispitnog sustava.

Podaci o prijašnjim kontrolama

47. Laboratorij bi trebao utvrditi:
- raspon i distribuciju prijašnjih pozitivnih kontrola,
 - raspon i distribuciju prijašnjih negativnih kontrola (netretirane kulture, kontrole s otapalom).
48. Pri prvom bi dobivanju podataka za distribuciju podataka o prijašnjim negativnim kontrolama istodobne negativne kontrole trebale biti u skladu s objavljenim podacima

o negativnim kontrolama. Kako se budu dodavali novi eksperimentalni podaci o distribuciji kontrola, istodobne negativne kontrole trebale bi u idealnom slučaju biti unutar kontrolnih granica od 95 % te distribucije (64. i 65.).

49. Baza podataka o prijašnjim negativnim kontrolama laboratorija trebala bi u početku obuhvaćati najmanje deset pokusa, međutim bilo bi poželjno da se sastoji od najmanje 20 pokusa provedenih u usporedivim pokusnim uvjetima. Laboratoriji bi trebali primjenjivati metode za kontrolu kvalitete, kao što su kontrolni dijagrami (npr. C-dijagrami ili X-stupčasti dijagrami; 65.), kako bi utvrdili koliko su promjenjivi njihovi podaci o pozitivnim i negativnim kontrolama i dokazali da je u njihovu laboratoriju metodologija „pod kontrolom” (66.). Daljnje pojedinosti i preporuke o tome kako izraditi i upotrebljavati prijašnje podatke mogu se pronaći u literaturi (64.).
50. Podaci o negativnim kontrolama trebali bi se sastojati od podataka o učestalosti pojave mutanata u jednoj kulturi ili, po mogućnosti, u ponovljenim kulturama kako je opisano u stavku 27. Istodobne negativne kontrole u idealnom bi slučaju trebale biti unutar kontrolnih granica od 95 % distribucije prijašnjih negativnih kontrola koje se nalaze u bazi podataka laboratorija. Ako se podaci o negativnim kontrolama nalaze izvan kontrolnih granica od 95 %, mogu biti prihvatljivi za uključenje u distribuciju prijašnjih kontrola pod uvjetom da ti podaci nisu ekstremne netipične vrijednosti te da postoje dokazi o tome da je ispitni sustav „pod kontrolom” (vidjeti stavak 49.) i da nema tehničke ili ljudske pogreške.
51. Svaku izmjenu pokusnog protokola trebalo bi razmotriti s obzirom na to jesu li podaci u skladu s postojećim bazama podataka laboratorija o prijašnjim kontrolama. Svaka veća nesukladnost trebala bi dovesti do uspostave nove baze podataka o prijašnjim kontrolama.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Predstavljanje rezultata

52. Predstavljanje podataka i za test MLA i za test TK6 treba uključivati, i za tretirane i kontrolne kulture, podatke potrebne za izračun citotoksičnosti (relativni ukupni rast ili relativna stopa preživljavanja) i učestalosti pojave mutanata, kako je opisano u nastavku.
53. Kod testa MLA treba navesti podatke o pojedinačnim kulturama za relativni rast u suspenziji, relativni ukupni rast, učinkovitost kloniranja u trenutku selekcije mutanata i broj kolonija mutanata (za verziju s agarom) ili broj praznih jažica (za verziju s mikrojažicama). Učestalost pojave mutanata treba izraziti kao broj mutiranih stanica na milijun preživjelih stanica. Ako je odgovor pozitivan, učestalost pojave mutanata u malim i velikim kolonijama (i/ili postotak ukupne učestalosti pojave mutanata) treba

navesti za barem jednu koncentraciju ispitivane kemikalije (obično najviša pozitivna koncentracija) te negativne i pozitivne kontrole. U slučaju negativnog odgovora učestalost pojave mutanata u malim i velikim kolonijama treba navesti za negativnu i pozitivnu kontrolu.

54. Kod testa TK6 podatke o pojedinačnim kulturama treba navesti za relativnu stopu preživljavanja, učinkovitost kloniranja u trenutku selekcije mutanata i broj praznih jažica za mutante koji se javljaju rano i one koji se javljaju kasno. Učestalost pojave mutanata treba izraziti kao broj mutiranih stanica na broj preživjelih stanica, a treba uključivati ukupnu učestalost pojave mutanata te učestalost pojave mutanata (i/ili postotak ukupne učestalosti pojave mutanata) koji se javljaju rano i onih koji se javljaju kasno.

Kriteriji prihvatljivosti

55. I za test MLA i za test TK6 treba ispuniti sljedeće kriterije prije nego što se utvrde ukupni rezultati za određenu ispitivanu kemikaliju:

- provedena su dva pokusna uvjeta (kratko tretiranje s metaboličkom aktivacijom i bez nje – vidjeti stavak 33.), osim ako je jedan doveo do pozitivnih rezultata,
- odgovarajući broj stanica i koncentracija prikladan je za analizu (stavci 27., 34.–36.),
- kriteriji za odabir najveće koncentracije u skladu su s kriterijima opisanima u stavcima 28.–30.

Kriteriji prihvatljivosti za negativne i pozitivne kontrole

56. Analiza velike količine podataka iz testova MLA koju je provela IWGT-ova Stručna skupina za MLA dovela je do međunarodnog konsenzusa u pogledu specifičnih kriterija prihvatljivosti za test MLA (1., 2., 3., 4. i 5.). Stoga se u toj ispitnoj metodi navode specifične preporuke za utvrđivanje prihvatljivosti negativnih i pozitivnih kontrola te za procjenu rezultata pojedinačnih tvari u testu MLA. Baza podataka za test TK6 mnogo je manja te ga stručna skupina nije procjenjivala.
57. Kod testa MLA svaki pokus treba procijeniti s obzirom na to ispunjava li netretirana kontrola/kontrola s otapalom kriterije prihvatljivosti IWGT-ove Stručne skupine za MLA (4. i tablica 2. u nastavku) za: 1. učestalost pojave mutanata (treba napomenuti da se IWGT-ove prihvatljive učestalosti pojave mutanata razlikuju za verzije testa MLA s agarom i mikrojažicama); 2. učinkovitost kloniranja (CE) u trenutku selekcije mutanata i 3. rast u suspenziji (SG) za kontrolu s otapalom (formule potražiti u Dodatku 2.).

Tablica 2.: Kriteriji prihvatljivosti za MLA

Parametar	Metoda s mekim agarom	Metoda s mikrojažicama

Učestalost pojave mutanata	35 – 140 x 10 ⁻⁶	50 – 170 x 10 ⁻⁶
Učinkovitost kloniranja	65–120 %	65–120 %
Rast u suspenziji	8–32 puta (tretiranje od tri do četiri sata) 32–180 puta (tretiranje od 24 sata, ako se provodi)	8–32 puta (tretiranje od tri do četiri sata) 32–180 puta (tretiranje od 24 sata, ako se provodi)

58. Kad je riječ o testu MLA, svaki test treba procijeniti i u pogledu toga ispunjavaju li pozitivne kontrole barem jedan od sljedeća dva kriterija prihvatljivosti koje je razvila stručna skupina IWGT-a:

- pozitivna kontrola trebala bi pokazati apsolutno povećanje ukupne učestalosti pojave mutanata, tj. povećanje veće od pozadinske učestalosti pojave spontanijih mutanata (inducirana učestalost pojave mutanata (IMF)) od najmanje 300 x 10⁻⁶. Najmanje 40 % IMF-a trebalo bi se odraziti u učestalosti pojave mutanata u maloj koloniji,
- pozitivna kontrola pokazuje povećanje učestalosti pojave mutanata u maloj koloniji koje je za najmanje 150 x 10⁻⁶ veće od učestalosti u istodobnoj netretiranoj kontroli/kontroli s otapalom (IMF u malim kolonijama od 150 x 10⁻⁶).

59. Kad je riječ o testu TK6, test će biti prihvatljiv ako se istodobna negativna kontrola smatra prihvatljivom za dodavanje u bazu podataka laboratorija o prijašnjim negativnim kontrolama kako je opisano u stavcima 48.–49. Osim toga, istodobne pozitivne kontrole (vidjeti stavak 32.) trebale bi inducirati odgovore koji su u skladu s onima generiranim u bazi podataka o prijašnjim pozitivnim kontrolama te dovesti do statistički značajnog povećanja u odnosu na istodobnu negativnu kontrolu.

60. Kod oba bi testa gornja granica citotoksičnosti uočene kod pozitivne kontrolne kulture trebala biti ista kao i kod pokusnih kultura. Drugim riječima, relativni ukupni rast ili relativna stopa preživljavanja ne bi trebali biti manji od 10 %. Dovoljno je upotrijebiti jednu koncentraciju (ili jednu od koncentracija pozitivnih kontrolnih kultura ako se upotrebljava više koncentracija) kako bi se dokazalo da su ispunjeni kriteriji prihvatljivosti za pozitivnu kontrolu. Nadalje, učestalost pojave mutanata pozitivne kontrole mora biti unutar prihvatljivog raspona utvrđenog za laboratorij.

Ocjenjivanje i tumačenje rezultata

61. Za test MLA znatan posao u vezi s biološkom relevantnosti i kriterijima za pozitivni odgovor obavila je IWGT-ova stručna skupina za limfome miša (4.). Stoga se u ovoj ispitnoj metodi pružaju specifične preporuke za tumačenje rezultata ispitivanih kemikalija iz testa MLA (vidjeti stavke 62.–64.). Baza podataka za test TK6 mnogo je manja te ga stručna skupina nije procjenjivala. Stoga su preporuke za tumačenja

podataka za test TK6 općenitije (vidjeti stavke 65.–66.). Dodatne preporuke primjenjuju se na oba testa (vidjeti stavke 67.–71.).

MLA

62. Preporučuje se pristup za utvrđivanje pozitivnih i negativnih odgovora kako bi se osiguralo da je povećana učestalost pojave mutanata biološki relevantna. Umjesto statističke analize koja se obično upotrebljava za ostale testove, ovaj se pristup oslanja na upotrebu unaprijed utvrđene inducirane učestalosti pojave mutanata (tj. povećanje učestalosti pojave mutanata veće nego u istodobnoj kontroli), određene kao globalni evaluacijski faktor (GEF), koji se temelji na analizi distribucije podataka o učestalosti pojave mutanata u negativnoj kontroli iz uključenih laboratorija (4.). Kod verzije testa s agarom GEF iznosi 90×10^{-6} , a za verziju testa MLA s mikrojažicama GEF iznosi 126×10^{-6} .
63. Pod uvjetom da su ispunjeni svi kriteriji prihvatljivosti, ispitivana kemikalija smatra se jasno pozitivnom ako je u bilo kojem ispitnom pokusnom uvjetu (vidjeti stavak 33.) povećanje učestalosti pojave mutanata u odnosu na istodobno provedeno pozadinsko mjerenje veće od GEF-a te je povezano s koncentracijom (npr. upotrebom testa trenda). Tada se smatra da ispitivana kemikalija može inducirati mutacije u tom ispitnom sustavu.
64. Pod uvjetom da su ispunjeni svi kriteriji prihvatljivosti, ispitivana kemikalija smatra se jasno negativnom ako u svim ispitnim pokusnim uvjetima (vidjeti stavak 33.) nema odgovora povezanog s koncentracijom ili, ako postoji povećanje učestalosti pojave mutanata, ono nije veće od GEF-a. Tada se smatra da ispitivana kemikalija ne može inducirati mutacije u tom ispitnom sustavu.

TK6

65. Pod uvjetom da su ispunjeni svi kriteriji prihvatljivosti, ispitivana kemikalija smatra se jasno pozitivnom ako je u bilo kojem od ispitanih pokusnih uvjeta (vidjeti stavak 33.):
- najmanje pri jednoj ispitnoj koncentraciji uočeno je statistički značajno povećanje u odnosu na istodobnu negativnu kontrolu,
 - odgovarajući test trenda pokazuje da je povećanje povezano s koncentracijom (vidjeti stavak 33.),
 - bilo koji od rezultata je izvan distribucije podataka o prijašnjim negativnim kontrolama (npr. kontrolne granice od 95 % prema Poissonovoj distribuciji; vidjeti stavak 48.).

Kada su ispunjeni svi ti uvjeti, smatra se da ispitivana kemikalija može inducirati mutacije u tom sustavu ispitivanja. Preporuke za najprikladnije statističke metode nalaze

se u literaturi (66. i 67.).

66. Pod uvjetom da su ispunjeni svi kriteriji prihvatljivosti, ispitivana kemikalija smatra se jasno negativnom ako u svim ispitanim pokusnim uvjetima (vidjeti stavak 33.):

- ni pri jednoj ispitnoj koncentraciji nije uočeno statistički značajno povećanje u odnosu na istodobnu negativnu kontrolu,
- odgovarajući test trenda pokazuje da nema povećanja povezanog s koncentracijom,
- svi su rezultati u okviru distribucije podataka o prijašnjim negativnim kontrolama (npr. kontrolne granice od 95 % prema Poissonovoj distribuciji; vidjeti stavak 48.).

Tada se smatra da ispitivana kemikalija ne može inducirati mutacije u tom ispitnom sustavu.

I za test MLA i za test TK6:

67. Ako se najveća koncentracija temelji na citotoksičnosti, najvećom koncentracijom trebao bi se nastojati ostvariti RTG/RS od 20 do 10 %. Konsenzus je da treba oprezno tumačiti pozitivne rezultate koji se nalaze samo u rasponu RTG-a/RS-a od 20 do 10 % te da se rezultat neće smatrati pozitivnim ako je do povećanja učestalosti pojave mutanata došlo samo kod RTG-a/RS-a od 10 % ili manjeg (ako se procjenjuje) (2. i 59.).

68. Postoje određene okolnosti u kojima dodatne informacije mogu pomoći u utvrđivanju da ispitivana kemikalija nije mutagena ako nema kulture koja pokazuje vrijednost RTG-a od 10 do 20 % RTG-a/RS-a. Te su situacije sažete u nastavku teksta. 1. Ne postoje dokazi o mutagenom učinku (npr. nema odgovora na dozu, nema učestalosti pojave mutanata veće od one koja se opaža kod istodobne negativne kontrole ili u odnosu na prijašnje pozadinske raspone itd.) u nizu podatkovnih točaka od 100 % do 20 % RTG-a/RS-a te postoji barem jedna podatkovna točka u rasponu od 20 do 25 % RTG-a/RS-a. 2. Ne postoje dokazi o mutagenom učinku (npr. nema odgovora na dozu, nema učestalosti pojave mutanata veće od one koja se opaža kod istodobne negativne kontrole ili u odnosu na prijašnje pozadinske raspone itd.) u nizu podatkovnih točaka od 100 % do 25 % RTG-a/RS-a te postoji i negativna podatkovna točka koja je malo niža od 10 % RTG-a/RS-a. U te dvije situacije može se zaključiti da je ispitivana kemikalija negativna.

69. Jasno pozitivan ili negativan odgovor nije potrebno provjeravati.

70. Ako odgovor nije ni jasno pozitivan ni jasno negativan kako je prethodno opisano i/ili kako bi se pridonijelo utvrđivanju biološke relevantnosti rezultata, podatke bi trebalo ocjenjivati na temelju stručne prosudbe i/ili daljnjih istraživanja. Moglo bi biti korisno ponoviti pokus, eventualno u izmijenjenim pokusnim uvjetima (npr. razmak između koncentracija kako bi se povećala vjerojatnost dobivanja podatkovnih točaka u

rasponu od 10 do 20 % RTG-a/RS-a, upotreba drugih uvjeta metaboličke aktivacije (tj. koncentracija S9 ili podrijetlo S9) i trajanje tretiranja).

71. U rijetkim slučajevima, čak i nakon dodatnih istraživanja, skup podataka neće omogućiti donošenje zaključka o tome je li rezultat pozitivan ili negativan. Stoga bi se trebalo zaključiti da je odgovor na ispitivanu kemikaliju dvosmislen (tumači se da je jednako vjerojatno da je pozitivan ili negativan).

IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

72. Izvješće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Ispitivana kemikalija:

- izvor, broj serije, rok uporabe, ako su dostupni,
- stabilnost ispitivane kemikalije, ako je poznata,
- topljivost i stabilnost ispitivane kemikalije u otapalu, ako su poznate,
- izmjerene vrijednosti za pH, osmolalnost i taloženje u mediju za uzgoj kulture u koju je dodana ispitivana kemikalija, prema potrebi.

Tvar s jednim sastojkom:

- fizički izgled, topljivost u vodi i druga relevantna fizikalno-kemijska svojstva,
- kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv, CAS broj, SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula, čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.

Tvari s više sastojaka, UVCB tvari i smjese:

- opis (koliko je to moguće) kemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativnog udjela i relevantnih fizikalno-kemijskih svojstava sastojaka.

Otapalo:

- obrazloženje odabira otapala,
- postotak otapala u konačnom mediju za uzgoj kulture.

Stanice:

za laboratorijske glavne kulture:

- vrsta i izvor stanica te prethodna upotreba u ispitnom laboratoriju,
- kariotipna svojstva i/ili modalni broj kromosoma,
- metode održavanja staničnih kultura,

- odsustvo mikoplazme,
- vremena udvostručivanja stanica.

Ispitni uvjeti:

- obrazloženje odabira koncentracija i broja staničnih kultura, uključujući, npr. podatke o citotoksičnosti i ograničenja topljivosti,
- sastav medija, koncentracija CO₂, razina vlažnosti,
- koncentracija ispitivane kemikalije izražena kao konačna koncentracija u mediju za uzgoj kulture (npr. µg ili mg/ml ili mM medija za uzgoj kulture),
- koncentracija (i/ili volumen) otapala i ispitivane kemikalije koji su dodani mediju za uzgoj kulture,
- temperatura inkubacije,
- vrijeme inkubacije,
- trajanje tretiranja,
- gustoća stanica za vrijeme tretiranja,
- vrsta i sastav sustava metaboličke aktivacije (izvor S9, metoda pripreme mješavine S9, koncentracija ili volumen mješavine S9 i S9 u konačnom mediju za uzgoj kulture, kontrole kvalitete S9),
- tvari za pozitivnu i negativnu kontrolu, konačne koncentracije za svaki uvjet tretiranja,
- dužina razdoblja ekspresije (uključujući broj nasadenih stanica te režim uzgoja supkultura i dodavanja hranjivih tvari, ako je primjereno),
- identitet selektivnog agensa i njegova koncentracija,
- kod testa MLA treba navesti primijenjenu metodu (agar ili mikrojažice),
- kriteriji prihvatljivosti testova,
- metode korištene za prebrojavanje vijabilnih i mutiranih stanica,
- metode mjerenja citotoksičnosti,
- sve dodatne informacije koje se odnose na citotoksičnost i upotrijebljenu metodu,
- trajanje inkubacije nakon nasađivanja,
- definicija kolonija kod kojih se razmatra veličina i vrsta (uključujući kriterije za „male” i „velike” kolonije, ako je primjereno),
- kriteriji prema kojima se studija smatra pozitivnom, negativnom ili dvosmislenom,

- metode upotrijebljene za određivanje pH-vrijednosti i osmolalnosti, ako se provode, te za određivanje taloženja, ako je relevantno.

Rezultati:

- broj tretiranih stanica i broj supkultiviranih stanica za svaku kulturu,
- parametri toksičnosti (RTG za MLA i RS za TK6),
- znakovi taloženja i vrijeme utvrđivanja,
- broj stanica nasadenih u selektivni i neselektivni medij,
- broj kolonija u neselektivnom mediju i broj otpornih kolonija u selektivnom mediju te povezana učestalost pojave mutanata,
- razvrstavanje kolonija po veličini za negativne i pozitivne kontrole, a ako je ispitivana kemikalija pozitivna, najmanje jedna koncentracija i povezane učestalosti pojave mutanata,
- odnos koncentracije i odgovora, ako je moguće,
- podaci o istodobnim negativnim kontrolama (otapalo) i pozitivnim kontrolama (koncentracije i otapala),
- podaci o prijašnjim negativnim (otapalo) i pozitivnim kontrolama (koncentracije i otapala) s rasponima, srednjim vrijednostima i standardnim devijacijama, broj ispitivanja na kojima se temelje kontrole iz prijašnjih ispitivanja,
- statističke analize (za pojedinačne kulture i objedinjena ponavljanja ako je primjereno) i p-vrijednosti, ako postoje, te procjena GEF-a za test MLA.

Rasprava o rezultatima

Zaključak

LITERATURA

1. Moore, M.M., Honma, M., Clements, J. (Rapporteur), Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cole, J., Gollapudi, B., Harrington-Brock, K., Mitchell, A., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., San, R., Shimada, H. and Stankowski, L.F. Jr. (2000). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus (TK) Gene Mutation Assay: International Workshop on Genotoxicity Test Procedures (IWGTP) Workgroup Report, *Environ. Mol. Mutagen.*, 35 (3): 185.–190.
2. Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Harrington-Brock, K., Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Collard, D., Fellows, M., Flanders, K., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Kraycer, J., McEnaney, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Oliver, Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Shimada, H. and Stankowski, L.F. Jr. (2002). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: Follow-Up International Workshop on Genotoxicity Test Procedures, New Orleans, Louisiana, (travanj 2000.), *Environ. Mol. Mutagen.*, 40 (4): 292.–299.
3. Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Delongchamp, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A., Wakuri, S. and Yoshimura, I. (2003). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: International Workshop (Plymouth, UK) on Genotoxicity Test Procedures Workgroup Report, *Mutation Res.*, 540: 127.–140.
4. Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Delongchamp, R., Durward, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Lloyd, M., Majeska, J., Myhr, B., O'Donovan, M., Omori, T., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A.K., Van Goethem, F., Wakuri, S. and Yoshimura, I. (2006). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Gene Mutation Assay: Follow-Up Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Tests – Aberdeen, Scotland, 2003 – Assay Acceptance Criteria, Positive Controls, and Data Evaluation, *Environ. Mol. Mutagen.*, 47 (1): 1.–5.
5. Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Clay, P., Doppalapudi, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Muster, W., Pant, K., Kidd, D.A., Lorge, E., Lloyd, M., Myhr, B., O'Donovan, M., Riach, C., Stankowski, L.F. Jr., Thakur A.K. and Van Goethem, F. (2007). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Mutation Assay: Meeting of the

International Workshop on Genotoxicity Testing, San Francisco, 2005, Recommendations for 24-h Treatment, *Mutation. Res.*, 627 (1): 36.–40.

6. OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Pariz.
7. Fellows M.D., Luker, T., Cooper, A. and O'Donovan, M.R. (2012). Unusual Structure-Genotoxicity Relationship in Mouse Lymphoma Cells Observed with a Series of Kinase Inhibitors. *Mutation, Res.*, 746 (1): 21.–28.
8. Honma, M., Momose, M., Sakamoto, H., Sofuni, T. and Hayashi, M. (2001). Spindol Poisons Induce Allelic Loss in Mouse Lymphoma Cells Through Mitotic Non-Disjunction. *Mutation Res.*, 493 (1-2): 101.–114.
9. Wang, J., Sawyer, J.R., Chen, L., Chen, T., Honma, M., Mei, N. and Moore, M.M. (2009). The Mouse Lymphoma Assay Detects Recombination, Deletion, and Aneuploidy, *Toxicol. Sci.*, 109 (1): 96.–105.
10. Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A., and Hozier, J.C. (1990). Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. *Proc. National. Academy. Sci. SAD*, 87 (1): 51.–55.
11. Hozier, J., Sawyer, J., Moore, M., Howard, B. and Clive, D. (1981). Cytogenetic Analysis of the L5178Y/TK^{+/-} Leads to TK^{-/-} Mouse Lymphoma Mutagenesis Assay System, *Mutation Res.*, 84 (1): 169.–181.
12. Hozier, J., Sawyer, J., Clive, D. and Moore, M.M. (1985). Chromosome 11 Aberrations in Small Colony L5178Y TK^{-/-} Mutants Early in their Clonal History, *Mutation Res.*, 147 (5): 237.–242.
13. Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. and Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFTr) Mutants of L5178Y/TK^{+/-} Mouse Lymphoma Cells. *Mutation Res.*, 151 (1): 161.–174.
14. Liber H.L., Call K.M. and Little J.B. (1987). Molecular and Biochemical Analyses of Spontaneous and X-Ray-Induced Mutants in Human Lymphoblastoid Cells. *Mutation Res.*, 178 (1): 143.–153.
15. Li C.Y., Yandell D.W. and Little J.B. (1992). Molecular Mechanisms of Spontaneous and Induced Loss of Heterozygosity in Human Cells *In Vitro*. *Somat. Cell Mol. Genet.*, 18 (1): 77.–87.

16. Honma M., Hayashi M. and Sofuni T. (1997). Cytotoxic and Mutagenic Responses to X-Rays and Chemical Mutagens in Normal and P53-Mutated Human Lymphoblastoid Cells. *Mutation Res.*, 374 (1): 89.–98.
17. Honma, M., Momose, M., Tanabe, H., Sakamoto, H., Yu, Y., Little, J.B., Sofuni, T. and Hayashi, M. (2000). Requirement of Wild-Type P53 Protein for Maintenance of Chromosomal Integrity. *Mol. Carcinogen.*, 28 (4): 203.–14.
18. Amundson S.A. and Liber H.L. (1992). A Comparison of Induced Mutation at Homologous Alleles of the TK Locus in Human Cells. II. Molecular Analysis of Mutants. *Mutation Res.*, 267 (1): 89.–95.
19. Schisler M.R., Moore M.M. and Gollapudi B.B. (2013). *In Vitro* Mouse Lymphoma (L5178Y TK^{+/–}-3.7.2C) Forward Mutation Assay. In *Protocols in Genotoxicity Assessment* A. Dhawan and M. Bajpayee (Eds.), Springer Protocols, Humana Press: 27.–50.
20. Long, L.H., Kirkland, D., Whitwell, J. and Halliwell, B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, *Mutation Res.*, 634 (1-2): 177.–183.
21. Nesslany, F., Simar-Meintieres, S., Watzinger, M., Talahari, I. and Marzin, D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. *Environ. Mol. Mutagen.*, 49 (6): 439.–452.
22. Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion Concentrations. *Environ. Mutagen.*, 8 (6): 879.–886.
23. Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. *Mutation Res.*, 268 (2): 297.–305.
24. Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M.Jr, Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Res.*, 257: 147.–204.
25. Wang J., Heflich R.H. and Moore M.M. (2007). A Method to Distinguish Between the *De Novo* Induction of Thymidine Kinase Mutants and the Selection of Pre-Existing Thymidine Kinase Mutants in the Mouse Lymphoma Assay. *Mutation Res.*, 626 (1-2): 185.–190.
26. Fischer, G.A. (1958). Studies on the Culture of Leukemic Cells *In Vitro*. *Ann. N.Y. Academy Sci.*, 76: 673.–680.

27. Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson, A.G. and Brown, M.M.M. (1979). Validation and Characterization of the L5178Y/TK^{+/-} - Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. *Mutation Res.*, 59(1): 61.–108.
28. Sawyer, J., Moore, M.M., Clive, D. and Hozier, J. (1985). Cytogenetic Characterization of the L5178Y TK^{+/-} 3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, *Mutation Res.*, 147 (5): 243.–253.
29. Sawyer J.R., Moore M.M. and Hozier J.C. (1989). High-Resolution Cytogenetic Characterization of the L5178Y TK^{+/-} Mouse Lymphoma Cell Line, *Mutation Res.*, 214 (2): 181.–193.
30. Sawyer, J.R., Binz, R.L., Wang, J. and Moore, M.M. (2006). Multicolor Spectral Karyotyping of the L5178Y TK^{+/-}-3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, *Environ. Mol. Mutagen.*, 47 (2): 127.–131.
31. Fellows, M.D., McDermott, A., Clare, K.R., Doherty, A. and Aardema, M.J. (2014). The Spectral Karyotype of L5178Y TK^{+/-} Mouse Lymphoma Cells Clone 3.7.2C and Factors Affecting Mutant Frequency at the Thymidine Kinase (TK) Locus in the Microtitre Mouse Lymphoma Assay, *Environ. Mol. Mutagen.*, 55 (1): 35.–42.
32. Storer, R.D., Jraynak, A.R., McKelvey, T.W., Elia, M.C., Goodrow, T.L. and DeLuca, J.G. (1997). The Mouse Lymphoma L5178Y TK^{+/-} Cell Line is Heterozygous for a Codon 170 Mutation in the P53 Tumor Suppressor Gene. *Mutation. Res.*, 373 (2): 157.–165.
33. Clark L.S., Harrington-Brock, K., Wang, J., Sargent, L., Lowry, D., Reynolds, S.H. and Moore, M.M. (2004). Loss of P53 Heterozygosity is not Responsible for the Small Colony Thymidine Kinase Mutant Phenotype in L5178Y Mouse Lymphoma Cells. *Mutagen.*, 19 (4): 263.–268.
34. Skopek T.R., Liber, H.L., Penman, B.W. and Thilly, W.G. (1978). Isolation of a Human Lymphoblastoid Line Heterozygous at the Thymidine Kinase Locus: Possibility for a Rapid Human Cell Mutation Assay. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 84 (2): 411.–416.
35. Honma M. (2005). Generation of Loss of Heterozygosity and its Dependency on P53 Status in Human Lymphoblastoid Cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, 45 (2-3): 162.–176.
36. Xia, F., Wang, X., Wang, Y.H., Tsang, N.M., Yandell, D.W., Kelsey, K.T. and Liber, H.L. (1995). Altered P53 Status Correlates with Differences in Sensitivity to Radiation-Induced Mutation and Apoptosis in Two Closely Related Human Lymphoblast Lines. *Cancer. Res.*, 55 (1): 12.–15.

37. Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, A. Sutter, D.J. Kirkland (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Rukopis u pripremi).
38. Lloyd M. and Kidd D. (2012). The Mouse Lymphoma Assay. Springer Protocols: Methods in Molecular Biology 817, Genetic Toxicology Principles and Methods, ed. Parry and Parry, Humana Press. ISBN, 978-1-61779-420-9, 35.–54.
39. Mei N., Guo X. and Moore M.M. (2014). Methods for Using the Mouse Lymphoma Assay to Screen for Chemical Mutagenicity and Photo-Mutagenicity. U: Optimization in Drug Discover: *In Vitro* Methods: Yan Z and Caldwell (Eds), 2nd Edition, GW; Humana Press, Totowa, NJ.
40. Liber H.L. and Thilly W.G. (1982). Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploidhuman Lymphoblasts. *Mutation Res.*, 94 (2): 467.–485.
41. Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Hay, R., Merten, OW., Price, A., Schechtman, L., Stacey, G. and Stokes, W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. *ATLA*, 33 (3): 261.–287.
42. Moore M.M. and Howard B.E. (1982). Quantitation of Small Colony Trifluorothymidine-Resistant Mutants of L5178Y/TK+/- Mouse Lymphoma Cells in RPMI-1640 Medium, *Mutation Res.*, 104 (4-5): 287.–294.
43. Ames B.N., McCann J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 31 (6): 347.–364.
44. Maron D.M. and Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 113 (3-4): 173.–215.
45. Natarajan, A.T., Tate, A.D, Van Buul, P.P.W., Meijers, M. and De Vogel, N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens After Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. *Mutation Res.*, 37 (1): 83.–90.

46. Matsuoka A., Hayashi M. and Ishidate M. Jr. (1979). Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*. *Mutation Res.*, 66 (3): 277.–290.
47. Ong T.M., *et al.* (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, 4 (1): 55.–65.
48. Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. *Mutagen.*, 7 (3): 175.–177.
49. Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. U: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. de Serres F.J., *et al.* (Eds, Elsevier, North-Holland, str. 85.–88.
50. Galloway S.M., *et al.* (1994). Report from Working Group on *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations. *Mutation Res.*, 312 (3): 241.–261.
51. Johnson T.E., Umbenhauer D.R. and Galloway S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/Beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, *Environ. Mol. Mutagen.*, 28 (1): 51.–59.
52. UNEP (2001). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP).
53. Krahn D.F., Barsky F.C. and McCooey K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. U: *Genotoxic Effects of Airborne Agents* Tice R.R., Costa D.L. and Schaich K.M. (Eds.) New York, Plenum, str. 91.–103.
54. Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. *Environ. Mutagen.*, 5 (6): 795.–801.
55. Asakura M., Sasaki T., Sugiyama T., Arito H., Fukushima, S. and Matsushima, T. (2008). An Improved System for Exposure of Cultured Mammalian Cells to Gaseous Compounds in the Chromosomal Aberration Assay. *Mutation Res.*, 652 (2): 122.–130.

56. Arlett C.F., *et al.* (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. U: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Ed.), Cambridge University Press, str. 66.–101.
57. Morita T., Honma M. and Morikawa K. (2012). Effect of Reducing the Top Concentration Used in the *In Vitro* Chromosomal Aberration Test in CHL Cells on the Evaluation of Industrial Chemical Genotoxicity. *Mutation Res.*, 741 (1-2): 32.–56.
58. Brookmire L., Chen J.J. and Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay. *Environ. Mol. Mutagen.*, 54 (1): 36.–43.
59. USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Dostupno na: [<https://www.federalregister.gov/a/2012-13774>].
60. Honma M. and Hayashi M. (2011). Comparison of *In Vitro* Micronucleus and Gene Mutation Assay Results for P53-Competent Versus P53-Deficient Human Lymphoblastoid Cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, 52 (5): 373.–384.
61. Moore-Brown, M.M., Clive, D., Howard, B.E., Batson, A.G. and Johnson, K.O. (1981). The Utilization of Trifluorothymidine (TFT) to Select for Thymidine Kinase-Deficient (TK^{-/-}) Mutants from L5178Y/TK^{+/-} Mouse Lymphoma Cells, *Mutation Res.*, 85 (5): 363.–378.
62. Liber H.L., Yandell D.W. and Little J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HRPT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK locus. *Mutation Res.*, 216 (1): 9.–17.
63. Furth E.E., Thilly, W.G., Penman, B.W., Liber, H.L. and Rand, W.M. (1981). Quantitative Assay for Mutation in Diploid Human Lymphoblasts Using Microtiter Plates. *Anal. Biochem.*, 110 (1): 1.–8.
64. Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H. J. and Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, *Mutation Res.*, 723 (2): 87.–90.
65. Ryan T.P. (2000). Statistical Methods for Quality Improvement. John Wiley and Sons, New York 2nd Edition.

66. OECD (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 199), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
67. Fleiss J.L., Levin B. and Paik M.C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

Dodatak 1.

DEFINICIJE

Aneugen: svaka kemikalija ili postupak koji u interakciji s elementima mitotičkog i mejotičkog ciklusa diobe stanice uzrokuje aneuploidiju u stanicama ili organizmima.

Aneuploidija: svako odstupanje od uobičajenog diploidnog (ili haploidnog) broja kromosoma za jedan kromosom ili više njih, ali ne za cijelu skupinu ili skupine kromosoma (poliploidija).

Mutageni supstitucije baznih parova: kemikalije koje uzrokuju supstituciju baznih parova u DNK-u.

Kemikalija: tvar ili smjesa.

Učinkovitost kloniranja: postotak stanica nasađenih pri malenoj gustoći koje mogu narasti u koloniju koja se može prebrojiti.

Klastogen: svaka kemikalija ili proces koji uzrokuju strukturne kromosomske aberacije u populacijama stanica ili organizama.

Citotoksičnost: za testove obuhvaćene ovom ispitnom metodom citotoksičnost se definira kao smanjenje relativnog ukupnog rasta (RTG) za MLA ili relativne stope preživljavanja (RS) za TK6.

Napredna mutacija: genska mutacija od roditeljskog tipa u mutantni oblik, koja uzrokuje promjenu ili gubitak enzimskog djelovanja ili funkcije kodiranog proteina.

Mutageni pomaka okvira očitavanja (frameshift mutageni): kemikalije koje uzrokuju adiciju ili deleciju jednog baznog para ili više njih u molekuli DNK.

Genotoksičnost: opći izraz kojim su obuhvaćene sve vrste oštećenja DNK ili kromosoma uključujući lomove DNK, adukte, premještanja, mutacije, aberacije kromosoma i aneuploidiju. Ne dovode sve vrste genotoksičnih učinaka do mutacija ili trajnog oštećenja kromosoma.

Mitotska rekombinacija: rekombinacija između homolognih kromatida koja može dovesti do indukcije lomova oba lanca DNK ili gubitka heterozigotnosti, a do koje dolazi tijekom mitoze.

Mutagen: uzrokuje nasljednu promjenu slijeda (sljedova) parova baza DNK u genima ili strukture kromosoma (kromosomske aberacije).

Učestalost pojave mutanata (MF): broj uočenih mutiranih stanica podijeljen brojem vijabilnih stanica.

Vrijeme fenotipske ekspresije: vrijeme nakon tretiranja tijekom kojeg se genetske

modifikacije fiksiraju unutar genoma i postojeći genski produkti odstranjuju do te mjere da se mijenja fenotipsko svojstvo.

Relativna stopa preživljavanja (RS): relativna stopa preživljavanja upotrebljava se kao mjera citotoksičnosti povezane s tretiranjem u testu TK6. To je relativna učinkovitost kloniranja (CE) stanica koje se nasade odmah nakon što ih se tretira, prilagođeno za mogući gubitak stanica tijekom tretiranja u odnosu na učinkovitost kloniranja negativne kontrole.

Relativni rast u suspenziji (RSG): kod testa MLA, relativni ukupni rast ispitivane kulture u suspenziji tijekom dva dana u usporedbi s ukupnim rastom negativne kontrole/kontrole s otapalom u suspenziji tijekom dva dana (Clive i Spector, 1975.). Relativni rast u suspenziji treba uključivati relativni rast ispitivane kulture u usporedbi s negativnom kontrolom/kontrolom s otapalom tijekom razdoblja tretiranja.

Relativni ukupni rast (RTG): relativni ukupni rast upotrebljava se kao mjera citotoksičnosti povezane s tretiranjem u testu MLA. To je mjera relativnog (u odnosu na kontrolu s nosačem) rasta ispitivanih kultura tijekom faza tretiranja, dvodnevne ekspresije i kloniranja selekcije mutanata u testu. Relativni ukupni rast svake ispitivane kulture množi se relativnom učinkovitošću kloniranja ispitivane kulture u trenutku selekcije mutanata i izražava se u odnosu na učinkovitost kloniranja negativne kontrole/kontrole s otapalom (Clive i Spector, 1975.).

Frakcije jetre S9: supernatant homogenata jetre centrifugiran na 9 000 g, tj. ekstrakt sirove jetre.

Mješavina S9: mješavina frakcije jetre S9 i kofaktora potrebnih za djelovanje metaboličkih enzima.

Rast u suspenziji (SG): multiplikacijski faktor povećanja broja stanica tijekom faza tretiranja i ekspresije testa MLA. Kod kratkog tretiranja (tri ili četiri sata) rast u suspenziji računa se tako da se multiplikacijski faktor povećanja prvog dana pomnoži s multiplikacijskim faktorom povećanja drugog dana. Ako se upotrebljava 24-satno tretiranje, rast u suspenziji računa se tako da se multiplikacijski faktor povećanja tijekom 24-satnog tretiranja pomnoži multiplikacijskim faktorima povećanja prvog i drugog dana.

Kontrola s otapalom: opći izraz za označivanje kontrolnih kultura kojima je dodano jedino otapalo koje je upotrijebljeno za otapanje ispitivane kemikalije.

Ispitivana kemikalija: svaka tvar ili smjesa koja se ispituje ovom ispitnom metodom.

Netretirane kontrole: netretirane kontrole kulture su koje nisu ni s čim tretirane (tj. ni ispitivanom kemikalijom ni otapalom), ali se obrađuju na isti način kao kulture tretirane ispitivanom kemikalijom.

Dodatak 2.

FORMULE

Citotoksičnost

Za obje verzije testa MLA (s agarom i mikrojažicama)

Citotoksičnost se definira kao relativni ukupni rast (RTG), što uključuje relativni rast u suspenziji (RSG) tijekom dvodnevnog razdoblja ekspresije i relativnu učinkovitost kloniranja (RCE) dobivenu u trenutku selekcije mutanata. RTG, RSG i RCE izražavaju se kao postotak.

Izračun RSG-a: rast u suspenziji jedan (SG_1) stopa je rasta od nultog do prvog dana (koncentracija stanica prvog dana/koncentracija stanica nultog dana), a rast u suspenziji dva (SG_2) stopa je rasta od prvog do drugog dana (koncentracija stanica drugog dana/koncentracija stanica prvog dana). RSG je ukupni SG ($SG_1 \times SG_2$) za tretiranu kulturu u usporedbi s netretiranom kontrolom/kontrolom s otapalom. To jest: $RSG = [SG_{1(test)} \times SG_{2(test)}] / [SG_{1(kontrola)} \times SG_{2(kontrola)}]$. SG_1 treba izračunati iz početne koncentracije stanica koja je upotrijebljena na početku tretiranja stanica. Time se uzima u obzir bilo kakva diferencijalna citotoksičnost do koje dolazi u ispitivanim kulturama tijekom tretiranja stanica.

RCE je relativna učinkovitost kloniranja ispitivane kulture u usporedbi s relativnom učinkovitošću kloniranja netretirane kontrole/kontrole s otapalom dobivena u trenutku selekcije mutanata.

Relativni ukupni rast (RTG): $RTG = RSG \times RCE$

TK6

Relativna stopa preživljavanja (RS):

Citotoksičnost se procjenjuje relativnom stopom preživljavanja, tj. učinkovitošću kloniranja stanica koje se nasade odmah nakon tretiranja, prilagođeno za mogući gubitak stanica tijekom tretiranja u odnosu na učinkovitost kloniranja u negativnim kontrolama (kojima se dodjeljuje stopa preživljavanja od 100 %). Prilagodba za gubitak stanica tijekom tretiranja može se izračunati na sljedeći način:

$$\text{Prilagođeni CE} = CE \times \frac{\text{Broj stanica na kraju tretiranja}}{\text{Broj stanica na početku tretiranja}}$$

Relativna stopa preživljavanja za kulturu tretiranu ispitivanom kemikalijom računa se na sljedeći način:

$$RS = \frac{\text{Prilagođeni CE u tretiranoj kulturi}}{\text{Prilagođeni CE u kontroli s otapalom}} \times 100$$

Učestalost pojave mutanata za testove MLA i TK6

Učestalost pojave mutanata (MF) učinkovitost je kloniranja kolonija mutanata u selektivnom mediju (CE_M), prilagođeno s obzirom na učinkovitost kloniranja u neselektivnom mediju u trenutku selekcije mutanata (CE_V). Drugim riječima, $MF = CE_M/CE_V$. Izračun tih dviju učinkovitosti kloniranja za metode kloniranja s agarom i mikrojažicama opisan je u nastavku.

Verzija testa MLA s agarom: u verziji testa MLA s mekim agarom broj kolonija na ploči za selekciju mutanata (C_M) i broj kolonija na neprobranoj ploči ili ploči za učinkovitost kloniranja (broj vijabilnih stanica) (C_V) dobiva se izravnim brojanjem klonova. Ako se 600 stanica nasadi na ploče za selekciju mutanata (CE_M) za učinkovitost kloniranja (CE) te na neprobrane ploče ili ploče za učinkovitost kloniranja (broj vijabilnih stanica) (CE_V) te se za selekciju mutanata upotrijebi 3×10^6 stanica,

$$CE_M = C_M / (3 \times 10^6) = (C_M / 3) \times 10^{-6}$$

$$CE_V = C_V / 600$$

Verzija testova MLA i TK6 s mikrojažicama: u verziji testa MLA C_M i C_V utvrđuju se kao umnožak ukupnog broja mikrojažica (TW) i vjerojatnog broja kolonija po jažici (P) na pločama s mikrojažicama.

$$C_M = P_M \times TW_M$$

$$C_V = P_V \times TW_V$$

Od nulte točke Poissonove distribucije (Furth *et al.*, 1981.) P se određuje kao

$$P = -\ln (EW / TW)$$

Pri tom EW označava prazne jažice, a TW ukupne jažice. Zato je

$$CE_M = C_M / T_M = (P_M \times TW_M) / T_M$$

$$CE_V = C_V / T_V = (P_V \times TW_V) / T_V$$

Kod verzije testa MLA s mikrojažicama učestalost pojave mutanata u malim i velikim kolonijama računat će se na isti način, upotrebom odgovarajućeg broja praznih jažica za male i velike kolonije.

Kod testa TK6 učestalost pojave mutanata u malim i velikim kolonijama temelji se na mutantima koji se javljaju rano i onima koji se javljaju kasno.

B.68. IN VITRO ISPITNA METODA S KRATKIM VREMENOM IZLAGANJA ZA UTVRĐIVANJE: i. KEMIKA LIJA KOJE INDUCIRAJU TEŠKU OZLJEDU OKA I ii. KEMIKA LIJA KOJE NIJE POTREBNO RAZVRSTATI S OBZIROM NA NADRAŽIVANJE OKA ILI TEŠKU OZLJEDU OKA

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 491 (2017.). *In vitro* ispitna metoda s kratkim vremenom izlaganja (STE) jest *in vitro* metoda koja se može upotrebljavati u određenim okolnostima i uz specifična ograničenja za razvrstavanje i označivanje kemikalija (tvari i smjese) koje induciraju tešku ozljedu oka s obzirom na opasnosti te onih za koje nije potrebno razvrstavanje s obzirom na tešku ozljedu oka ili nadraživanje oka, kako je utvrđeno Globalno usklađenim sustavom razvrstavanja i označivanja kemikalija (GHS) Ujedinjenih naroda (UN) (1.) i Uredbom (EZ) br. 1272/2008 o razvrstavanju, označivanju i pakiranju tvari i smjesa (CLP) Europske unije¹.
2. Dulji niz godina potencijal opasnosti kemikalija za oko ocjenjivao se prvenstveno upotrebom *in vivo* ispitivanja na oku kunića (ispitna metoda B.5. (8.), ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 405). Opće je prihvaćena činjenica da se u doglednoj budućnosti *in vivo* ispitivanje na oku kunića neće moći potpuno zamijeniti nijednim alternativnim pojedinačnim *in vitro* ispitivanjem za predviđanje različitih kemijskih razreda u punom rasponu teških ozljeda oka/nadraživanja oka. Međutim, kao potpuna zamjena za ispitivanje na oku kunića mogle bi se primjenjivati strateške kombinacije alternativnih ispitnih metoda u okviru strategije (višerazinskog) ispitivanja (2.). Pristup odozgo prema dolje osmišljen je za ispitivanje kemikalija za koje se na temelju postojećih informacija može očekivati da imaju veliki potencijal za nadražujuće djelovanje ili da induciraju teške ozljede oka. Nasuprot tome, pristup odozdo prema gore osmišljen je za ispitivanje kemikalija za koje se na temelju postojećih informacija može očekivati da ne izazivaju dovoljno nadraživanje oka da bi ih se moralo razvrstati. Iako se ispitna metoda STE ne smatra potpunom zamjenom za *in vivo* ispitivanje na oku kunića, primjerena je za upotrebu kao dio strategije višerazinskog ispitivanja za regulatorno razvrstavanje i označivanje, kao što je pristup odozgo prema dolje/odozdo prema gore, kako bi se bez daljnjeg ispitivanja utvrdile: i. kemikalije koje induciraju tešku ozljedu oka (kategorija 1. sustava UN GHS/CLP-a) i

¹ Uredba (EZ) br. 1272/2008 Europskog parlamenta i Vijeća od 16. prosinca 2008. o razvrstavanju, označivanju i pakiranju tvari i smjesa, o izmjeni i stavljanju izvan snage Direktive 67/548/EEZ i Direktive 1999/45/EZ i o izmjeni Uredbe (EZ) br. 1907/2006, SL L 353/1, 31.12.2008.

- ii. kemikalije (pri čemu se isključuju vrlo hlapljive tvari i sve kemikalije u krutom stanju osim površinski aktivnih tvari) koje nije potrebno razvrstati u pogledu nadraživanja ili teške ozljede oka (bez kategorije prema sustavu UN GHS/CLP-u) (1. i 2.). Međutim, kemikalija za koju se ispitnom metodom STE ne predviđa ni da inducira tešku ozljedu oka (kategorija 1. sustava UN GHS/CLP-a) ni da je bez kategorije prema sustavu UN GHS/CLP-u (ne inducira ni teške ozljede oka ni nadraživanje oka) morala bi se dodatno ispitati kako bi se utvrdilo konačno razvrstavanje. Nadalje, prije primjene ispitne metode STE u okviru pristupa odozdo prema gore u skladu s drugim shemama razvrstavanja osim sustava UN GHS/CLP-a trebalo bi se savjetovati s odgovarajućim regulatornim tijelima. Odabir najprimjerenije ispitne metode i upotrebu te ispitne metode treba razmotriti u kontekstu Smjernica OECD-a o integriranim pristupima ispitivanju i procjeni za teške ozljede oka i nadraživanje oka (14.).
3. Svrha je ove ispitne metode opisati postupke koji se primjenjuju za ocjenjivanje potencijala opasnosti ispitivane kemikalije za oko na temelju njezine sposobnosti induciranja citotoksičnosti u ispitnoj metodi s kratkim vremenom izlaganja. Citotoksični učinak kemikalija na epitelne stanice rožnice važan je način djelovanja (MOA) koji dovodi do oštećenja epitela rožnice i nadraživanja oka. Vijabilnost stanica u ispitnoj metodi STE procjenjuje se kvantitativnim mjerenjem nakon što se iz stanica ekstrahira sol plavog formazana koju proizvode žive stanice enzimskom konverzijom vitalne boje MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid), poznate i kao tiazolil plavo tetrazolijev bromid (3.). Dobivena vijabilnost stanica uspoređuje se s kontrolom s otapalom (relativna vijabilnost) i upotrebljava za procjenu potencijala opasnosti ispitivane kemikalije za oko. Ispitivana kemikalija razvrstava se u kategoriju 1. sustava UN GHS-a/CLP-a ako i koncentracija od 5 % i 0,05 % rezultiraju vijabilnošću stanica od 70 % ili manjom ($\leq$). Nasuprot tome, predviđa se da je kemikalija bez kategorije prema sustavu UN GHS/CLP-u ako i koncentracija od 5 % i 0,05 % rezultiraju vijabilnošću stanica većom od ($>$) 70 %.
4. U ovoj se ispitnoj metodi izraz „ispitivana kemikalija” upotrebljava za označivanje onoga što se ispituje te se ne odnosi na primjenjivost ispitne metode STE za ispitivanje tvari i/ili smjesa. Definicije su navedene u Dodatku.

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

5. Ova se ispitna metoda temelji na protokolu koji je razvilo društvo Kao Corporation (4.) i koji je bio predmet dviju različitih validacijskih studija: jednu je proveo Validacijski odbor JSAAE-a (Japansko društvo za alternative pokusima na životinjama) (5.), a drugu JaCVAM (Japanski centar za validaciju alternativnih metoda) (6.). Stručnu reviziju proveo je NICEATM/ICCVAM na temelju izvješća validacijskih studija i osnovnih dokumenata za preispitivanje o ispitnoj metodi (7).

6. Kada su se upotrijebili za utvrđivanje kemikalija (tvari i smjesa) koje induciraju teške ozljede oka (kategorija 1. prema sustavu UN GHS/CLP-u (1.)), podaci dobiveni upotrebom ispitne metode STE na 125 kemikalija (koje uključuju i tvari i smjese) pokazali su ukupnu točnost od 83 % (104/125), udio lažno pozitivnih rezultata od 1 % (1/86) i udio lažno negativnih rezultata od 51 % (20/39) u usporedbi s *in vivo* ispitivanjem na oku kunića (7.). Dobiveni udio lažno negativnih rezultata nije presudan u ovom kontekstu jer bi se sve ispitivane kemikalije koje induciraju vijabilnost stanica ≤ 70 % pri koncentraciji od 5 % i > 70 % pri koncentraciji od 0,05 % kasnije ispitale drugim primjereno validiranim *in vitro* ispitnim metodama ili, kao posljednja opcija, *in vivo* ispitivanjem na oku kunića, ovisno o regulatornim zahtjevima i u skladu sa strategijom sekvencijskog ispitivanja i pristupima snage dokaza koji se sada preporučuju (1. i 8.). Uglavnom su ispitane tvari s jednim sastojkom, iako postoji ograničena količina podataka i o ispitivanju smjesa. Unatoč tomu ova je ispitna metoda tehnički primjenjiva i za ispitivanje tvari s više sastojaka i smjesa. Međutim, prije nego što se ova ispitna metoda primijeni na smjesi radi dobivanja podataka za predviđenu regulatornu svrhu, potrebno je razmotriti mogu li se njome dobiti primjereni rezultati za tu svrhu te ako mogu, zašto. Ta razmatranja nisu potrebna ako postoji regulatorni zahtjev za ispitivanje smjese. Kod ispitne metode STE nisu uočeni nikakvi drugi specifični nedostaci kada se upotrebljava za utvrđivanje ispitivanih kemikalija kao kemikalija iz kategorije 1. sustava UN GHS/CLP-a. Istraživači bi mogli razmotriti primjenu ove ispitne metode na ispitivanim kemikalijama, pri čemu bi vijabilnost stanica ≤ 70 % pri koncentracijama od 5 % i 0,05 % trebalo prihvatiti kao pokazatelj odgovora da kemikalija inducira tešku ozljedu oka i da bi je bez daljnjeg ispitivanja trebalo razvrstati u kategoriju 1. sustava UN GHS/CLP-a.
7. Kada su se upotrijebili za utvrđivanje kemikalija (tvari i smjesa) koje nije potrebno razvrstati u pogledu nadraživanja i teške ozljede oka (tj. bez kategorije prema sustavu UN GHS/CLP-u), podaci dobiveni upotrebom ispitne metode STE na 130 kemikalija (koje uključuju i tvari i smjese) pokazali su ukupnu točnost od 85 % (110/130), udio lažno pozitivnih rezultata od 12 % (9/73) i udio lažno negativnih rezultata od 19 % (11/57) u usporedbi s *in vivo* ispitivanjem na oku kunića (7.). Ako se iz skupa podataka isključe vrlo hlapljive tvari i krute tvari osim površinski aktivnih tvari, ukupna točnost poboljšava se na 90 % (92/102), udio lažno negativnih rezultata na 2 % (1/54), a udio lažno pozitivnih rezultata na 19 % (9/48) (7.). Kao posljedica, potencijalni nedostaci ispitne metode STE, kada se upotrebljava za utvrđivanje ispitivanih kemikalija za koje nije potrebno razvrstavanje u pogledu nadraživanja i teških ozljeda oka (bez kategorije prema sustavu UN GHS/CLP-u), uključuju visok udio lažno negativnih rezultata za: i. vrlo hlapljive tvari s tlakom pare većim od 6 kPa i ii. kemikalije u krutom stanju (tvari i smjese) osim površinski aktivnih tvari i smjesa

koje se sastoje samo od površinski aktivnih tvari. Te kemikalije isključene su iz područja primjene ispitne metode STE (7.).

8. Uz kemikalije navedene u stavcima 6. i 7., skup podataka dobiven ispitnom metodom STE sadržava i interne podatke o 40 smjesa, koji su nakon što ih se usporedilo s *in vivo* Draizeovim ispitivanjem na oku pokazali točnost od 88 % (35/40), udio lažno pozitivnih rezultata od 50 % (5/10) i udio lažno negativnih rezultata od 0 % (0/30) u pogledu smjesa za koje nije potrebno razvrstavanje na temelju sustava razvrstavanja UN GHS/CLP-a (9.). Ispitna metoda STE stoga se može primjenjivati za utvrđivanje smjesa bez kategorije prema sustavu UN GHS/CLP-u u pristupu odozdo prema gore, uz iznimku smjesa u krutom stanju osim onih koje se sastoje samo od površinski aktivnih tvari, kao proširenje njezina ograničenja na tvari u krutom stanju. Nadalje, smjese koje sadržavaju tvari s tlakom pare većim od 6 kPa treba oprezno ocijeniti kako bi se izbjegla moguća preblaga predviđanja i treba ih ocijeniti na pojedinačnoj osnovi.
9. Ispitna metoda STE ne može se upotrebljavati za utvrđivanje ispitivanih kemikalija kao kemikalija iz kategorije 2. prema sustavu UN GHS/CLP-u ili kategorije 2.A (nadraživanje oka) ili 2.B (blago nadraživanje oka) prema sustavu UN GHS zbog znatnog broja kemikalija iz kategorije 1. prema GHS-u UN-a koje se preblago predviđaju kao kemikalije iz kategorije 2., 2.A ili 2.B te kemikalija bez kategorije prema sustavu UN GHS/CLP-u koje se prestrogo predviđaju kao kemikalije iz kategorije 2., 2.A ili 2.B (7.). U tu svrhu može biti potrebno daljnje ispitivanje drugom prikladnom metodom.
10. Ispitna metoda STE primjerena je za ispitivane kemikalije koje se otapaju ili ravnomjerno suspendiraju najmanje pet minuta u fiziološkoj otopini, 5-postotnom dimetilsulfoksidu (DMSO) u fiziološkoj otopini ili u mineralnom ulju. Ispitna metoda STE nije primjerena za ispitivane kemikalije koje nisu topljive ili se ne mogu ravnomjerno suspendirati najmanje pet minuta u fiziološkoj otopini, 5-postotnom dimetilsulfoksidu (DMSO) u fiziološkoj otopini ili u mineralnom ulju. Upotreba mineralnog ulja u ispitnoj metodi STE moguća je zbog kratkotrajnog izlaganja. Stoga je ispitna metoda STE primjerena za predviđanje potencijala opasnosti ispitivanih kemikalija netopivih u vodi za oko (npr. dugolančani masni alkoholi ili ketoni) pod uvjetom da se mogu miješati u najmanje jednom od tri prethodno predložena otapala (4).

11. U ovoj se ispitnoj metodi izraz „ispitivana kemikalija” upotrebljava za označivanje onoga što se ispituje¹ te se ne odnosi na primjenjivost ispitne metode STE za ispitivanje tvari i/ili smjesa.

NAČELO ISPITIVANJA

12. Ispitna metoda STE *in vitro* je test koji se temelji na citotoksičnosti, a provodi se na konfluentnom monosloju stanica rožnice kunića Statens Serum Instituta (SIRC), koje se uzgajaju na polikarbonatnoj mikroploči s 96 jažica (4.). Nakon petominutnog izlaganja ispitivanoj kemikaliji citotoksičnost se kvantitativno mjeri kao relativna vijabilnost stanica SIRC upotrebom MTT testa (4.). Smanjena vijabilnost stanica upotrebljava se za predviđanje potencijalnih štetnih učinaka koji dovode do oštećenja očiju.
13. Navedeno je da se 80 % otopine koja se nakapa u oko kunića izluči preko konjunktivalne vrećice u roku od tri do četiri minute, dok se više od 80 % otopine koja se nakapa u ljudsko oko izluči u roku od jedne do dvije minute (10.). Ispitnom metodom STE pokušavaju se uskladiti ta vremena izlaganja te se citotoksičnost upotrebljava kao krajnja točka za procjenu razmjera oštećenja stanica SIRC nakon petominutnog izlaganja ispitivanoj kemikaliji.

DOKAZIVANJE OSPOSOBLJENOSTI

14. Prije rutinske upotrebe ispitne metode STE opisane u ovoj ispitnoj metodi laboratoriji bi trebali dokazati tehničku osposobljenost točnim utvrđivanjem kategorije jedanaest tvari koje su preporučene u tablici 1. Te su tvari odabrane kako bi predstavljale cijeli raspon odgovora za ozbiljnu ozljedu oka ili nadraživanje oka na temelju rezultata *in vivo* ispitivanja na oku kunića (Smjernica za ispitivanje 405) i sustava razvrstavanja UN GHS/CLP-a (1.). Među ostalim su kriterijima za odabir: tvari bi trebale biti komercijalno dostupne, trebali bi biti dostupni visokokvalitetni *in vivo* referentni podaci i trebali bi biti dostupni visokokvalitetni *in vitro* podaci iz ispitne metode STE (3.). U slučajevima u kojima nije dostupna navedena tvar ili ako je to opravdano može se upotrijebiti druga tvar za koju su dostupni primjereni referentni *in vivo* i *in vitro* podaci pod uvjetom da se primjenjuju isti kriteriji kao ovdje opisani kriteriji.

¹ U lipnju 2013. na zajedničkom sastanku dogovoreno je da bi u novim i ažuriranim ispitnim metodama sada trebalo dosljednije upotrebljavati termin „ispitivana kemikalija” kojim se opisuje ono što se ispituje kada je to moguće.

Tablica 1.: Popis tvari koje služe za dokazivanje osposobljenosti

Tvar	CAS br.	Kemijski razred¹	Agregatno stanje	<i>In vivo</i> kat. sustava UN GHS ili CLP-a²	Otapalo u testu STE	STE kat. sustava UN GHS ili CLP-a
Benzalkonijev klorid (10 %, vodena otopina)	8001-54-5	Onijev spoj	Tekućina	Kategorija 1.	Fiziološka otopina	Kategorija 1.
Triton X-100 (100 %)	9002-93-1	Eter	Tekućina	Kategorija 1.	Fiziološka otopina	Kategorija 1.
Kiselo crvena 92	18472-87-2	Heterociklički spoj; spoj brom; spoj klora	Kruta tvar	Kategorija 1.	Fiziološka otopina	Kategorija 1.
Natrijev hidroksid	1310-73-2	Lužina; anorganska kemikalija	Kruta tvar	Kategorija 1. ³	Fiziološka otopina	Kategorija 1.
Butirolakton	96-48-0	Lakton; heterociklički spoj	Tekućina	Kategorija 2.A (kategorija 2. prema CLP-u)	Fiziološka otopina	Predviđanje nije moguće
1-oktanol	111-87-5	Alkohol	Tekućina	Kategorija 2.A/B ⁴ (kategorija 2. prema CLP-u)	Mineralno ulje	Predviđanje nije moguće
Ciklopentanol	96-41-3	Alkohol; ugljikovodik, ciklički	Tekućina	Kategorija 2.A/B ⁵ (kategorija 2. prema CLP-u)	Fiziološka otopina	Predviđanje nije moguće
2-etoksietilacetat	111-15-9	Alkohol; eter	Tekućina	Bez kategorije	Fiziološka otopina	Bez kategorije
Dodekan	112-40-3	Ugljikovodik, aciklički	Tekućina	Bez kategorije	Mineralno ulje	Bez kategorije
Metil-izobutil-keton	108-10-1	Keton	Tekućina	Bez kategorije	Mineralno ulje	Bez kategorije
n,n-dimetilgvaniidin sulfat	598-65-2	Amidin; spoj sumpora	Kruta tvar	Bez kategorije	Fiziološka otopina	Bez kategorije

Kratice: CAS br. = registarski broj Službe za podatke o kemijskim tvarima

¹ Kemijski razredi dodijeljeni su upotrebom informacija iz prethodnih publikacija NICEATM-a, a ako one nisu dostupne, upotrebom oznaka medicinskog nazivlja američke Nacionalne medicinske knjižnice (MeSH®) (putem baze podataka ChemIDplus® (Nacionalna medicinska knjižnica), dostupno na <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>) i NICEATM-ovih određenja strukture.

² Na temelju rezultata *in vivo* ispitivanja na oku kunića (Smjernica OECD-a za ispitivanje 405) i uz primjenu sustava UN GHS/CLP-a (1.).

³ Razvrstavanje u kategoriju 1. temelji se na potencijalu 100-postotnog natrijeva hidroksida da nagrize kožu (naveden kao kemikalija za dokazivanje osposobljenosti s potencijalom nagrizanja kože u Smjernici OECD-a za ispitivanje 435) i kriteriju za kategoriju 1. sustava UN GHS/CLP-a (1.).

⁴ Razvrstavanje u kategoriju 2.A ili 2.B ovisi o tumačenju kriterija sustava UN GHS za razlikovanje tih dviju kategorija, odnosno je li za razvrstavanje u kategoriju 2.A potrebno da dvije od šest životinja ili četiri od šest životinja imaju učinke sedmog dana. *In vivo* skup podataka uključivao je dvije studije s tri životinje u svakoj. U jednoj studiji dvije od tri životinje sedmog su dana pokazale učinke koji zahtijevaju razvrstavanje u kategoriju 2.A (11.), dok su u drugoj studiji sve krajnje točke kod sve tri životinje ponovno imale vrijednost nula do sedmog dana, što zahtijeva razvrstavanje u kategoriju 2.B (12.).

⁵ Razvrstavanje u kategoriju 2.A ili 2.B ovisi o tumačenju kriterija sustava UN GHS za razlikovanje tih dviju kategorija, odnosno je li za razvrstavanje u kategoriju 2.A potrebno da jedna od tri životinje ili dvije od tri životinje imaju učinke sedmog dana. *In vivo* istraživanje uključivalo je tri životinje. Osim zamućenja rožnice i crvenila konjunktive kod jedne životinje sve su krajnje točke ponovno imale vrijednost nula do sedmog dana ili ranije. Jedna životinja koja se nije potpuno oporavila do sedmog dana imala je vrijednost zamućenja rožnice 1 i crvenila konjunktive 1 (sedmog dana), a potpuno se oporavila 14. dana (11.).

POSTUPAK

Priprema staničnog monosloja

15. Za provođenje ispitne metode STE treba upotrebljavati SIRC, staničnu liniju rožnice kunića. Preporučuje se da se stanice SIRC nabave iz kompetentne banke stanica kao što je American Type Culture Collection CCL60.
16. Stanice SIRC uzgajaju se na 37 °C s 5 % CO₂ i u vlažnim atmosferskim uvjetima u tikvici s kulturom koja sadržava medij za uzgoj kulture koji se sastoji od Eagleova minimalnog esencijalnog medija (MEM) obogaćenog s 10 % fetalnog goveđeg seruma (FBS), 2 mM L-glutamina, 50–100 jedinica/ml penicilina i 50–100 µg/ml streptomicina. Stanice koje su postale konfluentne u tikvici s kulturom treba izdvojiti upotrebom otopine tripsin etilendiamintetraoctene kiseline, uz upotrebu pribora za struganje stanica ili bez njega. Stanice se razmnožavaju (npr. od dvije do tri pasaže) u tikvici s kulturom prije nego što se upotrijebe za rutinsko ispitivanje te se od odmrzavanja trebaju pasażirati najviše 25 puta.
17. Stanice koje su spremne za upotrebu u testu STE zatim se pripremaju u odgovarajućoj gustoći te se nasađuju u ploče s 96 jažica. Preporučuje se gustoća nasađivanja stanica od $6,0 \times 10^3$ stanica po jažici ako se stanice upotrebljavaju četiri dana nakon nasađivanja ili $3,0 \times 10^3$ stanica po jažici ako se stanice upotrebljavaju pet dana nakon nasađivanja, pri volumenu kulture od 200 µl. Stanice koje se upotrebljavaju za test STE i koje se nasade u medij za uzgoj kulture pri odgovarajućoj gustoći dosegnut će konfluenciju od više od 80 % u vrijeme ispitivanja, tj. četiri ili pet dana nakon nasađivanja.

Primjena ispitivanih kemikalija i kontrolnih tvari

18. Fiziološka otopina prvi je odabir za otapanje ili suspendiranje ispitivanih kemikalija. Ako ispitivana kemikalija pokazuje slabu topljivost ili se u najmanje pet minuta ne može ravnomjerno otopiti ili suspendirati u fiziološkoj otopini, kao drugi izbor za otapanje upotrebljava se 5-postotni DMSO (CAS br. 67-68-5) u fiziološkoj otopini. Kod ispitivanih kemikalija koje se u najmanje pet minuta ne mogu

ravnomjerno otopiti ili suspendirati u fiziološkoj otopini ili 5-postotnom DMSO-u u fiziološkoj otopini, kao treći izbor za otapalo upotrebljava se mineralno ulje (CAS br. 8042-47-5) u fiziološkoj otopini.

19. Ispitivane kemikalije ravnomjerno se otapaju ili suspendiraju u odabranom otapalu pri koncentraciji od 5 % (w/w) i dodatno razrjeđuju serijskim deseterostrukim razrjeđivanjem do koncentracije od 0,5 % i 0,05 %. Svaka se kemikalija mora ispitati i pri koncentraciji od 5 % i 0,05 %. Stanice koje se uzgajaju na ploči s 96 jažica izlažu se dozi od 200 μ l/jažica otopine (ili suspenzije) ispitivane kemikalije u koncentraciji od 5 % ili 0,05 % na pet minuta na sobnoj temperaturi. Ispitivane kemikalije (tvari s jednim sastojkom ili tvari s više sastojaka ili smjese) smatraju se čistim tvarima i razrjeđuju se ili suspendiraju u skladu s metodom, neovisno o njihovoj čistoći.
20. Medij za uzgoj kulture opisan u stavku 16. upotrebljava se kao kontrola s medijem na svakoj ploči svakog ponavljanja. Nadalje, stanice se izlažu i uzorcima kontrole s otapalom na svakoj ploči svakog ponavljanja. Za otapala navedena u stavku 18. potvrđeno je da ne utječu štetno na vijabilnost stanica SIRC.
21. Kod ispitne metode STE kao pozitivna kontrola na svakoj ploči svakog ponavljanja upotrebljava se 0,01-postotni natrijev lauril sulfat (SLS) u fiziološkoj otopini. Kako bi se izračunala vijabilnost stanica pozitivne kontrole, svaka ploča svakog ponavljanja mora uključivati i fiziološku otopinu kao kontrolu s otapalom.
22. Slijepa proba potrebna je kako bi se utvrdila kompenzacija za optičku gustoću i treba je provesti u jažicama koje sadržavaju samo fiziološku otopinu puferiranu fosfatnim puferom, ali ne kalcij i magnezij (PBS-) ni stanice.
23. Svaki uzorak (ispitivana kemikalija pri koncentraciji od 5 % i 0,05 %, kontrola s medijem, kontrola s otapalom i pozitivna kontrola) treba ispitati tripot za svako ponavljanje izlaganjem stanica dozi od 200 μ l odgovarajuće ispitivane ili kontrolne kemikalije na pet minuta na sobnoj temperaturi.
24. Referentne tvari korisne su za ocjenjivanje potencijala za nadražujuće djelovanje na oči nepoznatih kemikalija iz specifičnog kemijskog razreda ili razreda proizvoda ili za ocjenjivanje relativnog potencijala za nadražujuće djelovanje tvari koja nadražuje oči unutar specifičnog raspona odgovora na nadražujuću tvar.

Mjerenje vijabilnosti stanica

25. Stanice se nakon izlaganja ispiru s 200 μ l PBS-a i dodaje im se 200 μ l otopine MTT-a (0,5 mg MTT/ml medija za uzgoj kulture). Nakon dvosatnog vremena reakcije u inkubatoru (37 °C, 5 % CO₂), otopina MTT-a pretiće se, MTT formazan ekstrahira se tako da se doda 200 μ l 0,04 N klorovodične kiseline i izopropanola tijekom 60 minuta u mraku na sobnoj temperaturi te se apsorbancija otopine MTT formazana mjeri pri

570 nm upotrebom čitača ploča. Ispitivane kemikalije utječu na MTT test (bojilima ili tvarima koje neposredno reduciraju MTT) samo ako se u ispitnom sustavu zadržava znatna količina ispitivane kemikalije nakon ispiranja koje se obavlja nakon izlaganja, a to je slučaj kod 3D tkiva rekonstruirane ljudske rožnice ili rekonstruirane ljudske epiderme, ali nije relevantno za 2D stanične kulture koje se upotrebljavaju za ispitnu metodu STE.

Tumačenje rezultata i model predviđanja

26. Vrijednosti optičke gustoće (OD) za svaku ispitivanu kemikaliju zatim se upotrebljavaju za izračun vijabilnosti stanica u odnosu na kontrolu s otapalom, koja je određena kao 100 %. Relativna vijabilnost stanica izražava se kao postotak i dobiva se tako da se optička gustoća ispitivane kemikalije podijeli optičkom gustoćom kontrole s otapalom nakon što se od obiju vrijednosti oduzme optička gustoća slijepe probe.

$$\text{Vijab. stanica (\%)} = \frac{(OD_{570} \text{ ispit. kemikalije}) - (OD_{570} \text{ slijepe probe})}{(OD_{570} \text{ kontr. s otapalom}) - (OD_{570} \text{ slijepe probe})} \times 100$$

Slično tome, relativna vijabilnost stanica kod svake kontrole s otapalom izražava se kao postotak i dobiva se tako da se optička gustoća svake kontrole s otapalom podijeli optičkom gustoćom kontrole s medijem nakon što se od obiju vrijednosti oduzme optička gustoća slijepe probe.

27. Treba provesti tri neovisna ponavljanja s po tri jažice s ponavljanjem (tj. $n = 9$). Aritmetička sredina triju jažica za svaku ispitivanu kemikaliju i kontrolu s otapalom u svakom neovisnom ponavljanju upotrebljava se za izračun aritmetičke sredine relativne vijabilnosti stanica. Konačna aritmetička sredina vijabilnosti stanica računa se iz tri neovisna ponavljanja.
28. Granične vrijednosti vijabilnosti stanica za utvrđivanje ispitivanih kemikalija koje induciraju tešku ozljedu oka (kategorija 1. sustava UN GHS/CLP-a) i ispitivanih kemikalija koje nije potrebno razvrstati s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka (bez kategorije prema sustavu UN GHS/CLP-u) navedene su u nastavku.

Tablica 2.: Model predviđanja ispitne metode STE

Vijabilnost stanica		Razvrstavanje prema sustavu GHS UN-a ili CLP-u	Primjenjivost
Pri 5 %	Pri 0,05 %		
> 70 %	> 70 %	Bez kategorije	Tvari i smjese uz iznimku: i. vrlo hlapljivih tvari s tlakom pare većim od 6 kPa ¹ ; i ii. kemikalija u krutom stanju (tvari i smjese) osim površinski aktivnih tvari i smjesa koje se sastoje samo od površinski aktivnih tvari

$\leq 70 \%$	$> 70 \%$	Predviđanje nije moguće	Nije primjenjivo
$\leq 70 \%$	$\leq 70 \%$	Kategorija 1.	Tvari i smjese ²

¹ Smjese koje sadržavaju tvari s tlakom pare većim od 6 kPa treba oprezno ocijeniti kako bi se izbjegla moguća preblaga predviđanja i treba ih ocijeniti na pojedinačnoj osnovi.

² Na temelju rezultata dobivenih uglavnom s tvarima s jednim sastojkom, iako postoji i ograničena količina podataka o ispitivanju smjesa. Unatoč tomu ova je ispitna metoda tehnički primjenjiva i za ispitivanje tvari s više sastojaka i smjesa. Prije nego što se ova ispitna metoda primijeni na smjesi radi dobivanja podataka za predviđenu regulatornu svrhu, potrebno je razmotriti mogu li se njome dobiti primjereni rezultati za tu svrhu te ako mogu, zašto. Ta razmatranja nisu potrebna ako postoji regulatorni zahtjev za ispitivanje smjese.

Kriteriji prihvatljivosti

29. Rezultati ispitivanja ocjenjuju se kao prihvatljivi ako su ispunjeni svi sljedeći kriteriji:

- optička gustoća kontrole s medijem (izložene mediju za uzgoj kulture) treba biti 0,3 ili veća nakon što se oduzme optička gustoća slijepe probe;
- vijabilnost kontrole s otapalom treba biti 80 % ili veća u odnosu na kontrolu s medijem. Ako se u svakom ponavljanju upotrebljava više kontrola s otapalom, svaka kontrola treba pokazivati vijabilnost stanica veću od 80 % kako bi se razvrstale ispitivane kemikalije koje se ispituju tim otapalima;
- vijabilnost stanica koja se dobije s pozitivnom kontrolom (0,01 % SLS) treba biti u okviru dvije standardne devijacije prijašnje srednje vrijednosti. Gornju i donju granicu prihvatljivosti za pozitivnu kontrolu treba često ažurirati, tj. svaka tri mjeseca ili svaki put kada se provodi prihvatljivi test u laboratorijima u kojima se testovi ne provode često (tj. rjeđe od jednom mjesečno). Ako laboratorij ne provede dovoljan broj pokusa kako bi se utvrdila statistički pouzdana distribucija pozitivnih kontrola, prihvatljiva je upotreba gornje i donje granice prihvatljivosti koju je utvrdio subjekt koji je razvio metodu, tj. od 21,1 % do 62,3 % prema prijašnjim podacima laboratorija, dok se interna distribucija izrađuje tijekom prvih rutinskih testova;
- standardna devijacija konačne vijabilnosti stanica koja se dobije iz tri neovisna ponavljanja treba biti manja od 15 % i kod koncentracije od 5 % i od 0,05 % ispitivane kemikalije.

Ako nije ispunjen jedan ili više od tih kriterija, rezultate treba odbaciti i treba provesti još tri neovisna ponavljanja.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Podaci

30. Treba navesti podatke za svaku pojedinačnu jažicu (npr. vrijednosti vijabilnosti stanica) svakog ponavljanja te ukupnu srednju vrijednost, standardnu devijaciju i razvrstavanje.

Izvešće o ispitivanju

31. Izvešće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Ispitivana kemikalija i kontrolne tvari

- tvar s jednim sastojkom: kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv(i), CAS registracijski broj(evi), SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula i/ili druge identifikacijske oznake,
- tvar s više sastojaka, UVCB tvar i smjesa: opisane koliko god je to moguće npr. kemijskim identitetom (vidjeti gore), čistoćom, količinskom zastupljenošću i relevantnim fizikalno-kemijskim svojstvima sastojaka (vidjeti gore), u mjeri u kojoj su podaci dostupni,
- agregatno stanje, hlapljivost, pH-vrijednost, LogP, molekularna masa, kemijski razred i dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva relevantna za provedbu studije, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,
- čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.,
- obrada prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),
- uvjeti skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni.

Uvjeti i postupci ispitne metode

- naziv i adresa naručitelja, ustanove koja provodi ispitivanje i voditelja istraživanja,
- opis upotrijebljene ispitne metode,
- upotrijebljena stanična linija, njezin izvor, broj pasaže i konfluencija stanica koje se koriste za ispitivanje,
- pojedinosti o primijenjenom ispitnom postupku,
- broj primijenjenih ponavljanja i ponovljenih uzoraka,
- koncentracije ispitivane kemikalije (ako je drukčije od preporučenog),
- obrazloženje za odabir otapala za svaku ispitivanu kemikaliju,
- trajanje izlaganja ispitivanoj kemikaliji (ako je drukčije od preporučenog),
- opis svih izmjena ispitnog postupka,
- opis primijenjenih kriterija ocjenjivanja i odlučivanja,
- upućivanje na prijašnju srednju vrijednost pozitivne kontrole i standardno odstupanje,

- dokazivanje osposobljenosti laboratorija za izvođenje ispitne metode (npr. ispitivanjem tvari koje služe za dokazivanje osposobljenosti) ili dokazivanje obnovljive primjene ispitne metode tijekom vremena.

Rezultati

- za svaku ispitivanu kemikaliju i kontrolnu tvar te svaku ispitanu koncentraciju treba navesti tablični prikaz za pojedinačne vrijednosti optičke gustoće po jažici ponovljenog uzorka, aritmetičke srednje vrijednosti optičke gustoće za svako neovisno ponavljanje, postotak vijabilnosti stanica za svako neovisno ponavljanje i konačnu aritmetičku sredinu postotka vijabilnosti stanica i standardnu devijaciju u tri ponavljanja,
- rezultati za kontrolu s medijem, kontrolu s otapalom i pozitivnu kontrolu kojima se dokazuju odgovarajući kriteriji prihvatljivosti istraživanja,
- opis drugih uočenih učinaka,
- ukupno utvrđeno razvrstavanje, s upućivanjem na primijenjeni model predviđanja/kriterije odlučivanja.

Rasprava o rezultatima

Zaključci

LITERATURA

1. Ujedinjeni narodi (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Dostupno na: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.
2. Scott L, *et al.* (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *in vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1.–9.
3. Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to 7 Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55.–63.
4. Takahashi Y, *et al.* (2008). Development of the Short Time Exposure (STE) Test: an *In Vitro* Eye Irritation Test Using SIRC Cells. *Toxicol. In Vitro* 22, 760.–770.
5. Sakaguchi H, *et al.* (2011). Validation Study of the Short Time Exposure (STE) Test to Assess the Eye Irritation Potential of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 25, 796.–809.
6. Kojima H, *et al.* (2013). Second-Phase Validation of Short Time Exposure Tests for Assessment of Eye Irritation Potency of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 27, str. 1855.–1869.
7. ICCVAM (2013). Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document, NIH. Dostupno na: [http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf].
8. Poglavlje B.5. ovog Priloga, Akutno nadraživanje/nagrizanje oka.
9. Saito K, *et al.* (2015). Predictive Performance of the Short Time Exposure Test for Identifying Eye Irritation Potential of Chemical Mixtures.
10. Mikkelsen TJ, Chrai SS and Robinson JR. (1973). Altered Bioavailability of Drugs in the Eye Due to Drug-Protein Interaction. *J. Pharm. Sci.* 1648.–1653.
11. ECETOC (1998). Eye Irritation Reference Chemicals Data Bank. Technical Report (No 48. (2)), Bruxelles, Belgija.

12. Gautheron P, *et al.* (1992). Bovine Corneal Opacity and Permeability Test: an *In Vitro* Assay of Ocular Irritancy. *Fundam Appl Toxicol.* 18, 442.–449.
13. OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34). Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
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). Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

Dodatak

DEFINICIJE

Točnost: stupanj podudarnosti između rezultata ispitne metode i prihvaćenih referentnih vrijednosti. Ona je mjerilo učinkovitosti ispitne metode i jedan od aspekata relevantnosti. Pojam je često međusobno zamjenjiv s pojmom „podudarnost” u smislu udjela točnih ishoda ispitne metode (13.).

Referentna tvar: tvar koja se primjenjuje kao standard za usporedbu s ispitivanom kemikalijom. Referentna tvar trebala bi imati sljedeća svojstva: i. podrijetlo iz dosljednih i pouzdanih izvora; ii. strukturnu i funkcionalnu sličnost s razredom tvari koje se ispituju; iii. poznata fizikalna/kemijska svojstva; iv. podatke kojima se dokazuju poznati učinci i v. poznatu snagu u rasponu željenog odgovora.

Pristup odozdo prema gore: stupnjeviti pristup koji se primjenjuje za ispitivanu kemikaliju u pogledu koje postoji sumnja da joj nije potrebno razvrstavanje s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka, a koji počinje utvrđivanjem kemikalija za koje nije potrebno razvrstavanje (negativan ishod) u odnosu na druge kemikalije (pozitivan ishod).

Kemikalija: tvar ili smjesa.

Nadraživanje oka: promjena na oku nastala kao rezultat primjene ispitivane kemikalije na prednju površinu oka, koja je potpuno reverzibilna u roku od 21 dana nakon primjene. Pojam je međusobno zamjenjiv s pojmovima „reverzibilni učinci na oko” i „kategorija 2. sustava UN GHS/CLP-a”.

Udio lažno negativnih rezultata: udio svih pozitivnih kemikalija koje su ispitnom metodom pogrešno identificirane kao negativne. Jedan je od pokazatelja uspješnosti ispitne metode.

Stopa lažno pozitivnih rezultata: udio svih negativnih kemikalija koje su ispitnom metodom pogrešno identificirane kao pozitivne. Jedan je od pokazatelja uspješnosti ispitne metode.

Opasnost: inherentno svojstvo nekog agensa ili stanje koje može uzrokovati štetne učinke kada su organizam, sustav ili (sub)populacija izloženi tom agensu.

Kontrola s medijem: netretirani ponovljeni uzorak koji sadržava sve sastavnice ispitnog sustava. Taj se uzorak obrađuje s uzorcima tretiranim ispitivanom kemikalijom i drugim kontrolnim uzorcima kako bi se utvrdilo je li otapalo u interakciji s ispitnim sustavom.

Smjesa: smjesa ili otopina koja se sastoji od dviju ili više tvari.

Tvar s jednim sastojkom: tvar, definirana količinskim sastavom, u kojoj je jedan glavni sastojak prisutan u koncentraciji od najmanje 80 % (w/w).

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid; tiazolil plavo tetrazolijev bromid.

Tvar s više sastojaka: tvar, definirana količinskim sastavom, u kojoj je više od jednog glavnog sastojka prisutno u koncentraciji od 10 % (w/w) ili većoj te manjoj od 80 % (w/w). Tvar s više sastojaka rezultat je procesa proizvodnje. Smjesa i tvar s više sastojaka razlikuju se po tome što se smjesa dobiva miješanjem dviju ili više tvari bez kemijske reakcije. Tvar s više sastojaka rezultat je kemijske reakcije.

OD: optička gustoća.

Pozitivna kontrola: ponovljeni uzorak koji sadržava sve komponente ispitnog sustava i tretiran je s tvari za koju je poznato da inducira pozitivan odgovor. Kako bi se osigurala mogućnost procjene varijabilnosti odgovora pozitivne kontrole tijekom vremena, pozitivan odgovor ne bi smio biti presnažan.

Relevantnost: opis odnosa između ispitivanja i istraživanog učinka te je li ispitivanje prikladno i korisno za određenu svrhu. Pokazuje u kojoj se mjeri ispitivanjem točno mjeri ili predviđa istraživani biološki učinak. Relevantnost uključuje razmatranje o točnosti (podudarnosti) ispitne metode (10.).

Pouzdanost: pokazuje u kojoj se mjeri ispitna metoda može obnovljivo primijeniti unutar jednog laboratorija i između više laboratorija tijekom vremena uz primjenu istog protokola. Ocjenjuje se izračunavanjem obnovljivosti unutar jednog laboratorija i između više njih te ponovljivosti unutar jednog laboratorija (13.).

Osjetljivost: udio svih pozitivnih/aktivnih kemikalija koje su pravilno razvrstane primjenom ispitivanja. To je mjera točnosti ispitne metode koja daje kategorijske rezultate i važan je čimbenik za ocjenu relevantnosti ispitne metode (10.).

Teška ozljeda oka: oštećenje očnog tkiva ili ozbiljno fizičko pogoršanje vida izazvano primjenom ispitivane kemikalije na prednju površinu oka, koje nije u potpunosti reverzibilno unutar 21 dana od primjene. Pojam je međusobno zamjenjiv s pojmovima „ireverzibilni učinci na oko” i „kategorija 1. sustava UN GHS/CLP-a”.

Kontrola s otapalom/nosačem: netretirani uzorak koji sadržava sve komponente ispitnog sustava, uključujući otapalo ili nosač koji se obrađuje s uzorcima tretiranima ispitivanom kemikalijom i drugim kontrolnim uzorcima kako bi se utvrdio polazni odgovor za uzorke koji se tretiraju ispitivanom kemikalijom otopljenom u istom otapalu ili nosaču. Kada se ispituje s istodobnom kontrolom s medijem, taj uzorak isto tako pokazuje jesu li otapalo ili nosač u interakciji s ispitnim sustavom.

Specifičnost: udio svih negativnih/neaktivnih kemikalija koje su pravilno razvrstane primjenom ispitivanja. To je mjera točnosti ispitne metode koja daje kategorijske rezultate i važan je čimbenik za ocjenu relevantnosti ispitne metode (13.).

Tvar: kemijski element i njegovi spojevi u prirodnome stanju ili dobiveni proizvodnim postupkom, što uključuje i aditive koji su nužni za održavanje stabilnosti proizvoda te

nečistoće koje proizlaze iz primijenjenoga postupka, ali isključuje otapala koja se mogu izdvojiti bez utjecaja na stabilnost tvari ili promjene njezina sastava.

Površinski aktivna tvar: kemikalija, kao npr. deterdžent, koju se naziva i površinski aktivnim agensom, a kojom se može smanjiti površinska napetost tekućine i time omogućiti pjenjenje i prodiranje u krute tvari; poznata je i kao sredstvo za vlaženje.

Ispitivana kemikalija: svaka tvar ili smjesa koja se ispituje ovom ispitnom metodom.

Strategija višerazinskog ispitivanja: strategija stupnjevito ispitivanja u kojoj se sve postojeće informacije o ispitivanoj kemikaliji preispituju točno utvrđenim redoslijedom, pri čemu se prije prelaska na sljedeću razinu na svakoj razini primjenjuje postupak analize snage dokaza kako bi se odredilo je li na raspolaganju dovoljno informacija za donošenje odluke o razvrstavanju tvari s obzirom na opasnost. Ako se na temelju postojećih podataka ispitivanoj kemikaliji može pripisati potencijal nadražujućeg djelovanja, daljnje ispitivanje nije potrebno. Ako se na temelju postojećih informacija ispitivanoj kemikaliji ne može pripisati potencijal za nadražujuće djelovanje, provodi se postupak stupnjevito sekvencijskog ispitivanja na životinjama sve dok se nedvosmisleno ne utvrdi razvrstavanje.

Pristup odozgo prema dolje: stupnjevito pristup koji se primjenjuje za ispitivanu kemikaliju u pogledu koje postoji sumnja da uzrokuje tešku ozljedu oka, a koji počinje utvrđivanjem kemikalija koje induciraju tešku ozljedu oka (pozitivan ishod) u odnosu na druge kemikalije (negativan ishod).

Globalno usklađeni sustav Ujedinjenih naroda za razvrstavanje i označivanje kemikalija (UN GHS): sustav za razvrstavanje kemikalija (tvari i smjesa) prema standardiziranim vrstama i stupnjevima fizičkih opasnosti i opasnosti za zdravlje i okoliš, kojim su obuhvaćena odgovarajuća komunikacijska sredstva kao što su piktogrami, oznake opasnosti, oznake upozorenja, oznake obavijesti i sigurnosno-tehnički listovi, kojima se prenose informacije o njihovim štetnim učincima u cilju zaštite ljudi (uključujući poslodavce, radnike, prijevoznike, potrošače i interventno osoblje) i okoliša (1.).

Kategorija 1. sustava UN GHS/CLP-a: vidjeti „tešku ozljedu oka”.

Kategorija 2. sustava UN GHS/CLP-a: vidjeti „nadraživanje oka”.

Bez kategorije prema sustavu UN GHS: kemikalije koje nisu razvrstane u kategoriju 1. ili 2. prema sustavu UN GHS/CLP-u, (ili kategoriju 2.A ili 2.B prema sustavu UN GHS).

UVCB: tvari nepoznatog ili promjenjivog sastava, složeni reakcijski proizvodi i biološki materijali.

B.69. ISPITNA METODA REKONSTRUIRANOG EPITELA KOJI NALIKUJE LJUDSKOJ ROŽNICI (RhCE) ZA UTVRĐIVANJE KEMIKA LIJA KOJE NIJE POTREBNO RAZVRSTATI I OZNAČITI S OBZIROM NA NADRAŽIVANJE OKA ILI TEŠKU OZLJEDU OKA

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 492 (2017.). *Teška ozljeda oka* odnosi se na izazivanje oštećenja tkiva oka ili ozbiljno fizičko pogoršanje vida nakon primjene ispitivane kemikalije na prednju površinu oka, a koje nije potpuno reverzibilno unutar 21 dana od primjene, kako je utvrđeno Globalno usklađenim sustavom razvrstavanja i označivanja kemikalija Ujedinjenih naroda (UN GHS) (1.) i Uredbom (EZ) br. 1272/2008 o razvrstavanju, označivanju i pakiranju tvari i smjesa (CLP)¹ Europske unije. Prema sustavu UN GHS i CLP-u *nadraživanje očiju* odnosi se na izazivanje promjena u oku nakon primjene ispitivane kemikalije na prednju površinu oka, koje su u potpunosti reverzibilne unutar 21 dana nakon primjene. Ispitivane kemikalije koje induciraju tešku ozljedu oka razvrstane su u kategoriju 1. sustava UN GHS i CLP-a, dok su kemikalije koje induciraju nadraživanje očiju razvrstane u kategoriju 2. sustava UN GHS i CLP-a. Ispitivane kemikalije koje su nerazvrstane s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka definirane su kao one koje ne ispunjavaju zahtjeve za razvrstavanje u kategoriju 1. ili 2. (2.A ili 2.B) sustava UN GHS i CLP-a, odnosno one se navode kao kemikalije bez kategorije prema sustavu UN GHS i CLP-u.
2. Procjena teške ozljede oka/nadraživanja oka obično je uključivala upotrebu laboratorijskih životinja (ispitna metoda B.5. (2.)). Odabir najprimjerenije ispitne metode i upotrebu te ispitne metode treba razmotriti u kontekstu Smjernica OECD-a o integriranim pristupima ispitivanju i procjeni za teške ozljede oka i nadraživanje oka (39.).
3. U ovoj ispitnoj metodi opisuje se *in vitro* postupak koji omogućuje utvrđivanje kemikalija (tvari i smjesa) koje nije potrebno razvrstati i označiti s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka u skladu sa sustavom UN GHS i CLP-om. U njoj se upotrebljava rekonstruirani epitel koji nalikuje ljudskoj rožnici (RhCE) i koji vjerno oponaša histološka, morfološka, biokemijska i fiziološka svojstva epitela

¹ Uredba (EZ) br. 1272/2008 Europskog parlamenta i Vijeća od 16. prosinca 2008. o razvrstavanju, označivanju i pakiranju tvari i smjesa, o izmjeni i stavljanju izvan snage Direktive 67/548/EEZ i Direktive 1999/45/EZ i o izmjeni Uredbe (EZ) br. 1907/2006, SL L 353/1, 31.12.2008.

ljudske rožnice. Validirane su još četiri *in vitro* ispitne metode koje se smatraju znanstveno valjanima te su donesene kao ispitne metode B.47. (3.), B.48. (4.), B.61. (5.) i B.68. (6.), a bave se krajnjom točkom teške ozljede oka/nadraživanja oka na zdravlje ljudi.

4. Ova ispitna metoda obuhvaća dva validirana testa u kojima se upotrebljavaju komercijalno dostupni modeli RhCE-a. Validacijske studije za procjenu nadraživanja oka/teške ozljede oka provedene su (7., 8., 9., 10., 11., 12. i 13.) upotrebom testa nadraživanja očiju (EIT) EpiOcular™ (EIT) i testa nadraživanja očiju s epitelom ljudske rožnice (HCE) SkinEthic™. U svakom od tih testova kao ispitni sustav upotrebljavaju se komercijalno dostupni modeli tkiva RhCE, koje se dalje u tekstu navode kao validirane referentne metode VRM1 i VRM2. Iz tih validacijskih studija i njihovih neovisnih stručnih pregleda (9. i 12.) donesen je zaključak da se testom nadraživanja očiju EpiOcular™ i testom nadraživanja očiju s epitelom ljudske rožnice SkinEthic™ mogu točno utvrditi kemikalije (i tvari i smjese) koje nije potrebno razvrstati i označiti s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka u skladu sa sustavom UN GHS te su testovi preporučeni kao znanstveno valjani za tu svrhu (13.).
5. Trenutačno je opće prihvaćena činjenica da se u doglednoj budućnosti *in vivo* Draizeovo ispitivanje na oku kunića (2. i 14.) neće moći potpuno zamijeniti nijednom pojedinačnom *in vitro* ispitnom metodom za predviđanje različitih kemijskih razreda u punom rasponu teških ozljeda oka/nadraživanja oka. Međutim, kao potpuna zamjena za Draizeovo ispitivanje na oku mogu se primjenjivati strateške kombinacije nekoliko alternativnih ispitnih metoda u okviru strategija (višerazinskog) ispitivanja, kao što je pristup odozdo prema gore/odozgo prema dolje (15.). Pristup odozdo prema gore (15.) trebalo bi primijeniti kada se na temelju postojećih informacija očekuje da kemikalija neće izazvati znatno nadraživanje oka koje bi zahtijevalo razvrstavanje, dok bi pristup odozgo prema dolje (15.) trebalo primijeniti kada se na temelju postojećih informacija očekuje da će kemikalija izazvati tešku ozljedu oka. Test nadraživanja očiju EpiOcular™ i test nadraživanja očiju s epitelom ljudske rožnice SkinEthic™ preporučuju se za utvrđivanje kemikalija za koje nije potrebno razvrstavanje u pogledu nadraživanja ili teške ozljede oka u skladu sa sustavom UN GHS/CLP-om (bez kategorije) bez daljnjeg ispitivanja, u okviru strategije ispitivanja kao što je pristup odozdo prema gore/odozgo prema dolje koju su predložili Scott i dr., npr. kao početni korak u pristupu odozdo prema gore ili kao jedan od posljednjih koraka u pristupu odozgo prema dolje (15.). Međutim, test nadraživanja očiju EpiOcular™ i test nadraživanja očiju s epitelom ljudske rožnice SkinEthic™ nisu namijenjeni za razlikovanje kategorije 1. sustava UN GHS/CLP-a (teška ozljeda oka) od kategorije 2. tog sustava (nadraživanje oka). Ta razlika morat će se utvrditi na drugoj razini strategije ispitivanja (15.). Ispitivanu kemikaliju za koju se testom nadraživanja očiju EpiOcular™ ili testom nadraživanja očiju s epitelom ljudske

rožnice SkinEthic™ utvrdi da ju je potrebno razvrstati u pogledu nadraživanja oka/teške ozljede oka stoga će trebati dodatno ispitati (*in vitro* i/ili *in vivo*) kako bi se došlo do konačnog zaključka (bez kategorije, kategorija 2. ili kategorija 1. prema sustavu UN GHS/CLP-u), npr. upotrebom ispitne metode B.47., B.48., B.61. ili B.68.

6. Svrha je ove ispitne metode opisati postupak koji se primjenjuje za ocjenjivanje potencijala opasnosti ispitivane kemikalije za oko na temelju njezine sposobnosti induciranja citotoksičnosti u modelu tkiva RhCE, kako se izmjeri MTT testom (16.) (vidjeti stavak 21.). Vijabilnost tkiva RhCE nakon izlaganja ispitivanoj kemikaliji utvrđuje se u usporedbi s tkivima koja se tretiraju s tvari za negativnu kontrolu (postotak vijabilnosti) i zatim se upotrebljava za predviđanje potencijala opasnosti ispitivane kemikalije za oko.
7. Za lakšu validaciju novih ili izmijenjenih *in vitro* testova koji se temelje na RhCE-u i koji su slični testu nadraživanja očiju EpiOcular™ i testu nadraživanja očiju s epitelom ljudske rožnice SkinEthic™ dostupni su zahtjevi izvedbe (17.), u skladu s načelima Smjernice OECD-a br. 34 (18.) te oni omogućuju pravovremenu izmjenu Smjernice OECD-a za ispitivanje 492 radi uključivanja tih načela. Uzajamno prihvaćanje podataka na temelju sporazuma OECD-a jamči se samo za testove koji su validirani u skladu sa zahtjevima izvedbe ako je OECD pregledao te testove i uključio ih u odgovarajuću smjernicu OECD-a za ispitivanje.

DEFINICIJE

8. Definicije su navedene u Dodatku 1.

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

9. Ova ispitna metoda temelji se na komercijalnim trodimenzionalnim modelima tkiva RhCE koji se proizvode upotrebom primarnih ljudskih epidermalnih keratinocita (tj. EpiOcular™ OCL-200) ili ljudskih imortaliziranih epitelih stanica rožnice (tj. SkinEthic™ HCE/S). Modeli tkiva RhCE EpiOcular™ OCL-200 i SkinEthic™ HCE/S slični su *in vivo* trodimenzionalnoj strukturi epitela rožnice i proizvode se upotrebom stanica vrste koja se proučava (19. i 20.). Nadalje, testovima se izravno mjeri citotoksičnost koja je rezultat prolaska kemikalije kroz rožnicu i izazivanja oštećenja stanica i tkiva; citotoksični odgovor zatim određuje ukupni ishod *in vivo* teške ozljede oka/nadraženosti oka. Do oštećenja stanica može doći preko nekoliko načina djelovanja (vidjeti stavak 20.), ali citotoksičnost ima važnu, a možda i primarnu, mehanicističku ulogu u određivanju ukupnog odgovora na kemikaliju u obliku teške ozljede oka/nadraživanja oka, koja se *in vivo* uglavnom očituje u pojavi zamućenja rožnice, iritisa, crvenila konjunktive i/ili kemoze konjunktive, neovisno o fizikalno-kemijskim procesima na kojima se temelji oštećenje tkiva.

10. U validacijskoj studiji na kojoj se temelji ova ispitna metoda ispitan je širok raspon kemikalija, koje obuhvaćaju vrlo različite vrste kemikalija, kemijske razrede, molekularne mase, vrijednosti LogP, kemijske strukture itd. Validacijska baza podataka za test nadraživanja očiju EpiOcular™ sadržavala je ukupno 113 kemikalija, koje su obuhvaćale 95 različitih organskih funkcionalnih skupina u skladu s analizom OECD-ova alata QSAR (8.). Većinu tih kemikalija činile su tvari s jednim sastojkom, ali u studiju je uključeno i nekoliko tvari s više sastojaka (uključujući tri homopolimera, pet kopolimera i deset kvazipolimera). Kad je riječ o agregatnom stanju i kategorijama sustava UN GHS/CLP-a, 113 ispitanih kemikalija distribuirano je na sljedeći način: 13 tekućina iz kategorije 1., 15 kemikalija u krutom stanju iz kategorije 1., šest tekućina iz kategorije 2.A, deset kemikalija u krutom stanju iz kategorije 2.A, sedam tekućina iz kategorije 2.B, sedam kemikalija u krutom stanju iz kategorije 2.B, 27 tekućina bez kategorije i 28 kemikalija u krutom stanju bez kategorije (8.). Validacijska baza podataka za test nadraživanja očiju s epitelom ljudske rožnice SkinEthic™ sadržavala je ukupno 200 kemikalija, koje su obuhvaćale 165 različitih organskih funkcionalnih skupina (8., 10. i 11.). Većinu tih kemikalija činile su tvari s jednim sastojkom, ali u studiju je uključeno i nekoliko tvari s više sastojaka (uključujući deset polimera). Kad je riječ o agregatnom stanju i kategorijama sustava UN GHS/CLP-a, 200 ispitanih kemikalija distribuirano je na sljedeći način: 27 tekućina iz kategorije 1., 24 kemikalije u krutom stanju iz kategorije 1., 19 tekućina iz kategorije 2.A, deset kemikalija u krutom stanju iz kategorije 2.A, devet tekućina iz kategorije 2.B, osam kemikalija u krutom stanju iz kategorije 2.B, 50 tekućina bez kategorije i 53 kemikalije u krutom stanju bez kategorije (10. i 11.).
11. Ova je ispitna metoda primjenjiva na tvari i smjese te na kemikalije u krutom stanju, tekućine, polukrute kemikalije i voskove. Tekućine mogu biti vodene i bezvodne; krute tvari mogu biti topljive ili netopljive u vodi. Krute tvari prije primjene treba samljeti u sitni prah kad god je to moguće; nije potrebna nikakva druga prethodna obrada uzorka. Plinovi i aerosoli nisu ocijenjeni u validacijskoj studiji. Iako je moguće da se oni mogu ispitati upotrebom tehnologije RhCE, trenutačnom ispitnom metodom nije omogućeno ispitivanje plinova i aerosola.
12. Ispitivane kemikalije koje apsorbiraju svjetlost u istom rasponu kao i MTT formazan (prirodno ili nakon tretiranja) i ispitivane kemikalije koje mogu izravno reducirati vitalnu boju MTT (na MTT formazan) mogu utjecati na mjerenje vijabilnosti tkiva te se kod njih trebaju upotrebljavati prilagođene kontrole za ispravke. Vrsta prilagođenih kontrola koja može biti potrebna mijenjat će se ovisno o vrsti interferencije koju proizvodi ispitivana kemikalija i postupku koji se upotrebljava za kvantificiranje MTT formazana (vidjeti stavke 36.–42.).

13. Rezultati dobiveni u predvalidacijskoj (21. i 22.) i cjelokupnoj validacijskoj (8., 10. i 11.) studiji pokazali su da se i test nadraživanja očiju EpiOcular™ i test nadraživanja očiju s epitelom ljudske rožnice SkinEthic™ mogu prenijeti u laboratorije koji još nikada nisu provodili te testove te da su obnovljivi unutar jednog laboratorija i između više laboratorija. Na temelju tih studija razina obnovljivosti u smislu usklađenosti predviđanja koja se može očekivati iz testa nadraživanja očiju EpiOcular™ na temelju podataka o 113 kemikalija iznosi približno 95 % unutar laboratorija i 93 % između više laboratorija. Razina obnovljivosti u smislu usklađenosti predviđanja koja se može očekivati iz testa nadraživanja očiju s epitelom ljudske rožnice SkinEthic™ na temelju podataka o 120 kemikalija iznosi približno 92 % unutar laboratorija i 95 % između više laboratorija.
14. Test nadraživanja očiju EpiOcular™ može se primjenjivati za utvrđivanje kemikalija koje nije potrebno razvrstati s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka u skladu sa sustavom razvrstavanja UN GHS i CLP-om. Uzimajući u obzir podatke dobivene u validacijskoj studiji (8.), test nadraživanja očiju EpiOcular™ ima ukupnu točnost od 80 % (na temelju 112 kemikalija), osjetljivost od 96 % (na temelju 57 kemikalija), udio lažno negativnih rezultata od 4 % (na temelju 57 kemikalija), specifičnost od 63 % (na temelju 55 kemikalija) i udio lažno pozitivnih rezultata od 37 % (na temelju 55 kemikalija), u usporedbi s referentnim podacima *in vivo* ispitivanja na oku kunića (ispitna metoda B.5.) (2. i 14.), razvrstano u skladu sa sustavom razvrstavanja UN GHS i CLP-om. Studija u kojoj je 97 tekućih agrokemijskih formulacija ispitano testom nadraživanja očiju EpiOcular™ pokazala je sličnu uspješnost ispitne metode za tu vrstu smjesa kao što je ona dobivena u validacijskoj studiji (23.). Tih je 97 formulacija distribuirano na sljedeći način: 21 kemikalija iz kategorije 1., 19 kemikalija iz kategorije 2.A, 14 kemikalija iz kategorije 2.B i 43 kemikalije bez kategorije, razvrstano u skladu sa sustavom razvrstavanja UN GHS na temelju referentnih podataka *in vivo* ispitivanja na oku kunića (ispitna metoda B.5.) (2. i 14.). Dobivena je ukupna točnost od 82 % (na temelju 97 formulacija), osjetljivost od 91 % (na temelju 54 formulacije), udio lažno negativnih rezultata od 9 % (na temelju 54 formulacije), specifičnost od 72 % (na temelju 43 formulacije) i udio lažno pozitivnih rezultata od 28 % (na temelju 43 formulacije) (23.).
15. Test nadraživanja očiju s epitelom ljudske rožnice SkinEthic™ može se primjenjivati za utvrđivanje kemikalija koje nije potrebno razvrstati s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka u skladu sa sustavom razvrstavanja UN GHS i CLP-om. Uzimajući u obzir podatke dobivene u validacijskoj studiji (10. i 11.), test nadraživanja očiju s epitelom ljudske rožnice SkinEthic™ ima ukupnu točnost od 84 % (na temelju 200 kemikalija), osjetljivost od 95 % (na temelju 97 kemikalija), udio lažno negativnih rezultata od 5 % (na temelju 97 kemikalija), specifičnost od

72 % (na temelju 103 kemikalije) i udio lažno pozitivnih rezultata od 28 % (na temelju 103 kemikalije), u usporedbi s referentnim podacima *in vivo* ispitivanja na oku kunića (ispitna metoda B.5.) (2. i 14.), razvrstano u skladu sa sustavom razvrstavanja UN GHS i CLP-om.

16. Udjeli lažno negativnih rezultata dobiveni u oba testa RhCE, s tvarima ili smjesama, ulaze u 12-postotnu ukupnu vjerojatnost da se kemikalije u *in vivo* Draizeovu ispitivanju na oku u ponovljenim testovima utvrde kao kemikalije iz kategorije 2. ili bez kategorije u skladu sa sustavom UN GHS ili CLP-om; uzrok je tomu inherentna varijabilnost unutar testa u toj metodi (24.). Stope lažno negativnih rezultata dobivene u obje ispitne metode RhCE s tvarima ili smjesama nisu presudne u kontekstu ove ispitne metode jer je sve ispitivane kemikalije kod kojih je vijabilnost tkiva jednaka utvrđenim graničnim vrijednostima ili manja od njih (vidjeti stavak 44.) potrebno dodatno ispitati drugim *in vitro* ispitnim metodama ili, kao posljednja opcija kod kunića, ovisno o regulatornim zahtjevima, upotrebom strategije sekvencijskog ispitivanja u analizi snage dokaza. Ove se ispitne metode mogu primjenjivati za sve vrste kemikalija, pri čemu negativni rezultat treba biti prihvatljiv za nerazvrstavanje kemikalije s obzirom na nadraživanje oka i tešku ozljedu oka (bez kategorije prema sustavu UN GHS i CLP-u). Prije primjene testa nadraživanja očiju EpiOcular™ i testa nadraživanja očiju s epitelom ljudske rožnice SkinEthic™ u skladu s drugim shemama razvrstavanja osim sustava UN GHS/CLP-a trebalo bi se savjetovati s odgovarajućim regulatornim tijelima.
17. Ograničenje je ove ispitne metode to što ne omogućuje razlikovanje nadraživanja oka/reverzibilnih učinaka na oko (kategorija 2.) od teške ozljede oka/ireverzibilnih učinaka na oko (kategorija 1.), kako je utvrđeno sustavom UN GHS i CLP-om, niti razlikovanje kemikalija nadražujućih za oči (neobvezna kategorija 2.A) od kemikalija blago nadražujućih za oči (neobavezna kategorija 2.B), kako je utvrđeno sustavom UN GHS (1.). U te je svrhe potrebno daljnje ispitivanje drugim *in vitro* ispitnim metodama.
18. U ovoj se ispitnoj metodi izraz „ispitivana kemikalija” upotrebljava za označivanje onoga što se ispituje¹ te se ne odnosi na primjenjivost ispitne metode RhCE za ispitivanje tvari i/ili smjesa.

¹ U lipnju 2013. na zajedničkom sastanku OECD-a dogovoreno je da bi u novim i ažuriranim smjernicama OECD-a za ispitivanje, kada je to moguće, sada trebalo dosljednije upotrebljavati termin „ispitivana kemikalija” kojim se opisuje ono što se ispituje.

NAČELO ISPITIVANJA

19. Ispitivana kemikalija lokalno se nanosi na najmanje dva trodimenzionalna modela tkiva RhCE, a vijabilnost tkiva mjeri se nakon izlaganja i razdoblja inkubacije nakon tretiranja. Tkiva RhCE rekonstruiraju se iz primarnih ljudskih epidermalnih keratinocita ili ljudskih imortaliziranih epitelnih stanica rožnice, koje su uzgajane nekoliko dana kako bi tvorile stratificirani, visoko izdiferencirani ljuskavi epitel koji je morfološki sličan onom koji se nalazi u ljudskoj rožnici. Model tkiva EpiOcular™ RhCE sastoji se od najmanje tri vijabilna sloja stanica i nekeratinizirane površine, koji imaju strukturu koja nalikuje rožnici i analogna je strukturi *in vivo*. Model tkiva SkinEthic™ HCE RhCE sastoji se od najmanje četiri vijabilna sloja stanica, uključujući stupičaste bazalne stanice, prijelazne krilate stanice i površinske ljuskave stanice koje su slične uobičajenom epitelu ljudske rožnice (20. i 26.).
20. Kemijski inducirana teška ozljeda oka/nadraživanje oka, koji se *in vivo* uglavnom očituju kao zamućenje rožnice, iritis, crvenilo konjunktive i/ili kemoza konjunktive, rezultat je niza događaja koji započinju prodiranjem kemikalije kroz rožnicu i/ili konjunktivu i oštećenjem stanica. Do oštećenja stanica može doći preko nekoliko načina djelovanja, uključujući: liziranje stanične membrane (npr. površinski aktivnim tvarima, organskim otapalima); koagulaciju makromolekula (osobito proteina) (npr. površinski aktivnim tvarima, organskim otapalima, lužinama i kiselinama); saponifikaciju lipida (npr. lužinama); i alkilaciju ili druge kovalentne interakcije s makromolekulama (npr. izbjeljivačima, peroksidima i alkilatorima) (15., 27. i 28.). Međutim, pokazalo se da citotoksičnost ima važnu, a možda i primarnu, mehanicističku ulogu u određivanju ukupnog odgovora na kemikaliju u obliku teške ozljede oka/nadraživanja oka, neovisno o fizikalno-kemijskim procesima na kojima se temelji oštećenje tkiva (29. i 30.). Nadalje, potencijal kemikalije da izazove tešku ozljedu oka/nadraživanje oka prvenstveno je određen razmjerom početne ozljede (31.), koji je u korelaciji s razmjerom smrti stanica (29.) i s razmjerom naknadnih odgovora i konačnih ishoda (32.). Stoga slabo nadražujuće kemikalije obično utječu samo na površinski epitel rožnice, blago i umjereno nadražujuće kemikalije uglavnom oštećuju epitel i površinsku stromu, a jako nadražujuće kemikalije oštećuju epitel, dubinsku stromu, a ponekad i endotel rožnice (30. i 33.). Mjerenje vijabilnosti modela tkiva RhCE nakon lokalnog izlaganja ispitivanoj kemikaliji radi utvrđivanja kemikalija koje nije potrebno razvrstati s obzirom na tešku ozljedu oka/nadraživanje oka (bez kategorije prema sustavu UN GHS i CLP-u) temelji se na pretpostavci da će sve kemikalije koje induciraju tešku ozljedu oka ili nadraživanje oka inducirati citotoksičnost u epitelu rožnice i/ili konjunktivi.
21. Vijabilnost tkiva u modelima RhCE obično se mjeri enzimskom konverzijom vitalne boje MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazol bromid; tiazolil plavo tetrazolijev bromid; CAS broj 298-93-1], koju vrše vijabilne stanice tkiva, u sol

plavog MTT formazana koja se kvantitativno mjeri nakon ekstrakcije iz tkiva (16.). Kemikalije koje ne treba razvrstati i označiti u skladu sa sustavom UN GHS/CLP-om (bez kategorije) utvrđene su kao kemikalije koje ne smanjuju vijabilnost tkiva ispod utvrđenog praga (tj. vijabilnost tkiva > 60 % u testu EIT EpiOcular™ i testu EITL¹ s HCE-om SkinEthic™ ili > 50 % u testu EITS² s HCE-om SkinEthic™) (vidjeti stavak 44.).

DOKAZIVANJE OSPOSOBLJENOSTI

22. Prije rutinske upotrebe testova RhCE u regulatorne svrhe laboratoriji trebaju dokazati tehničku osposobljenost tako da točno predvide 15 kemikalija koje služe za dokazivanje osposobljenosti navedenih u tablici 1. Te su kemikalije odabrane među kemikalijama upotrijebljenima u validacijskim studijama validiranih referentnih metoda (8., 10. i 11.). Odabir uključuje, u mjeri u kojoj je to moguće, kemikalije: i. koje obuhvaćaju različita agregatna stanja; ii. koje obuhvaćaju puni raspon odgovora u obliku *in vivo* teške ozljede oka/nadraživanja oka na temelju visokokvalitetnih rezultata dobivenih u referentnom *in vivo* ispitivanju na oku kunića (ispitna metoda B.5.) (2. i 14.) te prema sustavu razvrstavanja UN GHS (tj. kategorije 1., 2.A, 2.B ili bez kategorije) (1.) i CLP-u (tj. kategorije 1., 2. ili bez kategorije); iii. koje obuhvaćaju različite *in vivo* pokretače razvrstavanja (24. i 25.); iv. koje su reprezentativne za kemijske razrede koji su korišteni u validacijskoj studiji (8., 10. i 11.); v. koje obuhvaćaju dobru i široku zastupljenost organskih funkcionalnih skupina (8., 10. i 11.); vi. koje imaju dobro utvrđene kemijske strukture (8., 10. i 11.); vii. koje su obojene i/ili koje izravno reduciraju MTT; viii. koje su dale ponovljive rezultate u ispitnim metodama RhCE tijekom njihovih validacija; ix. koje su točno predviđene ispitnim metodama RhCE tijekom njihovih validacijskih studija; x. koje obuhvaćaju puni raspon *in vitro* odgovora na temelju visokokvalitetnih podataka iz ispitnih metoda RhCE (vijabilnost od 0 do 100 %); xi. koje su komercijalno dostupne; i xii. koje nisu povezane s neprimjereno visokim troškovima nabave i/ili zbrinjavanja. U situacijama kada navedena kemikalija nije dostupna ili se ne može upotrijebiti iz drugih opravdanih razloga, mogla bi se upotrijebiti druga kemikalija koja ispunjava prethodno opisane kriterije, npr. kemikalije koje su upotrijebljene u validaciji validirane referentne metode. Međutim, takva odstupanja treba obrazložiti.

¹ EITL: test nadraživanja očiju (EIT) za tekućine s epitelom ljudske rožnice (HCE) SkinEthic™.

² EITS: test nadraživanja očiju (EIT) za kemikalije u krutom stanju s epitelom ljudske rožnice (HCE) SkinEthic™.

Tablica 1.: Popis kemikalija koje služe za dokazivanje osposobljenosti

Kemijski naziv	CAS br.	Organska funkcionalna skupina ¹	Agregatno stanje	Vijabilnost za VRM1 (%) ²	Vijabilnost za VRM2 (%) ³	Predviđanje VRM-a	Tvar koja reducira MTT	Interferencija s bojom
<i>In vivo kategorija 1.⁴</i>								
Metil-tioglikolat	2365-48-2	Ester karboksilne kiseline; tioalkohol	Tekućina	10,9 ± 6,4	5,5 ± 7,4	Predviđanje nije moguće	Da (jako)	Ne
Hidroksietil-akrilat	818-61-1	Akrlat; alkohol	Tekućina	7,5 ± 4,7 ⁵	1,6 ± 1,0	Predviđanje nije moguće	Ne	Ne
2,5-dimetil-2,5-heksandiol	110-03-2	Alkohol	Kruta tvar	2,3 ± 0,2	0,2 ± 0,1	Predviđanje nije moguće	Ne	Ne
Natrijev oksalat	62-76-0	Okso-karboksilna kiselina	Kruta tvar	29,0 ± 1,2	5,3 ± 4,1	Predviđanje nije moguće	Ne	Ne
<i>In vivo kategorija 2.A⁴</i>								
2,4,11,13-tetraazatetradekan-diimidamid, N,N"-bis(4-klorofenil)-3,12-diimino-, di-D-glukonat (20 %, vodena otopina) ⁶	18472-51-0	Aromatski heterociklički halid; aril halid; dihidroksilna skupina; gvanidin	Tekućina	4,0 ± 1,1	1,3 ± 0,6	Predviđanje nije moguće	Ne	Da (slabo)
Natrijev benzoat	532-32-1	Aril; karboksilna kiselina	Kruta tvar	3,5 ± 2,6	0,6 ± 0,1	Predviđanje nije moguće	Ne	Ne
<i>In vivo kategorija 2.B⁴</i>								
Dietiltoluamid	134-62-3	Benzamid	Tekućina	15,6 ± 6,3	2,8 ± 0,9	Predviđanje nije moguće	Ne	Ne
2,2-dimetil-3-metilenbiciklo [2.2.1] heptan	79-92-5	Alkan, razgranat tercijarnim ugljikom; alken; bicikloheptan; karbociklički spojevi s premoštenim prstenastim sustavom; cikloalkan	Kruta tvar	4,7 ± 1,5	15,8 ± 1,1	Predviđanje nije moguće	Ne	Ne
<i>In vivo bez kategorije⁴</i>								
1-etil-3-metilimidazolium etilsulfat	342573-75-5	Alkoksi; amonijeva sol; aril; imidazol; sulfat	Tekućina	79,9 ± 6,4	79,4 ± 6,2	Bez kat.	Ne	Ne

Kemijski naziv	CAS br.	Organska funkcionalna skupina ¹	Agregatno stanje	Vijabilnost za VRM1 (%) ²	Vijabilnost za VRM2 (%) ³	Predviđanje VRM-a	Tvar koja reducira MTT	Interferencija s bojom
Dikaprilil eter	629-82-3	Alkoksi; eter	Tekućina	97,8 ± 4,3	95,2 ± 3,0	Bez kat.	Ne	Ne
Piperonil butoksid	51-03-6	Alkoksi; benzodioksol; benzil; eter	Tekućina	104,2 ± 4,2	96,5 ± 3,5	Bez kat.	Ne	Ne
Polietilen glikol (PEG-40) hidrogeniranog ricinusovog ulja	61788-85-0	Acilal; alkohol; alil; eter	Viskozna tvar	77,6 ± 5,4	89,1 ± 2,9	Bez kat.	Ne	Ne
1-(4-klorofenil)-3-(3,4-diklorfenil) urea	101-20-2	Aromatski heterociklički halid; aril halid; derivati uree	Kruta tvar	106,7 ± 5,3	101,9 ± 6,6	Bez kat.	Ne	Ne
2,2'-metilen-bis-(6-(2H-benzotriazol-2-il)-4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenol)	103597-45-1	Alkan razgranat kvarternim ugljikom; vezani karbociklički aromatski spoj; vezani zasićeni heterociklički spojevi; prekursori kinoidnih spojeva; tert-butil	Kruta tvar	102,7 ± 13,4	97,7 ± 5,6	Bez kat.	Ne	Ne
Kalijev tetrafluoroborat	14075-53-7	Anorganska sol	Kruta tvar	88,6 ± 3,3	92,9 ± 5,1	Bez kat.	Ne	Ne

Kratice: CAS br. = registarski broj Službe za podatke o kemijskim tvarima; UN GHS = Globalno usklađeni sustav Ujedinjenih naroda za razvrstavanje i označivanje kemikalija (1.); VRM1 = validirana referentna metoda, EpiOcular™ EIT; VRM2 = validirana referentna metoda, SkinEthic™ HCE EIT; Interferencija s bojom = interferencija s bojom kod mjerenja standardne apsorbancije (optička gustoća (OD)) MTT formazana.

¹ Organska funkcionalna skupina dodijeljena u skladu s ugniježđenom analizom OECD-ova alata 3.1. (8.).

² Na temelju rezultata dobivenih testom nadraživanja očiju EpiOcular™ u validacijskoj studiji nadraživanja oka (EIVS) EURL ECVAM-a/udruženja Cosmetics Europe (8.).

³ Na temelju rezultata dobivenih testom nadraživanja očiju s epitelom ljudske rožnice SkinEthic™ u validacijskoj studiji (10. i 11.).

⁴ Na temelju rezultata *in vivo* ispitivanja na oku kunića (ispitna metoda B.5./Smjernica OECD-a za ispitivanje 405) (2. i 14.) i uz primjenu sustava UN GHS.

⁵ Na temelju rezultata dobivenih u konzorciju CEFIC za studiju o strategiji *in vitro* ispitivanja nadraživanja oka (CON4EI).

⁶ Razvrstavanje u kategoriju 2.A ili 2.B ovisi o tumačenju kriterija sustava UN GHS za razlikovanje tih dviju kategorija, odnosno je li za razvrstavanje u kategoriju 2.A potrebno da jedna od tri životinje ili dvije od tri životinje imaju učinke sedmog dana. *In vivo* istraživanje uključivalo je tri životinje. Osim zamućenja rožnice kod jedne životinje sve su krajnje točke ponovno imale vrijednost nula do sedmog dana ili ranije. Jedna životinja koja se nije potpuno oporavila do sedmog dana imala je vrijednost zamućenja rožnice 1 (sedmog dana), a potpuno se oporavila devetog dana.

23. U okviru ispitivanja osposobljenosti preporučuje se da korisnici po primitku provjere svojstva barijere tkiva u skladu sa specifikacijama proizvođača modela tkiva RhCE (vidjeti stavke 25., 27. i 30.) To je posebno važno ako se tkiva šalju na velike udaljenosti/tijekom dugih vremenskih razdoblja. Nakon što se ispitivanje uspješno uspostavi te nakon što se stekne i dokaže osposobljenost u pogledu njegove upotrebe, takva rutinska provjera neće biti potrebna. Međutim, kod rutinske upotrebe ispitivanja preporučuje se daljnje ocjenjivanje svojstava barijere u pravilnim vremenskim razmacima.

POSTUPAK

24. Ovom ispitnom metodom trenutačno su obuhvaćeni znanstveno valjani test nadraživanja očiju EpiOcular™ i test nadraživanja očiju s epitelom ljudske rožnice SkinEthic™ (9., 12. i 13.), koji se nazivaju validirane referentne metode (VRM1 i VRM2). Dostupni su standardni operativni postupci (SOP) za ispitnu metodu RhCE te bi ih trebalo primjenjivati pri provedbi i primjeni ispitnih metoda u laboratoriju (34. i 35.). U sljedećim stavcima i Dodatku 2. opisuju se glavni elementi i postupci testova RhCE.

ELEMENTI ISPITNE METODE RHCE

Opći uvjeti

25. Treba upotrebljavati relevantne ljudske stanice za rekonstrukciju trodimenzionalnog tkiva epitela koje nalikuje rožnici, a koje bi se trebalo sastojati od progresivno stratificiranih, ali ne i kornificiranih stanica. Model tkiva RhCE priprema se u umetcima s poroznom sintetičkom membranom kroz koju hranjive tvari mogu proći do stanica. U rekonstruiranom epitelu koji nalikuje rožnici trebaju biti prisutni višestruki slojevi vijabilnih, nekeratiniziranih stanica epitela. Model tkiva RhCE trebao bi imati površinu epitela koja je u izravnom dodiru sa zrakom kako bi se omogućilo izravno lokalno izlaganje ispitivanim kemikalijama na način koji je sličan načinu na koji bi epitel rožnice bio izložen *in vivo*. Model tkiva RhCE treba činiti funkcionalnu barijeru koja je dovoljno otporna da zaustavi brzi prodor citotoksičnih referentnih tvari, npr. Tritona X-100 ili natrijeva dodecil-sulfata (SDS). Treba dokazati funkciju barijere, a ona se može ocijeniti utvrđivanjem ili vremena izlaganja potrebnog za smanjenje vijabilnosti tkiva za 50 % (ET₅₀) nakon primjene referentne tvari u utvrđenoj, fiksnoj koncentraciji (npr. 100 µl 0,3-postotnog (v/v) Tritona X-100) ili koncentracije pri kojoj referentna tvar smanjuje vijabilnost tkiva za 50 % (IC₅₀) nakon fiksno vremena izlaganja (npr. 30 minuta tretiranja s 50 µl SDS-a) (vidjeti stavak 30.). Model tkiva RhCE treba biti dovoljno nepropustan da spriječi prolazak ispitivane kemikalije oko ruba vijabilnog tkiva, jer bi to moglo značiti loše

modeliranje izlaganja rožnice. Ljudske stanice koje se upotrebljavaju za utvrđivanje modela tkiva RhCE ne smiju biti onečišćene bakterijama, virusima, mikoplazmom i gljivicama. Dobavljač treba provjeriti je li model tkiva sterilan i utvrditi da nema kontaminacije gljivicama i bakterijama.

Funkcionalni uvjeti

Vijabilnost

26. Za kvantifikaciju vijabilnosti tkiva upotrebljava se MTT test (16.). Vijabilne stanice modela tkiva RhCE reduciraju vitalnu boju MTT u talog plavog MTT formazana, koji se zatim ekstrahira iz tkiva izopropanolom (ili sličnim otapalom). Ekstrahirani MTT formazan može se kvantificirati upotrebom mjerenja standardne apsorbancije (optička gustoća (OD)) ili postupkom HPLC/UPLC spektrofotometrije (36.). Optička gustoća (OD) samog ekstrakcijskog otapala treba biti dovoljno mala, tj. $OD < 0,1$. Korisnici modela tkiva RhCE trebali bi osigurati da svaka šarža modela tkiva RhCE koji se upotrebljava ispunjava utvrđene kriterije za negativnu kontrolu. Rasponi prihvatljivosti za vrijednosti optičke gustoće negativne kontrole za validirane referentne metode navedeni su u tablici 2. Korisnik HPLC/UPLC spektrofotometrije trebao bi upotrebljavati raspone optičke gustoće negativne kontrole navedene u tablici 2. kao kriterij prihvatljivosti za negativnu kontrolu. U ispitnom izvješću potrebno je dokumentirati da su tkiva tretirana s tvari za negativnu kontrolu stabilna u kulturi (daju slična mjerenja vijabilnosti tkiva) za vrijeme trajanja ispitnog izlaganja. Proizvođač tkiva trebao bi slijediti isti postupak kao dio kontrole kvalitete šarže tkiva, ali u tom se slučaju mogu primjenjivati različiti kriteriji prihvatljivosti od kriterija navedenih u tablici 2. Raspon prihvatljivosti (gornja i donja granica) za vrijednosti optičke gustoće negativne kontrole (u uvjetima ispitne metode za kontrolu kvalitete) treba utvrditi subjekt koji je razvio model tkiva RhCE ili dobavljač tog modela.

Tablica 2.: Rasponi prihvatljivosti vrijednosti optičke gustoće negativne kontrole (za korisnike testa)

Test	Donja granica prihvatljivosti	Gornja granica prihvatljivosti
EIT EpiOcular™ (OCL-200) – VRM1 (za protokole za tekućine i krute tvari)	$> 0,8^1$	$< 2,5$
EIT s HCE-om SkinEthic™ (HCE/S) – VRM2 (za protokole za tekućine i krute tvari)	$> 1,0$	$\leq 2,5$

¹ U ovom ograničenju prihvatljivosti uzima se u obzir mogućnost produljenog vremena otpreme/skladištenja (npr. > 4 dana), za što se pokazalo da ne utječe na uspješnost ispitne metode (37.).

Funkcija barijere

27. Model tkiva RhCE treba biti dovoljno debeo i čvrst kako bi onemogućio brzu penetraciju citotoksičnih referentnih tvari, kako je procijenjeno npr. vrijednošću ET_{50} (Triton X-100) ili IC_{50} (SDS) (tablica 3.). Subjekt koji je razvio model tkiva RhCE ili njegov prodavatelj trebao bi pri dostavi tkiva krajnjem korisniku dokazati funkciju barijere svake šarže modela tkiva RhCE koji se upotrebljava (vidjeti stavak 30.).

Morfologija

28. Histološko ispitivanje modela tkiva RhCE trebalo bi pokazivati strukturu epitela koja nalikuje ljudskoj rožnici (uključujući barem tri sloja vijabilnih stanica epitela i nekeratiniziranu površinu). Subjekt koji je razvio model ili dobavljač utvrdio je odgovarajuću morfologiju za validirane referentne metode te je stoga korisnik ispitne metode ne mora ponovno dokazivati za svaku šaržu tkiva.

Obnovljivost

29. Rezultati pozitivne i negativne kontrole ispitne metode trebaju dokazati obnovljivost tijekom vremena.

Kontrola kvalitete (KK)

30. Model tkiva RhCE trebao bi se upotrebljavati samo ako subjekt koji ga je razvio ili dobavljač dokaže da svaka šarža upotrijebljenog modela tkiva RhCE ispunjava definirane kriterije za odobrenje proizvoda, među kojima su najvažniji vijabilnost (stavak 26.) i funkcija barijere (vidjeti stavak 27.). Raspon prihvatljivosti (gornje i donje granice) za funkcije barijere, kako se mjeri vrijednošću ET_{50} ili IC_{50} (vidjeti stavke 25. i 26.), treba utvrditi subjekt koji je razvio model tkiva RhCE ili njegov dobavljač. Raspon prihvatljivosti vrijednosti ET_{50} i IC_{50} koji subjekt koji je razvio modele tkiva RhCE (koji se upotrebljavaju u validiranim referentnim metodama) ili njihov dobavljač upotrebljava kao kriterij za kontrolu kvalitete šarže naveden je u tablici 3. Subjekt koji je razvio model tkiva RhCE ili njegov dobavljač treba korisnicima ispitne metode dostaviti podatke kojima se dokazuje usklađenost sa svim kriterijima za odobrenje proizvoda kako bi korisnici mogli uključiti te informacije u izvješće o ispitivanju. Samo rezultati dobiveni s tkivima koja ispunjavaju sve te kriterije za odobrenje proizvoda mogu se prihvatiti za pouzdano predviđanje kemikalija koje ne treba razvrstati i označiti s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka u skladu sa sustavom UN GHS/CLP-om.

Tablica 3.: Kriterij za kontrolu kvalitete šarže

Test	Donja granica prihvatljivosti	Gornja granica prihvatljivosti
EIT EpiOcular™ (OCL-200) – VRM1 (100 µl 0,3-postotnog (v/v) Tritona X-100)	$ET_{50} = 12,2$ min	$ET_{50} = 37,5$ min
EIT s HCE-om SkinEthic™ (HCE/S) – VRM2 (30 minuta tretiranja s 50 µl SDS-a)	$IC_{50} = 1$ mg/ml	$IC_{50} = 3,2$ mg/ml

Primjena ispitivane kemikalije i kontrolnih tvari

31. Za svaku ispitivanu kemikaliju i svaku kontrolnu tvar trebalo bi upotrijebiti najmanje dva ponovljena uzorka tkiva u svakom ciklusu. Upotrebljavaju se dva različita protokola za tretiranje, jedan za tekuće ispitivane kemikalije i jedan za kemikalije u krutom stanju (34. i 35.). Kod obje metode i oba protokola površinu modela tkiva treba navlažiti Dulbeccovom fiziološkom otopinom puferiranom fosfatnim puferom bez kalcija i magnezija (DPBS bez $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) prije primjene ispitivanih kemikalija kako bi se oponašali vlažni uvjeti ljudskog oka. Tretiranje tkiva započinje izlaganjem ispitivanim kemikalijama i kontrolnim tvarima. Kod oba protokola za tretiranje u obje validirane ispitne metode treba primijeniti dovoljnu količinu ispitivane kemikalije ili kontrolne tvari kako bi se ravnomjerno prekrila površina epitela tako da se izbjegne beskonačna doza (vidjeti stavke 32. i 33.) (Dodatak 2.).
32. Ispitivane kemikalije koje se mogu pipetirati pri temperaturi od 37 °C ili nižoj (prema potrebi upotrebom pipete koja radi na načelu pozitivnog istisnog volumena) tretiraju se kao tekućine u validiranim referentnim metodama, a u suprotnom bi se trebale tretirati kao kemikalije u krutom stanju (vidjeti stavak 33.). U validiranim referentnim metodama tekuće ispitivane kemikalije ravnomjerno se nanose na površinu tkiva (tj. primjenjuje se najmanje 60 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$) (vidjeti Dodatak 2., 33. i 34.). Kapilarnost (učinak površinske napetosti) do koje može doći zbog malih volumena koji se primjenjuju na umetak (na površinu tkiva) treba izbjegavati u mjeri u kojoj je to moguće kako bi se zajamčilo točno doziranje tkiva. Tkiva tretirana tekućim ispitivanim kemikalijama inkubiraju se 30 minuta u standardnim uvjetima kulture (37 $\pm$ 2 °C, 5 $\pm$ 1 % CO_2 , relativna vlažnost $\geq$ 95 %). Na kraju razdoblja izlaganja tekuću ispitivanu kemikaliju i kontrolne tvari treba pažljivo ukloniti s površine tkiva obilnim ispiranjem DPBS-om bez $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ na sobnoj temperaturi. Nakon tog koraka ispiranja slijedi uranjanje u svježi medij na sobnoj temperaturi nakon izlaganja (kako bi se uklonila ispitivana kemikalija koju je tkivo apsorbiralo) u unaprijed utvrđenom razdoblju koje ovisi o upotrijebljenoj validiranoj referentnoj metodi. Samo u slučaju metode VRM1 prije provedbe MTT testa primjenjuje se inkubacija nakon izlaganja u svježem mediju u standardnim uvjetima kulture (vidjeti Dodatak 2., 34. i 35.).
33. Ispitivane kemikalije koje se ne mogu pipetirati pri temperaturama do 37 °C u validiranim referentnim metodama tretiraju se kao krute tvari. Količina ispitivane kemikalije koja se primjenjuje treba biti dovoljna kako bi se prekrila cijela površina tkiva, tj. treba primijeniti najmanje 60 mg/cm^2 (Dodatak 2.). Kad god je to moguće, kemikalije u krutom stanju treba ispitivati u obliku sitnog praha. Tkiva tretirana ispitivanim kemikalijama u krutom stanju inkubiraju se u unaprijed utvrđenom razdoblju (ovisno o upotrijebljenoj validiranoj referentnoj metodi) u standardnim uvjetima kulture (vidjeti Dodatak 2., 34. i 35.). Na kraju razdoblja izlaganja ispitivanu kemikaliju u krutom stanju i kontrolne tvari treba pažljivo ukloniti s površine tkiva

obilnim ispiranjem DPBS-om bez $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ na sobnoj temperaturi. Nakon tog koraka ispiranja, a prije provedbe MTT testa, nakon izlaganja slijedi uranjanje u svježi medij na sobnoj temperaturi (kako bi se uklonila ispitivana kemikalija koju je tkivo apsorbiralo) u unaprijed utvrđenom razdoblju, koje ovisi o upotrijebljenoj validiranoj referentnoj metodi, te inkubacija u svježem mediju nakon izlaganja u standardnim uvjetima kulture (vidjeti Dodatak 2., 34. i 35.).

34. U svaki ciklus treba uključiti istodobne negativne i pozitivne kontrole kako bi se dokazalo da su vijabilnost (utvrđena negativnom kontrolom) i osjetljivost (utvrđena pozitivnom kontrolom) tkiva u okviru raspona prihvatljivosti koji su utvrđeni na temelju prijašnjih podataka. Istodobna negativna kontrola pruža i osnovicu (100-postotna vijabilnost) za izračun postotka relativne vijabilnosti tkiva tretiranih ispitivanom kemikalijom ($\% \text{vijabilnost}_{\text{test}}$). Kao tvar za pozitivnu kontrolu za upotrebu s validiranim referentnim metodama preporučuje se čisti metil-acetat (CAS br. 79-20-9, komercijalno dostupan kod npr. društva Sigma-Aldrich, Cat# 45997; tekućina). Kao tvari za negativnu kontrolu za upotrebu s metodama VRM1 i VRM2 preporučuju se ultračisti H_2O i DPBS bez $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$. Te su se kontrolne tvari upotrebljavale u validacijskim studijama validiranih referentnih metoda i za njih postoji najviše prijašnjih podataka. Upotrebu primjerenih alternativnih tvari za pozitivnu i negativnu kontrolu treba znanstveno i primjereno obrazložiti. Negativne i pozitivne kontrole treba ispitati primjenom istih protokola kao što su oni koji su upotrijebljeni za ispitivane kemikalije uključene u ciklus (tj. za tekućine i/ili kemikalije u krutom stanju). Nakon te primjene slijedi tretiranje izlaganjem, ispiranje, uranjanje nakon izlaganja i inkubacija nakon izlaganja, ako je primjenjivo, kako je opisano za kontrole koje se provode istodobno s tekućim ispitivanim kemikalijama (vidjeti stavak 32.) ili za kontrole koje se provode istodobno s ispitivanim kemikalijama u krutom stanju (vidjeti stavak 33.), prije provedbe MTT testa (vidjeti stavak 35. i literaturu pod 34. i 35.). Jedan skup negativnih i pozitivnih kontrola dovoljan je za sve ispitivane kemikalije u istom agregatnom stanju (tekućine ili kemikalije u krutom stanju) uključene u isti ciklus.

Mjerenja vijabilnosti tkiva

35. MTT test standardizirana je kvantitativna metoda (16.) koja bi se trebala upotrebljavati za mjerenje vijabilnosti tkiva u okviru ove ispitne metode. Taj je test prikladan za trodimenzionalni model tkiva. MTT test provodi se neposredno nakon razdoblja inkubacije nakon izlaganja. Kod validiranih referentnih metoda uzorak modela tkiva RhCE stavlja se u 0,3 ml otopine MTT-a koncentracije 1 mg/ml na 180 ± 15 min u standardnim uvjetima kulture. Vijabilne stanice modela tkiva RhCE reduciraju vitalnu boju MTT u talog plavog MTT formazana. Nataloženi proizvod plavog MTT formazana zatim se ekstrahira iz tkiva upotrebom primjerenog volumena izopropanola (ili sličnog otapala) (34. i 35.). Tkiva koja se ispituju tekućim

ispitivanim kemikalijama treba ekstrahirati i iz gornjeg i donjeg dijela tkiva, dok tkiva koja se ispituju kemikalijama u krutom stanju i obojenim tekućinama treba ekstrahirati samo iz donjeg dijela tkiva (kako bi se smanjila potencijalna kontaminacija ekstrakcijske otopine izopropanola ispitivanom kemikalijom koja je možda ostala u tkivu). Tkiva koja se ispituju tekućim ispitivanim kemikalijama koje nije jednostavno isprati isto se mogu ekstrahirati samo iz donjeg dijela tkiva. Tvari za negativnu i pozitivnu kontrolu koje se ispituju istodobno treba tretirati slično kao i ispitivane kemikalije. Ekstrahirani MTT formazan može se kvantificirati mjerenjem standardne apsorbancije (OD) na 570 nm upotrebom pojasa propuštanja do najviše ± 30 nm ili upotrebom postupka HPLC/UPLC spektrofotometrije (vidjeti stavak 42. i literaturu pod 11. i 36.).

36. Optička svojstva ispitivanih kemikalija ili njihovo kemijsko djelovanje na MTT može utjecati na mjerenje MTT formazana, što dovodi do pogrešne procjene vijabilnosti tkiva. Ispitivane kemikalije mogu utjecati na mjerenje MTT formazana izravnom redukcijom MTT-a u plavi MTT formazan i/ili interferencijom s bojom ako ispitivana kemikalija apsorbira, prirodno ili zbog postupaka obrade, u istom rasponu optičke gustoće kao i MTT formazan (tj. približno 570 nm). Prije ispitivanja treba provesti prethodne provjere kako bi se omogućilo utvrđivanje potencijalnih tvari koje izravno reduciraju MTT i/ili kemikalija koje interferiraju s bojom te se trebaju upotrijebiti dodatne kontrole za otkrivanje i ispravljanje moguće interferencije tih ispitivanih kemikalija (vidjeti stavke od 37. do 41.). To je osobito važno kada se određena ispitivana kemikalija ne ispere u potpunosti s modela tkiva RhCE ili prodre u epitel koji nalikuje rožnici te je stoga prisutna u modelima tkiva RhCE pri provođenju MTT testa. Za ispitivane kemikalije koje apsorbiraju svjetlost u istom rasponu kao i MTT formazan (prirodno ili nakon tretiranja), koje nisu kompatibilne s mjerenjem standardne apsorbancije (OD) MTT formazana zbog prejake interferencije, tj. jake apsorbancije na 570 ± 30 nm, za mjerenje MTT formazana može se upotrijebiti postupak HPLC/UPLC spektrofotometrije (vidjeti stavke 41. i 42.) (11. i 36.). Podroban opis načina na koji se otkrivaju i ispravljaju izravna redukcija MTT-a i interferencije s bojilima dostupan je u standardnim operativnim postupcima za validirane referentne metode (34. i 35.). Ilustrativni dijagrami toka koji daju smjernice o tome kako utvrditi kemikalije koje izravno reduciraju MTT i/ili kemikalije koje interferiraju s bojom te kako postupati s njima u okviru VRM1 i VRM2 navedeni su u dodacima III. i IV.
37. Kako bi se utvrdila potencijalna interferencija ispitivanih kemikalija koje apsorbiraju svjetlost u istom rasponu kao i MTT formazan (prirodno ili nakon tretiranja) i odlučilo jesu li potrebne dodatne kontrole, ispitivana kemikalija dodaje se vodi i/ili izopropanolu te se inkubira na odgovarajuće vrijeme na sobnoj temperaturi (vidjeti Dodatak 2. te literaturu pod 34. i 35.). Ako ispitivana kemikalija u vodi i/ili

izopropanolu apsorbira dovoljno svjetlosti u rasponu od 570 ± 20 nm za VRM1 (vidjeti Dodatak 3.) ili ako se miješanjem ispitivane kemikalije s vodom za VRM2 dobije obojena otopina (vidjeti Dodatak 4.), pretpostavlja se da ispitivana kemikalija utječe na mjerenje standardne apsorbancije (OD) MTT formazana i treba provesti daljnje kontrole bojila ili treba upotrijebiti postupak HPLC/UPLC spektrofotometrije, u kojem slučaju te kontrole nisu potrebne (vidjeti stavke 41. i 42., dodatke III. i IV. te literaturu pod 34. i 35.). Pri provedbi mjerenja standardne apsorbancije (OD), svaku interferirajuću ispitivanu kemikaliju treba primijeniti na najmanje dva ponovljena uzorka vijabilnog tkiva, koji se podvrgavaju cijelom postupku ispitivanja, ali se u koraku inkubacije MTT-a inkubiraju s medijem, a ne s otopinom MTT-a, kako bi se provela kontrola nespecifične boje u živim tkivima (NSC_{living}) (34. i 35.). Kontrolu NSC_{living} treba obavljati istodobno uz ispitivanje obojene ispitivane kemikalije, a u slučaju više ispitivanja sa svakim provedenim ispitivanjem (u svakom ciklusu) treba provesti neovisnu kontrolu NSC_{living} zbog svojstvene biološke varijabilnosti živih tkiva. Prava vijabilnost tkiva računa se kao: postotak vijabilnosti tkiva koji se dobiva iz živih tkiva izloženih interferirajućoj ispitivanoj kemikaliji i inkubiranih otopinom MTT-a ($\%Vijabilnost_{\text{test}}$), umanjeno za postotak nespecifične boje dobiven sa živim tkivima izloženima interferirajućoj ispitivanoj kemikaliji i inkubiranim s medijem bez MTT-a, koji se provodi istodobno kao i test koji se ispravlja ($\%NSC_{\text{living}}$), tj. prava vijabilnost tkiva = $[\%Vijabilnost_{\text{test}}] - [\%NSC_{\text{living}}]$.

38. Kako bi se identificirale tvari koje izravno reduciraju MTT, svaku bi ispitivanu kemikaliju trebalo dodati u svježe pripremljenu otopinu MTT-a. Primjerena količina ispitivane kemikalije dodaje se otopini MTT-a i smjesa se inkubira približno tri sata u standardnim uvjetima kulture (vidjeti dodatke III. i IV.) (34. i 35.). Ako smjesa MTT-a koja sadržava ispitivanu kemikaliju (ili suspenziju za netopljive ispitivane kemikalije) postane plava/ljubičasta, pretpostavlja se da ispitivana kemikalija izravno reducira MTT i treba se provesti daljnja funkcionalna provjera nevijabilnih modela tkiva RhCE, neovisno o upotrebi mjerenja standardne apsorbancije (OD) ili postupka HPLC/UPLC spektrofotometrije. U toj dodatnoj funkcionalnoj provjeri upotrebljavaju se mrtva tkiva kod kojih je prisutna samo preostala metabolička aktivnost, ali koja apsorbiraju i zadržavaju ispitivanu kemikaliju na sličan način kao i vijabilna tkiva. Mrtva tkiva za metodu VRM1 pripremaju se izlaganjem niskoj temperaturi („usmrćivanje zamrzavanjem”). Mrtva tkiva za metodu VRM2 pripremaju se produljenom inkubacijom (npr. najmanje 24 ± 1 h) u vodi, nakon čega slijedi skladištenje na niskoj temperaturi („usmrćivanje vodom”). Svaka ispitivana kemikalija koja reducira MTT primjenjuje se na najmanje dva ponovljena uzorka mrtvog tkiva koji se podvrgavaju cijelom postupku ispitivanja kako bi se provela kontrola nespecifične redukcije MTT-a (NSMTT) (34. i 35.). Dovoljna je jedna kontrola NSMTT po ispitivanoj kemikaliji neovisno o broju provedenih neovisnih ispitivanja/ciklusa. Prava vijabilnost tkiva računa se kao: postotak vijabilnosti tkiva

dobiven sa živim tkivima izloženima tvari koja reducira MTT (%Vijabilnost_{test}), umanjen za postotak nespecifične redukcije MTT-a dobiven s mrtvim tkivima izloženima istoj tvari koja reducira MTT, izračunano u odnosu na negativnu kontrolu koja se provodi istodobno kao i test koji se ispravlja (%NSMTT), tj. prava vijabilnost tkiva = [%Vijabilnost_{test}] – [%NSMTT].

39. Za ispitivane kemikalije za koje se utvrdi da interferiraju s bojom (vidjeti stavak 37.) i izravno reduciraju MTT (vidjeti stavak 38.) bit će potreban i treći skup kontrola pri mjerenju standardne apsorbancije (OD) osim kontrola NSMTT i NSC_{living} opisanih u prethodnim stavcima. To je obično slučaj kod tamno obojenih ispitivanih kemikalija koje apsorbiraju svjetlost u rasponu od 570 ± 30 nm (npr. plave, ljubičaste ili crne kemikalije) jer njihova intrinzična boja sprečava procjenu njihove sposobnosti da izravno reduciraju MTT, kako je opisano u stavku 38. Zbog toga je automatski obvezna upotreba kontrola NSMTT, zajedno s kontrolama NSC_{living}. I živa i mrtva tkiva mogu apsorbirati i zadržati ispitivane kemikalije za koje se provode i kontrola NSMTT i kontrola NSC_{living}. Stoga se u tom slučaju kontrolom NSMTT može ispraviti ne samo potencijalna izravna redukcija MTT-a ispitivanom kemikalijom, već i interferencija s bojom koja je posljedica apsorpcije i zadržavanja ispitivane kemikalije u mrtvim tkivima. To bi moglo dovesti do dvostrukog ispravka za interferenciju s bojom jer se kontrolom NSC_{living} već ispravlja interferencija s bojom koja je posljedica apsorpcije i zadržavanja ispitivane kemikalije u živim tkivima. Kako bi se izbjegao mogući dvostruki ispravak za interferenciju s bojom, treba provesti treću kontrolu za nespecifičnu boju u mrtvim tkivima (NSC_{killed}) (vidjeti dodatke III i IV. te literaturu pod 34. i 35.). U toj dodatnoj kontroli ispitivana kemikalija primjenjuje se na najmanje dva ponovljena uzorka mrtvog tkiva, koja se podvrgavaju cijelom postupku ispitivanja, ali se u koraku inkubacije MTT-a inkubiraju s medijem, a ne s otopinom MTT-a. Dovoljna je jedna kontrola NSC_{killed} po ispitivanoj kemikaliji neovisno o broju provedenih neovisnih ispitivanja/ciklusa, ali treba je provoditi istodobno s kontrolom NSMTT i s istom šaržom tkiva. Prava vijabilnost tkiva računa se kao: postotak vijabilnosti tkiva dobiven sa živim tkivima izloženima ispitivanoj kemikaliji (%Vijabilnost_{test}), umanjeno za %NSMTT i %NSC_{living} te uvećano za postotak nespecifične boje dobiven s mrtvim tkivima izloženima interferirajućoj ispitivanoj kemikaliji i inkubiranim s medijem bez MTT-a, izračunano u odnosu na negativnu kontrolu koja se provodi istodobno kao i test koji se ispravlja (%NSC_{killed}), tj. prava vijabilnost tkiva = [%Vijabilnost_{test}] – [%NSMTT] – [%NSC_{living}] + [%NSC_{killed}].
40. Važno je napomenuti da nespecifična redukcija MTT-a i interferencije s nespecifičnim bojama mogu povećati optičku gustoću (kod mjerenja standardne apsorbancije) ekstrakta tkiva iznad raspona linearnosti spektrofotometra i da nespecifična redukcija MTT-a može povećati i površinu pika MTT formazana (kod

mjerenja HPLC/UPLC spektrofotometrijom) ekstrakta tkiva iznad raspona linearnosti spektrofotometra. Na temelju toga važno je da svaki laboratorij prije početka ispitivanja ispitivanih kemikalija u regulatorne svrhe utvrdi raspon linearnosti optičke gustoće/površine pika svojeg spektrofotometra, npr. s MTT formazanom (CAS # 57360-69-7), komercijalno dostupnim kod npr. društva Sigma-Aldrich (Cat# M2003).

41. Mjerenje standardne apsorbancije spektrofotometrom primjereno je za procjenu kemikalija koje izravno reduciraju MTT i ispitivanih kemikalija koje interferiraju s bojom ako je uočena interferencija kod mjerenja MTT formazana prevelika (tj. vrijednosti optičke gustoće ekstrakata tkiva dobivenih s ispitivanom kemikalijom bez ispravaka za izravnu redukciju MTT-a i/ili interferencija s bojom unutar su linearnog raspona spektrofotometra). Ipak, rezultate za ispitivane kemikalije koji daju %NSMTT i/ili %NSC_{living} $\geq 60\%$ (VRM1 i VRM2 za protokol za tekućine) ili 50 % (VRM2 za protokol za kemikalije u krutom stanju) negativne kontrole trebalo bi oprezno tumačiti jer je to utvrđena granična vrijednost koja se u validiranim referentnim metodama upotrebljava za razlikovanje razvrstanih i nerazvrstanih kemikalija (vidjeti stavak 44.). Međutim, standardna apsorbancija ne može se mjeriti kada je interferencija s mjerenjem MTT formazana prejaka (tj. kada dovodi do neispravljenih vrijednosti optičke gustoće ispitivanih ekstrakata tkiva izvan linearnog raspona spektrofotometra). Obojene ispitivane kemikalije ili ispitivane kemikalije koje postanu obojene u dodiru s vodom ili izopropanolom koje prejako interferiraju s mjerenjem standardne apsorbancije (OD) MTT formazana mogu se procijeniti primjenom HPLC/UPLC spektrofotometrije (vidjeti dodatke III. i IV.). Razlog je tome što sustav HPLC/UPLC omogućuje izdvajanje MTT formazana iz kemikalije prije njegove kvantifikacije (36.). Zato pri upotrebi HPLC/UPLC spektrofotometrije nikada nisu potrebne kontrole NSC_{living} i NSC_{killed}, neovisno o kemikaliji koja se ispituje. Kontrole NSMTT ipak treba upotrijebiti ako se sumnja u to da ispitivana kemikalija izravno reducira MTT (nakon postupka opisanog u stavku 38.). Kontrole NSMTT treba upotrijebiti i s ispitivanim kemikalijama koje imaju boju (intrinzičnu ili koja se javlja u vodi) koja sprečava procjenu njihove sposobnosti da izravno reduciraju MTT, kako je opisano u stavku 38. Ako se za mjerenje MTT formazana upotrebljava HPLC/UPLC spektrofotometrija, postotak vijabilnosti tkiva računa se kao postotak površine pika MTT formazana dobiven sa živim tkivima izloženima ispitivanoj kemikaliji u odnosu na pik MTT formazana dobiven s istodobnom negativnom kontrolom. Za ispitivane kemikalije koje mogu izravno reducirati MTT prava vijabilnost tkiva računa se kao: %Vijabilnost_{test} umanjeno za %NSMTT, kako je opisano u posljednjoj rečenici stavka 38. Naposljetku, treba napomenuti da se ispitnim metodama RhCE ne mogu procijeniti kemikalije koje izravno reduciraju MTT ili kemikalije koje izravno reduciraju MTT koje ujedno mogu interferirati s bojom, koje se zadržavaju u tkivima nakon tretiranja i reduciraju MTT toliko jako da dovode do optičke gustoće (upotrebom standardnog mjerenja optičke gustoće) ili

površina pika (upotrebom UPLC/HPLC spektrofotometrije) ispitivanih ekstrakata tkiva koje su izvan raspona linearnosti spektrofotometra, iako se očekuje da će se one javljati samo u iznimno rijetkim slučajevima.

42. HPLC/UPLC spektrofotometrija može se upotrebljavati sa svim vrstama ispitivanih kemikalija (obojenima i neobojenima, koje reduciraju MTT i koje ga ne reduciraju) za mjerenje MTT formazana (11. i 36.). Zbog raznolikosti sustava HPLC/UPLC spektrofotometrije nije izvedivo da svaki korisnik uspostavi identične uvjete sustava. Stoga bi kvalifikaciju sustava HPLC/UPLC spektrofotometrije trebalo dokazati prije njegove upotrebe za kvantificiranje MTT formazana iz ekstrakata tkiva tako da sustav ispuni kriterije prihvatljivosti za skup standardnih parametara kvalifikacije u skladu s parametrima opisanim u smjernicama američke Uprave za hranu i lijekove o validaciji bioanalitičkih metoda namijenjenih industriji (36. i 38.). Ti ključni parametri i njihovi kriteriji prihvatljivosti prikazani su u Dodatku 5. Kada se ispune kriteriji prihvatljivosti definirani u Dodatku 5., smatra se da je sustav HPLC/UPLC spektrofotometrije kvalificiran i spreman za mjerenje MTT formazana u pokusnim uvjetima opisanim u ovoj ispitnoj metodi.

Kriteriji prihvatljivosti

43. Za svaki ciklus u kojem se upotrebljavaju šarže tkiva RhCE koje ispunjavaju kontrolu kvalitete (vidjeti stavak 30.), tkiva tretirana s tvari za negativnu kontrolu trebala bi imati optičku gustoću koja odražava kvalitetu tkiva za koja su poštovani koraci dopreme i preuzimanja te svi postupci protokola i koja ne bi smjela biti izvan prethodno utvrđenih granica opisanih u tablici 2. (vidjeti stavak 26.). Slično tome, tkiva tretirana s tvari za pozitivnu kontrolu, tj. metilacetatom, trebaju pokazivati srednju vijabilnost tkiva $< 50 \%$ u odnosu na negativnu kontrolu u metodi VRM1 s protokolom za tekućine ili kemikalije u krutom stanju i $\leq 30 \%$ (protokol za tekućine) ili $\leq 20 \%$ (protokol za kemikalije u krutom stanju) u odnosu na negativnu kontrolu u metodi VRM2, što odražava sposobnost tkiva da odgovore na nadražujuću ispitivanu kemikaliju u uvjetima ispitivane metode (34. i 35.). Varijabilnost između ponovljenih uzoraka tkiva s ispitivanim kemikalijama i kontrolnim tvarima trebala bi biti unutar prihvaćenih granica (tj. razlika u vijabilnosti između dva ponovljena uzorka tkiva trebala bi biti manja od 20% odnosno standardna devijacija u tri ponovljena uzorka tkiva ne bi trebala biti veća od 18%). Ako je negativna ili pozitivna kontrola uključena u ciklus izvan prihvaćenih raspona, smatra se da ciklus ne ispunjava zahtjeve i treba ga ponoviti. Ako je varijabilnost između ponovljenih uzorka tkiva s ispitivanom kemikalijom izvan prihvaćenog raspona, mora se smatrati da test ne ispunjava zahtjeve i ispitivanu kemikaliju treba ponovno ispitati.

Tumačenje rezultata i model predviđanja

44. Vrijednosti optičke gustoće/površine pika dobivene s ponovljenim ekstraktima tkiva za svaku ispitivanu kemikaliju treba upotrebljavati za izračun srednjeg postotka vijabilnosti tkiva (srednja vrijednost među ponovljenim uzorcima tkiva) normaliziranog u odnosu na negativnu kontrolu, koja je određena kao 100 %. Granična vrijednost postotka vijabilnosti tkiva za utvrđivanje ispitivanih kemikalija koje ne treba razvrstati s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka (bez kategorije prema sustavu UN GHS i CLP-u) navedena je u tablici 4. Rezultate stoga treba tumačiti na sljedeći način:

- utvrđuje se da ispitivanu kemikaliju ne treba razvrstati i označiti u skladu sa sustavom UN GHS i CLP-om (bez kategorije) ako je srednji postotak vijabilnosti tkiva nakon izlaganja i inkubacije nakon izlaganja veći od ($>$) utvrđene granične vrijednosti postotka vijabilnosti tkiva, kako je prikazano u tablici 4. U tom slučaju nije potrebno daljnje ispitivanje drugim ispitnim metodama,
- ako je srednji postotak vijabilnosti tkiva nakon izlaganja te inkubacije nakon izlaganja manji od ili jednak ($\leq$) utvrđenoj graničnoj vrijednosti postotka vijabilnosti tkiva, predviđanje nije moguće, kako je prikazano u tablici 4. U tom će slučaju biti potrebno daljnje ispitivanje s drugim ispitnim metodama jer ispitne metode RhCE pokazuju određeni broj lažno pozitivnih rezultata (vidjeti stavke 14. i 15.) i ne razlikuju kategorije 1. i 2. prema sustavu UN GHS i CLP-u (vidjeti stavak 17.).

Tablica 4.: Modeli predviđanja u skladu s razvrstavanjem prema sustavu UN GHS i CLP-u

VRM	Bez kategorije	Predviđanje nije moguće
VRM 1 – EIT EpiOcular™ (za oba protokola)	Srednja vijabilnost tkiva $> 60 \%$	Srednja vijabilnost tkiva $\leq 60 \%$
VRM 2 – EIT s HCE-om SkinEthic™ (za protokol za tekućine)	Srednja vijabilnost tkiva $> 60 \%$	Srednja vijabilnost tkiva $\leq 60 \%$
VRM2 – EIT s HCE-om SkinEthic™ (za protokol za kemikalije u krutom stanju)	Srednja vijabilnost tkiva $> 50 \%$	Srednja vijabilnost tkiva $\leq 50 \%$

45. Jedan test koji obuhvaća najmanje dva ponovljena uzorka tkiva trebao bi biti dovoljan za ispitivanu kemikaliju ako je rezultat nedvosmislen. Međutim, u slučajevima graničnih rezultata, kao što su neusklađena ponovljena mjerenja i/ili srednji postotak vijabilnosti tkiva od $60 \pm 5 \%$ (VRM1 i VRM2 za protokol za tekućine) ili $50 \pm 5 \%$ (VRM2 za protokol za kemikalije u krutom stanju), trebalo bi razmotriti drugi test, a i treći test u slučaju neusklađenih rezultata između prva dva testa.

46. Za specifične vrste smjesa mogu se razmotriti različite granične vrijednosti postotaka vijabilnosti tkiva prema kojima se razvrstane ispitivane kemikalije razlikuju od nerazvrstanih, ako je to primjereno i obrazloženo, kako bi se povećala ukupna uspješnost ispitne metode za te vrste smjesa (vidjeti stavak 14.). Referentne kemikalije mogu biti korisne za procjenu potencijala nepoznate ispitivane kemikalije ili razreda proizvoda da uzrokuju tešku ozljedu oka/nadraživanje oka ili za procjenu relativne potencijalne okularne toksičnosti razvrstane kemikalije unutar specifičnog raspona pozitivnih odgovora.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Podaci

47. Podatke iz pojedinačnih ponovljenih tkiva u ciklusu (npr. podaci o vrijednosti optičke gustoće/površini pika MTT formazana i izračunanom postotku vijabilnosti tkiva za ispitivanu kemikaliju i kontrole te konačno predviđanje na temelju ispitne metode RhCE) treba navesti u obliku tablice za svaku ispitivanu kemikaliju, prema potrebi uključujući i podatke iz ponovljenih testova. Osim toga, treba navesti i srednji postotak vijabilnosti tkiva i razliku vijabilnosti između dva ponovljena uzorka tkiva (ako je $n = 2$ ponovljena uzorka tkiva) ili standardnu devijaciju (ako je $n \geq 3$ ponovljena uzorka tkiva) za svaku pojedinačnu ispitivanu kemikaliju i kontrolu. Za svaku ispitivanu kemikaliju treba navesti svaku uočenu interferenciju s mjerenjem MTT formazana koje ispitivana kemikalija uzrokuje izravnom redukcijom MTT-a i/ili interferencijom s bojom.

Izvješće o ispitivanju

48. Izvješće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije.

Ispitivana kemikalija

Tvar s jednim sastojkom:

- kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv(i), CAS registracijski broj(evi), SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula i/ili druge identifikacijske oznake,
- agregatno stanje, hlapljivost, pH-vrijednost, LogP, molekularna masa, kemijski razred i dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva relevantna za provedbu studije, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,
- čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.,
- obrada prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),
- uvjeti skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni.

Tvar s više sastojaka, UVCB tvar i smjesa:

- opisane koliko god je to moguće npr. kemijskim identitetom (vidjeti gore), čistoćom, količinskom zastupljenošću i relevantnim fizikalno-kemijskim svojstvima sastojaka (vidjeti gore), u mjeri u kojoj su podaci dostupni,
- agregatno stanje i dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva relevantna za provedbu studije, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,
- čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.,
- obrada prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),
- uvjeti skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni.

Tvari za pozitivnu i negativnu kontrolu

- kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv(i), CAS registracijski broj(evi), SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula i/ili druge identifikacijske oznake,
- agregatno stanje, hlapljivost, molekularna masa, kemijski razred i dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva relevantna za provedbu studije, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,
- čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.,
- obrada prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),
- uvjeti skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,
- ako je primjenjivo, obrazloženje upotrebe negativne kontrole koja nije ultračisti H₂O ili DPBS bez Ca²⁺/Mg²⁺,
- ako je primjenjivo, obrazloženje upotrebe pozitivne kontrole koja nije čisti metil-acetat,
- upućivanje na rezultate koji se odnose na prijašnje pozitivne i negativne kontrole i pokazuju primjerenost kriterija prihvatljivosti ciklusa.

Informacije o naručitelju i ustanovi koja provodi ispitivanje:

- naziv i adresa naručitelja, ustanove koja provodi ispitivanje i voditelja istraživanja.

Upotrijebljeni model tkiva RhCE i protokol (uz obrazloženje odabira ako je primjenjivo)

Uvjeti primjene ispitne metode:

- upotrijebljeni model tkiva RhCE, uključujući broj šarže,

- valna duljina i pojas propuštanja (ako je primjenjivo) koji se upotrebljavaju za kvantifikaciju MTT formazana te raspon linearnosti mjernog uređaja (npr. spektrofotometra),
- opis metode koja se upotrebljava za kvantifikaciju MTT formazana,
- opis upotrijebljenog sustava HPLC/UPLC spektrofotometrije, ako je primjenjivo,
- potpune popratne informacije o konkretnom modelu tkiva RhCE koji je korišten, uključujući njegove radne značajke. To bi, među ostalim, trebalo uključivati:
 - i. kontrolu kvalitete vijabilnosti (dobavljač);
 - ii. vijabilnost u uvjetima primjene ispitne metode (korisnik);
 - iii. kontrolu kvalitete funkcije barijere;
 - iv. morfologiju ako je dostupna;
 - v. obnovljivost i prediktivnu sposobnost;
 - vi. druge kontrole kvalitete (KK) modela tkiva RhCE ako su dostupne,
- upućivanje na prijašnje podatke za model tkiva RhCE. To bi, među ostalim, trebalo uključivati: prihvatljivost podataka o kontroli kvalitete s upućivanjem na prijašnje podatke o šarži,
- izjava o tome da je ustanova koja provodi ispitivanje dokazala osposobljenost za upotrebu ispitne metode prije rutinske upotrebe ispitivanjem kemikalija koje služe za dokazivanje osposobljenosti.

Kriteriji prihvatljivosti ciklusa i ispitivanja:

- srednje vrijednosti i rasponi prihvatljivosti pozitivnih i negativnih kontrola na temelju prijašnjih podataka,
- prihvatljiva varijabilnost između ponovljenih uzoraka tkiva za pozitivne i negativne kontrole,
- prihvatljiva varijabilnost između ponovljenih uzoraka tkiva za ispitivanu kemikaliju.

Ispitni postupak:

- pojedinosti o upotrijebljenom ispitnom postupku,
- doze upotrijebljenih ispitivanih kemikalija i kontrolnih tvari,
- trajanja i temperature izlaganja, uranjanja nakon izlaganja i inkubacije nakon izlaganja (ako je primjenjivo),
- opis svih izmjena ispitnog postupka,
- oznake kontrola koje se koriste za tvari koje neposredno reduciraju MTT i/ili ispitivane kemikalije za bojenje, ako je primjenjivo,

- broj ponovljenih uzoraka tkiva upotrijebljenih po ispitivanoj kemikaliji i kontrolama (pozitivna kontrola, negativna kontrola i NSMTT, NSCliving i NSCKilled, ako je primjenjivo).

Rezultati

- tablični prikaz podataka za pojedinačne ispitivane kemikalije i kontrolne tvari za svaki ciklus (uključujući ponovljene pokuse ako je primjenjivo) i svako ponovljeno mjerenje, uključujući vrijednost optičke gustoće ili površinu pika MTT formazana, postotak vijabilnosti tkiva, srednji postotak vijabilnosti tkiva, razlike između ponovljenih uzoraka tkiva ili standardne devijacije te konačno predviđanje,
- ako je primjenjivo, rezultati kontrola upotrijebljenih za kemikalije koje neposredno reduciraju MTT i/ili obojenih ispitivanih kemikalija, uključujući vrijednost optičke gustoće ili površinu pika MTT formazana, %NSMTT, %NSCliving, %NSCKilled, razliku između ponovljenih uzoraka tkiva ili standardnu devijaciju, konačni točni postotak vijabilnosti tkiva i konačno predviđanje,
- rezultati dobiveni s ispitivanim kemikalijama i kontrolnim tvarima u odnosu na utvrđene kriterije prihvatljivosti za ciklus i ispitivanje,
- opis drugih uočenih učinaka, npr. ako obojena ispitivana kemikalija oboji tkiva.

Rasprava o rezultatima

Zaključak

LITERATURA

1. UN (2015). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, New York i Ženeva. United Nations. Dostupno na: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.
2. Poglavlje B.5. ovog Priloga, Akutno nadraživanje/nagrizanje oka.
3. Poglavlje B.47. ovog Priloga, Metoda ispitivanja zamućenja i propusnosti goveđe rožnice za utvrđivanje i. kemikalija koje izazivaju tešku ozljedu oka i ii. kemikalija koje nije potrebno razvrstati s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka.
4. Poglavlje B.48. ovog Priloga, Metoda ispitivanja na izoliranom pilećem oku za utvrđivanje i. kemikalija koje izazivaju tešku ozljedu oka i ii. kemikalija koje nije potrebno razvrstati s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka.
5. Poglavlje B.61. ovog Priloga, Metoda ispitivanja propuštanja fluoresceina za identifikaciju tvari nagrizajućih i jako nadražujućih za oči.
6. Poglavlje B.68. ovog Priloga, *In vitro* ispitna metoda s kratkim vremenom izlaganja za utvrđivanje: i. kemikalija koje induciraju tešku ozljedu oka i ii. kemikalija koje nije potrebno razvrstati s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka.
7. Freeman, S.J., Alépée N., Barroso, J., Cole, T., Compagnoni, A., Rubingh, C., Eskes, C., Lammers, J., McNamee, P., Pfannenbecker, U., Zuang, V. (2010). Prospective Validation Study of Reconstructed Human Tissue Models for Eye Irritation Testing. *ALTEX* 27, Special Issue 2010, 261.–266.
8. EC EURL ECVAM (2014). 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. Dostupno na: <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC100280>.
9. EURL ECVAM Science Advisory Committee (2014). ESAC Opinion on the EURL ECVAM Eye Irritation Validation Study (EIVS) on EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE and a related Cosmetics Europe study on HPLC/UPLC-spectrophotometry as an alternative endpoint detection system for MTT-formazan. ESAC Opinion No 2014-03 od 17. studenoga 2014.; EUR 28173 EN; doi: 10.2787/043697. Dostupno na: <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103702>.

10. Alépée, N., Leblanc, V., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Lelièvre, D., Meloni, M., Nardelli, L., Roper, C.S, Santirocco, E., Toner, F., Van Rompay, A., Vinall, J., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory validation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using liquid chemicals. *Toxicol. In Vitro* 31, 43.–53.
11. Alépée, N., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Meloni, M., Nardelli, L., Vinall, C.J., Toner, F., Roper, C.S, Van Rompay, A.R., Leblanc, V., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory evaluation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using solid chemicals and overall performance of the test method with regard to solid and liquid chemicals testing. *Toxicol. In Vitro* 34, 55.–70.
12. EURL ECVAM Science Advisory Committee (2016). ESAC Opinion on the SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). ESAC Opinion No 2016-02 od 24. lipnja 2016.; EUR 28175 EN; doi: 10.2787/390390. Dostupno na: <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. (Rukopis u pripremi).
14. Draize, J.H., Woodard, G., Calvery, H.O. (1944). Methods for the Study of Irritation and Toxicity of Substances Applied Topically to the Skin and Mucous Membranes. *Journal of Pharmacol. and Exp. Therapeutics* 82, 377.–390.
15. Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., Zuang, V. (2010). A Proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *In Vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1.–9.
16. Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55.–63.
17. OECD (2016). Series on Testing and Assessment No 216: Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Cornea-Like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage, Based on the Validated Reference

Methods EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE EIT described in TG 492. Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

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. Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
19. Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Hayden, P., Kubilus, J., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2011). Development of the EpiOcular™ Eye Irritation Test for Hazard Identification and Labelling of Eye Irritating Chemicals in Response to the Requirements of the EU Cosmetics Directive and REACH Legislation. *Altern. Lab. Anim.* 39, 339.–364.
20. Nguyen, D.H., Beuerman, R.W., De Wever, B., Rosdy, M. (2003). Three-dimensional construct of the human corneal epithelium for in vitro toxicology. U: Salem, H., Katz, S.A. (Eds), *Alternative Toxicological Methods*, CRC Press, str. 147.–159.
21. Pfannenbecker, U., Bessou-Touya, S., Faller, C., Harbell, J., Jacob, T., Raabe, H., Tailhardat, M., Alépée, N., De Smedt, A., De Wever, B., Jones, P., Kaluzhny, Y., Le Varlet, B., McNamee, P., Marrec-Fairley, M., Van Goethem, F. (2013). Cosmetics Europe multi-laboratory pre-validation of the EpiOcular™ reconstituted Human Tissue Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 619.–626.
22. Alépée, N., Bessou-Touya, S., Cotovio, J., de Smedt, A., de Wever, B., Faller, C., Jones, P., Le Varlet, B., Marrec-Fairley, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., van Goethem, F., McNamee, P. (2013). Cosmetics Europe Multi-Laboratory Pre-Validation of the SkinEthic™ Reconstituted Human Corneal Epithelium Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 1476.–1488.
23. Kolle, S.N., Moreno, M.C.R., Mayer, W., van Cott, A., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R. (2015). The EpiOcular™ Eye Irritation Test is the Method of Choice for *In Vitro* Eye Irritation Testing of Agrochemical Formulations: Correlation Analysis of EpiOcular™ Eye Irritation Test and BCOP Test Data to UN GHS, US EPA and Brazil ANIVSA Classifications. *Altern. Lab. Anim.* 43, 1.–18.
24. Adriaens, E., Barroso, J., Eskes, C., Hoffmann, S., McNamee, P., Alépée, N., Bessou-Touya, S., De Smedt, A., De Wever, B., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Zuang, V. (2014). Retrospective Analysis of the Draize Test for Serious Eye Damage/Eye Irritation: Importance of Understanding the *In Vivo* Endpoints Under UN GHS/EU CLP for the Development and Evaluation of *In Vitro* Test Methods. *Arch. Toxicol.* 88, 701.–723.

25. Barroso, J., Pfannenbecker, U., Adriaens, E., Alépée, N., Cluzel, M., De Smedt, A., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Templier, M., McNamee, P. (2017). Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation *in vivo* data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD). *Arch. Toxicol.* 91, 521.–547.
26. Meloni, M., De Servi, B., Marasco, D., Del Prete, S. (2011). Molecular mechanism of ocular surface damage: Application to an *in vitro* dry eye model on human corneal epithelium. *Molecular Vision* 17, 113.–126.
27. Hackett, R.B., McDonald, T.O. (1991). Eye Irritation. U: *Advances in Modern Toxicology: Dermatoxicology* Marzulli F.N. and Maibach H.I. (Eds.), 4th Edition, str. 749.–815. Washington, DC, SAD: Hemisphere Publishing Corporation.
28. Fox, D.A., Boyes, W.K. (2008). Toxic Responses of the Ocular and Visual System. In Cassaret and Doull's *Toxicology: The Basic Science of Poisons* Klaassen C.D.(Ed.), 7th Edition, str. 665.–697. Withby, ON, Canada: McGraw-Hill Ryerson.
29. Jester, J.V., Li, H.F., Petroll, W.M., Parker, R.D., Cavanagh, H.D., Carr, G.J., Smith, B., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant Induced Corneal Injury Correlates with Cell Death. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 922.–936.
30. Maurer, J.K., Parker, R.D., Jester, J.V. (2002). Extent of Corneal Injury as the Mechanistic Basis for Ocular Irritation: Key Findings and Recommendations for the Development of Alternative Assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36, 106.–117.
31. Jester, J.V., Li, L., Molai, A., Maurer, J.K. (2001). Extent of Corneal Injury as a Mechanistic Basis for Alternative Eye Irritation Tests. *Toxicol. In Vitro* 15, 115.–130.
32. Jester, J.V., Petroll, W.M., Bean, J., Parker, R.D., Carr, G.J., Cavanagh, H.D., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant-Induced Corneal Injury Predicts Extent of Subsequent Ocular Responses. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 2610.–2625.
33. Jester, J.V. (2006). Extent of Corneal Injury as a Biomarker for Hazard Assessment and the Development of Alternative Models to the Draize Rabbit Eye Test. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 25, 41.–54.
34. EpiOcular™ EIT SOP, Version 8 (March 05, 2013). EpiOcular™ EIT for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Dostupno na:

[<https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index>].

35. SkinEthic™ HCE EIT SOP, Version 1. (July 20, 2015). SkinEthic™ HCE Eye Irritation Test (EITL for Liquids, EITS for Solids) for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Dostupno na: <https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index>.
36. Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., McNamee, P. (2015). Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT-Reduction Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29, 741.–761.
37. Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Handa, Y., DeLuca, J., Truong, T., Hunter, A., Kearney, P., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2015). EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) for Hazard Identification and Labeling of Eye Irritating Chemicals: Protocol Optimization for Solid Materials and Extended Shipment Times. *Altern. Lab Anim.* 43, 101.–127.
38. US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Svibanj 2001. Dostupno na: <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, Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

Dodatak 1.

DEFINICIJE

Točnost: stupanj podudarnosti između rezultata ispitne metode i prihvaćenih referentnih vrijednosti. Ona je mjerilo učinkovitosti ispitne metode i jedan od aspekata „relevantnosti”. Pojam je često međusobno zamjenjiv s pojmom „podudarnost” u smislu udjela točnih ishoda ispitne metode (18.).

Referentna kemikalija: kemikalija koja se primjenjuje kao standard za usporedbu s ispitivanom kemikalijom. Referentna kemikalija trebala bi imati sljedeća svojstva: i. dosljedne i pouzdane izvore za njezinu identifikaciju i karakterizaciju; ii. strukturnu, funkcionalnu i/ili kemijsku sličnost ili razred proizvoda sličan kemikalijama koje se ispituju; iii. poznata fizikalno-kemijska svojstva; iv. podatke kojima se dokazuju poznati učinci; i v. poznatu jakost u rasponu željenog odgovora.

Pristup odozdo prema gore: stupnjeviti pristup koji se primjenjuje za ispitivanu kemikaliju u pogledu koje postoji sumnja da joj nije potrebno razvrstavanje i označivanje s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka, a koji počinje utvrđivanjem kemikalija za koje nije potrebno razvrstavanje i označivanje (negativan ishod) u odnosu na druge kemikalije (pozitivan ishod).

Kemikalija: tvar ili smjesa.

Podudarnost: vidjeti „Točnost”.

Rožnica: transparentni dio prednje strane očne jabučice kojim su prekrivene šarenica i zjenica i koji propušta svjetlost u unutrašnjost oka.

CV: koeficijent varijacije.

Dev. odstupanje.

EIT: test nadraživanja oka.

EURL ECVAM: referentni laboratorij Europske unije za alternative ispitivanju na životinjama.

Nadraživanje oka: promjene na oku nastale kao rezultat primjene ispitivane kemikalije na prednju površinu oka, koje su potpuno reverzibilne u roku od 21 dana nakon primjene. Pojam je međusobno zamjenjiv s pojmovima „reverzibilni učinci na oko” i „kategorija 2. sustava UN GHS/CLP-a”.

ET₅₀: vrijeme izlaganja potrebno za smanjenje vijabilnosti tkiva za 50 % nakon primjene referentne kemikalije u određenoj, fiksnoj koncentraciji.

Udio lažno negativnih rezultata: udio svih pozitivnih tvari koje su ispitnom metodom pogrešno identificirane kao negativne. Jedan je od pokazatelja uspješnosti ispitne metode.

Stopa lažno pozitivnih rezultata: udio svih negativnih tvari koje su ispitnom metodom pogrešno identificirane kao pozitivne. Jedan je od pokazatelja uspješnosti ispitne metode.

Opasnost: inherentno svojstvo nekog agensa ili stanje koje može uzrokovati štetne učinke kada su organizam, sustav ili (sub)populacija izloženi tom agensu.

HCE: epitel ljudske rožnice SkinEthic™.

HPLC: tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti.

IC₅₀: koncentracija pri kojoj referentna kemikalija smanjuje vijabilnost tkiva za 50 % nakon fiksnog vremena izlaganja (npr. 30 minuta tretiranja SDS-om).

Beskonačna doza: količina ispitivane kemikalije primijenjena na model tkiva RhCE koja je veća od količine potrebne da bi se potpuno i ravnomjerno pokrila površina epitela.

Ireverzibilni učinci na oko: vidjeti „tešku ozljedu oka”.

LLOQ: donja granica kvantifikacije.

LogP: logaritam podjelnog koeficijenta oktanol-voda.

Smjesa: smjesa ili otopina koja se sastoji od dviju ili više tvari.

Tvar s jednim sastojkom: tvar, definirana količinskim sastavom, u kojoj je jedan glavni sastojak prisutan u koncentraciji od najmanje 80 % (w/w).

Tvar s više sastojaka: tvar, definirana količinskim sastavom, u kojoj je više od jednog glavnog sastojka prisutno u koncentraciji od 10 % (w/w) ili većoj te manjoj od 80 % (w/w). Tvar s više sastojaka rezultat je procesa proizvodnje. Smjesa i tvar s više sastojaka razlikuju se po tome što se smjesa dobiva miješanjem dviju ili više tvari bez kemijske reakcije. Tvar s više sastojaka rezultat je kemijske reakcije.

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid; tiazolil plavo tetrazolijev bromid.

Negativna kontrola: uzorak koji sadržava sve komponente ispitnog sustava i tretiran je s tvari za koju je poznato da ne inducira pozitivan odgovor u ispitnom sustavu. Taj se uzorak obrađuje s uzorcima tretiranima ispitivanom kemikalijom i drugim kontrolnim uzorcima te se upotrebljava kako bi se utvrdila 100-postotna vijabilnost tkiva.

Nerazvrstano: kemikalije koje nisu razvrstane s obzirom na nadraživanje oka (kategorija 2. sustava UN GHS/CLP-a, kategorija 2.A ili 2.B sustava UN GHS) ili tešku ozljedu oka (kategorija 1. sustava UN GHS/CLP-a). Pojam je međusobno zamjenjiv s pojmom „bez kategorije prema sustavu UN GHS/CLP-u”.

NSC_{killed}: nespecifična boja u mrtvim tkivima.

NSC_{living}: nespecifična boja u živim tkivima.

NSMTT: nespecifična redukcija MTT-a.

OD: optička gustoća.

Zahtjevi izvedbe: zahtjevi koji se temelje na validiranoj ispitnoj metodi koja se smatrala znanstveno valjanom i pružaju temelj za ocjenjivanje usporedivosti predložene, funkcionalno i mehanicistički slične, ispitne metode. Oni uključuju: i. ključne elemente ispitne metode; ii. minimalni popis referentnih kemikalija odabranih između kemikalija koje se koriste za dokazivanje prihvatljive učinkovitosti validirane ispitne metode; i iii. slične razine točnosti i pouzdanosti, utemeljene na rezultatima dobivenim za validiranu ispitnu metodu, koje se prilikom ocjenjivanja trebaju dokazati predloženom ispitnom metodom koristeći minimalni popis referentnih kemikalija (18.).

Pozitivna kontrola: uzorak koji sadržava sve komponente ispitnog sustava i tretiran je s tvari za koju je poznato da inducira pozitivan odgovor u ispitnom sustavu. Taj se uzorak obrađuje s uzorcima tretiranima ispitivanom kemikalijom i drugim kontrolnim uzorcima. Kako bi se osigurala mogućnost procjene varijabilnosti odgovora pozitivne kontrole tijekom vremena, pozitivan odgovor ne bi smio biti presnažan.

Relevantnost: opis odnosa između ispitivanja i istraživnog učinka te je li ispitivanje prikladno i korisno za određenu svrhu. Pokazuje u kojoj se mjeri ispitivanjem točno mjeri ili predviđa istraživani biološki učinak. Relevantnost uključuje razmatranje o točnosti (podudarnosti) ispitne metode (18.).

Pouzdanost: pokazuje u kojoj se mjeri ispitna metoda može obnovljivo primijeniti unutar jednog laboratorija i između više laboratorija tijekom vremena uz primjenu istog protokola. Ocjenjuje se izračunavanjem obnovljivosti unutar jednog laboratorija i između više njih te ponovljivosti unutar jednog laboratorija (18.).

Zamjensko ispitivanje: ispitivanje koje zamjenjuje rutinsko i prihvaćeno ispitivanje za određivanje opasnosti i/ili procjenu rizika, za koje je utvrđeno da osigurava istovjetnu ili bolju zaštitu zdravlja ljudi, zdravlja životinja ili okoliša u odnosu na prihvaćeno ispitivanje u svim mogućim okolnostima ispitivanja i za sve kemikalije (18.).

Obnovljivost: podudarnost rezultata dobivenih ponovljenim ispitivanjem iste ispitivane kemikalije uz primjenu istog ispitnog protokola (vidjeti „pouzdanost”) (18.).

Reverzibilni učinci na oko: vidjeti „nadraživanje oka”.

RhCE: rekonstruirani epitel koji nalikuje ljudskoj rožnici.

Ciklus: ciklus se sastoji od jedne ispitivane kemikalije ili više njih koje se ispituju istodobno s negativnom i pozitivnom kontrolom.

SD: standardna devijacija.

Osjetljivost: udio svih pozitivnih/aktivnih ispitivanih kemikalija koje su pravilno razvrstane primjenom ispitivanja. To je mjera točnosti ispitne metode koja daje kategorijske rezultate i

važan je čimbenik za ocjenu relevantnosti ispitne metode (18.).

Teška ozljeda oka: oštećenje očnog tkiva ili ozbiljno fizičko pogoršanje vida izazvano primjenom ispitivane tvari na prednju površinu oka, koje nije u potpunosti reverzibilno unutar 21 dana od primjene. Pojam je međusobno zamjenjiv s pojmovima „ireverzibilni učinci na oko” i „kategorija 1. sustava UN GHS/CLP-a”.

Standardni operativni postupci (SOP): formalni, pisani postupci kojima se detaljno opisuje kako treba provoditi specifične rutinske laboratorijske operacije i operacije specifične za test. Obvezni su na temelju dobre laboratorijske prakse.

Specifičnost: udio svih negativnih/neaktivnih ispitivanih kemikalija koje su pravilno razvrstane primjenom ispitivanja. To je mjera točnosti ispitne metode koja daje kategorijske rezultate i važan je čimbenik za ocjenu relevantnosti ispitne metode (18.).

Tvar: kemijski element i njegovi spojevi u prirodnome stanju ili dobiveni proizvodnim postupkom, što uključuje i aditive koji su nužni za održavanje stabilnosti proizvoda te nečistoće koje proizlaze iz primijenjenoga postupka, ali isključuje otapala koja se mogu izdvojiti bez utjecaja na stabilnost tvari ili promjene njezina sastava.

Test: jedna ispitivana kemikalija koja se istodobno ispituje na najmanje dva ponovljena uzorka tkiva kako je utvrđeno u odgovarajućem SOP-u.

Vijabilnost tkiva: parametar za mjerenje ukupne aktivnosti populacije stanica u rekonstruiranom tkivu u obliku njihove sposobnosti da reduciraju vitalnu boju MTT, što ovisno o krajnjoj točki koja se mjeri i planu ispitivanja korelira s ukupnim brojem i/ili vitalnošću živih stanica.

Pristup odozgo prema dolje: stupnjeviti pristup koji se primjenjuje za kemikaliju u pogledu koje postoji sumnja da inducira tešku ozljedu oka, a koji počinje utvrđivanjem kemikalija koje induciraju tešku ozljedu oka (pozitivan ishod) u odnosu na druge kemikalije (negativan ishod).

Ispitivana kemikalija: svaka tvar ili smjesa koja se ispituje ovom ispitnom metodom.

Strategija višerazinskog ispitivanja: strategija stupnjevito ispitivanja u kojoj se ispitne metode upotrebljavaju sekvencijski. Sve postojeće informacije o ispitivanoj kemikaliji preispituju se na svakoj razini, pri čemu se prije prelaska na sljedeću razinu strategije primjenjuje postupak analize snage dokaza kako bi se odredilo je li na raspolaganju dovoljno informacija za donošenje odluke o razvrstavanju tvari s obzirom na opasnost. Ako se na temelju postojećih podataka ispitivanoj kemikaliji može pripisati potencijal/jakost opasnog djelovanja, daljnje ispitivanje nije potrebno (18.).

ULOQ: gornja granica kvantifikacije.

Globalno usklađeni sustav Ujedinjenih naroda za razvrstavanje i označivanje kemikalija (UN GHS): sustav za razvrstavanje kemikalija (tvari i smjesa) prema standardiziranim vrstama i stupnjevima fizičkih opasnosti i opasnosti za zdravlje i okoliš,

kojim su obuhvaćena odgovarajuća komunikacijska sredstva kao što su piktogrami, oznake opasnosti, oznake upozorenja, oznake obavijesti i sigurnosno-tehnički listovi, kojima se prenose informacije o njihovim štetnim učincima u cilju zaštite ljudi (uključujući poslodavce, radnike, prijevoznike, potrošače i interventno osoblje) i okoliša (1.).

Kategorija 1. sustava UN GHS/CLP-a: vidjeti „tešku ozljedu oka”.

Kategorija 2. sustava UN GHS/CLP-a: vidjeti „nadraživanje oka”.

Bez kategorije prema sustavu UN GHS i CLP-u: kemikalije koje ne ispunjavaju zahtjeve za razvrstavanje u kategoriju 1. ili 2. sustava UN GHS/CLP-a (ili kategoriju 2.A ili 2.B sustava UN GHS). Pojam je međusobno zamjenjiv s pojmom „nerazvrstano”.

UPLC: tekućinska kromatografija iznimno visoke djelotvornosti.

UVCB: tvari nepoznatog ili promjenjivog sastava, složeni reakcijski proizvodi i biološki materijali.

Valjana ispitna metoda: ispitna metoda za koju se smatra da je dovoljno relevantna i pouzdana za određenu svrhu te koja se temelji na znanstveno utemeljenim načelima. Ispitna metoda nije nikada valjana u apsolutnom smislu nego samo u odnosu na određenu svrhu (18.).

Validirana ispitna metoda: ispitna metoda za koju su provedena validacijska istraživanja za utvrđivanje relevantnosti (uključujući točnost) i pouzdanosti za specifičnu namjenu. Važno je napomenuti da validirana ispitna metoda možda neće biti u dovoljnoj mjeri uspješna s obzirom na točnost i pouzdanost da bi je se moglo smatrati prihvatljivom za predloženu namjenu (18.).

VRM: validirana referentna metoda.

VRM1: test nadraživanja očiju EpiOcular™ naziva se validiranom referentnom metodom 1.

VRM2: test nadraživanja očiju s epitelom ljudske rožnice SkinEthic™ naziva se validiranom referentnom metodom 2.

Analiza snage dokaza: proces razmatranja prednosti i slabosti različitih informacija u donošenju i dokazivanju zaključka o potencijalu opasnosti ispitivane tvari.

Dodatak 2.

GLAVNI ELEMENTI TESTOVA RHCE VALIDIRANIH ZA UTVRĐIVANJE KEMIKA LIJA KOJE NIJE POTREBNO RAZVRSTATI I OZNAČITI S OBZIROM NA NADRAŽIVANJE OKA ILI TEŠKU OZLJEDU OKA

Elementi testa	EIT EpiOcular™ (VRM 1)		EIT s HCE-om SkinEthic™ (VRM 2)	
Protokoli	Tekućine (koje se mogu pipetirati na temperaturi od 37 ± 1 °C ili nižoj 15 min)	Kemikalije u krutom stanju (ne mogu se pipetirati)	Tekućine i viskozne kemikalije (mogu se pipetirati)	Kemikalije u krutom stanju (ne mogu se pipetirati)
Površina modela	0,6 cm ²	0,6 cm ²	0,5 cm ²	0,5 cm ²
Broj ponovljenih uzoraka tkiva	Najmanje dva	Najmanje dva	Najmanje dva	Najmanje dva
Prethodna provjera za interferenciju s bojom	50 µl + 1 ml H₂O 60 min na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO₂, relativna vlažnost ≥ 95 % (bezbojne ispitivane kemikalije) ili 50 µl + 2 ml izopropanola miješano 2–3 h na sobnoj temp. (obojene ispitivane kemikalije) → ako je OD ispitivane kemikalije pri 570 ± 20 nm, nakon što se oduzme OD za izopropanol ili vodu, $> 0,08$ (što odgovara približno 5 % srednjeg OD-a negativne kontrole), trebalo bi provesti prilagođene kontrole na živom tkivu	50 mg + 1 ml H₂O 60 min na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO₂, relativna vlažnost ≥ 95 % (bezbojne ispitivane kemikalije) i/ili 50 mg + 2 ml izopropanola miješano 2–3 h na sobnoj temp. (obojene i bezbojne ispitivane kemikalije) → ako je OD ispitivane kemikalije pri 570 ± 20 nm, nakon što se oduzme OD za izopropanol ili vodu, $> 0,08$ (što odgovara približno 5 % srednjeg OD-a negativne kontrole), trebalo bi provesti prilagođene kontrole na živom tkivu	10 µl + 90 µl H₂O miješano 30 ± 2 min na sobnoj temperaturi (18–28 °C) → ako je ispitivana kemikalija obojena, trebalo bi provesti prilagođene kontrole na živom tkivu	10 mg + 90 µl H₂O miješano 30 ± 2 min na sobnoj temperaturi → ako je ispitivana kemikalija obojena, trebalo bi provesti prilagođene kontrole na živom tkivu

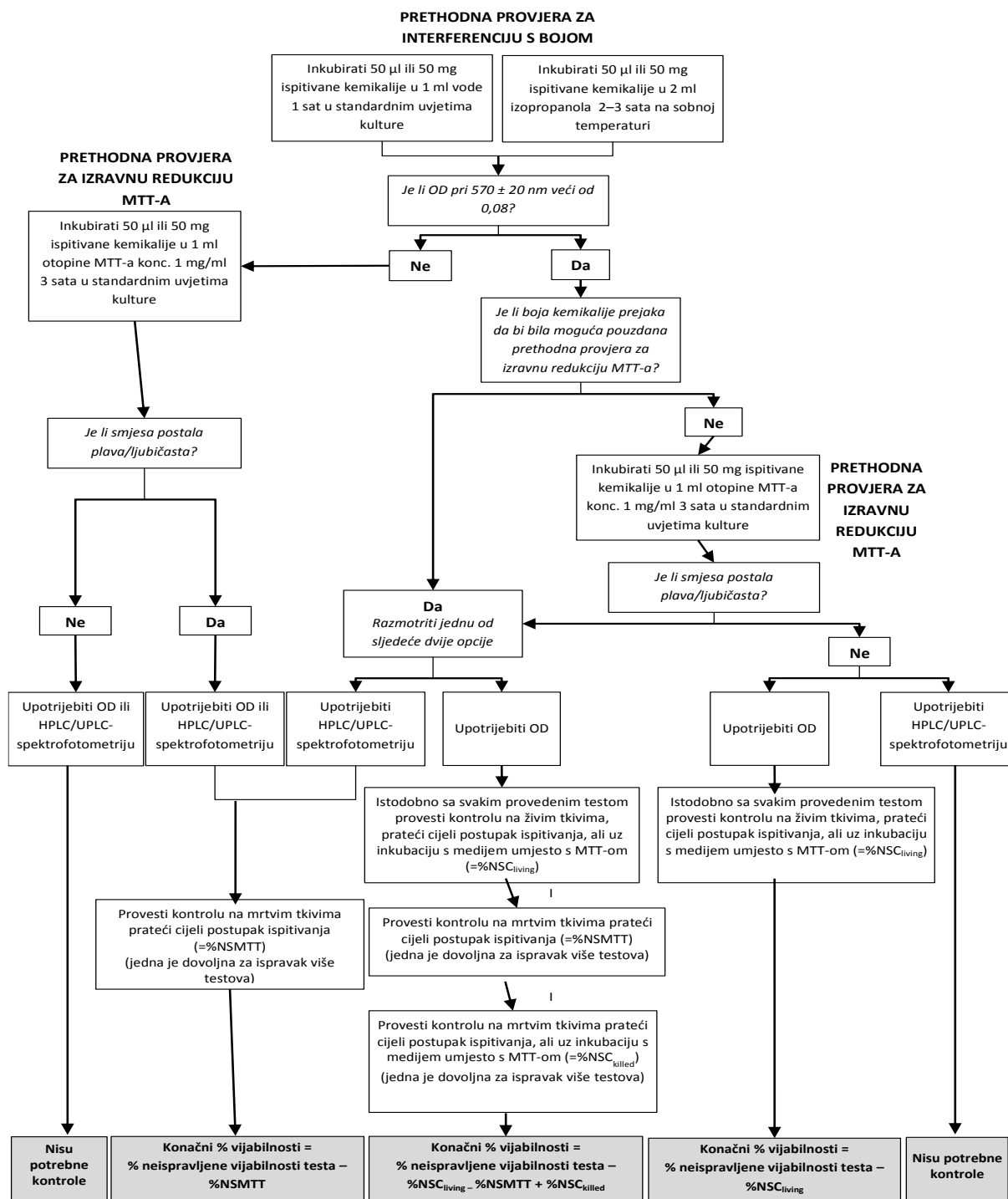
Elementi testa	EIT EpiOcular™ (VRM 1)		EIT s HCE-om SkinEthic™ (VRM 2)	
Prethodna provjera izravne redukcije MTT-a	otopina 50 µl + 1 ml MTT 1 mg/ml tijekom 180 ± 15 min na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , relativna vlažnost ≥ 95 % → ako otopina postane plava/ljubičasta, treba provesti prilagođene kontrole usmrćivanjem zamrzavanjem (kao negativna kontrola upotrebljava se 50 µl sterilne deionizirane vode u otopini MTT-a)	otopina 50 mg + 1 ml MTT 1 mg/ml tijekom 180 ± 15 min na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , relativna vlažnost ≥ 95 % → ako otopina postane plava/ljubičasta, treba provesti prilagođene kontrole usmrćivanjem zamrzavanjem (kao negativna kontrola upotrebljava se 50 µl sterilne deionizirane vode u otopini MTT-a)	otopina 30 µl + 300 µl MTT 1 mg/ml tijekom 180 ± 15 min na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , relativna vlažnost ≥ 95 % → ako otopina postane plava/ljubičasta, treba provesti prilagođene kontrole usmrćivanjem vodom (kao negativna kontrola upotrebljava se 30 µl sterilne deionizirane vode u otopini MTT-a)	30 mg + 300 µl MTT otopina 1 mg/ml tijekom 180 ± 15 min na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , relativna vlažnost ≥ 95 % → ako otopina postane plava/ljubičasta, treba provesti prilagođene kontrole usmrćivanjem vodom (kao negativna kontrola upotrebljava se 30 µl sterilne deionizirane vode u otopini MTT-a)
Prethodna obrada	20 µl DPBS-a bez Ca ²⁺ /Mg ²⁺ tijekom 30 ± 2 min na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , relativna vlažnost ≥ 95 %, zaštićeno od svjetla	20 µl DPBS-a bez Ca ²⁺ /Mg ²⁺ tijekom 30 ± 2 min na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , relativna vlažnost ≥ 95 %, zaštićeno od svjetla	–	–
Doze za tretiranje i primjena	50 µl (83,3 µl/cm ²)	50 mg (83,3 mg/cm ²) upotrebom kalibriranog alata (npr. žlica kalibrirana tako da sadržava 50 mg natrijeva klorida kada je vrhom puna)	10 µl DPBS-a bez Ca ²⁺ /Mg ²⁺ + 30 ± 2 µl (60 µl/cm ²) Za viskozne kemikalije upotrijebiti najlonsku mrežu	30 µl DPBS-a bez Ca ²⁺ /Mg ²⁺ + 30 ± 2 mg (60 mg/cm ²)
Vrijeme i temperatura izloženosti	30 min (± 2 min) u mediju za uzgoj kulture na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , relativna vlažnost ≥ 95 %	6 sati (± 0,25 sati) u mediju za uzgoj kulture na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , relativna vlažnost ≥ 95 %	30 min (± 2 min) u mediju za uzgoj kulture na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , relativna vlažnost ≥ 95 %	4 sata (± 0,1 sat) u mediju za uzgoj kulture na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , relativna vlažnost ≥ 95 %
Ispiranje na sobnoj temperaturi	3 puta u 100 ml DPBS-a bez Ca ²⁺ /Mg ²⁺	3 puta u 100 ml DPBS-a bez Ca ²⁺ /Mg ²⁺	20 ml DPBS-a bez Ca ²⁺ /Mg ²⁺	25 ml DPBS-a bez Ca ²⁺ /Mg ²⁺
Uranjanje nakon izlaganja	12 min (± 2 min) na sobnoj temp. u mediju za uzgoj kulture	25 min (± 2 min) na sobnoj temp. u mediju za uzgoj kulture	30 min (± 2 min) na 37 °C, 5 % CO ₂ , relativna vlažnost od 95 % u mediju za uzgoj kulture	30 min (± 2 min) na sobnoj temp. u mediju za uzgoj kulture

Elementi testa	EIT EpiOcular™ (VRM 1)		EIT s HCE-om SkinEthic™ (VRM 2)	
Inkubacija nakon izlaganja	120 min (± 15 min) u mediju za uzgoj kulture na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , relativna vlažnost ≥ 95 %	18 h ($\pm 0,25$ h) u mediju za uzgoj kulture na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , relativna vlažnost ≥ 95 %	nema	18 h ($\pm 0,5$ h) u mediju za uzgoj kulture na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , relativna vlažnost ≥ 95 %
Negativna kontrola	50 μ l H ₂ O Ispitano istodobno	50 μ l H ₂ O Ispitano istodobno	30 ± 2 μ l DPBS-a bez Ca ²⁺ /Mg ²⁺ Ispitano istodobno	30 ± 2 μ l DPBS-a bez Ca ²⁺ /Mg ²⁺ Ispitano istodobno
Pozitivna kontrola	50 μ l metilacetata Ispitano istodobno	50 μ l metilacetata Ispitano istodobno	30 ± 2 μ l metilacetata Ispitano istodobno	30 ± 2 μ l metilacetata Ispitano istodobno
Otopina MTT-a	300 μ l 1 mg/ml	300 μ l 1 mg/ml	300 μ l 1 mg/ml	300 μ l 1 mg/ml
Vrijeme i temperatura inkubacije MTT-a	180 min (± 15 min) na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , relativna vlažnost ≥ 95 %	180 min (± 15 min) na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , relativna vlažnost ≥ 95 %	180 min (± 15 min) na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , relativna vlažnost ≥ 95 %	180 min (± 15 min) na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , relativna vlažnost ≥ 95 %
Ekstrakcijsko otapalo	2 ml izopropanola (ekstrakcija s vrha i dna umetka bušenjem tkiva)	2 ml izopropanola (ekstrakcija s dna umetka bušenjem tkiva)	1,5 ml izopropanola (ekstrakcija s vrha i dna umetka)	1,5 ml izopropanola (ekstrakcija s dna umetka)
Vrijeme i temperatura ekstrakcije	2–3 h uz protresanje (~ 120 o/min) na sobnoj temp. ili preko noći na 4–10 °C	2–3 h uz protresanje (~ 120 o/min) na sobnoj temp. ili preko noći na 4–10 °C	4 h uz protresanje (~ 120 o/min) na sobnoj temp. ili barem preko noći bez protresanja na 4–10 °C	Najmanje 2 h uz protresanje (~ 120 o/min) na sobnoj temp.
Očitavanje optičke gustoće	570 nm (550–590 nm) bez referentnog filtra	570 nm (550–590 nm) bez referentnog filtra	570 nm (540–600 nm) bez referentnog filtra	570 nm (540–600 nm) bez referentnog filtra
Kontrola kvalitete tkiva	Tretiranje sa 100 μ l 0,3-postotnog (v/v) Tritona X-100 12,2 min $\leq$ ET ₅₀ $\leq$ 37,5 min	Tretiranje sa 100 μ l 0,3-postotnog (v/v) Tritona X-100 12,2 min $\leq$ ET ₅₀ $\leq$ 37,5 min	tretiranje SDS-om 30 min (50 μ l) 1,0 mg/ml $\leq$ IC ₅₀ $\leq$ 3,5 mg/ml	tretiranje SDS-om 30 min (50 μ l) 1,0 mg/ml $\leq$ IC ₅₀ $\leq$ 3,2 mg/ml

Elementi testa	EIT EpiOcular™ (VRM 1)		EIT s HCE-om SkinEthic™ (VRM 2)	
Kriteriji prihvatljivosti	1. Srednja optička gustoća ponovljenih uzoraka tkiva tretiranih negativnom kontrolom trebala bi biti $> 0,8$ i $< 2,5$. 2. Srednja vijabilnost ponovljenih uzoraka tkiva izloženih pozitivnoj kontroli na 30 min, izražena kao postotak negativne kontrole, trebala bi biti < 50 %. 3. Razlika u vijabilnosti između dva ponovljena uzorka tkiva trebala bi biti manja od 20 %.	1. Srednja optička gustoća ponovljenih uzoraka tkiva tretiranih negativnom kontrolom trebala bi biti $> 0,8$ i $< 2,5$. 2. Srednja vijabilnost ponovljenih uzoraka tkiva izloženih pozitivnoj kontroli na šest sati, izražena kao postotak negativne kontrole, trebala bi biti < 50 %. 3. Razlika u vijabilnosti između dva ponovljena uzorka tkiva trebala bi biti manja od 20 %.	1. Srednja optička gustoća ponovljenih uzoraka tkiva tretiranih negativnom kontrolom trebala bi biti $> 1,0$ i $\leq 2,5$. 2. Srednja vijabilnost ponovljenih uzoraka tkiva izloženih pozitivnoj kontroli na 30 min, izražena kao postotak negativne kontrole, trebala bi biti ≤ 30 %. 3. Razlika u vijabilnosti između dva ponovljena uzorka tkiva trebala bi biti manja od 20 %.	1. Srednja optička gustoća ponovljenih uzoraka tkiva tretiranih negativnom kontrolom trebala bi biti $> 1,0$ i $\leq 2,5$. 2. Srednja vijabilnost ponovljenih uzoraka tkiva izloženih pozitivnoj kontroli na četiri sata, izražena kao postotak negativne kontrole, trebala bi biti ≤ 20 %. 3. Razlika u vijabilnosti između dva ponovljena uzorka tkiva trebala bi biti manja od 20 %.

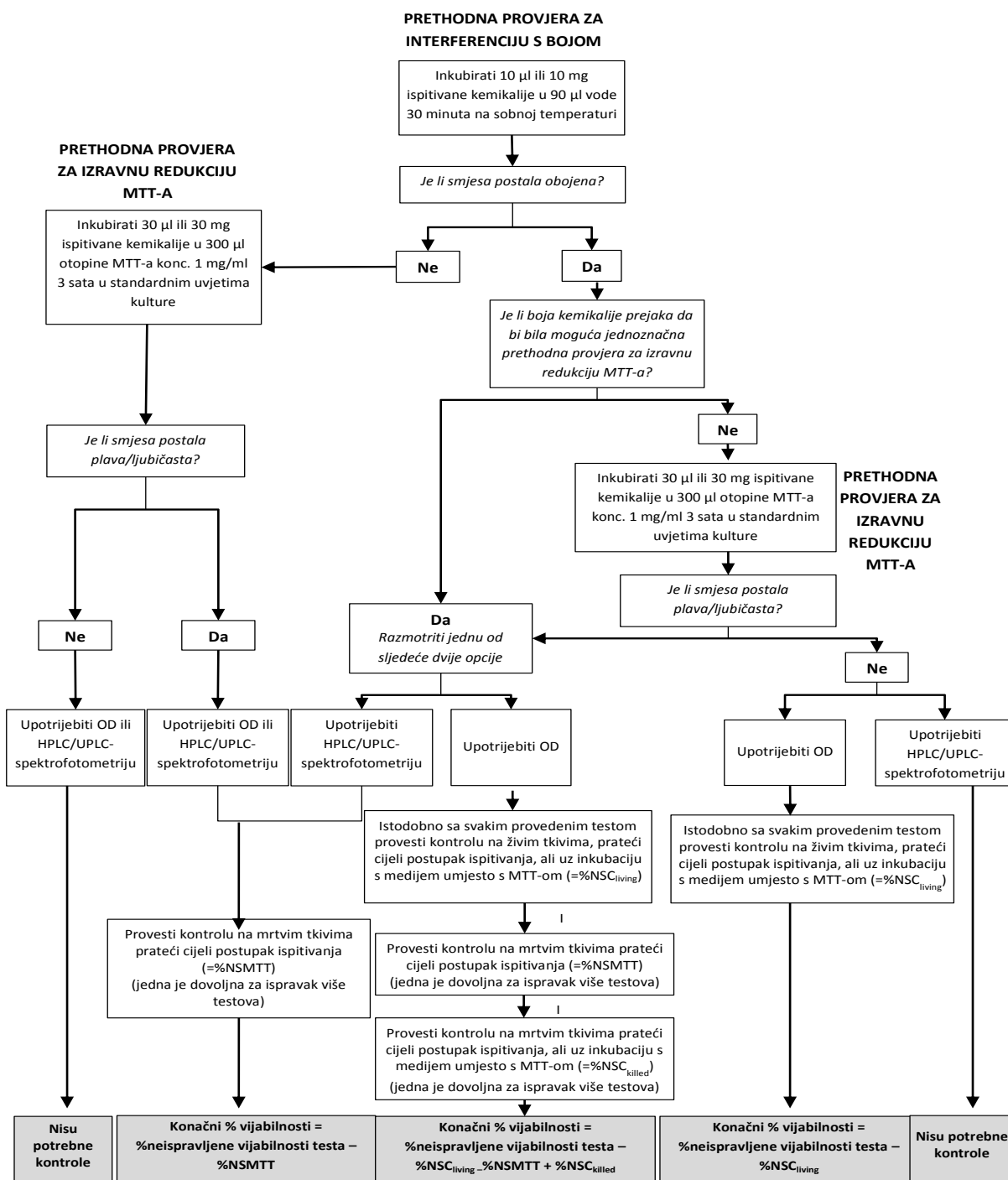
Dodatak 3.

**ILUSTRATIVNI DIJAGRAM TOKA KOJI DAJE SMJERNICE O TOME KAKO
UTVRDITI KEMIČALIJE KOJE IZRAVNO REDUCIRAJU MTT I/LI KEMIČALIJE
KOJE INTERFERIRAJU S BOJOM TE KAKO S NJIMA POSTUPATI, NA TEMELJU
STANDARDNIH OPERATIVNIH POSTUPAKA ZA VRMI**



Dodatak 4.

**ILUSTRATIVNI DIJAGRAM TOKA KOJI DAJE SMJERNICE O TOME KAKO
UTVRDITI KEMIKALIJE KOJE IZRAVNO REDUCIRAJU MTT I/ILI KEMIKALIJE
KOJE INTERFERIRAJU S BOJOM TE KAKO S NJIMA POSTUPATI, NA TEMELJU
STANDARDNIH OPERATIVNIH POSTUPAKA ZA VRM2**



Dodatak 5.

KLJUČNI PARAMETRI I KRITERIJI PRIHVATLJIVOSTI ZA KVALIFIKACIJU SUSTAVA HPLC/UPLC SPEKTROFOTOMETRIJE ZA MJERENJE MTT FORMAZANA EKSTRAHIRANOG IZ MODELA TKIVA RHCE

Parametar	Protokol izveden iz smjernica Uprave za hranu i lijekove (FDA) (36. i 38.)	Kriteriji prihvatljivosti
Selektivnost	Analiza izopropanola, slijepe probe na živom tkivu (ekstrakt izopropanola iz modela živih tkiva RhCE bez ikakve obrade), slijepe probe na mrtvom tkivu (ekstrakt izopropanola iz modela mrtvih tkiva RhCE bez ikakve obrade) i boje (npr. metilensko plavilo)	$Površina_{interference} \leq 20 \%$ $površine_{LLOQ}^1$
Preciznost	Kontrole kvalitete (tj. MTT formazan pri 1,6 µg/ml, 16 µg/ml i 160 µg/ml) u izopropanolu (n = 5)	$CV \leq 15 \%$ ili $\leq 20 \%$ za LLOQ
Točnost	Kontrole kvalitete u izopropanolu (n = 5)	$\%Dev \leq 15 \%$ ili $\leq 20 \%$ za LLOQ
Učinak matrice	Kontrole kvalitete u slijepoj probi na živom tkivu (n = 5)	$85 \% \leq \% \text{ učinka matrice} \leq 115 \%$
Prijenos	Analiza izopropanola nakon standardnog ULOQ ²	$Površina_{interference} \leq 20 \%$ $površine_{LLOQ}$
Obnovljivost (u danu)	3 neovisne kalibracijske krivulje (na temelju šest uzastopnih razrjeđivanja 1/3 MTT formazana u izopropanolu, počevši s ULOQ-om, tj. 200 µg/ml) Kontrole kvalitete u izopropanolu (n = 5)	Kalibracijske krivulje: $\%Dev \leq 15 \%$ ili $\leq 20 \%$ za LLOQ Kontrole kvalitete: $\%Dev \leq 15 \%$ i $CV \leq 15 \%$
Obnovljivost (među danima)	Prvi dan: 1 kalibracijska krivulja i kontrole kvalitete u izopropanolu (n = 3) Drugi dan: 1 kalibracijska krivulja i kontrole kvalitete u izopropanolu (n = 3) Treći dan: 1 kalibracijska krivulja i kontrole kvalitete u izopropanolu (n = 3)	
Kratkoročna stabilnost MTT formazana u ekstraktu tkiva RhCE	Kontrole kvalitete u slijepoj probi na živom tkivu (n = 3) analizirane na dan pripreme i nakon 24 sata skladištenja na sobnoj temperaturi	$\%Dev \leq 15 \%$
Dugoročna stabilnost MTT formazana u ekstraktu tkiva RhCE, ako je potrebno	Kontrole kvalitete u slijepoj probi na živom tkivu (n = 3) analizirane na dan pripreme i nakon nekoliko dana skladištenja na -20 °C	$\%Dev \leq 15 \%$

¹ LLOQ: donja granica kvantifikacije, definirana tako da obuhvaća vijabilnost tkiva od 1 do 2 %, tj. 0,8 µg/ml.

² ULOQ: gornja granica kvantifikacije, definirana tako da bude barem dva puta veća od najviše očekivane koncentracije MTT formazana u ekstraktima izopropanola iz negativnih kontrola (~ 70 µg/ml u validiranoj referentnoj metodi), tj. 200 µg/ml.

B.70. *IN VITRO* TESTOVI LJUDSKOG REKOMBINANTNOG ESTROGENSKOG RECEPTORA (hrER) ZA OTKRIVANJE KEMIKA LIJA S AFINITETOM VEZIVANJA NA ESTROGENSKI RECEPTOR

OPĆI UVOD

OECD-ova smjernica za ispitivanje koja se temelji na uspješnosti

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 493 (TG) (2015.). Smjernica za ispitivanje 493 jest smjernica za ispitivanje koja se temelji na uspješnosti (PBTG), u kojoj se opisuje metodologija za *in vitro* testove ljudske rekombinante za otkrivanje tvari s afinitetom vezivanja na receptore estrogena (testovi vezivanja na hrER). Sastoji se od dva mehanicistički i funkcionalno slična testa za identifikaciju kemikalija koje se vežu na receptore estrogena (tj. ER α) i trebala bi olakšati razvoj novih sličnih ili izmijenjenih testova u skladu s načelima za validaciju utvrđenima u Vodiču OECD-a o validaciji i međunarodnom prihvatanju novih ili ažuriranih ispitnih metoda za procjenu opasnosti (1.). Potpuno validirane referentne ispitne metode (Dodatak 2. i Dodatak 3.) koje čine osnovu ove smjernice za ispitivanje koja se temelji na uspješnosti uključuju:

- Freyberger-Wilsonov (FW) *in vitro* test vezivanja na receptore estrogena (ER) upotrebom cijelog ljudskog rekombinantnog receptora ER α (2.), i
- *in vitro* test vezivanja na estrogenski receptor upotrebom ljudskog rekombinantnog proteina domene vezivanja liganda koji je razvio CERi (Institut za procjenu i istraživanje kemikalija) (2.).

Dostupni su zahtjevi izvedbe (PS) (3.) za lakši razvoj i validaciju sličnih ispitnih metoda za istu krajnju točku opasnosti te omogućivanje pravovremene izmjene PBTG-a 493 kako bi se novi slični testovi mogli dodati u ažurirani PBTG. Međutim, slični testovi dodat će se samo nakon što ih OECD pregleda i složi se da su ispunjeni zahtjevi izvedbe. Testovi uključeni u Smjernicu za ispitivanje 493 mogu se upotrebljavati neselektivno za ispunjavanje zahtjeva zemalja članica OECD-a u pogledu rezultata ispitivanja vezivanja na receptore estrogena, uz ostvarivanje koristi od OECD-ova uzajamnog prihvatanja podataka.

Kontekst i načela testova uključenih u ovu ispitnu metodu

2. OECD je 1998. pokrenuo aktivnost visokog prioriteta u cilju revizije postojećih i razvoja novih smjernica za ispitivanje za probir i ispitivanje potencijalnih endokrino disruptivnih kemikalija. OECD-ov konceptualni okvir (CF) za ispitivanje i procjenu potencijalnih endokrino disruptivnih kemikalija revidiran je 2012. Izvorni i revidirani konceptualni okvir uključeni su kao prilozi Vodiču o standardiziranim smjernicama za ispitivanje za ocjenu kemikalija u pogledu endokrine disrupcije (4.). Konceptualni okvir sastoji se od pet razina, a svaka razina odgovara različitoj razini biološke složenosti. Testovi vezivanja na receptore estrogena opisani u ovoj ispitnoj metodi testovi su 2. razine, koja uključuje „*in*

in vitro testove koji pružaju podatke o odabranim endokrinim mehanizmima/putovima”. Ova je ispitna metoda namijenjena za *in vitro* testove vezivanja na receptor osmišljene za identifikaciju liganda na ljudski estrogenski receptor alfa (ER α).

3. Relevantnost *in vitro* testa vezivanja na receptore estrogena za biološke funkcije jasno je dokazana. Testovi vezivanja na estrogenski receptor osmišljeni su za utvrđivanje kemikalija koje potencijalno mogu ometati hormonski put estrogena te su se u posljednja dva desetljeća često upotrebljavali za opisivanje distribucije estrogenskog receptora u tkivu i za utvrđivanje agonista/antagonista estrogenskog receptora. Tim se testovima oponaša interakcija liganda i receptora koja čini početni korak estrogenskog signalnog puta i ključna je za reproduktivnu funkciju svih kralježnjaka.
4. Interakcija estrogena i estrogenskog receptora može utjecati na transkripciju gena koje kontrolira estrogen i inducirati negenomske učinke, a to može dovesti do indukcije ili inhibicije staničnih procesa, među ostalim i onih koji su potrebni za proliferaciju stanica, uobičajeni fetalni razvoj i reproduktivnu funkciju (5., 6. i 7.). Poremećaj uobičajenih estrogenskih sustava potencijalno može uzrokovati štetne učinke na uobičajeni razvoj (ontogeneza), reproduktivno zdravlje i integritet reproduktivnog sustava. Neispravno signaliziranje estrogenskog receptora može dovesti do učinaka kao što su povećani rizik od karcinoma koji ovise o hormonima, smanjenje plodnosti te promjene fetalnog rasta i razvoja (8.).
5. *In vitro* testovi vezivanja temelje se na izravnoj interakciji tvari sa specifičnim mjestom vezivanja liganda na receptor koje regulira transkripciju gena. Ključni element testa vezivanja na ljudski rekombinantni estrogenski receptor alfa (hrER α) mjeri sposobnost radioaktivno obilježenog liganda ([³H]17 β -estradiol) da se veže na estrogenski receptor u prisutnosti povećavajućih koncentracija ispitivane kemikalije (tj. konkurenata). Ispitivane kemikalije koje imaju velik afinitet za estrogenski receptor natječu se s radioaktivno obilježenim ligandom pri nižoj koncentraciji u odnosu na kemikalije s manjim afinitetom za taj receptor. Ovaj se test sastoji od dva glavna elementa: pokusa vezivanja do zasićenja kako bi se opisali parametri interakcije receptora i liganda i evidentirala specifičnost estrogenskog receptora, nakon čega slijedi pokus konkurentskog vezivanja u kojem se ispitivana kemikalija i radioaktivno obilježeni ligand natječu u vezivanju na estrogenski receptor.
6. Validacijske studije CERI-jevog i FW testa vezivanja pokazale su njihovu relevantnost i pouzdanost za predviđenu svrhu (2.).
7. Definicije i kratice upotrijebljene u ovoj ispitnoj metodi opisuju se u Dodatku 1.

Područje primjene testova vezivanja na receptore i ograničenja povezana s njima

8. Ovi se testovi predlažu u svrhu probira i utvrđivanja prioriteta, ali u njima se mogu dobiti i informacije za početni molekularni događaj (MIE) koje se mogu upotrijebiti u pristupu

snage dokaza. Testovima se ispituje kemijsko vezivanje na domenu vezivanja liganda receptora ER α u *in vitro* sustavu. Stoga rezultate ne bi trebalo izravno ekstrapolirati na signalizaciju kompleksa i regulaciju netaknutog endokrinog sustava *in vivo*.

9. Vezivanje prirodnog liganda, 17 β -estradiola, početni je korak u nizu molekularnih događaja koji aktivira transkripciju ciljnih gena i naposljetku kulminira fiziološkom promjenom (9.). Stoga se vezivanje na domenu vezivanja liganda receptora ER α smatra jednim od ključnih mehanizama endokrine disrupcije posredovane estrogenskim receptorom, iako postoje i drugi mehanizmi preko kojih može doći do endokrine disrupcije, uključujući: i. interakcije s mjestima na receptoru ER α koja nisu džep za vezivanje liganda; ii. interakcije s ostalim receptorima relevantnima za signaliziranje estrogena, receptorom ER β i estrogenskim receptorom spregnutim s G-proteinima, ostalim receptorima i enzimskim sustavima u endokrinom sustavu; iii. sintezu hormona; iv. metaboličku aktivaciju i/ili inaktivaciju hormona; v. distribuciju hormona u ciljna tkiva i vi. uklanjanje hormona iz tijela. Nijedan test u okviru ove ispitne metode ne bavi se tim načinima djelovanja.
10. Ovom ispitnom metodom ispituje se sposobnost tvari da se vežu na ljudski receptor ER α i njome se ne razlikuju agonisti i antagonisti receptora ER α . Test se ne bavi daljnjim događajima kao što su transkripcija gena ili fiziološke promjene. Budući da su se u validaciji upotrebljavale samo pojedinačne tvari s jednim sastojkom, nije se razmatrala primjenjivost za ispitivanje smjesa. Unatoč tomu, testovi su u teoriji primjenjivi i za ispitivanje tvari s više sastojaka i smjesa. Prije nego što se ova ispitna metoda primijeni na smjesi radi dobivanja podataka za predviđenu regulatornu svrhu, potrebno je razmotriti mogu li se njome dobiti primjereni rezultati za tu svrhu te ako mogu, zašto. Ta razmatranja nisu potrebna ako postoji regulatorni zahtjev za ispitivanje smjese.
11. Sustavi receptora koji ne sadržavaju stanice nemaju intrinzičnu metaboličku sposobnost i nisu validirani u kombinaciji s metaboličkim enzimskim sustavima. Međutim, metabolička aktivnost možda se može uključiti u plan istraživanja, ali za to bi bila potrebna dodatna validacija.
12. Kemikalije koje mogu denaturirati protein (tj. protein receptora), kao što su površinski aktivne tvari ili kemikalije koje mogu promijeniti pH-vrijednost testnog pufera, ne mogu se ispitati ili se mogu ispitati samo pri koncentracijama kod kojih nema tih interakcija. Osim toga, raspon koncentracija koji se može ispitati u testovima za ispitivanu kemikaliju ograničen je njezinom topljivošću u testnom puferu.
13. U informativne svrhe u tablici 1. navedeni su rezultati ispitivanja za 24 tvari koje su ispitane u oba potpuno validirana testa opisana u ovoj ispitnoj metodi. Na temelju objavljenih izvješća, od tih tvari 17 ih je razvrstano kao kemikalije koje se vežu na estrogenski receptor, a šest kao kemikalije koje se ne vežu, uključujući *in vitro* testove za transkripcijsku aktivaciju estrogenskog receptora i/ili uterotrofni test (9., 10., 11., 12., 13.,

14. i 15.). S obzirom na podatke sažete u tablici 1., postojala je gotovo 100-postotna podudarnost između dva testa u vezi s razvrstavanjem svih tvari do 10^{-4} M i svaka je tvar točno razvrstana kao kemikalija koja se veže ili ne veže na receptore estrogena. Dodatne informacije o ovoj skupini tvari i o dodatnim tvarima koje su ispitane u testovima vezivanja na receptore estrogena tijekom validacijskih studija navedene su u zahtjevima izvedbe za test vezivanja na hrER (3.), Dodatak 2. (tablice 1., 2. i 3.).

Tablica 1.: Razvrstavanje tvari kao kemikalija koje se vežu ili ne vežu na receptore estrogena kada se ispituju u FW i CERi-jevom testu vezivanja na hrER

	Naziv tvari	CAS br.	Predviđeni odgovor	FW test		CERi-jev test		Kemijjski razred prema MESH-u	Razred proizvoda
				Raspon konc. (M)	Razvrstavanje	Raspon konc. (M)	Razvrstavanje		
1	17β-estradiol	50-28-2	<i>Kemikalija koja se veže</i>	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Kemikalija koja se veže	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Kemikalija koja se veže	Steroid	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
2	Noretinodrel	68-23-5	<i>Kemikalija koja se veže</i>	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-4}$	Kemikalija koja se veže	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-4}$	Kemikalija koja se veže	Steroid	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
3	Noretindron	68-22-4	<i>Kemikalija koja se veže</i>	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-4}$	Kemikalija koja se veže	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-4}$	Kemikalija koja se veže	Steroid	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
4	Di- <i>n</i> -butil-ftalat	84-74-2	<i>Kemikalija koja se ne veže*</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Kemikalija koja se ne veže**	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Kemikalija koja se ne veže**	Ugljikovodik (ciklički), ester	Plastifikator, kemijjski međuprodukt
5	DES	56-53-1	<i>Kemikalija koja se veže</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Kemikalija koja se veže	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Kemikalija koja se veže	Ugljikovodik (ciklički), fenol	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
6	17α-etinilestradiol	57-63-6	<i>Kemikalija koja se veže</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Kemikalija koja se veže	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Kemikalija koja se veže	Steroid	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
7	Mezo-heksestrol	84-16-2	<i>Kemikalija koja se veže</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Kemikalija koja se veže	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Kemikalija koja se veže	Ugljikovodik (ciklički), fenol	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
8	Genistein	446-72-0	<i>Kemikalija koja se veže</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Kemikalija koja se veže	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Kemikalija koja se veže	Ugljikovodik (heterociklički), flavonoid	Prirodni proizvod
9	Ekvuol	531-95-3	<i>Kemikalija koja se veže</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Kemikalija koja se veže	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Kemikalija koja se veže	Metabolit fitoestrogena	Prirodni proizvod
10	Butil paraben (<i>n</i> -butil-4-hidroksibenzoat)	94-26-8	<i>Kemikalija koja se veže</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Kemikalija koja se veže	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Kemikalija koja se veže	Paraben	Konzervans
11	Nonilfenol (smjesa)	84852-15-3	<i>Kemikalija koja se veže</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Kemikalija koja se veže	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Kemikalija koja se veže	Alkilfenol	Međuspoj
12	<i>o,p'</i> -DDT	789-02-6	<i>Kemikalija koja se veže</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Kemikalija koja se veže	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Kemikalija koja se veže	Organoklor	Insekticid
13	Kortikosteron	50-22-6	<i>Kemikalija koja se ne veže*</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Kemikalija koja se ne veže	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Kemikalija koja se ne veže	Steroid	Prirodni proizvod
14	Zearalenon	17924-92-4	<i>Kemikalija koja se veže</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Kemikalija koja se veže	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Kemikalija koja se veže	Ugljikovodik (heterociklički), lakton	Prirodni proizvod
15	Tamoksifen	10540-29-1	<i>Kemikalija koja se veže</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Kemikalija koja se veže	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Kemikalija koja se veže	Ugljikovodik (ciklički)	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
16	5α-dihidrotestosteron	521-18-6	<i>Kemikalija koja se veže</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Kemikalija koja se veže	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Kemikalija koja se veže	Steroid, nefenolni	Prirodni proizvod
17	Bisfenol A	80-05-7	<i>Kemikalija koja se veže</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Kemikalija koja se veže	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Kemikalija koja se veže	Fenol	Kemijjski međuprodukt
18	4- <i>n</i> -heptilfenol	1987-50-4	<i>Kemikalija koja se veže</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Daje dvosmislen odgovor ^a	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Kemikalija koja se veže	Alkilfenol	Međuprodukt
19	Kepon	143-	<i>Kemikalija</i>	$1 \times 10^{-10} -$	Kemikalija	$1 \times 10^{-10} -$	Kemikalija	Ugljikovodik	Pesticid

	(klordekoni)	50-0	koja se veže	1×10^{-3}	koja se veže	1×10^{-3}	koja se veže	(halogenirani)	
20	Benz(a)antracen	56-55-3	Kemikalija koja se ne veže	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Kemikalija koja se ne veže ^b	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Kemikalija koja se ne veže ^b	Aromatični ugljikovodik	Međuproizvod
21	Enterolakton	78473-71-9	Kemikalija koja se veže	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Kemikalija koja se veže	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Kemikalija koja se veže	Fitoestrogen	Prirodni proizvod
22	Progesteron	57-83-0	Kemikalija koja se ne veže*	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Kemikalija koja se ne veže	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Kemikalija koja se ne veže	Steroid	Prirodni proizvod
23	Oktil-trietoksisilan	2943-75-1	Kemikalija koja se ne veže	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Kemikalija koja se ne veže	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Kemikalija koja se ne veže	Silan	Modifikator površine
24	Atrazin	1912-24-9	Kemikalija koja se ne veže*	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Kemikalija koja se ne veže	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Kemikalija koja se ne veže	Heterociklički spoj	Herbicid

* Granica topljivosti $< 1 \times 10^{-4}$ M.

* Upotreba i razvrstavanje di-*n*-butil-ftalata (DBP) kao kemikalije koja se ne veže temeljili su se na ispitivanju do 10^{-4} M jer je u nekim laboratorijima tijekom predvalidacijskih studija uočeno da tvar nije topljiva pri 10^{-3} M (npr. zamućenje).

† Tijekom validacijske studije di-*n*-butil-ftalat (DBP) ispitivao se kao kodirana ispitivana tvar pri koncentracijama do 10^{-3} M. U tim su uvjetima neki laboratoriji uočili smanjenje vezivanja radioaktivno obilježenog liganda pri najvišoj koncentraciji (10^{-3} M) i/ili nejasno prilagođenu krivulju. U tim je ciklusima DBP razvrstan kao „kemikalija koja daje dvosmislen odgovor” ili kao „kemikalija koja se veže” u tri laboratorija od njih pet koji su upotrebljavali CERi-jev test i u pet laboratorija od njih šest koji su upotrebljavali FW test (vidjeti literaturu pod 2., odjeljke IV.B.3.a,b i VI.A).

^a Razvrstavanje nije bilo u skladu s predviđenim razvrstavanjem. Razvrstavanje 4-*n*-heptilfenola kao „kemikalije koja daje dvosmislen odgovor” ili kao „kemikalije koja se ne veže” u tri laboratorija od njih pet dovelo je do prosječnog razvrstavanja kao kemikalije koja daje dvosmislen odgovor. Temeljitim pregledom otkriveno je da su uzrok tome ograničenja topljivosti kemikalije koja su spriječila nastanak cijele krivulje vezivanja.

^b Tijekom validacijske studije benz(a)antracen reklasificiran je kao kemikalija koja se ne veže (tj. negativan je) na temelju objavljene literature koja pokazuje da *in vitro* estrogena aktivnost navedena za tu tvar (16) prvenstveno ovisi o njezinoj metaboličkoj aktivaciji (17)(18). Enzimska metabolička aktivacija tvari ne bi se očekivala u testovima vezivanja na hrER koji ne sadržavaju stanice, kao što je slučaj u ovoj validacijskoj studiji između laboratorija. Stoga je tu tvar ispravno razvrstati kao kemikaliju koja se ne veže ako se upotrebljava u pokusnim uvjetima za FW i CERi-jev test.

SASTAVNICE TESTA VEZIVANJA NA hrER

Ključne sastavnice testa

- Ova se ispitna metoda primjenjuje na testove u kojima se upotrebljava estrogenski receptor i primjereno snažan ligand na receptor koji se može upotrijebiti kao marker/obilježivač za test i koji se može istisnuti s povećavajućim koncentracijama ispitivane kemikalije. Testovi vezivanja sadržavaju sljedeće dvije glavne sastavnice: 1. vezivanje do zasićenja i 2. konkurentsko vezivanje. Test vezivanja do zasićenja upotrebljava se za potvrdu specifičnosti i aktivnosti pripreme receptora, dok se pokus konkurentskog vezivanja upotrebljava za procjenu sposobnosti ispitivane kemikalije da se veže na receptor hrER.

Kontrole

- Treba opisati osnovu za predloženi istodobni referentni estrogen i kontrole. Istodobne kontrole (otapalo (nosač), pozitivne kontrole (kemikalija koja se veže na estrogenski receptor; snažan i slab afinitet), negativne kontrole (kemikalija koja se ne veže)), prema potrebi, znak su da test djeluje u ispitnim uvjetima i osnova su za usporedbe između pokusa;

obično su dio kriterija prihvatljivosti za određeni pokus (1.). Na jednoj ploči tijekom svakog ciklusa treba upotrijebiti cijelu krivulju koncentracija referentnog estrogena i kontrola (tj. kemikalije koja se slabo veže i koja se ne veže). Sve ostale ploče trebaju sadržavati: 1. visoku (približno potpuno istiskivanje radioaktivno obilježenog liganda) i srednju (približno IC_{50}) koncentraciju E2 i kemikalije koja se slabo veže u tri ponavljanja; 2. kontrolu s otapalom i nespecifično vezivanje, svako u tri ponavljanja.

Standardni postupci kontrole kvalitete

16. Treba provesti standardne postupke kontrole kvalitete kako je opisano za svaki test da bi se osigurala stabilnost aktivnih receptora, točne koncentracije kemikalija i održavanja granica tolerancije kroz više ponavljanja i zadržala sposobnost pružanja očekivanih odgovora vezivanja na receptore estrogena tijekom vremena.

Dokazivanje osposobljenosti laboratorija

17. Prije ispitivanja nepoznatih kemikalija primjenom bilo kojeg od testova u okviru ove ispitne metode, svaki laboratorij treba dokazati osposobljenost za primjenu testa provođenjem testova zasićenja kako bi se potvrdile specifičnost i aktivnost pripravka estrogenskog receptora te testova konkurentskog vezivanja s referentnim estrogenom i kontrolama (kemikalije koje se slabo vežu i koje se ne vežu). Laboratorij treba uspostaviti bazu prijašnjih podataka s rezultatima za referentni estrogen i kontrole nastale u 3–5 neovisnih pokusa provedenih na različite dane. Ti će pokusi biti osnova za referentni estrogen i prijašnje kontrole za laboratorij te će se upotrebljavati kao djelomična ocjena prihvatljivosti testa za buduće cikluse.
18. Osjetljivost ispitnog sustava potvrdit će se i ispitivanjem tvari za dokazivanje osposobljenosti navedenih u tablici 2. Popis tvari za dokazivanje osposobljenosti podskup je referentnih tvari koje su navedene u zahtjevima izvedbe za testove vezivanja na receptore estrogena (3.). Te su tvari komercijalno dostupne, predstavljaju razrede kemikalija koji se obično povezuju s aktivnošću vezivanja na estrogenski receptor, pokazuju primjeren raspon jakosti koji se očekuje za kemikalije koje se vežu na estrogenski receptor (tj. slabe do jake) i kemikalije koje se ne vežu (tj. negativne kemikalije). Ispitane koncentracije svake tvari za dokazivanje osposobljenosti trebaju obuhvaćati raspon naveden u tablici 2. Za svaku tvar treba provesti najmanje tri pokusa i rezultati trebaju biti u skladu s očekivanom aktivnošću kemikalije. Svaki pokus treba provesti neovisno (tj. sa svježim razrjeđivanjima receptora, kemikalija i reagensa), s tri ponavljanja za svaku koncentraciju. Osposobljenost se dokazuje točnim razvrstavanjem (pozitivno/negativno) svake tvari za dokazivanje osposobljenosti. Pri učenju testova svaki tehničar treba provesti ispitivanje osposobljenosti.

Tablica 2.: Popis kontrola i tvari za dokazivanje osposobljenosti za testove konkurentskog vezivanja na hrER¹

Br.	Naziv tvari	CAS br. ²	Predvideni odgovor ^{3,4}	Raspon ispitne koncentracije (M)	Kemijski razred prema MeSH-u ⁵	Razred proizvoda ⁶
Kontrole (referentni estrogen, kemikalija koja se slabo veže, kemikalija koja se ne veže)						
1	17β-estradiol	50-28-2	Kemikalija koja se veže	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Steroid	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
2	Noretinodrel (ili) noretindron	68-23-5 (ili) 68-22-4	Kemikalija koja se veže	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-6}$	Steroid	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
3	Oktil-trietoksisilan	2943-75-1	Kemikalija koja se ne veže	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Silan	Modifikator površine
Tvari za dokazivanje osposobljenosti⁶						
4	Dietilstilbestrol	56-53-1	Kemikalija koja se veže	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Ugljikovodik (ciklički), fenol	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
5	17α-etinilestradiol	57-63-6	Kemikalija koja se veže	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Steroid	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
6	Mezo-heksestrol	84-16-2	Kemikalija koja se veže	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Ugljikovodik (ciklički), fenol	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
7	Tamoksifen	10540-29-1	Kemikalija koja se veže	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Ugljikovodik (ciklički)	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
8	Genistein	446-72-0	Kemikalija koja se veže	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Heterociklički spoj, flavonoid	Prirodni proizvod
9	Bisfenol A	80-05-7	Kemikalija koja se veže	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Fenol	Kemijski međuproizvod
10	Zearalenon	17924-92-4	Kemikalija koja se veže	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-3}$	Heterociklički spoj, lakton	Prirodni proizvod

11	Butil paraben	94-26-8	Kemikalija koja se veže	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-3}$	Karboksilna kiselina, fenol	Konzervans
12	Atrazin	1912-24-9	Kemikalija koja se ne veže	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Heterociklički spoj	Herbicid
13	Di- <i>n</i> -butil-ftalat (DBP) ⁷	84-74-2	Kemikalija koja se ne veže ⁸	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Ugljikovodik (ciklički), ester	Plastifikator, kemijski međuproizvod
14	Kortikosteron	50-22-6	Kemikalija koja se ne veže	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-4}$	Steroid	Prirodni proizvod

¹ Ako tvar za dokazivanje osposobljenosti više nije komercijalno dostupna, može se upotrijebiti tvar koja je razvrstana na isti način u pogledu vezivanja na receptore estrogena, usporedive je jakosti te je iz istog kemijskog razreda.

² Kratice: CAS br. = registarski broj Službe za podatke o kemijskim tvarima.

³ Razvrstavanje kao kemikalija koja se veže na ER α ili se ne veže na njega tijekom validacijske studije za CER1-jev i FW test vezivanja na hrER (2.).

⁴ Aktivnost vezivanja na estrogenski receptore temeljila se na ICCVAM-ovu Osnovnom dokumentu za preispitivanje (BRD) za testove vezivanja estrogenskog receptora i transaktivacije (9.) te empirijskim podacima i drugim informacijama dobivenima iz studija na koje se upućuje i koje su objavljene i pregledane (10., 11., 12., 13., 14. i 15.).

⁵ Tvari su raspoređene u jedan kemijski razred ili njih više primjenom oznaka medicinskog nazivlja američke Nacionalne medicinske knjižnice (MeSH) – međunarodno priznate standardne sheme razvrstavanja (dostupno na: <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁶ Tvari su raspoređene u jedan razred proizvoda ili njih više primjenom baze podataka o opasnim tvarima američke Nacionalne medicinske knjižnice (dostupno na: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).

⁷ DBP se može upotrebljavati kao zamjenska kontrolna kemikalija koja se ne veže, s najvećom koncentracijom od 10^{-4} M.

⁸ Granica topljivosti za tu tvar iznosi 10^{-4} M. Upotreba i razvrstavanje di-*n*-butil-ftalata (DBP) kao kemikalije koja se ne veže temelje se na ispitivanju do 10^{-4} M jer je u nekim laboratorijima tijekom predvalidacijskih studija uočeno da tvar nije topljiva pri 10^{-3} M (npr. zamućenje).

Ispitivanje topljivosti i utvrđivanje raspona koncentracija za ispitivane kemikalije

19. Treba provesti preliminarno ispitivanje kako bi se utvrdila granica topljivosti za svaku ispitivanu kemikaliju i utvrdio primjereni raspon koncentracija za upotrebu u testu. Granicu topljivosti svake ispitivane kemikalije prvo treba utvrditi u otapalu i zatim potvrditi u uvjetima testa. Konačna koncentracija ispitana u testu ne bi trebala biti veća od 1 mM. Ispitivanje za utvrđivanje raspona sastoji se od kontrole s otapalom i osam log-serijskih razrjeđivanja, počevši od najveće prihvatljive koncentracije (npr. 1 mM ili manje, na temelju granice topljivosti) i uočene prisutnosti zamućenja ili taloga. Koncentracije u drugom i trećem pokusu po potrebi treba prilagoditi kako bi se bolje opisala krivulja koncentracija – odgovor.

Kriteriji prihvatljivosti ciklusa ispitivanja

20. Prihvaćanje ili odbijanje ciklusa ispitivanja temelji se na procjeni rezultata dobivenih za referentni estrogen i kontrolu koji se koriste za svaki pokus. Prvo, kod ploče 1 cijele krivulje koncentracija referentne kontrole iz svakog pokusa trebaju zadovoljiti mjerila uspješnosti s pomoću parametara prilagođene krivulje (npr. IC_{50} i Hillov nagib) na temelju rezultata navedenih za odgovarajuće protokole za CERI-jev i FW test (dodaci 2. i 3.) i prijašnjih kontrolnih podataka laboratorija koji provodi test. Sve kontrole (referentni estrogen, kemikalija koja se slabo veže i kemikalija koja se ne veže) treba točno razvrstati za svaki pokus. Kontrole na svim kasnijim pločama zatim treba procijeniti u pogledu dosljednosti s pločom 1. Treba upotrijebiti dovoljan raspon koncentracija ispitivane kemikalije kako bi se jasno utvrdio vrh krivulje konkurentskog vezivanja. Varijabilnost među ponavljanjima pri svakoj koncentraciji ispitivane kemikalije te među tri neovisna ciklusa treba biti razumna i znanstveno opravdana. Sposobnost dosljedne provedbe testa treba dokazati razvojem i održavanjem baze prijašnjih podataka za referentni estrogen i kontrole. Kao mjera obnovljivosti unutar jednog laboratorija mogu se koristiti standardne devijacije (SD) ili koeficijenti varijacije (CV) za srednje vrijednosti parametara prilagođavanja krivulja referentnog estrogena i kontrolne kemikalije koja se slabo veže. Pri pregledu rezultata kontrole na ploči iz svakog ciklusa te za svaku ispitivanu kemikaliju treba primijeniti stručnu prosudbu.

Osim toga, treba ispuniti sljedeća načela u pogledu kriterija prihvatljivosti:

- podaci bi trebali biti dovoljni za kvantitativnu procjenu vezivanja na receptore estrogena,
- ispitane koncentracije trebale bi biti unutar područja topljivosti ispitivane kemikalije.

Analiza podataka

21. Utvrđeni postupak analize podataka o vezivanju do zasićenja i konkurentskom vezivanju treba ispunjavati ključna načela za opis interakcija receptora i liganda. Podaci o vezivanju do zasićenja obično se analiziraju upotrebom modela nelinearne regresije kojim se uzimaju u

obzir ukupno i nespecifično vezivanje. Pri utvrđivanju vrijednosti B_{max} i K_d možda će biti potreban ispravak potrošnje liganada (npr. Swillens, 1995. (19.)). Podaci iz testova konkurentskog vezivanja obično se transformiraju (npr. postotak specifičnog vezivanja i koncentracija ispitivane kemikalije ($\log M$)). Procjene za $\log (IC_{50})$ za svaku ispitivanu kemikaliju treba utvrditi upotrebom primjerenog softvera za nelinearno prilagođavanje krivulje kako bi se prilagodila Hillova jednačba s četiri parametra. Nakon početne analize treba izvršiti pregled parametara prilagođene krivulje i izvršiti vizualni pregled mjere u kojoj podaci o vezivanju odgovaraju izrađenoj krivulji konkurentskog vezivanja. U nekim slučajevima može biti potrebna dodatna analiza kako bi se dobila najbolje prilagođena krivulja (npr. ograničavanje vrha i/ili dna krivulje, upotreba pravila od 10 %; vidjeti Dodatak 4. i literaturu pod 2. (odjeljak III.A.2.)).

22. Ispunjavanje kriterija prihvatljivosti (stavak 20.) znači da sustav testa pravilno funkcionira, ali time se ne osigurava da će svaki pojedinačni test dati točne podatke. Ponavljanje točnih rezultata prvog testa najbolji je znak toga da su dobiveni točni podaci.

Opći kriteriji za tumačenje podataka

23. Trenutačno ne postoji općeprihvaćena metoda za tumačenje podataka o vezivanju na receptore estrogena. Međutim, i kvalitativne (npr. kemikalija koja se veže/ne veže) i/ili kvantitativne (npr. IC_{50} , relativni afinitet vezivanja (RBA) itd.) procjene aktivnosti posredovane hrER-om trebaju se temeljiti na empirijskim podacima i valjanoj znanstvenoj prosudbi.

Izvješće o ispitivanju

24. Izvješće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Test:

- korišteni test.

Kontrolna/referentna/ispitivana kemikalija:

- izvor, broj serije, rok uporabe, ako su dostupni
- stabilnost ispitivane kemikalije, ako je poznata
- topljivost i stabilnost ispitivane kemikalije u otapalu ako su poznate
- prema potrebi, mjerenja pH-vrijednosti, osmolalnosti i taloga u mediju za uzgoj kulture kojem je dodana ispitivana kemikalija.

Tvar s jednim sastojkom:

- fizički izgled, topljivost u vodi i druga relevantna fizikalno-kemijska svojstva

- kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv, CAS broj, SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula, čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.

Tvari s više sastojaka, UVCB tvari i smjese:

- opis (koliko je to moguće) kemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativnog udjela i relevantnih fizikalno-kemijskih svojstava sastojaka.

Otapalo/nosač:

- karakterizacija (priroda, dobavljač i serija)
- obrazloženje za odabir otapala/nosača
- topljivost i stabilnost ispitivane kemikalije u otapalu/nosaču, ako su poznate.

Receptori:

- izvor receptora (dobavljač, kataloški broj, serija, vrste receptora, koncentracija aktivnih receptora koju je naveo dobavljač, potvrda dobavljača)
- opis receptora (uključujući rezultate vezivanja do zasićenja): K_d , B_{max}
- skladištenje receptora
- radioaktivno obilježeni ligand
- dobavljač, kataloški broj, serija, specifična aktivnost.

Ispitni uvjeti:

- ograničenja topljivosti u uvjetima testa
- sastav pufera za vezivanje
- koncentracija receptora
- koncentracija obilježivača (tj. radioaktivno obilježenog liganda)
- koncentracije ispitivane kemikalije
- postotak nosača u konačnom testu
- temperatura i vrijeme inkubacije
- metoda odvajanja vezanih/slobodnih tvari
- pozitivne i negativne kontrole/referentne tvari
- kriteriji na temelju kojih se test smatra pozitivnim, negativnim ili dvosmislenim.

Provjera prihvatljivosti:

- stvarne vrijednosti IC_{50} i vrijednosti Hillova nagiba za istodobne pozitivne kontrole/referentne tvari.

Rezultati:

- neobrađeni podaci i podaci o vezanim/slobodnim tvarima
- ako je primjereno, provjera radi potvrde denaturiranja
- ako postoji, najniža učinkovita koncentracija (LEC)
- vrijednosti RBA i/ili IC₅₀, ako je primjereno
- odnos koncentracije i odgovora, ako je moguće
- statističke analize, ako postoje, i mjera pogreške i pouzdanosti (npr. SEM, SD, CV interval 95-postotne pouzdanosti) te opis načina na koji se došlo do tih vrijednosti.

Rasprava o rezultatima:

- primjena pravila od 10 %.

Zaključak

LITERATURA

1. OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 34), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
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), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
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), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
4. OECD (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 150), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
5. Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept, Climacteric, 5 Suppl 2: str. 20.–6.
6. Welboren W.J., *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and How are they Regulated? *Endocr. Relat. Cancer.*, 16(4): str. 1073.–89.
7. Younes M. and Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 135(1): str. 63.–6.
8. Diamanti-Kandarakis *et al.* (2009). Endocrine-Disrupting Chemicals: an Endocrine Society Sci. Statement, *Endo Rev* 30(4):293.–342.
9. ICCVAM (2002). Background Review Document. Current Status of Test Methods for Detecting Endocrine Disruptors: *In Vitro* Estrogen Receptor Binding Assays. (NIH Publication No 03-4504). National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC.
10. ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.
11. ICCVAM (2006). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

12. Akahori Y. *et al.* (2008). Relationship Between the Results of *In Vitro* Receptor Binding Assay to Human Estrogen Receptor Alpha and *In Vivo* Uterotrophic Assay: Comparative Study with 65 Selected Chemicals, *Toxicol. In Vitro*, 22(1): 225.–231.
13. OECD (2007). Additional Data Supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in Rodents, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 67), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
14. Takeyoshi, M. (2006). Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line, Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI): Japan. str. 1.–188.
15. Yamasaki, K; Noda, S; Imatanaka, N; Yakabe, Y. (2004). Comparative Study of the Uterotrophic Potency of 14 Chemicals in a Uterotrophic Assay and their Receptor-Binding Affinity, *Toxicol. Letters*, 146: 111.–120.
16. Kummer V; Maskova, J; Zraly, Z; Neca, J; Simeckova, P; Vondracek, J; Machala, M. (2008). Estrogenic Activity of Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Uterus of Immature Wistar Rats. *Toxicol. Letters*, 180: 213.–221.
17. Gozgit, JM; Nestor, KM; Fasco, MJ; Pentecost, BT; Arcaro, KF. (2004). Differential Action of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Endogenous Estrogen-Responsive Genes and on a Transfected Estrogen-Responsive Reporter in MCF-7 Cells. *Toxicol. and Applied Pharmacol.*, 196: 58.–67.
18. Santodonato, J. (1997). Review of the Estrogenic and Antiestrogenic Activity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Relationship to Carcinogenicity. *Chemosphere*, 34: 835.–848.
19. Swillens S (1995). Interpretation of Binding Curves Obtained with High Receptor Concentrations: Practical Aid for Computer Analysis, *Mol Pharmacol* 47(6):1197.–1203.

Dodatak 1.

DEFINICIJE I KRATICE

Pravilo od 10 %: opcija da se iz analize isključe podatkovne točke kod kojih je srednja vrijednost ponovljenih uzoraka za postotak specifično vezanog [³H]17β-estradiola za 10 % ili više iznad srednje vrijednosti uočene pri nižoj koncentraciji (vidjeti Dodatak 4.).

Kriteriji prihvatljivosti: minimalne norme za provedbu eksperimentalnih kontrola i referentnih normi. Da bi se pokus smatrao valjanim, trebali bi biti ispunjeni svi kriteriji prihvatljivosti.

Točnost (podudarnost): stupanj podudarnosti između rezultata testa i prihvaćenih referentnih vrijednosti. Ona je mjerilo učinkovitosti testa i jedan od aspekata relevantnosti. Pojam je često međusobno zamjenjiv s pojmom „podudarnost” u smislu udjela točnih ishoda testa (1.).

CF: OECD-ov konceptualni okvir za ispitivanje i procjenu endokrino disruptivnih kemikalija.

Kemikalija: tvar ili smjesa.

CV: koeficijent varijacije.

E2: 17β-estradiol.

ED: endokrina disrupcija.

hERα: ljudski estrogenski receptor alfa.

ER: estrogenski receptor.

Estrogeno djelovanje: sposobnost kemikalije da oponaša 17β-estradiol u pogledu sposobnosti da se veže na receptore estrogena. Ovom se ispitnom metodom može otkriti vezivanje na receptor hERα.

IC₅₀: pola najveće učinkovite koncentracije inhibitorne ispitivane kemikalije.

ICCVAM: The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (Međuagencijski koordinacijski odbor za validaciju alternativnih metoda).

Obnovljivost između laboratorija: mjera u kojoj različiti kvalificirani laboratoriji mogu dobiti kvalitativno i kvantitativno slične rezultate primjenom istog protokola i ispitivanjem istih tvari. Obnovljivost između više laboratorija utvrđuje se tijekom predvalidacijskih i validacijskih procesa te pokazuje mjeru u kojoj se test može uspješno prenositi među laboratorijima, a poznata je i kao interlaboratorijska obnovljivost (1.).

Obnovljivost unutar jednog laboratorija: utvrđivanje mjere u kojoj kvalificirane osobe u istom laboratoriju mogu uspješno ponoviti rezultate primjenom specifičnog protokola u različito vrijeme. Poznata je i kao intralaboratorijska obnovljivost (1.).

LEC: najniža učinkovita koncentracija jest najniža koncentracija ispitivane kemikalije koja dovodi do odgovora (tj. najniža koncentracija ispitivane kemikalije pri kojoj je multiplikacijski faktor

indukcije statistički različit od istodobne kontrole s nosačem).

I ja također test: kolokvijalni izraz za test koji je strukturno i funkcionalno sličan validiranoj i prihvaćenoj referentnoj ispitnoj metodi. Izraz se često koristi u istom značenju kao slična ispitna metoda.

PBTG: smjernica za ispitivanje koja se temelji na uspješnosti.

Zahtjevi izvedbe: zahtjevi koji se temelje na validiranoj ispitnoj metodi i pružaju temelj za ocjenjivanje usporedivosti predložene, funkcionalno i mehanicistički slične, ispitne metode. Oni obuhvaćaju: 1. ključne sastavnice testa; 2. minimalni popis referentnih kemikalija odabranih između kemikalija koje se koriste za dokazivanje prihvatljive učinkovitosti validirane ispitne metode, i 3. slične razine točnosti i pouzdanosti, utemeljene na rezultatima dobivenim za validiranu ispitnu metodu, koje se prilikom ocjenjivanja trebaju dokazati predloženom ispitnom metodom koristeći minimalni popis referentnih kemikalija (1.).

Tvari za dokazivanje osposobljenosti: podskupina referentnih tvari iz zahtjeva izvedbe kojima se laboratoriji mogu koristiti kako bi dokazali tehničku osposobljenost za provođenje standardiziranog testa. Kriteriji za odabir tih tvari obično uključuju to da predstavljaju cijeli raspon odgovora, da su komercijalno dostupni i da su za njih dostupni visokokvalitetni referentni podaci.

Osposobljenost: dokazana sposobnost za pravilno provođenje testa prije ispitivanja nepoznatih tvari.

Referentni estrogen: 17 β -estradiol (E2, CAS 50-28-2).

Referentne ispitne metode: testovi na kojima se temelji PBTG 493.

RBA: relativni afinitet vezivanja. RBA tvari računa se kao postotak log (IC₅₀) za tvar u odnosu na log (IC₅₀) za 17 β -estradiol.

Relevantnost: opis odnosa između testa i istraživnog učinka te je li test prikladan i koristan za određenu svrhu. Pokazuje u kojoj se mjeri testom točno mjeri ili predviđa istraživani biološki učinak. Relevantnost uključuje razmatranje o točnosti (podudarnosti) testa (1.).

Pouzdanost: pokazuje u kojoj se mjeri test može obnovljivo primijeniti unutar jednog laboratorija i između više laboratorija tijekom vremena uz primjenu istog protokola. Ocjenjuje se izračunavanjem obnovljivosti unutar jednog laboratorija i između više laboratorija.

SD: standardna devijacija.

Ispitivana kemikalija: svaka tvar ili smjesa koja se ispituje ovom ispitnom metodom.

Validirana ispitna metoda: test za koji su provedene validacijske studije za utvrđivanje relevantnosti (uključujući točnost) i pouzdanosti za specifičnu namjenu. Važno je napomenuti da validirana ispitna metoda možda neće biti u dovoljnoj mjeri uspješna s obzirom na točnost i pouzdanost da bi je se moglo smatrati prihvatljivom za predloženu namjenu (1.).

Validacija: proces kojim se utvrđuju pouzdanost i relevantnost određenog pristupa, metode, testa, procesa ili procjene za definiranu svrhu (1.).

Dodatak 2.

FREYBERGER-WILSONOVI *IN VITRO* TESTOVI VEZIVANJA NA ESTROGENSKI RECEPTOR (ER α) DO ZASIĆENJA I KONKURENTSKOG VEZIVANJA UPOTREBOM CIJELOG REKOMBINANTNOG RECEPTORA ER α

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA (VIDJETI I OPĆI UVOD)

1. U ovom *in vitro* testu vezivanja na estrogenski receptor (ER α) do zasićenja i konkurentskog vezivanja upotrebljava se cijeli ljudski receptor ER α (hrER α) koji se proizvodi i izolira iz stanica kukaca zaraženih bakulovirusom. Protokol koji su razvili Freyberger i Wilson podvrgnut je međunarodnoj validacijskoj studiji u više laboratorija (2.) i ona je pokazala njegovu relevantnost i pouzdanost za predviđenu svrhu testa.
2. Ovaj je test postupak probira za utvrđivanje tvari koje se mogu vezati na cijeli receptor hrER α . Upotrebljava se za utvrđivanje sposobnosti ispitivanih kemikalija da se natječu sa 17 β -estradiolom u vezivanju na hrER α . Kvantitativni rezultati testa mogu uključivati IC₅₀ (mjera koncentracije ispitivane kemikalije koja je potrebna da se istisne pola [³H]-17 β -estradiola s receptora hrER α) i relativne afinitete vezivanja ispitivanih kemikalija za hrER α u usporedbi sa 17 β -estradiolom. U svrhu probira kemikalija prihvatljivi kvalitativni rezultati testa mogu uključivati razvrstavanja ispitivanih kemikalija kao kemikalija koje se vežu na hrER α , koje se ne vežu ili koje daju dvosmislen odgovor na temelju kriterija opisanih za krivulje vezivanja.
3. U testu se upotrebljava radioaktivno obilježeni ligand, što znači da laboratorij mora imati dozvolu za radioaktivne materijale. U svim postupcima s radioizotopima i opasnim kemikalijama treba poštovati propise i postupke kako je opisano u nacionalnom zakonodavstvu.
4. Prije upotrebe ovog testa u regulatorne svrhe treba pročitati odjeljke „**OPĆI UVOD**” i „**SASTAVNICE TESTA VEZIVANJA NA hrER**”. Definicije i kratice upotrijebljene u ovoj Smjernici za ispitivanje navedene su u Dodatku 1.

NAČELA TESTA (VIDJETI I OPĆI UVOD)

5. Test vezivanja na hrER α mjeri sposobnost vezivanja radioaktivno obilježenog liganda ([³H]17 β -estradiol) na estrogenski receptor u prisutnosti povećavajućih koncentracija ispitivane kemikalije (tj. konkurenta). Ispitivane kemikalije koje imaju velik afinitet za estrogenski receptor natječu se s radioaktivno obilježenim ligandom pri nižoj koncentraciji u odnosu na kemikalije s manjim afinitetom za taj receptor.
6. Ovaj se test sastoji od dva glavna elementa: pokusa vezivanja do zasićenja kako bi se opisali parametri interakcije receptora i liganda, nakon čega slijedi pokus konkurentskog

vezivanja u kojem se ispitivana kemikalija i radioaktivno obilježeni ligand natječu u vezivanju na estrogenski receptor.

7. Svrha je pokusa vezivanja do zasićenja opisati određenu šaržu receptora u pogledu afiniteta vezivanja i broja u pripravku za pokus konkurentskog vezivanja. Pokusom vezivanja do zasićenja mjeri se, u uvjetima ravnoteže, afinitet fiksne koncentracije estrogenskog receptora za njegov prirodni ligand (koji predstavlja konstanta disocijacije, K_d) i koncentracija aktivnih mjesta na receptorima (B_{max}).
8. Pokusom konkurentskog vezivanja mjeri se afinitet tvari da se natječe s $[^3H]17\beta$ -estradiolom u vezivanju na estrogenski receptor. Afinitet se kvantificira koncentracijom ispitivane kemikalije koja, u uvjetima ravnoteže, inhibira 50 % specifičnog vezivanja $[^3H]17\beta$ -estradiola (koja se naziva „50-postotna inhibitorska koncentracija” ili IC_{50}). To se može procijeniti i upotrebom relativnog afiniteta vezivanja (RBA, u odnosu na IC_{50} estradiola koji je izmjeren zasebno u istom ciklusu). Pokusom konkurentskog vezivanja mjeri se vezivanje $[^3H]17\beta$ -estradiola pri fiksnoj koncentraciji u prisutnosti širokog raspona (osam redova veličine) koncentracija ispitivanih kemikalija. Ako je moguće, podaci se zatim prilagođavaju u oblik Hillove jednadžbe (Hill, 1910.) koja opisuje istiskivanje radioaktivno obilježenog liganda konkurentnom kemikalijom koja se veže na jedno mjesto. Mjera istiskivanja radioaktivno obilježenog estradiola u uvjetima ravnoteže upotrebljava se za opis ispitivane kemikalije kao kemikalije koja se veže, koja se ne veže ili koja daje dvosmislen odgovor.

POSTUPAK

Dokazivanje prihvatljivog djelovanja proteina receptora hrER α

9. Prije rutinske provedbe testova vezivanja do zasićenja i konkurentskog vezivanja za svaku novu šaržu receptora hrER α treba dokazati da ispravno djeluju u laboratoriju u kojem će se upotrebljavati. Za dokazivanje uspješnosti treba upotrijebiti proces koji se sastoji od dva koraka. Riječ je o sljedećim koracima:
 - provedbi testa vezivanja $[^3H]$ - 17β -estradiola do zasićenja kako bi se dokazali specifičnost i zasićenje receptora hrER α . Nelinearnom regresijskom analizom tih podataka (npr. BioSoft; McPherson, 1985.; Motulsky, 1995.) i kasnijom Scatchardovom krivuljom treba evidentirati afinitet vezivanja $[^3H]$ - 17β -estradiola na receptor hrER α (K_d) i broj receptora (B_{max}) za svaku šaržu receptora hrER α ,
 - provedbi testa konkurentskog vezivanja upotrebom kontrolnih tvari (referentni estrogen (17β -estradiol), kemikalije koja se slabo veže (npr. noretinodrel ili noretindron) i kemikalije koja se ne veže (oktil-trietoksisilan, OTES)). Svaki laboratorij treba uspostaviti bazu prijašnjih podataka kako bi evidentirao dosljednost vrijednosti IC_{50} i drugih relevantnih vrijednosti za referentni estrogen i kemikaliju koja se slabo veže između pokusa i među različitim šaržama receptora hrER α . Parametri krivulja konkurentskog

vezivanja za kontrolne tvari trebaju biti unutar ograničenja intervala pouzdanosti od 95 % (vidjeti tablicu 1.) koja su određena na temelju podataka iz laboratorija koji su sudjelovali u validacijskoj studiji za ovaj test (2.).

Tablica 1.: Kriteriji uspješnosti razvijeni za referentni estrogen i kemikaliju koja se slabo veže, FW test vezivanja na hrER

Tvar	Parametar	Srednja vrijednost ^a	Standardna devijacija (n)	Intervali pouzdanosti od 95 % ^b	
				Donja granica	Gornja granica
17β-estradiol	Vrh (%)	100,44	10,84 (67)	97,8	103,1
	Dno (%)	0,29	1,25 (67)	-0,01	0,60
	Hillov nagib	-1,06	0,20 (67)	-1,11	-1,02
	LogIC ₅₀ (M)	-8,92 ^c	0,18 (67)	-8,97	-8,88
Noretinodrel	Vrh (%)	99,42	8,90 (68)	97,27	101,60
	Dno (%)	2,02	3,42 (68)	1,19	2,84
	Hillov nagib	-1,01	0,38 (68)	-1,10	-0,92
	Log IC ₅₀ (M)	-6,39	0,27 (68)	-6,46	-6,33
Noretindron^c	Vrh (%)	96,14	8,44 (27)	92,80	99,48
	Dno (%)	2,38	5,02 (27)	0,40	4,37
	Hillov nagib	-1,41	0,32 (27)	-1,53	-1,28
	LogIC ₅₀ (M)	-5,73	0,27 (27)	-5,84	-5,62

^a Srednja vrijednost (n) ± standardna devijacija (SD) izračunani su na temelju procjena parametara prilagođene krivulje (Hillova jednadžba s četiri parametra) za kontrolne cikluse provedene u četiri laboratorija tijekom validacijske studije (vidjeti Prilog N literaturi pod 2.).

^b Intervali pouzdanosti od 95 % navedeni su kao smjernica za kriterije prihvatljivosti.

^c U validacijskoj studiji nije bilo obvezno ispitivanje noretindrona za podzadatak 4. (vidjeti literaturu pod 2., vidjeti podzadatak 4). Stoga su srednje vrijednosti ± standardne devijacije (n) izračunane na temelju procjena prilagođene krivulje (Hillova jednadžba s četiri parametra) za kontrolne cikluse provedene u dva laboratorija.

Raspon za IC₅₀ ovisit će o vrijednosti Kd pripravka receptora i koncentraciji radioaktivno obilježenog liganda upotrijebljenoj u svakom laboratoriju. Bit će prihvatljiva odgovarajuća prilagodba za raspon vrijednosti IC₅₀ na temelju uvjeta korištenih za provedbu testa.

Dokazivanje osposobljenosti laboratorija

- Vidjeti stavke 17. i 18. te tablicu 2. u odjeljku „SASTAVNICE TESTA VEZIVANJA NA hrER” ove ispitne metode. Svaki test (zasićenje i konkurentsko vezivanje) treba se sastojati od tri neovisna ciklusa (tj. sa svježim razrjeđivanjima receptora, kemikalija i reagensa) provedena na različite dane te svaki ciklus treba sadržavati tri ponavljanja.

Utvrđivanje koncentracije receptora (hrERα)

- Koncentracija aktivnih receptora malo se razlikuje s obzirom na šaržu i uvjete skladištenja. Zato treba utvrditi koncentraciju aktivnih receptora koja je dobivena od dobavljača. Tako će se dobiti primjerena koncentracija aktivnih receptora u trenutku provedbe ciklusa.
- Nominalne koncentracije od 0,25, 0,5, 0,75 i 1 nM receptora treba inkubirati bez (ukupno vezivanje) i sa (nespecifično vezivanje) 1 μM neobilježenog estradiola u uvjetima koji odgovaraju konkurentskom vezivanju (tj. 1 nM [³H]-estradiola). Specifično vezivanje, izračunano kao razlika ukupnog i nespecifičnog vezivanja, grafički se prikazuje u ovisnosti

o nominalnoj koncentraciji receptora. Koncentracija receptora koja pokaže specifične vrijednosti vezivanja koje odgovaraju 20 % dodane radioaktivne oznake povezana je s odgovarajućom nominalnom koncentracijom receptora i tu koncentraciju receptora treba upotrebljavati za pokuse vezivanja do zasićenja i konkurentskog vezivanja. Konačna koncentracija receptora hrER od 0,5 nM često će ispunjavati taj uvjet.

13. Ako se kriterij od 20 % ne može ispuniti u više navrata, treba provjeriti plan pokusa kako bi se utvrdile potencijalne pogreške. Neuspjeh u ispunjavanju kriterija od 20 % može biti znak toga da u rekombinantnoj šarži ima vrlo malo aktivnih receptora pa treba razmotriti upotrebu druge šarže receptora.

Test zasićenja

14. Osam povećavajućih koncentracija [^3H]-17 β -estradiola treba procijeniti u tri ponavljanja, u sljedeća tri uvjeta (vidjeti tablicu 2.):

- bez neobilježenog 17 β -estradiola i u prisutnosti estrogenskog receptora. Tako se utvrđuje ukupno vezivanje mjerenjem radioaktivnosti u jažicama u kojima se nalazi samo [^3H]-17 β -estradiol,
- u prisutnosti koncentracije neobilježenog 17 β -estradiola koja je 1 000 veća od koncentracije obilježenog 17 β -estradiola i u prisutnosti estrogenskog receptora. Svrha je ovog uvjeta zasititi aktivna vezna mjesta neobilježenim 17 β -estradiolom te mjerenjem radioaktivnosti u jažicama utvrditi nespecifično vezivanje. Sav radioaktivno obilježeni estradiol koji je preostao a koji se može vezati na receptor smatra se vezanim na nespecifično mjesto jer bi neobilježeni estradiol trebao biti prisutan u tako visokoj koncentraciji da se veže na sva dostupna specifična mjesta na receptoru,
- bez neobilježenog 17 β -estradiola i bez estrogenskog receptora (utvrđivanje ukupne radioaktivnosti).

Priprema otopina [^3H]-17 β -estradiola i neobilježenog 17 β -estradiola

15. Razrjeđivanja [^3H]-17 β -estradiola trebaju se pripremiti dodavanjem testnog pufera u glavnu otopinu [^3H]-17 β -estradiola od 12 nM kako bi se dobile koncentracije koje su prvotno u rasponu od 0,12 nM do 12 nM. Dodavanjem 40 μl tih otopina odgovarajućim testnim jažicama na mikrotitracijskoj ploči s 96 jažica (u konačnom volumenu od 160 μl) dobit će se konačne koncentracije testa, u rasponu od 0,03 do 3,0 nM. Priprema testnog pufera, glavne otopine [^3H]-17 β -estradiola i razrjeđivanja te utvrđivanje koncentracija podrobno su opisani u protokolu za FW test (2.).
16. Razrjeđivanja etanolskih otopina 17 β -estradiola treba pripremiti dodavanjem testnog pufera kako bi se dobilo osam povećavajućih koncentracija koje su prvo u rasponu od 0,06 μM do 6 μM . Dodavanjem 80 μl tih otopina odgovarajućim testnim jažicama na mikrotitracijskoj ploči s 96 jažica (u konačnom volumenu od 160 μl) dobit će se konačne koncentracije testa, u rasponu od 0,03 do 3 μM . Konačna koncentracija neobilježenog 17 β -estradiola u

pojedinačnim testnim jažicama za nespecifično vezivanje treba biti 1 000 puta veća od koncentracije obilježenog [³H]-17β-estradiola. Priprema razrjeđivanja neobilježenog 17β-estradiola posebno je opisana u protokolu za FW test (2.).

17. Treba upotrebljavati nominalnu koncentraciju receptora koja rezultira specifičnim vezivanjem od 20 ± 5 % (vidjeti stavke 12. i 13.). Otopinu receptora hrERα treba pripremiti neposredno prije upotrebe.

18. Mikrotitracijske ploče s 96 jažica pripremaju se kako je prikazano u tablici 2., s tri ponavljanja po koncentraciji. Primjer rasporeda koncentracija i volumena [³H]-17β-estradiola, neobilježenog 17β-estradiola, pufera i receptora na pločama naveden je u Dodatku 2.2.

Tablica 2.: Raspored na mikrotitracijskoj ploči za test vezivanja do zasićenja

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [³ H] E ₂ + ER			0,06 nM [³ H] E ₂ + ER			0,08 nM [³ H] E ₂ + ER			0,10 nM [³ H] E ₂ + ER			Ukupno vezivanje (otapalo)
B	0,30 nM [³ H] E ₂ + ER			0,60 nM [³ H] E ₂ + ER			1,0 nM [³ H] E ₂ + ER			3,0 nM [³ H] E ₂ + ER			
C													
D	0,03 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,03 μM E ₂			0,06 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,06 μM E ₂			0,08 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,08 μM E ₂			0,10 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,10 μM E ₂			Nespec. vezivanje
E	0,30 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,30 μM E ₂			0,60 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,60 μM E ₂			1,0 nM [³ H] E ₂ + ER + 1,0 μM E ₂			3,0 nM [³ H] E ₂ + ER + 3,0 μM E ₂			
F													
G													
H													

[³H] E₂: [³H]-17β-estradiol

ER: estrogenski receptor

E₂: neobilježeni 17β-estradiol

19. Mikrotitracijske ploče testa treba inkubirati na temperaturi od 2 do 8 °C od 16 do 20 sati te ih tijekom razdoblja inkubacije treba staviti u rotator.

Mjerenje [³H]-17β-estradiola koji se vezao na receptore hrERα

20. [³H]-17β-estradiol koji se vezao na receptore hrERα treba odvojiti od slobodnog [³H]-17β-estradiola dodavanjem 80 μl hladne suspenzije DCC-a svakoj jažici, protresanjem mikrotitracijskih ploča deset minuta i centrifugiranjem tijekom deset minuta pri približno 2 500 o/min. Kako bi se tijekom tog procesa smanjila disocijacija vezanog [³H]-17β-estradiola s receptora hrERα, vrlo je važno da se puferi i testne jažice drže na temperaturi od 2 do 8 °C i da se svaki korak provede brzo. Potrebna je jedinica za miješanje za mikrotitracijske ploče kako bi se ploče obradile učinkovito i brzo.

21. Zatim vrlo oprezno treba uzeti 50 μ l supernatanta koji sadržava [^{3} H]-17 β -estradiol vezan na receptor hrER α kako bi se izbjegla bilo kakva kontaminacija jažica dodirivanjem DCC-a i treba ga staviti na drugu mikrotitracijsku ploču.
22. Zatim u svaku jažicu treba dodati 200 μ l scintilacijske tekućine, koja može pretvoriti kinetičku energiju nuklearnih emisija u svjetlosnu energiju (A1–B12 i D1–E12). Jažice G1–H12 (utvrđene kao ukupni dpm) predstavljaju serijska razrjeđivanja [^{3} H]-17 β -estradiola (40 μ l) koja treba izravno dodati scintilacijskoj tekućini u jažicama ploče za mjerenje, kako je navedeno u tablici 3., tj. te jažice sadržavaju samo 200 μ l scintilacijske tekućine i odgovarajuće razrjeđivanje [^{3} H]-17 β -estradiola. Te mjere pokazuju koliko je [^{3} H]-17 β -estradiola u dpm-ovima dodano svakoj skupini jažica za ukupno vezivanje i nespecifično vezivanje.

Tablica 3.: Raspored na mikrotitracijskoj ploči za test vezivanja do zasićenja, mjerenje radioaktivnosti

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [³ H] E ₂ + ER			0,06 nM [³ H] E ₂ + ER			0,08 nM [³ H] E ₂ + ER			0,10 nM [³ H] E ₂ + ER			Ukupno vezivanje (otapalo)
B	0,30 nM [³ H] E ₂ + ER			0,60 nM [³ H] E ₂ + ER			1,0 nM [³ H] E ₂ + ER			3,0 nM [³ H] E ₂ + ER			
C													
D	0,03 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,03 μM E ₂			0,06 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,06 μM E ₂			0,08 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,08 μM E ₂			0,10 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,10 μM E ₂			Nespec. vezivanje
E	0,30 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,30 μM E ₂			0,60 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,60 μM E ₂			1,0 nM [³ H] E ₂ + ER + 1,0 μM E ₂			3,0 nM [³ H] E ₂ + ER + 3,0 μM E ₂			
F													
G	0,03 nM [³ H] E ₂ (ukupno dpm)			0,06 nM [³ H] E ₂			0,08 nM [³ H] E ₂			0,10 nM [³ H] E ₂			Ukupno dpm*
H	0,30 nM [³ H] E ₂			0,60 nM [³ H] E ₂			1,0 nM [³ H] E ₂			3,0 nM [³ H] E ₂			

[^{3} H] E₂: [^{3} H]-17 β -estradiol

ER: estrogenski receptor

E₂: neobilježeni 17 β -estradiol

dpm: raspad u minuti

*Serijska razrjeđivanja radioaktivno obilježenog [^{3} H] estradiola ovdje treba izravno dodati u 200 μ l scintilacijske tekućine u jažicama G1–H12.

23. Mjerenje treba započeti s odgodom od najmanje dva sata i vrijeme brojenja treba iznositi 40 minuta po jažici. Kako bi se utvrdio dpm po jažici, treba upotrijebiti scintilacijski brojač za mikrotitracijske ploče s ispravkom za gašenje. Umjesto toga, ako nije dostupan scintilacijski brojač za mikrotitracijsku ploču, uzorci se mogu mjeriti uobičajenim brojačem. U tim uvjetima treba razmotriti smanjenje vremena brojenja.

Test konkurentskog vezivanja

24. Testom konkurentskog vezivanja mjeri se vezivanje jedne koncentracije [^3H]-17 β -estradiola u prisutnosti povećavajućih koncentracija ispitivane kemikalije. Za svaku koncentraciju unutar jednog ciklusa treba upotrijebiti tri istodobna ponovljena uzorka. Osim toga, za svaku ispitanu kemikaliju treba provesti tri istodobna ciklusa. Test treba provesti na jednoj mikrotitracijskoj ploči s 96 jažica ili više ploča.

Kontrole

25. Pri provedbi testa u svaki pokus istodobno treba uključiti otapalo i kontrole (tj. referentni estrogen, kemikaliju koja se slabo veže i kemikaliju koja se ne veže). Na jednoj ploči tijekom svakog ciklusa treba upotrijebiti cijelu krivulju koncentracija referentnog estrogena i kontrola (tj. kemikalije koja se slabo veže i koja se ne veže). Sve ostale ploče trebaju sadržavati: i. visoku (najveće istiskivanje) i srednju (približno IC_{50}) koncentraciju E2 i kemikalije koja se slabo veže u triplicatima; ii. kontrolu s otapalom i nespecifično vezivanje, najmanje u tri ponavljanja. Postupci za pripremu testnog pufera, kontrola, [^3H]-17 β -estradiola, receptora hrER α i otopina ispitivanih kemikalija opisani su u literaturi pod 2. (Prilog K, vidjeti protokol za test FW).

Kontrola s otapalom:

26. Kontrola s otapalom pokazuje da otapalo nije u interakciji s ispitnim sustavom i mjeri ukupno vezivanje (TB). Poželjno je otapalo etanol. Umjesto toga, ako najviša koncentracija ispitivane kemikalije nije topljiva u etanolu, može se upotrijebiti DMSO. Koncentracija etanola ili DMSO-a, ako se upotrebljavaju, u konačnim testnim jažicama iznosi 1,5 % i ne smije biti veća od 2 %.

Kontrola s puferom

27. Kontrola s puferom (BC) ne smije sadržavati ni otapalo ni ispitanu kemikaliju, ali treba sadržavati sve ostale sastavnice testa. Rezultati kontrole s puferom uspoređuju se s kontrolom s otapalom kako bi se potvrdilo da otapalo koje se upotrebljava ne utječe na ispitni sustav.

Kemikalija koja se jako veže (referentni estrogen)

28. Endogeni je ligand 17 β -estradiol (CAS 50-28-2) i on se veže s velikim afinitetom na estrogenski receptor podvrste alfa. Za svaki test konkurentskog vezivanja na hrER α treba pripremiti standardnu krivulju u kojoj se upotrebljava neobilježeni 17 β -estradiol kako bi se omogućila procjena varijabilnosti pri provedbi testa tijekom vremena u istom laboratoriju. Treba pripremiti osam otopina neobilježenog 17 β -estradiola u etanolu, s koncentracijama u testnim jažicama u rasponu od 100 nM do 10 pM (od $-7[\log\text{M}]$ do $-11[\log\text{M}]$), raspoređeno na sljedeći način: ($-7[\log\text{M}]$, $-8[\log\text{M}]$, $-8,5[\log\text{M}]$, $-9[\log\text{M}]$, $-9,5[\log\text{M}]$, $-10[\log\text{M}]$, $-11[\log\text{M}]$). Najviša koncentracija neobilježenog 17 β -estradiola (1 μM) služi i kao pokazatelj nespecifičnog vezivanja. Ova se koncentracija prepoznaje po oznaci „NSB” u tablici 4. iako je ona isto dio standardne krivulje.

Kemikalija koja se slabo veže

29. Treba uključiti kemikaliju koja se slabo veže (noretinodrel (CAS 68-23-5) ili noretindron (CAS 68-22-4)) kako bi se dokazala osjetljivost svakog pokusa i omogućila procjena varijabilnosti pri provedbi testa tijekom vremena. Treba pripremiti osam otopina kemikalije koja se slabo veže u etanolu, s koncentracijama u testnim jažicama u rasponu od 3 nM do 30 pM (od $-8,5[\log M]$ do $-4,5[\log M]$), raspoređeno na sljedeći način: $-4,5[\log M]$, $-5[\log M]$, $-5,5[\log M]$, $-6[\log M]$, $-6,5[\log M]$, $-7[\log M]$, $-7,5[\log M]$, $-8,5[\log M]$.

Kemikalija koja se ne veže

30. Kao negativnu kontrolu (kemikaliju koja se ne veže) treba upotrebljavati oktil-trietoksisilan (OTES, CAS 2943-75-1). Ona je jamstvo da će se načinom na koji se test provodi otkriti kada se ispitivane kemikalije ne vežu na receptor hrER α . Treba pripremiti osam otopina kemikalije koja se ne veže u etanolu, s koncentracijama u testnim jažicama u rasponu od 0,1 nM do 1 000 μM (od $-10[\log M]$ do $-3[\log M]$), u log povećanjima. Kao alternativna kontrolna kemikalija koja se ne veže može se upotrebljavati di-*n*-butil-ftalat (DBP). Pokazalo se da je njegova najveća topljivost $-4[\log M]$.

Koncentracija receptora hrER α

31. Treba upotrebljavati količinu receptora koja daje specifično vezivanje od $20 \pm 5 \%$ 1 nM radioaktivno obilježenog liganda (vidjeti stavke 12. i 13. Dodatka 2.). Otopinu receptora hrER α treba pripremiti neposredno prije upotrebe.

[3H]-17 β -estradiol

32. Koncentracija [^3H]-17 β -estradiola u testnim jažicama treba biti 1,0 nM.

Ispitivane kemikalije

33. U prvom se redu treba ispitati topljivost kako bi se utvrdila granica topljivosti za svaku ispitivanu kemikaliju i utvrdio primjereni raspon koncentracija za upotrebu u protokolu ispitivanja. Granicu topljivosti svake ispitivane kemikalije prvo treba utvrditi u otapalu i zatim potvrditi u uvjetima testa. Konačna koncentracija koja se ispituje u testu ne smije biti veća od 1 mM. Test za utvrđivanje raspona sastoji se od kontrole s otapalom i osam log-serijskih razrjeđivanja, počevši od najveće prihvatljive koncentracije (npr. 1 mM ili manje, na temelju granice topljivosti) i uočene prisutnosti zamućenja ili taloga (vidjeti i stavak 35.). Ispitivanu kemikaliju treba ispitati upotrebom krivulja s osam raspoređenih log koncentracija, kako se utvrdi u prethodnom ispitivanju za utvrđivanje raspona. Koncentracije u drugom i trećem pokusu po potrebi treba prilagoditi kako bi se bolje opisala krivulja koncentracija – odgovor.
34. Razrjeđivanja ispitivane kemikalije treba pripremiti u odgovarajućem otapalu (vidjeti stavak 26. Dodatka 2.). Ako najviša koncentracija ispitivane kemikalije nije topljiva ni u etanolu ni u DMSO-u te bi dodavanjem još otapala koncentracija otapala u konačnoj epruveti porasla iznad prihvatljivog ograničenja, najviša koncentracija može se smanjiti na

sljedeću nižu koncentraciju. U tom se slučaju može dodati dodatna koncentracija na donjem kraju niza koncentracija. Ostale koncentracije u nizu ne smiju se mijenjati.

35. Otopine ispitivane kemikalije treba pažljivo pratiti kada se dodaju u testnu jažicu jer se ispitivana kemikalija može nataložiti nakon dodavanja u testnu jažicu. Podatke za sve jažice koje sadržavaju talog treba isključiti iz prilagođavanja krivulje i treba evidentirati razlog za isključivanje podataka.
36. Ako već postoje informacije iz drugih izvora koje pokazuju $\log(\text{IC}_{50})$ ispitivane kemikalije, može biti primjereno geometrijski rasporediti razrjeđivanja (tj. polovine log jedinica oko očekivane vrijednosti $\log(\text{IC}_{50})$). Konačni rezultat treba odražavati dovoljnu raspoređenost koncentracija na obje strane $\log(\text{IC}_{50})$, uključujući „vrh” i „dno”, tako da se krivulja vezivanja može primjereno opisati.

Organizacija testne ploče

37. Označene mikrotitracijske ploče treba pripremiti razmatrajući inkubacije u šest ponavljanja sa šiframa za kontrolu s otapalom, najviše koncentracije referentnog estrogena koji služi i kao pokazatelj nespecifičnog vezivanja (NSB) i kontrole s puferom te uzimajući u obzir inkubacije u tri ponavljanja sa šiframa za svaku od osam koncentracija kontrole koja se ne veže (oktil-trietoksisilan), sedam nižih koncentracija za referentni estrogen, osam razina koncentracije kemikalije koja se slabo veže i osam koncentracija svake ispitivane kemikalije (TC). Primjer rasporeda dijagrama ploče za cijele krivulje koncentracija referentnog estrogena i kontrola naveden je u tablici 4. u nastavku. Za ispitivane kemikalije upotrebljavaju se dodatne mikrotitracijske ploče koje trebaju uključivati kontrole na ploči, tj.: 1. visoku (najveće istiskivanje) i srednju (približno IC_{50}) koncentraciju E2 i kemikalije koja se slabo veže u tri ponavljanja; 2. kontrolu s otapalom i nespecifično vezivanje u šest ponavljanja (tablica 5.). Primjer radnog lista s rasporedom na mikrotitracijskoj ploči za test konkurentskog vezivanja s tri nepoznate ispitivane kemikalije naveden je u Dodatku 2.3. Koncentracije navedene u tablicama 4. i 5. konačne su koncentracije testa. Najveća koncentracija za E2 treba iznositi $1 \times 10^{-7} \text{ M}$, a za kemikaliju koja se slabo veže treba upotrebljavati najvišu koncentraciju koja se upotrebljavala za kemikaliju koja se slabo veže na ploči 1. Laboratorij mora utvrditi koncentraciju IC_{50} na temelju svoje baze podataka o prijašnjim kontrolama. Očekuje se da će ta vrijednost biti slična vrijednosti uočenoj u validacijskim studijama (vidjeti tablicu 1.).

Tablica 4.: Raspored na mikrotitracijskoj ploči za test konkurentskog vezivanja, cijele krivulje koncentracija referentnog estrogena i kontrola (ploča 1)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (samo otapalo)			TB (samo otapalo)			NSB			NSB		
B	E2 (1×10^{-7})			E2 (1×10^{-8})			E2 ($1 \times 10^{-8.5}$)			E2 (1×10^{-9})		
C	E2 ($1 \times 10^{-9.5}$)			E2 (1×10^{-10})			E2 (1×10^{-11})			Slijepa proba*		

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	Slijepa proba (za radioakt.)**	Slijepa proba (za radioakt.)**	Kontrola s puferom	Kontrola s puferom

U ovom se primjeru kao kemikalija koja se slabo veže upotrebljava noretinodrel (NE)

* Stvarna slijepa proba, jažica se ne upotrebljava.

** Slijepa proba ne upotrebljava se tijekom inkubacije, ali se upotrebljava za potvrđivanje ukupne dodane radioaktivnosti.

Tablica 5.: Raspored na mikrotitracijskoj ploči za test konkurentskog vezivanja, cijele krivulje koncentracija ispitivane kemikalije i kontrola na ploči

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (samo otapalo)			TB (samo otapalo)			NSB			NSB		
B	TC1 (1×10^{-3})			TC1 (1×10^{-4})			TC1 (1×10^{-5})			TC1 (1×10^{-6})		
C	TC1 (1×10^{-7})			TC1 (1×10^{-8})			TC1 (1×10^{-9})			TC1 (1×10^{-10})		
D	TC2 (1×10^{-3})			TC2 (1×10^{-4})			TC2 (1×10^{-5})			TC2 (1×10^{-6})		
E	TC2 (1×10^{-7})			TC2 (1×10^{-8})			TC2 (1×10^{-9})			TC2 (1×10^{-10})		
F	TC3 (1×10^{-3})			TC3 (1×10^{-4})			TC3 (1×10^{-5})			TC3 (1×10^{-6})		
G	TC3 (1×10^{-7})			TC3 (1×10^{-8})			TC3 (1×10^{-9})			TC3 (1×10^{-10})		
H	NE (IC ₅₀)			NE ($1 \times 10^{-4,5}$)			E2 (IC ₅₀)			E2 (1×10^{-7})		

U ovom se primjeru kao kemikalija koja se slabo veže upotrebljava noretinodrel (NE)

Dovršetak testa konkurentskog vezivanja

38. Kako je prikazano u tablici 6., u jažice treba dodati 80 µl kontrole s otapalom, kontrole s puferom, referentnog estrogena, kemikalije koja se slabo veže, kemikalije koja se ne veže i ispitivanih kemikalija pripremljenih u testnom puferu. Zatim u svaku jažicu treba dodati 40 µl otopine 4 nM [3H]-17β-estradiola. Nakon lagane rotacije od 10 do 15 minuta na temperaturi od 2 do 8 °C, treba dodati 40 µl otopine receptora hrERα. Mikrotitracijske ploče testa treba inkubirati na temperaturi od 2 do 8 °C od 16 do 20 sati te ih tijekom razdoblja inkubacije treba staviti u rotator.

Tablica 6.: Volumen sastavnica testa za test konkurentskog vezivanja na hrER, mikrotitracijske ploče

Volumen (µl)	Sastojak
80	Neobilježeni 17β-estradiol, noretinodrel, OTES, ispitivane kemikalije, otapalo ili pufer

40	otopina 4 nM [³ H]-17β-estradiola
40	otopina hrERα, koncentracija kako je utvrđena
160	<i>Ukupni volumen u svakoj testnoj jažici</i>

39. Zatim treba kvantificirati [³H]-17β-estradiol vezan na receptore hrERα, nakon odvajanja [³H]-17β-estradiola vezanog na receptore hrERα od slobodnog [³H]-17β-estradiola dodavanjem 80 μl suspenzije hladnog DCC-a u svaku jažicu, kako je opisano u stavcima od 20. do 23. za test vezivanja do zasićenja.
40. Jažice H1–6 (utvrđene kao slijepe probe (za radioaktivnost) u tablici 4.) predstavljaju dpm radioaktivno obilježenog [³H] estradiola u 40 μl. Alikvot od 40 μl treba izravno dodati scintilacijskoj tekućini u jažicama H1–H6.

Kriteriji prihvatljivosti

Test vezivanja do zasićenja

41. Krivulja specifičnog vezivanja treba dosegnuti plato kako se upotrebljavaju povećavajuće koncentracije [³H]-17β-estradiola, što ukazuje na zasićenje receptora hrERα ligandom.
42. Specifično vezivanje pri 1 nM [³H]-17β-estradiola treba biti unutar prihvatljivog raspona od 15 % do 25 % prosječne izmjerene ukupne radioaktivnosti dodane u svim ciklusima. Prihvatljiva su povremena manja odstupanja od tog raspona, ali ako su ciklusi dosljedno izvan tog raspona ili je određeni ciklus znatno izvan tog raspona, koncentraciju proteina treba prilagoditi i treba ponoviti test zasićenja.
43. Iz podataka bi trebala nastati linearna Scatchardova krivulja.
44. Nespecifično vezivanje ne bi trebalo biti preveliko. Vrijednost za nespecifično vezivanje obično bi trebala biti < 35 % ukupnog vezivanja. Međutim, omjer povremeno može biti veći od tog ograničenja kada se mjeri vrlo niski dpm za najniže koncentracije ispitanog radioaktivno obilježenog 17β-estradiola.

Test konkurentskog vezivanja

45. Povećavanjem koncentracija neobilježenog 17β-estradiola trebao bi se istisnuti [³H]-17β-estradiol s receptora na način koji je dosljedan konkurentskom vezivanju na jedno mjesto.
46. Vrijednost IC₅₀ za referentni estrogen (tj. 17β-estradiol) treba biti približno jednaka molarnoj koncentraciji [³H]-17β-estradiola uvećanoj za K_d utvrđen u testu vezivanja do zasićenja.
47. Ukupno specifično vezivanje dosljedno bi trebalo biti unutar prihvatljivog raspona od 20 ± 5 % ako je prosječna izmjerena koncentracija ukupne radioaktivnosti dodane svakoj jažici iznosila 1 nM u svim ciklusima. Prihvatljiva su povremena manja odstupanja od tog

raspona, ali ako su ciklusi dosljedno izvan tog raspona ili je određeni ciklus znatno izvan tog raspona, koncentraciju proteina treba prilagoditi.

48. Otapalo ne bi smjelo promijeniti osjetljivost ili obnovljivost testa. Rezultati kontrole s otapalom (jažice TB) uspoređuju se s kontrolom s puferom kako bi se potvrdilo da otapalo koje se upotrebljava ne utječe na ispitni sustav. Ako otapalo ne utječe na test, rezultati TB-a i kontrole s puferom trebaju biti usporedivi.
49. Kemikalija koje se ne veže ne bi trebala istisnuti više od 25 % [^3H]-17 β -estradiola s receptora hrER α ako se ispituje do 10^{-3} M (OTES) ili 10^{-4} M (DBP).
50. Kriteriji uspješnosti razvijeni su za referentni estrogen i dvije kemikalije koje se slabo vežu (npr. noretinodrel, noretindron) upotrebom podataka iz validacijske studije FW testa vezivanja na hrER (Prilog N literaturi pod 2.). Intervali pouzdanosti od 95 % navode se za srednju vrijednost (n) $\pm$ standardnu devijaciju za sve kontrolne cikluse u svim laboratorijima koji sudjeluju u validacijskoj studiji. Intervali pouzdanosti od 95 % izračunani su za parametre prilagođene krivulje (tj. vrh, dno, Hillov nagib, logIC $_{50}$) za referentni estrogen i kemikalije koje se slabo vežu te za log $_{10}$ RBA kemikalija koje se slabo vežu u odnosu na referentni estrogen te se navode kao kriteriji uspješnosti za pozitivne kontrole. U tablici 1. navedeni su očekivani rasponi za parametre prilagođene krivulje koji se mogu upotrebljavati kao kriteriji uspješnosti. U praksi se raspon vrijednosti IC $_{50}$ može neznatno razlikovati ovisno o vrijednosti Kd pripravka receptora i koncentraciji liganda.
51. Za parametre prilagođene krivulje za ispitivane kemikalije nisu razvijeni kriteriji uspješnosti zbog velikog raspona postojećih potencijalnih ispitivanih kemikalija i varijacije u mogućim afinitetima i ishodima (npr. cijela krivulja, djelomična krivulja, bez prilagođavanja krivulje). Međutim, pri pregledu rezultata iz svakog ciklusa za ispitivanu kemikaliju treba primijeniti stručnu prosudbu. Treba upotrijebiti dovoljan raspon koncentracija ispitivane kemikalije kako bi se jasno utvrdio vrh (npr. od 90 do 100 % vezivanja) konkurentne krivulje. Varijabilnost među ponavljanjima pri svakoj koncentraciji ispitivane kemikalije te među tri neistodobna ciklusa treba biti razumna i znanstveno opravdana. Kontrole iz svakog ciklusa za ispitivanu kemikaliju trebale bi se približiti mjerama uspješnosti koje su navedene za ovaj FW test i biti dosljedne prijašnjim podacima o kontrolama iz svakog odgovarajućeg laboratorija.

ANALIZA PODATAKA

Test vezivanja do zasićenja

52. Mjere se i ukupno i nespecifično vezivanje. Iz tih se vrijednosti računa specifično vezivanje povećavajućih koncentracija [^3H]-17 β -estradiola u uvjetima ravnoteže tako da se nespecifično vezivanje oduzme od ukupnoga. Grafikon specifičnog vezivanja u odnosu na koncentraciju [^3H]-17 β -estradiola treba dosegnuti plato za najveće specifično vezivanje koje ukazuje na zasićenje receptora hrER α [^3H]-17 β -estradiolom. Osim toga, analizom

podataka treba evidentirati vezivanje [^3H]-17 β -estradiola na jedno vezno mjesto s velikim afinitetom. Nespecifično, ukupno i specifično vezivanje treba prikazati na krivulji vezivanja do zasićenja. Za daljnju analizu tih podataka treba upotrijebiti nelinearnu regresijsku analizu (npr. BioSoft; McPherson, 1985.; Motulsky, 1995.), s konačnim prikazom podataka u obliku Scatchardove krivulje.

53. Analizom podataka treba utvrditi Bmax i Kd samo iz podataka o ukupnom vezivanju upotrebom pretpostavke da je nespecifično vezivanje linearno, osim ako se obrazloži upotreba druge metode. Osim toga, pri utvrđivanju najbolje prilagodbe treba upotrijebiti temeljitu regresiju osim ako se obrazloži drugačiji odabir. Treba navesti metodu odabranu za temeljitu regresiju. Kod utvrđivanja vrijednosti Bmax i Kd iz podataka o vezivanju do zasićenja uvijek treba primijeniti ispravak potrošnje liganada (npr. upotrebom Swillensove metode iz 1995.).

Test konkurentskog vezivanja

54. Krivulja konkurentskog vezivanja grafički se prikazuje kao specifično vezivanje [^3H]-17 β -estradiola u odnosu na koncentraciju (log10 jedinice) konkurenta. Koncentracija ispitivane kemikalije koja inhibira 50 % najvećeg specifičnog vezivanja [^3H]-17 β -estradiola čini vrijednost IC₅₀.
55. Procjene za vrijednosti log(IC₅₀) za pozitivne kontrole (npr. referentni estrogen i kemikalija koja se slabo veže) treba utvrditi upotrebom primjerenog softvera za nelinearno prilagođavanje krivulje kako bi se prilagodila Hillova jednadžba s četiri parametra (npr. BioSoft; McPherson, 1985.; Motulsky, 1995.). Vrh, dno, nagib i log(IC₅₀) obično ne bi trebalo ograničavati pri prilagođavanju tih krivulja. Pri utvrđivanju najbolje prilagodbe treba upotrijebiti temeljitu regresiju osim ako se obrazloži drugačiji odabir. Ne treba primijeniti ispravak potrošnje liganada. Nakon početne analize svaku krivulju vezivanja treba pregledati kako bi se osigurala odgovarajuća prilagodba modelu. Relativni afinitet vezivanja (RBA) za kemikaliju koja se slabo veže treba izračunati kao postotak log (IC₅₀) za kemikaliju koja se slabo veže u odnosu na log (IC₅₀) za 17 β -estradiol. Rezultate iz pozitivnih kontrola i kontrola s kemikalijama koje se ne vežu treba procijeniti upotrebom mjera uspješnosti testa iz stavaka od 45. do 50. u ovom Dodatku 2.
56. Podatke za sve ispitivane kemikalije treba analizirati upotrebom stupnjevitog pristupa kako bi se osiguralo da su podaci primjereno analizirani i da je svaka krivulja konkurentskog vezivanja pravilno razvrstana. Preporučuje se da se svaki ciklus za ispitivanu kemikaliju prvo podvrgne standardiziranoj analizi podataka koja je identična analizi upotrijebljenoj za referentni estrogen i kontrolne kemikalije koje se slabo vežu (vidjeti prethodni stavak 55.). Kada se to dovrši, treba izvršiti tehnički pregled parametara prilagođene krivulje i vizualni pregled mjere u kojoj podaci odgovaraju izrađenoj krivulji konkurentskog vezivanja za svaki ciklus. Tijekom tog tehničkog pregleda dobar pokazatelj toga da su test i analiza podataka pravilno provedeni uključuju opažanje smanjenja postotka specifično vezanog [^3H]-17 β -estradiola koje ovisi o koncentraciji, malu varijabilnost među tehničkim

ponavljanjima pri svakoj koncentraciji kemikalije i dosljednost u parametrima prilagodbe među tri ciklusa.

Tumačenje podataka

57. Pod uvjetom da su ispunjeni svi kriteriji prihvatljivosti, ispitivana kemikalija smatra se kemikalijom koja se veže na receptor hrER α ako se krivulja vezivanja može prilagoditi, a najniža točka na krivulji odgovora u rasponu podataka manja je od 50 % (slika 1.).

58. Pod uvjetom da su ispunjeni svi kriteriji prihvatljivosti, ispitivana kemikalija smatra se kemikalijom koja se ne veže na receptor hrER α :

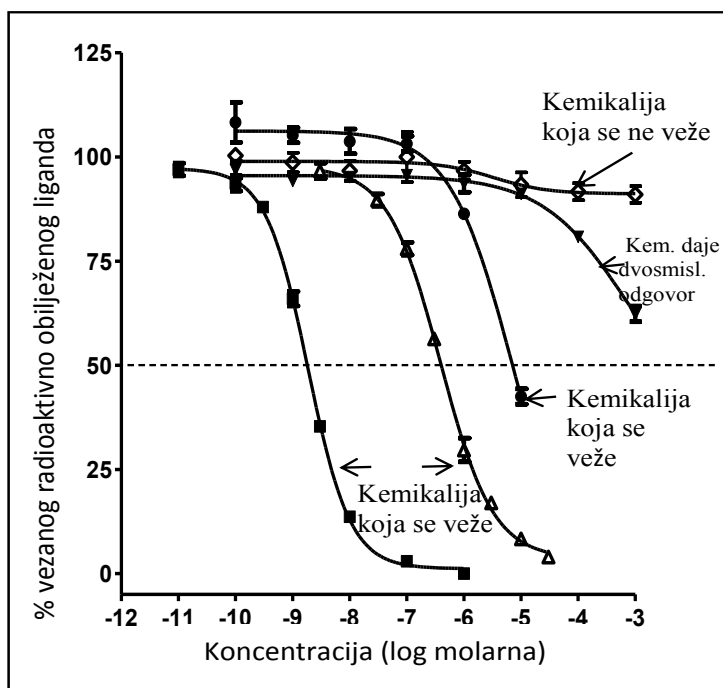
- ako se krivulja vezivanja može prilagoditi i ako je najniža točka na prilagođenoj krivulji odgovora u rasponu podataka veća od 75 %, ili
- ako se krivulja vezivanja ne može prilagoditi i ako je najniži neizgladeni prosječni postotak vezivanja među skupinama koncentracija u podacima veći od 75 %.

59. Smatra se da ispitivane kemikalije daju dvosmislen odgovor ako se ne ispuni nijedan od prethodno navedenih uvjeta (npr. najniža točka na prilagođenoj krivulji odgovora nalazi se između 76 i 51 %).

Tablica 7.: Kriteriji za dodjelu razvrstavanja na temelju krivulje konkurentskog vezivanja za ispitivanu kemikaliju

Razvrstavanje	Kriteriji
Kemikalija koja se veže ^a	Može se prilagoditi krivulja vezivanja. Najniža točka na krivulji odgovora u rasponu podataka manja je od 50 %.
Kemikalija koja se ne veže ^b	Ako se krivulja vezivanja može prilagoditi, najniža točka na prilagođenoj krivulji odgovora u rasponu podataka veća je od 75 %. Ako se krivulja vezivanja ne može prilagoditi, najniži neizgladeni prosječni postotak vezivanja među skupinama koncentracija u podacima veći je od 75 %.
Daje dvosmislen odgovor ^c	Bilo koji ciklus koji se može ispitati, a nije ni kemikalija koja se veže ni koja se ne veže (npr. najniža točka na prilagođenoj krivulji odgovora nalazi se između 76 i 51 %).

Slika 1.: Primjeri razvrstavanja ispitivanih kemikalija upotrebom krivulje konkurentskog vezivanja



60. Višestruki ciklusi koji se provedu u laboratoriju za ispitivanu kemikaliju kombiniraju se dodjeljivanjem numeričkih vrijednosti svakom ciklusu i određivanjem prosjeka svih ciklusa kako je prikazano u tablici 8. Rezultati za kombinirane cikluse u svakom laboratoriju uspoređuju se s očekivanim razvrstavanjem za svaku ispitivanu kemikaliju.

Tablica 8.: Metoda za razvrstavanje ispitivane kemikalije upotrebom višestrukih ciklusa unutar laboratorija

Za dodjelu vrijednosti svakom ciklusu:	
Razvrstavanje	Brojčana vrijednost
Kemikalija koja se veže	2
Daje dvosmislen odgovor	1
Kemikalija koja se ne veže	0
Za razvrstavanje prosječne brojčane vrijednosti u svim ciklusima:	
Razvrstavanje	Brojčana vrijednost
Kemikalija koja se veže	Prosječno $\geq 1,5$
Daje dvosmislen odgovor	$0,5 \leq \text{prosječno} < 1,5$
Kemikalija koja se ne veže	Prosječno $< 0,5$

IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

61. Vidjeti stavak 24. u odjeljku „SASTAVNICE TESTA VEZIVANJA NA hrER” ove ispitne metode.

Dodatak 2.1.

POPIS TERMINA

[³H]E2: 17 β -estradiol radioaktivno obilježen tricijem.

DCC: ugljen premazan dekstranom.

E2: neobilježeni 17 β -estradiol (inertni).

Testni pufer: 10 mM trisa, 10 mg/ml goveđeg serumskog albumina, 2 mM DTT-a, 10-postotnoga glicerola, 0,2 mM leupeptina, pH-vrijednost od 7,5.

hrER α : ljudski rekombinantni estrogenski receptor alfa (domena vezivanja liganda).

Ponavljanje: jedna od više jažica s istim sadržajem u istoj koncentraciji koje se ispituju istodobno u istom ciklusu. U ovom se protokolu svaka koncentracija ispitivane kemikalije ispituje u tri ponavljanja; drugim riječima, tri se ponavljanja ispituju istovremeno pri svakoj koncentraciji ispitivane kemikalije.

Ciklus: cijeli skup jažica s istodobno provedenim testovima na mikrotitracijskoj ploči koji daje sve informacije potrebne za opis vezivanja ispitivane kemikalije na receptor hrER α (odnosno ukupni [³H]-17 β -estradiol dodan testnoj jažici, najveće vezivanje [³H]-17 β -estradiola na receptore hrER α , nespecifično vezivanje i ukupno vezivanje pri različitim koncentracijama ispitivane kemikalije). Ciklus se može sastojati od samo jedne testne jažice (tj. ponovljeni uzorak) po koncentraciji, ali zbog toga što se ovim protokolom zahtijeva ispitivanje u tri ponavljanja, jedan se ciklus sastoji od tri testne jažice po koncentraciji. Osim toga, ovim se protokolom zahtijevaju tri neovisna (tj. neistodobna) ciklusa po kemikaliji.

Dodatak 2.2.

UOBIČAJENI TEST ZASIĆENJA S $[^3\text{H}]$ -17 β -ESTRADIOLOM S TRI JAŽICE S PONAVLJANJEM

Uobičajeni test zasićenja s $[^3\text{H}]$ -17 β -estradiolom s tri jažice s ponavljanjem											
Položaj	Ponavljanje	Šifra vrste jažice	Početna koncentracija radioaktivno obilježenog E2 (nM)	Volumen radioaktivno obilježenog E2 (μl)	Konačna koncentracija radioaktivno obilježenog E2 (nM)	Početna koncentracija neobilježenog E2 (μM)	Volumen neobilježenog E2 (μl)	Konačna koncentracija neobilježenog E2 (μM)	Volumen pufera (μl)	Volumen receptora (μl)	Ukupni volumen u jažicama
A1	1	H	0,12	40	0,03	–	–	–	80	40	160
A2	2	H	0,12	40	0,03	–	–	–	80	40	160
A3	3	H	0,12	40	0,03	–	–	–	80	40	160
A4	1	H	0,24	40	0,06	–	–	–	80	40	160
A5	2	H	0,24	40	0,06	–	–	–	80	40	160
A6	3	H	0,24	40	0,06	–	–	–	80	40	160
A7	1	H	0,32	40	0,08	–	–	–	80	40	160
A8	2	H	0,32	40	0,08	–	–	–	80	40	160
A9	3	H	0,32	40	0,08	–	–	–	80	40	160
A10	1	H	0,40	40	0,10	–	–	–	80	40	160
A11	2	H	0,40	40	0,10	–	–	–	80	40	160
A12	3	H	0,40	40	0,10	–	–	–	80	40	160
B1	1	H	1,20	40	0,30	–	–	–	80	40	160
B2	2	H	1,20	40	0,30	–	–	–	80	40	160
B3	3	H	1,20	40	0,30	–	–	–	80	40	160
B4	1	H	2,40	40	0,60	–	–	–	80	40	160
B5	2	H	2,40	40	0,60	–	–	–	80	40	160
B6	3	H	2,40	40	0,60	–	–	–	80	40	160
B7	1	H	4,00	40	1,00	–	–	–	80	40	160
B8	2	H	4,00	40	1,00	–	–	–	80	40	160
B9	3	H	4,00	40	1,00	–	–	–	80	40	160
B10	1	H	12,00	40	3,00	–	–	–	80	40	160
B11	2	H	12,00	40	3,00	–	–	–	80	40	160
B12	3	H	12,00	40	3,00	–	–	–	80	40	160
D1	1	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	–	40	160
D2	2	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	–	40	160
D3	3	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	–	40	160
D4	1	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	–	40	160
D5	2	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	–	40	160
D6	3	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	–	40	160
D7	1	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	–	40	160
D8	2	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	–	40	160
D9	3	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	–	40	160
D10	1	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	–	40	160
D11	2	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	–	40	160

D12	3	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	–	40	160

Uobičajeni test zasićenja s [3H]-17β-estradiolom s tri jažice s ponavljanjem											
Položaj	Ponavljanje	Šifra vrste jažice	Početna konc. rad. obilježenog E2 (nM)	Volumen rad. obilježenog E2 (μl)	Konačna koncentracija radioaktivno obilježenog E2 (nM)	Početna koncentracija neobilježenog E2 (μM)	Volumen neobilježenog E2 (μl)	Konačna koncentracija neobilježenog E2 (μM)	Volumen pufera (μl)	Volumen receptora (μl)	Ukupni volumen u jažicama
E1	1	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	–	40	160
E2	2	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	–	40	160
E3	3	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	–	40	160
E4	1	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	–	40	160
E5	2	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	–	40	160
E6	3	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	–	40	160
E7	1	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	–	40	160
E8	2	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	–	40	160
E9	3	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	–	40	160
E10	1	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	–	40	160
E11	2	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	–	40	160
E12	3	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	–	40	160
G1	1	radioakt.	0,12	40	0,03	–	–	–	–	–	40
G2	2	radioakt.	0,12	40	0,03	–	–	–	–	–	40
G3	3	radioakt.	0,12	40	0,03	–	–	–	–	–	40
G4	1	radioakt.	0,24	40	0,06	–	–	–	–	–	40
G5	2	radioakt.	0,24	40	0,06	–	–	–	–	–	40
G6	3	radioakt.	0,24	40	0,06	–	–	–	–	–	40
G7	1	radioakt.	0,32	40	0,08	–	–	–	–	–	40
G8	2	radioakt.	0,32	40	0,08	–	–	–	–	–	40
G9	3	radioakt.	0,32	40	0,08	–	–	–	–	–	40
G10	1	radioakt.	0,40	40	0,10	–	–	–	–	–	40
G11	2	radioakt.	0,40	40	0,10	–	–	–	–	–	40
G12	3	radioakt.	0,40	40	0,10	–	–	–	–	–	40
H1	1	radioakt.	1,20	40	0,30	–	–	–	–	–	40
H2	2	radioakt.	1,20	40	0,30	–	–	–	–	–	40
H3	3	radioakt.	1,20	40	0,30	–	–	–	–	–	40
H4	1	radioakt.	2,40	40	0,60	–	–	–	–	–	40
H5	2	radioakt.	2,40	40	0,60	–	–	–	–	–	40
H6	3	radioakt.	2,40	40	0,60	–	–	–	–	–	40
H7	1	radioakt.	4,00	40	1,00	–	–	–	–	–	40
H8	2	radioakt.	4,00	40	1,00	–	–	–	–	–	40
H9	3	radioakt.	4,00	40	1,00	–	–	–	–	–	40
H10	1	radioakt.	12,00	40	3,00	–	–	–	–	–	40
H11	2	radioakt.	12,00	40	3,00	–	–	–	–	–	40
H12	3	radioakt.	12,00	40	3,00	–	–	–	–	–	40

Napominje se da su „radioaktivne” jažice prazne tijekom inkubacije. Dodaje se 40 μl samo za brojenje scintilacijom.

Dodatak 2.3.: Raspored jažica za test konkurentskog vezivanja

Ploča	Položaj	Ponavljanje	Vrsta jažice	Šifra jažice	Šifra koncentracije	Početna koncentracija konkurenta (M)	Glavni hrER (μl)	Vol. pufera (μl)	Vol. obilježivača (rad. obilj. E2) (μl)	Volumen s ploče za razrjeđivanje (μl)	Konačni volumen (μl)	Konačna koncentracija konkurenta (M)
S	A1	1	ukupno vezivanje	TB	TB1	–	40		40	80	160	–
S	A2	2	ukupno vezivanje	TB	TB2	–	40		40	80	160	–
S	A3	3	ukupno vezivanje	TB	TB3	–	40		40	80	160	–
S	A4	1	ukupno vezivanje	TB	TB4	–	40		40	80	160	–
S	A5	2	ukupno vezivanje	TB	TB5	–	40		40	80	160	–
S	A6	3	ukupno vezivanje	TB	TB6	–	40		40	80	160	–
S	A7	1	neobilježeni E2	NSB	S0	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
S	A8	2	neobilježeni E2	NSB	S0	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
S	A9	3	neobilježeni E2	NSB	S0	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
S	A10	1	neobilježeni E2	NSB	S0	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
S	A11	2	neobilježeni E2	NSB	S0	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
S	A12	3	neobilježeni E2	NSB	S0	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
S	B1	1	neobilježeni E2	S	S1	2,00E-07	40	–	40	80	160	1,0E-07
S	B2	2	neobilježeni E2	S	S1	2,00E-07	40	–	40	80	160	1,0E-07
S	B3	3	neobilježeni E2	S	S1	2,00E-07	40	–	40	80	160	1,0E-07
S	B4	1	neobilježeni E2	S	S2	2,00E-08	40	–	40	80	160	1,0E-08
S	B5	2	neobilježeni E2	S	S2	2,00E-08	40	–	40	80	160	1,0E-08
S	B6	3	neobilježeni E2	S	S2	2,00E-08	40	–	40	80	160	1,0E-08
S	B7	1	neobilježeni E2	S	S3	6,00E-09	40	–	40	80	160	3,0E-09
S	B8	2	neobilježeni E2	S	S3	6,00E-09	40	–	40	80	160	3,0E-09
S	B9	3	neobilježeni E2	S	S3	6,00E-09	40	–	40	80	160	3,0E-09
S	B10	1	neobilježeni E2	S	S4	2,00E-09	40	–	40	80	160	1,0E-09
S	B11	2	neobilježeni E2	S	S4	2,00E-09	40	–	40	80	160	1,0E-09
S	B12	3	neobilježeni E2	S	S4	2,00E-09	40	–	40	80	160	1,0E-09
S	C1	1	neobilježeni E2	S	S5	6,00E-10	40	–	40	80	160	3,0E-10
S	C2	2	neobilježeni E2	S	S5	6,00E-10	40	–	40	80	160	3,0E-10
S	C3	3	neobilježeni E2	S	S5	6,00E-10	40	–	40	80	160	3,0E-10
S	C4	1	neobilježeni E2	S	S6	2,00E-10	40	–	40	80	160	1,0E-10
S	C5	2	neobilježeni E2	S	S6	2,00E-10	40	–	40	80	160	1,0E-10
S	C6	3	neobilježeni E2	S	S6	2,00E-10	40	–	40	80	160	1,0E-10
S	C7	1	neobilježeni E2	S	S7	2,00E-11	40	–	40	80	160	1,0E-11
S	C8	2	neobilježeni E2	S	S7	2,00E-11	40	–	40	80	160	1,0E-11
S	C9	3	neobilježeni E2	S	S7	2,00E-11	40	–	40	80	160	1,0E-11
S	C10	1	slijepa proba	slijepa	B1	–	–	160	–	–	160	–
S	C11	2	slijepa proba	slijepa	B2	–	–	160	–	–	160	–
S	C12	3	slijepa proba	slijepa	B3	–	–	160	–	–	160	–
S	D1	1	noretinodrel	NE	WP1	6,00E-05	40	–	40	80	160	3,0E-05
S	D2	1	noretinodrel	NE	WP1	6,00E-05	40	–	40	80	160	3,0E-05
S	D3	1	noretinodrel	NE	WP1	6,00E-05	40	–	40	80	160	3,0E-05
S	D4	1	noretinodrel	NE	WP2	2,00E-05	40	–	40	80	160	1,0E-05
S	D5	1	noretinodrel	NE	WP2	2,00E-05	40	–	40	80	160	1,0E-05
S	D6	1	noretinodrel	NE	WP2	2,00E-05	40	–	40	80	160	1,0E-05
S	D7	1	noretinodrel	NE	WP3	6,00E-06	40	–	40	80	160	3,0E-06
S	D8	1	noretinodrel	NE	WP3	6,00E-06	40	–	40	80	160	3,0E-06
S	D9	1	noretinodrel	NE	WP3	6,00E-06	40	–	40	80	160	3,0E-06
S	D10	1	noretinodrel	NE	WP4	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
S	D11	1	noretinodrel	NE	WP4	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
S	D12	1	noretinodrel	NE	WP4	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06

Raspored jažica za test konkurentskog vezivanja												
Ploča	Položaj	Ponavljanje	Vrsta jažice	Šifra jažice	Šifra koncentracije	Početna koncentracija konkurenta (M)	Glavni hr-ER (μl)	Vol. pufera (μl)	Vol. obilježivača (rad. obilj. E2) (μl)	Volumen s ploče za razrjeđivanje (μl)	Konačni volumen (μl)	Konačna koncentracija konkurenta (M)
S	E1	1	noretinodrel	NE	WP	6,00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E2	2	noretinodrel	NE	WP	6,00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E3	3	noretinodrel	NE	WP	6,00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E4	1	noretinodrel	NE	WP	2,00E-07-	40		40	80	160	1,0E-07
S	E5	2	noretinodrel	NE	WP	2,00E-07-	40		40	80	160	1,0E-07
S	E6	3	noretinodrel	NE	WP	2,00E-07-	40		40	80	160	1,0E-07
S	E7	1	noretinodrel	NE	WP	6,00E-08	40	–	40	80	160	3,0E-08
S	E8	2	noretinodrel	NE	WP	6,00E-08	40	–	40	80	160	3,0E-08
S	E9	3	noretinodrel	NE	WP	6,00E-08	40	–	40	80	160	3,0E-08
S	E10	1	noretinodrel	NE	WP	6,00E-09	40	–	40	80	160	3,0E-09
S	E11	2	noretinodrel	NE	WP	6,00E-09	40	–	40	80	160	3,0E-09
S	E12	3	noretinodrel	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	radioakt.	H	H	–	–	–	40	–	40	–
S	H2	1	radioakt.	H	H	–	–	–	40	–	40	–
S	H3	1	radioakt.	H	H	–	–	–	40	–	40	–
S	H4	1	radioakt.	H	H	–	–	–	40	–	40	–
S	H5	1	radioakt.	H	H	–	–	–	40	–	40	–
S	H6	1	radioakt.	H	H	–	–	–	40	–	40	–
S	H7	1	kontrola s puferom	BC	BC	–	40	80	40	–	160	–
S	H8	1	kontrola s puferom	BC	BC	–	40	80	40	–	160	–
S	H9	1	kontrola s puferom	BC	BC	–	40	80	40	–	160	–
S	H10	1	kontrola s puferom	BC	BC	–	40	80	40	–	160	–
S	H11	1	kontrola s puferom	BC	BC	–	40	80	40	–	160	–
S	H12	1	kontrola s puferom	BC	BC	–	40	80	40	–	160	–

Napominje se da su „radioaktivne” jažice prazne tijekom inkubacije. Dodaje se 40 μl samo za brojenje scintilacijom.

Raspored jažica za test konkurentskog vezivanja												
Ploča	Položaj	Ponavljanje	Vrsta jažice	Šifra jažice	Šifra koncentracije	Početna konc. konkurenta (M)	Glavni hrER (μl)	Vol. pufera (μl)	Vol. obilj. (rad. obilj. E2) (μl)	Vol. s ploče za razrj. (μl)	Konačni volumen (μl)	Konačna koncentracija konkurenta (M)
P1	A1	1	ukupno vezivanje	TB	TBB1B1	–	40	–	40	80	160	–
P1	A2	2	ukupno vezivanje	TB	TB2	–	40	–	40	80	160	–
P1	A3	3	ukupno vezivanje	TB	TB3	–	40	–	40	80	160	–
P1	A4	1	ukupno vezivanje	TB	TB4	–	40	–	40	80	160	–
P1	A5	2	ukupno vezivanje	TB	TB5	–	40	–	40	80	160	–
P1	A6	3	ukupno vezivanje	TB	TB6	–	40	–	40	80	160	–
P1	A7	1	neobilježeni E2	NSB	S0	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
P1	A8	2	neobilježeni E2	NSB	S0	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
P1	A9	3	neobilježeni E2	NSB	S0	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
P1	A10	1	neobilježeni E2	NSB	S0	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
P1	A11	2	neobilježeni E2	NSB	S0	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
P1	A12	3	neobilježeni E2	NSB	S0	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
P1	B1	1	ispit. kemikalija 1	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B2	2	ispit. kemikalija 1	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B3	3	ispit. kemikalija 1	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B4	1	ispit. kemikalija 1	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B5	2	ispit. kemikalija 1	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B6	3	ispit. kemikalija 1	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B7	1	ispit. kemikalija 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B8	2	ispit. kemikalija 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B9	3	ispit. kemikalija 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B10	1	ispit. kemikalija 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	B11	2	ispit. kemikalija 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	B12	3	ispit. kemikalija 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	C1	1	ispit. kemikalija 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C2	2	ispit. kemikalija 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C3	3	ispit. kemikalija 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C4	1	ispit. kemikalija 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C5	2	ispit. kemikalija 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C6	3	ispit. kemikalija 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C7	1	ispit. kemikalija 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C8	2	ispit. kemikalija 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C9	3	ispit. kemikalija 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C10	1	ispit. kemikalija 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	C11	2	ispit. kemikalija 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	C12	3	ispit. kemikalija 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	D1	1	ispit. kemikalija 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D2	2	ispit. kemikalija 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D3	3	ispit. kemikalija 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D4	1	ispit. kemikalija 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D5	2	ispit. kemikalija 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D6	3	ispit. kemikalija 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D7	1	ispit. kemikalija 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D8	2	ispit. kemikalija 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D9	3	ispit. kemikalija 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D10	1	ispit. kemikalija 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	D11	2	ispit. kemikalija 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	D12	3	ispit. kemikalija 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	E1	1	ispit. kemikalija 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E2	2	ispit. kemikalija 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E3	3	ispit. kemikalija 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07

Raspored jažica za test konkurentskog vezivanja

Ploča	Položaj	Ponavljjanje	Vrsta jažice	Šifra jažice	Šifra koncentracije	Početna koncentracija konkurenta (M)	Glavni hrER (μl)	Vol. pufera (μl)	Vol. Obilj. (rad. obilj. E2) (μl)	Vol. s ploče za razrj. (μl)	Konačni volumen (μl)	Konačna koncentracija konkurenta (M)
P1	E4	1	ispit. kemikalija 2	TC2	6	–	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E5	2	ispit. kemikalija 2	TC2	6	–	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E6	3	ispit. kemikalija 2	TC2	6	–	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E7	1	ispit. kemikalija 2	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E8	2	ispit. kemikalija 2	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E9	3	ispit. kemikalija 2	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E10	1	ispit. kemikalija 2	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	E11	2	ispit. kemikalija 2	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	E12	3	ispit. kemikalija 2	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	F1	1	ispit. kemikalija 3	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F2	2	ispit. kemikalija 3	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F3	3	ispit. kemikalija 3	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F4	1	ispit. kemikalija 3	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F5	2	ispit. kemikalija 3	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F6	3	ispit. kemikalija 3	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F7	1	ispit. kemikalija 3	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F8	2	ispit. kemikalija 3	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F9	3	ispit. kemikalija 3	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F10	1	ispit. kemikalija 3	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	F11	2	ispit. kemikalija 3	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	F12	3	ispit. kemikalija 3	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	G1	1	ispit. kemikalija 3	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G2	2	ispit. kemikalija 3	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G3	3	ispit. kemikalija 3	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G4	1	ispit. kemikalija 3	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G5	2	ispit. kemikalija 3	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G6	3	ispit. kemikalija 3	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G7	1	ispit. kemikalija 3	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G8	2	ispit. kemikalija 3	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G9	3	ispit. kemikalija 3	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G10	1	ispit. kemikalija 3	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	G11	2	ispit. kemikalija 3	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	G12	3	ispit. kemikalija 3	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	H1	1	noretinodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H2	2	noretinodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H3	3	noretinodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H4	1	noretinodrel	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H5	2	noretinodrel	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H6	3	noretinodrel	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H7	1	neobilježeni E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H8	2	neobilježeni E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H9	3	neobilježeni E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H10	1	neobilježeni E2 S			1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H11	2	neobilježeni E2 S			1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H12	3	neobilježeni E2 S			1,00E-7	40	0	40	80	160	

Dodatak 3.

IN VITRO TEST VEZIVANJA NA ESTROGENSKI RECEPTOR UPOTREBOM LJUDSKOG REKOMBINANTNOG PROTEINA DOMENE VEZIVANJA LIGANDA RECEPTORA ERA KOJI JE RAZVIO CERi (INSTITUT ZA PROCJENU I ISTRAŽIVANJE KEMIČALIJA)

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA (VIDJETI I OPĆI UVOD)

1. U ovom *in vitro* testu vezivanja na estrogenski receptor (ER α) do zasićenja i konkurentskog vezivanja upotrebljava se domena vezivanja liganda (LBD) ljudskog receptora ER α (hrER α). Taj konstrukt proteina proizveo je CERi (institut za procjenu i istraživanje kemikalija) iz Japana te on postoji kao fuzijski protein glutation S-transferaza (GST) i eksprimira se u bakteriji *E. coli*. CERi-jev protokol podvrgnut je međunarodnoj validacijskoj studiji u više laboratorija (2.) koja je pokazala njegovu relevantnost i pouzdanost za predviđenu svrhu testa.
2. Ovaj je test postupak probira za utvrđivanje tvari koje se mogu vezati na receptor hrER α . Upotrebljava se za utvrđivanje sposobnosti ispitivanih kemikalija da se natječu sa 17 β -estradiolom u vezivanju na domenu vezivanja liganda receptora hrER α . Kvantitativni rezultati testa mogu uključivati IC₅₀ (mjera koncentracije ispitivane kemikalije koja je potrebna da se istisne pola [³H]-17 β -estradiola s receptora hrER α) i relativne afinitete vezivanja ispitivanih kemikalija na hrER α u usporedbi sa 17 β -estradiolom. U svrhu probira kemikalija prihvatljivi kvalitativni rezultati testa mogu uključivati razvrstavanja ispitivanih kemikalija kao kemikalija koje se vežu na hrER α , koje se ne vežu ili koje daju dvosmislen odgovor na temelju kriterija opisanih za krivulje vezivanja.
3. U testu se upotrebljava radioaktivno obilježeni ligand, što znači da laboratorij mora imati dozvolu za radioaktivne materijale. U svim postupcima s radioizotopima i opasnim kemikalijama treba poštovati propise i postupke kako je opisano u nacionalnom zakonodavstvu.
4. Prije upotrebe ovog testa u regulatorne svrhe treba pročitati odjeljke „OPĆI UVOD” i „SASTAVNICE TESTA VEZIVANJA NA hrER”. Definicije i kratice upotrijebljene u ovoj Smjernici za ispitivanje navedene su u Dodatku 1.

NAČELA TESTA (VIDJETI I OPĆI UVOD)

5. Test vezivanja na hrER α mjeri sposobnost vezivanja radioaktivno obilježenog liganda ([³H]17 β -estradiol) na estrogenski receptor u prisutnosti povećavajućih koncentracija ispitivane kemikalije (tj. konkurenta). Ispitivane kemikalije koje imaju velik afinitet za estrogenski receptor natječu se s radioaktivno obilježenim ligandom pri nižoj koncentraciji u odnosu na kemikalije s manjim afinitetom za taj receptor.

6. Ovaj se test sastoji od dva glavna elementa: pokusa vezivanja do zasićenja kako bi se opisali parametri interakcije receptora i liganda, nakon čega slijedi pokus konkurentskog vezivanja u kojem se ispitivana kemikalija i radioaktivno obilježeni ligand natječu u vezivanju na estrogenski receptor.
7. Svrha je pokusa vezivanja do zasićenja opisati određenu šaržu receptora u pogledu afiniteta vezivanja i broja u pripravku za pokus konkurentskog vezivanja. Pokusom vezivanja do zasićenja mjeri se, u uvjetima ravnoteže, afinitet fiksne koncentracije estrogenskog receptora za njegov prirodni ligand (koji predstavlja konstanta disocijacije, K_d) i koncentracija aktivnih mjesta na receptorima (B_{max}).
8. Pokusom konkurentskog vezivanja mjeri se afinitet tvari da se natječe s [^3H]17 β -estradiolom u vezivanju na estrogenski receptor. Afinitet se kvantificira koncentracijom ispitivane kemikalije koja, u uvjetima ravnoteže, inhibira 50 % specifičnog vezivanja [^3H]17 β -estradiola (koja se naziva „50-postotna inhibitorska koncentracija” ili IC_{50}). To se može procijeniti i upotrebom relativnog afiniteta vezivanja (RBA, u odnosu na IC_{50} estradiola koji je izmjeren zasebno u istom ciklusu). Pokusom konkurentskog vezivanja mjeri se vezivanje [^3H]17 β -estradiola pri fiksnoj koncentraciji u prisutnosti širokog raspona (osam redova veličine) koncentracija ispitivanih kemikalija. Ako je moguće, podaci se zatim prilagođavaju u oblik Hillove jednadžbe (Hill, 1910.) koja opisuje istiskivanje radioaktivno obilježenog liganda konkurentnom kemikalijom koja se veže na jedno mjesto. Mjera istiskivanja radioaktivno obilježenog estradiola u uvjetima ravnoteže upotrebljava se za opis ispitivane kemikalije kao kemikalije koja se veže, koja se ne veže ili koja daje dvosmislen odgovor.

POSTUPAK

Dokazivanje prihvatljivog djelovanja proteina receptora hrER α

9. Prije rutinske provedbe testova vezivanja do zasićenja i konkurentskog vezivanja za svaku novu šaržu receptora hrER α treba dokazati da ispravno djeluju u laboratoriju u kojem će se upotrebljavati. Za dokazivanje uspješnosti treba upotrijebiti proces koji se sastoji od dva koraka. Riječ je o sljedećim koracima:
 - provedbi testa vezivanja [^3H]-17 β -estradiola do zasićenja kako bi se dokazali specifičnost i zasićenje receptora hrER α . Nelinearnom regresijskom analizom tih podataka (npr. BioSoft; McPherson, 1985.; Motulsky, 1995.) i kasnijom Scatchardovom krivuljom treba evidentirati afinitet vezivanja [^3H]-17 β -estradiola na receptor hrER α (K_d) i broj receptora (B_{max}) za određenu šaržu receptora hrER α ,
 - provedbi testa konkurentskog vezivanja upotrebom kontrolnih tvari (referentni estrogen (17 β -estradiol), kemikalije koja se slabo veže (npr. noretinodrel ili noretindron) i kemikalije koja se ne veže (oktil-trietoksisilan, OTES)). Svaki laboratorij treba uspostaviti bazu prijašnjih podataka kako bi evidentirao dosljednost vrijednosti IC_{50} i relevantnih vrijednosti za referentni estrogen i kemikaliju koja se slabo veže između pokusa i među

različitim šaržama receptora hrER α . Osim toga, parametri krivulja konkurentskog vezivanja za kontrolne tvari trebaju biti unutar ograničenja intervala pouzdanosti od 95 % (vidjeti tablicu 1.) koja su razvijena upotrebom podataka iz laboratorija koji su sudjelovali u validacijskoj studiji za ovaj test (2.).

Tablica 1.: Kriteriji uspješnosti razvijeni za referentni estrogen i kemikaliju koja se slabo veže, CERI-jev test vezivanja na hrER

Tvar	Parametar	Srednja vrijednost ^a	Standardna devijacija (n)	Intervali pouzdanosti od 95 % ^b	
				Donja granica	Gornja granica
17β-estradiol	Vrh	104,74	13,12 (70)	101,6	107,9
	Dno	0,85	2,41 (70)	0,28	1,43
	Hillov nagib	- 1,22	0,20 (70)	- 1,27	- 1,17
	LogIC ₅₀	- 8,93	0,23 (70)	- 8,98	- 8,87
Noretinodrel	Vrh	101,31	10,55 (68)	98,76	103,90
	Dno	2,39	5,01 (68)	1,18	3,60
	Hillov nagib	- 1,04	0,21 (68)	- 1,09	- 0,99
	LogIC ₅₀	- 6,19	0,40 (68)	- 6,29	- 6,10
Noretindron^c	Vrh	92,27	7,79 (23)	88,90	95,63
	Dno	16,52	10,59 (23)	11,94	21,10
	Hillov nagib	- 1,18	0,32 (23)	- 1,31	- 1,04
	LogIC ₅₀	- 6,01	0,54 (23)	- 6,25	- 5,78

^a Srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija (SD) s veličinom uzorka (n) izračunani su upotrebom procjena prilagođene krivulje (Hillova jednadžba s četiri parametra) za kontrolne cikluse provedene u četiri laboratorija tijekom validacijske studije (vidjeti Prilog N literaturi pod 2.).

^b Intervali pouzdanosti od 95 % navedeni su kao smjernica za kriterije prihvatljivosti.

^c U validacijskoj studiji nije bilo obvezno ispitivanje noretindrona za podzadatak 4 (vidjeti literaturu pod 2., vidjeti podzadatak 4.). Stoga su srednje vrijednosti $\pm$ standardne devijacije (n) izračunane upotrebom procjena prilagodbe krivulje (Hillova jednadžba s četiri parametra) za kontrolne cikluse provedene u dva laboratorija.

Raspon za IC₅₀ ovisit će o vrijednosti Kd pripravka receptora i koncentraciji radioaktivno obilježenih liganada u svakom laboratoriju. Bit će prihvatljiva odgovarajuća prilagodba za raspon vrijednosti IC₅₀ na temelju uvjeta korištenih za provedbu testa.

Dokazivanje osposobljenosti laboratorija

- Vidjeti stavke 17. i 18. te tablicu 2. u odjeljku „**SASTAVNICE TESTA VEZIVANJA NA hrER**” ove ispitne metode. Svaki test (zasićenje i konkurentsko vezivanje) treba se sastojati od tri neovisna ciklusa (tj. sa svježim razrjeđivanjima receptora, kemikalija i reagensa) provedena na različite dane te svaki ciklus treba sadržavati tri ponavljanja.

Utvrđivanje koncentracije receptora (hrER α)

- Koncentracija aktivnih receptora malo se razlikuje s obzirom na šaržu i uvjete skladištenja. Zato treba utvrditi koncentraciju aktivnih receptora koja je dobivena od dobavljača. Tako će se dobiti primjerena koncentracija aktivnih receptora u trenutku provedbe ciklusa.
- Nominalne koncentracije od 0,1, 0,2, 0,4 i 0,6 nM receptora treba inkubirati bez (ukupno vezivanje) i s (nespecifično vezivanje) 1 μ M neobilježenog estradiola u uvjetima koji odgovaraju konkurentskom vezivanju (tj. 0,5 nM [³H]-estradiola). Specifično vezivanje, izračunano kao razlika ukupnog i nespecifičnog vezivanja, grafički se prikazuje u ovisnosti o nominalnoj koncentraciji receptora. Koncentracija receptora koja pokaže specifične

vrijednosti vezivanja koje odgovaraju 40 % dodane radioaktivne oznake povezana je s odgovarajućom koncentracijom receptora i tu koncentraciju receptora treba upotrebljavati za pokuse vezivanja do zasićenja i konkurentskog vezivanja. Konačna koncentracija receptora hrER od 0,2 nM često će ispunjavati taj uvjet.

13. Ako se kriterij od 40 % ne može ispuniti u više navrata, treba provjeriti plan pokusa kako bi se utvrdile potencijalne pogreške. Neuspjeh u ispunjavanju kriterija od 40 % može biti znak toga da u rekombinantnoj šarži ima vrlo malo aktivnih receptora i zatim treba razmotriti upotrebu druge šarže receptora.

Test zasićenja

14. Osam povećavajućih koncentracija [^3H]17 β -estradiola treba procijeniti u tri ponavljanja, u sljedeća tri uvjeta (vidjeti tablicu 2.):
 - a. bez neobilježenog 17 β -estradiola i u prisutnosti estrogenskog receptora. To je utvrđivanje ukupnog vezivanja mjerenjem radioaktivnosti u jažicama u kojima se nalazi samo [^3H]17 β -estradiol;
 - b. u prisutnosti koncentracije neobilježenog 17 β -estradiola koja je 2 000 veća od koncentracije obilježenog 17 β -estradiola i u prisutnosti estrogenskog receptora. Namjera je ovog uvjeta zasiti aktivna vezna mjesta neobilježenim 17 β -estradiolom te mjerenjem radioaktivnosti u jažicama utvrditi nespecifično vezivanje. Sav radioaktivno obilježeni estradiol koji je preostao koji se može vezati na receptor smatra se vezanim na nespecifično mjesto jer bi neobilježeni estradiol trebao biti prisutan u tako visokoj koncentraciji da se veže na sva dostupna specifična mjesta na receptoru;
 - c. bez neobilježenog 17 β -estradiola i bez estrogenskog receptora (utvrđivanje ukupne radioaktivnosti).

Priprema otopina [^3H]-17 β -estradiola, neobilježenog 17 β -estradiola i receptora hrERa

15. Otopinu 40 nM [^3H]-17 β -estradiola treba pripremiti iz 1 μM glavne otopine [^3H]-17 β -estradiola u DMSO-u, dodavanjem DMSO-a (kako bi se pripremilo 200 nM) i testnog pufera na sobnoj temperaturi (kako bi se pripremilo 40 nM). Upotrebom te otopine od 40 nM priprema se niz razrjeđivanja [^3H]-17 β -estradiola, u rasponu od 0,313 nM do 40 nM s testnim puferom na sobnoj temperaturi (kako je prikazano u retku 12 tablice 2.). Konačne koncentracije u testu, u rasponu od 0,0313 do 4,0 nM, dobit će se dodavanjem 10 μl tih otopina odgovarajućim testnim jažicama na mikrotitracijskoj ploči s 96 jažica (vidjeti tablice 2. i 3.). Priprema testnog pufera, izračun izvorne glavne otopine [^3H]-17 β -estradiola na temelju njezine specifične aktivnosti, priprema razrjeđivanja te utvrđivanje koncentracija detaljno su opisani u protokolu za CERI test (2.).
16. Razrjeđivanja neobilježenih otopina 17 β -estradiola treba pripremiti iz 1 nM glavne otopine 17 β -estradiola dodavanjem testnog pufera kako bi se dobilo osam povećavajućih koncentracija koje su prvotno u rasponu od 0,625 μM do 80 μM . Konačne koncentracije u

testu, u rasponu od 0,0625 do 8 μ M, dobit će se dodavanjem 10 μ l tih otopina odgovarajućim testnim jažicama na mikrotitracijskoj ploči s 96 jažica namijenjenima za mjerenje nespecifičnog vezivanja (vidjeti tablice 2. i 3.). Priprema razrjeđivanja neobilježenog 17 β -estradiola posebno je opisana u protokolu za CERI-jev test (2.).

17. Treba upotrebljavati koncentraciju receptora koja daje specifično vezivanje od 40 ± 10 % (vidjeti stavke 12. i 13.). Otopinu receptora hrER α treba pripremiti s vrlo hladnim testnim puferom neposredno prije upotrebe, tj. nakon što se pripreme sve jažice za ukupno vezivanje, nespecifično vezivanje i samo radioaktivno obilježeni ligand.

18. Mikrotitracijske ploče s 96 jažica pripremaju se kako je prikazano u tablici 2., s tri ponavljanja po koncentraciji [^{3} H]-17 β -estradiola. Raspored volumena [^{3} H]-17 β -estradiola, neobilježenog 17 β -estradiola, pufera i receptora prikazan je u tablici 3.

Tablica 2.: Raspored na mikrotitracijskoj ploči za test vezivanja do zasićenja

	1*	2*	3*	4*	5*	6*	7*	8*	9*	10	11**	12**
	Za mjerenje TB-a			Za mjerenje NSB-a			Za utvrđivanje samo radioaktivno obilježenog liganda				Razrjeđivanja neobilježenog E2 za stupce ploče 4–6	Razrjeđivanja [^{3} H]E2 za stupce ploče 1–9
A	0,0313 nM [^{3} H] E ₂ + ER			0,0313 nM [^{3} H] E ₂ + 0,0625 μ M E ₂ + ER			0,0313 nM				0,625 μ M	0,313 nM
B	0,0625 nM [^{3} H] E ₂ + ER			0,0625 nM [^{3} H] E ₂ + 0,125 μ M E ₂ + ER			0,0625 nM				1,25 μ M	0,625 nM
C	30,125 nM [^{3} H] E ₂ + ER			0,125 nM [^{3} H] E ₂ + 0,25 μ M E ₂ + ER			0,125 nM				2,5 μ M	1,25 nM
D	0,250 nM [^{3} H] E ₂ + ER			0,250 nM [^{3} H] E ₂ + 0,5 μ M E ₂ + ER			0,250 nM				5 μ M	2,5 nM
E	0,50 nM [^{3} H] E ₂ + ER			0,50 nM [^{3} H] E ₂ + 1 μ M E ₂ + ER			0,50 nM				10 μ M	5 nM
F	1,00 nM [^{3} H] E ₂ + ER			1,00 nM [^{3} H] E ₂ + 2 μ M E ₂ + ER			1,00 nM				20 μ M	10 nM
G	2,00 nM [^{3} H] E ₂ + ER			2,00 nM [^{3} H] E ₂ + 4 μ M E ₂ + ER			2,00 nM				40 μ M	20 nM
H	4,00 nM [^{3} H] E ₂ + ER			4,00 nM [^{3} H] E ₂ + 8 μ M E ₂ + ER			4,00 nM				80 μ M	40 nM

TB: ukupno vezivanje

NSB: nespecifično vezivanje

[³H] E₂: [³H]17β-estradiol

E₂: neobilježeni 17β-estradiol

* Koncentracije koje su ovdje navedene konačne su koncentracije u svakoj jažici.

** Razrjeđivanja neobilježenog E₂ i [³H]E₂ mogu se pripremiti na različitim pločama.

Tablica 3.: Volumeni reagensa za mikrotitracijsku ploču za zasićenje

Broj retka		1	2	3	4	5	6	7*	8*	9*
Koraci pripreme		Jažice za TB			Jažice za NSB			Samo rad. obilj.ligand		
Volumen sastavnica za prethodne reakcijske jažice i redosljed dodavanja	Pufer	60 µl			50 µl			90 µl		
	neobilježeni E2 iz retka 11 u tablici 2.	–			10 µl			–		
	[3H]E2 iz retka 12 u tablici 2.	10 µl			10 µl			10 µl		
	hrERα	30 µl			30 µl			–		
Ukupni reakcijski volumen		100 µl			100 µl			100 µl		
Inkubacija		REAKCIJA NAKON DVA SATA INKUBACIJE						Kvantifikacija radioaktivnosti odmah nakon pripreme. Bez inkubacije		
Tretiranje 0,4-postotnim DCC-om		Da			Da			Ne		
Volumen 0,4-postotnog DCC-a		100 µl			100 µl			–		
Filtriranje		Da			Da			Ne		
MJERENJE DPMS-a										
Kvantifikacijski volumen dodan scintilacijskom koktelu		100 µl**			100 µl**			50 µl		

* Ako se za mjerenje raspada u minuti upotrebljava tekućinski scintilacijski brojač (LSC) za mikrotitracijske ploče, samo radioaktivno obilježeni ligand nije primjereno pripremati na istoj testnoj ploči na kojoj se nalaze i jažice za TB i NSB. Samo radioaktivno obilježeni ligand treba pripremiti na drugoj ploči.

** Ako se za odvajanje DCC-a upotrebljava centrifugiranje, LSC-om treba izmjeriti 50 μl supernatanta kako bi se izbjegla kontaminacija DCC-a.

19. Mikrotitracijske ploče testa za utvrđivanje ukupnog i nespecifičnog vezivanja treba inkubirati dva sata na sobnoj temperaturi (od 22 °C do 28 °C).

Mjerenje [³H]-17β-estradiola koji se vezao na receptore hrERα

20. Nakon dvosatnog razdoblja inkubacije [³H]-17β-estradiol vezan na receptore hrERα treba odvojiti od slobodnog [³H]-17β-estradiola tako da se u jažice doda 100 μl 0,4-postotne vrlo hladne suspenzije DCC-a. Ploče zatim treba staviti na led deset minuta, a reakcijsku smjesu i suspenziju DCC-a filtrirati prenošenjem na filter mikrotitracijske ploče kako bi se uklonio DCC. Zatim 100 μl filtrata treba dodati scintilacijskoj tekućini u bočice LSC-a za utvrđivanje raspada u minuti (dpm) po bočici brojenjem metodom tekućinske scintilacije.

21. Umjesto toga, ako nije dostupan mikrotitracijski filter, DCC se može ukloniti centrifugiranjem. Zatim vrlo oprezno treba uzeti 50 μ l supernatanta koji sadržava [^{3} H]-17 β -estradiol vezan na receptor hrER α kako bi se izbjegla bilo kakva kontaminacija jažica dodirivanjem DCC-a i to se treba upotrijebiti za brojenje scintilacijom.
22. Uvjet sa samo radioaktivno obilježenim ligandom upotrebljava se za utvrđivanje raspada u minuti (dpm) [^{3} H]-17 β -estradiola dodanog u testne jažice. Radioaktivnost treba kvantificirati odmah nakon pripreme. Te jažice ne treba inkubirati ni tretirati suspenzijom DCC-a, već se njihov sadržaj treba izravno dodati scintilacijskoj tekućini. Te mjere pokazuju koliko je [^{3} H]-17 β -estradiola u dpm-ovima dodano svakoj skupini jažica za ukupno vezivanje i nespecifično vezivanje.

Test konkurentskog vezivanja

23. Testom konkurentskog vezivanja mjeri se vezivanje jedne koncentracije [^{3} H]-17 β -estradiola u prisutnosti povećavajućih koncentracija ispitivane kemikalije. Za svaku koncentraciju unutar jednog ciklusa treba upotrijebiti tri istodobna ponovljena uzorka. Osim toga, za svaku ispitivanu kemikaliju treba provesti tri neparalelna ciklusa. Test treba provesti na jednoj mikrotitracijskoj ploči s 96 jažica ili više ploča.

Kontrole

24. Pri provedbi testa u svaki pokus istodobno treba uključiti otapalo i kontrole (tj. referentni estrogen, kemikaliju koja se slabo veže i kemikaliju koja se ne veže). Na jednoj ploči tijekom svakog ciklusa treba upotrijebiti cijelu krivulju koncentracija referentnog estrogena i kontrola (tj. kemikalije koja se slabo veže i koja se ne veže). Sve ostale ploče trebaju sadržavati: i. visoku (najveće istiskivanje, tj. približno potpuno istiskivanje radioaktivno obilježenog liganda) i srednju (približno IC₅₀) koncentraciju E2 i kemikalije koja se slabo veže u tri ponavljanja; ii. kontrolu s otapalom i nespecifično vezivanje, svako u tri ponavljanja. Postupci za pripremu testnog pufera, [^{3} H]-17 β -estradiola, receptora hrER α i otopina ispitivanih kemikalija podrobno su opisani u protokolu za test CER1 (2.).

Kontrola s otapalom

25. Kontrola s otapalom pokazuje da otapalo nije u interakciji s ispitnim sustavom i mjeri ukupno vezivanje (TB). Poželjno je otapalo DMSO. Umjesto toga, ako najviša koncentracija ispitivane kemikalije nije topljiva u DMSO-u, može se upotrijebiti etanol. Koncentracija DMSO-a u konačnim testnim jažicama treba biti 2,05 % i može se povećati do 2,5 % ako ispitivana kemikalija nije dovoljno topljiva. Ne treba upotrebljavati koncentracije DMSO-a veće od 2,5 % zbog utjecaja većih koncentracija otapala na test. Za ispitivane kemikalije koje nisu topljive u DMSO-u, ali su topljive u etanolu, u testu se može upotrijebiti najviše 2 % etanola bez interferencije.

Kontrola s puferom

26. Kontrola s puferom (BC) ne smije sadržavati ni otapalo ni ispitivanu kemikaliju, ali treba sadržavati sve ostale sastavnice testa. Rezultati kontrole s puferom uspoređuju se s

kontrolom s otapalom kako bi se potvrdilo da otapalo koje se upotrebljava ne utječe na ispitni sustav.

Kemikalija koja se jako veže (referentni estrogen)

27. Endogeni je ligand 17β -estradiol (CAS 50-28-2) i on se veže s velikim afinitetom za estrogenski receptor podvrste alfa. Za svaki test konkurentskog vezivanja na hrER α treba pripremiti standardnu krivulju u kojoj se upotrebljava neobilježeni 17β -estradiol kako bi se omogućila procjena varijabilnosti pri provedbi testa tijekom vremena u istom laboratoriju. Treba pripremiti osam otopina neobilježenog 17β -estradiola u DMSO-u i testnom puferu, sa sljedećim konačnim koncentracijama u testnim jažicama koje se trebaju upotrijebiti za standardnu krivulju: 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , $10^{-8,5}$, 10^{-9} , $10^{-9,5}$, 10^{-10} , 10^{-11} M. Najviša koncentracija neobilježenog 17β -estradiola ($1\ \mu\text{M}$) treba služiti kao pokazatelj nespecifičnog vezivanja. Ova se koncentracija prepoznaje po oznaci „NSB” u tablici 4. iako je ona i dio standardne krivulje.

Kemikalija koja se slabo veže

28. Treba uključiti kemikaliju koja se slabo veže (noretinodrel (CAS 68-23-5) ili alternativno noretindron (CAS 68-22-4)) kako bi se dokazala osjetljivost svakog pokusa i omogućila procjena varijabilnosti pri provedbi testa tijekom vremena. Treba pripremiti osam otopina kemikalije koja se slabo veže u DMSO-u i testnom puferu, sa sljedećim konačnim koncentracijama u testnim jažicama: $10^{-4,5}$, $10^{-5,5}$, 10^{-6} , $10^{-6,5}$, 10^{-7} , $10^{-7,5}$, 10^{-8} i 10^{-9} M.

Kemikalija koja se ne veže

29. Kao negativnu kontrolu (kemikaliju koja se ne veže) treba upotrebljavati oktil-trietoksisilan (OTES, CAS 2943-75-1). Ona je jamstvo da će se načinom na koji se test provodi otkriti ispitivane kemikalije koje se ne vežu na receptor hrER α . Treba pripremiti osam otopina kemikalije koja se ne veže u DMSO-u i testnom puferu, sa sljedećim konačnim koncentracijama u testnim jažicama: 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} M. Kao alternativna kemikalija koja se ne veže može se upotrebljavati di-*n*-butil-ftalat (DBP, CAS 84-72-2), ali se ispituje samo do 10^{-4} M. Pokazalo se da je 10^{-4} M najveća topljivost DBP-a u testu.

Koncentracija receptora hrER α

30. Treba upotrebljavati količinu receptora koja daje specifično vezivanje od $40 \pm 10\%$ (vidjeti stavke 12. i 13. Dodatka 3.). Otopinu receptora hrER α treba pripremiti razrjeđivanjem funkcionalnog receptora hrER α u vrlo hladnom testnom puferu, neposredno prije upotrebe.

[^3H]- 17β -estradiol

31. Konačna koncentracija [^3H]- 17β -estradiola u testnim jažicama treba biti $0,5\ \text{nM}$.

Ispitivane kemikalije

32. U prvom se redu treba ispitati topljivost kako bi se utvrdila granica topljivosti za svaku ispitivanu kemikaliju i utvrdio primjereni raspon koncentracija za upotrebu u protokolu ispitivanja. Granicu topljivosti svake ispitivane kemikalije prvo treba utvrditi u otapalu i

zatim potvrditi u uvjetima testa. Konačna koncentracija koja se ispituje u testu ne smije biti veća od 1 mM. Ispitivanje za utvrđivanje raspona uključuje kontrolu s otapalom i najmanje osam log-serijskih razrjeđivanja, počevši od najveće prihvatljive koncentracije (npr. 1 mM ili manje, na temelju granice topljivosti) i uočene prisutnosti zamućenja ili taloga (vidjeti i stavak 35. Dodatka 3.). Kada se utvrdi raspon koncentracija za ispitivanje, ispitivanu kemikaliju treba ispitati upotrebom osam primjereno raspoređenih log koncentracija, kako su utvrđene u prethodnom ispitivanju za utvrđivanje raspona. Ako je potrebno, koncentracije ispitane u drugom i trećem pokusu po potrebi treba dodatno prilagoditi kako bi se bolje opisala krivulja koncentracija – odgovor.

33. Razrjeđivanja ispitivane kemikalije treba pripremiti u odgovarajućem otapalu (vidjeti stavak 25. Dodatka 3.). Ako najviša koncentracija ispitivane kemikalije nije topljiva ni u etanolu ni u DMSO-u te bi dodavanjem još otapala koncentracija otapala u konačnoj epruveti porasla iznad prihvatljivog ograničenja, najviša koncentracija može se smanjiti na sljedeću nižu koncentraciju. U tom se slučaju može dodati dodatna koncentracija na donjem kraju niza koncentracija. Ostale koncentracije u nizu ne smiju se mijenjati.
34. Otopine ispitivane kemikalije treba pažljivo pratiti kada se dodaju u testnu jažicu jer se ispitivana kemikalija može nataložiti nakon dodavanja u testnu jažicu. Podatke za sve jažice koje sadržavaju talog treba isključiti iz prilagođavanja krivulje i treba evidentirati razlog za isključivanje podataka.
35. Ako već postoje informacije iz drugih izvora koje pokazuju $\log(\text{IC}_{50})$ ispitivane kemikalije, može biti primjereno geometrijski rasporediti razrjeđivanja bliže očekivanoj vrijednosti $\log(\text{IC}_{50})$ (tj. polovine log jedinica). Konačni rezultati trebaju pokazivati dovoljnu raspoređenost koncentracija na obje strane $\log(\text{IC}_{50})$, uključujući „vrh” i „dno”, tako da se krivulja vezivanja može primjereno opisati.

Organizacija testne ploče

36. Označene mikrotitracijske ploče treba pripremiti upotrebom inkubacija u šest ponavljanja za kontrolu s otapalom, najviše koncentracije referentnog estrogena (E2) koji služi i kao pokazatelj nespecifičnog vezivanja (NSB), kontrole s puferom, osam koncentracija kontrole koja se ne veže (oktil-trietoksisilan), sedam nižih koncentracija za referentni estrogen (E2), osam koncentracija kemikalije koja se slabo veže (noretinodrel ili noretindron) i osam koncentracija svake ispitivane kemikalije (TC). Primjer rasporeda na ploči za cijele krivulje koncentracija referentnog estrogena i kontrola naveden je u tablici 4. u nastavku. Za ispitivanu kemikaliju upotrebljavaju se dodatne mikrotitracijske ploče koje trebaju uključivati kontrole na ploči, tj.: i. visoku (najveće istiskivanje) i srednju (približno IC_{50}) koncentraciju E2 i kemikalije koja se slabo veže u tri ponavljanja; ii. kontrolu s otapalom (kao ukupno vezivanje) i nespecifično vezivanje u šest ponavljanja (tablica 5.). Primjer radnog lista s rasporedom mikrotitracijskih ploča za test konkurentskog vezivanja s tri nepoznate ispitivane kemikalije naveden je u Dodatku 3.3. Koncentracije navedene u radnom listu te u tablicama 4. i 5. odnose se na konačne koncentracije koje se upotrebljavaju u svakoj testnoj jažici. Najveća koncentracija za E2 treba iznositi 1×10^{-6}

⁷ M, a za kemikaliju koja se slabo veže treba upotrebljavati najvišu koncentraciju koja se upotrebljavala za kemikaliju koja se slabo veže na ploči 1. Laboratorij mora utvrditi koncentraciju IC₅₀ na temelju svoje baze podataka o prijašnjim kontrolama. Očekuje se da će ta vrijednost biti slična vrijednosti uočenoj u validacijskim studijama (vidjeti tablicu 1.).

Tablica 4.: Raspored na mikrotitracijskoj ploči za test konkurentskog vezivanja^{1,2}, cijele krivulje koncentracija referentnog estrogena i kontrola (ploča 1)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Kontrola s puferom i pozitivna kontrola (E2)			Slabo pozitivna kemikalija (Noretinodrel)			Negativna kontrola (OTES)			TB i NSB		
A	Slijepa proba*			1×10^{-9} M			1×10^{-10} M			TB (kontrola s otapalom) (2,05-postotni DMSO)		
B	E2 (1×10^{-11} M)			1×10^{-8} M			1×10^{-9} M					
C	E2 (1×10^{-10} M)			$1 \times 10^{-7,5}$ M			1×10^{-8} M			NSB (10^{-6} M E2)		
D	E2 ($1 \times 10^{-9,5}$ M)			1×10^{-7} M			1×10^{-7} M					
E	E2 (1×10^{-9} M)			$1 \times 10^{-6,5}$ M			1×10^{-6} M			Kontrola s puferom		
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			Slijepa proba (za radioakt.)**		
H	E2 (1×10^{-7} M)			$1 \times 10^{-4,5}$ M			1×10^{-3} M					

¹ Primjer rasporeda za mikrotitracijsku ploču sa standardima koje treba primijeniti u svakom pokusu.

² Napominje se da se na ovoj mikrotitracijskoj ploči upotrebljavaju razrjeđivanja pripremljena na ploči za razrjeđivanje opisanoj u pogledu standarda u prethodnim odjeljcima.

U ovom se primjeru kao kemikalija koja se slabo veže upotrebljava noretinodrel (NE)

* Stvarna slijepa proba, jažica se ne upotrebljava.

** Slijepa proba, ne upotrebljava se tijekom inkubacije, ali se upotrebljava za potvrđivanje ukupne dodane radioaktivnosti.

Tablica 5.: Raspored na mikrotitracijskoj ploči za test konkurentskog vezivanja, dodatne ploče za ispitivane kemikalije (TC) i kontrole na ploči

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Ispitivana kemikalija 1 (TC-1)			Ispitivana kemikalija 2 (TC-2)			Ispitivana kemikalija 3 (TC-3)			Kontrole		
A	TC-1 (1×10^{-10} M)			TC-2 (1×10^{-10} M)			TC-3 (1×10^{-10} M)			E2 (1×10^{-7} M)		
B	TC-1 (1×10^{-9} M)			TC-2 (1×10^{-9} M)			TC-3 (1×10^{-9} M)			E ₂ (IC ₅₀)		
C	TC-1 (1×10^{-8} M)			TC-2 (1×10^{-8} M)			TC-3 (1×10^{-8} M)			NE ($1 \times 10^{-4,5}$ M)		

D	TC-1 (1×10^{-7} M)	TC-2 (1×10^{-7} M)	TC-3 (1×10^{-7} M)	NE (IC_{50})
E	TC-1 (1×10^{-6} M)	TC-2 (1×10^{-6} M)	TC-3 (1×10^{-6} M)	NSB (10^{-6} M E2)
F	TC-1 (1×10^{-5} M)	TC-2 (1×10^{-5} M)	TC-3 (1×10^{-5} M)	
G	TC-1 (1×10^{-4} M)	TC-2 (1×10^{-4} M)	TC-3 (1×10^{-4} M)	TB (kontrola s otapalom)
H	TC-1 (1×10^{-3} M)	TC-2 (1×10^{-3} M)	TC-3 (1×10^{-3} M)	

U ovom se primjeru kao kemikalija koja se slabo veže upotrebljava noretinodrel (NE)

Dovršetak testa konkurentskog vezivanja

37. Uz iznimku jažica za ukupno vezivanje i slijepe probe (za radioaktivnost), kako je prikazano u tablici 6., u svaku jažicu treba staviti 50 μ l testnog pufera i pomiješati s 10 μ l kontrole s otapalom, referentnog estrogena (E2), kemikalije koja se slabo veže, kemikalije koja se ne veže ili ispitivanih kemikalija te s 10 μ l otopine [^{3} H]-17 β -estradiola od 5 nM. Zatim se svakoj ploči dodaje 30 μ l vrlo hladne otopine receptora i lagano promiješa. Otopina receptora hrER α trebala bi biti posljednji reagens koji se dodaje. Mikrotitracijske ploče testa treba inkubirati dva sata na sobnoj temperaturi (od 22 do 28 °C).

Tablica 6.: Volumen sastavnica testa za test konkurentskog vezivanja na hrER, mikrotitracijske ploče

<i>Broj retka i koraci pripreme</i>		Osim jažica za TB	Jažice za TB	Slijepa proba (za radioakt.)
Volumen sastavnica za prethodne reakcijske jažice i redosljed dodavanja	Testni pufer sobne temperature	50 μ l	60 μ l	90 μ l
	Neobilježeni E2, kemikalija koja se slabo veže, kemikalija koja se ne veže, otapalo i ispitivane kemikalije*	10 μ l	–	–
	[^{3} H]-17 β -estradiol koji treba imati konačnu koncentraciju od 0,5 nM (tj. 5 nM)	10 μ l	10 μ l	10 μ l
	Koncentracija receptora hrER α kako je utvrđeno (vidjeti stavke 12. i 13.)	30 μ l	30 μ l	–
Ukupni volumen u svakoj testnoj jažici		100 μ l	100 μ l	100 μ l

*Pravilno pripremljeni kako bi se dobila konačna koncentracija u okviru prihvatljive koncentracije otapala

38. Zatim treba kvantificirati [^{3} H]-17 β -estradiol vezan na receptore hrER α , nakon odvajanja [^{3} H]-17 β -estradiola vezanog na receptore hrER α od slobodnog [^{3} H]-17 β -estradiola dodavanjem 100 μ l suspenzije vrlo hladnog DCC-a u svaku jažicu, kako je opisano u stavcima od 21. do 23. Dodatka 3. za test vezivanja do zasićenja.

39. Jažice G10–12 i H10–12 (utvrđene kao slijepe probe (za radioaktivnost) u tablici 4.) predstavljaju dpm označenog [^{3} H] estradiola u 10 μ l. Alikvot od 10 μ l treba izravno dodati scintilacijskoj tekućini.

Kriteriji prihvatljivosti

Test vezivanja do zasićenja

40. Krivulja specifičnog vezivanja treba dosegnuti plato kako se upotrebljavaju povećavajuće koncentracije [³H]-17β-estradiola, što ukazuje na zasićenje receptora hrERα ligandom.
41. Specifično vezivanje pri 0,5 nM [³H]-17β-estradiola treba biti unutar prihvatljivog raspona od 30 % do 50 % prosječne izmjerene ukupne radioaktivnosti dodane u svim ciklusima. Prihvatljiva su povremena manja odstupanja od tog raspona, ali ako su ciklusi dosljedno izvan tog raspona ili je određeni ciklus znatno izvan tog raspona, koncentraciju proteina treba prilagoditi i treba ponoviti test zasićenja.
42. Iz podataka bi trebala nastati linearna Scatchardova krivulja.
43. Nespecifično vezivanje ne bi trebalo biti preveliko. Vrijednost za nespecifično vezivanje obično bi trebala biti < 35 % ukupnog vezivanja. Međutim, omjer povremeno može biti veći od tog ograničenja kada se mjere vrlo niski dpm-ovi za najniže koncentracije ispitnog radioaktivno obilježenog 17β-estradiola.

Test konkurentskog vezivanja

44. Povećavanjem koncentracija neobilježenog 17β-estradiola trebao bi se istisnuti [³H]-17β-estradiol s receptora na način koji je dosljedan konkurentskom vezivanju na jedno mjesto.
45. Vrijednost IC₅₀ za referentni estrogen (tj. 17β-estradiol) treba biti približno jednaka molarnoj koncentraciji [³H]-17β-estradiola uvećanoj za K_d utvrđen u testu vezivanja do zasićenja.
46. Ukupno specifično vezivanje dosljedno bi trebalo biti unutar prihvatljivog raspona od 40 ± 10 % ako je prosječna izmjerena koncentracija ukupne radioaktivnosti dodane svakoj jažici iznosila 0,5 nM u svim ciklusima. Prihvatljiva su povremena manja odstupanja od tog raspona, ali ako su ciklusi dosljedno izvan tog raspona ili je određeni ciklus znatno izvan tog raspona, koncentraciju proteina treba prilagoditi.
47. Otapalo ne bi smjelo promijeniti osjetljivost ili obnovljivost testa. Rezultati kontrole s otapalom (jažice TB) uspoređuju se s kontrolom s puferom kako bi se potvrdilo da otapalo koje se upotrebljava ne utječe na ispitni sustav. Ako otapalo ne utječe na test, rezultati TB-a i kontrole s puferom trebaju biti usporedivi.
48. Kemikalija koja se ne veže ne bi trebala istisnuti više od 25 % [³H]-17β-estradiola s receptora hrERα ako se ispituje do 10⁻³ M (OTES) ili 10⁻⁴ M (DBP).
49. Kriteriji uspješnosti razvijeni su za referentni estrogen i dvije kemikalije koje se slabo vežu (npr. noretinodrel, noretindron) upotrebom podataka iz validacijske studije za CERI-jev test vezivanja na hrER (Prilog N literaturi pod 2.). Intervali pouzdanosti od 95 % navode se za srednju vrijednost ±SD (n) svih kontrolnih ciklusa u sva četiri laboratorija koja su sudjelovala u validacijskoj studiji. Intervali pouzdanosti od 95 % izračunani su za parametre prilagođene krivulje (tj. vrh, dno, Hillov nagib i Log IC₅₀) za referentni estrogen i kemikalije koje se slabo vežu te za log₁₀RBA kemikalija koje se slabo vežu u odnosu na

referentni estrogen. U tablici 1. navedeni su očekivani rasponi za parametre prilagođene krivulje koji se mogu upotrebljavati kao kriteriji uspješnosti. U praksi se raspon vrijednosti IC_{50} može neznatno razlikovati ovisno o eksperimentalno izvedenoj vrijednosti K_d pripravka receptora i koncentraciji liganda upotrijebljenoj u testu.

50. Za parametre prilagođene krivulje za ispitivane kemikalije nisu razvijeni kriteriji uspješnosti zbog velikog raspona postojećih potencijalnih ispitivanih kemikalija i varijacije u mogućim afinitetima i ishodima (npr. cijela krivulja, djelomična krivulja, bez prilagođavanja krivulje). Međutim, pri pregledu rezultata iz svakog ciklusa za ispitivanu kemikaliju treba primijeniti stručnu prosudbu. Treba upotrijebiti dovoljan raspon koncentracija ispitivane kemikalije kako bi se jasno utvrdio vrh (npr. od 90 do 100 % vezivanja) konkurentne krivulje. Varijabilnost među ponavljanjima pri svakoj koncentraciji ispitivane kemikalije te među tri neistodobna ciklusa treba biti razumna i znanstveno opravdana. Kontrole iz svakog ciklusa za ispitivanu kemikaliju trebale bi se približiti mjerilima uspješnosti koja su navedena za ovaj CERI-jev test i biti dosljedne podacima o prijašnjim kontrolama iz svakog odgovarajućeg laboratorija.

ANALIZA PODATAKA

Test vezivanja do zasićenja

51. Mjere se i ukupno i nespecifično vezivanje. Iz tih se vrijednosti računa specifično vezivanje povećavajućih koncentracija $[^3H]$ -17 β -estradiola u uvjetima ravnoteže tako da se nespecifično vezivanje oduzme od ukupnoga. Grafikon specifičnog vezivanja u odnosu na koncentraciju $[^3H]$ -17 β -estradiola treba dosegnuti plato za najveće specifično vezivanje koje ukazuje na zasićenje receptora hrER α $[^3H]$ -17 β -estradiolom. Osim toga, analizom podataka treba evidentirati vezivanje $[^3H]$ -17 β -estradiola na jedno vezno mjesto s velikim afinitetom. Nespecifično, ukupno i specifično vezivanje treba prikazati na krivulji vezivanja do zasićenja. Za daljnju analizu tih podataka treba upotrijebiti nelinearnu regresijsku analizu (npr. BioSoft; McPherson, 1985.; Motulsky, 1995.), s konačnim prikazom podataka u obliku Scatchardove krivulje.
52. Analizom podataka treba utvrditi B_{max} i K_d samo iz podataka o ukupnom vezivanju uz pretpostavku da je nespecifično vezivanje linearno, osim ako se obrazloži upotreba druge metode. Osim toga, pri utvrđivanju najbolje prilagodbe treba upotrijebiti temeljitu regresiju osim ako se obrazloži drugačiji odabir. Treba navesti metodu odabranu za temeljitu regresiju. Kod utvrđivanja vrijednosti B_{max} i K_d iz podataka o vezivanju do zasićenja uvijek treba primijeniti ispravak za potrošnju liganada (npr. upotrebom Swillensove metode iz 1995.).

Test konkurentskog vezivanja

53. Krivulja konkurentskog vezivanja grafički se prikazuje kao specifično vezivanje $[^3H]$ -17 β -estradiola u odnosu na koncentraciju ($\log_{10}$ jedinice) konkurenta. Koncentracija ispitivane

kemikalije koja inhibira 50 % najvećeg specifičnog vezivanja [³H]-17β-estradiola čini vrijednost IC₅₀.

54. Procjene za vrijednosti log(IC₅₀) za pozitivne kontrole (npr. referentni estrogen i kemikalija koja se slabo veže) treba utvrditi upotrebom primjerenog softvera za nelinearno prilagođavanje krivulje kako bi se prilagodila Hillova jednadžba s četiri parametra (npr. BioSoft; McPherson, 1985.; Motulsky, 1995.). Vrh, dno, nagib i log(IC₅₀) obično ne bi trebalo ograničavati pri prilagođavanju tih krivulja. Pri utvrđivanju najbolje prilagodbe treba upotrijebiti temeljitu regresiju osim ako se obrazloži drugačiji odabir. Ne treba primijeniti ispravak za potrošnju liganada. Nakon početne analize svaku krivulju vezivanja treba pregledati kako bi se osigurala odgovarajuća prilagodba modelu. Relativni afinitet vezivanja (RBA) za kemikaliju koja se slabo veže treba izračunati kao postotak log (IC₅₀) za kemikaliju koja se slabo veže u odnosu na log (IC₅₀) za 17β-estradiol. Rezultate iz pozitivnih kontrola i kontrola s kemikalijama koje se ne vežu treba procijeniti upotrebom kriterija uspješnosti testa iz stavaka od 44. do 49. ovog Dodatka 3.
55. Podatke za sve ispitivane kemikalije treba analizirati upotrebom stupnjevitog pristupa kako bi se osiguralo da su podaci primjereno analizirani i da je svaka krivulja konkurentskog vezivanja pravilno razvrstana. Preporučuje se da se svaki ciklus za ispitivanu kemikaliju prvo podvrgne standardiziranoj analizi podataka koja je identična analizi upotrijebljenoj za referentni estrogen i kontrole kemikalije koja se slabo veže (vidjeti stavak 54. ovog Dodatka 3.). Kada se to dovrši, treba izvršiti tehnički pregled parametara prilagođene krivulje i vizualni pregled mjere u kojoj podaci odgovaraju izrađenoj krivulji konkurentskog vezivanja za svaki ciklus. Tijekom tog tehničkog pregleda dobar pokazatelj toga da su test i analiza podataka pravilno provedeni uključuju opažanje smanjenja postotka specifično vezanog [³H]-17β-estradiola koje ovisi o koncentraciji, malu varijabilnost među tehničkim ponavljanjima pri svakoj koncentraciji ispitivane kemikalije i dosljednost u parametrima prilagodbe između tri ciklusa.

Tumačenje podataka

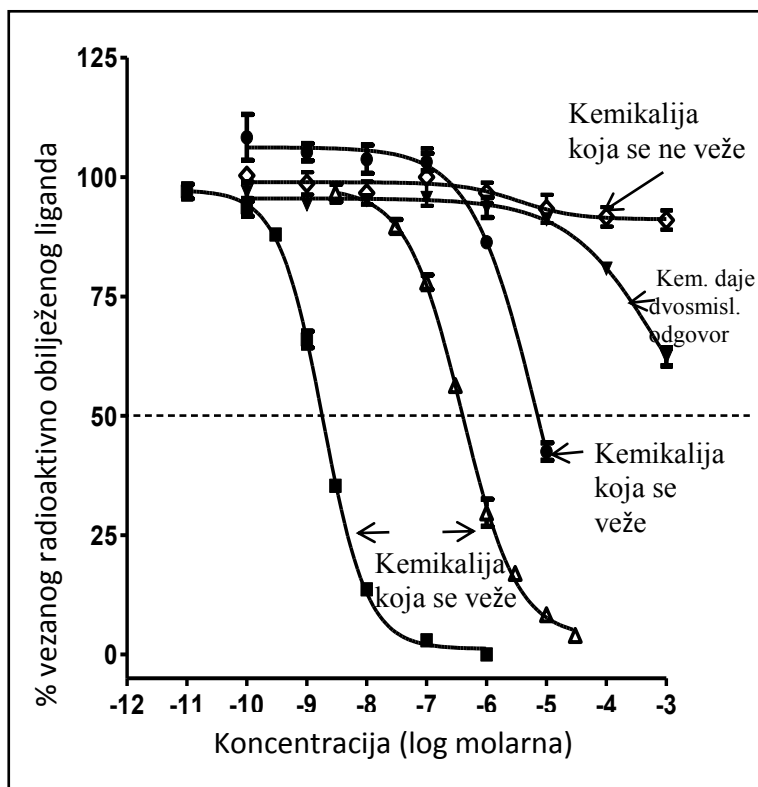
56. Pod uvjetom da su ispunjeni svi kriteriji prihvatljivosti, ispitivana kemikalija smatra se kemikalijom koja se veže na receptor hrERα ako se krivulja vezivanja može prilagoditi te je najniža točka na krivulji odgovora u rasponu podataka manja od 50 % (slika 1.).
57. Pod uvjetom da su ispunjeni svi kriteriji prihvatljivosti, ispitivana kemikalija smatra se kemikalijom koja se ne veže na receptor hrERα:
- ako se krivulja vezivanja može prilagoditi i ako je najniža točka na prilagođenoj krivulji odgovora u rasponu podataka veća od 75 %, ili
 - ako se krivulja vezivanja ne može prilagoditi i ako je najniži neizgladeni prosječni postotak vezivanja među skupinama koncentracija u podacima veći od 75 %.

58. Smatra se da ispitivane kemikalije daju dvosmislen odgovor ako se ne ispuni nijedan od prethodno navedenih uvjeta (npr. najniža točka na prilagođenoj krivulji odgovora nalazi se između 76 i 51 %).

Tablica 7.: Kriteriji za dodjelu razvrstavanja na temelju krivulje konkurentskog vezivanja za ispitivanu kemikaliju

Razvrstavanje	Kriteriji
Kemikalija koja se veže ^a	Može se prilagoditi krivulja vezivanja. • Najniža točka na krivulji odgovora u rasponu podataka manja je od 50 %.
Kemikalija koja se ne veže ^b	Ako se krivulja vezivanja može prilagoditi, • najniža točka na prilagođenoj krivulji odgovora u rasponu podataka veća je od 75 %. Ako se krivulja vezivanja ne može prilagoditi, • najniži neizgladnjeni prosječni postotak vezivanja među skupinama koncentracija u podacima veći je od 75 %.
Daje dvosmislen odgovor ^c	Bilo koji ciklus koji se može ispitati, a nije ni kemikalija koja se veže ni koja se ne veže (npr. najniža točka na prilagođenoj krivulji odgovora nalazi se između 76 i 51 %).

Slika 1.: Primjeri razvrstavanja ispitivanih kemikalija upotrebom krivulje konkurentskog vezivanja



59. Višestruki ciklusi koji se provedu u laboratoriju za ispitivanu kemikaliju kombiniraju se dodjeljivanjem numeričkih vrijednosti svakom ciklusu i određivanjem prosjeka svih ciklusa kako je prikazano u tablici 8. Rezultati za kombinirane cikluse u svakom laboratoriju uspoređuju se s očekivanim razvrstavanjem za svaku ispitivanu kemikaliju.

Tablica 8.: Metoda za razvrstavanje ispitivane kemikalije upotrebom višestrukih ciklusa unutar laboratorija

Za dodjelu vrijednosti svakom ciklusu:	
Razvrstavanje	Brojčana vrijednost
Kemikalija koja se veže	2
Daje dvosmislen odgovor	1
Kemikalija koja se ne veže	0
Za razvrstavanje prosječne brojčane vrijednosti u svim ciklusima:	
Razvrstavanje	Brojčana vrijednost
Kemikalija koja se veže	Prosječno $\geq 1,5$
Daje dvosmislen odgovor	$0,5 \leq \text{prosječno} < 1,5$
Kemikalija koja se ne veže	Prosječno $< 0,5$

IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

60. Vidjeti stavak 24. u odjeljku „SASTAVNICE TESTA VEZIVANJA NA hrER” ove ispitne metode.

Dodatak 3.1.

POPIS TERMINA

[³H]E2: 17 β -estradiol radioaktivno obilježen tricijem.

DCC: ugljen premazan dekstranom.

E2: neobilježeni 17 β -estradiol (inertni).

Testni pufer: 10 mM Tris-HCl, pH-vrijednosti 7,4, s 1 mM EDTA-e, 1 mM EGTA-e, 1 mM NaVO₃, 10 % glicerola, 0,2 mM leupeptina, 1 mM ditiotreitola i 10 mg/ml goveđeg serumskog albumina.

hrER α : ljudski rekombinantni estrogenski receptor alfa (domena vezivanja liganda).

Ponavljanje: jedna od više jažica s istim sadržajem u istoj koncentraciji koje se ispituju istodobno u istom ciklusu. U ovom se protokolu svaka koncentracija ispitivane kemikalije ispituje u tri ponavljanja; drugim riječima, tri se ponavljanja ispituju istovremeno pri svakoj koncentraciji ispitivane kemikalije.

Ciklus: cijeli skup jažica s istodobno provedenim testovima na mikrotitracijskoj ploči koji daje sve informacije potrebne za opis vezivanja ispitivane kemikalije na receptor hrER α (odnosno ukupni [³H]-17 β -estradiol dodan testnoj jažici, najveće vezivanje [³H]-17 β -estradiola na receptore hrER α , nespecifično vezivanje i ukupno vezivanje pri različitim koncentracijama ispitivane kemikalije). Ciklus se može sastojati od samo jedne testne jažice (tj. ponovljeni uzorak) po koncentraciji, ali zbog toga što se ovim protokolom zahtijeva ispitivanje u tri ponavljanja, jedan se ciklus sastoji od tri testne jažice po koncentraciji. Osim toga, ovim se protokolom zahtijevaju tri neovisna (tj. neistodobna) ciklusa po kemikaliji.

Dodatak 3.2.

RASPORED JAŽICA ZA TEST KONKURENTSKOG VEZIVANJA

Ploča	Položaj	Ponavljanje	Vrsta jažice	Šifra jažice	Šifra koncentracije	Poč. konc. konkurenta (M)	Glavni hrER (μl)	Vol. pufera (μl)	Vol. obilježi. (rad. obilj. E2) (μl)	Vol. s ploče za razrj. (μl)	Konačni volumen (μl)	Konačna koncentracija konkurenta (M)
S	A1	1	slijepa proba	BK	BK1	–	–	–	–	–	–	–
S	A2	2	slijepa proba	BK	BK2	–	–	–	–	–	–	–
S	A3	3	slijepa proba	BK	BK3	–	–	–	–	–	–	–
S	B1	1	neobilježeni E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	B2	2	neobilježeni E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	B3	3	neobilježeni E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	C1	1	neobilježeni E2	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	C2	2	neobilježeni E2	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	C3	3	neobilježeni E2	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	D1	1	neobilježeni E2	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	D2	2	neobilježeni E2	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	D3	3	neobilježeni E2	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	E1	1	neobilježeni E2	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	E2	2	neobilježeni E2	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	E3	3	neobilježeni E2	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	F1	1	neobilježeni E2	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	F2	2	neobilježeni E2	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	F3	3	neobilježeni E2	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	G1	1	neobilježeni E2	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	G2	2	neobilježeni E2	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	G3	3	neobilježeni E2	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	H1	1	neobilježeni E2	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	H2	2	neobilježeni E2	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	H3	3	neobilježeni E2	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	A4	1	noretinodrel	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	A5	2	noretinodrel	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	A6	3	noretinodrel	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B4	1	noretinodrel	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	B5	2	noretinodrel	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	B6	3	noretinodrel	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C4	1	noretinodrel	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	C5	2	noretinodrel	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	C6	3	noretinodrel	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	D4	1	noretinodrel	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D5	2	noretinodrel	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D6	3	noretinodrel	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	E4	1	noretinodrel	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07
S	E5	2	noretinodrel	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07
S	E6	3	noretinodrel	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07
S	F4	1	noretinodrel	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F5	2	noretinodrel	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F6	3	noretinodrel	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	G4	1	noretinodrel	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	G5	2	noretinodrel	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	G6	3	noretinodrel	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06

Raspored jažica za test konkurentskog vezivanja

Ploča	Položaj	Ponavljjanje	Vrsta jažice	Šifra jažice	Šifra koncentracije	Početna koncentracija konkurenta (M)	Glavni hrER (μl)	Vol. pufera (μl)	Vol. obiljež. (rad. obilj. E2) (μl)	Volumen s ploče za razrj. (μl)	Konačni volumen (μl)	Konačna koncentracija konkurenta (M)
S	H4	1	noretinodrel	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	H5	2	noretinodrel	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	H6	3	noretinodrel	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	A7	1	OTES	N	OTES1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	A8	2	OTES	N	OTES1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	A9	3	OTES	N	OTES1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	B7	1	OTES	N	OTES2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B8	2	OTES	N	OTES2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B9	3	OTES	N	OTES2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	C7	1	OTES	N	OTES3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C8	2	OTES	N	OTES3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C9	3	OTES	N	OTES3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	D7	1	OTES	N	OTES4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D8	2	OTES	N	OTES4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D9	3	OTES	N	OTES4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	E7	1	OTES	N	OTES5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	E8	2	OTES	N	OTES5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	E9	3	OTES	N	OTES5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F7	1	OTES	N	OTES6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
S	F8	2	OTES	N	OTES6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
S	F9	3	OTES	N	OTES6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
S	G7	1	OTES	N	OTES7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
S	G8	2	OTES	N	OTES7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
S	G9	3	OTES	N	OTES7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
S	H7	1	OTES	N	OTES8DBP7	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
S	H8	2	OTES	N	OTES88	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
S	H9	3	OTES	N	OTES8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
S	A10	1	ukupno vezivanje	TB	TB1	–	30	60	10	–	100	–
S	A11	2	ukupno vezivanje	TB	TB2	–	30	60	10	–	100	–
S	A12	3	ukupno vezivanje	TB	TB3	–	30	60	10	–	100	–
S	B10	4	ukupno vezivanje	TB	TB4	–	30	60	10	–	100	–
S	B11	5	ukupno vezivanje	TB	TB5	–	30	60	10	–	100	–
S	B12	6	ukupno vezivanje	TB	TB6	–	30	60	10	–	100	–
S	C10	1	neobilježeni E2	NSB	S1	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	C11	2	neobilježeni E2	NSB	S2	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	C12	3	neobilježeni E2	NSB	S3	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D10	4	neobilježeni E2	NSB	S4	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D11	5	neobilježeni E2	NSB	S5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D12	6	neobilježeni E2	NSB	S6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	E10	1	kontr. s puferom	BC	BC1	–	–	100	–	–	100	–
S	E11	2	kontr. s puferom	BC	BC2	–	–	100	–	–	100	–
S	E12	3	kontr. s puferom	BC	BC3	–	–	100	–	–	100	–
S	F10	4	kontr. s puferom	BC	BC4	–	–	100	–	–	100	–
S	F11	5	kontr. s puferom	BC	BC5	–	–	100	–	–	100	–
S	F12	6	kontr. s puferom	BC	BC6	–	–	100	–	–	100	–
S	G10*	1	sl. proba (za rad.) radioakt.	H1	H1	–	90	–	10	–	100	–
S	G11*	2	sl. proba (za rad.) radioakt.	H2	H2	–	90	–	10	–	100	–
S	G12*	3	sl. proba (za rad.) radioakt.	H3	H3	–	90	–	10	–	100	–
S	H10*	4	sl. proba (za rad.) radioakt.	H4	H4	–	90	–	10	–	100	–
S	H11*	5	sl. proba (za rad.) radioakt.	H5	H5	–	90	–	10	–	100	–
S	H12	6	sl. proba (za rad.) radioakt.	H6	H6	–	90	–	10	–	100	–

*: Napominje se da su „radioaktivne” jažice prazne tijekom inkubacije. Dodaje se 10 μl samo za brojenje scintilacijom.

Raspored jažica za test konkurentskog vezivanja

Ploča	Položaj	Ponavljjanje	Vrsta jažice	Šifra jažice	Šifra koncentracije	Početna koncentracija konkurenta (M)	Glavni hrER (μl)	Vol. pufera (μl)	Vol. obiljež. (rad. obilj. E2) (μl)	Volumen s ploče za razrjeđ.(μl)	Konačni volumen (μl)	Konačna koncentracija konkurenta (M)
P1	A1	1	nepoznato 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A2	2	nepoznato 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A3	3	nepoznato 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B1	1	nepoznato 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B2	2	nepoznato 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B3	3	nepoznato 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C1	1	nepoznato 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C2	2	nepoznato 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C3	3	nepoznato 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D1	1	nepoznato 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D2	2	nepoznato 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D3	3	nepoznato 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E1	1	nepoznato 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E2	2	nepoznato 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E3	3	nepoznato 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F1	1	nepoznato 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F2	2	nepoznato 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F3	3	nepoznato 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G1	1	nepoznato 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G2	2	nepoznato 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G3	3	nepoznato 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H1	1	nepoznato 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H2	2	nepoznato 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H3	3	nepoznato 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A4	1	nepoznato 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A5	2	nepoznato 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A6	3	nepoznato 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B4	1	nepoznato 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B5	2	nepoznato 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B6	3	nepoznato 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C4	1	nepoznato 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C5	2	nepoznato 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C6	3	nepoznato 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D4	1	nepoznato 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D5	2	nepoznato 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D6	3	nepoznato 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E4	1	nepoznato 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E5	2	nepoznato 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E6	3	nepoznato 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F4	1	nepoznato 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F5	2	nepoznato 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F6	3	nepoznato 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G4	1	nepoznato 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G5	2	nepoznato 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G6	3	nepoznato 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H4	1	nepoznato 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H5	2	nepoznato 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H6	3	nepoznato 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03

Raspored jažica za test konkurentskog vezivanja

Ploča	Položaj	Ponavljjanje	Vrsta jažice	Šifra jažice	Šifra koncentracije	Početna koncentracija konkurenta (M)	Glavni hrER (μl)	Vol. pufera (μl)	Vol. obiljež. (rad. obilj. E2) (μl)	Volumen s ploče za razrjeđ. (μl)	Konačni volumen (μl)	Konačna koncentracija konkurenta (M)
P1	A7	1	nepoznato 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A8	2	nepoznato 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A9	3	nepoznato 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B7	1	nepoznato 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B8	2	nepoznato 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B9	3	nepoznato 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C7	1	nepoznato 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C8	2	nepoznato 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C9	3	nepoznato 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D7	1	nepoznato 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D8	2	nepoznato 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D9	3	nepoznato 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E7	1	nepoznato 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E8	2	nepoznato 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E9	3	nepoznato 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F7	1	nepoznato 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F8	2	nepoznato 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F9	3	nepoznato 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G7	1	nepoznato 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G8	2	nepoznato 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G9	3	nepoznato 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H7	1	nepoznato 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H8	2	nepoznato 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H9	3	nepoznato 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A10	1	kontr. E2 (max)	S	E2max1	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	A11	2	kontr. E2 (max)	S	E2max2	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	A12	3	kontr. E2 (max)	S	E2max3	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	B10	1	kontr. E2 (IC50)	S	E2IC501	E2IC50x10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	B11	2	kontr. E2 (IC50)	S	E2IC502	E2IC50x10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	B12	3	kontr. E2 (IC50)	S	E2IC503	E2IC50x10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	C10	1	kontrolni NE	S	Nemax1	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	C11	2	kontrolni NE	S	Nemax2	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	C12	3	kontrolni NE	S	Nemax3	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	D10	1	kontrolni NE	S	NEIC501	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	D11	2	kontrolni NE	S	NEIC502	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	D12	3	kontrolni NE	S	NEIC503	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	E10	1	neob. E2 (visoki)	NSB	S1	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E11	2	neob. E2 (visoki)	NSB	S2	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E12	3	neob. E2 (visoki)	NSB	S3	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F10	4	neob. E2 (visoki)	NSB	S4	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F11	5	neob. E2 (visoki)	NSB	S5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F12	6	neob. E2 (visoki)	NSB	S6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	G10	1	ukupno vezivanje	TB	TB1	–	30	60	10	–	100	–
P1	G11	2	ukupno vezivanje	TB	TB2	–	30	60	10	–	100	–
P1	G12	3	ukupno vezivanje	TB	TB3	–	30	60	10	–	100	–
P1	H10	4	ukupno vezivanje	TB	TB4	–	30	60	10	–	100	–
P1	H11	5	ukupno vezivanje	TB	TB5	–	30	60	10	–	100	–
P1	H12	6	ukupno vezivanje	TB	TB6	–	30	60	10	–	100	–

Dodatak 4.

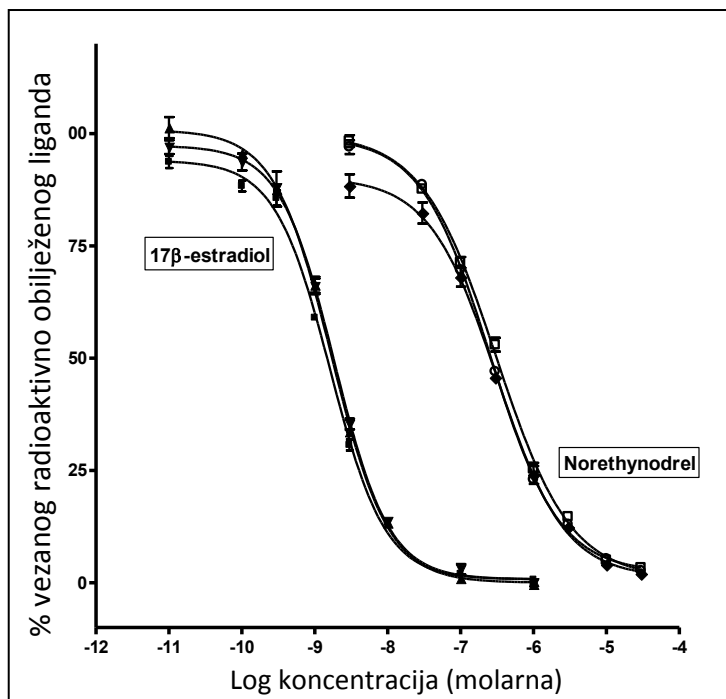
RAZMATRANJA ZA ANALIZU PODATAKA IZ TESTA KONKURENTSKOG VEZIVANJA NA HRER

1. Testom konkurentskog vezivanja na hrER α mjeri se vezivanje jedne koncentracije [^3H]-17 β -estradiola u prisutnosti povećavajućih koncentracija ispitivane kemikalije. Krivulja konkurentskog vezivanja grafički se prikazuje kao specifično vezivanje [^3H]-17 β -estradiola u odnosu na koncentraciju (log10 jedinice) konkurenta. Koncentracija ispitivane kemikalije koja inhibira 50 % najvećeg specifičnog vezivanja [^3H]-17 β -estradiola čini IC₅₀.

Analiza podataka za referentni estrogen i kemikaliju koja se slabo veže (1.)

2. Podaci iz kontrolnih ciklusa transformiraju se (tj. postotak specifičnog vezivanja [^3H]-17 β -estradiola i log koncentracija kontrolne kemikalije) radi daljnje analize. Procjene za vrijednosti log(IC₅₀) za pozitivne kontrole (npr. referentni estrogen i kemikalija koja se slabo veže) treba utvrditi upotrebom primjerenog softvera za nelinearno prilagođavanje krivulje kako bi se prilagodila Hillova jednadžba s četiri parametra (npr. BioSoft; GraphPad Prism) (2.). Vrh, dno, nagib i log(IC₅₀) obično se mogu ostaviti neograničenima pri prilagođavanju tih krivulja. Pri utvrđivanju najbolje prilagodbe treba upotrijebiti temeljitu regresiju osim ako se obrazloži drugačiji odabir. Treba navesti metodu odabranu za temeljitu regresiju. Za FW i CERI-jev test nije bio potreban ispravak za potrošnju liganada, ali po potrebi može se razmotriti njegova upotreba. Nakon početne analize svaku krivulju vezivanja treba pregledati kako bi se osigurala odgovarajuća prilagodba modelu. Relativni afinitet vezivanja (RBA) za kemikaliju koja se slabo veže može se izračunati kao postotak log (IC₅₀) za kemikaliju koja se slabo veže u odnosu na log (IC₅₀) za 17 β -estradiol. Rezultate za pozitivne kontrole i kontrolu s kemikalijom koja se ne veže treba procijeniti upotrebom kriterija uspješnosti testa i kriterija prihvatljivosti kako je opisano u ovoj ispitnoj metodi (stavak 20.), Dodatku 2. (FW test, stavci od 41. do 51.) i Dodatku 3. (CERI-jev test, stavci od 41. do 51.). Primjeri tri ciklusa za referentni estrogen i kemikaliju koja se slabo veže prikazani su na slici 1.

Slika 1. Primjeri krivulja konkurentskog vezivanja za referentni estrogen i kontrolnu kemikaliju koja se slabo veže

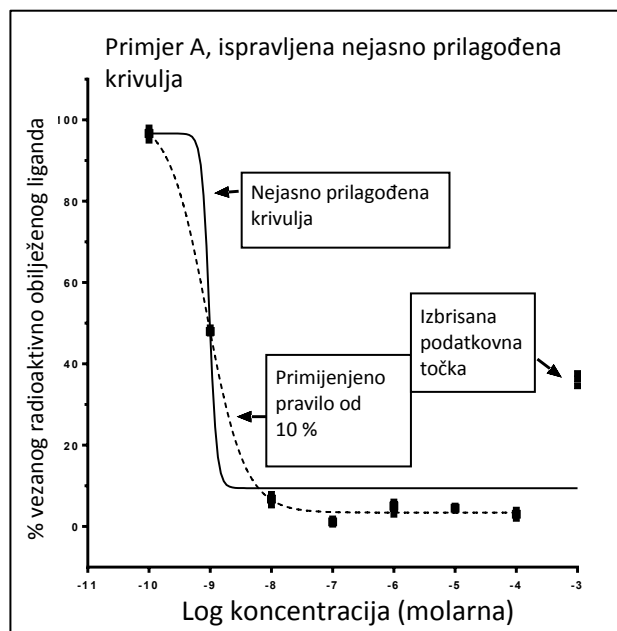


Analiza podataka za ispitivane kemikalije

3. Podatke za sve ispitivane kemikalije treba analizirati upotrebom stupnjevito pristupa kako bi se osiguralo da su podaci primjereno analizirani i da je svaka krivulja konkurentskog vezivanja pravilno razvrstana. Svaki ciklus za ispitivanu kemikaliju prvo treba podvrgnuti standardiziranoj analizi podataka koja je identična analizi upotrijebljenoj za referentni estrogen i kontrolne kemikalije koje se slabo vežu. Kada se to dovrši, treba izvršiti tehnički pregled parametara prilagođene krivulje i vizualni pregled mjere u kojoj podaci odgovaraju izrađenoj krivulji konkurentskog vezivanja za svaki ciklus. Tijekom tog tehničkog pregleda dobar pokazatelj toga da su test i analiza podataka pravilno provedeni uključuju opažanje smanjenja postotka specifično vezanog [^3H]-17 β -estradiola koje ovisi o koncentraciji, malu varijabilnost među tehničkim ponavljanjima pri svakoj koncentraciji kemikalije i dosljednost u parametrima prilagodbe među tri ciklusa. Pri pregledu rezultata iz svakog ciklusa za ispitivanu kemikaliju treba primijeniti stručnu prosudbu, a podaci upotrijebljeni za razvrstavanje ispitivane kemikalije kao kemikalije koja se veže ili koja se ne veže trebaju biti znanstveno opravdani.
4. Povremeno se mogu pojaviti primjeri podataka za koje je potrebna posebna pozornost kako bi se pravilno analizirali i protumačili podaci o vezivanju na hrER. U prethodnim studijama uočeno je da postoje slučajevi u kojima analiza i tumačenje podataka o konkurentskom vezivanju na receptore mogu biti složeni zbog povećanja postotka

specifičnog vezivanja kod ispitivanja kemikalija pri najvišim koncentracijama (slika 2.). To je poznata poteškoća do koje dolazi kod upotrebe protokola za niz testova konkurentskog vezivanja na receptore (3). U tim se slučajevima pri nižim koncentracijama uočava odgovor koji ovisi o koncentraciji, ali kako se koncentracija ispitivane kemikalije približava granici topljivosti prestaje se smanjivati istiskivanje [^3H]17 β -estradiola. U tim slučajevima podaci za više koncentracije pokazuju da je dosegnuto biološko ograničenje testa. Na primjer, ta je pojava često povezana s netopljivošću kemikalije i taloženjem pri visokim koncentracijama ili može odražavati i prekoračenje sposobnosti ugljena premazanog dekstranom da veže slobodni radioaktivno obilježeni ligand tijekom postupka odvajanja pri najvišim koncentracijama kemikalija. Zadržavanje tih podatkovnih točaka tijekom prilagođavanja podataka o konkurentskom vezivanju u sigmoidnu krivulju ponekad može dovesti do pogrešnog razvrstavanja ispitivane kemikalije u pogledu potencijala vezivanja na estrogenski receptor (slika 2.). Kako bi se to izbjeglo, protokol za FW i CERi-jev test vezivanja na hrER uključuje opciju da se iz analize isključe podatkovne točke kod kojih je srednja vrijednost ponovljenih uzoraka za postotak specifično vezanog [^3H]17 β -estradiola za 10 % ili više veća iznad srednje vrijednosti uočene pri nižoj koncentraciji (to se obično naziva pravilo od 10 %). Ovo se pravilo može upotrijebiti samo jednom za određenu krivulju i mora ostati dovoljno podataka za najmanje šest koncentracija tako da se krivulju može točno razvrstati.

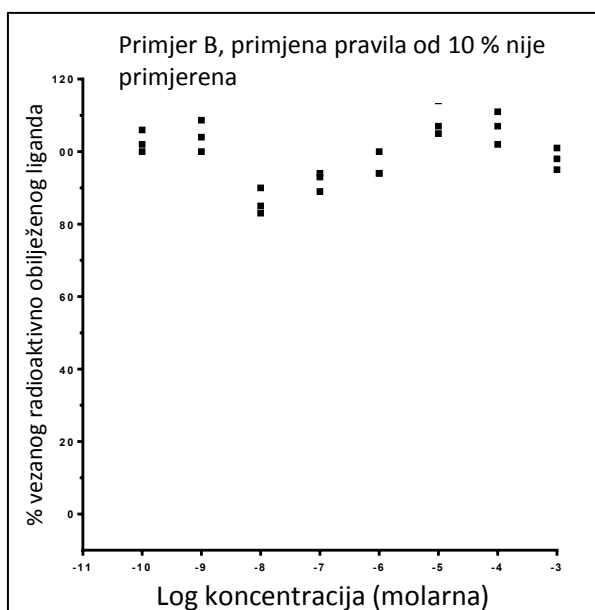
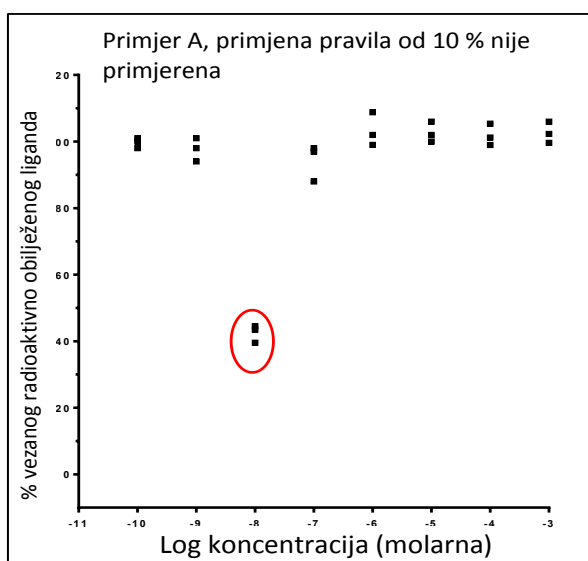
Slika 2.: Primjeri, krivulje konkurentskog vezivanja s upotrebom pravila od 10 % i bez te upotrebe.



- Primjerenu upotrebu pravila od 10 % za ispravak tih krivulja treba pažljivo razmotriti i sačuvati za slučajeve u kojima postoji snažna indikacija da je riječ o kemikaliji koja se veže na receptor hrER. Tijekom provedbe pokusa za validacijsku studiju FW testa

vezivanja na hrER uočeno je da pravilo od 10 % ponekad ima neplaniranu i nepredviđenu posljedicu. Kemikalije koje nisu bile u interakciji s receptorom (tj. prave kemikalije koje se ne vežu) često su pokazivale varijabilnost u pogledu 100-postotnog vezivanja radioaktivno označenog liganda koja je bila veća od 10 % u cijelom rasponu ispitanih koncentracija. Ako se najniža vrijednost javila pri niskoj koncentraciji, upotrebom pravila od 10 % iz analize bi se potencijalno mogli izbrisati podaci iz svih viših koncentracija iako bi te koncentracije mogle biti korisne u utvrđivanju toga da se kemikalija ne veže. Na slici 3. prikazani su primjeri slučajeva u kojima upotreba pravila od 10 % nije primjerena.

Slika 3.: Primjeri, podaci o konkurentskom vezivanju gdje nije primjerena upotreba pravila od 10 %



Referentni dokumenti

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), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
2. Motulsky H. and Christopoulos A. (2003). *The law of mass action, In Fitting Models to Biological Data Using Linear and Non-linear Regression*. GraphPad Software Inc., San Diego, CA, str. 187.–191. www.graphpad.com/manuals/Prism4/RegressionBook.pdf.
3. Laws SC, Yavanhxay S, Cooper RL, Eldridge JC. (2006). *Nature of the Binding Interaction for 50 Structurally Diverse Chemicals with Rat Estrogen Receptors*. Toxicological Sci. 94(1):46.–56.