



Az Európai Unió
Tanácsa

Brüsszel, 2019. február 25.
(OR. en)

6800/19
ADD 1

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

FEDŐLAP

Küldi:	az Európai Bizottság
Az átvétel dátuma:	2019. február 22.
Címzett:	a Tanács Főtitkársága
Biz. dok. sz.:	Annex to D060575/02
Tárgy:	Melléklet a következőhöz: A BIZOTTSÁG (EU) .../... RENDELETE (XXX) a vegyi anyagok regisztrálásáról, értékeléséről, engedélyezéséről és korlátozásáról (REACH) szóló 1907/2006/EK európai parlamenti és a tanácsi rendelet értelmében alkalmazandó vizsgálati módszerek megállapításáról szóló 440/2008/EK rendelet mellékletének a műszaki fejlődéshez való hozzáigazítás céljából történő módosításáról

Mellékelten továbbítjuk a delegációknak a D060575/02 számú dokumentum mellékletét.

Melléklet: Annex to D060575/02

HU

MELLÉKLET

A 440/2008/EK rendelet melléklete a következőképpen módosul:

1. A B. részben a B.4. fejezet helyébe a következő szöveg lép:

„B.4. AKUT BŐRIRRITÁCIÓ/BŐRKORRÓZIÓ**BEVEZETÉS**

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 404. vizsgálati iránymutatásában (2015) leírt módszerrel. A vegyi anyagok vizsgálatára vonatkozó OECD-iránymutatás rendszeres időközönként felülvizsgálat tárgyát képezi annak biztosítása érdekében, hogy tükrözze a rendelkezésre álló legjobb tudományos ismereteket. Az OECD 404. vizsgálati iránymutatásának felülvizsgálata során kiemelt figyelmet szenteltek az állatjóléti szempontokkal kapcsolatos lehetséges jobbító beavatkozásoknak és a vizsgálati vegyi anyaggal kapcsolatban rendelkezésre álló összes információ kiértékelésének, hogy ezáltal elkerülhető legyen a laboratóriumi állatokon történő szükségtelen kísérletezés. Az OECD (eredetileg 1981-ben elfogadott, majd 1992-ben, 2002-ben és 2015-ben átdolgozott) 404. vizsgálati iránymutatásának frissített kiadása hivatkozik a bőrirritáció/bőrkorrózió vonatkozásában végzett vizsgálatok és értékelések integrált megközelítéseiről (IATA) szóló iránymutatásra (1), amely a bőrirritációs és bőrkorróziós vizsgálatok moduláris megközelítésére tesz javaslatot. Az integrált vizsgálati és értékelési megközelítés több, információforrásokat és adatelemző eszközöket csoportosító modult ismertet, továbbá iránymutatást nyújt arra nézve, hogy i. miként integrálhatók és használhatók az ismert vizsgálati és nem vizsgálati eredetű adatok a vegyi anyagok potenciális bőrirritációs és bőrkorróziós hatásainak felmérésére, és ii. javaslatot tesz a további vizsgálatok szükségességékor alkalmazható megközelítésre (1). Emellett az iránymutatás javasolja, hogy – amennyiben szükséges – az előzetes *in vivo* vizsgálat során az állatra ne egyszerre, hanem időben egymás után helyezték fel a három tesztapaszt.
2. A bőrirritáció és a bőrkorrózió fogalommeghatározása a vizsgálati módszer függelékében szerepel.

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK

3. A tudományos észszerűség és az állatok kímélete érdekében nem szabad *in vivo* vizsgálatokat végezni mindaddig, amíg a vizsgálati vegyi anyag potenciális

bőrkorróziós/bőrirritációs hatására vonatkozó összes rendelkezésre álló adatra el nem végezték a bizonyítékok súlyán alapuló (WoE) elemzést a bőrirritáció/bőrkorrózió vonatkozásában végzett vizsgálatok és értékelések integrált megközelítéseiről (IATA) szóló iránymutatás szerint, vagyis az iránymutatás három részének és az azokhoz tartozó moduloknak megfelelően (1). Röviden: az 1. rész az ismert adatokkal foglalkozik hét modulon keresztül, amelyek lefedik a humán adatokat, az *in vivo* adatokat, az *in vitro* adatokat, a fizikai-kémiai tulajdonságokkal kapcsolatos adatokat (pl. a pH-értéket, különösen az erős savasságot vagy lúgosságot) és a nem vizsgálatalapú módszereket. A 2. rész az adatok WoE-elemzésének elvégzését írja le. Amennyiben a WoE-elemzés nem meggyőző, tovább kell haladni a 3. rész szerint, amelynek során további vizsgálatokat kell végezni, először *in vitro* módszerekkel, majd legvégső esetben *in vivo* vizsgálatokkal. Az elemzés célja tehát az, hogy csökkentse az *in vivo* bőrkorróziós/bőrirritációs vizsgálatokat azon vizsgálati vegyi anyagok esetében, amelyekre az említett két végpont tekintetében más vizsgálatokból már elegendő bizonyíték áll rendelkezésre.

AZ *IN VIVO* VIZSGÁLAT ELVE

4. A vizsgálati vegyi anyagot egyetlen dózisban kell alkalmazni a kísérleti állat bőrén; a vizsgált állat nem kezelt bőrfelületei szolgálnak kontrollként. Az irritáció/korrózió mértékét meghatározott időközönként kell ellenőrizni és értékelni, továbbá a hatások teljes kiértékelése érdekében részletesebben is ismertetni. A vizsgálat időtartamának elég hosszúnak kell lennie ahhoz, hogy meg lehessen határozni a megfigyelt hatások visszafordíthatóságát vagy visszafordíthatatlanságát.
5. A vizsgálat bármely fázisában tartósan súlyos stressz és/vagy fájdalom jeleit mutató állatokat kíméletesen le kell ölni, és a vizsgálati vegyi anyagot ennek megfelelően kell értékelni. Az elhullás közelében lévő és súlyosan szenvedő állatok kíméletes leölésére vonatkozó döntés kritériumai külön iránymutatás (2) tárgyát képezik.

AZ *IN VIVO* VIZSGÁLAT ELŐKÉSZÍTÉSE

Az állatfaj kiválasztása

6. A preferált laboratóriumi állatfaj az albínó nyúl, és egészséges, fiatal felnőtt állatokat kell használni. Más fajok alkalmazását megfelelően indokolni kell.

Az állatok előkészítése

7. A vizsgálat előtt körülbelül 24 órával el kell távolítani az állat szőrzetét úgy, hogy teljesen le kell nyírni az állat törzsének dorzális területét. Ügyelni kell arra, hogy eközben ne dörzsölődjön ki az állat bőre, és csak olyan állatokat szabad használni, amelyek bőre ép és egészséges.

8. Egyes nyúltörzsek szőrzete sűrű foltokban nő, amelyek az év egyes szakaszaiban még szembetűnőbbek. Az ilyen sűrű szőrzetnövekedéssel jellemzett részeket nem szabad vizsgálati területként használni.

Tartási és etetési körülmények

9. Az állatokat egyenként kell elhelyezni. Nyulak esetében a kísérleti állatok tartására szolgáló helyiség hőmérsékletének 20 °C-nak (± 3 °C) kell lennie. Noha a helyiség relatív páratartalmának legalább 30 %-nak kell lennie, és az – a takarítás időtartamától eltekintve – lehetőség szerint nem haladhatja meg a 70 %-ot, a célértéknek 50–60 % között kell lennie. A világítás legyen mesterséges; 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltakozásával. Az etetéshez standard laboratóriumi takarmány alkalmazható, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett.

VIZSGÁLATI ELJÁRÁS

A vizsgálati vegyi anyag alkalmazása

10. A vizsgálati vegyi anyagot egy kis (körülbelül 6 cm²-es) bőrterületre kell kijuttatni, majd egy géztapasszal le kell takarni, és nem irritáló ragasztószalaggal kell a helyén rögzíteni. Olyan esetekben, amikor a közvetlen alkalmazás nem megoldható (pl. folyadékok vagy egyes masszák esetében), a vizsgálati vegyi anyagot először a géztapaszra kell felvinni, és azután azt kell a bőrre helyezni. Az expozíciós idő tartamára a tapaszt lazán kell a bőrre rögzíteni egy megfelelő, félig záró kötés alkalmazásával. Amennyiben a vizsgálati vegyi anyagot a tapaszra viszik fel, azt úgy kell a bőrre rögzíteni, hogy megfelelő legyen a kontaktus, és a bőrön egyenletes legyen az anyag eloszlása. Gondoskodni kell arról, hogy az állat ne férhessen hozzá a tapaszhoz és ne nyelhesse le vagy lélegezhesse be a vizsgálati vegyi anyagot.
11. A folyékony vizsgálati vegyi anyagok adagolása rendszerint hígítás nélkül történik. Szilárd anyagok vizsgálatakor (amelyeket szükség esetén porrá lehet őrölni) a vizsgálati vegyi anyagot a lehető legkisebb, de a bőrrel való megfelelő kontaktus biztosításához a lehető legkisebb mennyiségű vízzel (vagy szükség esetén más megfelelő vivőanyaggal) kell nedvesíteni. Ha vivőanyagként nem vizet alkalmaznak, annak lehetőleg ne, vagy csak minimális bőrirritáló hatása legyen.
12. Ha megoldható, az általában 4 órás expozíciós idő végén az adott esetben megmaradt vizsgálati vegyi anyagot vízzel vagy megfelelő oldószerrel el kell távolítani, ügyelve arra, hogy ez ne befolyásolja a meglévő válaszreakciókat vagy a felhám épségét.

Dózis

13. A vizsgálat helyére 0,5 ml folyadékot vagy 0,5 g szilárd anyagot vagy pasztát kell felvinni.

Előzetes vizsgálat (*in vivo* bőrirritációs/bőrkorróziós vizsgálat egy állat felhasználásával)

14. Ha a bizonyítékok súlyán alapuló elemzés vagy korábbi *in vitro* vizsgálat alapján a vizsgálati vegyi anyag korróziós vagy irritáló hatásúnak minősül, illetve nem osztályozandó, általában nincsen szükség további *in vivo* vizsgálatokra. Amennyiben azonban indokoltnak látszik a további adatgyűjtés, az *in vivo* vizsgálatot először egy állaton kell elvégezni, az alábbi eljárás alkalmazásával. Az állatra egymást követően legfeljebb három tesztet lehet helyezni. Az első tesztet három perc után kell eltávolítani. Ha nem láthatók súlyos bőrreakciók, egy második tesztet helyeznek fel egy másik helyre, majd egy óra elteltével eltávolítják. Ha a megfigyelések ebben a szakaszban azt mutatják, hogy humánusan megengedhető az expozíció négy órára történő meghosszabbítása, egy harmadik tesztet is fel lehet helyezni, melyet négy óra múlva eltávolítanak és a válaszreakciót kiértékelik.
15. Ha a három egymás utáni expozíció bármelyike után korróziós hatás tapasztalható, a vizsgálatot azonnal be kell fejezni. Ha az utolsó teszt eltávolítása után sem figyelhető meg korróziós hatás, az állatot 14 napon át meg kell figyelni, kivéve, ha előbb jelentkezik korróziós hatás.
16. Azokban az esetekben, amikor a vizsgálati vegyi anyag várhatóan nem okoz korróziós hatást, de irritáló lehet, egyetlen tesztet kell helyezni egy állatra, négy óra időtartamra.

Megerősítő vizsgálat (*in vivo* bőrirritációs vizsgálat további állatok felhasználásával)

17. Ha az előzetes vizsgálat során nem figyelhető meg korróziós hatás, legfeljebb további két állaton egy-egy teszt és négyórás expozíciós idő alkalmazásával meg kell erősíteni az irritációt vagy a negatív válaszreakciókat. Ha az előzetes vizsgálat során irritációs válasz figyelhető meg, a megerősítő vizsgálat lépcsőzetesen vagy két további állat párhuzamos kezelésével is elvégezhető. Abban a kivételes esetben, ha nem végeznek előzetes vizsgálatot, két vagy három állatot lehet kezelni egy-egy tapasszal, amelyet négy óra múlva kell eltávolítani. Ha két állat használata esetén mindkettő ugyanolyan válaszreakciót mutat, további vizsgálatokra nincs szükség. Egyéb esetben egy harmadik állatot is be kell vonni a vizsgálatba. A nem egyértelmű válaszreakciókat esetlegesen további állatok bevonásával lehet értékelni.

Megfigyelési időszak

18. A megfigyelési időszak hosszát úgy kell megválasztani, hogy elegendő legyen a megfigyelt hatások visszafordíthatóságának teljes kiértékelésére. A vizsgálatot azonban azonnal meg kell szakítani, ha az állat tartósan súlyos fájdalom vagy stressz jeleit mutatja. A hatások visszafordíthatóságának meghatározásához az állatokat a tapaszok eltávolítása után legfeljebb 14 napig meg kell figyelni. Ha a visszafordíthatóság a 14 napos időszak vége előtt bebizonyosodik, a kísérletet ekkor kell befejezni.

Klinikai megfigyelések és a bőrreakciók értékelése

19. Minden állatnál meg kell vizsgálni a bőrpír (eritéma) vagy vizenyő (ödéma) jeleit és a válaszreakciókat a tapasz eltávolítása után 60 perccel, majd 24, 48 és 72 órával értékelni kell. Az egy állattal végzett előzetes vizsgálatban a vizsgálati területet a tapasz eltávolítása után azonnal is meg kell vizsgálni. A bőrreakciókat a csatolt táblázatban megadottak szerint kell értékelni és feljegyezni. Ha 72 óra elteltével sem irritációként, sem korrózióként nem értékelhető bőrkárosodás látható, a hatások visszafordíthatóságának meghatározásához szükség lehet a megfigyelések folytatására a 14. napig. Az irritáció megfigyelésén kívül minden lokális toxikus hatást, mint például a bőr zsírtartalmának csökkentését, és bármely káros szisztémás hatást (pl. a mérgezés klinikai tüneteire és a testtömegre gyakorolt hatást) részletesen le kell írni és fel kell jegyezni. A nem egyértelmű válaszreakciók tisztázása érdekében fontolóra kell venni kórszövettani vizsgálatok elvégzését is.
20. A bőrreakciók értékelése elkerülhetetlenül szubjektív. A bőrreakciók értékelésének harmonizálása és a vizsgáló laboratóriumok, illetve a megfigyelésekben és azok értékelésében részt vevők segítése érdekében a megfigyeléseket végző személyzetet megfelelően ki kell képezni az alkalmazott értékelő rendszer (lásd a csatolt táblázatot) használatára. Hasznos lehet egy, a bőrirritációk és más léziók értékelését ismertető, illusztrált útmutató is (3).

ADATOK ÉS JELENTÉS

21. A végleges vizsgálati jelentésben a vizsgálatok eredményeit táblázatos formában kell összefoglalni, amelynek a 24. pontban felsorolt tételek mindegyikét tartalmaznia kell.

Az eredmények értékelése

22. A bőrirritációs pontszámokat a léziók jellegével és súlyosságával, illetve visszafordíthatóságával vagy visszafordíthatatlanságával összefüggésben kell értékelni. Az egyes pontszámok nem jelentenek abszolút normát egy anyag irritációs tulajdonságai tekintetében, mivel a vizsgálandó anyag egyéb hatásait is értékelni kell. Az egyes pontszámokat ehelyett referenciaértékeknek kell tekinteni, amelyeket a vizsgálat során tett összes egyéb megfigyeléssel együttesen kell értékelni.
23. Az irritációs válaszreakciók értékelésekor figyelembe kell venni a bőrléziók visszafordíthatóságát. Ha az olyan válaszreakciók, mint a szőrhiány (korlátozott területen), a kóros elszarusodás (hiperkeratózis), a szövetszaporodás (hiperplázia) vagy a hámlás a 14 napos megfigyelési időszak végére sem múlnak el, a vizsgálati vegyi anyagot irritálónak kell tekinteni.

Vizsgálati jelentés

24. A vizsgálati jelentésnek a következő információkat kell tartalmaznia:

Az in vivo vizsgálatok indokolása:

- a korábban rendelkezésre álló vizsgálati adatok WoE-elemzése, beleértve a lépcsőzetes vizsgálati stratégia során nyert adatokat is;
- a korábbi vizsgálatokból rendelkezésre álló, vonatkozó adatok ismertetése;
- a vizsgálati stratégia egyes szakaszaiban nyert adatok;
- az elvégzett *in vitro* vizsgálatok, ezen belül az eljárások, illetve a vizsgált anyaggal és a referenciaanyagokkal kapott eredmények részleteinek ismertetése;
- WoE-elemzés az *in vivo* vizsgálat elvégzéséhez.

Vizsgálati vegyi anyag:

- Egy összetevőből álló anyag: kémiai azonosítás, például IUPAC- vagy CAS-névvel, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet alapján, tisztaság, adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb. alapján;
- ismeretlen vagy változó összetételű anyagok, több összetevőből álló anyagok és keverékek, komplex reakciótermékek vagy biológiai anyagok (UVCB-k): lehetőség szerint az összetevők kémiai azonosítója (lásd fent), mennyiségi előfordulása és releváns fizikai-kémiai tulajdonságai alapján jellemezve;
- fizikai megjelenés, vízdékonyság és további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok;
- eredet, gyártási szám, ha ismert;
- a vizsgálati vegyi anyag/kontrollanyag kezelése a vizsgálatot megelőzően, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés);
- a vizsgálati vegyi anyag stabilitása, felhasználási határideje vagy ismételt elemzésének napja, ha ismert;
- tárolási feltételek.

Vivőanyag:

- azonosítás, (adott esetben) koncentráció, alkalmazott térfogat;
- a vivőanyag megválasztásának indokolása.

Kísérleti állat(ok):

- a felhasznált faj/törzs, adott esetben az albínó nyúltól eltérő faj(ok) alkalmazásának indokolása;
- az állat(ok) száma nemenként;
- az egyes állatok testtömege a vizsgálat előtt és annak befejezésekor;

- életkor a vizsgálat kezdetén;
- az állat(ok) származása, tartásának körülményei, takarmánya stb.

Vizsgálati körülmények:

- az állat azon testrészének előkészítése, ahová felhelyezik a tapaszt;
- a felhasznált tapaszt típusának és a tapasztolási eljárásnak a részletes leírása;
- a vizsgálati vegyi anyag előkészítésének, alkalmazásának és eltávolításának részletes ismertetése.

Eredmények:

- az irritációs/korróziós válasz pontszámainak táblázatos formában történő megadása minden egyes állatra és minden egyes mérési időpontra vonatkozóan;
- az összes megfigyelt lézió ismertetése;
- a megfigyelt irritáció vagy korrózió jellegének és mértékének, illetve az esetleges kórszövettani eredményének a leíró jellegű ismertetése;
- a bőrirritáción és -korrózión kívüli egyéb káros lokális hatások (pl. a bőr zsírtartalmának csökkenése) és szisztémás hatások ismertetése.

Az eredmények értékelése

Következtetések

SZAKIRODALOM

- (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), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.
- (2) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998.
- (3) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 19), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

TÁBLÁZAT: A BŐRREAKCIÓK ÉRTÉKELÉSE**Bőrpír (eritéma) és pörkképződés**

Nincs bőrpír.....	0
Nagyon enyhe bőrpír (alig észlelhető).....	1
Jól kifejezett bőrpír.....	2
Közepes–súlyos mértékű bőrpír.....	3
Pörkképződésig fokozódó súlyos bőrpír (céklavörös szín), amely lehetetlenné teszi a bőrpír osztályozását... 4	
Elérhető maximális pontszám: 4	

Vizenyőképződés

Nincs vizenyő.....	0
Nagyon enyhe vizenyő (alig észlelhető).....	1
Enyhe vizenyő (a terület szélei az egyértelmű kiemelkedések miatt jól kifejezettek).....	2
Közepes súlyosságú vizenyő (körülbelül 1 mm-re emelkedik ki).....	3
Súlyos vizenyő (több mint 1 mm-re emelkedik ki és nagyobb, mint az expozíciós terület)....	4
Elérhető maximális pontszám: 4	

A nem egyértelmű válaszreakciókat kórszövettani vizsgálattal lehet tisztázni.

Függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Vegyí anyag: anyag vagy keverék.

Bőrirritáció: a vizsgálati vegyi anyag alkalmazását követően 4 órán belül megjelenő, visszafordítható bőrkárosodás.

Bőrkorrózió: a vizsgálati vegyi anyag alkalmazását követően négy órán belül megjelenő, visszafordíthatatlan bőrkárosodás, azaz a felhámon át az irhára is áttérjedő, látható szövetelhalás. A korróziós reakciót jellemzően fekélyek, vérzés, véres var, illetve a 14 napos megfigyelési időszak végén a bőr kifehéredése miatti elszíneződések, teljesen szőrtelen területek és hegek jellemzik. A kérdéses lézió értékeléséhez figyelembe kell venni a kórszövettant.

Vizsgálati vegyi anyag: az e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.”

2. A B. részben a B.17. fejezet helyébe a következő szöveg lép:

„B.17. EMLŐSSEJTEKEN HPRT ÉS XPRT GÉNNEL VÉGZETT *IN VITRO* GÉN MUTÁCIÓS VIZSGÁLATOK

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 476. vizsgálati iránymutatásával (2016). A vizsgálati módszereket a tudományos fejlődés, a változó szabályozási igények és az állatok kíméletének figyelembevételével rendszeresen felülvizsgálják. A B.17. vizsgálati módszer jelenlegi felülvizsgált változata a vizsgálat csaknem harminc éves alkalmazása során szerzett tapasztalatokat tükrözi, valamint annak a különálló, újonnan kifejlesztett módszernek az eredményeit, amelynek keretében timidin-kináz gén használatával végeznek emlőssejteken *in vitro* génmutációs vizsgálatokat. A B.17. vizsgálati módszer a genetikai toxikológiai vizsgálati módszerek sorozatának részét képezi. Az OECD kidolgozott egy, a genetikai toxikológiai vizsgálatokról tömör tájékoztatást nyújtó, az OECD genetikai toxikológiára vonatkozó vizsgálati iránymutatásainak közelmúltbeli változásait áttekintő dokumentumot (1).
2. Az emlőssejteken végzett *in vitro* génmutációs vizsgálat célja a vegyi anyagok által előidézett génmutációk észlelése. Az e vizsgálatokban használt sejtvonalak forward (előremutató) mutációkat mérnek riportergénekben, konkrétan az endogén hipoxantinguanin-foszforibozil-transzferáz génben (Hprt rágsálósejtekben és HPRT emberi sejtekben; e vizsgálati módszer keretében együttes megnevezésük Hprt-gén és HPRT-vizsgálat) és a xantin-guanin-foszforibozil-transzferáz (gpt) transzgénben (a továbbiakban: XPRT-vizsgálat). A HPRT-és XPRT-mutációvizsgálatok a genetikai események különböző spektrumait észlelik. A HPRT-vizsgálat által észlelt mutációs eseményeken (pl. bázispárok cseréje, leolvasási keret eltolódása, kisebb deléciók és inszerciók) túlmenően a gpt transzgén autoszomális helye lehetővé teszi a nagy mértékű deléciókból és esetlegesen a mitotikus rekombinációból eredő mutációk észlelését, amelyek HPRT-vizsgálattal nem észlelhetők, mivel a Hprt-gén az X kromoszómán helyezkedik el (2) (3) (4) (5) (6) (7). Szabályozási célra jelenleg az XPRT-vizsgálatot a HPRT-vizsgálatnál ritkábban alkalmazzák.
3. Az alkalmazott fogalom meghatározások az 1. függelékben találhatók.

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

4. Az *in vitro* végrehajtott vizsgálatok rendszerint külső forrásból származó metabolikus aktiválás használatát teszik szükségessé. Az exogén metabolikus aktivációs rendszer nem utánozza teljesen az *in vivo* körülményeket.

5. Ügyelni kell arra, hogy ne álljanak elő olyan körülmények, amelyek álpozitív – tehát nem a vizsgálati vegyi anyag és a sejt genetikai anyagának közvetlen kölcsönhatásából származó – eredményre (azaz a vizsgálati rendszerrel való esetleges kölcsönhatásra) vezetnének; ilyen körülmény többek között a pH-érték vagy az ozmolalitás változása (8) (9) (10), a tenyészközeg összetevőivel való kölcsönhatás (11) (12) vagy a túlzott mértékű citotoxicitás (13). A 19. pontban meghatározott, ajánlott citotoxicitási felső határértékeket meghaladó citotoxicitás a HPRT-vizsgálat szempontjából túlzott mértékűnek minősül.
6. A vizsgálati módszer tervezett szabályozási célt szolgáló adatgenerálás érdekében, keveréken történő alkalmazása előtt meg kell vizsgálni, hogy az megfelelő eredményeket biztosíthat-e erre a célra, és ha igen, miért. Ilyen megfontolások nem szükségesek, ha létezik a keverék vizsgálatára vonatkozó szabályozási követelmény.

A VIZSGÁLAT ELVE

7. Azok a mutáns sejtek, amelyek nem mutatnak Hprt-enzimaktivitást a HPRT-vizsgálatban vagy xpRT-enzimaktivitást az XPRT-vizsgálatban, rezisztensek a purinanalog 6-thioguanin (TG) citosztatikus hatásaival szemben. A Hprt- (a HPRT-vizsgálatban) vagy a gpt -(az XPRT-vizsgálatban) proficiens sejtek érzékenyek a TG-re, ami a celluláris metabolizmus gátlását okozza, és megállítja a további sejtosztódást. Tehát a mutáns sejtek képesek sejtburjánzásra TG jelenlétében, míg a normál sejtek, amelyek (a HPRT-vizsgálatban) Hprt-enzimet vagy (az XPRT-vizsgálatban) gpt-enzimet tartalmaznak, nem képesek erre.
8. Szuszpenzióban vagy egyrétegű (monolayer) tenyészetben növekvő sejteket megfelelő időtartamig (3–6 órán keresztül) külső forrásból származó metabolikus aktivációval és anélkül (lásd a 14. pontot) kezelik a vizsgálati vegyi anyaggal, majd a sejt kultúrát átültetik, hogy meghatározzák a citotoxicitást és lehetővé tegyék a fenotípusos expressziót a mutáns kiválasztása előtt (14) (15) (16) (17). A citotoxicitást a relatív túlélés alapján kell meghatározni, ami a közvetlenül a kezelést követően mért és a kezelés során tapasztalt sejtpusztulással kiigazított kolóniaképző képesség összevetve a negatív kontrollal (18. pont és 2. függelék). A kezelt tenyészeteket megfelelő, az egyes sejt vonalakra jellemző ideig tenyészközegben tartják, hogy lehetővé váljon az indukált mutációk közel optimális fenotípusos expressziója (ez általában legalább 7–9 napot igényel). A fenotípus expressziót követően a mutációs gyakoriságot úgy határozzák meg, hogy leültetnek ismert számú sejtet a szelekciós ágenszt tartalmazó tápoldatba a mutáns telepek kimutatására, valamint a szelekciós ágenszt nem tartalmazó tápoldatba a kolóniaképző képesség (életképesség) meghatározására. Megfelelő inkubációs idő után megszámlálják a telepeket. A mutációs gyakoriság kiszámításának alapja a mutáns telepek száma, kiigazítva a mutáns kiválasztásának idején mért kolóniaképző képességgel.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Előkészületek

Sejtek

9. A HPRT- és XPRT-vizsgálatokban használt sejttypusoknak bizonyítottan érzékenynek kell lenniük a kémiai mutagén anyagokra, magas kolóniaképző képességgel, stabil kariotípussal és stabil spontán mutációs gyakorisággal kell rendelkezniük. A HPRT-vizsgálatokhoz leggyakrabban használt sejtek közé tartoznak a CHO, CHL és V79-es kínai hörcsög sejtek, az L5178Y egér-limfómasejtek és a TK6-os humán limfoblasztoid sejtek (18) (19). Az XPRT-vizsgálathoz CHO-ból származó AS52-es sejteket használnak, amelyek tartalmazzák a gpt transzgént (és Hp^rt-génjüket kiütötték) (20) (21); a HPRT-vizsgálat AS52-es sejteken nem végezhető el, mert azok hp^rt-génjét kiütötték. Más sejt vonalak használatát indokolni és validálni kell.
10. A sejt vonalakat rutinszerűen ellenőrizni kell a modális kromoszómaszám stabilitása és az esetleges mikoplazma-fertőzés szempontjából (22) (23), és a sejtek nem használhatók fel, ha fertőzöttek vagy ha a modális kromoszómaszám megváltozott. A vizsgálólaboratóriumban használt sejtek rendes sejt ciklusidejét meg kell állapítani, és annak összhangban kell lennie a közzétett sejt jellemzőkkel. Az induló sejt készletben is ellenőrizni kell a spontán mutációs gyakoriságot, és a sejteket nem szabad felhasználni, ha a mutációs gyakoriság nem elfogadható.
11. A vizsgálatban való felhasználás előtt a sejt kultúrákat, amennyiben szükséges, meg kell tisztítani a jelen lévő mutáns sejtektől, például HAT-tápfolyadékban történő tenyésztéssel a HPRT-vizsgálatnál, és MPA-tápfolyadékban az XPRT-vizsgálatnál (5) (24) (lásd az 1. függelék). A megtisztított sejtek fagyasztással tartósíthatók, majd felolvasztva munkakészletként használhatók. Az újonnan felolvasztott munkakészlet azt követően használható fel a vizsgálathoz, hogy elérte szokásos megduplázódási idejét. XPRT-vizsgálat végzésekor a szokásos módon tenyésztett AS52-es sejtek számára olyan körülményeket kell biztosítani, amelyek garantálják a gpt-transzgén fennmaradását (20).

Tápfolyadék és tenyésztési körülmények

12. A tenyészetek fenntartására megfelelő tápfolyadékot és inkubációs feltételeket kell biztosítani (tenyésztőedények, 5 %-os CO₂-koncentrációjú, vízgőzzel telített levegő és 37 °C-os inkubációs hőmérséklet). A sejt tenyészeteket mindig olyan körülmények között kell tartani, amelyek biztosítják az exponenciális növekedési szakaszt. Különösen fontos a tenyészközeg és a tenyésztési körülmények olyan módon történő megválasztása, hogy azok biztosítsák az optimális növekedési feltételeket az expressziós időszak alatt, valamint azt, hogy mind a vad típusú, mind a mutáns sejt vonalak kolóniaképző képessége optimális legyen.

A tenyészetek előkészítése

13. A sejtvonalakat törzstenyészetekből kell felszaporítani, majd tápfolyadékba leoltani olyan sejtszámmal, hogy a sejtek a szuszpenziókban vagy az egyrétegű tenyészetekben a teljes kezelési és expressziós időszakban exponenciálisan növekedjenek (az egyrétegű tenyészetekben növvő sejtek esetében például kerülendő a konfluencia).

Metabolikus aktiválás

14. Nem megfelelő endogén metabolikus képességű sejtek használata esetén exogén metabolikus aktivációs rendszereket kell alkalmazni. A leggyakrabban használt rendszer – amely egyéb indok fennállása hiányában általánosságban ajánlott – a kofaktorokkal kiegészített mitokondriális frakció (S9), amelyet rágcső (általában patkány) olyan enzimindukáló reagensekkel kezelt májából izolálnak, mint az Aroclor 1254 (25) (26) (27) (28), vagy a fenobarbitál és β -naftoflavon kombinációja (29) (30) (31) (32). Ez utóbbi kombináció nem ütközik a környezetben tartósan megmaradó szerves szennyező anyagokról szóló stockholmi egyezményrel (33), és kimutatták róla, hogy hatékonysága a vegyes funkciójú oxidázok indukálásához az Aroclor 1254-ével megegyező (29) (31). Az S9 frakció jellemzően 1–2 térfogatszázalék koncentrációban használatos, de a végső vizsgálati közegben 10 térfogatszázalékra növelhető. Az alkalmazott exogén metabolikus aktivációs rendszer vagy metabolikus induktor típusának és koncentrációjának megválasztását befolyásolhatja a vizsgált anyagok osztálya (34) (35) (36).

A vizsgálati vegyi anyag előkészítése

15. A szilárd halmazállapotú vizsgálati vegyi anyagokat a sejtek kezelése előtt megfelelő oldószerrel elő kell kezelni, és szükség esetén hígítani kell (lásd a 16. pontot). A folyékony halmazállapotú vizsgálati vegyi anyagok közvetlenül hozzáadhatók a vizsgálati rendszerhez és/vagy hígíthatók a vizsgálati rendszer kezelése előtt. A gáz halmazállapotú vagy illékony vizsgálati vegyi anyagokat a standard protokollok megfelelő módosításával, például légmentesen lezárt tenyésztőedényekben történő kezeléssel kell vizsgálni (37) (38). A vizsgálati vegyi anyagot tartalmazó készítményeket közvetlenül a kezelés előtt kell előállítani, kivéve, ha az anyag tárolás során való stabilitása bizonyított.

VIZSGÁLATI KÖRÜLMÉNYEK

Oldószerek

16. Az oldószert oly módon kell kiválasztani, hogy optimális oldhatóságot biztosítson a vizsgálati vegyi anyagnak, ugyanakkor ne befolyásolja hátrányosan a vizsgálat lebonyolítását, vagyis ne változtassa meg a sejtek növekedését, ne befolyásolja a vizsgálati vegyi anyag integritását, ne lépjen reakcióba a tenyésztőedényekkel, és ne károsítsa a metabolikus aktivációs rendszert. Amennyiben lehetséges, először valamilyen vizes oldószer (vagy tápfolyadék) használatát érdemes megfontolni. Jól bevált oldószer például a víz és a dimetil-szulfoxid. A szerves oldószerek koncentrációja a végleges kezelési közegben általában ne haladja meg az 1 térfogatszázalékot, a vizes oldószereké (sóoldat

vagy víz) pedig a 10 térfogatszázalékot. Nem bevált oldószerek (például etanol vagy aceton) használata esetében a vizsgálati vegyi anyaggal és a vizsgálati rendszerrel való összeegyeztethetőségükre utaló adatokkal kell alátámasztani használatukat és azt, hogy a használt koncentrációnál nem genotoxikusak. Alátámasztó adatok hiányában szükséges nem kezelt kontrollok alkalmazása is (lásd az 1. függelék) annak bizonyítására, hogy a kiválasztott oldószer nem vált ki káros vagy mutagén hatást.

A citotoxicitás mérése és az expozíciós koncentrációk kiválasztása

17. A vizsgálati vegyi anyag legmagasabb koncentrációjának meghatározása során kerülendő az olyan koncentráció, amely hamis pozitív válaszreakciókat válthat ki, mint például a túlzott citotoxicitást okozó koncentráció (lásd a 20. pontot), a tápfolyadékban történő kicsapódást okozó koncentráció (lásd a 21. pontot), illetve a pH vagy az ozmolalítás jelentős változását okozó koncentráció (lásd az 5. pontot). Ha a vizsgálati vegyi anyag a hozzáadásakor jelentős változást okoz a tenyészközeg pH-jában, a pH a kezelésre szolgáló végleges tenyészközeg pufferekkelésével kiigazítható, hogy elkerülhetők legyenek a hamis pozitív eredmények és megfelelő tenyésztési feltételeket lehessen fenntartani.
18. A koncentráció kiválasztása a citotoxicitás és egyéb megfontolások alapján történik (lásd a 20–22. pontot). Bár a fő vizsgálatban alkalmazandó koncentrációk jobb meghatározásához egy előzetes vizsgálatban érdemes meghatározni a citotoxicitást, az előzetes vizsgálat nem követelmény. Még ha sor is kerül a citotoxicitás előzetes meghatározására, a fő vizsgálat során minden kultúrára el kell végezni a citotoxicitás mérését. A citotoxicitást a relatív túlélés alapján kell értékelni, amely a közvetlenül a kezelést követően átültetett sejtek kolóniaképző képessége (CE), kiigazítva a kezelés során bekövetkezett sejtpusztulással, majd összevetve a negatív kontrollok (ezek túlélési aránya 100 %-nak tekintendő) kiigazított kolóniaképző képességével (a képletet lásd a 2. függelékben).
19. Legalább négy, az elfogadhatósági kritériumokat (megfelelő citotoxicitás, sejtszám stb.) teljesítő vizsgálati koncentrációt ki kell értékelni (az oldószeres és a pozitív kontrollokon túl). Bár két párhuzamos tenyészet használata ajánlott, az egyes vizsgált koncentrációknál párhuzamos vagy szimpla kezelt tenyészetek használhatók. A független párhuzamos tenyészetekben adott koncentráció mellett kapott eredményeket külön kell dokumentálni, az adatelemzéshez azonban összevonhatók (17). Az alacsony citotoxicitást vagy a citotoxicitás hiányát mutató vizsgálati vegyi anyagok esetében rendszerint megközelítőleg kétszeres-háromszoros koncentrációs intervallumok helyénvalóak. Citotoxicitás esetén a választott vizsgálati koncentrációknak le kell fedniük a citotoxicitást okozó koncentrációtól az azon koncentrációkig terjedő tartományt, ahol mérsékelt vagy alacsony a citotoxicitás, illetve nem jelentkezik citotoxicitás. Számos vizsgálati vegyi anyagnak meredek a koncentráció-válasz görbéje, és annak érdekében, hogy a citotoxicitás teljes tartományát le lehessen fedni, vagy részletesen meg lehessen vizsgálni a koncentráció-válasz összefüggést, szükség lehet egymáshoz közelebbi koncentrációk és négynél több

koncentráció használatára, különösen olyan helyzetekben, ahol megismételt kísérlet szükséges (lásd a 43. pontot). Négynél több koncentráció alkalmazásának különösen szimpla tenyészetek alkalmazása esetében lehet jelentősége.

20. Ha a legnagyobb koncentráció a citotoxicitáson alapul, a legmagasabb koncentrációval 10 és 20 % közötti relatív túlélési arányt kell megcélózni. A kizárólag 10 %-os vagy az alatti relatív túlélésnél jelentkező pozitív eredmények kiértékelése során körültekintően kell eljárni (43. pont).
21. A legalacsonyabb oldhatatlan koncentrációnál alacsonyabb koncentrációk mellett nem citotoxikus, nehezen oldható vizsgálati vegyi anyagok esetében a legmagasabb analizált koncentrációnak a vizsgálati vegyi anyaggal történő kezelés végén szemmel vagy inverz mikroszkóp segítségével látható zavarosságot vagy kicsapódást kell okoznia. Még abban az esetben is, ha a citotoxicitás a legalacsonyabb oldhatatlan koncentráció felett jön létre, ajánlatos egyetlen egy, zavarosságot vagy látható kicsapódást okozó koncentrációt vizsgálni, mivel a kicsapódás fals hatásokat eredményezhet. A kicsapódást okozó koncentrációnál ügyelni kell annak biztosítására, hogy a kicsapódás ne zavarja a vizsgálat lebonyolítását. Hasznos lehet a tápfolyadékban való oldhatóság meghatározása a kísérlet előtt.
22. Ha nem figyelhető meg kicsapódás vagy korlátozó citotoxicitás, a legmagasabb vizsgálati koncentrációnak 10 mM-nek, 2 mg/ml-nek vagy 2 µl/ml-nek kell megfelelnie, melyek közül a legalacsonyabb a mérvado (39) (40). Ha a vizsgálati vegyi anyag nem meghatározott összetételű, például ismeretlen vagy változó összetételű anyag, komplex reakciótermékek vagy biológiai anyagok (vagyis úgynevezett ismeretlen vagy változó összetételű vegyi anyagok (UVCB-k)) (41), környezeti extraktum stb., előfordulhat, hogy kellő citotoxicitás hiányában a legmagasabb koncentrációnak magasabbnak (például 5 mg/ml-nek) kell lennie ahhoz, hogy növekedjen az egyes összetevők koncentrációja. Megjegyzendő azonban, hogy ezek a követelmények eltérőek lehetnek a humán gyógyszerek esetében (42).

Kontrollok

23. Minden kísérleti körülménynél párhuzamos negatív kontrollokat kell használni (lásd a 16. pontot), amelyeknél csak oldószert alkalmaznak a tenyészközegben, és a kezelésük ugyanolyan módon történik, mint a kezelt tenyészeteké.
24. Párhuzamos pozitív kontrollok szükségesek annak igazolására, hogy a laboratórium képes az alkalmazott vizsgálati protokoll feltételei mellett mutagének azonosítására, valamint adott esetben az exogén metabolikus aktivációs rendszer eredményességének igazolására. Pozitív kontrollokra vonatkozó példák az alábbi 1. táblázatban találhatók. Indokolt esetben pozitív kontrollként alternatív anyagok használhatók. Mivel az emlőssejtek genetikai toxicitás szempontjából végzett *in vitro* vizsgálatait kellően szabványosítottak, az exogén

metabolikus aktiváló rendszerrel vagy anélkül végzett kezeléseket alkalmazó vizsgálatok elvégezhetők mindössze egy – metabolikus aktiválást igénylő – pozitív kontrollal. Ebben az esetben ezen egyetlen pozitív kontroll válaszreakciója a metabolikus aktiváló rendszer aktivitását és a vizsgálati rendszer reagálóképességét is bizonyítja. Mindegyik pozitív kontrollt egy vagy több olyan koncentrációban kell alkalmazni, amely a háttérértékekhez viszonyítva reprodukálható és kimutatható növekedést okoz, hogy bizonyítani lehessen a vizsgálati rendszer érzékenységét, és a választ nem veszélyeztetheti a vizsgálati módszerben meghatározott határértékeket meghaladó citotoxicitás (lásd a 20. pontot).

1. táblázat: A laboratóriumok jártasságának értékeléséhez és a pozitív kontrollok kiválasztásához ajánlott referenciaanyagok.

Metabolikus aktivációs körülmények	Lókusz	Anyag és CAS-szám
Exogén metabolikus aktiválás nélkül	<i>Hprt</i>	Etil-metán-szulfonát [CAS-szám: 62-50-0] Etil-nitrozo-karbamid [CAS-szám: 759-73-9] 4-Nitro-kinolin-1-oxid [CAS-szám: 56-57-5]
	<i>xprt</i>	Sztreptonigrin [CAS-szám: 3930-19-6] Mitomicin-C [CAS-szám: 50-07-7]
Exogén metabolikus aktiválással	<i>Hprt</i>	3-Metil-kolantrén [CAS-szám: 56-49-5] 7,12-Dimetil-benzantracén [CAS-szám: 57-97-6] Benzo[a]pirén [CAS-szám: 50-32-8]
	<i>xprt</i>	Benzo[a]pirén [CAS-szám: 50-32-8]

ELJÁRÁS

Kezelés a vizsgálati vegyi anyaggal

25. A proliferáló sejteket metabolikus aktivációs rendszer jelenlétében és hiányában kezelik a vizsgálati vegyi anyaggal. Az expozíciónak megfelelő időtartamig kell tartania (ez rendszerint 3–6 óra).
26. Az egyes vizsgálati (kontroll és kezelt) tenyészetekhez a vizsgálat bármely szakaszában alkalmazott minimális sejtszámnak a spontán mutációs gyakoriságon kell alapulnia. Általános iránymutatásként annyi sejtet kell kezelni és passzálni, amely elegendő ahhoz, hogy a vizsgálat minden szakaszában valamennyi tenyészetben előforduljon 10 spontán mutáció (17). A spontán mutációs gyakoriság rendszerint 5 és 20×10^{-6} közé esik. Az 5×10^{-6} spontán mutációs gyakoriság érdekében, valamint hogy biztosítani lehessen a spontán mutációk megfelelő számát (10 vagy több), még a kezelés során 90 %-os citotoxicitást (10 %-os relatív túlélést) okozó koncentrációk mellett kezelt tenyészetek esetében is legalább 20×10^6 sejt kezelése szükséges. Emellett az expressziós időszak során elegendő számú (2 milliónál soha nem kevesebb) sejtet kell tenyészteni majd leültetni a mutáns kiválasztásához (17).

A fenotípusos expresszió ideje és a mutációs gyakoriság mérése

27. A kezelési időszak után a sejteket tovább kell tenyészteni, hogy a mutáns fenotípus kifejlődhessen. Általában 7–9 nap elegendő a frissen indukált Hp^rt- és xp^rt-mutánsok közel optimális fenotípusos expressziójához (43) (44). Ezen időszak alatt a sejteket az exponenciális növekedésük fenntartása érdekében rendszeresen át kell ültetni. A fenotípusos expressziót követően a sejteket újból leültetik a szelekciós ágens (6-tioguanint) tartalmazó, illetve szelekciós ágens nélküli tápfolyadékba, hogy a kiválasztás időpontjában meg lehessen határozni a mutánsok számát, illetve a kolóniaképző képességet. A leültetés egyrétegű tenyészetek esetében végezhető tenyésztőedényekben, vagy sejtszuspenzió esetén mikrotiter lemezekben. A mutánsok kiválasztásához a sejteket olyan sűrűségben kell átültetni, amely biztosítja a mutánsok optimális kinyerését (azaz elkerülhetővé teszi a metabolikus együttműködést) (17). A lemezeket a telepek optimális növekedését lehetővé tévő ideig (pl. 7–12 napig) inkubálni kell, és meg kell számolni a telepeket. A mutációs gyakoriság kiszámításának alapja a mutáns telepek száma, kiigazítva a mutánsok kiválasztásának idején mért kolóniaképző képességgel (a képleteket lásd a 2. függelékben).

A laboratórium jártassága

28. A laboratóriumoknak a vizsgálat rutinszerű alkalmazása előtti elegendő tapasztalat igazolása érdekében kísérletsorozatot kell végrehajtaniuk referenciaként szolgáló, különböző mechanizmussal ható pozitív anyagokkal (legalább egy metabolikus aktiválással és legalább egy metabolikus aktiválás nélkül ható, az 1. táblázatban felsoroltak közül kiválasztott anyaggal), és különböző negatív kontrollokkal (különböző oldószerek/vivőanyagok használatával). E pozitív és negatív kontrollok válaszreakcióinak összhangban kell lenniük a szakirodalommal. Ez nem vonatkozik azokra a laboratóriumokra, amelyek tapasztalattal rendelkeznek, azaz amelyeknek a rendelkezésére áll a 30–33. pontban meghatározott, történeti adatokat tartalmazó adatbázis.
29. A pozitív kontrollként kiválasztott anyagokat (lásd a 25. pontban szereplő 1. táblázatot) metabolikus aktiválás nélkül és metabolikus aktiválással is meg kell vizsgálni a laboratórium mutagén hatású vegyi anyagok kimutatásában és a metabolikus aktivációs rendszer hatékonyságának meghatározásában való jártasságának bizonyítására, valamint be kell mutatni, hogy a laboratórium megfelelően végzi a kezelés alatt a sejtenyésztest, a fenotípusos expressziót és a mutánsok kiválasztását, továbbá, hogy a kiértékelési eljárások is megfelelőek. A vizsgálati rendszer érzékenysége és dinamikus tartományának bizonyítása érdekében a kiválasztott anyagok koncentrációtartományát úgy kell megválasztani, hogy reprodukálható és koncentrációval összefüggő növekedést biztosítson a háttérértékekhez viszonyítva.

Történeti kontrolladatok

30. A laboratóriumnak meg kell állapítania a következőket:

- a pozitív történeti kontrollok tartománya és eloszlása,
 - a negatív (nem kezelt, oldószeres) történeti kontrollok tartománya és eloszlása.
31. A negatív történeti kontrollok eloszlásához kapcsolódó első adatgyűjtés során a párhuzamos negatív kontrolloknak összhangban kell lenniük a kontrollokra vonatkozóan közzétett adatokkal (22). Amint több kísérleti adat is felvételre kerül a kontrollok eloszlásához, a párhuzamos negatív kontrolloknak ideális esetben az eloszlás 95 %-os ellenőrzési határértékén belül kell lenniük (17) (45) (46).
32. A laboratórium negatív történeti kontrollokat tartalmazó adatbázisát első lépésként legalább 10 kísérlettel kell kiépíteni, de az adatbázisnak lehetőség szerint legalább 20, összehasonlítható kísérleti körülmények között végzett kísérletet kell tartalmaznia. A laboratóriumoknak minőségellenőrzési módszereket, például ellenőrzési diagramokat (C-diagramokat vagy X-bar diagramokat (47)) kell alkalmazniuk annak meghatározására, hogy a pozitív és a negatív kontrollokra vonatkozó adataik mennyire változóak, valamint annak bizonyítására, hogy a laboratóriumukban a módszertan „ellenőrzés alatt” áll (46). A történeti adatok összeállításának és felhasználásának módjára (azaz az adatok történeti adatok közé történő felvételének és azok közül való kizárásának kritériumaira, valamint egy adott kísérlet elfogadhatósági kritériumaira) vonatkozó további ajánlások a szakirodalomban találhatók (45).
33. A negatív kontrollokra vonatkozó adatoknak tartalmazniuk kell a szimpla tenyészetből vagy lehetőség szerint a párhuzamos tenyészetekből származó mutációs gyakoriságot, ahogyan az a 23. pontban szerepel. A párhuzamos negatív kontrolloknak ideális esetben a laboratórium negatív történeti kontrollokat tartalmazó adatbázisa szerinti eloszlás 95 %-os ellenőrzési határértékén belül kell lenniük (17) (45) (46). Amennyiben a párhuzamos negatív kontrollokra vonatkozó adatok a 95 %-os ellenőrzési határértéken kívül esnek, akkor számíthatók be a kontrollok történeti eloszlásába, ha ezek az adatok nem szélsőségesen kiugró értékek, továbbá bizonyíték van arra, hogy a vizsgálati rendszer „ellenőrzés alatt áll” (lásd fent), valamint arra, hogy nem áll fenn szakmai vagy emberi mulasztás.
34. A kísérleti protokoll bármely módosítását meg kell vizsgálni abból a szempontból, hogy összhangban van-e a laboratórium meglévő történeti kontrolladatbázisaival. Jelentősebb következtetlenségek fennállása esetén új történeti kontrolladatbázist kell létrehozni.

ADATOK ÉS JELENTÉS

Az eredmények értékelése

35. Az eredmények értékelésének tartalmaznia kell a (relatív túlélési arányban kifejezett) citotoxicitás kiszámításához szükséges valamennyi adatot. Az adatoknak mind a kezelt, mind a kontrolltenyészetek esetén magukban kell foglalniuk a kezelés végén mért

sejtszámot, a közvetlenül a kezelés után átültetett sejtek számát és a telepek számát (illetve mikrotiter módszer használata esetén a telepet nem tartalmazó lyukak számát). Az egyes tenyészetek relatív túlélését a párhuzamos oldószeres kontrollhoz viszonyított százalékarányban kell kifejezni (a fogalommeghatározásokat lásd az 1. függelékben).

36. Az eredmények bemutatásának tartalmaznia kell ezenfelül a mutációs gyakoriság kiszámításához szükséges valamennyi adatot. A kezelt tenyészetekre és a kontrolltenyészetekre vonatkozó adatoknak ki kell terjedniük: (1) a szelekciós ágenssel és anélkül leültetett sejtek számára (a mutánsok kiválasztása céljából történő leültetés időpontjában), valamint (2) a szelekciós ágens tartalmazó és nem tartalmazó lemezek számolt telepek számára (illetve mikrotiter módszer használata esetén a telepet nem tartalmazó lyukak számára). A mutációs gyakoriság kiszámításának alapja a mutáns telepek száma (a szelekciós ágens tartalmazó lemezeken) kiigazítva a (szelekciós ágens nem tartalmazó lemezeken mért) kolóniaképző képességgel. A mutációs gyakoriságot az 1 millió életképes sejtre jutó mutáns sejtek számaként kell kifejezni (a fogalommeghatározásokat lásd az 1. függelékben).
37. Fel kell jegyezni az egyes tenyészetekhez tartozó adatokat. Ezenkívül az összes adatot össze kell foglalni táblázatos formában.

Elfogadhatósági kritériumok

38. Egy-egy vizsgálat elfogadhatósága az alábbi kritériumokon alapul:

- A párhuzamos negatív kontroll a 33. pont szerint foglalható bele a laboratórium negatív történeti kontrollokat tartalmazó adatbázisába.
- A párhuzamos pozitív kontrolloknak (lásd a 24. pontot) a pozitív történeti kontrollokat tartalmazó adatbázisban generált válaszreakciókkal összeegyeztethető válaszokat, valamint a párhuzamos negatív kontrollhoz viszonyítva statisztikailag szignifikáns növekedést kell előidézniük.
- Két kísérleti körülmény (metabolikus aktiválással és metabolikus aktiválás nélkül történő) vizsgálatára került sor, kivéve, ha az egyik pozitív eredményeket hozott (lásd a 25. pontot).
- Megfelelő számú sejt és koncentráció elemezhető (25., 26. és 19. pont).
- A legmagasabb koncentráció kiválasztására vonatkozó kritériumok összhangban vannak a 20., 21. és 22. pontban ismertetett kritériumokkal.

Az eredmények értékelése és értelmezése

39. Amennyiben valamennyi elfogadhatósági kritérium teljesül, a vizsgálati vegyi anyag egyértelműen pozitívnak minősül, ha a vizsgált kísérleti körülmények bármelyikében:

- legalább az egyik vizsgálati koncentráció statisztikailag szignifikáns növekedést mutat a párhuzamos negatív kontrollhoz viszonyítva,
- a megfelelő trendpróbával történő értékelés arra utal, hogy a növekedés a koncentrációval összefügg,
- ezen eredmények bármelyike a negatív történeti kontrolladatok eloszlásán (például Poisson-eloszlású 95 %-os ellenőrzési határértéken) kívül esik; lásd a 33. pontot).

Ezen kritériumok mindegyikének teljesülése esetén úgy tekintendő, hogy a vizsgálati vegyi anyag ebben a vizsgálati rendszerben képes génmutációkat előidézni a tenyésztett emlőssejtekben. A legmegfelelőbb statisztikai módszerekre vonatkozó ajánlások megtalálhatók a szakirodalomban (46) (48).

40. Amennyiben valamennyi elfogadhatósági kritérium teljesül, a vizsgálati vegyi anyag egyértelműen negatívnak minősül, ha valamennyi vizsgált kísérleti körülmény esetén fennáll, hogy:

- a vizsgálati koncentrációk egyike sem mutat statisztikailag szignifikáns növekedést a párhuzamos negatív kontrollhoz viszonyítva,
- a megfelelő trendpróbával végzett értékelés nem mutat koncentrációval összefüggő növekedést,
- valamennyi eredmény a negatív történeti kontrolladatok eloszlásán (például Poisson-eloszlású 95 %-os ellenőrzési határértéken) belül van; lásd a 33. pontot).

Ezt követően úgy tekintendő, hogy a vizsgálati vegyi anyag ebben a vizsgálati rendszerben nem képes génmutációkat előidézni a tenyésztett emlőssejtekben.

41. Az egyértelműen pozitív vagy negatív válasz igazolása nem követelmény.

42. Olyan esetekben, amikor a válaszreakció – a fentiekben leírtak szerint – nem egyértelműen negatív vagy pozitív, illetve egy adott eredmény biológiai relevanciája megállapításának alátámasztása érdekében az adatokat szakértői vélemény és/vagy további vizsgálatok alapján kell értékelni. Hasznos lehet egy megismételt kísérlet lehetőleg módosított kísérleti körülmények (például a koncentrációk felosztása, más [S9-es koncentráció vagy S9 eredetű] metabolikus aktiválási feltételek) melletti elvégzése.

43. Ritka esetekben az adatkészlet még további vizsgálatok után is eleve kizárja a pozitív vagy negatív eredményekre vonatkozó következtetést. Ezért a vizsgálati vegyi anyag válaszreakcióját kétértelműnek kell minősíteni (amit úgy kell értelmezni, hogy egyenlő valószínűséggel tekinthető pozitívnak és negatívnak).

Vizsgálati jelentés

44. A vizsgálati jelentésnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálati vegyi anyag:

- eredet, gyártási szám, felhasználási határidő, ha rendelkezésre áll;
- a vizsgálati vegyi anyag stabilitása, ha ismert;
- a vizsgálati vegyi anyag oldhatósága és stabilitása az oldószerben, ha ismert;
- adott esetben a pH-érték, az ozmolalitás és a kicsapódás mérése abban a tápfolyadékban, amelyhez a vizsgálati vegyi anyagot hozzáadták.

Egy összetevőből álló anyag:

- fizikai megjelenés, vízzoldékonyság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok;
- kémiai azonosítás, például IUPAC- vagy CAS-névvel, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet alapján, tisztaság, adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb. alapján

Több összetevőből álló anyag, UVCB-k és keverékek:

- amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosítója (lásd fent), mennyiségi előfordulása és releváns fizikai-kémiai tulajdonságai révén jellemezve.

Oldószer:

- az oldószer kiválasztásának indokolása;
- az oldószernek a végleges tápfolyadékban belüli aránya.

*Sejtek:**Laboratóriumi törzstenyészetek esetén:*

- a sejtvonalak típusa és eredete;
- a passzálások száma, ha rendelkezésre áll, és története a laboratóriumban;
- a kariotípus jellemzői és/vagy a modális kromoszómaszám;
- a sejtenyészetek fenntartásának módszerei.
- a mikoplazmamentesség;
- sejt megduplázódási ideje.

Vizsgálati körülmények:

- a koncentrációk kiválasztásának és a tenyészetek számának indokolása, beleértve például a citotoxicitási adatokat és az oldhatóságra vonatkozó korlátokat;
- a közeg összetétele, CO₂-koncentráció, páratartalom;

- a vizsgálati vegyi anyag koncentrációja a tápfolyadékban belüli végső koncentrációjaként kifejezve (például μg vagy mg/a tápfolyadék ml-e vagy mM-ja);
- a tápfolyadékhoz adott oldószer és vizsgálati vegyi anyag koncentrációja (és/vagy térfogata);
- inkubációs hőmérséklet;
- inkubációs idő;
- a kezelés időtartama;
- sejtsűrűség a kezelés időtartama alatt;
- a metabolikus aktivációs rendszer típusa és összetétele (az S9 eredete, az S9 keverék elkészítési módszerei, az S9 keverék és az S9 koncentrációja vagy térfogata a végleges tápfolyadékban, az S9 minőségellenőrzése);
- pozitív és negatív kontrollként szolgáló anyagok, végső koncentrációk az egyes kezelési körülmények esetén;
- az expressziós időszak hossza (beleértve a leültetett sejtek számát, a szubkultúrákat és a tápfolyadékok cseréjét, ha szükséges);
- a szelekciós ágens neve és koncentrációja;
- a vizsgálatok elfogadhatósági kritériumai;
- az életképes és mutáns sejtek számának megállapítására használt módszerek;
- a citotoxicitás mérésére alkalmazott módszerek;
- a citotoxicitás és az alkalmazott módszer szempontjából lényeges kiegészítő információk;
- a leültetést követően végzett inkubálás időtartama;
- azok a kritériumok, amelyek meghatározzák, hogy a vizsgálatok pozitívnak, negatívnak vagy többféleképpen értelmezhetőnek tekintendők-e;
- a pH-érték, az ozmolalitás és a kicsapódás meghatározására alkalmazott módszerek.

Eredmények:

- az egyes tenyészetek esetében kezelt sejtek és átültetett sejtek száma;
- a citotoxicitás mérése és egyéb megfigyelések, ha vannak ilyenek;
- a kicsapódás jelei és a meghatározás időpontja;
- a szelektív és nem szelektív folyadékba leültetett sejtek száma;
- a telepek száma a nem szelektív közegben és a rezisztens telepek száma a szelektív közegben, valamint az ezeknél tapasztalható mutációs gyakoriság;
- amennyiben lehetséges, a koncentráció-válasz összefüggés;

- a párhuzamos negatív (oldószeres) és a pozitív kontrollokra vonatkozó adatok (koncentrációk és oldószeresek);
- a történeti negatív (oldószeres) és a pozitív kontrollokra vonatkozó adatok, a tartományok, az átlagok, a szórás és a konfidencia-intervallum (pl. 95 %) megadásával, továbbá az adatok száma;
- statisztikai elemzések (az egyes tenyészetek és adott esetben az összevont párhuzamos tenyészetek tekintetében), valamint p-értékek, ha meghatározásra kerültek.

Az eredmények értékelése.

Következtetések

SZAKIRODALOM

- (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, Párizs.
- (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., USA, 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. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Eds.), Cambridge University Press, pp. 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. o.
- (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. (Előkészület alatt álló kézirat).
- (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., 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, 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. In: *In vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, de Serres F.J., Fouts J.R., Bend J.R. and Philpot R.M. (szerk.), Elsevier, North-Holland, 85-88. o.

- (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). A környezetben tartósan megmaradó szerves szennyező anyagokról szóló stockholmi egyezmény, az ENSZ Környezetvédelmi Programja (UNEP). Elérhető a következő címen: [<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) Krahn D.F., Barsky F.C. and McCooey K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (eds.) *Genotoxic Effects of Airborne Agents*. New York, Plenum, 91-103. o.
- (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). Hozzáférés a Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezettől kérhető.
- (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). Ismeretlen vagy változó összetételű vegyi anyagok, komplex reakciótermékek vagy biológiai anyagok: UVCB-k ,
- (42) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use. Elérhető a következő címen: [<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), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.
- (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. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Kirkland, D.J., (szerk.) Cambridge University Press, Cambridge, 141-154. o.
- (48) Fleiss J. L., Levin B., and Paik M. C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Bázispár-szubsztitúciót okozó mutagének: azok a vegyi anyagok, amelyek a bázispárok szubsztitúcióját okozzák a DNS-ben.

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Kolóniaképző képesség: azon alacsony sűrűséggel leültetett sejtek százalékaránya, amelyek képesek megszámlálható teleppé fejlődni.

Koncentrációk: a vizsgálati vegyi anyagnak a tápfolyadékon belüli végső koncentrációira utalnak.

Citotoxicitás: az e vizsgálati módszerbe tartozó vizsgálatok esetében a citotoxicitás a kezelt sejtek relatív túlélésének csökkenése a negatív kontrollhoz viszonyítva (lásd az adott pontot).

Forward (előremutató) mutáció: a mutáns alak szülőktől származó típusától eltérő olyan génmutáció, amely a kódolt protein enzimaktivitásának vagy funkciójának változását vagy elvesztését eredményezi.

Frameshiftet okozó mutagének: azok a vegyi anyagok, amelyek egy vagy több bázispár addícióját vagy delécióját okozzák a DNS-ben.

Genotoxikus: általános kifejezés, amely magába foglalja a DNS- vagy kromoszómakárosodás valamennyi típusát, köztük a DNS-töréseket, adduktok képződését, átrendeződéseket, mutációkat, kromoszómaaberrációkat és aneuploidiát. A genotoxikus hatások nem minden típusa eredményez mutációkat vagy stabil kromoszómakárosodást.

HAT-tápfolyadék: hipoxantint, aminopterint és timidint tartalmazó tápfolyadék, amelyet Hprt-mutánsok szelektálására alkalmaznak.

Mitotikus rekombináció: a mitózis során a homológ kromatidok rekombinációja, ami kettős szálú DNS-töréseket vagy a heterozigótaság elvesztését okozhatja.

MPA-tápfolyadék: xantint, adenint, timidint, aminopterint és mikofenolsavat tartalmazó tápfolyadék, amelyet Xprt-mutánsok szelektálására használnak.

Mutagén: örökletes elváltozást idéz elő a génekben lévő DNS-bázispár-szekvenciá(k)ban vagy a kromoszómák szerkezetében (kromoszómaaberrációk).

Mutációs gyakoriság: a megfigyelt mutáns telepek számának és a szelektív tápfolyadékba leültetett sejtek számának aránya, kiigazítva a szelekció idején mért kolóniaképző képességgel (vagy életképességgel).

Fenotípusos expresszió ideje: a kezelést követő időtartam, amely során a genetikai változás rögzül a genomban, és a korábban meglévő géntermékek olyan mértékben kiürülnek, hogy a fenotípus-tulajdonság megváltozik.

Relatív túlélés: A relatív túlélést a kezelés okozta citotoxicitás mértékeként használják. A relatív túlélés a közvetlenül a kezelést követően átültetett sejtek kolóniaképző képessége, kiigazítva a kezelés során bekövetkezett sejtpusztulással, majd összevetve a negatív kontrollok (túlélési arányuk 100 %-nak tekintendő) kolóniaképző képességével.

S9 májfrakciók: 9000 g centrifugálás utáni májhomogenátum felülúszója, azaz a nyers májextraktum.

S9 keverék: az S9 májfrakció és a metabolikus enzimaktivitáshoz szükséges kofaktorok keveréke.

Oldószeres kontroll: a csak a vizsgálati vegyi anyag feloldására használatos oldószert tartalmazó kontrolltenyészetek meghatározására szolgáló általános kifejezés.

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

Nem kezelt kontroll: nem kezelt (azaz sem a vizsgálati vegyi anyaggal, sem oldószerral nem kezelt), de a vizsgálati vegyi anyagot befogadó tenyészetekkel párhuzamosan és azonos módon feldolgozott tenyészetek.

UVCB: ismeretlen vagy változó összetételű vegyi anyagok, komplex reakciótermékek vagy biológiai anyagok.

2. függelék

A CITOTOXICITÁS ÉS A MUTÁCIÓS GYAKORISÁG MEGHATÁROZÁSÁRA SZOLGÁLÓ KÉPLETEK

A citotoxicitást a relatív túlélés alapján kell értékelni, ami a közvetlenül a kezelést követően átültetett sejtek kolóniaképző képessége (CE), kiigazítva a kezelés során bekövetkezett sejtpusztulással, majd összevetve a negatív kontrollok (túlélési arányuk 100 %-nak tekintendő) kiigazított kolóniaképző képességével (lásd alább a relatív túlélés kiszámítására szolgáló képletet).

A vizsgálati vegyi anyaggal kezelt tenyészetek kiigazított kolóniaképző készségét az alábbi módon kell meghatározni:

$$\text{Kiigazított kolóniaképző készség} = \frac{\text{A sejtek száma a kezelés végén}}{\text{A sejtek száma a kezelés kezdetén}}$$

A vizsgálati vegyi anyaggal kezelt tenyészetek relatív túlélését az alábbi módon kell meghatározni:

$$\text{Relatív túlélés} = \frac{\text{Kiigazított kolóniaképző készség kezelt tenyészetben}}{\text{Kiigazított kolóniaképző készség oldószeres kontrollban}} \times 100$$

A mutációs gyakoriság a szelektív tápfolyadékban lévő mutáns telepek kolóniaképző képességének és a nem szelektív tápfolyadék kolóniaképző képességének aránya, amelyet ugyanazon tenyészetre vonatkozva kell meghatározni, a szelekció időpontjában.

$$\text{Mutációs gyakoriság} = \frac{\text{Mutáns telepek kolóniaképző készsége szelektív médiumban}}{\text{Kolóniaképző készség nem szelektív közegben}}$$

Amikor lemezeket alkalmaznak a kolóniaképző képesség meghatározásához:

Kolóniaképző képesség = Telepek száma/leültetett sejtek száma.

Amikor mikrotiter lemezeket alkalmaznak a kolóniaképző képesség meghatározásához:

A mikrotiter lemezek egyes lyukaiban lévő telepek száma Poisson-eloszláson alapul.

Kolóniaképző képesség = $-\text{LnP}(0)$ /az egyes lyukakba leültetett sejtek száma

Ahol a $-\text{LnP}(0)$ az üres lyukak valószínűsíthető száma a leoltott lyukak számához képest, és az alábbi képlettel határozható meg:

$\text{LnP}(0) = -\text{Ln}(\text{üres lyukak száma}/\text{leültetett lyukak száma})$

3. A B. részben a B.22. fejezet helyébe a következő szöveg lép:

„B.22. DOMINÁNS LETÁLIS VIZSGÁLAT RÁGCSÁLÓKON

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 478. vizsgálati iránymutatásában (2016) leírt módszerrel. A vizsgálati módszereket a tudományos fejlődés, a változó szabályozási igények és az állatok kíméletére irányuló megfontolások figyelembevételével rendszeresen felülvizsgálják. A vizsgálati módszer jelenlegi felülvizsgált változata tükrözi a vizsgálat csaknem harminc éves alkalmazása során szerzett tapasztalatokat, valamint azon alapul, hogy ez a vizsgálat beépíthető más toxicitási vizsgálatokba, például fejlődési, reprodukciós vagy genotoxicitási vizsgálatokba, vagy azokkal együtt alkalmazható; mindazonáltal a vizsgálat – korlátaiból és a kísérleti állatok nagy számából fakadóan – nem alkalmas elsődleges módszerként való használatra, ehelyett kiegészítő vizsgálati módszerként alkalmazható kizárólag olyan esetekben, amikor más módszerrel nem lehet eleget tenni a szabályozási követelményeknek. A toxicitási vizsgálatok kombinálása révén jelentősen csökkenthető a toxicitási vizsgálatokban alkalmazandó állatok száma. Az OECD kidolgozott egy, a genetikai toxikológiai vizsgálatokról tömör tájékoztatást nyújtó, az OECD genetikai toxikológiára vonatkozó vizsgálati iránymutatásainak közelmúltbeli változásait áttekintő dokumentumot (1).
2. A domináns letális vizsgálat célja annak kimutatása, hogy egy adott vegyi anyag okoz-e a csírasejtekben kromoszóma-rendellenességre visszavezethető mutációkat. Emellett a domináns letális vizsgálat a genotoxicitás értékelése szempontjából is releváns, mert az *in vivo* metabolizmus, valamint a farmakokinetikai és a DNS-hibajavító eljárások tényezői – jóllehet fajoként eltérnek – aktívak és hozzájárulnak a reakcióhoz. A vizsgálati vegyi anyag beadását követően kimutatott domináns letális mutáció azt jelzi, hogy az adott vizsgálati vegyi anyag hatást gyakorolt a vizsgált állat csíraszöveire.
3. A domináns letális mutációk embrionális, illetve magzati elhalást okoznak. A vizsgálati vegyi anyag beadását követően kimutatott domináns letális mutáció azt jelzi, hogy az adott vizsgálati vegyi anyag a vizsgált állat esetében hatást gyakorolt a csírasejtekre.
4. A domináns letális vizsgálat hasznos a szomatikus *in vivo* végpontok használatával végzett vizsgálatok pozitív eredményének megerősítésére, továbbá releváns végpontja a csírasejtvonalon keresztül átörökölt genetikai betegségekben rejlő, embereket érintő veszélyek és kockázatok előrejelzésének. A vizsgálat ugyanakkor munkaigényes, és jelentős mennyiségű állat szükséges hozzá; következésképpen elvégzése rendkívül költséges és időigényes. Mivel a domináns letális mutációk spontán gyakorisága meglehetősen nagy, a vizsgálat általában korlátozott érzékenységgel bír a mutációs gyakoriság enyhe növekedésének észlelése terén.

5. A kulcsfontosságú fogalmak meghatározásai az 1. függelékben találhatók.

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK

6. A vizsgálatot leginkább egereken végzik (2) (3) (4), de egyes esetekben – amennyiben tudományosan indokolt – más fajok, például patkányok (5) (6) (7) (8) is megfelelőek lehetnek. A domináns letális hatások általában nagymérvű kromoszómakárosodásra (szerkezeti és számbeli rendellenességekre) vezethetők vissza (9) (10) (11), de a génmutáció sem zárható ki az okok közül. A domináns letális mutáció magában a csírasejtben, illetve a megtermékenyítést követően a korai embrióban alakul ki, az ivarsejt hibás működését nem idézi elő, ugyanakkor a megtermékenyített pete vagy a fejlődő embrió elhalását okozza.
7. Minden egyes hímet megfelelő időközönként egymás után szűz nőstényekkel pároztatnak. A kezelést követő pároztatások száma a domináns letális vizsgálat végső céljától függ (23. pont), és azt úgy kell meghatározni, hogy a hím csírasejt érésének összes fázisát értékelni lehessen a domináns letális hatás szempontjából (12).
8. Ha létezik arra vonatkozó bizonyíték, hogy a vizsgálati vegyi anyag vagy annak metabolitja(i) nem éri(k) el a herét, e vizsgálat alkalmazása nem megfelelő.

A VIZSGÁLAT ELVE

9. Általában hím állatokat kezelnek megfelelő expozíciós úton a vizsgálati vegyi anyaggal, és a kezelt állatokat kezeletlen szűz nőstényekkel pároztatják. Egymás után következő pároztatási időszakok alkalmazásával különféle csírasejttípusok vizsgálhatók. A pároztatást követően megfelelő idő elteltével a nőstényeken eutanáziát hajtanak végre, majd méhüket megvizsgálva megállapítják a beágyazódások, valamint az élő és elhalt embriók számát. Egy adott vizsgálati vegyi anyag domináns letalitásának meghatározásához egybevetik a kezelt csoportban egy nőstényre jutó élő, beágyazódott embriók számát a vivőanyag/oldószeres kontrollcsoportban egy nőstényre jutó élő, beágyazódott embriók számával. Az egy nőstényre jutó élettelen, beágyazódott embriók számának növekedése a kezelt csoportban a kontrollcsoportban tapasztalható hasonló adathoz képest a vizsgálati vegyi anyag által kiváltott, beágyazódás utáni veszteséget tükrözi. A beágyazódás utáni veszteség kiszámításához meghatározzák az elhalt és az összes beágyazódott embrió arányát a kezelt csoportban, majd összevetik azt a kontrollcsoport hasonló adatával. A beágyazódás előtti veszteség úgy becsülhető meg, hogy összehasonlítják a sárgatestek számából kivont összes beágyazódott embrió számát vagy az egy nőstényre jutó összes beágyazódott embrió számát a kezelt és kontrollcsoportokban.

A LABORATÓRIUM JÁRTASSÁGÁNAK IGAZOLÁSA

10. A vizsgálatban való jártasság igazolása érdekében a laboratóriumoknak bizonyítottan képesnek kell lenniük a közzétett adatok (például (13) (14) (15) (16) (17) (18)) szerinti domináns letalitási gyakoriság reprodukálására pozitív kontrollként szolgáló – például az 1. táblázatban felsorolt – anyagokkal (ideértve a gyenge reakciókat is) és vivőanyagok kontrollokkal, valamint a negatív kontrollokból származó adatoknak olyan gyakoriságot kell mutatniuk, amely összhangban áll az elfogadható adattartománnyal (lásd a fenti referenciákat) vagy a laboratóriumi történeti kontrollok eloszlásával, ha rendelkezésre állnak történeti adatok.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Előkészületek

Az állatfaj kiválasztása

11. Egészséges, ivarérett, általánosan használt laboratóriumi állattörzsekből származó állatokat kell alkalmazni. Általában egereket használnak, bár a patkányok is megfelelőek lehetnek. Bármely egyéb megfelelő emlősfaj használható, ha a jelentésben szerepel tudományos indokolás.

Az állatok tartásának és etetésének körülményei

12. Rágcsálók esetében a kísérleti állatok tartására szolgáló helyiség hőmérsékletének 22° C-nak ($\pm 3^\circ$ C) kell lennie. Bár ideális esetben a helyiség relatív páratartalmának 50–60 %-nak kell lennie, legyen legalább 40 %, és a takarítás időtartamától eltekintve lehetőleg ne haladja meg a 70 %-ot. A világítás legyen mesterséges; 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást. Az etetéshez standard laboratóriumi takarmány alkalmazható, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett. A takarmány megválasztását a vizsgálati vegyi anyaggal való megfelelő keveredés szükségessége is befolyásolhatja, ha a vizsgálati vegyi anyag beadása ilyen módon történik. Ha agresszív viselkedés nem várható és nem tapasztalható, a rágcsálókat kezelés és pároztatás előtt azonos nemű kis (legfeljebb öt) egyedből álló csoportokban, lehetőleg szilárd, megfelelő környezetgazdagítással ellátott ketrecekben kell tartani. Ha tudományos szempontból indokolt, az állatok egyedileg is elhelyezhetők.

Az állatok előkészítése

13. Egészséges és ivarérett felnőtt him és nőstény állatokat osztanak véletlenszerűen a kontroll- és kezelt csoportokba. Az egyes állatokat humánus, minimálisan invazív módszerrel (például gyűrűzéssel, címkézéssel, mikrocip beültetésével vagy biometrikus azonosítással, de a lábujj vagy a fül kilyukasztása nélkül) egyedi azonosítóval kell ellátni, és legalább öt napig szoktatni kell a laboratóriumi körülményekhez. A ketreceket úgy kell elrendezni, hogy minimálisak legyenek a ketrec elhelyezéséből adódó esetleges hatások. A pozitív kontrollal és a vizsgálati vegyi anyaggal való keresztszennyeződés kerülendő. A

vizsgálat kezdetén az állatok tömege közötti eltérésnek minimálisnak kell lennie és nem haladhatja meg az ivaronkénti átlag $\pm 20\%$ -át.

A dózisok előkészítése

14. Az állatoknak történő adagolás előtt a szilárd halmazállapotú vizsgálati vegyi anyagokat fel kell oldani vagy szuszpendálni kell megfelelő oldószerben vagy vivőanyagban, vagy bele kell keverni a takarmányba vagy az ivóvízbe. A folyékony vizsgálati vegyi anyagok közvetlenül adagolhatók vagy az adagolás előtt hígíthatók. Belélegzéses expozíció esetén a vizsgálati vegyi anyagok fizikai-kémiai tulajdonságaiktól függően gáz, gőz vagy szilárd/folyadék aeroszol formában adagolhatók. A vizsgálati vegyi anyagból mindig friss készítményeket kell alkalmazni, kivéve akkor, ha a stabilitási adatok bizonyítják a tárolás elfogadhatóságát és meghatározzák a megfelelő tárolási feltételeket.

Vizsgálati körülmények

Oldószer/Vivőanyag

15. Az oldószer/vivőanyag nem okozhat toxikus hatásokat a választott dózisok mellett, és nem alkalmazható olyan anyag, amelyről feltehető, hogy kémiai reakcióba fog lépni a vizsgálati vegyi anyaggal. Jól ismert oldószerektől eltérő oldószerek/vivőanyagok alkalmazása esetén azok használatát alá kell támasztani a kompatibilitásukat jelző referenciaadatokkal. Amennyiben lehetséges, először valamilyen vizes oldószer/vivőanyag használatát ajánlatos megfontolni. Általánosan használt, kompatibilis oldószer/vivőanyag például többek között a víz, a fiziológias sóoldat, a metil-cellulóz-oldat, a karboximetil-cellulóz-nátriumsó-oldat, az olívaolaj és a kukoricaolaj.

Pozitív kontrollok

16. Egyidejűleg alkalmazott pozitív kontrollállatokat mindig kell alkalmazni, kivéve ha a laboratórium igazolta a vizsgálat lebonyolításában szerzett jártasságát, és a közelmúltban (például az elmúlt 5 évben) rutinszerűen használta a vizsgálatot. Ugyanakkor a pozitív kontrollcsoportba tartozó állatok esetében nem szükséges a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt állatokéval megegyező adagolási módot alkalmazni, vagy mintát venni valamennyi pároztatási időszakokban. Pozitív kontrollként olyan anyagokat kell használni, amelyekről ismert, hogy a vizsgálati feltételek mellett domináns letális hatást fejtenek ki. A kezelés kivételével a kontrollcsoportokba osztott állatokat azonos bánásmódban kell részesíteni a kezelt csoportokban lévő állatokkal.
17. A pozitív kontrollanyagok dózisát úgy kell megválasztani, hogy enyhe vagy mérsékelt hatást fejtsenek ki, lehetővé téve a vizsgálat teljesítőképességének és érzékenységének kritikus értékelését, ugyanakkor megbízhatóan pozitív domináns letális hatást eredményezzenek. A pozitív kontrollként szolgáló anyagokra és a megfelelő dózisokra az 1. táblázat tartalmaz példákat.

1. táblázat: Példák pozitív kontrollként szolgáló anyagokra.

Anyag [CAS-szám] (hivatkozási szám)	Effektív dózis tartománya (mg/kg) (rágcsáló fajok)	Adagolás időtartama (napokban)
Trietilén-melamin [51-18-3] (15)	0,25 (egerek)	1
Ciklofoszfamid [50-18-0] (19)	50–150 (egerek)	5
Ciklofoszfamid [50-18-0] (5)	25–100 (patkányok)	1
Etil-metánszulfonát [62-50-0] (13)	100-300 (egerek)	5
Akrlamid monomer [79-06-1] (17)	50 (egerek)	5
Klórambucil [305-03-3] (14)	25 (egerek)	1

Negatív kontrollok

18. Minden mintavételi időpontban negatív kontrollállatokat is kell használni, amelyeket csak oldószerrel vagy vivőanyaggal kezeltek, és a kezelésük egyébiránt ugyanolyan módon történik, mint a kezelt csoportoké (20). Ha nem állnak rendelkezésre olyan történeti vagy publikált kontrolladatok, amelyek igazolják, hogy a választott oldószer/vivőanyag nem idéz elő domináns letális vagy egyéb káros hatásokat, a vivőanyagok kontroll elfogadhatóságának megállapítása érdekében nem kezelt kontrollállatokat is alkalmazni kell minden mintavételi időpontban.

ELJÁRÁS**Az állatok száma**

19. Minden egyes hímre előre meghatározott megfelelő időközönként (például hetente egyszer, 21. és 23. pont) egymás után, lehetőleg egyetlen szűz nőténnyel pároztatnak. A hímek csoportonkénti számát előre meg kell határozni, méghozzá úgy, hogy (az egyes pároztatási időszakokban pároztatott nőtényekkel együtt) kellő létszámban legyenek ahhoz, hogy megfelelő statisztikai erőt képviseljenek a domináns letalitási gyakoriság legalább megduplázódásához (44. pont).
20. Az egyes pároztatási időszakokban rendelkezésre álló nőtények számát szintén az általuk képviselt statisztikai erő alapján kell előre meghatározni úgy, hogy lehetővé tudják tenni a domináns letalitási gyakoriság legalább megduplázódásának észlelését (vagyis elegendő vemhes nőtény legyen legalább összesen 400 beágyazott embrió biztosításához) (20) (21)

(22) (23), illetve hogy elemzési egységenként (vagyis adagolásonkénti pároztatott csoportként) legalább egy elhalt, beágyazódott embrióra lehessen számítani (24).

Beadási időszak és pároztatási időszakok

21. A kezelés utáni pároztatási időszakok számát a kezelési ütemterv határozza meg, amelynek biztosítania kell, hogy a hím csírasejt érésének minden fázisát értékelni lehessen a domináns letális hatás előidézése szempontjából (12) (25). A legfeljebb napi öt dózis beadásával járó egyszeri kezelés esetén az utolsó kezelés időpontjától számítva 8 (egereknél) vagy 10 (patkányoknál) pároztatást kell végrehajtani az egyhetes időszakok alatt. Többszöri dózis beadásakor a pároztatási időszakok száma a beadási időszak növelésével arányosan csökkenthető, amennyiben értékelni lehet a spermaképződés valamennyi fázisát (például egy 28 napos expozíciós időszak után csupán 4 hetes pároztatás elegendő az egerek összes spermaképződési fázisának elemzéséhez). Minden kezelési és pároztatási ütemtervet tudományosan indokolni kell.
22. A nőtényeknek legalább egy ivari ciklus erejéig a hímekkel kell maradniuk (egy hét például mind az egereknél, mind a patkányoknál lefed egy ivari ciklust). Az egyhetes időköz alatt nem párosított nőtények felhasználhatók a következő pároztatási időszakban. Alternatív megoldásként a nőtények mindaddig a hímekkel tarthatók, amíg a párzásra sor nem került, ami a hüvelyben a sperma jelenlétéből, illetve a hüvelyi dugó megjelenéséből határozható meg.
23. Az expozíciós és pároztatási eljárás függ a domináns letalitási vizsgálat végső céljától. Amennyiben a cél annak meghatározása, hogy egy adott vegyi anyag önmagában okoz-e domináns letális mutációt, az elfogadott módszer alapján az expozíciónak ki kell terjednie a teljes spermaképződési ciklusra (ami egerek esetén heti 5–7 kezeléssel 7 hét), és egyszer kell pároztatni, a ciklus végén. Ha azonban a cél a domináns letalitás előidézésére érzékeny csírasejttípus meghatározása, ajánlatos inkább egyszeri vagy 5 napon át tartó expozíciót követően egyhetes időközökben pároztatni.

Dózisok

24. Ha előzetes range-finding studyvizsgálatra kerül sor amiatt, mert már nem állnak rendelkezésre megfelelő adatok a dózisok megválasztásának segítéséhez, azt ugyanazon laboratóriumban, ugyanazon fajok, törzsek, nemek és kezelési eljárások alkalmazásával kell végrehajtani, mint amelyeket a fő vizsgálatban fognak használni (26). A vizsgálatnak a maximális tolerálható dózis (MTD) meghatározására kell irányulnia, amely anélkül, hogy vizsgálatkorlátozó toxicitást mutatna, a vizsgálati időszak tartamához viszonyítva a legmagasabb tolerált dózis (például rendellenes viselkedést vagy reakciókat, enyhe testtömeg-csökkenést vagy vérképzőrendszert érintő citotoxicitást vált ki), de elhullást, illetve humánus eutanáziát igénylő, bizonyított fájdalmat, szenvedést vagy stresszt nem idéz elő (27).

25. Az MTD nem befolyásolhatja kedvezőtlenül a pároztatás sikerét sem (21).
26. A kis, nem mérgező dózisban specifikus biológiai aktivitást mutató vizsgálati vegyi anyagok (mint például a hormonok és a mitogének), valamint azok a vegyi anyagok, amelyek a toxikokinetikai tulajdonságok telítődését mutatják, kivételek lehetnek a dózismeghatározási követelmények alól, és eseti alapon kell őket értékelni.
27. Annak érdekében, hogy dózis–válasz adatokat lehessen szerezni, a teljes vizsgálatnak egy negatív kontrollcsoportot, valamint legalább három dózist kell tartalmaznia, ahol a dózisok közötti szorzótényező általában 2, de legfeljebb 4. Ha a vizsgálati vegyi anyag nem okoz toxicitást a dózistartomány-kereső vizsgálatban vagy meglévő adatok alapján, egyszeri adagolás esetén a legmagasabb dózissal 2000 mg/testtömegkilogrammnak kell lennie. Ha azonban a vizsgálati vegyi anyag toxicitást okoz, az MTD-nek a beadott legmagasabb dózissal kell lennie, és a használt dózisoknak lehetőleg le kell fedniük a maximálistól az alacsony mértékű toxicitást okozó vagy toxicitást egyáltalán nem okozó dózsig terjedő tartományt. Ha a vizsgálati vegyi anyag nem okoz toxicitást, legalább 14 napig tartó beadási időszak esetén, a legmagasabb dózissal 1000 mg/testtömeg kg/napnak, 14 napnál rövidebb beadási időszak esetében pedig 2000 mg/testtömeg kg/napnak kell lennie.

A dózisok beadása

28. Az emberi expozíció várható útját figyelembe kell venni a vizsgálat tervezése során. Ezért az egyéb expozíciós utak – például takarmány, ivóvíz, szubkután, intravénás, topikális, inhalációs, orális (gyomorszondával) vagy implantáció – is kiválaszthatók indokoltként. Az utat mindenesetre úgy kell kiválasztani, hogy biztosítsa a célszövet(ek) megfelelő expozícióját. A hasüregbe adott injekció általában nem ajánlott, mivel az nem tervezett emberi expozíciós út, és kizárólag tudományos indokolással alkalmazható. Ha a vizsgálati vegyi anyagot a takarmányba vagy ivóvízbe keverik, különösen egyszeri adagolás esetén ügyelni kell arra, hogy a táplálék és a víz fogyasztása és a pároztatás közötti idő elegendő legyen a hatások kimutathatóságához (31. pont). A gyomorszondán át vagy injekcióval egyszerre beadható maximális folyadékmennyiség a kísérleti állat méretétől függ. A térfogata rendszerint nem haladhatja meg az 1 ml/100 testtömeggramm mennyiséget, kivéve vizes oldatok esetén, amelyeknél legfeljebb 2 ml/100 testtömeggramm használható. Ennél nagyobb mennyiségek használatát (ha azt az állatjóléti tárgyú jogszabályok lehetővé teszik) meg kell indokolni. A koncentráció megfelelő beállításával kell minimalizálni a beadott térfogat variabilitását, és így kell biztosítani, hogy minden dózissal azonos legyen a testtömegarányos térfogat.

Megfigyelések

29. A kísérleti állatok esetében általános klinikai megfigyeléseket kell tenni, és a klinikai tüneteket legalább naponta egyszer, lehetőleg minden nap ugyanazon időpont(ok)ban rögzíteni kell, továbbá figyelembe kell venni az adagolást követően várható hatások

érvényesülésének csúcsidőszakát. Az adagolási időszakban naponta legalább kétszer meg kell vizsgálni az összes állatot morbiditás és mortalitás szempontjából. Minden állat tömegét le kell mérni a vizsgálat megkezdésekor, az ismételt dózisú vizsgálatok esetén hetente legalább egyszer, valamint az állatok végleges elaltatásakor. A felvett táplálék mennyiségét heti rendszerességgel le kell mérni. Amennyiben a vizsgálati vegyi anyag beadására az ivóvízzel együtt kerül sor, a vízfogyasztást minden vízcsere alkalmával és legalább hetente le kell mérni. A túlzott toxicitás nem halálos jeleit mutató állatokat a vizsgálati időszak befejezése előtt végleg el kell altatni (27).

A szövetek gyűjtése és feldolgozása

30. A nőtényeket a vemhesség második felében altatják el véglegesen, az egereket a vemhesség 13. napján, a patkányokat pedig a vemhesség 14–15. napján. Megvizsgálják, hogy tapasztalható-e méhükben domináns letális hatások, ehhez meghatározzák a beágyazódások, az élő és elhalt embriók, valamint a sárgatestek számát.
31. A méhszarvakat és a petefészkeket átvizsgálják, hogy megszámlálják a sárgatesteket, valamint eltávolítsák és megszámlálják a magzatokat és megmérjék tömegüket. Ügyelni kell arra, hogy a méhen belül feltárják az élő magzatok által takart elhalásokat és meghatározzák számukat. A magzati mortalitást fel kell jegyezni. Rögzíteni kell emellett a sikeresen megtermékenyített nőtények számát, továbbá az összes beágyazódás, beágyazódás előtti veszteség és beágyazódás utáni mortalitás számát (a korai és kései felszívódásokkal egyetemben). A látható magzatok ezenfelül legalább két hétig tartósíthatók Bouin-féle rögzítőszerben, hogy meg lehessen vizsgálni a jelentősebb külső fejlődési rendellenességeket (28), ami kiegészítő adatokat szolgáltat a vizsgálati anyag reprodukciót és fejlődést érintő hatásairól.

ADATOK ÉS JELENTÉS

Az eredmények feldolgozása

32. Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni, bemutatva a pároztatott hímek számát, a vemhes nőtények számát, valamint a nem vemhes nőtények számát. Minden párzás eredményét egyedileg kell jelenteni, egyenként azonosítva a hímeket és a nőtényeket. A kezelt hímek esetében fel kell jegyezni a pároztatási időszakot és a dózist, és minden nőtény esetében fel kell jegyezni a beágyazódott élő és elhalt embriók számát.
33. A beágyazódás utáni veszteség kiszámításához meg kell határozni az elhalt és az összes beágyazódott embrió arányát a kezelt csoportban, majd össze kell vetni azt a vivőanyag/oldószeres kontrollcsoport hasonló adatával.
34. A beágyazódás előtti veszteség a sárgatestek számának és a beágyazódások számának különbségéből vagy az egy nőtényre jutó átlagos beágyazódások számának a

kontrollpárosztatásokhoz viszonyított fogatkozásából számítható ki. Ha vizsgálták a beágyazódás előtti veszteséget, azt is jelenteni kell.

35. A domináns letális tényező a következőképpen becsülhető meg: (beágyazódás utáni elhalálozások/összes beágyazódás nőstényenként) x 100.

36. A toxicitásra és a klinikai tünetekre vonatkozó adatokat (a 29. pont alapján) jelenteni kell.

Elfogadhatósági kritériumok

37. Az alábbi kritériumok határozzák meg a vizsgálat elfogadhatóságát:

- A párhuzamos negatív kontroll adatai összhangban vannak a negatív történeti kontrolladatokra vonatkozólag közzétett normákkal és – amennyiben rendelkezésre állnak – a laboratórium történeti kontrolladataival (lásd a 10. és a 18. pontot).
- A párhuzamos pozitív kontrollok olyan válaszreakciókat generálnak, amelyek összhangban vannak a pozitív történeti kontrolladatokra vonatkozólag közzétett normákkal és – amennyiben rendelkezésre állnak – a laboratórium pozitív történeti kontrollokat tartalmazó adatbázisával, továbbá a negatív kontrollhoz viszonyítva statisztikailag szignifikáns növekedést idéznek elő (lásd a 17. és a 18. pontot).
- Megfelelő számú beágyazódás és dózis képezte elemzés tárgyát (20. pont).
- A legmagasabb dózis kiválasztására vonatkozó kritériumok összhangban vannak a 24. és 27. pontban ismertetett kritériumoknak.

Az eredmények értékelése és értelmezése

38. Legalább három kezelt dóziscsoportot kell megvizsgálni annak érdekében, hogy elegendő adat álljon rendelkezésre a dózis–válasz elemzéshez.

39. Amennyiben valamennyi elfogadhatósági kritérium teljesül, a vizsgálati vegyi anyag egyértelműen pozitívnak minősül, ha:

- legalább az egyik vizsgálati dózis statisztikailag szignifikáns növekedést mutat a párhuzamos negatív kontrollhoz viszonyítva;
- a növekedés dózisfüggő legalább egy kísérleti körülménynél (például hetes párosztatási időszak) megfelelő vizsgálattal történő értékelés alapján; valamint
- ezen eredmények bármelyike kívül esik a negatív kontrolladatok elfogadható tartományán vagy a laboratórium negatív történeti kontrolladatainak eloszlásán (például Poisson-eloszlású 95 %-os ellenőrzési határértéken).

Ezt követően úgy tekintendő, hogy a vizsgálati vegyi anyag képes domináns letális mutációkat előidézni a kísérleti állatok csírasejtjeiben. A legmegfelelőbb statisztikai

módszerekre vonatkozó ajánlások leírását a 44. pont tartalmazza; a szakirodalomban további ajánlott statisztikai megközelítések találhatók (20) (21) (22) (24) (29). Az alkalmazott statisztikai teszteknek az állatot kell kísérleti egységnek tekinteniük.

40. Amennyiben valamennyi elfogadhatósági kritérium teljesül, a vizsgálati vegyi anyag egyértelműen negatívnak minősül, ha:

- a vizsgálati dózisok egyike sem mutat statisztikailag szignifikáns növekedést a párhuzamos negatív kontrollhoz viszonyítva;
- egyik kísérleti körülmény sem mutat a dózissal összefüggő növekedést; valamint
- valamennyi eredmény a negatív kontrolladatok, vagy amennyiben rendelkezésre állnak, a laboratórium negatív történeti kontrolladatainak (például Poisson-eloszlású 95 %-os ellenőrzési határértéken) tartományába esik.

Ezt követően úgy tekintendő, hogy a vizsgálati vegyi anyag nem képes domináns letális mutációkat előidézni a kísérleti állatok csírasejtjeiben.

41. Az egyértelműen pozitív vagy egyértelműen negatív válasz igazolása nem követelmény.

42. Ha a válasz nem egyértelműen negatív és nem is egyértelműen pozitív, illetve egy adott eredmény (például kismértékű vagy határesethez közelítő növekedés) biológiai relevanciája megállapításának segítése érdekében az adatokat szakértői véleménnyel és/vagy a meglévő kísérleti adatok további vizsgálataival kell értékelni, például meg kell határozni, hogy a pozitív eredmény kívül esik-e a negatív kontrolladatok elfogadható tartományán vagy a laboratórium történeti negatív kontrolladatain (30).

43. Ritka esetekben, az adatkészlet még további vizsgálatok után is eleve kizárja a pozitív vagy negatív eredményekre vonatkozó következtetést, ezért kétértelmű reakció lesz a következtetés.

44. Az alkalmazott statisztikai teszteknek a hím állatot kell kísérleti egységnek tekinteniük. Bár előfordulhat, hogy a számadatok (pl. az egy nőtényre jutó beágyazódások száma) a Poisson-féle eloszlás és/vagy az arányszámok (pl. az elhalt beágyazódott embriók aránya) a binominális eloszlás szerint alakul, az ilyen adatok gyakori jellemzője a túlszóródás (31). Ennek megfelelően a statisztikai elemzésnek először a túl- és alulszóródás mértékét kell tesztelnie, például a Cochran-féle binomiális variancia próbával (32) vagy a Tarone-féle, binominális túlszóródást vizsgáló $C(\alpha)$ -próbával (31) (33). Amennyiben nem mutatható ki eltérés a binomiális eloszlástól, az egyes dózisok egymáshoz való viszonyára vonatkozó trendek vizsgálhatók Cochran-Armitage-féle trendpróbával (34), a kontrollcsoporttal való páronkénti összehasonlításához pedig a Fisher-egzakt teszt használható (35). Hasonlóképpen, ha nem tapasztalható eltérés a Poisson-eloszlástól, a számok alakulásának trendjei vizsgálhatók Poisson-regresszióval (36), a kontrollcsoporttal történő páronkénti összevetéshez pedig alkalmazható a Poisson-modell páronkénti kontrasztanalízise (36). Ha

az eloszlás szignifikánsan túl- vagy alulbecsült, a nem paraméteres módszerek használata ajánlott (23) (31). Ilyenek a rangsor alapú próbák, például a Jonckheere–Terpstra-féle trendpróba (37) és a vivőanyag/oldószeres kontrollcsoporttal való páronkénti összehasonlítással végzett Mann–Whitney-féle próbák (38), továbbá a tendencia feltárására és a kontrollcsoporttal történő páronkénti összehasonlításra szolgáló permutációs, újra-mintavételezési és bootstrap-eljárások (31) (39).

45. A pozitív domináns letális vizsgálat bizonyítékát szolgáltatja annak, hogy a vizsgálati vegyi anyag genotoxicitást idéz elő a vizsgálatához használt faj kezelt hímjének csírasejtjeiben.
46. A válaszreakció biológiai jelentőségének értékelésekor támpontot adhat annak mérlegelése, hogy a megfigyelt értékek a kontrollokkal kapott régebbi eredmények tartományába esnek-e (40).

Vizsgálati jelentés

47. A vizsgálati jelentésnek a következőket kell tartalmaznia:

Összegzés.

Vizsgálati vegyi anyag:

- eredet, gyártási szám, felhasználási határidő, ha rendelkezésre áll;
- a vizsgálati vegyi anyag stabilitása, ha ismert;
- a vizsgálati vegyi anyag oldhatósága és stabilitása az oldószerben, ha ismert;
- adott esetben a pH-érték, az ozmolalitás és a kicsapódás mérése abban a tápfolyadékban, amelyhez a vizsgálati vegyi anyagot hozzáadták.

Egy összetevőből álló anyag:

- fizikai megjelenés, vízzoldékonyság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok;
- kémiai azonosítás, például IUPAC- vagy CAS-névvel, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet alapján, tisztaság, adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb. alapján

Több összetevőből álló anyag, UVCB-k és keverékek:

- amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosítója (lásd fent), mennyiségi előfordulása és releváns fizikai-kémiai tulajdonságai révén jellemezve.

A vizsgálati vegyi anyag előkészítése:

- a vivőanyag megválasztásának indokolása;

- a vizsgálati vegyi anyag oldhatósága és stabilitása az oldószerben/vivőanyagban, ha ismert;
- a takarmány-, ivóvíz- vagy inhalációs készítmények előkészítése;
- a készítmények analitikai meghatározásai (pl. stabilitás, homogenitás, névleges koncentráció), ha végeztek ilyen meghatározásokat.

Kísérleti állatok:

- a felhasznált faj/törzs és megválasztásuk indokolása;
- az állatok száma, kora és neme;
- az állatok származása, tartási körülmények, takarmány stb.;
- az állatok egyedi azonosítására szolgáló módszerek;
- rövid távú vizsgálatok esetében: az egyes hím állatok testtömege a vizsgálat kezdetekor és végén, egy hétnél hosszabb vizsgálatok esetében: az egyes állatok testtömege a vizsgálat során és a táplálékfelvételük. A testtömegtartományt, az átlagot és a szórást minden egyes csoportnál meg kell adni.

Vizsgálati körülmények:

- a pozitív és negatív (vivőanyagok/oldószeres) kontrollok adatai;
- a dózistartomány-kereső vizsgálat adatai;
- a dózisok kiválasztásának indokolása;
- a vizsgálati vegyi anyag előkészítésének részletes ismertetése;
- a vizsgálati vegyi anyag beadására vonatkozó részletek;
- a beadási mód indokolása;
- az állati toxicitás mérésére szolgáló módszerek, beleértve adott esetben a kórszöveti vagy hematológiai elemzéseket, illetve az állatok megfigyelésének és a testtömeg mérésének gyakorisága;
- negatív eredmény esetén annak ellenőrzésére szolgáló módszerek, hogy a vizsgálati vegyi anyag elérte-e a célszövetet vagy az általános keringési rendszert;
- tényleges dózis (mg/testtömeg kg/nap) a vizsgálati vegyi anyagnak a takarmányban/ivóvízben meglévő koncentrációjából (ppm) és a fogyasztásból számítva, ha alkalmazható;
- a táplálék és víz minőségére vonatkozó részletek;
- a ketrecek környezetgazdagítására vonatkozó részletek;
- a kezelési és mintavételi ütemtervek részletes leírása és kiválasztásuk indokolása;

- a fájdalomcsillapítás módja;
- az eutanázia módja;
- a szövetek izolálására és tartósítására használt eljárások;
- valamennyi készlet és reagens beszerzési forrása és gyártási száma (ha elérhető);
- a domináns letális hatások számolására szolgáló módszerek;
- a pároztatási ütemterv;
- a párzás igazolására használt módszer;
- az eutanázia időpontja;
- a domináns letális hatások értékelésének kritériumai, többek között a sárgatestek, beágyazódások, felszívódások és beágyazódás előtti veszteségek, élő és elhalt beágyazódott embriók száma.

Eredmények:

- az állatok állapota a vizsgálati időszak előtt és alatt, beleértve a toxicitás jeleit;
- a hím egyedek testtömege a kezelési és pároztatási időszakok alatt;
- a pároztatott nőstények száma;
- a dózis-válasz összefüggés, ahol lehetséges;
- a párhuzamos és negatív történeti kontrolladatok tartományokkal, átlagértékekkel és szórásokkal;
- az egyidejűleg elvégzett pozitív kontrollokra vonatkozó adatok;
- az egyes anyaállatok táblázatba foglalt adatai: az egy anyaállatra jutó sárgatestek száma; az egy anyaállatra jutó beágyazódások száma; az egy anyaállatra jutó felszívódások és beágyazódás előtti veszteségek száma; az egy anyaállatra jutó élő beágyazódott embriók száma; az egy anyaállatra jutó elhalt beágyazódott embriók száma; a magzatok testtömege;
- a fenti adatok pároztatási időszakonkénti és dózisonkénti összefoglalása, a domináns letalitás gyakoriságával;
- statisztikai elemzések és alkalmazott módszerek.

Az eredmények értékelése.

Következtetés.

SZAKIRODALOM

- (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, Párizs.
- (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.) 235-334. o., 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. o.
- (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. o.
- (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, 129-156. o.
- (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. o.
- (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.), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.
- (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: 417-451. o.
- (33) Tarone R.E. (1979). Testing the Goodness of Fit of the Binomial Distribution. *Biometrika*, 66: 585-590. o.
- (34) Margolin B.H. (1988). Test for Trend in Proportions. In *Encyclopedia of Statistical Sciences*, Volume 9, Kotz S. and Johnson N. L. (Eds.), 334-336. o. 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, Chapters 14 and 17. McGraw-Hill, Boston
- (37) Jonckheere R. (1954). A Distribution-Free K-Sample Test Against Ordered Alternatives. *Biometrika*, 41:133-145.
- (38) Conover W.J. (1971). Practical Nonparametric Statistics. John Wiley and Sons, New York
- (39) Efron, B. (1982). The Jackknife, the Bootstrap and Other Resampling Plans. Society for Industrial and Applied Mathematics, Philadelphia, PA.
- (40) Fleiss J. (1973). Statistical Methods for Rates and Proportions. John Wiley and Sons, New York.

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Sárgatest (corpus luteum): hormontermelő képződmény, amely a petefészekben alakul ki a petét kilökő tüsző helyén. A petefészekben jelen lévő sárgatestek száma megegyezik a peteérés során keletkezett peték számával.

Domináns letális mutáció: a csírasejtben vagy a megtermékenyítést követően létrejövő mutáció, amely az embrió vagy a magzat elhalását okozza.

Termékenységi mutató: a pároztatott vemhes nőtények száma a pároztatott nőtények számához képest.

Pároztatási időszak: a kezelés vége és a kezelt hímek pároztatása között eltelt idő. Az időköz szabályozása révén felmérhetők a különböző csírasejttípusokra gyakorolt kémiai hatások. Az expozíció végét követő 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7. és 8. hét során zajló egér pároztatásoknál mérhetők a spermiumot, kondenzált spermatidokat, kerek spermatidokat, pachitén spermatocitákat, korai spermatocitákat, differenciálódott spermatogóniumokat, differenciálódó spermatogóniumokat és csírasejt spermatogóniumokat ért hatások.

Beágyazódás előtti veszteség: a beágyazódások száma és a sárgatestek száma között különbség. Megbecsülhető a kezelt és a kontrollcsoportba beosztott nőtények összes beágyazódásainak összevetése alapján is.

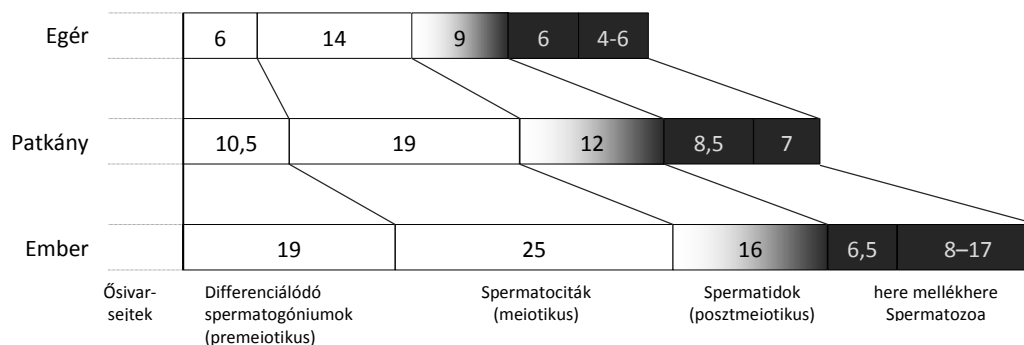
Beágyazódás utáni veszteség: a kezelt csoport elhalt beágyazódásainak aránya összehasonlítva a kontrollcsoport összes beágyazódáshoz viszonyított elhalt beágyazódásaival.

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

UVCB: ismeretlen vagy változó összetételű vegyi anyagok, komplex reakciótermékek vagy biológiai anyagok.

2. függelék

A SPERMATOGENEZIS IDEJE EMLŐSÖKNÉL



1. ábra: A hím csírasejt (napokban megadott) fejlődési idejének összevetése egér, patkány és ember között. Az árnyékolással jelzett időszakokban nem zajlik DNS-javítás.

A fentiekben látható az egérben, patkányban és emberben lezajló spermatogenezis sematikus ábrája (forrás: Adler, 1996). A nem differenciálódott spermatogóniumok közé tartoznak: A-szimpla; A-párosított; és A-összekapcsolt spermatogóniumok (Hess and de Franca, 2008). Az A-szimpla spermatogóniumokat tekintik a valódi ösivar-sejteknek; ezért az ösivar-sejtekre gyakorolt hatások felmérése érdekében (egereknél) legalább 49 napnak kell eltelnie a vizsgálati vegyi anyag utolsó beadása és a pároztatás között.

Hivatkozások

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

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

4. A B. részben a B.23. fejezet helyébe a következő szöveg lép:

„B.23 SPERMAGONIÁLIS KROMOSZÓMARENDELLENESSÉG VIZSGÁLATA EMLŐSÖKÖN

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 483. vizsgálati iránymutatásával (2016). A vizsgálati módszereket a tudományos fejlődés, a változó szabályozási igények és az állatok kíméletére irányuló megfontolások figyelembevételével rendszeresen felülvizsgálják. A vizsgálati módszer átdolgozott változata tükrözi a vizsgálat hosszú éveken keresztül alkalmazása során szerzett tapasztalatokat, valamint felveti annak lehetőségét, hogy ezt a vizsgálatot beépítsék más toxicitási vagy genotoxicitási vizsgálatokba, vagy azokkal együtt alkalmazzák. A toxicitási vizsgálatok kombinálása lehetővé teheti a toxicitási vizsgálatokban használt állatok számának csökkentését. E vizsgálati módszer a genetikai toxikológiai vizsgálati módszerek sorozatának részét képezi. Az OECD kidolgozott egy, a genetikai toxikológiai vizsgálatokról tömör tájékoztatást nyújtó, az OECD genetikai toxikológiára vonatkozó vizsgálati iránymutatásainak közelmúltbeli változásait áttekintő dokumentumot (1).
2. A spermagonális kromoszómarendellenesség emlősökön történő *in vivo* vizsgálatának célja azon vegyi anyagok azonosítása, amelyek strukturális kromoszóma-rendellenességeket okoznak emlősök spermiogoniális sejtjeiben (2), (3), (4). Ez a vizsgálat ezenfelül a genotoxicitás értékelése szempontjából is releváns, mert az *in vivo* metabolizmus, a farmakokinetikai és a DNS-hibajavító eljárások tényezői – jóllehet fajonként eltérnek – aktívak és hozzájárulnak a reakciókhoz. Ezt a vizsgálati módszert nem a számszerű rendellenességek mérésére tervezték; és nem is használják rutinszerűen erre a célra.
3. E vizsgálat kimutatja (mind a kromoszóma, mind a kromatid típusú) szerkezeti kromoszóma-rendellenességeket az osztódó spermagonális ivarsejtekben, ezért várhatóan előre jelezheti az ivarsejtek öröklődő mutációit.
4. A kulcsfontosságú fogalmak meghatározásai a függelékben találhatók.

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK

5. E vizsgálatban rendszerint rágcásalók használatosak, de egyes esetekben – amennyiben tudományosan indokolt – más fajok is megfelelőek lehetnek. A rágcásalók heréiből standard citogenetikai módszerekkel előállított készítmények mitotikus (spermiogoniális) és meiotikus (spermatocita) metafázist idéznek elő. A mitotikus és a meiotikus metafázis a kromoszómák morfológiája alapján határozható meg (4). Ez az *in vivo* citogenetikus vizsgálat észleli a szerkezeti kromoszóma-rendellenességeket a spermagonális mitózisokban. Más célsejtek nem képezik tárgyát e vizsgálati módszernek.

6. A spermiogoniumokban a kromatid típusú rendellenességek észleléséhez a kezelést követő első mitotikus sejtosztódást kell megvizsgálni, még mielőtt ezek a rendellenességek a következő sejtosztódások során kromoszóma típusú rendellenességekké alakulnának. A kezelt spermaticitákról további információk szerezhetők a diakinézis-metafázis I-ben és metafázis II-ben jelentkező szerkezeti kromoszóma-rendellenességek meiotikus kromoszómaelemzésével.
7. A herékben a spermiogoniumok számos generációja van jelen (5), és ezek a különböző ivarsejttípusok a kémiai kezeléssel szembeni érzékenység egész spektrumát átfoghatják. Így tehát az észlelt rendellenességek a kezelt spermiogonium-populációk halmozott választást jelentik. A herékből előállított készítményekben fellelhető mitotikus sejtek többsége B spermiogonium, amelyek megközelítőleg 26 órás sejtciklussal rendelkeznek (3).
8. Ha létezik arra vonatkozó bizonyíték, hogy a vizsgálati vegyi anyag vagy annak metabolitja(i) nem éri(k) el a herét, ez a vizsgálat nem megfelelő.

A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

9. Általában az állatokat megfelelő expozíciós úton kezelik a vizsgálati vegyi anyaggal, majd a kezelés után megfelelő időpontban eutanáziát hajtanak végre rajtuk. Az eutanázia előtt az állatokat metafázis-blokkoló szerrel (például kolchicinnel vagy Colcemid[®]-del) kezelik. Ezután kromoszómapreparátumot hoznak létre az ivarsejtekből és megfestik azokat, majd a metafázisban lévő sejtek elemzésével megállapítják a kromoszómaaberrációkat.

A LABORATÓRIUM JÁRTASSÁGÁNAK IGAZOLÁSA

10. A vizsgálatban való jártasság igazolása érdekében a laboratóriumoknak bizonyítottan képesnek kell lenniük reprodukálni a spermiogonium szerkezeti kromoszóma-rendellenességeinek gyakoriságára vonatkozó várható eredményeket pozitív kontrollként szolgáló – például az 1. táblázatban felsorolt – anyagokkal (ideértve a gyenge reakciókat is), valamint a negatív kontrollokból származó adatoknak olyan gyakoriságot kell mutatniuk, amely összhangban áll a szakirodalomban (pl. (2) (3) (6) (7) (8) (9) (10)) közzétett elfogadható adattartománnyal vagy a laboratóriumi kontrollok történeti szórásával, ha vannak történeti adatok.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Előkészületek

Az állatfaj kiválasztása

11. Egészséges, fiatal, ivarérett, általánosan használt laboratóriumi állattörzsekből származó állatokat kell alkalmazni. Rendszerint hím egereket használnak; ugyanakkor más megfelelő emlős fajok hímjei is alkalmazhatók, amennyiben az tudományosan indokolt, és lehetővé teszi a vizsgálatnak egy eltérő vizsgálati módszerrel való együttes alkalmazását. Rágcsálóktól eltérő fajok használatának tudományos indokolását közölni kell a jelentésben.

Az állatok tartásának és etetésének körülményei

12. Rágcsálók esetében a kísérleti állatok tartására szolgáló helyiség hőmérsékletének 22 °C-nak (± 3 °C) kell lennie. Bár ideális esetben a helyiség relatív páratartalmának 50–60 %-nak kell lennie, legyen legalább 40 %, és a takarítás időtartamától eltekintve lehetőleg ne haladja meg a 70 %-ot. A világítás legyen mesterséges; 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltakozásával. Az etetéshez standard laboratóriumi takarmány alkalmazható, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett. A takarmány megválasztását a vizsgálati vegyi anyaggal való megfelelő keveredés szükségessége is befolyásolhatja, ha a vizsgálati vegyi anyag beadása ilyen módon történik. Ha agresszív viselkedés nem várható, a rágcsálókat kis csoportokban, lehetőleg szilárd aljú, megfelelő környezetgazdagítással ellátott ketrecekben kell tartani (ketrecenként legfeljebb öt egyed tartható). Ha tudományos szempontból indokolt, az állatok egyedileg is elhelyezhetők.

Az állatok előkészítése

13. A rendszerint egészséges, fiatal, felnőtt (a kezelés kezdetén 8–12 hetes) állatokat használnak, és véletlenszerűen osztják be a kontroll- és a kezelt csoportokba. Az egyes állatokat humánus, minimálisan invazív módszerrel (például gyűrűzéssel, címkézéssel, mikrocip beültetésével vagy biometrikus azonosítással, de a fül vagy a lábujj kilyukasztása nélkül) egyedi azonosítóval kell ellátni, és legalább öt napig szoktatni kell a laboratóriumi körülményekhez. A ketrecek úgy kell elrendezni, hogy minimálisak legyenek a ketrec elhelyezéséből adódó esetleges hatások. A pozitív kontrollal és a vizsgálati vegyi anyaggal való keresztszennyeződés kerülendő. A vizsgálat kezdetén az egyes állatok tömege közötti eltérésnek minimálisnak kell lennie és nem haladhatja meg a ± 20 %-ot.

A dózisok előkészítése

14. Az állatoknak történő adagolás előtt a szilárd halmazállapotú vizsgálati vegyi anyagokat fel kell oldani vagy szuszpendálni kell megfelelő oldószerben vagy vivőanyagban, vagy bele kell keverni a takarmányba vagy az ivóvízbe. A folyékony vizsgálati vegyi anyagok közvetlenül adagolhatók vagy az adagolás előtt hígíthatók. Belélegzéses expozíció esetén a vizsgálati vegyi anyagok fizikai-kémiai tulajdonságaiktól függően gáz, gőz vagy szilárd/folyadék aeroszol formában adagolhatók. A vizsgálati vegyi anyagból mindig friss készítményeket kell alkalmazni, kivéve akkor, ha a stabilitási adatok bizonyítják a tárolás elfogadhatóságát és meghatározzák a megfelelő tárolási feltételeket.

Vizsgálati körülmények – oldószer/vivőanyag

15. Az oldószer/vivőanyag nem okozhat toxikus hatásokat az alkalmazott dózisok mellett, és nem alkalmazható olyan oldószer/vivőanyag, amely képes kémiai reakcióba lépni a vizsgálati vegyi anyagokkal. Jól ismert oldószerektől eltérő oldószerek/vivőanyagok alkalmazása esetén azok használatát alá kell támasztani a kompatibilitásukat jelző referenciaadatokkal. Amennyiben lehetséges, először valamilyen vizes oldószer/vivőanyag használatát kell megfontolni. Általánosan használt, kompatibilis oldószer/vivőanyag például többek között a víz, a fiziológiás sóoldat, a metil-cellulóz-oldat, a karboximetil-cellulóz-nátriumsó-oldat, az olívaolaj és a

kukoricaolaj. Ha nem állnak rendelkezésre olyan történeti vagy publikált kontrolladatok, amelyek igazolják, hogy a választott atipikus oldószer/vivőanyag nem idéz elő szerkezeti kromoszóma-rendellenességet vagy más káros hatást, az oldószeres/vivőanyagok kontroll elfogadhatóságának megállapítása érdekében előzetes vizsgálatot kell végezni.

Pozitív kontrollok

16. Egyidejűleg alkalmazott pozitív kontrollállatokat mindig kell alkalmazni, kivéve ha a laboratórium igazolta a vizsgálat lebonyolításában szerzett jártasságát, és a közelmúltban (például az elmúlt 5 évben) rutinszerűen használta a vizsgálatot. Párhuzamos pozitív kontrollcsoport hiányában minden egyes kísérletben értékelési kontrollokat (fixált és megfestetlen tárgylemezeket) kell alkalmazni. Ezek oly módon kaphatók meg, hogy a vizsgálat értékelésébe beszámítják a vizsgálat lebonyolítása szerinti laboratóriumban rendszeres időközönként (például 6–18 hónaponként) – például a jártasság vizsgálata során, vagy szükség esetén azt követően rendszeresen – pozitív kontrollokkal végzett különálló kísérlettel létrejött és tárolt megfelelő referenciamintákat.
17. A pozitív kontrollként szolgáló anyagoknak megbízható módon ki kell váltaniuk a szerkezeti kromoszóma-rendellenességekkel rendelkező sejtek spontán szinthez képest kimutathatóan gyakoribbá válását. A pozitív kontrollok dózisát úgy kell megválasztani, hogy a hatások egyértelműek legyenek, de az értékelő ne tudja beazonosítani azonnal a kódolt mintákat. A pozitív kontrollként szolgáló anyagokra az 1. táblázat tartalmaz példákat.

1. táblázat: Példák pozitív kontrollként szolgáló anyagokra.

Anyag [CAS-szám] (referenciaszám)
Ciklofoszfamid (monohidrát) [CAS-szám: 50-18-0 (CAS-szám 6055-19-2)] (9)
Ciklohexil-amin [CAS-szám: 108-91-8] (7)
Mitomycin C [CAS-szám: 50-07-7] (6)
Akrilamid monomer (CAS-szám: 79-06-1) (10)
Trietilén-melamin [CAS-szám: 51-18-3] (8)

Negatív kontrollok

18. Minden mintavételi időpontban negatív kontrollállatokat is kell használni, amelyeket csak oldószerrel vagy vivőanyaggal kezeltek, és a kezelésük egyébiránt ugyanolyan módon történik, mint a kezelési csoportoké. Ha nem állnak rendelkezésre olyan történeti vagy publikált kontrolladatok, amelyek igazolják, hogy a választott oldószer/vivőanyag nem idéz elő kromoszóma-rendellenességeket vagy más káros hatásokat, a vivőanyagok kontroll elfogadhatóságának megállapítása érdekében nem kezelt kontrollállatokat is alkalmazni kell minden mintavételi időpontban.

ELJÁRÁS

Az állatok száma

19. A vizsgálat megkezdésekor a csoportok méretét úgy kell megállapítani, hogy egy csoportban legalább öt hím állat legyen. Ez a csoportonkénti állatszám elegendőnek tekinthető ahhoz, hogy megfelelő mértékű statisztikai kiértékelést lehessen végezni (vagyis általában észlelni lehessen a kromoszóma-rendellenesség gyakoriságának legalább megduplázódását, amikor a negatív kontrollszint 0,05-ös szignifikanciaszint melletti 80 %-os valószínűségnél legalább 1,0 %) (3) (11). Útmutatás az állatok maximális számára vonatkozó tipikus követelményhez: a három dóziscsoporttal és egy párhuzamos negatív kontrollcsoporttal, továbbá egy pozitív kontrollcsoporttal (amelyek mindegyike csoportonként öt állatból áll) két mintavételi időpontban végzett vizsgálathoz 45 állatra lenne szükség.

A kezelés ütemterve

20. A vizsgálati vegyi anyagot rendszerint egyetlen adagban adják be (egyszeri kezelés keretében); alkalmazható más adagolási rend is, amennyiben használata tudományos szempontból indokolt.
21. A legnagyobb adaggal kezelt csoportnál a kezelés után két különböző időpontban mintát kell venni. Mivel a vizsgálati vegyi anyag(ok) felvételéhez és anyagcseréjéhez szükséges idő, valamint annak (azoknak) a sejtciklus-kinetikára gyakorolt hatása befolyásolhatja a kromoszóma-rendellenesség kimutatásának optimális időpontját, egy korai és egy későbbi mintavételt végeznek a kezelést követően körülbelül 24 és 48 órával. A legmagasabb dózisoktól eltérő dózisok esetén korai időpontban, a kezelés után 24 órával kell mintát venni (ami megegyezik a B spermiogoniumok sejtciklusának idejével vagy annál rövidebb, így nagyobb valószínűséggel értékelhetők a kezelés utáni első metafázisok), kivéve ha más időpontról bebizonyosodott, hogy az megfelelőbb.
22. Más mintavételi idők is alkalmazhatók. Olyan vegyi anyagok esetében például, amelyek S fázistól független hatásokat fejtenek ki, megfelelőbbnek bizonyulhatnak a 24 óránál rövidebb mintavételi idők is.
23. Ismételt dózisú kezelési eljárás is használható, például ha a vizsgálat elvégzésére egy másik végpontot érintő, 28 napig tartó beadási időszakot alkalmazó vizsgálattal (pl. a B.58. vizsgálati módszerrel) összefüggésben kerül sor; ez esetben azonban a mintavételi időszakok különbözősége miatt további állatcsoportok bevonására lenne szükség. Ennek megfelelően az ilyen ütemtervek megfelelőségét eseti alapon kell tudományos érvekkel alátámasztani.
24. Az eutanázia előtt az állatok hasüregébe adott injekcióval megfelelő adag metafázist blokkoló vegyi anyagot (például Colcemid[®]-et vagy kolchicint) fecskendeznek be. Ezután az állatokból megfelelő időközönként mintákat kell venni. Egerek és patkányok esetében ez az időköz körülbelül 3–5 óra.

Dózisok

25. Ha előzetes dózistartomány-kereső vizsgálatra kerül sor amiatt, hogy nem állnak rendelkezésre megfelelő adatok a dózisok kiválasztásának segítéséhez, azt ugyanazon laboratóriumban, ugyanazon fajok, törzsek és kezelési eljárások alkalmazásával kell végrehajtani, mint amelyek a fő vizsgálatban alkalmazandóak, a dóziskereső vizsgálat végrehajtására vonatkozó ajánlások szerint (12). E vizsgálatnak a maximális tolerálható dózis (MTD) meghatározására kell irányulnia, amely a vizsgálati időszak hosszához képest enyhe toxikus hatásokat kiváltó dózis (például rendellenes viselkedést vagy reakciókat, enyhe testtömeg-csökkenést vagy vérképzőrendszert érintő citotoxicitást vált ki), de amely elhullást, illetve az állatok végleges elaltatását szükségessé tévő, bizonyított fájdalmat, szenvedést vagy stresszt nem idéz elő.
26. A legmagasabb adag olyan adagként is definiálható, amely létrehoz valamilyen toxicitási jelet a spermiogonium-sejtekben (például az első és második meiotikus metafázis esetében a spermiogoniális mitózis arányának csökkenése). E csökkenés nem haladhatja meg az 50 %-ot.
27. A kis, nem mérgező dózisban specifikus biológiai aktivitást mutató vizsgálati vegyi anyagok (mint például a hormonok és a mitogének), valamint azok a vegyi anyagok, amelyek a toxikokinetikai tulajdonságok telítődését mutatják, kivételek lehetnek a dózismeghatározási követelmények alól, és eseti alapon kell azokat értékelni.
28. Annak érdekében, hogy dózis-válasz adatokat lehessen szerezni, a teljes vizsgálatnak egy negatív kontrollcsoportot (18. pont), valamint legalább három dózist kell tartalmaznia, ahol a dózisok közötti szorzótényező általában 2, de legfeljebb 4. Ha a vizsgálati vegyi anyag nem okoz toxicitást a dózistartomány-kereső vizsgálatban vagy meglévő adatok alapján, egyszeri adagolás esetén a legmagasabb dózissal 2000 mg/testtömegkilogrammnak kell lennie. Ha azonban a vizsgálati vegyi anyag toxicitást okoz, az MTD-nek a beadott legmagasabb dózissal kell lennie, és az alkalmazott dózisok lehetőleg fedjék le a maximálistól az alacsony mértékű toxicitást okozó vagy toxicitást egyáltalán nem okozó dózsig terjedő tartományt. Ha a célszövet (vagyis a here) toxicitása valamennyi vizsgált dózissal megfigyelhető, érdemes nem toxikus dózissal további vizsgálatot végezni. A mennyiségi dózis-válasz adatok teljesebb körű jellemzését célzó vizsgálatok további dóziscsoportokat tehetnek szükségessé. Ezek a határértékek a vizsgálati vegyi anyagok bizonyos, külön követelmények hatálya alá tartozó típusai (például a humán gyógyszerek) esetében változóak lehetnek. Ha a vizsgálati vegyi anyag toxicitást okoz, a legmagasabb dózist és két alacsonyabb dózist kell kiválasztani (a fentiek szerint). Legalább 14 napig tartó beadási időszak esetén a legmagasabb dózissal 1000 mg/testtömeg kg/napnak, 14 napnál rövidebb beadási időszak esetén pedig 2000 mg/testtömeg kg/napnak kell lennie.

A dózisok beadása

29. Az emberi expozíció várható útját figyelembe kell venni a vizsgálat tervezése során. Ezért az egyéb expozíciós utak (például takarmány, ivóvíz, topikális szubkután, intravénás, orális (gyomorszondával), inhalációs vagy implantáció) is kiválaszthatók indokoltként. Az utat mindenesetre úgy kell kiválasztani, hogy biztosítsa a célszövet megfelelő expozícióját. A

hasüregbe adott injekció tudományos indokolás hiányában általában nem ajánlott, mivel az fiziológiai szempontból nem releváns emberi expozíciós út. Ha a vizsgálati vegyi anyagot a takarmányba vagy ivóvízbe keverik, különösen egyszeri adagolás esetén ügyelni kell arra, hogy a táplálék és a víz fogyasztása és a mintavétel közötti idő elegendő legyen a hatások kimutathatóságához (lásd a 33. pontot). A gyomorszondán át vagy injekcióval egyszerre beadható maximális folyadékmennyiség a kísérleti állat méretétől függ. A térfogata rendszerint nem haladhatja meg az 1 ml/100 testtömeggramm mennyiséget, kivéve vizes oldatok esetén, amelyeknél legfeljebb 2 ml/100 testtömeggramm használható. Ennél nagyobb mennyiségek használatát (ha azt az állatjóléti tárgyú jogszabályok lehetővé teszik) meg kell indokolni. A koncentráció megfelelő beállításával kell minimalizálni a beadott térfogat variabilitását, és így kell biztosítani, hogy minden dózisonál azonos legyen a testtömegarányos térfogat.

Megfigyelések

30. A kísérleti állatok esetében általános klinikai megfigyeléseket kell tenni, és a klinikai tüneteket legalább naponta egyszer, lehetőleg minden nap ugyanazon időpont(ok)ban rögzíteni kell, továbbá figyelembe kell venni az adagolást követően várható hatások érvényesülésének csúcsidőszakát. Naponta legalább kétszer meg kell vizsgálni az összes állatot morbiditás és mortalitás szempontjából. Minden állat tömegét le kell mérni a vizsgálat megkezdésekor, az ismételt dózisú vizsgálatok esetén hetente legalább egyszer, valamint az állatok végleges elaltatásakor. A legalább egy hétig tartó vizsgálatok során a felvett táplálék mennyiségét legalább heti rendszerességgel le kell mérni. Amennyiben a vizsgálati vegyi anyag beadására az ivóvízzel együtt kerül sor, a vízfogyasztást minden vízcsere alkalmával és legalább hetente le kell mérni. A túlzott toxicitás nem halálos jeleit mutató állatokat a vizsgálati időszak befejezése előtt el kell altatni (13).

Kromoszómapreparálás

31. Közvetlenül az eutanázia után ivarsejt-szuszpenziót vesznek egyik vagy mindkét heréből, majd hipotóniás oldatba helyezik és ismert protokollok szerint – például (2) (14) (15) – fixálják azokat. A sejteket ezután tárgylemezre kenik és megfestik (16) (17). Valamennyi tárgylemezt kóddal kell ellátni, hogy az értékelő ne tudja beazonosítani azokat.

Elemzés

32. Minden egyes állatnál legalább 200 jól szétterült metafázist kell elemezni (3) (11). Amennyiben a negatív történeti kontrolladatok 1 % alatti gyakoriságot mutatnak, a statisztikai értékelés növelése érdekében egyedenként több mint 200 sejtet kell értékelni. Olyan festési módszereket kell alkalmazni, amelyek lehetővé teszik a centromer azonosítását.
33. A kromoszóma és a kromatid típusú rendellenességeket külön-külön kell feljegyezni és altípusonként (törések, kicserélődések) kell besorolni. A Gep-eket fel kell jegyezni, de nem kell figyelembe venni annak meghatározásakor, hogy egy adott vegyi anyag előidézi-e a kromoszóma-rendellenességet mutató sejtek számának szignifikáns növekedését. A laboratóriumban alkalmazott eljárásoknál biztosítani kell, hogy a kromoszóma-

rendellenességeket jól képzett értékelők elemezzék, Mivel a tárgylemezek elkészítésére szolgáló eljárások következtében gyakran kiértékelhetetlen a metafázisok bizonyos hányada, mert az eljárás kromoszómavesztéseket okoz, a sejteket a centromerszám alapján kell értékelni, ami a kiértékelte sejteknél nem lehet kevesebb mint $2n \pm 2$, ahol az n az adott fajra jellemző haploid kromoszómaszám.

34. Bár a vizsgálat célja a szerkezeti kromoszóma-rendellenességek észlelése, fontos feljegyezni a poliploid sejtek és az endoreduplikált kromoszómákkal rendelkező sejtek előfordulásának gyakoriságát, amennyiben láthatók ilyen sejtek (44. pont).

ADATOK ÉS JELENTÉS

Az eredmények feldolgozása

35. Az egyes állatok adatait táblázat formájában kell megadni. Minden egyes állat esetében értékelni kell a szerkezeti kromoszómaaberrációval/-aberrációkkal rendelkező sejtek számát és a sejtenkénti kromoszóma-rendellenességek számát. Az altípusonként (törések, kicserélődések) besorolt, kromatid és kromoszóma típusú rendellenességeket külön-külön kell felsorolni, megadva a számukat és a gyakoriságukat a kísérleti és a kontrollcsoportok esetében. A Gap-eket külön kell feljegyezni. A Gap-ek gyakoriságát bele kell foglalni a jelentésbe, de általában nem kell szerepeltetni az összes szerkezeti kromoszóma-rendellenesség gyakoriságának elemzésében. A poliploid és az endoreduplikált kromoszómákkal rendelkező sejtek százalékos arányát észlelés esetén a jelentésbe kell foglalni.

36. A toxicitásra és a klinikai tünetekre vonatkozó adatokat (a 30. pont alapján) jelenteni kell.

Elfogadhatósági kritériumok

37. Az alábbi kritériumok határozzák meg a vizsgálat elfogadhatóságát:

- A párhuzamos negatív kontroll adatai összhangban vannak a negatív történeti kontrolladatokra vonatkozó közzétett normákkal (amelyek alapján a kromoszóma-rendellenességgel rendelkező sejtek aránya várhatóan $> 0\%$ és $\leq 1,5\%$) és – amennyiben rendelkezésre állnak – a laboratórium történeti kontrolladataival (lásd a 10. és a 18. pontot).
- A párhuzamos pozitív kontrollok olyan válaszokat generálnak, amelyek összhangban vannak a pozitív történeti kontrolladatokra vonatkozólag közzétett normákkal és – amennyiben rendelkezésre áll – a laboratórium pozitív történeti kontrollokat tartalmazó adatbázisával, továbbá a negatív kontrollhoz viszonyítva statisztikailag szignifikáns növekedést idéznek elő (lásd a 17. és a 18. pontot).
- Megfelelő számú sejt és dózis képezte elemzés tárgyát (lásd a 28. és a 32. pontot).
- A legmagasabb dózis kiválasztására vonatkozó kritériumok összhangban vannak a 25. és 26. pontban ismertetett legmagasabb dózisokkal.

38. Ha mitózist és meiózist egyaránt tapasztalnak, meg kell határozni a spermagoniális mitózisok első és második meiotikus metafázishoz viszonyított arányát, állatonként 100 osztódó sejt összes mintájában valamennyi kezelt és negatív kontrollállathoz tartozó citotoxicitás méréseként. Ha csak mitózist figyelnek meg, a mitózisindexet állatonként legalább 1000 sejtben kell meghatározni.

Az eredmények értékelése és értelmezése

39. Legalább három kezelt dóziscsoportot kell megvizsgálni annak érdekében, hogy elegendő adat álljon rendelkezésre a dózis–válasz elemzéshez.
40. Amennyiben valamennyi elfogadhatósági kritérium teljesül, a vizsgálati vegyi anyag egyértelműen pozitívnak minősül, ha:

- legalább az egyik vizsgálati dózis statisztikailag szignifikáns növekedést mutat a párhuzamos negatív kontrollhoz viszonyítva;
- a növekedés legalább egy mintavételi időpont tekintetében összefügg a dózissal; valamint
- ezen eredmények bármelyike kívül esik a negatív kontrolladatok elfogadható tartományán vagy a laboratórium negatív történeti kontrolladatainak eloszlásán (például Poisson-eloszlású 95 %-os ellenőrzési határértéken).

Ezt követően úgy tekintendő, hogy a vizsgálati vegyi anyag képes kromoszóma-rendellenességeket előidézni a vizsgált állatok spermiogonium-sejtjeiben. A legmegfelelőbb statisztikai módszerekre vonatkozó ajánlások a szakirodalomban is megtalálhatók (11) (18). Az alkalmazott statisztikai teszteknek az állatot kell kísérleti egységnek tekinteniük.

41. Amennyiben valamennyi elfogadhatósági kritérium teljesül, a vizsgálati vegyi anyag egyértelműen negatívnak minősül, ha:

- a vizsgálati dózisok egyike sem mutat statisztikailag szignifikáns növekedést a párhuzamos negatív kontrollhoz viszonyítva;
- egyik kísérleti körülmény sem mutat a dózissal összefüggő növekedést; valamint
- valamennyi eredmény a negatív kontrolladatok, vagy amennyiben rendelkezésre állnak, a laboratórium negatív történeti kontrolladatainak (például Poisson-eloszlású 95 %-os ellenőrzési határértéken) tartományába esik.

Ezt követően úgy tekintendő, hogy a vizsgálati vegyi anyag nem képes kromoszóma-rendellenességeket előidézni a vizsgált állatok spermiogonium-sejtjeiben. A legmegfelelőbb statisztikai módszerekre vonatkozó ajánlások a szakirodalomban is megtalálhatók (11) (18). A negatív eredmény nem zárja ki annak lehetőségét, hogy a vegyi anyag kromoszóma-rendellenességet vagy génmutációt idéz elő a fejlődés egy későbbi, a vizsgálat tárgykörén kívül eső fázisában.

42. Az egyértelműen pozitív vagy egyértelműen negatív válasz igazolása nem követelmény.

43. Ha a válasz nem egyértelműen negatív és nem is egyértelműen pozitív, illetve egy adott eredmény (például kismértékű vagy határesethez közelítő növekedés) biológiai relevanciája megállapításának segítése érdekében az adatokat szakértői véleménnyel és/vagy a meglévő kísérleti adatok további vizsgálataival kell értékelni, például meg kell határozni, hogy a pozitív eredmény kívül esik-e a negatív kontrolladatok elfogadható tartományán vagy a laboratórium negatív történeti kontrolladatain (19).
44. Ritka esetekben, az adatkészlet még további vizsgálatok után is eleve kizárja a pozitív vagy negatív eredményekre vonatkozó következtetést, ezért kétértelmű reakció lesz a következtetés.
45. A poliploid sejtek számának növekedése azt jelezheti, hogy a vizsgálati vegyi anyag potenciálisan gátolhatja a mitotikus folyamatokat és számszerű kromoszóma-rendellenességet idézhet elő (20). Az endoreduplikált kromoszómákkal rendelkező sejtek számának növekedése azt jelezheti, hogy a vizsgálati vegyi anyag potenciálisan gátolhatja a sejtciklus előrehaladását (21) (22), ami más mechanizmus révén idéz elő számszerű kromoszóma-rendellenességet, mint a mitotikus folyamatok gátlása (lásd a 2. pontot). Ezért a poliploid sejtek és az endoreduplikált kromoszómákkal rendelkező sejtek előfordulását külön-külön kell feljegyezni.

Vizsgálati jelentés

46. A vizsgálati jelentésnek a következőket kell tartalmaznia:

Összegzés.

Vizsgálati vegyi anyag:

- eredet, gyártási szám, felhasználási határidő, ha rendelkezésre áll;
- a vizsgálati vegyi anyag stabilitása, ha ismert;
- a vizsgálati vegyi anyag oldhatósága és stabilitása az oldószerben, ha ismert;
- adott esetben a pH-érték, az ozmolalitás és a kicsapódás mérése abban a tápfolyadékban, amelyhez a vizsgálati vegyi anyagot hozzáadták.

Egy összetevőből álló anyag:

- fizikai megjelenés, vízzoldékonyság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok;
- kémiai azonosítás, például IUPAC- vagy CAS-névvel, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet alapján, tisztaság, adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb. alapján

Több összetevőből álló anyag, UVCB-k és keverékek:

- amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosítója (lásd fent), mennyiségi előfordulása és releváns fizikai-kémiai tulajdonságai révén jellemezve.

A vizsgálati vegyi anyag előkészítése:

- a vivőanyag megválasztásának indokolása;
- a vizsgálati vegyi anyag oldhatósága és stabilitása az oldószerben/vivőanyagban;
- a takarmány-, ivóvíz- vagy inhalációs készítmények előkészítése;
- a készítmények analitikai meghatározásai (pl. stabilitás, homogenitás, névleges koncentráció),
- ha végeztek ilyen meghatározásokat.

Kísérleti állatok:

- a felhasznált faj/törzs és a felhasználásuk indokolása;
- az állatok száma és életkora,
- az állatok származása, tartási körülmények, takarmány stb.;
- az állatok egyedi azonosítására szolgáló módszerek;
- rövid távú vizsgálatok esetében: az egyes állatok testsúlya a vizsgálat kezdetekor és végén; egy hétnél hosszabb vizsgálatok esetében: az egyes állatok testtömege a vizsgálat során és a táplálékfelvételük. A testtömegtartományt, az átlagot és a szórást minden egyes csoportnál meg kell adni.

Vizsgálati körülmények:

- a pozitív és negatív (vivőanyag/oldószeres) kontrollok adatai;
- a dózistartomány-kereső vizsgálatból kapott adatok, ha történt ilyen vizsgálat;
- a dózisok kiválasztásának indokolása;
- a beadási mód indokolása;
- a vizsgálati vegyi anyag előkészítésének részletes ismertetése;
- a vizsgálati vegyi anyag beadására vonatkozó részletek;
- a kiválasztott elpusztítási időpontok indokolása;
- az állati toxicitás mérésére szolgáló módszerek, beleértve adott esetben a kórszövettani vagy hematológiai elemzéseket, illetve az állatok megfigyelésének és a testtömeg mérésének gyakorisága;
- negatív eredmény esetén annak ellenőrzésére szolgáló módszerek, hogy a vizsgálati vegyi anyag elérte-e a célszövetet vagy az általános keringési rendszert;
- tényleges dózis (mg/testtömeg kg/nap) a vizsgálati vegyi anyagnak a takarmányban/ivóvízben meglévő koncentrációjából (ppm) és a fogyasztásból számítva, ha alkalmazható;
- a táplálék és víz minőségére vonatkozó részletek;
- a kezelési és mintavételi ütemtervek részletes leírása és kiválasztásuk indokolása;
- az eutanázia módja;

- a fájdalomcsillapítás módja (amennyiben alkalmaznak ilyet);
- a szövetek izolálására használt eljárások;
- metafázis-blokkoló vegyi anyag azonosítása, annak koncentrációja és kezelési időtartama;
- a tárgylemez preparálásának módszerei;
- a rendellenességek értékelésének kritériumai;
- az elemzett sejtek száma (állatonként);
- azon kritériumok, amelyek meghatározzák, hogy a vizsgálatok pozitívnak, negatívnak vagy többféleképpen értelmezhetőnek tekintendők-e.

Eredmények:

- az állatok állapota a vizsgálati időszak előtt és alatt, beleértve a toxicitás jeleit;
- az állatok testsúlya és szerveik tömeg a termináláskor (több kezelés esetén a kezelési eljárás során mért testsúlyok);
- toxicitás jelei;
- mitotikus index;
- spermagoniális mitózisok aránya az első és második meiotikus metafázishoz viszonyítva, vagy a célszövet expozíciójának egyéb bizonyítéka;
- rendellenességek száma és típusa az egyes állatokban;
- a rendellenességek csoportonkénti száma összesen, átlagokkal és szórással;
- a rendellenességeket mutató sejtek csoportonkénti száma átlagokkal és szórással;
- a dózis-válasz összefüggés, ahol lehetséges;
- statisztikai elemzések és alkalmazott módszerek;
- az egyidejűleg elvégzett negatív kontrollokra vonatkozó adatok;
- negatív történeti kontrolladatok, a tartományok, az átlagok, a szórás és a 95 %-os konfidenciaintervallum (ha rendelkezésre áll) megadásával, vagy a vizsgálati eredmények elfogadhatóságának megállapításához használt, publikált negatív történeti kontrolladatok;
- az egyidejűleg elvégzett pozitív kontrollokra vonatkozó adatok;
- a ploidia változásai, ha észlelhetők, beleértve a poliploid és/vagy endoreduplikált sejtek gyakoriságát.

Az eredmények értékelése

Következtetések

SZAKIRODALOM

- (1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Paris
- (2) Adler, I.-D. (1984). Cytogenetic Tests in Mammals. In: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. Ed. S. Venitt and J. M. Parry. IRL Press, Oxford, Washington DC, pp. 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. In: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, Cheng C.Y. (Ed.) Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, pp. 1-15.
- (6) Adler, I.-D. (1974). Comparative Cytogenetic Study after Treatment of Mouse Spermatogonia with Mitomycin C, Mutation. Res., 23(3): 368-379. Adler, I.D. (1986). Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications. In: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel C., Lambert B. and Magnusson J. (Eds.) Liss, New York, pp. 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. o.
- (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.), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.
- (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, In: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 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 In: D.J. Kirkland (Ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 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.

Függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Aneuploidia: a normális diploid (vagy haploid) kromoszómaszámtól egyetlen kromoszómával vagy egynél több, szám feletti kromoszómával, de nem teljes kromoszómakészlettel (kromoszómakészletekkel) (poliploidia) való bármely eltérés.

Centroméra: olyan kromoszóma-régió(k), amely(ek)hez a sejtosztódás során orsórostok kötődnek, lehetővé téve a leánykromoszómáknak az utódsejtek pólusai felé irányuló szabályos mozgását.

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Kromoszómasokféleség: a kromoszómák alakjában (pl. metacentrikus, akrocentrikus stb.) és méretében megfigyelhető változatosság.

Kromatid típusú rendellenesség: olyan szerkezeti kromoszómakárosodás, amely a különálló kromatidok törésében vagy a kromatidok közötti törésben és újraegyesülésben nyilvánul meg.

Kromoszóma típusú rendellenesség: olyan szerkezeti kromoszómakárosodás, amely a két kromatid azonos helyén történt törésében, vagy törésében és újraegyesülésében nyilvánul meg.

Klasztogén: bármely olyan vegyi anyag, amely sejtek vagy szervezetek populációjában szerkezeti kromoszóma-rendellenességeket okoz.

Gap: egyetlen kromatid szélességénél kisebb és a kromatidok minimális átrendeződését okozó akromatikus lézió.

Genotoxikus: olyan általános kifejezés, amely magában foglalja a DNS- vagy kromoszómakárosodás valamennyi típusát, köztük a töréseket, a deléciókat, az adduktok képződését, a nukleotidok módosulását és kapcsolódását, az átrendeződéseket, a mutációkat, a kromoszómaaberrációkat és az aneuploidiát. A genotoxikus hatás nem minden típusa eredményez mutációkat vagy stabil kromoszómakárosodást.

Mitotikus index (MI): a metafázisban lévő sejtek és a sejtpopuláció összes sejtjének aránya; e populáció proliferációja mértékének jelzése.

Mitózis: a sejtmag osztódása, amely általában profázisra, prometafázisra, metafázisra, anafázisra és telofázisra osztható fel.

Mutagén: örökletes elváltozást idéz elő a génekben lévő DNS-bázispár-szekvenciá(k)ban vagy a kromoszómák szerkezetében (kromoszómaaberrációk).

Számszerű rendellenesség: a kromoszómák számának eltérése a felhasznált állatokra jellemző normál számértéktől.

Poliploidia: a haploid kromoszómaszám (n) egészszámú, de nem diploid (azaz $3n$, $4n$ és így tovább) megsokszorozódása.

Szerkezeti rendellenesség: a sejtosztódás metafázisának mikroszkopikus vizsgálata során – deléciókként, fragmensekként és kicserélődésekként – észlelhető változás a kromoszóma szerkezetében.

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

UVCB: ismeretlen vagy változó összetételű vegyi anyagok, komplex reakciótermékek vagy biológiai anyagok.”

5. A B. részben a B.40. fejezet helyébe a következő szöveg lép:

„B.40. *IN VITRO* BŐRKORRÓZIÓ: TRANSZKUTÁN ELEKTROMOS REZISZTENCIA (TER) VIZSGÁLATI MÓDSZER

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 430. vizsgálati iránymutatásában (2015) leírt módszerrel. A bőrkorrózió valamely vizsgálati vegyi anyag alkalmazását követően megjelenő, visszafordíthatatlan bőrkárosodás, amely a felhámon át az irhára is áttérjedő látható szövetelhalást okoz [az Egyesült Nemzetek Szervezete (ENSZ) által kidolgozott, vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének globálisan harmonizált rendszerében (GHS) (1), valamint az Európai Unió (EU) anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról szóló 1272/2008/EK rendeletében (CLP-rendelet¹) meghatározottak szerint]. Ez a továbbfejlesztett B.40. vizsgálati módszer olyan *in vitro* eljárást biztosít, amely lehetővé teszi a korróziót nem okozó és korróziót okozó anyagok és keverékek ENSZ GHS (1) és CLP-rendelet szerinti meghatározását.
2. A bőrkorrózió felmérése jellemzően kísérleti állatokon történő vizsgálatot foglal magában (az OECD eredetileg 1981-ben elfogadott, majd 1992-ben, 2002-ben és 2015-ben felülvizsgált 404. vizsgálati iránymutatásával egyenértékű B.4. vizsgálati módszer alkalmazásával) (2). E B.40. vizsgálati módszer mellett a vegyi anyagok bőrkorróziós hatásának vizsgálatára szolgáló más *in vitro* vizsgálati módszereket is validáltak és elfogadtak – az OECD 431. vizsgálati iránymutatásával egyenértékű – B.40bis. vizsgálati módszerként (3) és – az OECD 435. vizsgálati iránymutatásával egyenértékű – B.65. vizsgálati módszerként (4), amelyek igény szerint alkalmazhatók a korrozív vegyi anyagok alkategóriáinak azonosítására is. Az OECD 439. vizsgálati iránymutatásával egyenértékű (5) B.46. vizsgálati módszer keretében pedig elfogadtak több, a bőrirritáció felmérésére szolgáló validált *in vitro* vizsgálati módszert. A bőrkorróziós és bőrirritációs vizsgálatok és értékelések integrált megközelítéseiről (IATA) szóló OECD-iránymutatás több, különböző információforrásokat és adatelemző eszközöket csoportosító modult ismertet, továbbá iránymutatást nyújt arra nézve, i. hogyan integrálhatók és használhatók az ismert vizsgálati és nem vizsgálati eredetű adatok a vegyi anyagok potenciális bőrirritációs és bőrkorróziós hatásainak felmérésére, és ii. javaslatot tesz egy, a további vizsgálatok szükségessége esetén alkalmazható megközelítésre (6).

¹ Az Európai Parlament és a Tanács 1272/2008/EK rendelete (2008. december 16.) az anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról, a 67/548/EGK és az 1999/45/EK irányelv módosításáról és hatályon kívül helyezéséről, valamint az 1907/2006/EK rendelet módosításáról (HL L 353/1., 2008.12.31.).

3. Ez a vizsgálati módszer a bőrkorrózióval mint az emberi egészség károsodásának egyik végpontjával foglalkozik. Alapja a patkánybőr transzcután elektromos rezisztenciáját (TER) mérő vizsgálati módszer, amelynek keretében bőrkorongokat használnak korrozív anyagok azonosítására, vizsgálva a normál *stratum corneum* integritására és barrierfunkciójára gyakorolt károsító hatásukat. A módszernek megfelelő, eredetileg 2004-ben elfogadott OECD vizsgálati iránymutatást az IATA-iránymutatás fényében 2015-ben módosították.
4. Az *in vitro* bőrkorróziós vizsgálatok szabályozási célú értékelése érdekében elvégezték a bőrkorrózió felmérésére szolgáló, patkánybőr használatán alapuló TER vizsgálati módszer elővalidálási vizsgálatait (7), majd a hivatalos validálási vizsgálatát (8) (9) (10) (11). E vizsgálatok eredményei vezettek ahhoz az ajánláshoz, hogy a TER vizsgálati módszer (validált referenciamódszer - VRM) használható szabályozási célú *in vivo* bőrkorrózió felmérésére (12) (13) (14).
5. Mielőtt az *in vitro* TER bőrkorróziós vizsgálati módszerhez hasonló vagy ahhoz képest módosított, a validált referenciamódszertől eltérő javasolt módszer szabályozási célú alkalmazásra kerülne, a validált referenciamódszerhez való hasonlóságának biztosítása érdekében a teljesítményszabványok (15) követelményeinek megfelelően meg kell határozni a javasolt felhasználása tekintetében fennálló megbízhatóságát, relevanciáját (pontosságát) és korlátait. Az adatok OECD-megállapodás szerinti kölcsönös elfogadása csak azután garantált, hogy a teljesítményszabványok szerint javasolt új vagy átdolgozott vizsgálati módszert felülvizsgálták és belefoglalták az OECD megfelelő vizsgálati iránymutatásába.

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

6. Az alkalmazott fogalmak meghatározása a függelékben található.

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK

7. A validálási vizsgálat (10) és más közzétett tanulmányok (16) (17) szerint a patkánybőr TER vizsgálati módszer egy 122 anyagból álló adatbázis tekintetében 94 %-os (51/54) összérzékenységgel és 71 %-os specificitással (48/68) képes megkülönböztetni ismert bőrkorróziót okozó és bőrkorróziót nem okozó anyagokat.
8. Ez a vizsgálati módszer a bőrkorrózió azonosítására szolgáló *in vitro* eljárás. Lehetővé teszi, hogy az ENSZ által kidolgozott GHS és a CLP-rendelet szerint megkülönböztessék a korróziót nem okozó és a korróziót okozó vizsgálati vegyi anyagokat. E vizsgálati módszer korlátai közé tartozik – ahogyan az a validálási vizsgálatokból kiderült (8) (9) (10) (11) –, hogy nem teszi lehetővé a korrozív anyagoknak és keverékeknek az ENSZ GHS és a CLP-rendelet szerinti alkategóriákba sorolását. A vizsgálati módszer jövőbeni használatát a vonatkozó szabályozási keret fogja meghatározni. Ez a vizsgálati módszer ugyan nem biztosít elegendő információt a bőrirritáció felméréséhez, de a B.46. vizsgálati módszer célja kifejezetten az, hogy a bőrirritációs egészségügyi hatásokat *in vitro* határozza meg (5). Egyetlen bőrexpozíció után a

bőrt ért helyi hatások teljes kiértékeléséhez az integrált vizsgálati és értékelési megközelítésekről szóló OECD-iránymutatást kell tanulmányozni (6).

9. A vizsgálati módszert alátámasztó validálás során igen sokféle, többségében különálló anyagot képviselő vegyi anyagot vizsgáltak, és a validálási vizsgálat empirikus adatbázisa összesen 60 anyagot tartalmazott, amelyek lefedik a kémiai osztályok széles körét (8) (9). Az összes rendelkezésre álló adat alapján a vizsgálati módszer a legkülönbözőbb kémiai osztályokra és halmazállapotokra, azon belül folyadékokra, félszilárd, szilárd és viaszos állagú anyagokra alkalmazható. Mivel azonban bizonyos halmazállapotok tekintetében nem állnak rendelkezésre könnyen hozzáférhető, megfelelő referenciaadatokkal bíró vizsgálati tételek, a validálás során viszonylag csekély számú viaszos állagú és korrozív szilárd anyag került felmérésére. A folyadékok lehetnek vizesek vagy nem vizesek; a szilárd anyagok lehetnek vízben oldódóak vagy oldhatatlanok. Olyan esetekben, amikor bizonyítékkal igazolható, hogy a vizsgálati módszer nem alkalmazható valamely konkrét anyagkategóriára, a vizsgálati módszert nem szabad az adott anyagkategóriára alkalmazni. E vizsgálati módszerről feltételezhető továbbá, hogy az anyagokra való alkalmazhatóságának kiterjesztéseként keverékekre is alkalmazható. Mivel azonban a keverékek kategóriák és összetételek széles körét fedik le, és jelenleg kevés információ áll rendelkezésre a keverékek vizsgálatára vonatkozóan, azokban az esetekben, amikor bizonyítékkal igazolható, hogy a vizsgálati módszer valamely konkrét keverékkategóriára nem alkalmazható (pl. az Eskes és munkatársai, 2012 által javasolt stratégia alapján) (18), a vizsgálati módszer az adott keverékkategóriára nem alkalmazható. A vizsgálati módszer tervezett szabályozási célt szolgáló adatgenerálás érdekében, keveréken történő alkalmazása előtt meg kell vizsgálni, hogy az megfelelő eredményeket biztosíthat-e erre a célra, és ha igen, miért. Ilyen megfontolások nem szükségesek, ha létezik a keverék vizsgálatára vonatkozó szabályozási követelmény. Gázokat és aeroszolókat validálási vizsgálatok keretében még nem vizsgáltak (8) (9). Bár elképzelhető, hogy ezek is vizsgálhatók TER vizsgálati módszerrel, a jelenlegi vizsgálati módszer nem teszi lehetővé gázok és aeroszolok vizsgálatát.

A VIZSGÁLAT ELVE

10. A vizsgálati vegyi anyagot 24 órán át a bőrkorongok epidermális felületén alkalmazzák egy kétkamrás vizsgálati rendszerben, amelyben a bőrkorongok a két kamra elválasztására szolgálnak. A bőrkorongok kéméletes módon leölt, 28–30 napos patkányokról származnak. A korrozív vegyi anyagok azok, amelyek a normál *stratum corneum* integritásának és barrierfunkciójának elvesztését okozzák, amit a TER meghatározott határérték alá történő csökkenésével mérnek (16) (lásd a 32. pontot). A patkánybőr TER esetében az 5 k Ω határérték került kiválasztásra a széles tartományt felölelő anyagok nagyszámú adataiból, ahol az értékek túlnyomó többsége vagy világosan ezen érték felett (gyakran > 10 k Ω) vagy jóval alatta (gyakran < 3 k Ω) volt (16). Általában azok a vizsgálati vegyi anyagok, amelyek az állatokra nézve nem korrozívak, de irritálók vagy nem irritálók, nem csökkentik a TER-t e határérték alá. Továbbá más bőrkészítmények vagy más berendezés használata módosíthatja a határértéket, ami további validálásokat tesz szükségessé.

11. A TER-ben a pozitív értékek – beleértve az 5 kΩ körülieket is – kontrollvizsgálata céljából a vizsgálati eljárás részét képezi egy festékmegkötést biztosító lépés is. A festékmegkötést biztosító lépés meghatározza, hogy az ionáteresztő képesség fokozódását a *stratum corneum* fizikai károsodása okozza-e. A patkánybőrt alkalmazó TER módszer a B.4. vizsgálati módszer (2) alapján vizsgált nyúlban előre jelezte az *in vivo* korrozivitást.

A JÁRTASSÁG BIZONYÍTÁSA

12. Az e vizsgálati módszerhez kapcsolódó patkánybőr TER vizsgálati módszer rutinszerű alkalmazása előtt a laboratóriumoknak az 1. táblázatban ajánlott tizenkét jártassági tesztanyag helyes osztályozásával igazolniuk kell szakmai jártasságukat. Ha a jegyzékben szereplő valamely anyag nem áll rendelkezésre, illetve ha indokolható, megfelelő *in vivo* és *in vitro* referenciaadatokkal rendelkező más – például a referencia-vegyianyagok jegyzékében feltüntetett (16) – anyag is használható, amennyiben a kiválasztási kritériumok megegyeznek az 1. táblázatban foglaltakkal.

1. táblázat: A jártassági tesztanyagok jegyzéke¹

Anyag	CAS-szám	Kémiai osztály ²	ENSZ GHS/CLP szerinti, <i>in vivo</i> eredményeken alapuló kat. ³	VRM szerinti, <i>in vitro</i> eredményeken alapuló kat.	Halmazállapot	pH ⁴
<i>In vivo</i> korrozív hatású						
N,N'-Dimetil-dipropiléntriamin	10563-29-8	szerves bázis	1A	6 x C	F	8,3
1,2-Diaminopropán	78-90-0	szerves bázis	1A	6 x C	F	8,3
Kénsav (10 %)	7664-93-9	szervetlen sav	(1A)/1B/1C	5 x C 1 x NK	F	1,2
Kálium-hidroxid (10 %-os aq.)	1310-58-3	szervetlen bázis	(1A)/1B/1C	6 x C	F	13,2
Oktánsav (kaprilsav)	124-07-2	szerves sav	1B/1C	4 x C 2 x NK	F	3,6
2-terc-Butilfenol	88-18-6	fenol	1B/1C	4 x C 2 x NK	F	3,9
<i>In vivo</i> nem korrozív hatású						
Izosztearinsav	2724-58-5	szerves sav	NK	6 x NK	F	3,6
4-Amino-1,2,4-triazol	584-13-4	szerves bázis	NK	6 x NK	Sz	5,5
Fenetil-bromid	103-63-9	elektrofil	NK	6 x NK	F	3,6
4-(Metil-tio)-benzaldehyd	3446-89-7	elektrofil	NK	6 x NK	F	6,8
1,9-Dekadién	1647-16-1	semleges szerves	NK	6 x NK	F	3,9

Anyag	CAS-szám	Kémiai osztály ²	ENSZ GHS/CLP szerinti, <i>in vivo</i> eredményeken alapuló kat. ³	VRM szerinti, <i>in vitro</i> eredményeken alapuló kat.	Halmazállapot	pH ⁴
Tetraklór-etilén	127-18-4	semleges szerves	NK	6 x NK	F	4,5

Rövidítések: aq = vizes; CAS-szám = Vegyianyag Nyilvántartási Szolgálat (CAS) nyilvántartási szám; VRM = Validált referenciamódszer; ND = Nem meghatározott.

¹A jártassági tesztanyagok – amelyek felsorolása elsőként korrozív és nem korrozív hatásuk szerint, majd korrozivitási alkategóriák szempontjából, végül pedig kémiai osztályuk alapján történt – a patkánybőr TER vizsgálati módszer ECVAM által végzett validálási vizsgálatában használt anyagok közül kerültek kiválasztásra (8) (9). Ha nincs másképpen feltüntetve, az anyagokat a kereskedelmi forrásból való beszerzésükkor tapasztalt tisztasági szinten vizsgálták (8). A lehetőségekhez mérten olyan anyagok kerültek kiválasztásra, amelyek: i. a validált referenciamódszer által mérhető vagy előrevezethető korrozivitási válaszreakciók tartományának tekintetében reprezentatívak (pl. nincs korrozív hatásuk; enyhétől az erősig terjedő korrozíós hatást váltanak ki); ii. a validálási vizsgálatban használt kémiai osztályok tekintetében reprezentatívak; iii. tükrözik a validált referenciamódszer teljesítményi jellemzőit; iv. jól meghatározott kémiai szerkezettel rendelkeznek; v. egyértelmű eredményeket hoznak az *in vivo* referenciavizsgálati módszer alkalmazásakor; vi. kereskedelmi forgalomban kaphatók; és vii. nem kapcsolódnak hozzájuk kiemelkedően magas ártalmatlanítási költségek.

²A Barratt és társai szerinti kémiai osztály (8).

³Az ENSZ GHS/CLP-rendelet szerinti 1A, 1B és 1C kategóriának az ENSZ I., II. és III. csomagolási csoportja felel meg.

⁴A pH-értékek forrása a Fentem és társai (9), valamint a Barratt és társai (8).

ELJÁRÁS

13. A patkánybőr TER bőrkorróziós vizsgálati módszerhez rendelkezésre állnak szabványműveleti eljárások (19). Az e vizsgálati módszer keretébe tartozó patkánybőr TER vizsgálati módszereknek az alábbi feltételeknek kell megfelelniük:

Állatok

14. Patkányokat kell használni, mert a bőrüknek a vizsgálati módszer során alkalmazható anyagokkal szembeni érzékenysége már korábban bebizonyosodott (12), emellett ez az egyetlen hivatalosan validált bőrforrás (8) (9). A patkányok kora (a bőr begyűjtésének időpontjában) és származása különösen fontos annak biztosítására, hogy a szőrtüszők nyugvó fázisban legyenek, mielőtt a felnőtt szőr nőni kezd.
15. A fiatal, körülbelül 22 napos, hím vagy nőstény patkányok (Wistar vagy hasonló törzs) hátán és horpaszon lévő szőrét kis nyírógéppel óvatosan eltávolítják. Azután az állatokat óvatosan törölgetve megmossák, miközben a lenyírt területet antibiotikumot tartalmazó oldatba merítik (amely a baktériumok növekedését hatékonyan gátló koncentrációban például sztreptomcint, penicillint, klóramfenikolt és amfotericint tartalmaz). Az állatokat az első mosást követő harmadik vagy negyedik napon ismételt megmossák antibiotikummal, és a második mosást

követő 3 napon belül felhasználják azokat, amikor a *stratum corneum* megerősödött a szőrtelenítés után.

A bőrkorongok előkészítése

16. Az állatokat 28–30 napos korukban kíméletes módon leölik; ez a kor kritikus. Ezután minden állatról eltávolítják a dorsolaterális bőrt, és a bőrtől való óvatos elválasztással lefejtik a felesleges szubkután zsírt. Egyenként körülbelül 20 mm-es átmérőjű bőrkorongokat távolítanak el. A bőrt a korongok felhasználása előtt tárolni lehet, ha kimutatható, hogy a pozitív és negatív kontrolladatok megegyeznek a friss bőrnél kapott adatokkal.
17. Minden bőrkorongot egy PTFE (politetrafluoroetilén) cső vége fölé helyeznek, biztosítva, hogy az epidermális felület érintkezzen a csővel. Egy „O” gumigyűrűt pontosan a cső végére illesztenek, hogy a helyén tartsa a bőrt, és a felesleges szövetet levágják. Az „O” gumigyűrűt aztán vazelinrel óvatosan tömítik a PTFE-cső végéhez. A csövet egy rugós csipesz tartja egy MgSO_4 -oldatot (154 mM) tartalmazó befogadókamra belsejében (1. ábra). A bőrkorongot teljesen bele kell meríteni az MgSO_4 -oldatba. Egyetlen patkánybőrből 10–15 bőrkorongot lehet készíteni. A cső és az „O” gyűrű méreteit a 2. ábra mutatja.
18. A vizsgálat kezdete előtt az egyes állati bőrok minőség-ellenőrzése céljából megméri két bőrkorong TER-értékét. Mindkét korongnak 10 k Ω -nál nagyobb elektromosrezisztencia-értéket kell mutatnia ahhoz, hogy a többi korongot fel lehessen használni a vizsgálati módszerhez. Ha a rezisztencia értéke kisebb mint 10 k Ω , a bőrdarab többi korongját ki kell dobni.

A vizsgálati vegyi anyag és a kontrollanyagok alkalmazása

19. A vizsgálati modell megfelelő teljesítménye érdekében minden vizsgálatmenettel (kísérlettel) egyidejűleg pozitív és negatív kontrollokat kell végezni. Minden vizsgálatmenetben (kísérletben) egyetlen állatról származó bőrkorongokat kell használni. Az ajánlott pozitív, illetve negatív vizsgálati vegyi anyagok: 10 M sósav, illetve desztillált víz.
20. A folyékony vizsgálati vegyi anyagokat (150 μl) a cső belsejében egyenletesen viszik fel az epidermális felületre. Szilárd anyagokkal történő vizsgálat esetén megfelelő mennyiségű szilárd anyagot egyenletesen visznek fel a korongra annak biztosítására, hogy az epidermisz teljes felületét beborítsa. A szilárd anyagra deionizált vizet (150 μl) öntenek, és a csövet óvatosan felrázzák. A bőrrel való maximális érintkezés elérése érdekében előfordulhat, hogy a szilárd anyagot 30 °C-ra fel kell melegíteni olvasztás vagy lágyítás céljából, illetve őrölni vagy porítani kell.
21. Minden vizsgálatmenet (kísérlet) során az egyes vizsgálati és kontrollanyagokhoz három bőrkorongot használnak. A vizsgálati vegyi anyagot 24 órán át alkalmazzák 20–23 °C-on. A vizsgálati vegyi anyagot legfeljebb szobahőmérsékletű csapvízsugárral addig mossák, amíg már nem lehet további anyagot eltávolítani.

TER-mérések

22. A bőr ellenállásának TER-ként történő mérése egy kisfeszültségű, váltakozó áramú Wheatstone-híd segítségével történik (18). A mérőeszköz általános jellemzői: 1–3 Volt üzemi feszültség, 50–1 000 Hz-es szinusz- vagy négyszög hullámú váltakozó áram és legalább 0,1–30 k Ω mérési tartomány. A validálási vizsgálatban használt mérőeszköz az induktivitást, kapacitást és rezisztenciát sorrendben 2000 H, 2000 μ F és 2 M Ω értékekig méri 100 Hz-es vagy 1 kHz-es frekvencián, soros vagy párhuzamos értékek felhasználásával. A TER-mérések céljára a korrozivitásra vonatkozó vizsgálati méréseket elektromos ellenállásban rögzítik 100 Hz-es frekvencián és soros értékeket felhasználva. Az elektromos ellenállás mérése előtt a bőr felületi feszültségét megfelelő mennyiségű 70 %-os etil-alkohollal csökkentik, amely beborítja az epidermiszt. Néhány másodperc elteltével az etil-alkoholt eltávolítják a csőből, majd azután a szövetet 3 ml MgSO₄-oldat (154 mM) hozzáadásával hidratálják. Az ellenállás k Ω /bőrkorongban való méréséhez a Wheatstone-híd elektródáit ráhelyezik a bőrkorong mindkét oldalára (1. ábra). Az elektróda méretei és a krokodilcsipeszek alatti elektródaszakasz hosszúsága a 2. ábrán látható. A belső elektródához csatolt csipesz az ellenállás mérésekor a PTFE-cső tetején található annak biztosítására, hogy állandó hosszúságú elektróda merüljön az MgSO₄-oldatba. A külső elektródát a befogadókamra belsejébe úgy helyezik el, hogy az a kamra aljáig érjen. A rugós csipesz és a PTFE-cső alja közötti távolságot állandó értéken tartják (2. ábra), mivel ez a távolság befolyásolja a kapott rezisztencia értékét. Következésképpen a belső elektróda és a bőrkorong közötti távolságnak állandónak és minimálisnak kell lenni (1–2 mm).
23. Ha a mért rezisztencia értéke nagyobb mint 20 k Ω , az valószínűleg a bőrkorong epidermális felületét borító vegyianyag-maradvány következménye. Ennek a bevonatnak az eltávolítása megkísérelhető például úgy, hogy kesztyűs hüvelykujjal befogják a PTFE csövet, és körülbelül 10 másodpercen át rázogatják; az MgSO₄-oldatot eltávolítják és a rezisztenciamérést friss MgSO₄-tal megismétlik.
24. A vizsgálati műszer jellemzői és méretei, valamint a használt vizsgálati eljárás befolyásolhatja a kapott TER-értékeket. Az 5 k Ω korróziós határértéket az ebben a vizsgálati módszerben leírt speciális műszerrel és eljárással kapott adatok alapján számolták ki. Ha a vizsgálati feltételek megváltoznak, vagy más készüléket használnak, előfordulhat, hogy eltérő határ- és kontrollértékeket kell alkalmazni. Ezért ajánlatos a módszert és az ellenállás határértékét a validálási vizsgálatban (8) (9) használt anyagokból vagy a vizsgált anyagokhoz hasonló kémiai osztályú anyagokból kiválasztott jártassági tesztanyagok sorozatának vizsgálatával meghatározni. A megfelelő jártassági tesztanyagok jegyzékét az 1. táblázat tartalmazza.

Festékanyag-megkötő módszerek

25. Bizonyos nem korrozív anyagoknak való expozíció eredményezheti a rezisztencia 5 k Ω határérték alá történő csökkenését, ami lehetővé teszi az ionoknak a *stratum corneum*on való passzálását, csökkentve ezáltal az elektromos rezisztenciát (5). Például a semleges szerves és felületaktív anyagok (például a tisztítószer, emulgeálószer és más felületaktív anyagok) eltávolíthatják a bőrsírt, ezáltal a barrier az ionok számára áthatolhatóbbá válik. Így ha az ilyen

vegyi anyagok TER-értéke alacsonyabb mint 5 k Ω vagy akörül van, és nem tapasztalható látható károsodás a bőrkorongokon, a kontrollon és kezelt szöveteken festékpenetrációs vizsgálatot kell végezni annak megállapítására, hogy a kapott TER-érték a bőr fokozottabb áteresztő képességének vagy a bőrkorrózióznak az eredménye-e (7) (9). Ez utóbbi esetén, amikor a *stratum corneum* szétrepedt, ha a bőrfelszínre szulforhodamin B festéket visznek fel, ez gyorsan áthatol, és megfesti az alatta lévő szövetet. Ez a különleges festékanyag az anyagok széles skálájának ellenáll, és nem érinti a lent leírt kivonási eljárás.

Szulforhodamin B festékanyag alkalmazása és eltávolítása

26. A TER-vizsgálatot követően a magnézium-szulfátot eltávolítják a csőből, és gondosan megvizsgálják, hogy a bőrön látható-e károsodás. Ha nincs nagyobb látható károsodás (pl. perforáció), szulforhodamin B festékanyag (Acid Red 52; C.I. 45100; CAS-szám: 3520-42-1), 150 μ l 10 tömegszázalékos desztillált vizes oldatát alkalmazták minden bőrkorong epidermális felületén 2 órán át. Ezeket a bőrkorongokat azután a felesleges/meg nem tapadt festékanyag eltávolítása érdekében körülbelül 10 másodpercig legfeljebb szobahőmérsékletű csapvízben lemosták. Minden egyes bőrdarabot gondosan eltávolítanak a PTFE-csőről és egy, deionizált vizet (8 ml) tartalmazó ampullába (például egy 20 ml-es üveg szcintillációs ampullába) helyezik. Az ampullákat óvatosan 5 percen át rázogatták minden felesleges/meg nem tapadt festékanyag eltávolítása érdekében. Ezt az öblítési eljárást megismétlik, azután a bőrkorongokat kiveszik, és desztillált vízben lévő 5 ml 30 tömegszázalékos nátrium-dodecil-szulfát (SDS) vizes oldatát tartalmazó ampullába helyezik, és egy éjszakán át 60 °C-on inkubálják.
27. Az inkubálást követően minden bőrkorongot eltávolítanak és kidobnak, a fennmaradó oldatot pedig 8 percen át 21 °C-on centrifugálják (relatív centrifugális erő $\sim 175 \times g$). 1 ml felüliszót kivesznek, és felhígítanak 1:5 térfogatban [azaz 1 ml + 4 ml] arányban 30 % (tömegszázalékos) SDS-sel. Megméri az oldat optikai sűrűségét (OD) 565 nm-nél.

A festékanyag-tartalom kiszámítása

28. Az OD-értékekből kiszámítják a korongonkénti szulforhodamin B festéktartalmat (9) (szulforhodamin B festék moláris extinkciós együtthatója 565 nm-en $8,7 \times 10^4$; molekulatömege 580 g). A festékanyag-tartalmat minden egyes bőrkorong esetében megfelelő kalibrációs görbe használatával meghatározzák, azután kiszámítják a párhuzamos vizsgálatok átlagos festékanyag-tartalmát.

Elfogadhatósági kritériumok

29. Az átlag TER-eredmények elfogadhatók, ha az egyidejű pozitív és negatív kontrollértékek a vizsgálati laboratóriumban a módszer elfogadható tartományába esnek. A fent leírt módszertanra és készülékre vonatkozó elfogadható ellenállás-tartományokat az alábbi táblázat tartalmazza:

Kontroll	Anyag	Ellenállás-tartomány (k Ω)
Pozitív	10 M sósav	0,5–1,0

Negatív	Desztillált víz	10–25

30. Az átlagos festékanyag-megkötési eredmények azzal a feltétellel fogadhatók el, hogy az egyidejű kontrollértékek a módszer elfogadható tartományába esnek. A fent leírt módszertan és készülék esetében a kontrollanyagok tekintetében javasolt elfogadható festéktartalom-tartományokat az alábbi táblázat tartalmazza:

Kontroll	Anyag	Festéktartalom tartománya ($\mu\text{g}/\text{korong}$)
Pozitív	10 M sósav	40–100
Negatív	Desztillált víz	15–35

Az eredmények értelmezése

31. A TER határértékét, amely megkülönbözteti a korrozív és a nem korrozív vizsgálati vegyi anyagokat, a vizsgálati módszer optimalizálása során állapították meg, egy elővalidálási szakaszban tesztelték, és egy hivatalos validálási vizsgálatban igazolták.

32. Az ENSZ GHS/CLP-rendelet osztályozási rendszeréhez kapcsolódó patkánybőr TER bőrkorróziós vizsgálati módszer előrejelzési modellje (9) (19) az alábbiak szerint alakul:

A vizsgálati vegyi anyag a bőrre nem korrozív hatású anyagnak tekintendő:

- i) ha a vizsgálati vegyi anyagra kapott átlagos TER-érték nagyobb mint ($>$) 5 k Ω ; vagy
- ii) a vizsgálati vegyi anyagra kapott átlagos TER-érték kisebb vagy egyenlő ($\leq$) 5 k Ω -mal, és
- a bőrkorongok nem mutatnak látható károsodást (pl. perforációt), és
- a korong átlagos festéktartalma kisebb ($<$) a 10 M HCl egyidejű pozitív kontrollnál megállapított átlagos bőrkorong-festéktartalomnál (a pozitív kontrollértékeket lásd a 30. pontban).

A vizsgálati vegyi anyagnak a bőrre korrozív hatása van:

- i) ha a vizsgálati vegyi anyagra kapott átlagos TER-érték kisebb vagy egyenlő ($\leq$) 5 k Ω -mal, és a bőrkorongok láthatóan károsodtak (pl. perforálódtak), vagy
- ii) a vizsgálati vegyi anyagra kapott átlagos TER-érték kisebb vagy egyenlő ($\leq$) 5 k Ω -mal, és
- a bőrkorongok nem mutatnak látható károsodást (pl. perforációt), de
- a korongok átlagos festéktartalma nagyobb vagy egyenlő ($\geq$) a 10 M HCl egyidejű pozitív kontrollnál megállapított átlagos bőrkorong-festéktartalommal (a pozitív kontrollértékeket lásd a 30. pontban).

33. Ha a besorolás egyértelmű, legalább három bőrkorong replikátum vizsgálatából álló egyszeri vizsgálatmenetnek (kísérletnek) elegendőnek kell lennie az adott vizsgálati vegyi anyag esetében. Határértéken lévő eredmények esetében azonban, ha például az egyes bőrkorong replikátumok eredményei nem egyeznek és/vagy az átlagos TER-érték $5 \pm 0,5$ k Ω ,

megfontolandó egy második független vizsgálatmenet (kísérlet) lefolytatása, illetve ha az első és a második vizsgálatmenet (kísérlet) eredményei különbözőek, egy harmadiké is.

ADATOK ÉS JELENTÉS

Adatok

34. A vizsgálati vegyi anyagokra, valamint a pozitív és negatív kontrollokra vonatkozó rezisztenciaértékeket ($k\Omega$) és adott esetben a festékanyag-tartalom értékeket ($\mu\text{g}/\text{korong}$) táblázatos formában kell megadni, beleértve minden vizsgálatmenet (kísérlet) során az egyes bőrkorong replikátumok esetében kapott adatokat és az átlagértékeket $\pm$ szórással. A jelentésbe bele kell foglalni valamennyi megismételt kísérletet. A bőrkorongok esetleges károsodását minden vizsgálati vegyi anyag esetében fel kell tüntetni.

Vizsgálati jelentés

35. A vizsgálati jelentésnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálati vegyi anyag és kontrollként szolgáló anyagok:

- Egy összetevőből álló anyag: kémiai azonosítás, például IUPAC- vagy CAS-névvel, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet alapján, tisztaság, adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb. alapján;
- Több összetevőből álló anyagok, UVCB-k és keverékek: lehetőség szerint az összetevők kémiai azonosítója (lásd fent), mennyiségi előfordulása és releváns fizikai-kémiai tulajdonságai alapján jellemezve;
- fizikai megjelenés, vízdékonyság és további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok;
- eredet, gyártási szám, ha ismert;
- a vizsgálati vegyi anyag/kontrollanyag kezelése a vizsgálatot megelőzően, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés);
- a vizsgálati vegyi anyag stabilitása, felhasználási határideje vagy ismételt elemzésének napja, ha ismert;
- tárolási feltételek.

Kísérleti állatok:

- a használt törzs és nem;
- az állatok kora, ha donorállatként használják azokat;
- az állatok származása, tartási körülmények, takarmány stb.;
- a bőrpreparátumra vonatkozó részletek.

Vizsgálati körülmények:

- a vizsgálati eszközökre vonatkozó kalibrációs görbék;

- a festékanyag-megkötő vizsgálat kiértékelésére vonatkozó kalibrációs görbék, az OD-értékek mérésekor használt sávszélesség és adott esetben a mérőeszköz (pl. a spektrofotométer) OD-linearitási tartománya;
- a TER-méréshez használt vizsgálati eljárás részletei;
- adott esetben a festékanyag-megkötő vizsgálatához használt vizsgálati eljárás részletei;
- az alkalmazott vizsgálati dózisok, az expozíciós időszak(ok) hossza és az expozíciós hőmérséklet(ek);
- az expozíciós időszak után alkalmazott mosási eljárás részletei;
- a vizsgálati vegyi anyagokként és kontrollonként (pozitív és negatív kontrollonként) használt bőrkorong replikátumok száma;
- a vizsgálati eljárás bármilyen változtatásának leírása;
- hivatkozás a modellel kapott korábbi adatokra. Ennek többek között az alábbiakat kell magában foglalnia:
 - i) a pozitív és negatív kontrollok ($k\Omega$ -ban megadott) TER-értékének elfogadhatósága, tekintettel a pozitív és negatív kontrollok ellenállás-tartományára;
 - ii) a pozitív és negatív kontrollok ($\mu\text{g}/\text{korongban}$ megadott) festékanyag-tartalom értékének elfogadhatósága, tekintettel a pozitív és negatív kontrollok festékanyagtartalom-tartományára;
 - iii) a vizsgálati eredmények elfogadhatósága, tekintettel a bőrkorong replikátumok adatainak korábbiakban tapasztalt változékonyságára;
- az alkalmazott döntési kritériumok/előrejelzési modell leírása.

Eredmények:

- A TER és a festékanyag-megkötő vizsgálat adatainak (ha releváns), ezek átlagának, szórásának (SD) és variációs koefficiensének (CV) táblázatba foglalása az egyes vizsgálati vegyi anyagokra és kontrollanyagokra, minden egyes vizsgálatmenetre (kísérletre) és valamennyi bőrkorong replikátumra (minden egyes állatra és minden egyes bőrmintára) vonatkozólag;
- bármilyen megfigyelt jelenség leírása;
- az alkalmazott előrejelzési modellel/döntési kritériumokkal összhangban kialakított osztályozás.

Az eredmények értékelése

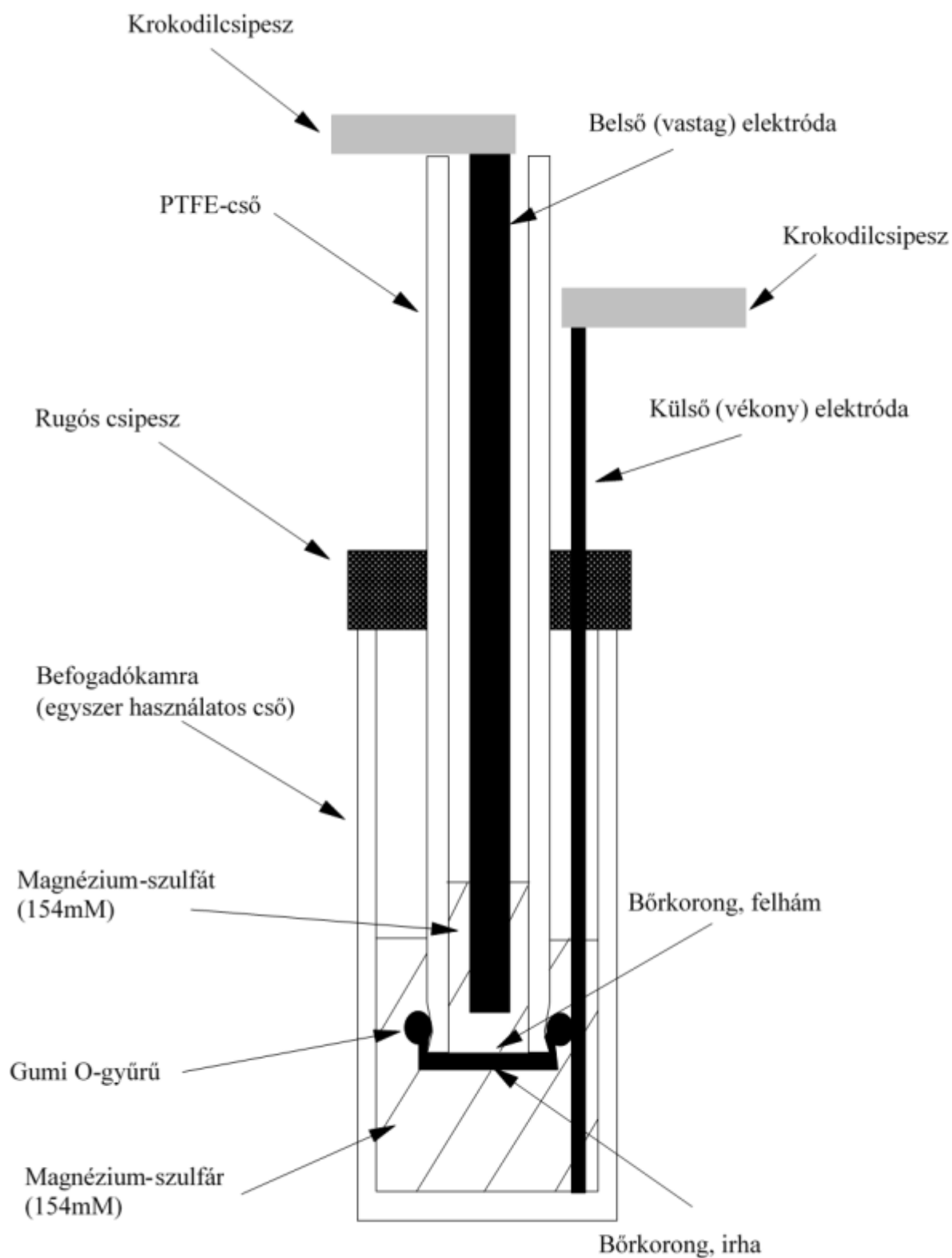
Következtetések

SZAKIRODALOM

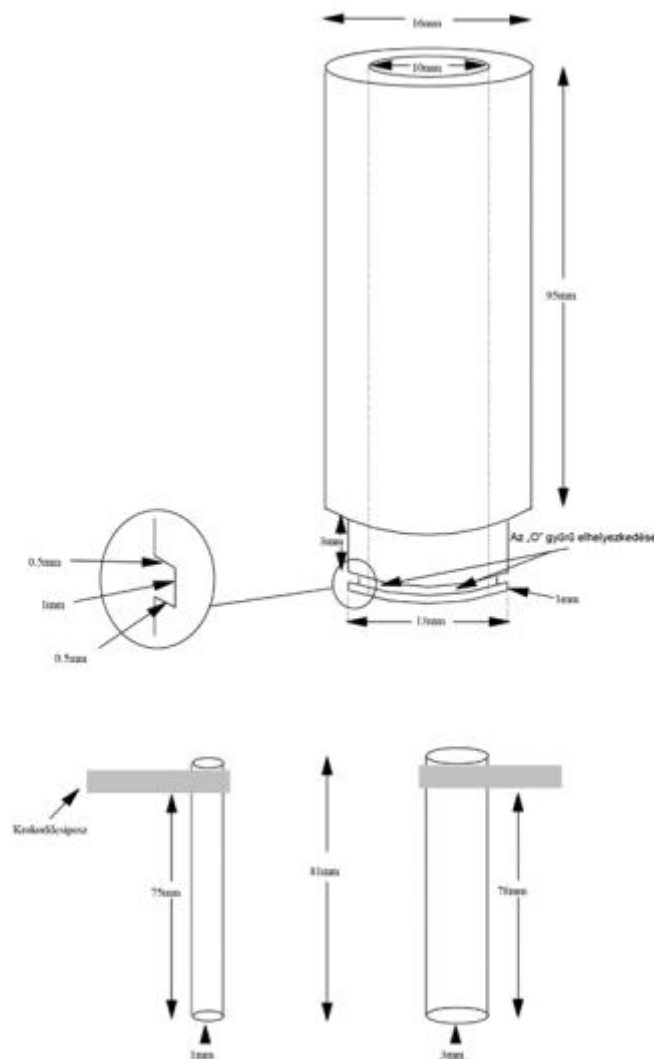
- (1) Egyesült Nemzetek Szervezete (ENSZ) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Elérhető a következő címen: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html].
- (2) E melléklet B.4., Akut bőrirritáció/bőrkorrózió fejezete.
- (3) E melléklet B.40bis, *In vitro* bőrmódel fejezete.
- (4) E melléklet B.65., *In vitro* Membrán barrier vizsgálati módszer fejezete.
- (5) E melléklet B.46., *In vitro* bőrirritáció: Rekonstruált emberi felhámmodellen végzett vizsgálati módszer című fejezete.
- (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), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.
- (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., Holzötter 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., Blaauwer 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, USA.

- (12) EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test (an *In vitro* Test for Skin Corrosivity), Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3 April 1998.
- (13) ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275–280.
- (14) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (2002). ICCVAM Evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication No 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.
- (15) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In vitro* Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 430. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 218. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (16) Oliver G.J.A., Pemberton M.A., 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), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

1. ÁBRA: A PATKÁNYBŐR TER-VIZSGÁLATÁRA SZOLGÁLÓ MŰSZER



2. ÁBRA: AZ ALKALMAZOTT POLITETRAFLUOROETILÉNCSŐ (PTFE-CSŐ) ÉS BEFOGADÓ CSŐ, VALAMINT AZ ELEKTRÓDÁK MÉRETEI



A fent ábrázolt eszközök legfontosabb elemei:

- a PTFE-cső belső átmérője,
- az elektródák PTFE-csőhöz és befogadó csőhöz viszonyított hosszúsága olyan legyen, hogy az elektródák ne érintkezzenek a bőrkoronggal, és hogy állandó hosszúságú elektróda legyen az MgSO_4 -oldatban,
- az MgSO_4 -oldat befogadó csőben lévő mennyisége a PTFE-csőben lévő szinthez viszonyítva adjon egy bizonyos folyadékmélységet, ahogyan azt az 1. ábra mutatja,
- a bőrkorongot kellő erősséggel kell a PTFE-csőhöz rögzíteni úgy, hogy az elektromos ellenállás a bőr tulajdonságaira vonatkozóan valós értéket adjon.

Függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK:

Pontosság: a vizsgálati módszerrel kapott eredmények és az elfogadott referenciaértékek közötti egyezés mértéke. A vizsgálati módszer teljesítményének mutatója, valamint a relevanciájának egyik megítélési szempontja. E kifejezést gyakran használják az »egyezés« megfelelőjeként, amely egy adott vizsgálati módszer alkalmazásakor az azonos eredmények arányát fejezi ki (20).

K: korrozív.

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Egyezés: a kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek teljesítményének mutatója, valamint a relevanciájának egyik megítélési szempontja. A kifejezést esetenként használják a pontosság megfelelőjeként, és úgy határozzák meg, mint a helyesen pozitívként vagy negatívként besorolt összes vizsgálati vegyi anyag aránya. Az egyezés nagy mértékben függ a vizsgálat tárgyát képező vizsgálati vegyi anyag típusaiban előforduló pozitív eredmények gyakoriságától (20).

GHS (a vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének az ENSZ által globálisan harmonizált rendszere): a vegyi anyagoknak (anyagoknak és keverékeknek) a fizikai, egészségi és környezeti veszélyek szabványosított típusai és szintjei szerinti osztályokba sorolására és megfelelő kommunikációs elemekkel (például piktogramokkal, figyelmeztetésekkel, figyelmeztető mondatokkal, óvintézkedésekre vonatkozó mondatokkal és biztonsági adatlapokkal) történő jelölésére javaslatokat megfogalmazó rendszer, amelynek célja, hogy az emberek (köztük a munkáltatók, a munkavállalók, a fuvarozók, a fogyasztók és a sürgősségi segélyszolgálatok) és a környezet megóvása érdekében egységesítse a vegyi anyagok káros hatásaira vonatkozó információk továbbítását (1).

IATA: integrált vizsgálati és értékelési megközelítés.

Keverék: két vagy több anyagot tartalmazó elegy vagy oldat.

Egy összetevőből álló anyag: olyan, a mennyiségi összetétele alapján meghatározott anyag, amelyben az egyik fő összetevő legalább 80 tömegszázalékban van jelen.

Több összetevőből álló anyag: olyan, a mennyiségi összetétele alapján meghatározott anyag, amelyben egynél több fő összetevő legalább 10 tömegszázalékban, de 80 tömegszázalékot nem meghaladó koncentrációban van jelen. A több összetevőből álló anyag gyártási folyamat eredménye. A keverék és a több összetevőből álló anyag között az a különbség, hogy a keverék két vagy több anyag összekeverésével, kémiai reakció nélkül jön létre. A több összetevőből álló anyag kémiai reakció eredménye.

NK: nem korrozív.

OD: optikai sűrűség.

Pozitív kontroll: a vizsgálati elrendezés valamennyi alkotóelemét tartalmazó, ismert pozitív hatást kiváltó anyaggal kezelt rendszer. Annak biztosítása érdekében, hogy a pozitív kontrollban

jelentkező hatás időbeli változását fel lehessen mérni, a pozitív hatás nem lehet túlságosan erőteljes.

Teljesítményszabványok: hitelesített referenciamódszeren alapuló szabványok, amelyek a javasolt, végrehajtás és funkcionalitás szempontjából hasonló vizsgálati módszer összehasonlíthatósági értékelésének alapjául szolgálnak. Ide tartoznak: i. a vizsgálati módszer alapvető összetevői; ii. a referencia-vegyianyagok minimális jegyzéke, amely a validált vizsgálati módszer által nyújtott teljesítmény elfogadhatóságának igazolására használt vegyi anyagokból került összeállításra; és iii. a validált vizsgálati módszer eredményei alapján meghatározott, hasonló megbízhatósági és pontossági szintek, amelyeket a javasolt vizsgálati módszernek teljesítenie kell a minimális jegyzék referencia-vegyianyagainak felhasználásával történő értékelése során.

Relevancia: a vizsgálati módszer és a vizsgált hatás kapcsolatát adja meg, valamint azt, hogy van-e a vizsgálatnak az adott cél szempontjából értelme és haszna. Azt tükrözi, hogy a vizsgálati módszer mennyire pontosan méri vagy jelzi előre a vizsgált biológiai hatást. A relevancia meghatározása során a vizsgálati módszer pontosságát (az eredmények egyezését) figyelembe kell venni (20).

Megbízhatóság: a vizsgálati módszer laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti időbeli reprodukálhatóságának mértéke ugyanazon protokoll alkalmazása mellett. A laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti reprodukálhatóság kiszámításával állapítják meg (20).

Érzékenység: az összes olyan pozitív/aktív vegyi anyag aránya, amelyet a vizsgálati módszer helyesen sorolt be. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (20).

In vivo bőrkorrózió: a vizsgálati vegyi anyag alkalmazását követően négy órán belül megjelenő, visszafordíthatatlan bőrkárosodás, azaz a felhámot át az irhára is áttérjedő látható szövetelhalás. A korróziós tünetek jellemzően fekély, vérzés, véres hegesedés és – 14 napos megfigyelés végén – a bőr kifehéredése miatt elszíneződés, teljes szőrhullámos területek és hegek. A kérdéses lézió értékeléséhez figyelembe kell venni a kórszövetet.

Specifitás: a vizsgálati módszerrel helyesen besorolt összes negatív/inaktív vegyi anyag aránya. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (20).

Anyag: olyan természetes állapotban előforduló vagy gyártási eljárásból származó kémiai elem és vegyületei, amely a stabilitásának megőrzéséhez szükséges adalékanyagot és az alkalmazott eljárásból származó szennyező anyagokat is tartalmazhat, de nem tartalmaz olyan oldószert, amely az anyag stabilitásának befolyásolása vagy összetételének megváltoztatása nélkül elkülöníthető.

Vizsgálatmenet: egyetlen vizsgálati vegyi anyag egyidejű tesztelése legalább három bőrkorong replikátumon.

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

Transzkután elektromos rezisztencia (TER): a bőr elektromos rezisztenciájának mérése rezisztenciaértékként, kiloohmban kifejezve. A barrierfunkció vizsgálatának egy egyszerű és nagy teljesítményű módszere, amely során az ionok bőrön történő passzálását egy Wheatstone-híd segítségével rögzítik.

UVCB: ismeretlen vagy változó összetételű anyagok, komplex reakciótermékek vagy biológiai anyagok. ”

6. A B. részben a B.40bis. fejezet helyébe a következő szöveg lép:

„B40bis. *IN VITRO* BŐRKORRÓZIÓ: REKONSTRUÁLT EMBERI FELHÁMMODELLEN VÉGZETT VIZSGÁLATI MÓDSZER

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 431. vizsgálati iránymutatásában (2016) leírt módszerrel. A bőrkorrózió valamely vizsgálati vegyi anyag alkalmazását követően megjelenő, visszafordíthatatlan bőrkárosodás, amely a felhámon át az irhára is áttérjedő látható szövetelhalást okoz [az Egyesült Nemzetek Szervezete (ENSZ) által kidolgozott, vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének globálisan harmonizált rendszerében (GHS) (1), valamint az Európai Unió (EU) anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról szóló 1272/2008/EK rendeletében (CLP-rendelet)¹ meghatározottak szerint]. Ez a továbbfejlesztett B.40bis. vizsgálati módszer olyan *in vitro* eljárást biztosít, amely lehetővé teszi a korróziót nem okozó és korróziót okozó anyagok és keverékek ENSZ GHS és CLP-rendelet szerinti meghatározását. Emellett lehetővé teszi a korrozív anyagok részleges alkategorizálását.
2. A vegyi anyagok bőrkorróziós hatásának felmérése jellemzően kísérleti állatokon történő vizsgálatot foglal magában (az OECD eredetileg 1981-ben elfogadott, majd 1992-ben, 2002-ben és 2015-ben felülvizsgált 404. vizsgálati iránymutatásával egyenértékű B.4. vizsgálati módszer alkalmazásával) (2). E B.40bis. vizsgálati módszer mellett a vegyi anyagok bőrkorróziós hatásának vizsgálatára szolgáló két másik *in vitro* vizsgálati módszert is validáltak és elfogadtak, a B.40. vizsgálati módszert (amely az OECD 430. vizsgálati iránymutatásával egyenértékű) (3) és a B.65. vizsgálati módszert (amely az OECD 435. vizsgálati iránymutatásával egyenértékű) (4). A potenciális bőrirritációs hatás felmérésére pedig elfogadták az *in vitro* B.46. vizsgálati módszert (mely az OECD 439. vizsgálati iránymutatásával egyenértékű) (5). A bőrkorróziós és bőrirritációs vizsgálatok és értékelések integrált megközelítéseiről (IATA) szóló OECD-iránymutatás több, információforrásokat és adatelemző eszközöket csoportosító modult ismertet, továbbá iránymutatást nyújt arra nézve, i. hogyan integrálhatók és használhatók az ismert vizsgálati és nem vizsgálati eredetű adatok a vegyi anyagok potenciális bőrirritációs és bőrkorróziós hatásainak felmérésére, és ii. javaslatot tesz egy, a további vizsgálatok szükségessége esetén alkalmazható megközelítésre (6).

¹ Az Európai Parlament és a Tanács 1272/2008/EK rendelete (2008. december 16.) az anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról, a 67/548/EGK és az 1999/45/EK irányelv módosításáról és hatályon kívül helyezéséről, valamint az 1907/2006/EK rendelet módosításáról (HL L 353/1., 2008.12.31.).

3. Ez a vizsgálati módszer a bőrkorrózióval mint az emberi egészség károsodásának egyik végpontjával foglalkozik. A módszerben (nem transzformált emberi epidermális keratinsejtekből felépített) rekonstruált emberi felhámot (RhE) alkalmaznak, amely nagy hasonlósággal modellezi az emberi bőr felső rétegének, azaz a felhámnak (epidermisznek) szövettani, morfológiai, biokémiai és fiziológiai tulajdonságait. A módszerrel egyenértékű, eredetileg 2004-ben elfogadott OECD-iránymutatás 2013-as átdolgozott változatába belefoglalták az RhE-modellt használó további vizsgálati módszereket és annak lehetőségét, hogy a módszereket a korrozív vegyi anyagok alkategóriába sorolására is alkalmazzák, 2015-ös átdolgozott kiadása pedig kitér az IATA-iránymutatásra és bevezet egy, az életképesség mérésére szolgáló alternatív eljárást.
4. E vizsgálati módszer négy validált, kereskedelmi forgalomban kapható RhE-modellt foglal magában. A kereskedelmi forgalomban beszerezhető vizsgálati modellek közül kettőn – az EpiSkin™ alapmodellen (SM) és az EpiDerm™ bőrkorróziós vizsgálaton (SCT) (EPI-200) – elővalidálási vizsgálatokat végeztek (7), majd ezt követően a bőrkorrózió értékelésére szolgáló hivatalos validálási vizsgálatot (8) (9) (10) is elvégezték (11) (12) (a továbbiakban validált referenciamódszerek, VRM-ek néven is hivatkozunk rájuk). E vizsgálatok következtetéseivel vezettek ahhoz az ajánláshoz, hogy a fent említett két validált referenciamódszer használható a korrozív (K) és nem korrozív (NK) anyagok szabályozási célú megkülönböztetésére, valamint hogy az EpiSkin™ emellett a korrozív anyagok alkategóriába sorolására is alkalmazható (13) (14) (15). A teljesítményszabványok szerinti validálás alapján két másik kereskedelmi forgalomban kapható *in vitro* bőrkorróziós RhE vizsgálati modell mutatott az EpiDerm™ validált referenciamódszerhez hasonló eredményeket (16) (17) (18). Ez a két modell a SkinEthic™ RHE¹ és az epiCS® (korábbi nevén EST-1000), amelyek szintén használhatók a korrozív és nem korrozív anyagok szabályozási célú megkülönböztetésére (19) (20). A rekonstruált emberi felhámmodellek gyártói a validálást követően, 2012 és 2014 között vizsgálatokat végeztek egy továbbfejlesztett protokoll alapján, amely korrigálta a vizsgálati vegyi anyagok nem specifikus MTT-redukáló hatására visszavezethető interferenciákat, javítva ezáltal a modellek teljesítményét mind a korrozív/nem korrozív anyagok megkülönböztetésére, mind a korrozív anyagok alkategóriába sorolása terén (21) (22). Az EpiDerm™ SCT, a SkinEthic™ RHE és az epiCS® validálás utáni alkalmazása során nyert adatok statisztikai elemzése révén olyan alternatív előrejelzési modelleket azonosítottak, amelyek javították az alkategóriába sorolási előrejelző képességet (23).

¹ Az RhE (= rekonstruált emberi felhám) rövidítés az összes RhE-technológián alapuló modell esetében használatos. A SkinEthic™ modellel összefüggésben használt RHE rövidítésnek ugyanaz a jelentése, de mivel az a szóban forgó vizsgálati módszer kereskedelmi nevének része, nagybetűvel írandó.

5. Mielőtt az *in vitro* RhE bőrkorróziós vizsgálati módszerhez hasonló vagy ahhoz képest módosított, a validált referenciamódszerektől eltérő javasolt módszer szabályozási célú alkalmazásra kerülne, a validált referenciamódszerekhez való hasonlóságának biztosítása érdekében az OECD 34. iránymutatásában lefektetett elvekkel (25) összhangban létrehozott teljesítményszabványok (24) követelményeinek megfelelően meg kell határozni a javasolt felhasználása tekintetében fennálló megbízhatóságát, relevanciáját (pontosságát) és korlátait. Az adatok kölcsönös elfogadása csak azután garantált, hogy a javasolt új vagy átdolgozott vizsgálati módszert a teljesítményszabványok szerint felülvizsgálták és belefoglalták a megfelelő vizsgálati iránymutatásba. A vizsgálati iránymutatásban szereplő vizsgálati modellek felhasználhatók az *in vitro* bőrkorróziós vizsgálati módszer vizsgálati eredményeire vonatkozó nemzeti követelmények kialakításához, ugyanakkor biztosítják az adatok kölcsönös elfogadásának előnyeit.

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

6. Az alkalmazott fogalommeghatározások az 1. függelékben találhatók.

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK

7. Ez a vizsgálati módszer lehetővé teszi a nem korrozív és korrozív anyagok és keverékek ENSZ GHS és CLP-rendelet szerinti azonosítását. A vizsgálati módszer emellett támogatja a korrozív anyagok és keverékek nem kötelező jellegű besorolását az ENSZ GHS (1) szerinti 1A alkategóriába, valamint egy kombinált 1B és 1C alkategóriába (21) (22) (23). A vizsgálati módszer egyik korlátja, hogy az 1C alkategóriába sorolt, ismert *in vivo* korrozív vegyi anyagok csekély száma miatt nem teszi lehetővé a bőrkorróziós 1B alkategória és 1C alkategória ENSZ GHS és CLP-rendelet szerinti megkülönböztetését. Az EpiSkin™, az EpiDerm™ SCT, a SkinEthic™ RHE és az epiCS® vizsgálati modellekkel elvégezhető az alkategóriába sorolás (vagyis 1A vagy 1B és 1C vagy nem korrozív (NK)).
8. A vizsgálati módszerben szereplő, a nem korrozív és korrozív anyagok azonosítására alkalmazott, vizsgálati modelleket alátámasztó validálás során igen sokféle, többségében különálló anyagokat képviselő vegyi anyagot vizsgáltak; a validálási vizsgálat empirikus adatbázisa összesen 60 vegyi anyagot tartalmazott, amelyek lefedik a kémiai osztályok széles körét (8) (9) (10). A vizsgálati módszer kidolgozói vizsgálták a módszer alkategóriába sorolásra való alkalmazásához kapcsolódó érzékenységet, specificitását, pontosságát és laboratóriumon belüli megismételhetőségét, e vizsgálatok eredményét az OECD felülvizsgálta (21) (22) (23). Az összes rendelkezésre álló adat alapján a vizsgálati módszer a legkülönbözőbb kémiai osztályokra és halmazállapotokra, azon belül folyadékokra, félszilárd, szilárd és viaszos állagú anyagokra alkalmazható. A folyadékok lehetnek vizesek vagy nem vizesek; a szilárd anyagok lehetnek vízben oldódóak vagy oldhatatlanok. Ahol megoldható, a szilárd anyagokat alkalmazásuk előtt finom porrá kell őrlni; a mintát előzetesen nem szükséges más módon kezelni. Olyan esetekben, amikor bizonyítékkal igazolható, hogy a vizsgálati módszer

keretében alkalmazott vizsgálati modellek nem használhatók valamely konkrét vegyianyag-kategóriára, a vizsgálati modelleket nem szabad az adott vegyianyag-kategóriára alkalmazni. E vizsgálati módszerről feltételezhető továbbá, hogy az anyagokra való alkalmazhatóságának kiterjesztéseként keverékekre is alkalmazható. Mivel azonban a keverékek kategóriák és összetételek széles körét fedik le, és jelenleg kevés információ áll rendelkezésre a keverékek vizsgálatára vonatkozóan, azokban az esetekben, amikor bizonyítékkal igazolható, hogy a vizsgálati módszer valamely konkrét keverékkategóriára nem alkalmazható (pl. a (26) szakirodalomban javasolt stratégia alapján), a vizsgálati módszer az adott keverékkategóriára nem alkalmazható. A vizsgálati módszer tervezett szabályozási célt szolgáló adatgenerálás érdekében, keveréken történő alkalmazása előtt meg kell vizsgálni, hogy az megfelelő eredményeket biztosíthat-e erre a célra, és ha igen, miért. Ilyen megfontolások nem szükségesek, ha létezik a keverék vizsgálatára vonatkozó szabályozási követelmény. Gázokat és aeroszolókat hitelesítési vizsgálat keretében még nem vizsgáltak (8) (9) (10). Bár elképzelhető, hogy ezek is vizsgálhatók a rekonstruált emberi felhámmodelles technikával, a jelenlegi vizsgálatimódszer-leírás nem engedi meg gázok és aeroszolok vizsgálatát.

9. Azok a vizsgálati vegyi anyagok, amelyek ugyanabban a tartományban nyelik el a fényt, mint az MTT-formazán, és azok a vizsgálati vegyi anyagok, amelyek közvetlenül is képesek redukálni az MTT vitális festéket (MTT-formazánná), befolyásolhatják a szövet életképességének mérését, ennek korrigálása érdekében adaptált kontrollokra van szükség. Az esetlegesen szükséges adaptált kontrollok típusa függ a vizsgálati vegyi anyag által előidézett interferencia típusától és az MTT-formazán méréséhez használt eljárástól (lásd a 25–31. pontot).
10. Ez a vizsgálati módszer ugyan nem biztosít megfelelő információkat a bőrirritáció felméréséhez, de az RhE vizsgálati rendszeren alapuló B.46. vizsgálati módszer célja kifejezetten az, hogy *in vitro* eljárással határozza meg a bőrirritáció egészségügyi hatását, noha más protokoll alkalmazásával (5). Egyetlen bőrexpozíció után a bőrt ért helyi hatások teljes kiértékeléséhez a vizsgálatok és értékelések integrált megközelítéseiről szóló OECD-iránymutatást kell tanulmányozni (6). Ezen integrált vizsgálati és értékelési megközelítés szerint *in vitro* bőrkorróziós vizsgálatokat (mint az ebben a vizsgálati módszerben leírtak) és bőrirritációs vizsgálatokat kell lefolytatni mielőtt az élő állatokon végzett vizsgálatokat fontolóra lehetne venni. Elfogadott tény, hogy az emberi bőr használatára nemzeti és nemzetközi etikai megfontolások és feltételek vonatkoznak.

A VIZSGÁLAT ELVE

11. A vizsgálati vegyi anyagot egy olyan nem transzformált emberi epidermális keratinocitákat tartalmazó, háromdimenziós rekonstruált emberi felhámmodellre viszik fel topikálisan, amelyeket úgy tenyésztettek ki, hogy többrétegű, erősen differenciált emberi felhámot (epidermiszt) alkossanak. Ez szervezett bazális, spinózus és granuláris sejtrétegekből, valamint

intercelluláris lamelláris lipidrétegeket tartalmazó többrétegű szarurétegből (*stratum corneum*) áll, amely tartalmazza a fő lipid osztályokat, amelyek analógok az *in vivo* megtalálhatókkal.

12. Az RhE vizsgálati módszer azon az előfeltételen alapul, hogy a korrozív vegyi anyagok diffúzióval vagy erózióval képesek áthatolni a *stratum corneum*on, és az alatta lévő sejtrétegekre citotoxikus hatást gyakorolnak. A sejtek életképességét az MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid, tiazolil kék tetrazólium-bromid; CAS-száma: 298-93-1] vitális festék enzimatisz uton kék formazán kristállyá történő átalakulása alapján mérik, amelyet a szövetekből történő kivonás után mennyiségileg meghatároznak (27). A korrozív hatású vegyi anyagokat azon képességük alapján azonosítják, hogy a sejtek életképességét meghatározott határérték alá csökkentik (lásd a 35. és a 36. pontot). Az RhE-alapú bőrkorróziós vizsgálati módszerről kimutatták, hogy képes előrejelezni a B.4. vizsgálati módszer (2) alapján nyulakon meghatározott *in vivo* bőrkorróziós hatásokat.

A JÁRTASSÁG BIZONYÍTÁSA

13. Az e vizsgálati módszerhez kapcsolódó négy validált RhE vizsgálati modell rutinszerű alkalmazása előtt a laboratóriumoknak a 1. táblázatban felsorolt tizenkét jártassági tesztanyag megfelelő besorolásával igazolniuk kell szakmai jártasságukat. Valamely módszer alkategóriába sorolás céljára történő használta esetén bizonyítani kell az alkategóriák megfelelő meghatározásában való jártasságot is. Ha a jegyzékben szereplő valamely anyag nem áll rendelkezésre, illetve ha indokolható, megfelelő *in vivo* és *in vitro* referenciaadatokkal rendelkező más – például a referencia-vegyianyagok jegyzékében feltüntetett (24) – anyag is használható, amennyiben a kiválasztási kritériumok megegyeznek az 1. táblázatban foglaltakkal.

1. táblázat: A jártassági tesztanyagok jegyzéke¹

Anyag	CAS-szám	Kémiai osztály ²	ENSZ GHS/CLP szerinti, <i>in vivo</i> eredményeken	VRM szerinti, <i>in vitro</i> eredményeken alapuló kat. ⁴	MTT-redukáló ⁵	Halmaz-állapot
1A alkategóriájú <i>in vivo</i> korrozív anyagok						
Brómecetsav	79-08-3	Szerves sav	1A	(3) 1A	--	Sz
Bór-trifluorid-dihidrát	13319-75-0	Szervetlen sav	1A	(3) 1A	--	F
Fenol	108-95-2	Fenol	1A	(3) 1A	--	Sz
Diklór-acetil-klorid	79-36-7	Elektrofil	1A	(3) 1A	--	F
Kombinált 1B–1C alkategóriájú <i>in vivo</i> korrozív anyagok						
Glioxilsav-monohidrát	563-96-2	Szerves sav	1B–1C	(3) 1B–1C	--	Sz
Tejsav	598-82-3	Szerves sav	1B–1C	(3) 1B–1C	--	F
Etanolamin	141-43-5	Szerves bázis	1B	(3) 1B–1C	Y	Viszkózus

Sósav (14,4 %)	7647-01-0	Szervetlen sav	1B–1C	(3) 1B–1C	--	F
<i>In vivo Non Corrosives</i>						
Fenetil-bromid	103-63-9	Elektrofil	NK	(3) NK	Y	F
4-Amino-1,2,4-triazol	584-13-4	Szerves bázis	NK	(3) NK	--	Sz
4-(metil-tio)-benzaldehyd	3446-89-7	Elektrofil	NK	(3) NK	Y	F
Laurinsav	143-07-7	Szerves sav	NK	(3) NK	--	Sz

Rövidítések: CAS-szám = Vegyi anyag Nyilvántartási Szolgálat (CAS) nyilvántartási szám; VRM = Validált referenciamódszer; NK = Nem korrozív

¹A jártassági tesztanyagok – amelyek felsorolása elsőként korrozív és nem korrozív hatásuk szerint, majd korrozivitási alkategóriák szempontjából, végül pedig kémiai osztályuk alapján történt – az ECVAM által az EpiSkin™ és az EpiDerm™ modellről készített validálási vizsgálatokban használt anyagok közül (8) (9) (10), valamint az EpiSkin™ (22), az EpiDerm™, a SkinEthic™ és az epiCS® előállítói által rendelkezésre bocsátott adatok alapján végzett validálás utáni vizsgálatokból (23) kerültek kiválasztásra. Ha nincs másképpen feltüntetve, az anyagokat a kereskedelmi forrásból való beszerzésükkor tapasztalt tisztasági szinten vizsgálták (8) (10). A lehetőségekhez mérten olyan anyagok kerülnek kiválasztásra, amelyek: i. a validált referenciamódszerek által mérhető vagy előrejelezhető korrozivitási válaszreakciók tartományának tekintetében reprezentatívak (pl. nincs korrozív hatásuk; enyhétől az erősig terjedő korróziós hatást váltanak ki); ii. a validálási vizsgálatokban használt kémiai osztályok tekintetében reprezentatívak; iii. jól meghatározott kémiai szerkezettel rendelkeznek; iv. megismételhető eredményeket váltanak ki a validált referenciamódszerben; v. egyértelmű eredményeket hoznak az *in vivo* referencia vizsgálati módszer alkalmazásakor; vi. kereskedelmi forgalomban kaphatók; és vii. nem kapcsolódnak hozzájuk kiemelkedően magas ártalmatlanítási költségek.

²A Barratt és társai szerinti kémiai osztály (8).

³Az ENSZ GHS/CLP-rendelet szerinti 1A, 1B és 1C kategóriának az ENSZ I., II. és III. csomagolási csoportja felel meg.

⁴A validált referenciamódszer táblázatban szereplő *in vitro* előrejelzései a vizsgálati módszer kidolgozói által az EpiSkin™ és az EpiDerm™ vizsgálati modellekkel végzett, validálást követő vizsgálatokból származnak.

⁵Az ECVAM bőrkorróziós validálási vizsgálatából származó életképességi értékek esetében nem korrigálták a közvetlen MTT-redukáló hatást (a validálási vizsgálatok során nem végeztek kontrollt elhalt szöveteken). Viszont a táblázatban feltüntetett, a vizsgálati módszer kidolgozóitól származó validálás utáni adatokat adaptált kontrollvizsgálatok alkalmazásával nyerték (23).

14. A jártasság igazolásának részeként ajánlott, hogy a felhasználó a rekonstruált emberi felhámmodell előállítója által meghatározottak szerint, átvétel után ellenőrizze a szövetek barrierjellemzőit. Ez különösen fontos, ha a szöveteket nagy távolságra/hosszú ideig szállították. Ha egy vizsgálati módszert már sikeresen igazoltak, és az alkalmazásában való jártasságot bizonyították, ilyen jellegű ellenőrzéseket nem szükséges rutinszerűen végezni. Ha azonban egy vizsgálati módszert rutinszerűen alkalmaznak, a barrierjellemzőket javasolt továbbra is rendszeres időközönként ellenőrizni.

ELJÁRÁS

15. Az alábbiak általános leírását adják a vizsgálati módszer keretében alkalmazott, a bőrkorrózió felmérésére szolgáló RhE vizsgálati modellek összetevőinek és eljárásainak. Azok a rekonstruált emberi felhámmodellek, amelyeknek e vizsgálati módszer keretében történő

használatát tudományosan megalapozottként elfogadták – vagyis az EpiSkin™ (SM), az EpiDerm™ (EPI-200), a SkinEthic™ RHE és az epiCS® modellek (16) (17) (19) (28) (29) (30) (31) (32) (33) – kereskedelmi forgalomban beszerezhetők. E négy rekonstruált emberi felhámmodellhez rendelkezésre állnak szabványműveleti eljárások (34) (35) (36) (37), vizsgálati módszerük főbb összetevőit pedig a 2. melléklet foglalja össze. E modellek bármelyikének laboratóriumi kivitelezése és alkalmazása során tanácsos tanulmányozni a vonatkozó szabványműveleti eljárást. Az ehhez a vizsgálati módszerhez tartozó négy rekonstruált emberi felhámmodellel végzett vizsgálatoknak az alábbi feltételeknek kell megfelelniük:

A RHE VIZSGÁLATI MÓDSZER ÖSSZETEVŐI

Általános feltételek

16. Az epitélium felépítéséhez nem transzformált emberi keratinocita sejteket kell használni. Élő epitélissejtek több rétegének (bazális réteg, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*) kell jelen lennie a funkcionális *stratum corneum* alatt. A *stratum corneum*nak többretegűnek kell lennie, és tartalmaznia kell az elengedhetetlenül szükséges lipidprofilt, hogy nagy ellenálló képességgel rendelkező funkcionális barriert képezzen a citotoxikus referencia-vegyianyagok, pl. a nátrium-dodecil-szulfát (SDS) vagy a Triton X-100 gyors áthatolása ellen. A barrierfunkciót bizonyítani kell, ennek értékeléséhez meghatározható az a referencia-vegyianyag koncentráció, amely meghatározott idejű expozíciót követően 50 %-kal csökkenti a szövetek életképességét (IC₅₀), vagy az az expozíciós idő, amely alatt egy adott, állandó koncentrációjú referencia-vegyianyag hatására a sejtek életképessége 50 %-kal csökken (ET₅₀) (lásd a 18. pontot). A rekonstruált emberi felhámmodell folyadékzáró tulajdonságainak meg kell akadályozni, hogy az anyag passzáljon a *stratum corneum* körül az élő szövetbe, amely a bőr expozíciójának rossz modellezését eredményezné. A rekonstruált emberi felhámmodellnek baktérium-, vírus-, mikoplazma- és gombafertőzéstől mentesnek kell lennie.

Funkcionális feltételek

Életképesség

17. A szövetek életképességének számszerű mérése MTT-vizsgálattal történik (27). A rekonstruált emberi felhám szövetkonstrukciójának élő sejtjei az MTT vitális festéket kék MTT-formazán kicsapódássá redukálják, amelyet azután izopropanol (vagy hasonló oldószer) használatával kivonnak a szövetből. Az extraháló oldószer optikai sűrűségének (OD) eléggé alacsonynak, azaz 0,1 alattinak kell lennie. A kivont MTT-formazán mennyisége meghatározható hagyományos abszorbancia (OD) méréssel vagy HPLC/UPLC spektrofotometriás eljárással (38). A rekonstruált emberi felhámmodell felhasználóinak biztosítaniuk kell, hogy az alkalmazott RhE-modell minden egyes tétele megfeleljen a negatív kontrollra vonatkozóan meghatározott kritériumoknak. A rekonstruált emberi felhámmodell előállítójának/forgalmazójának meg kell határozni a negatív kontroll OD-értékének elfogadhatósági tartományát (alsó és felső határértékét). A vizsgálati módszerhez kapcsolódó

négy validált RhE vizsgálati modell negatív kontrolljának OD-értékére vonatkozó elfogadhatósági tartományokat a 2. táblázat tartalmazza. Az HPLC/UPLC spektrofotometriás eljárást használóknak a negatív kontroll elfogadhatósági kritériumaként a 2. táblázatban szereplő negatív kontrollra vonatkozó OD-tartományok szolgálnak. Dokumentálni kell, hogy a negatív kontrollal kezelt szövetek az expozíció időtartama alatt stabil tenyészetben vannak (hasonló OD-értékeket adnak).

2. táblázat: A negatív kontroll OD-értékének elfogadhatósági tartománya a tétel minőségének ellenőrzéséhez

	Alsó elfogadási határ	Felső elfogadási határ
EpiSkin™ (SM)	> 0,6	< 1,5
EpiDerm™ SCT (EPI-200)	> 0,8	< 2,8
SkinEthic™ RHE	> 0,8	< 3,0
epiCS®	> 0,8	< 2,8

Barrierfunkció

18. A *stratum corneum*nak és lipidprofiljának az IC₅₀ vagy ET₅₀ alapján végzett becslések szerint (3. táblázat) megfelelő ellenálló képességgel kell rendelkeznie ahhoz, hogy meg tudja akadályozni bizonyos citotoxikus referencia-vegyianyagok (pl. a nátrium-dodecil-szulfát (SDS) vagy a Triton X-100) gyors áthatolását. Az RhE-modell előállítójának/forgalmazójának, a szövetek végfelhasználóhoz történő kiszállításakor igazolnia kell az alkalmazott rekonstruált emberi felhámmodell minden egyes tételének barrierfunkcióját (lásd a 21. pontot).

Morfológia

19. A rekonstruált emberi felhámmodellen szövettani vizsgálatot kell végezni, amely igazolja a többrétegű – bazális, spinózus és granuláris sejtrétegekből (*stratum basale*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*) és szarurétegből (*stratum corneum*) álló – humán epidermiszszerű szerkezetet, valamint azt, hogy a modell lipidprofilja hasonlós az emberi felhám lipidprofiljához. Az RhE-modell előállítójának/forgalmazójának, a szövetek végfelhasználóhoz történő eljuttatásakor az alkalmazott rekonstruált emberi felhámmodell minden tételén szövettani vizsgálattal igazolnia kell a szövetek megfelelő morfológiáját (lásd a 21. pontot).

Reprodukálhatóság

20. A vizsgálati módszer felhasználóinak pozitív és negatív kontrollokkal igazolniuk kell a vizsgálati módszerek időbeli reprodukálhatóságát. Emellett a vizsgálati módszer kizárólag alkalmazható, ha az RhE-modell előállítója/forgalmazója adatokkal támasztja alá, hogy a módszer – pl. a jártassági tesztanyagok jegyzékében (1. táblázat) szereplő – korrozív és nem korrozív vegyi anyagokkal időben megismételhető. Valamely vizsgálati módszer alkategóriába sorolás céljára történő alkalmazása esetén a megismételhetőséget az alkategóriába sorolás tekintetében is bizonyítani kell.

Minőség-ellenőrzés

21. A rekonstruált emberi felhámmodell csak abban az esetben alkalmazható, ha előállítója/forgalmazója igazolja, hogy az alkalmazott RhE-modell minden egyes tétele megfelel a gyártás utáni felszabadításra vonatkozóan meghatározott feltételeknek, amelyek közül az életképességre (17. pont), a barrierfunkcióra (18. pont) és a morfológiára (19. pont) vonatkozó kritériumok a leglényegesebbek. Ezeket az adatokat a vizsgálati módszer felhasználóinak rendelkezésére kell bocsátani, hogy ezeket az információkat fel tudják tüntetni a vizsgálati jelentésben. A korrozív hatás besorolásának megbízható előrejelzésekként kizárólag minőség-ellenőrzésen elfogadott szövettételeken végzett vizsgálatok eredményei fogadhatók el. Az IC₅₀ és az ET₅₀ eljárás elfogadhatósági tartományát (alsó és felső határértékét) a rekonstruált emberi felhámmodell előállítójának/forgalmazójának kell meghatároznia. A négy validált vizsgálati modell elfogadhatósági tartományát a 3. táblázat ismerteti.

3. táblázat: Minőség-ellenőrzési tételfelszabadítás feltételei

	Alsó elfogadási határ	Felső elfogadási határ
EpiSkin™ (SM) (18 órás kezelés nátrium-dodecil-szulfáttal (SDS)) (33)	IC ₅₀ = 1,0 mg/ml	IC ₅₀ = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SCT (EPI-200) (1 % Triton X-100) (34)	ET ₅₀ = 4,0 óra	ET ₅₀ = 8,7 óra
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (35)	ET ₅₀ = 4,0 óra	ET ₅₀ = 10,0 óra
epiCS® (1 % Triton X-100) (36)	ET ₅₀ = 2,0 óra	ET ₅₀ = 7,0 óra

A vizsgálati vegyi anyag és a kontrollként szolgáló vegyi anyagok alkalmazása

22. Minden expozíciós időszak során valamennyi vizsgálati vegyi anyaghoz és kontrollhoz legalább két szövetreplikátumot kell használni. Folyékony és szilárd vegyi anyagok esetében egyaránt megfelelő mennyiségű vizsgálati vegyi anyagot kell alkalmazni, hogy az egyenletesen fedje az epidermisz felszínét, azaz minimum 70 µl/cm² vagy 30 mg/cm²-t, ugyanakkor el kell kerülni a végtelen dózis alkalmazását. Modelltől függően szilárd vegyi anyagok alkalmazása előtt az epidermisz felületét ionmentesített vagy desztillált vízzel be kell nedvesíteni, hogy jobb legyen az érintkezés a vizsgálati vegyi anyag és az epidermisz felszíne között (34) (35) (36) (37). A szilárd anyagokat, amikor csak lehetséges finom por alakban kell vizsgálni. A felvitel módjának meg kell felelnie a vizsgálati vegyi anyagnak (lásd például a 34–37. referenciát). Az expozíciós időszak lejártával a vizsgálati vegyi anyagot vizes alapú pufferrel vagy 0,9 %-os NaCl-dal óvatosan le kell mosni az epidermisz felületéről. Attól függően, hogy a négy validált RhE vizsgálati modell közül melyiket használják, vizsgálati vegyi anyagoként két vagy három

expozíciós időszak alkalmazandó (mind a négy validált rekonstruált emberi felhámmodell esetében: 3 perc és 1 óra; az EpiSkinTM esetében plusz egy 4 órás expozíciós időszak). Az alkalmazott RhE vizsgálati modell és a meghatározott expozíciós időszak függvényében az expozíció alatti inkubációs hőmérséklet szobahőmérséklet és 37 °C között változhat.

23. Minden vizsgálatmenetben párhuzamos negatív és pozitív kontrollokkal bizonyítani kell, hogy a szövetek életképessége (negatív kontrollokkal), barrierfunkciója és az abból fakadó érzékenysége (pozitív kontrollokkal) egy meghatározott dokumentált elfogadhatósági tartományba esik. A javasolt pozitív kontrollanyag az alkalmazott rekonstruált emberi felhámmodelltől függően a jégcet vagy a 8N KOH. Megjegyzendő, hogy a 8N KOH közvetlen MTT-redukáló hatású, ezért szükség lehet a 25. és 26. pontban ismertetett adaptált kontrollok elvégzésére. A javasolt negatív kontrollanyag a 0,9 vegyesszázalékos NaCl-oldat vagy a víz.

A sejtek életképességének mérése

24. E vizsgálati módszer alkalmazása során a sejtek életképességének mérésére a kvantitatív MTT-vizsgálatot kell alkalmazni (27). A szövetmintát 3 órára megfelelő koncentrációjú (0,3 vagy 1 mg/ml) MTT-oldatba helyezik. A kicsapódott kék formazán terméket azután oldószer (pl. izopropanol, savas izopropanol) használatával eltávolítják a szövetből, és egy maximum ± 30 nm-es sávszűrő alkalmazásával 570 nm hullámhosszon az OD-érték meghatározásával, vagy egy HPLC/UPLC spektrofotometriás eljárás útján (lásd a 30. és 31. pontot) (38) megméri a formazán koncentrációját.
25. A vizsgálati vegyi anyagok megzavarhatják az MTT-vizsgálatot azáltal, hogy közvetlenül kék formazánná redukálják az MTT-t és/vagy azáltal, hogy színinterferenciát okoznak, ha a vizsgálati vegyi anyag jellegénél fogva vagy a kezelési eljárás következtében a formazánnal azonos OD-tartományban nyeli el a fényt (570 ± 30 nm, többnyire kék vagy lila vegyi anyagok esetében). E vizsgálati vegyi anyagok potenciális zavaró hatásának kiszűrése és korrigálása érdekében további kontrollokat kell végezni, mint például a nem specifikus MTT-redukció (NSMTT) kontrollt és a nem specifikus színeződés (NSC) kontrollt (lásd a 26–30. pontot). Ez különösen fontos abban az esetben, amikor egy adott vizsgálati vegyi anyagot nem távolítottak el teljesen a szövetből a mosás során, vagy amikor az anyag áthatol az epidermiszen, és így az MTT életképességi vizsgálat elvégzése során jelen van a szövetekben. A vizsgálati modellek szabványműveleti eljárásai részletes leírással szolgálnak arról, hogyan kell korrigálni a közvetlen MTT-redukáló hatást és a színezőanyagok okozta zavaró hatást (34) (35) (36) (37).
26. A közvetlen MTT-redukáló hatással rendelkező anyagok azonosítása érdekében minden vizsgálati vegyi anyagot frissen készített MTT-közegbe kell helyezni (34) (35) (36) (37). Amennyiben a vizsgálati vegyi anyagot tartalmazó MTT-keverék színe kékre/lilára változik, a vizsgálati vegyi anyag feltételezhetően közvetlenül redukálja az MTT-t, ezért kiegészítő funkcionális ellenőrzést kell végezni elhalt epidermiszen, független vizsgálat keretében hagyományos abszorbancia (OD) mérés, illetve HPLC/UPLC spektrofotometriás eljárás útján. E kiegészítő funkcionális ellenőrzés során elhalt szöveteket használnak, amelyek reziduális

metabolikus aktivitással rendelkeznek csupán, ugyanakkor a vizsgálati vegyi anyagot az élő szövetekhez hasonló mértékben abszorbeálják. Az egyes MTT-redukáló hatású vegyi anyagokkal expozíciós időszakonként legalább két elhalt szövetreplikátumot kezelnek, amelyeken elvégzik a teljes bőrkorróziós vizsgálatot. Ezután meghatározzák a szövetek valódi életképességét, ehhez az MTT-redukáló anyaggal kezelt élő szövetekkel kapott életképességi arányból levonják az ugyanazon MTT-redukáló anyaggal kezelt elhalt szövetekkel kapott nem specifikus MTT-redukció arányát, amelyet a vizsgálattal párhuzamosan végzett negatív kontrollal korrigálva számítanak ki (NSMTT-arány).

27. Annak érdekében, hogy meghatározható legyen a színes vizsgálati vegyi anyagok, illetve a vízzel vagy izopropanollal való érintkezés következtében elszíneződött vizsgálati vegyi anyagok potenciális zavaró hatása, és döntení lehessen a kiegészítő kontrollok szükségességéről, el kell végezni a vizsgálati vegyi anyag spektrumelemzését vízben (expozíciós környezet) és/vagy izopropanolban (extraháló oldat). Amennyiben vízben és/vagy izopropanolban a vizsgálati vegyi anyag 570 ± 30 nm-es tartományban nyeli el a fényt, további színezőanyag-kontrollokra van szükség, illetve alternatív megoldásként HPLC/UPLC spektrofotometriás eljárást lehet végezni, amelynek alkalmazásakor ezek a kontrollok nem szükségesek (lásd a 30. és 31. pontot). Hagyományos abszorbancia (OD) mérés esetén az egyes zavaró hatású színes vizsgálati vegyi anyagokkal expozíciós időszakonként legalább két élő szövetreplikátumot kezelnek, amelyeken elvégzik a teljes bőrkorróziós vizsgálatot, de az MTT inkubációs fázis során MTT-mentes oldatba helyezik azokat, hogy létrehozzanak egy nem specifikus színeződés (NSC_{élő}) kontrollt. Az élő szövetekre jellemző biológiai változékonyságból kifolyólag az NSC_{élő} kontrollt (minden egyes vizsgálatmenetben) valamennyi expozíciós időszakkal és színes vizsgálati vegyi anyaggal párhuzamosan el kell végezni. Ezután meghatározzák a szövetek valódi életképességét, ehhez a zavaró hatású vizsgálati vegyi anyaggal kezelt és MTT-oldatban inkubált élő szövetekkel kapott életképességi arányból levonják a korrigálandó vizsgálattal párhuzamosan elvégzett, a zavaró hatású vizsgálati vegyi anyaggal kezelt, viszont MTT nélküli közegben inkubált élő szövetekkel kapott nem specifikus elszíneződési százalékat (NSC_{élő} arány).
28. Azon hagyományos abszorbancia (OD) méréssel értékelt vizsgálati vegyi anyagok esetében, amelyek egyaránt okoznak közvetlen MTT-redukciót (lásd a 26. pontot) és színinterferenciát (lásd a 27. pontot), az előző pontokban ismertetett NSMTT és NSC_{élő} kontrollok mellett szükség van egy harmadik fajta kontrollra is. Általában ez a helyzet áll elő az MTT-vizsgálatot zavaró sötét színű (pl. kék, lila, fekete) vizsgálati vegyi anyagoknál, mivel saját színük akadályozza, hogy a 26. pontban leírtak szerint értékelni lehessen közvetlen MTT-redukáló hatásukat. Ezek a vizsgálati vegyi anyagok egyaránt kötődhetnek élő és elhalt szövetekhez, ezért az NSMTT-kontroll nem csupán a vizsgálati vegyi anyag által előidézett közvetlen MTT-redukáló hatást korrigálja, hanem az anyag elhalt szövetekhez való kötődéséből eredő színinterferenciát is. Ez viszont a színinterferencia kétszeri korrekciójához vezethet, mivel az NSC_{élő} kontroll már korrigálja a vizsgálati vegyi anyag élő szövetekhez való kötődéséből fakadó színinterferenciát. A színinterferencia esetleges kétszeri korrekciójának kiküszöbölése

érdekében szükség van egy harmadik kontrollra, amely az elhalt szövetek esetében méri a nem specifikus elszíneződést (NSC_{elhalt}). E kiegészítő kontroll során a vizsgálati vegyi anyaggal expozíciós időszakonként legalább két elhalt szövetreplikátumot kezelnek, amelyeken elvégzik a teljes bőrkorróziós vizsgálatot, de az MTT inkubációs fázis során MTT-mentes oldatba helyezik azokat. A független vizsgálatok/vizsgálatmenetek számától függetlenül vizsgálati vegyi anyagokként elegendő egyetlen NSC_{elhalt} kontroll, azt azonban az NSMTT-kontrollal egyidejűleg, és ha megoldható, ugyanazon szövettételen kell elvégezni. Ezután meghatározzák a szövetek valódi életképességét, ehhez a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt élő szövetekkel kapott életképességi arányból levonják az NSMTT-arányt és az $NSC_{élő}$ arányát, majd hozzáadják a zavaró hatású vizsgálati vegyi anyaggal kezelt és MTT nélküli közegben inkubált elhalt szövetekkel kapott nem specifikus elszíneződési arányt, amelyet a korrigálandó vizsgálattal párhuzamosan végzett negatív kontrollhoz viszonyítva számítanak ki (NSC_{elhalt} arány).

29. Fontos megjegyezni, hogy a nem specifikus MTT-redukció és a nem specifikus színinterferencia a spektrofotométer linearitási tartománya fölé növelheti a szövetkivonat leolvasott értékeit. Ebből kifolyólag minden laboratóriumnak kereskedelmi forgalomban kapható MTT-formazán (CAS-száma: 57360-69-7) segítségével meg kell határoznia spektrofotométerének linearitási tartományát, mielőtt megkezdene a vizsgálati vegyi anyagok szabályozási célú vizsgálatát. A spektrofotométert használó hagyományos abszorbancia (OD) mérés alkalmas a közvetlen MTT-redukáló hatással bíró és színinterferenciát okozó vizsgálati vegyi anyagok értékelésére, amikor a szövetkivonatok vizsgálati vegyi anyaggal kapott, közvetlen MTT-redukció és/vagy színinterferencia tekintetében nem korrigált OD-értékei a spektrofotométer linearitási tartományán belül vannak, illetve amikor a vizsgálati vegyi anyaggal kapott nem korrigált életképességi arány alapján a vizsgálati vegyi anyag korrozívnak tekinthető (lásd a 35. és 36. pontot). Mindazonáltal a negatív kontroll 50 %-ánál nagyobb NSMTT-arányt és/vagy $NSC_{élő}$ arányt előidéző vizsgálati vegyi anyagok eredményei óvatosan értelmezendők.
30. Azon színes vizsgálati vegyi anyagok esetében, amelyek nagy mértékben befolyásolják az MTT-vizsgálatot, és ezért hagyományos abszorbancia (OD) méréssel nem vizsgálhatók, az MTT-formazán HPLC/UPLC spektrofotometriás eljárással történő meghatározását lehet alkalmazni (lásd a 31. pontot) (37). A HPLC/UPLC spektrofotometriás rendszer lehetővé teszi, hogy az MTT-formazánt mennyiségi meghatározása előtt elkülönítsék a vizsgálati vegyi anyagtól (38). Ezért HPLC/UPLC spektrofotometriás módszer használata esetén a vizsgálati vegyi anyagtól függetlenül soha nincs szükség $NSC_{élő}$ és NSC_{elhalt} kontrollra. Az NSMTT-kontroll ugyanakkor alkalmazandó, ha a vizsgálati vegyi anyag gyaníthatóan közvetlenül redukálja az MTT-t, vagy a színe miatt közvetlen MTT-redukáló hatását nem lehet felmérni (a 26. pontban ismertetett módon). Amennyiben HPLC/UPLC spektrofotometriásan mérik az MTT-formazánt, a szövetek életképességi aránya a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt élő szövetekkel kapott MTT-formazán csúcsterület és a párhuzamos negatív kontrollal kapott MTT-formazán csúcsterület aránya lesz. A közvetlen MTT-redukáló hatással rendelkező

vizsgálati vegyi anyagok esetében a szövetek valódi életképességét úgy számítják ki, hogy a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt élő szövetekkel kapott életképességi arányból kivonják az NSMTT-arányt. Végül megjegyzendő, hogy azok a közvetlen MTT-redukáló hatású, esetleg színinterferenciát is okozó vegyi anyagok, amelyek a kezelést követően visszamaradnak a szövetben és olyan erős MTT-redukáló hatással bírnak, hogy a vizsgált szövetkivonatok OD-értéke (hagyományos OD mérés esetén), illetve csúcsterülete (HPLC/UPLC spektrofotometriás mérés esetén) kívül esik a spektrofotométer linearitási tartományán, nem értékelhetők, bár ilyen csak igen ritka esetben fordul elő.

31. A HPLC/UPLC spektrofotometria bármely típusú vizsgálati vegyi anyagnál (színes, nem színes, MTT-redukáló vagy nem MTT redukáló hatású) alkalmazható az MTT-formazán mérésére (38). A HPLC/UPLC spektrofotometriás rendszerek sokfélesége miatt szükség van arra, hogy a szövetkivonatok MTT-formazán-tartalmának meghatározása előtt igazolják a HPLC/UPLC spektrofotometriás rendszer minősítését azzal, hogy eleget tesznek az Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerfelügyelete (FDA) által az iparág számára kiadott, bioanalitikus módszerek validálására vonatkozó iránymutatásban (38) (39) szereplő standard minősítési paramétereken alapuló elfogadhatósági kritériumoknak. E kulcsfontosságú paraméterekről és elfogadhatósági kritériumokról a 4. függelék nyújt tájékoztatást. Amint eleget tettek a 4. függelékben meghatározott elfogadhatósági kritériumoknak, a HPLC/UPLC spektrofotometriás rendszer minősítettnek tekintendő, és alkalmas arra, hogy az itt leírt vizsgálati módszerben bemutatott kísérleti feltételek mellett elvégezze az MTT-formazán mérését.

Elfogadhatósági kritériumok

32. Minden vizsgálati módszer esetében, amelynek során érvényes RhE-modelleket alkalmaznak, a negatív kontrollal kezelt szöveteknek olyan OD-értéket kell mutatniuk, amely tükrözi a szövetek 2. táblázatban feltüntetett értékek szerinti minőségét, és amely nem lehet alacsonyabb a korábbi adatok alapján megállapított határértékeknél. A pozitív kontrollanyaggal, vagyis jégcettel vagy 8N KOH-hal kezelt szöveteknek tükrözniük kell a szövetek azon képességét, hogy a vizsgálati modell feltételei mellett reagálnak a korrozív vegyi anyagokra (lásd a 2. függelék). A vizsgálati és/vagy kontroll vegyi anyagokkal kezelt szövetreplikátumok variabilitásának az egyes érvényes RhE-modellek követelményeiben szereplő elfogadott határértéken belül kell maradnia (lásd a 2. függelék) (*pl.* a két szövetreplikátum közötti variabilitási különbség nem haladhatja meg a 30 %-ot). Amennyiben egy adott vizsgálatmenet negatív vagy pozitív kontrollja kívül esik az elfogadott tartományon, a vizsgálatmenetet érvénytelennek kell nyilvánítani, és meg kell ismételni. Ha a vizsgálati vegyi anyag variabilitása kívül esik a meghatározott tartományon, meg kell ismételni a vizsgálatát.

Az eredmények értelmezése és az előrejelzési modell

33. Az egyes vizsgálati vegyi anyagokra vonatkozó OD-értéket kell felhasználni a 100%-nak vett negatív kontrollhoz viszonyított százalékos életképesség kiszámításához. HPLC/UPLC spektrofotometria alkalmazása esetén a szövetek életképességi aránya a vizsgálati vegyi

anyaggal kezelt élő szövetekkel kapott MTT-formazán csúcsterület és a párhuzamos negatív kontrollal kapott MTT-formazán csúcsterület arányaként kerül meghatározásra. A sejtleletképeség százalékban megállapított határértéke, amelynek alapján megkülönböztethetők a korrozív és nem korrozív vizsgálati vegyi anyagok (vagy a különböző korrozív alkategóriák), és amelynek alapján az eredményeket értelmezni kell, a vizsgálati módszerhez tartozó vizsgálati modellekre vonatkozólag az alábbi 35. és 36. pontban kerül meghatározásra.

34. Ha a létrejött besorolás egyértelmű, legalább két szövetreplikátum vizsgálatából álló egyszeri vizsgálatmenetnek elegendőnek kell lennie az adott vizsgálati vegyi anyag esetében. Határértéken lévő eredmények esetében azonban, ha például az egyes szövetreplikátumok eredményei nem egyeznek, megfontolható egy második vizsgálatmenet lefolytatása, és ha az első és a második vizsgálatmenet eredményei különbözőek, egy harmadiké is.
35. Az ENSZ GHS/CLP-rendelet osztályozási rendszeréhez kapcsolódó EpiSkin™ bőrkorróziós vizsgálati modell előrejelzési modellje (9) (34) (22) a 4. táblázat szerint alakul:

4. táblázat: EpiSkin™ előrejelzési modell

Adott expozíciós időpontokban mért életképeség (t = 3, 60 és 240 perc)	Megfontolandó javaslat
< 35 % 3 perc expozíció után	Korrozív: • Opcionális 1A alkategória*
≥ 35 % 3 perc expozíció után ÉS < 35 % 60 perc expozíció után VAGY ≥ 35 % 60 perc expozíció után ÉS < 35 % 240 perc expozíció után	Korrozív: • Opcionális 1B és 1C alkategória kombinációja
≥ 35 % 240 perc expozíció után	Nem korrozív

*) Az RhE vizsgálati modellek alkategóriába sorolásra való alkalmasságának felmérése során nyert adatok azt mutatták, hogy az EpiSkin™ vizsgálati modell használatával az 1A alkategóriába sorolt anyagok mintegy 22 %-a valójában az 1B alkategóriába vagy az anyagok/keverékek 1C alkategóriájába tartozna (vagyis felülkategorizálás történt) (lásd a 3. függelék).

36. Az ENSZ GHS/CLP-rendelet osztályozási rendszeréhez kapcsolódó EpiDerm™ SCT (10) (23)(35), SkinEthic™ RHE (17) (18) (23) (36) és epiCS® (16) (23) (37) bőrkorróziós vizsgálati modellek előrejelzési modellje az 5. táblázat szerint alakul:

5. táblázat: EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE és epiCS®

Adott expozíciós időpontokban mért életképeség (t = 3 és 60 perc)	Megfontolandó javaslat
1. LÉPÉS EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE és epiCS® használata esetén	
< 50% 3 perc expozíció után	Korrozív

≥ 50 % 3 perc expozíció után ÉS < 15% 60 perc expozíció után	Korrozív
≥ 50 % 3 perc expozíció után ÉS ≥ 15 % 60 perc expozíció után	Nem korrozív
2. LÉPÉS EpiDerm™ SCT használata esetén – az 1. lépésben korrozívnak minősített anyagoknál/keverékeknél	
< 25% 3 perc expozíció után	Opcionális 1A alkategória *
≥ 25 % 3 perc expozíció után	Opcionális kombinált 1B–1C alkategória
2. LÉPÉS SkinEthic™ RHE használata esetén – az 1. lépésben korrozívnak minősített anyagoknál/keverékeknél	
< 18 % 3 perc expozíció után	Opcionális 1A alkategória *
≥ 18 % 3 perc expozíció után	Opcionális kombinált 1B–1C alkategória
2. LÉPÉS epiCS® használata esetén – az 1. lépésben korrozívnak minősített anyagoknál/keverékeknél	
< 15 % 3 perc expozíció után	Opcionális 1A alkategória *
≥ 15 % 3 perc expozíció után	Opcionális kombinált 1B–1C alkategória

ADATOK ÉS JELENTÉS

Adatok

37. Mindegyik vizsgálatra vonatkozóan táblázatos jelentést kell készíteni az egyes szövetreplikátumok adatairól (például OD-értékek és számított százalékos sejt-életképességi adatok az egyes vizsgálati vegyi anyagok esetében, a besorolást is beleértve), amelyben szerepelnie kell a megismételt kísérletek adatainak is, ha voltak ilyenek. Ezen túlmenően jelentésbe kell foglalni az egyes vizsgálatokban használt szövetreplikátumok átlagát, életképességi tartományát és variációs koefficiensét. Az MTT-reagens és a közvetlen MTT-redukáló hatású vagy színes vizsgálati vegyi anyagok között megfigyelt kölcsönhatásokat a jelentésben minden vizsgálati vegyi anyag esetében fel kell tüntetni.

Vizsgálati jelentés

38. A vizsgálati jelentésnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálati vegyi anyag és kontrollként szolgáló vegyi anyagok:

- Egy összetevőből álló anyag: kémiai azonosítás, például IUPAC- vagy CAS-névvel, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet alapján, tisztaság, adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb. alapján;

- Több összetevőből álló anyagok, UVCB-k és keverékek: amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosítója (lásd fent), mennyiségi előfordulása és releváns fizikai-kémiai tulajdonságai jellemzik;
- fizikai megjelenés, vízdékonyság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok;
- eredet, gyártási szám, ha ismert;
- a vizsgálati vegyi anyag/kontrollanyag kezelése a vizsgálatot megelőzően, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés);
- a vizsgálati vegyi anyag stabilitása, felhasználási határideje vagy ismételt elemzésének napja, ha ismert;
- tárolási feltételek.

Az alkalmazott RhE-modell és protokoll, valamint használatuk indokolása (amennyiben szükséges)

Vizsgálati körülmények:

- az alkalmazott RhE-modell (és gyártási szám);
- az MTT-formazán mennyiségi meghatározására használt mérőeszköz (pl. spektrofotométer) kalibrálási adatai, a hullámhossz és (adott esetben) a sáv szélesség, valamint a mérőeszköz linearitási tartománya;
- az MTT-formazán számszerű mérésére alkalmazott módszer leírása;
- a HPLC/UPLC-spektrofotometriás rendszer minősítésének leírása, ha releváns;
- az alkalmazott specifikus RhE-modellre vonatkozó teljes körű alátámasztó adatok, köztük a modell teljesítménye. Ennek többek között az alábbiakat kell magában foglalnia:
 - i) életképesség;
 - ii) barrierfunkció;
 - iii) morfológia;
 - iv) reprodukálhatóság és előrejelző képesség;
 - v) a modell minőség-ellenőrzése;
- hivatkozás a modellel kapott korábbi adatokra. Ennek többek között az alábbiakat kell magában foglalnia:
- a minőség-ellenőrzési adatok elfogadhatósága tekintettel a korábbi tétel adatokra;
- a vizsgálati módszer végrehajtásában való jártasság bizonyítása a módszer rutinszerű használata előtt, a jártassági tesztanyagok vizsgálata révén.

Vizsgálati eljárás:

- az alkalmazott vizsgálati eljárás részletes leírása (ideértve az expozíciós időszak utáni öblítési eljárásokat);
- a vizsgálati vegyi anyag és a kontrollként szolgáló vegyi anyagok dózisa;
- az expozíciós időszak(ok) hossza és az expozíciós hőmérséklet(ek);
- a közvetlen MTT-redukáló hatással rendelkező és/vagy színváltozást okozó vizsgálati vegyi anyagokhoz alkalmazott kontrollok feltüntetése, amennyiben releváns;
- vizsgálati vegyi anyagokként és kontrollonként (pozitív kontroll, negatív kontroll, NSMTT, NSC_{élő} és NSC_{elhalt}, ha releváns), valamint az egyes expozíciós időszakok során használt szövetreplikátumok;
- a használt RhE-modell alapján alkalmazott döntési kritériumok/előrejelzési modell leírása;
- a vizsgálati eljárás (többek között a mosási eljárások) bármilyen változtatásának leírása.

A vizsgálatmenet és a vizsgálat elfogadásának kritériumai:

- a pozitív és negatív kontrollok átlagértéke és elfogadhatósági tartománya a korábbi adatokon alapul;
- a pozitív és negatív kontrollokban használt szövetreplikátumok közötti elfogadható mértékű variabilitás;
- a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt szövetreplikátumok közötti elfogadható mértékű variabilitás.

Eredmények:

- az egyes vizsgálati vegyi anyagokra és kontrollokra, minden expozíciós időpontra, vizsgálatmenetre és szövetmérésre vonatkozó adatok, többek között az OD-érték vagy az MTT-formazán csúcsterület, szövetek életképességi aránya, szövetek átlagos életképességi aránya, a replikátumok közötti eltérések, szórások és/vagy variációs koefficiensek (amennyiben releváns) táblázatba foglalása;
- amennyiben alkalmazandó, a közvetlen MTT-redukáló hatású és/vagy elszíneződést okozó vizsgálati vegyi anyagokhoz használt kontrollok eredményei, ideértve az OD-értéket vagy az MTT-formazán csúcsterületet, az NSMTT, az NSC_{élő} és az NSC_{elhalt} arányt, a szövetreplikátumok közötti különbségeket, szórásokat és/vagy variációs koefficienseket (amennyiben releváns), és a szövetek helyes végső életképességi arányát;
- a meghatározott vizsgálatmenet és a vizsgálat elfogadhatósági kritériumai tekintetében a vizsgálati vegyi anyaggal/anyagokkal és a kontrollként szolgáló vegyi anyagokkal kapott eredmények;
- a megfigyelt egyéb hatások leírása.
- az alkalmazott előrejelzési modellel/döntési kritériumokkal összhangban kialakított osztályozás.

Az eredmények értékelése

Következtetések

SZAKIRODALOM

- (1) UN (2013). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth Revised Edition, UN New York valamint Geneva. Elérhető a következő címen: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html
- (2) E melléklet B.4., Akut bőrirritáció/bőrkorrózió fejezete.
- (3) E melléklet B.40., *In vitro* bőrkorrózió fejezete.
- (4) E melléklet B.65., *In vitro* Membrán barrier vizsgálati módszer fejezete.
- (5) E melléklet B.46., *In vitro* bőrirritáció: Rekonstruált emberi felhámmodellen végzett vizsgálati módszer című fejezete.
- (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) Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.
- (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. o.
- (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, USA.
- (13) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (2002). ICCVAM evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication No 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.
- (14) EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the EpiSkin™ Test (an *In vitro* Test for Skin Corrosivity), Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3 April 1998.
- (15) EC-ECVAM (2000). Statement on the Application of the EpiDerm™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC14), 21 March 2000.
- (16) Hoffmann J., Heisler E., Karpinski S., Losse J., Thomas D., Siefken W., Ahr H.J., Vohr H.W. 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. o.
- (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. o.
- (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. o.
- (19) EC-ECVAM (2006). Statement on the Application of the SkinEthic™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC25), 17 November 2006.
- (20) EC-ECVAM (2009). ESAC Statement on the Scientific Validity of an *In-Vitro* Test Method for Skin Corrosivity Testing: the EST-1000, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30), 12 June 2009.
- (21) OECD (2013). Summary Document on the Statistical Performance of Methods in OECD Test Guideline 431 for Sub-categorisation. Environment, Health, and

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

- (22) Alépée N., Grandidier M.H., 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). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris
- (25) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. . Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.
- (26) Eskes C. *et al.* (2012). Regulatory Assessment of *In vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul.Toxicol.Pharmacol.* 62, 393-403.
- (27) Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65:55-63.
- (28) Tinois E., *et al.* (1994). The Episkin Model: Successful Reconstruction of Human *Epidermis In vitro*. In: *In vitro* Skin Toxicology. Rougier A., Goldberg A.M and Maibach H.I. (Eds): 133-140. o.
- (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) Ponec 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. o.
- (39) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. (2001. május). Elérhető a következő címen: [\[http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf\]](http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf).

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Pontosság: a vizsgálati módszerrel kapott eredmények és az elfogadott referenciaértékek közötti egyezés mértéke. A vizsgálati módszer teljesítményének mutatója, valamint a relevanciájának egyik megítélési szempontja. E kifejezést gyakran használják az »egyezés« megfelelőjeként, amely egy adott vizsgálati módszer alkalmazásakor az azonos eredmények arányát fejezi ki (25).

Sejtek életképessége: a sejtpopulációk teljes aktivitását mérő paraméter (például a celluláris mitokondriális dehidrogenázoknak az MTT ([3–(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid, tiazolil kék] vitális festéket redukáló képessége), amely – a mért végponttól és az alkalmazott vizsgálati tervtől függően – korrelációt mutat az élő sejtek teljes számával és/vagy életképességével.

Vegyí anyag: anyag vagy keverék.

Egyezés: a kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek teljesítményének mutatója, valamint a relevanciájának egyik megítélési szempontja. A kifejezést esetenként használják a pontosság megfelelőjeként, és úgy határozzák meg, mint a helyesen pozitívként vagy negatívként besorolt összes vizsgálati vegyi anyag aránya. Az egyezés nagy mértékben függ a vizsgálat tárgyát képező vizsgálati vegyi anyag típusaiban előforduló pozitív eredmények gyakoriságától (25).

ET₅₀: a referencia-vegyianyag meghatározott, állandó koncentrációban történő alkalmazása esetén a sejt életképességének 50 %-kal való csökkentéséhez szükséges expozíciós idő meghatározásával becsülhető meg, lásd még az IC₅₀-et.

GHS (a vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének globálisan harmonizált rendszere): a vegyi anyagoknak (anyagoknak és keverékeknek) a fizikai, egészségi és környezeti veszélyek szabványosított típusai és szintjei szerinti osztályokba sorolására és megfelelő kommunikációs elemekkel (például piktogramokkal, figyelmeztetésekkel, figyelmeztető mondatokkal, óvintézkedésekre vonatkozó mondatokkal és biztonsági adatlapokkal) történő jelölésére javaslatokat megfogalmazó rendszer, amelynek célja, hogy az emberek (köztük a munkáltatók, a munkavállalók, a fuvarozók, a fogyasztók és a sürgősségi segélyszolgálatok) és a környezet megóvása érdekében egységesítse a vegyi anyagok káros hatásaira vonatkozó információk továbbítását (1).

HPLC: nagy teljesítményű folyadékkromatográfia.

IATA: integrált vizsgálati és értékelési megközelítés.

IC₅₀: annak a koncentrációnak a meghatározásával becsülhető meg, amelynél egy adott referencia-vegyianyag egy meghatározott expozíciós idő elteltével 50%-kal (IC₅₀) csökkenti a szövetek életképességét; lásd még az ET₅₀-et.

Végtelen dózis: az epidermiszen alkalmazott vizsgálati vegyi anyag azon mennyisége, amely meghaladja az epidermisz felszínének teljes és egyenletes befedéséhez szükséges mennyiséget. **Keverék:** két vagy több anyagból álló keverék vagy oldat, amelyben az anyagok nem lépnek egymással reakcióba.

Egy összetevőből álló anyag: olyan, a mennyiségi összetétele alapján meghatározott anyag, amelyben az egyik fő összetevő legalább 80 tömegszázalékban van jelen.

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid; tiazolil kék tetrazólium-bromid.

Több összetevőből álló anyag: olyan, a mennyiségi összetétele alapján meghatározott anyag, amelyben egynél több fő összetevő több mint 10 tömegszázalékban, de 80 tömegszázalékot nem meghaladó koncentrációban van jelen. A több összetevőből álló anyag gyártási folyamat eredménye. A keverék és a több összetevőből álló anyag között az a különbség, hogy a keverék két vagy több anyag összekeverésével, kémiai reakció nélkül jön létre. A több összetevőből álló anyag kémiai reakció eredménye.

NK: nem korrozív.

NSC_{elhalt} kontroll: elhalt szöveteken végzett, nem specifikus színeződést mérő kontroll.

NSC_{élő} kontroll: élő szöveteken végzett, nem specifikus színeződést mérő kontroll.

NSMTT: nem specifikus MTT-redukció.

OD: optikai sűrűség.

Pozitív kontroll: a vizsgálati rendszer valamennyi alkotóelemét tartalmazó, ismert pozitív hatást kiváltó vegyi anyaggal kezelt replikátum. Annak biztosítása érdekében, hogy a pozitív kontrollban jelentkező hatás időbeli változását fel lehessen mérni, a pozitív hatás nem lehet túlságosan erőteljes.

Teljesítményszabványok: hitelesített referenciamódszeren alapuló szabványok, amelyek a javasolt, végrehajtás és funkcionalitás szempontjából hasonló vizsgálati módszer összehasonlíthatósági értékelésének alapjául szolgálnak. Ide tartoznak: i. a vizsgálati módszer alapvető összetevői; ii. a referencia-vegyianyagok minimális jegyzéke, amely a validált vizsgálati módszer által nyújtott teljesítmény elfogadhatóságának igazolására használt vegyi anyagokból került összeállításra; és iii. a validált vizsgálati módszer eredményei alapján meghatározott, azokhoz hasonló megbízhatósági és pontossági szint, amelyet a javasolt vizsgálati módszernek teljesítenie kell a referencia-vegyianyagok minimális jegyzéke szerinti értékelése során (25).

Relevancia: a vizsgálati módszer és a vizsgált hatás kapcsolatát adja meg, valamint azt, hogy van-e a vizsgálatnak az adott cél szempontjából értelme és haszna. Azt tükrözi, hogy a vizsgálati módszer mennyire pontosan méri vagy jelzi előre a vizsgált biológiai hatást. A relevancia meghatározása során a vizsgálati módszer pontosságát (az eredmények egyezését) figyelembe

kell venni (25).

Megbízhatóság: a vizsgálati módszer laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti időbeli reprodukálhatóságának mértéke ugyanazon protokoll alkalmazása mellett. A laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti reprodukálhatóság kiszámításával állapítják meg (25).

Vizsgálatmenet: egy vizsgálatmenet során egy vagy több vizsgálati vegyi anyagot vizsgálnak egy párhuzamos negatív kontrollal és egy pozitív kontrollal.

Érzékenység: az összes olyan pozitív/aktív vegyi anyag aránya, amelyet a vizsgálati módszer helyesen sorolt be. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (25).

In vivo **bőrkorrózió:** a vizsgálati vegyi anyag alkalmazását követően négy órán belül megjelenő, visszafordíthatatlan bőrkárosodás, azaz a felhámon át az irhára is áttérjedő látható szövetelhalás. A korróziós reakciót fekélyek, vérzés, véres var, illetve a 14 napos megfigyelési időszak végén a bőr kifehéredése miatti elszíneződések, teljesen szőrtelen területek és hegek jellemzik. A kérdéses lézió értékeléséhez figyelembe kell venni a kórszövetet.

Specificitás: a vizsgálati módszerrel helyesen besorolt összes negatív/inaktív vegyi anyag aránya. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (25).

Anyag: olyan természetes állapotban előforduló vagy gyártási eljárásból származó kémiai elem és vegyületei, amely a stabilitásának megőrzéséhez szükséges adalékanyagot és az alkalmazott eljárásból származó szennyező anyagokat is tartalmazhat, de nem tartalmaz olyan oldószert, amely az anyag stabilitásának befolyásolása vagy összetételének megváltoztatása nélkül elkülöníthető. **Vizsgálati vegyi anyag:** bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

UPLC: ultranagy teljesítményű folyadékkromatográfia.

UVCB: ismeretlen vagy változó összetételű anyagok, komplex reakciótermékek vagy biológiai anyagok.

2. függelék

A BŐRKORRÓZIÓS VIZSGÁLATKÉNT VALIDÁLT RHE VIZSGÁLATI MODELLEK FŐBB ÖSSZETEVŐI

A vizsgálati modell összetevői	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
A modell felülete	0,38 cm ²	0,63 cm ²	0,5 cm ²	0,6 cm ²
A szövetreplikátumok száma	Expozíciós időszakonként legalább 2	Expozíciós időszakonként legalább 2–3	Expozíciós időszakonként legalább 2	Expozíciós időszakonként legalább 2

A vizsgálati modell összetevői	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
A kezelési dózisok és alkalmazásuk	<u>Folyadékok és viszkózus anyagok:</u> 50 µl ± 3 µl (131,6 µl/cm²) <u>Szilárd anyagok:</u> 20 ± 2 mg (52,6 mg/cm²) + 100 µl ± 5 µl NaCl-oldat (9 g/l) <u>Viaszos/ragadós anyagok:</u> 50 ± 2 mg (131,6 mg/cm²) nejlonhálóval	<u>Folyadékok:</u> 50 µl (79,4 µl/cm²) nejlonhálóval vagy anélkül <i>Elővizsgálat a vizsgálati vegyi anyag nejlonhálóval való kompatibilitására</i> <u>Félszilárd anyagok:</u> 50 µl (79,4 µl/cm²) <u>Szilárd anyagok:</u> 25 µl H₂O (vagy szükség esetén több) + 25 mg (39,7 mg/cm²) <u>Viaszos anyagok:</u> kb. 8 mm átmérőjű lapos „korongszerű” darab helyezendő a 15 µl H₂O-val megnedvesített szövetre.	<u>Folyadékok és viszkózus anyagok:</u> 40 µl ± 3 µl (80 µl/cm²) nejlonháló használatával <i>Elővizsgálat a vizsgálati vegyi anyag nejlonhálóval való kompatibilitására</i> <u>Szilárd anyagok:</u> 20 µl ± 2 µl H₂O + 20 ± 3 mg (40 mg/cm²) <u>Viaszos/ragadós anyagok:</u> 20 ± 3 mg (40 mg/cm²) nejlonháló használatával	<u>Folyadékok:</u> 50 µl (83,3 µl/cm²) nejlonháló használatával <i>Elővizsgálat a vizsgálati vegyi anyag nejlonhálóval való kompatibilitására</i> <u>Félszilárd anyagok:</u> 50 µl (83,3 µl/cm²) <u>Szilárd anyagok:</u> 25 mg (41,7 mg/cm²) + 25 µl H₂O (vagy szükség esetén több) <u>Viaszos anyagok:</u> kb. 8 mm átmérőjű lapos „keksz alakú” darab helyezendő a 15 µl H₂O-val megnedvesített szövetre
Közvetlen MTT-redukáló hatás előzetes felmérése	50 µl (folyadék) vagy 20 mg (szilárd) + 2 ml MTT 0,3 mg/ml oldat 180 ± 5 percig 37 °C, 5 % CO₂, 95 % RH mellett → ha az oldat színe kékre/lilára vált, vízben előlt adaptált kontrollt kell végezni	50 µl (folyadék) vagy 25 mg (szilárd) + 1 ml MTT 1 mg/ml oldat 60 percig 37 °C, 5 % CO₂, 95 % RH mellett → ha az oldat színe kékre/lilára vált, fagyasztással előlt adaptált kontrollt kell végezni	40 µl (folyadék) vagy 20 mg (szilárd) + 1 ml MTT 1 mg/ml oldat 180± 15 percig 37 °C, 5 % CO₂, 95 % RH mellett → ha az oldat színe kékre/lilára vált, fagyasztással előlt adaptált kontrollt kell végezni	50 µl (folyadék) vagy 25 mg (szilárd) + 1 ml MTT 1 mg/ml oldat 60 percig 37 °C, 5 % CO₂, 95 % RH mellett → ha az oldat színe kékre/lilára vált, fagyasztással előlt adaptált kontrollt kell végezni

A vizsgálati modell összetevői	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Színinterferencia előzetes felmérése	10 µl (folyadék) vagy 10 mg (szilárd) + 90 µl H ₂ O szobahőmérsékleten keverve 15 percig → ha az oldat elszíneződik, élő szöveteken adaptált kontrollt kell végezni	50 µl (folyadék) vagy 25 mg (szilárd) + 300 µl H ₂ O 60 percre 37 °C, 5% CO ₂ , 95% RH mellett → ha az oldat elszíneződik, élő szöveteken adaptált kontrollt kell végezni	40 µl (folyadék) vagy 20 mg (szilárd) + 300 µl H ₂ O szobahőmérsékleten keverve 60 percig → ha a vizsgálati vegyi anyag elszíneződik, élő szöveteken adaptált kontrollt kell végezni	50 µl (folyadék) vagy 25 mg (szilárd) + 300 µl H ₂ O 60 percre 37 °C, 5% CO ₂ , 95% RH mellett → ha az oldat elszíneződik, élő szöveteken adaptált kontrollt kell végezni
Expozíciós idő és hőmérséklet	3 perc, 60 perc (± 5 perc) és 240 perc (± 10 perc) Szellőztetett fülkében Szobahőmérsékleten (szobahőm., 18–28 °C)	3 perc szobahőmérsékleten, és 60 perc 37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % RH mellett	3 perc szobahőmérsékleten, és 60 perc 37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % RH mellett	3 perc szobahőmérsékleten, és 60 perc 37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % RH mellett
Öblítés	25 ml 1x PBS (2 ml/öblítésenként)	20 alkalommal mosni 1x PBS-sel	20 alkalommal mosni 1x PBS-sel	20 alkalommal mosni 1x PBS-sel
Negatív kontroll	50 µl NaCl-oldat (9 g/l) Minden expozíciós időpontban vizsgálva	50 µl H ₂ O Minden expozíciós időpontban vizsgálva	40 µl H ₂ O Minden expozíciós időpontban vizsgálva	50 µl H ₂ O Minden expozíciós időpontban vizsgálva
Pozitív kontroll	50 µl jégcet Csak 4 órán át vizsgálva	50 µl 8N KOH Minden expozíciós időpontban vizsgálva	40 µl 8N KOH Csak 1 órán át vizsgálva	50 µl 8N KOH Minden expozíciós időpontban vizsgálva

A vizsgálati modell összetevői	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
MTT-oldat	2 ml 0,3 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
MTT inkubációs idő és hőmérséklet	180 perc (± 15 perc) 37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % RH mellett	180 perc 37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % RH mellett	180 perc (± 15 perc) 37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % RH mellett	180 perc 37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % RH mellett
Extraháló oldószer	500 µl savasított izopropanol (0,04 N HCl izopropanolban) (izolált szövetet teljesen bemerítve)	2 ml izopropanol (kinyerés az inzert tetejéről és aljáról)	1,5 ml izopropanol (kinyerés az inzert tetejéről és aljáról)	2 ml izopropanol (kinyerés az inzert tetejéről és aljáról)
Extrakciós időtartam és hőmérséklet	Éjszakán át szobahőmérsékleten, fénytől védett helyen	Szobahőmérsékleten rázás nélkül éjszakán át vagy 120 perces rázatással (~120 rpm)	Szobahőmérsékleten rázás nélkül éjszakán át vagy 120 perces rázatással (~120 rpm)	Szobahőmérsékleten rázás nélkül éjszakán át vagy 120 perces rázatással (~120 rpm)
OD leolvasás	570 nm (545–595 nm) referenciaszűrő nélkül	570 nm (vagy 540 nm) referenciaszűrő nélkül	570 nm (540–600 nm) referenciaszűrő nélkül	540–570 nm referenciaszűrő nélkül
Szövet minőség-ellenőrzése	18 órás kezelés SDS-sel 1,0 mg/ml ≤ IC ₅₀ ≤ 3,0 mg/ml	Kezelés 1 % Triton X-100-zal 4,08 óra ≤ ET ₅₀ ≤ 8,7 óra	Kezelés 1 % Triton X-100-zal 4,0 óra ≤ ET ₅₀ ≤ 10,0 óra	Kezelés 1 % Triton X-100-zal 2,0 óra ≤ ET ₅₀ ≤ 7,0 óra

A vizsgálati modell összetevői	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Elfogadhatósági kritériumok	1. A negatív kontrollal (NaCl) kezelt szövetreplikátumok átlagos OD-értékének minden expozíciós időszakban legalább 0,6-nak és legfeljebb 1,5-nek kell lennie 2. A pozitív kontrollal (jégecet) 4 órán át kezelt szövetreplikátumok átlagos életképessége, a negatív kontrollhoz viszonyított százalékos arányban kifejezett értéke nem haladhatja meg a 20 %-ot 3. 20–100 %-os életképességi tartományban és legalább 0,3-as OD-értéknél a két szövetreplikátum életképessége közötti különbség nem haladhatja meg a 30 %-ot	1. A negatív kontrollal (H₂O) kezelt szövetreplikátumok átlagos OD-értékének minden expozíciós időszakban legalább 0,8-nak és legfeljebb 2,8-nak kell lennie 2. A pozitív kontrollal (8N KOH) 1 órán át kezelt szövetreplikátumok átlagos, a negatív kontroll százalékában kifejezett életképessége nem érheti el a 15 %-ot 3. 20–100 %-os életképességi tartományban a szövetreplikátumok közötti variációs koefficiens nem haladhatja meg a 30 %-ot.	1. A negatív kontrollal (H₂O) kezelt szövetreplikátumok átlagos OD-értékének minden expozíciós időszakban legalább 0,8-nak és legfeljebb 3,0-nak kell lennie 2. A pozitív kontrollal (8N KOH) 1 órán át (adott esetben 4 órán át) kezelt szövetreplikátumok átlagos, a negatív kontroll százalékában kifejezett életképessége nem érheti el a 15 %-ot 3. 20–100 %-os életképességi tartományban és legalább 0,3-as OD-értéknél a két szövetreplikátum életképessége közötti különbség nem haladhatja meg a 30 %-ot.	1. A negatív kontrollal (H₂O) kezelt szövetreplikátumok átlagos OD-értékének minden expozíciós időszakban legalább 0,8-nak és legfeljebb 2,8-nak kell lennie 2. A pozitív kontrollal (8N KOH) 1 órán át kezelt szövetreplikátumok átlagos, a negatív kontroll százalékában kifejezett életképessége nem érheti el a 20 %-ot 3. 20–100 %-os életképességi tartományban és legalább 0,3-as OD-értéknél a két szövetreplikátum életképessége közötti különbség nem haladhatja meg a 30 %-ot.

3. függelék

A VIZSGÁLATI MODELLEKNEK AZ ALKATEGÓRIÁBA SOROLÁS TERÉN NYÚJTOTT TELJESÍTMÉNYE

Az alábbi táblázat ismerteti a négy vizsgálati modellnek a vizsgálat négy kidolgozója által tesztelt, 80 vegyi anyagon nyújtott teljesítményét. A számításokat az OECD Titkársága végezte el, amelyek eredményét egy szakértői alcsoport vizsgálata felül és hagyta jóvá (21) (23).

Az EpiSkin™, az EpiDerm™, a SkinEthic™ és az epiCS® vizsgálati modellekkel elvégezhető az alkategóriába sorolás (vagyis 1A vagy 1B és 1C vagy nem korrozív (NK)).

A négy vizsgálati modell teljesítménye, felülkategorizálási aránya, alulkategorizálási aránya és pontossága (előrejelző képessége) az összes vizsgálati modellben 2 vagy 3 vizsgálatmenet során vizsgált, 80 elemből álló vegyi anyag készlet alapján:

ELŐREJELZÉSI STATISZTIKA A TELJES VEGYI ANYAG KÉSZLET ALAPJÁN				
(n= 80 vegyi anyag 2 független vizsgálatmenetben vizsgálva az epiCS® esetében, illetve 3 független vizsgálatmenetben vizsgálva az EpiDerm™ SCT, EpiSkin™ és SkinEthic™ RHE esetében, ami 159*, illetve 240 besorolást jelent)				
*az egyik vegyi anyagot egyszer vizsgálták az epiCS® modellben, mert nem állt rendelkezésre (23)				
	EpiSkin™	EpiDerm™	SkinEthic™	epiCS®
Felülkategorizálások:				
1B–1C osztályba tartozók 1A osztályba sorolása	21,50 %	29,0%	31,2%	32,8%
NK-anyagok 1B–1C osztályba sorolása	20,7%	23,4%	27,0 %	28,4 %
NK-anyagok 1A osztályba sorolása	0,00%	2,7%	0,0 %	0,00%
Felülkategorizálás korr.	20,7%	26,1%	27,0%	28,4%
Összesített felülkategorizálási ráta (minden	17,9%	23,3%	24,5%	25,8%
Alulkategorizálások:				
1A osztályba tartozók 1B–1C osztályba sorolása	16,7%	16,7 %	16,7%	12,5 %
1A osztályba tartozók NK-anyagként való	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
1B–1C osztályba tartozók NK-anyagként való	2,2%	0,00%	7,5%	6,6%
Összesített alulkategorizálási ráta (minden	3,3%	2,5%	5,4%	4,4%
Helyes kategorizálások:				
1A osztályba tartozók helyes besorolása	83,3%	83,3%	83,3%	87,5%

1B–1C osztályba tartozók helyes besorolása	76,3%	71,0%	61,3%	60,7%
NK-anyagok helyes besorolása	79,3%	73,9%	73,0%	71,62%
Összesített pontosság	78,8%	74,2%	70%	69,8%

NC: Nem korrozív

4. függelék

A rekonstruált emberi felhámshóvetből kivont MTT-formazán mérésére használt HPLC/UPLC spektrofotometriás rendszer minősítésének főbb paraméterei és elfogadhatósági kritériumai

Paraméter	Az FDA-iránymutatás szerinti protokoll (37) (38)	Elfogadhatósági kritériumok
Szelektivitás	Izopropanol elemzése, élő vakpróba (nem kezelt élő RhE-szövetekből kivont izopropanol), elhalt vakpróba (nem kezelt elhalt RhE-szövetekből kivont izopropanol)	$\text{Terület}_{\text{interferencia}} \leq \text{Terület}_{\text{AMHÉ}}^1 \cdot 20\% - a$
Precizitás	Minőség-ellenőrzések (vagyis MTT-formazán 1,6 µg/ml, 16 µg/ml és 160 µg/ml mellett) izopropanolban (n=5)	Variációs koefficiens $\leq 15\%$ vagy $\leq$ az AMHÉ 20 %-a
Pontosság	Minőség-ellenőrzés izopropanolban (n=5)	Eltérési arány $\leq 15\%$ vagy $\leq$ az AMHÉ 20 %-a
Mátrixhatás	Minőség-ellenőrzés élő vakpróbán (n=5)	$85\% \leq \text{Mátrixhatás } \% \leq 115\%$
Átvitel	Izopropanol elemzése egy FMHÉ ² szabvány után	$\text{Terület}_{\text{interferencia}} \leq \text{Terület}_{\text{AMHÉ}} \cdot 20\% - a$
Megismételhetőség (napon belüli)	3 független kalibrációs görbe (izopropanolba helyezett MTT-formazán 6 egymás utáni 1/3-os hígítása kezdve a FMHÉ-nél, vagyis 200 µg/ml-nél); Minőség-ellenőrzés izopropanolban (n=5)	Kalibrációs görbék: Eltérési arány $\leq 15\%$ vagy $\leq$ az AMHÉ 20 %-a Minőség-ellenőrzések: Eltérési arány $\leq 15\%$ és variációs koefficiens $\leq 15\%$
Megismételhetőség (napok közötti)	1. nap: 1 kalibrációs görbe és minőség-ellenőrzések izopropanolban (n=3) 2. nap: 1 kalibrációs görbe és minőség-ellenőrzések izopropanolban (n=3) 3. nap: 1 kalibrációs görbe és minőség-ellenőrzések izopropanolban (n=3)	
Az MTT-formazán rövid távú stabilitása az RhE szövetkivonatban	Minőség-ellenőrzések élő vakpróbán (n=3) a készítés napján és 24 órás szobahőmérsékleten való tárolás után	Eltérési arány $\leq 15\%$
Az MTT-formazán hosszú távú stabilitása az RhE szövetkivonatban, ha szükséges	Minőség-ellenőrzések élő vakpróbán (n=3) a készítés napján és több napi, meghatározott hőmérsékleten (pl. 4 °C, -20 °C, -80 °C) történő tárolás után	Eltérési arány $\leq 15\%$

¹AMHÉ: Alsó meghatározási határérték, amely 1–2 %-os szöveti életképességet takar, vagyis 0,8 µg/ml.

²FMHÉ: Felső meghatározási határérték, amely legalább kétszer akkora mint a negatív kontroll izopropanolban várható legmagasabb MTT-formazán koncentrációja, vagyis 200 µg/ml.”

7. A B. részben a B.46. fejezet helyébe a következő szöveg lép:

„B.46. *IN VITRO* BŐRIRRITÁCIÓ: REKONSTRUÁLT EMBERI FELHÁMMODELLEN VÉGZETT VIZSGÁLATI MÓDSZER

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 439. vizsgálati iránymutatásában (2015) leírt módszerrel. A bőrirritáció a vizsgálati vegyi anyag alkalmazását követően 4 órán belül megjelenő, visszafordítható bőrkárosodás [az Egyesült Nemzetek Szervezete (ENSZ) által kidolgozott, vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének globálisan harmonizált rendszerében (GHS)] (1), valamint az Európai Unió (EU) anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról szóló 1272/2008/EK rendeletében (CLP-rendelet)¹ meghatározottak szerint. Ez a vizsgálati módszer olyan *in vitro* eljárást biztosít, amely lehetővé teszi az ENSZ által kidolgozott GHS és a CLP-rendelet szerinti 2-es kategóriának megfelelő, irritációt okozó vegyi anyagok (anyagok és keverékek) jelentette veszély meghatározását (2). Azokban a régiókban, amelyekben nem alkalmazzák az ENSZ GHS szerinti opcionális 3. kategóriát (enyhe irritáló hatású anyagok), e vizsgálati módszert a kategóriába nem sorolt vegyi anyagok azonosítására is használhatják. Ezért a szabályozási keret és a használatban lévő osztályozási rendszer függvényében e vizsgálati módszer egyaránt használható az *in vivo* bőrirritációs vizsgálatokat önállóan helyettesítő vizsgálatként és valamely vizsgálati stratégia keretében alkalmazott részlegesen helyettesítő vizsgálatként a vegyi anyagok bőrirritációs hatásának meghatározására (3).
2. A bőrirritáció felmérése jellemzően kísérleti állatokon történő vizsgálatot foglal magában (az OECD eredetileg 1981-ben elfogadott, majd 1992-ben, 2002-ben és 2015-ben felülvizsgált 404. vizsgálati iránymutatásával egyenértékű B.4. vizsgálati módszer alkalmazásával) (4). A korrozivitás vizsgálata terén három validált *in vitro* vizsgálati módszert fogadtak el: (az OECD 430. vizsgálati iránymutatásával egyenértékű) B.40. vizsgálati módszert, (az OECD 431. vizsgálati iránymutatásával egyenértékű) B.40bis. vizsgálati módszert és (az OECD 435. vizsgálati iránymutatásával egyenértékű) B.65. vizsgálati módszert (5) (6) (7). A bőrkorróziós és bőrirritációs vizsgálatok és értékelések integrált megközelítéseiről (IATA) szóló OECD-iránymutatás több, információforrásokat és adatelemző eszközöket csoportosító modult ismertet, továbbá iránymutatást nyújt arra nézve, i. hogyan integrálhatók és használhatók az ismert vizsgálati és nem vizsgálati

¹ Az Európai Parlament és a Tanács 1272/2008/EK rendelete (2008. december 16.) az anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról, a 67/548/EGK és az 1999/45/EK irányelv módosításáról és hatályon kívül helyezéséről, valamint az 1907/2006/EK rendelet módosításáról (HL L 353/1., 2008.12.31.).

eredetű adatok a vegyi anyagok potenciális bőrirritációs és bőrkorróziós hatásainak felmérésére, és ii. javaslatot tesz egy, a további vizsgálatok szükségessége esetén alkalmazható megközelítésre (3).

3. Ez a vizsgálati módszer a bőrirritációval mint az emberi egészség károsodásának egyik végpontjával foglalkozik. Ez a módszer rekonstruált emberi felhám (RhE) *in vitro* vizsgálati rendszerén alapul, amely nagy hasonlósággal modellezi az emberi bőr felső rétegének, azaz a felhámnak (epidermisznek) biokémiai és fiziológiai tulajdonságait. Az RhE vizsgálati rendszer nem transzformált emberi keratinocitákat alkalmaz sejtforrásként, amelyekből rekonstruálnak egy szövettani és sejtfelépítés szempontjából reprezentatív felhámmodellt. A hasonló és módosított RhE-alapú vizsgálati módszerek validálásának és értékelésének elősegítése érdekében rendelkezésre állnak teljesítményszabványok, az OECD 34. iránymutatásában lefektetett elvekkel összhangban (8) (9). A módszerrel egyenértékű, eredetileg 2010-ben elfogadott vizsgálati iránymutatás 2013-as átdolgozott változatába belefoglaltak további RhE-modelleket, 2015-ös átdolgozott kiadása pedig kiter az IATA-iránymutatásra és bevezet egy, az életképesség mérésére szolgáló alternatív eljárást.
4. Az RhE vizsgálati rendszeren (érzékenysége 80 %, specificitása 70 % és pontossága 75%) alapuló négy kereskedelmi forgalomban kapható *in vitro* vizsgálati modellen végeztek elővalidálási, optimalizálási és validálási vizsgálatokat (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28). E vizsgálati iránymutatás magában foglalja ezt a négy vizsgálati modellt, felsorolásuk a 2. mellékletben található, amely tájékoztatást nyújt az adott vizsgálati módszerek validálásához alkalmazott validálási vizsgálat típusáról is. Ahogyan az a 2. mellékletben is megjegyzésre került, a vizsgálati módszer és a teljesítményszabványok (8) a validált referenciamódszer alapján kerültek kidolgozásra.
5. Az adatok OECD-megállapodás szerinti kölcsönös elfogadása csak a teljesítményszabványoknak (8) megfelelően validált vizsgálati modellek esetében lesz garantált, ha a vizsgálati modelleket az OECD felülvizsgálta és elfogadta. Az e vizsgálati módszer és az annak megfelelő OECD vizsgálati iránymutatás részét képező vizsgálati modellek egységesen használhatók arra, hogy eleget tegyenek az *in vitro* bőrirritációs vizsgálati módszerekből származó vizsgálati eredményekre vonatkozó nemzeti követelményeknek, ugyanakkor biztosítják az adatok kölcsönös elfogadásának előnyeit.
6. A dokumentumban alkalmazott fogalmak meghatározása az 1. függelékben található.

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

7. A vizsgálati módszer korlátai közé tartozik – ahogyan az az RhE vizsgálati módszereket értékelő és jellemző teljes körű előrettekintő validálási vizsgálatból kiderült (16) –, hogy

nem teszi lehetővé a vegyi anyagok ENSZ GHS szerinti opcionális 3. kategóriába (enyhe irritáló hatású anyagok) sorolását (1). Ezért a vizsgálati módszer jövőbeni használatát a tagállamok szabályozási kerete fogja meghatározni. Az EU a 3. kategóriát nem foglalta bele a CLP-rendeletbe. Egyetlen bőrexpozíció után a bőrt ért helyi hatások teljes kiértékeléséhez a vizsgálatok és értékelések integrált megközelítéseiről szóló OECD-iránymutatást kell tanulmányozni (3). Elfogadott tény, hogy az emberi bőr használatára nemzeti és nemzetközi etikai megfontolások és feltételek vonatkoznak.

8. Ez a vizsgálati módszer a bőrirritációval mint az emberi egészség károsodásának egyik végpontjával foglalkozik. Bár ez a vizsgálati módszer nem nyújt megfelelő információt a bőrkorrózióról, megjegyzendő, hogy a bőrkorrózió vizsgálatára irányuló (az OECD 431. vizsgálati iránymutatásával egyenértékű) B.40bis. módszer ugyanezen a rekonstruált emberi felhámmodelles vizsgálati rendszeren alapul, noha más protokollt alkalmaz (6). Ez a vizsgálati módszer emberi keratinsejteket tartalmazó rekonstruált emberi felhámmodelleken alapul, tehát a vizsgált faj célszervének *in vitro* vizsgálatáról van szó. Továbbá közvetlenül lefedi az irritáció során *in vivo* zajló gyulladásos kaszkád/hatásmechanizmus kezdeti lépését (körülírt sérülést eredményező sejt- és szövetkárosodás). E vizsgálati módszer validálási eljárása során a vegyi anyagok széles körét vizsgálták, és a validálási vizsgálat adatbázisa összesen 58 vegyi anyagra terjedt ki (16) (18) (23). A vizsgálati módszer szilárd anyagokra, folyadékokra, félszilárd anyagokra és viaszos anyagokra alkalmazandó. A folyadékok lehetnek vizesek vagy nem vizesek; a szilárd anyagok lehetnek vízben oldódóak vagy oldhatatlanok. Ahol megoldható, a szilárd anyagokat alkalmazásuk előtt finom porrá kell őrölni; a mintát előzetesen nem szükséges más módon kezelni. Gázokat és aeroszolókat hitelesítési vizsgálat keretében még nem vizsgáltak (29). Bár elképzelhető, hogy ezek is vizsgálhatók a rekonstruált emberi felhámmodelles technikával, a jelenlegi vizsgálatimódszer-leírás nem engedi meg gázok és aeroszolok vizsgálatát.
9. A vizsgálati módszer tervezett szabályozási célt szolgáló adatgenerálás érdekében, keveréken történő alkalmazása előtt meg kell vizsgálni, hogy az megfelelő eredményeket biztosíthat-e erre a célra, és ha igen, miért. Ilyen megfontolások nem szükségesek, ha létezik a keverék vizsgálatára vonatkozó szabályozási követelmény. Mivel azonban a keverékek kategóriák és összetételek széles körét fedik le, és jelenleg kevés információ áll rendelkezésre a keverékek vizsgálatára vonatkozóan, azokban az esetekben, amikor bizonyítékkal igazolható, hogy a vizsgálati módszer valamely konkrét keverékkategóriára nem alkalmazható (pl. az Eskes és társai, 2012 által javasolt stratégia alapján (30)), a vizsgálati módszer az adott keverékkategóriára nem alkalmazható. Hasonló elővigyázatossággal kell eljárni azokban az esetekben, amikor egyes kémiai osztályokról vagy fizikai-kémiai tulajdonságokról bizonyosodik be, hogy e vizsgálati módszer keretében nem alkalmazhatók.

10. Azok a vizsgálati vegyi anyagok, amelyek ugyanabban a tartományban nyelik el a fényt, mint az MTT-formazán, és azok a vizsgálati vegyi anyagok, amelyek közvetlenül is képesek redukálni az MTT vitális festéket (MTT-formazánná), befolyásolhatják a sejtek életképességének mérését, ennek korrigálása érdekében adaptált kontrollvizsgálatokra van szükség (lásd a 28–34. pontot).
11. Ha a besorolás egyértelmű, három szövetreplikátum vizsgálatából álló egyszeri vizsgálatmenetnek elegendőnek kell lennie az adott vizsgálati vegyi anyag esetében. Határértéken lévő eredmények esetében azonban, ha például az egyes szövetreplikátumok eredményei nem egyeznek és/vagy az átlagos százalékos életképesség $50 \pm 5 \%$, megfontolandó egy második vizsgálatmenet lefolytatása, és ha az első és a második vizsgálatmenet eredményei különbözőek, egy harmadiké is.

A VIZSGÁLAT ELVE

12. A vizsgálati vegyi anyagot egy olyan nem transzformált emberi epidermális keratinsejtekből képződött, háromdimenziós emberi felhámmodellre viszik fel topikálisan, amelyeket úgy tenyésztettek ki, hogy többrétegű, erősen differenciált emberi felhámot (epidermiszt) alkossanak. Ez szervezett bazális, spinózus és granuláris sejtrétegekből, valamint többrétegű szarurétegből (*stratum corneum*) áll, amelyek intercellulárisan lipid kettősréteget tartalmaznak, megtalálhatók a fő lipidcsoportok, amik analógok az *in vivo* megtalálható lipidcsoportokkal.
13. A vegyi anyagok által előidézett bőrirritáció, amely főként bőrpírt és ödémát okoz, egy kaszkád jellegű folyamat eredménye, amelynek első lépéseként a vegyi anyagok áthatolnak a *stratum corneum*on, ahol károsíthatják az alatta lévő, keratinsejtekből és más bőrsejtekből álló rétegeket. A károsodott sejtek vagy gyulladást okozó anyagokat bocsátanak ki, vagy egy gyulladásos kaszkádot indítanak el, amelyek szintén az irhában lévő sejtekre hatnak – főként a vérerek stromális és endoteliális sejtjeire. A megfigyelt bőrpírt és ödémát az endoteliális sejtek tágulása és fokozott permeabilitása idézi elő (29). Mivel az *in vitro* vizsgálati rendszerben nincsenek vérerek, a rekonstruált emberi felhámmodellen alapuló vizsgálati módszerek a kaszkád kiváltó eseményeit, vagyis a sejt-, illetve szövetkárosodást mérik (16), (17), a sejtek életképessége alapján.
14. A rekonstruált emberi felhámmodellekben lévő sejtek életképességét az MTT [3–(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid, tiazolil kék; CAS-száma: 298–93–1] vitális festék enzimatisz úton kék formazán kristállyá történő átalakulása alapján mérik, amelyet a szövetekből történő kivonás után mennyiségileg meghatároznak (31). Az irritatív hatású anyagokat azon képességük alapján azonosítják, hogy a sejtek életképességét meghatározott határérték alá (azaz az ENSZ GHS/CLP-rendelet szerinti 2. kategóriájú anyagok esetében $\leq 50 \%$ alá) csökkentik. A szabályozási kerettől és a vizsgálati módszer alkalmazhatóságától függően a határérték feletti sejtéletképességet eredményező vizsgálati

vegyi anyagok, amelyek a definált küszöbérték feletti értéket mutatnak nem irritálónak tekinthetők (vagyis 50 % feletti érték, nincs kategóriába sorolva).

A JÁRTASSÁG BIZONYÍTÁSA

15. Az e vizsgálati módszer alá tartozó (2. függelékben ismertetett) négy validált vizsgálati modell rutinszerű alkalmazása előtt a laboratóriumoknak az 1. táblázatban felsorolt tíz jártassági tesztanyag használatával igazolniuk kell szakmai jártasságukat. Az olyan helyzetekben, mint amikor a jegyzékben szereplő valamely anyag nem áll rendelkezésre, megfelelő *in vivo* és *in vitro* referenciaadatokkal rendelkező más – például a referencia-vegyianyagok jegyzékében feltüntetett (8) – anyag is használható, amennyiben a kiválasztási kritériumok megegyeznek az 1. táblázatban foglaltakkal. Más jártassági tesztanyag alkalmazását meg kell indokolni.

16. A jártassági vizsgálat részeként ajánlott, hogy a felhasználók a rekonstruált emberi felhámmodell gyártója által meghatározottak szerint, átvétel után ellenőrizzék a szövetek barrierjellemzőit. Ez különösen fontos, ha a szöveteket nagy távolságra/hosszú ideig szállították. Ha egy vizsgálati módszert már sikeresen igazoltak, valamint jártasságot szereztek az alkalmazásában és bizonyították azt, ilyen jellegű ellenőrzéseket nem szükséges rutinszerűen végezni. Ha azonban egy vizsgálati módszert rutinszerűen alkalmaznak, a barrierjellemzőket javasolt továbbra is rendszeres időközönként ellenőrizni.

1. táblázat: Jártassági tesztanyagok¹

Anyag	CAS-szám	<i>In vivo</i> eredmény ²	Halmazállapot	ENSZ GHS szerinti kategória
KATEGÓRIÁBA NEM SOROLT ANYAGOK (ENSZ GHS szerint „nem besorolt”)				
naftalin-ecetsav	86-87-3	0	Szilárd	Kategória nélküli
izopropanol	67-63-0	0,3	Folyadék	Kategória nélküli
metil-sztearát	112-61-8	1	Szilárd	Kategória nélküli
heptil-butirát	5870-93-9	1,7	Folyadék	Kategória nélküli (Opcionális 3. kategória) ³
hexil-szalicilát	6259-76-3	2	Folyadék	Kategória nélküli (Opcionális 3. kategória) ³
KATEGORIZÁLT ANYAGOK (ENSZ GHS szerinti 2. kategória)				
ciklámen-aldehid	103-95-7	2,3	Folyadék	2. kategória
1-brómhexán	111-25-1	2,7	Folyadék	2. kategória
kálium-hidroxid (5 %-os vizes oldat)	1310-58-3	3	Folyadék	2. kategória
1-metil-3-fenil-1-piperazin	5271-27-2	3,3	Szilárd	2. kategória
heptanál	111-71-7	3,4	Folyadék	2. kategória

¹ A jártassági tesztanyagok az anyagok olyan csoportját alkotják, amelyet felhasználtak a validálási vizsgálat során, kiválasztásuk pedig az alábbi kritériumok alapján történt: i. a vegyi anyagok kereskedelmi forgalomban kaphatók; ii. lefedik a Draize-féle irritációs pontértékek teljes tartományát (a nem irritálótól az erősen irritálóig);

iii. jól meghatározott kémiai szerkezettel rendelkeznek; iv. reprezentatívak a validálási folyamat során alkalmazott kémiai funkcionalitás tekintetében; v. több vizsgálat során és több laboratóriumban megismételhető *in vitro* eredményeket biztosítottak; vi. az *in vitro* vizsgálatokban megfeleltek az előrejelzéseknek, és vii. nem rendelkeznek rendkívül toxikus profillal (például karcinogén hatással vagy reprodukció toxicitással), valamint nem kapcsolódnak hozzájuk elrettentő mértékű ártalmatlanítási költségek.

2 Az *in vivo* pontszám összhangban van a B.4. vizsgálati módszerrel (4).

3 E vizsgálati módszer alapján az ENSZ GHS szerinti opcionális 3. kategóriába tartozó anyagok (enyhe irritáló hatású anyagok) (1) „kategória nélküli” anyagoknak minősülnek.

ELJÁRÁS

17. Az alábbiakban ismertetjük a bőrirritáció felmérésére szolgáló RhE vizsgálati módszer összetevőit és eljárásait (az egyes vizsgálati modellekhez kapcsolódó paramétereikről a 3. függelék nyújt további tájékoztatást). A vizsgálati módszernek megfelelő négy modellhez rendelkezésre állnak szabványművelési eljárások (32) (33) (34) (35).

A RHE VIZSGÁLATI MÓDSZER ÖSSZETEVŐI

Általános feltételek

18. Az epitélium felépítéséhez nem transzformált emberi keratinsejteket kell használni. Élő epitélissejtek több rétegének (bazális réteg, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*) kell jelen lennie a funkcionális *stratum corneum* alatt. A *stratum corneum*nak többretegűnek kell lennie, és tartalmaznia kell az elengedhetetlenül szükséges lipidprofil, hogy nagy ellenálló képességgel rendelkező funkcionális barriert képezzen a citotoxikus referencia-vegyianyagok, pl. a nátrium-dodecil-szulfát (SDS) vagy a Triton X-100 gyors áthatolása ellen. A barrierfunkciót bizonyítani kell, ennek értékeléséhez meghatározható az a referencia-vegyianyag koncentráció, amely meghatározott idejű expozíciót követően 50 %-kal csökkenti a szövetek életképességét (IC₅₀), vagy az az expozíciós idő, amely alatt egy adott, állandó koncentrációjú referencia-vegyianyag hatására a sejtek életképessége 50 %-kal csökken (ET₅₀). A rekonstruált emberi felhámmodell folyadékzáró tulajdonságainak meg kell akadályozni, hogy az anyag passzáljon a *stratum corneum* körül az élő szövetbe, amely a bőr expozíciójának rossz modellezését eredményezné. A rekonstruált emberi felhámmodellnek baktérium-, vírus-, mikoplazma- és gombafertőzéstől mentesnek kell lennie.

Funkcionális feltételek

Életképesség

19. Az életképesség számszerű mérése MTT-vizsgálattal történik (31). A rekonstruált ember felhám szövetkonstrukciójának élő sejtjei képesek az MTT vitális festéket kék MTT-formazán kristályokká redukálni, amelyeket azután izopropanol (vagy hasonló oldószer) használatával kivonják a szövetből. Az extraháló oldószer optikai sűrűségének (OD)

eléggé alacsonynak, azaz 0,1 alattinak kell lennie. A kivont MTT-formazán mennyisége meghatározható hagyományos abszorbancia (OD) méréssel vagy HPLC/UPLC spektrofotometriás eljárással (36). A rekonstruált emberi felhámmodell felhasználóinak biztosítaniuk kell, hogy az alkalmazott RhE-modell minden egyes tétele megfeleljen a negatív kontrollra vonatkozóan meghatározott kritériumoknak. A rekonstruált emberi felhámmodell előállítójának/forgalmazójának meg kell határoznia a negatív kontroll során nyert OD-értékek (bőrirritációs vizsgálati módszer körülményei alatti) elfogadhatósági tartományát (alsó és felső határértékeket). A vizsgálati módszerhez kapcsolódó négy validált RhE vizsgálati modell elfogadhatósági tartományát a 2. táblázat tartalmazza. A HPLC/UPLC spektrofotometriás eljárás alkalmazása esetén a negatív kontroll elfogadhatósági feltételeként a 2. táblázatban szereplő negatív kontrollra vonatkozó OD-tartományok szolgálnak. Dokumentálni kell, hogy a negatív kontrollal kezelt szövetek stabilak a tenyésztésben (hasonló életképességi értékeket adnak) a vizsgálat során alkalmazott expozíciós időszak alatt.

2. táblázat: Negatív kontrollra vonatkozó OD-értékek elfogadhatósági tartománya a vizsgálati módszer alá tartozó vizsgálati modellek alkalmazása esetén

	Alsó elfogadási határ	Felső elfogadási határ
EpiSkin™ (SM)	$\geq 0,6$	$\leq 1,5$
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	$\geq 0,8$	$\leq 2,8$
SkinEthic™ RHE	$\geq 0,8$	$\leq 3,0$
LabCyte EPI-MODEL24 SIT	$\geq 0,7$	$\leq 2,5$

Barrierfunkció

20. A *stratum corneum*nak és lipidprofiljának az IC₅₀ vagy ET₅₀ alapján végzett becslések szerint (3. táblázat) megfelelő ellenálló képességgel kell rendelkeznie ahhoz, hogy meg tudja akadályozni a citotoxikus referencia-vegyianyagok (pl. a nátrium-dodecil-szulfát (SDS) vagy a Triton X-100) gyors áthatolását.

Morfológia

21. A rekonstruált emberi felhámmodellen szövettani vizsgálatot kell végezni a humán epidermiszszerű szerkezet (beleértve a többrétegű *stratum corneum*) igazolására.

Reprodukálhatóság

22. A vizsgálati módszer alkalmazása során végzett pozitív és negatív kontrollok eredményeinek igazolniuk kell a módszer időbeni megismételhetőségét.

Minőség-ellenőrzés

23. A rekonstruált emberi felhámmodell csak abban az esetben alkalmazható, ha előállítója/forgalmazója igazolja, hogy az alkalmazott RhE-modell minden egyes tétele megfelel a gyártás utáni felszabadításra vonatkozóan meghatározott feltételeknek, amelyek közül az *életképességre* (19. pont), a *barrierfunkcióra* (20. pont) és a *morfológiára* (21.

pont) vonatkozó kritériumok a leglényegesebbek. Ezeket az adatokat a vizsgálati módszer felhasználóinak rendelkezésére kell bocsátani, hogy ezeket az információkat fel tudják tüntetni a vizsgálati jelentésben. Az IC₅₀ és az ET₅₀ eljárás elfogadhatósági tartományát (alsó és felső határértékét) a rekonstruált emberi felhámmodell előállítójának/forgalmazójának kell meghatározni. Az irritáló hatás besorolásának megbízható előrejelzéseként kizárólag minősített szöveteken végzett vizsgálatok eredményei fogadhatók el. Az e vizsgálati iránymutatáshoz kapcsolódó négy vizsgálati modell elfogadhatósági tartományát a 3. táblázat ismerteti.

3. táblázat: Minőség-ellenőrzés tételenkénti, kibocsátási kritériumai az e vizsgálati módszer alá tartozó vizsgálati modellek alkalmazása esetén

	Alsó elfogadási határ	Felső elfogadási határ
EpiSkin™ (SM) (18 órás kezelés nátrium-dodecilszulfáttal (SDS)) (32)	IC ₅₀ = 1,0 mg/ml	IC ₅₀ = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1 % Triton X-100) (33)	ET ₅₀ = 4,0 óra	ET ₅₀ = 8,7 óra
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (34)	ET ₅₀ = 4,0 óra	ET ₅₀ = 10,0 óra
LabCyte EPI-MODEL24 SIT (18 órás kezelés nátrium-dodecilszulfáttal (SDS)) (35)	IC ₅₀ = 1,4 mg/ml	IC ₅₀ = 4,0 mg/ml

A vizsgálati vegyi anyag és a kontrollként szolgáló vegyi anyagok alkalmazása

24. Minden vizsgálatmenetben valamennyi vizsgálati vegyi anyaghoz és kontrollhoz legalább három szövetreplikátumot kell használni. Folyékony és szilárd anyagok esetében egyaránt megfelelő mennyiségű vizsgálati vegyi anyagot kell alkalmazni, hogy az egyenletesen fedje az epidermisz felszínét, azaz 26 és 83 µl/cm² vagy mg/cm² közötti mennyiséget (lásd a 3. függelék), ugyanakkor el kell kerülni a végtelen dózis alkalmazását. Szilárd anyagok esetében alkalmazásuk előtt az epidermisz felületét ionmentesített vagy desztillált vízzel be kell nedvesíteni, hogy jobb legyen az érintkezés a vizsgálati vegyi anyag és az epidermisz felszíne között. A szilárd anyagokat, amikor csak lehetséges finom por alakban kell vizsgálni. Bizonyos esetekben a szétterítés megkönnyítésére nejlonháló használható (lásd a 3. függelék). Az expozíciós idő lejártaival a vizsgálati vegyi anyagot vizes alapú pufferral vagy 0,9 %-os NaCl-dal óvatosan le kell mosni az epidermisz felületéről. Az alkalmazott RhE vizsgálati modelltől függően az expozíciós időszak 15 és 60 perc között, az inkubációs hőmérséklet pedig 20 és 37 °C között változhat. Az expozíciós időt és hőmérsékletet minden egyes RhE vizsgálati módszerre optimalizálták, hogy azok tükrözzék a vizsgálati modellek különböző belső tulajdonságait (pl. barrierfunkcióját) (lásd a 3. függelék).
25. Minden vizsgálatmenetben párhuzamos negatív és pozitív kontrollokat kell végezni annak bizonyítására, hogy a szövetek életképessége (negatív kontrollok esetében),

barrierfunkciója és az abból fakadó érzékenysége (pozitív kontrollok esetében) egy meghatározott történeti elfogadhatósági tartományba esik. A javasolt pozitív kontrollanyag nátrium-dodecil-szulfát (SDS) 5 %-os vizes oldata. A javasolt negatív kontrollanyag a víz vagy a foszfátpuffert tartalmazó sóoldat (PBS).

A sejtek életképességének mérése

26. A vizsgálati eljárás szerint fontos, hogy az életképességi mérést ne azonnal a vizsgálati vegyi anyaggal végzett expozíció után végezzék, hanem friss tápközegeben, megfelelő hosszúságú inkubációs utókezelési időszakot követően. Ez az időszak egyaránt lehetővé teszi az enyhe irritatív hatás utáni felépülést, valamint az egyértelmű citotoxikus hatások megjelenését. A vizsgálati módszer alapjául szolgáló RhE-alapú vizsgálati modellek közül kettőnek az esetében elvégzett optimalizálási vizsgálat során a 42 órás kezelés utáni inkubációs időszak bizonyult optimálisnak (11) (12) (13) (14) (15).
27. Az MTT-vizsgálat egy szabványosított kvantitatív módszer, amelyet e vizsgálati módszer során a sejtek életképességének méréséhez kell alkalmazni. A vizsgálat kompatibilis a háromdimenziós szövetkonstrukcióban történő használattal. A szövetmintát 3 órára megfelelő koncentrációjú (például 0,3–1 mg/ml) MTT-oldatba kell helyezni. Az MTT-t az élő sejtek kék formazánná alakítják. A kicsapódott kék formazán terméket azután oldószer (pl. izopropanol, savas izopropanol) használatával eltávolítják a szövetből, és az OD-értéket 570 nm-es hullámhosszon (a maximumhoz képest ± 30 nm-es eltérés lehetséges), vagy egy HPLC/UPLC spektrofotométeres eljárás útján (lásd a 34. pontot) (36) meghatározzák a formazán koncentrációját.
28. A vizsgálati vegyi anyag optikai tulajdonságai vagy az MTT-re gyakorolt kémiai hatása folytán (pl. a vegyi anyagok meggátolhatják vagy megfordíthatják a színeképződést, vagy éppen fokozhatják azt) befolyásolhatja a vizsgálatot, ami az életképesség helytelen megbecsüléséhez vezet. Ez következhet be, amikor egy adott vizsgálati vegyi anyagot mosással nem távolítottak el teljesen a szövetből, vagy amikor az anyag áthatol az epidermiszen. Ha a vizsgálati vegyi anyag közvetlen hatást gyakorol az MTT-re (pl. MTT-redukáló), természetes állapotában is színes, vagy a szövetkezelés során elszíneződik, további kontrollokat kell alkalmazni annak kimutatására és korrigálására, hogy a vizsgálati vegyi anyag befolyásolja az életképesség mérésének módját (lásd a 29. és 33. pontot). A vizsgálati módszer alá tartozó négy validált modell szabványműveleti eljárásában megtalálható annak részletes leírása, hogyan kell korrigálni a közvetlen MTT-redukáló hatást és a színezőanyagok okozta zavaró hatást (32) (33) (34) (35).
29. A közvetlen MTT-redukáló hatással rendelkező anyagok azonosítása érdekében minden vizsgálati vegyi anyagot friss MTT-oldatba kell helyezni. Amennyiben a vizsgálati vegyi anyagot tartalmazó MTT-keverék színe kékre/lilára változik, a vizsgálati vegyi anyag feltételezhetően közvetlenül redukálja az MTT-t, ezért kiegészítő funkcionális ellenőrzést kell végezni elhalt rekonstruált emberi felhámshóveteken, független vizsgálat keretében,

hagyományos abszorbancia (OD) mérés, illetve HPLC/UPLC spektrofotometriás eljárás útján. E kiegészítő funkcionális ellenőrzés során elhalt szöveteket használnak, amelyek reziduális metabolikus aktivitással rendelkeznek csupán, ugyanakkor az élő szövetekhez hasonló módon abszorbeálják a vizsgálati vegyi anyagot. Az egyes MTT-redukáló hatású vizsgálati vegyi anyagokkal legalább két elhalt szövetreplikátumot kezelnek, amelyeken elvégzik a teljes vizsgálatot azzal a céllal, hogy egy nem specifikus MTT-redukciót (NSMTT) hozzanak létre (32) (33) (34) (35). A független vizsgálatok/vizsgálatmenetek számától függetlenül vizsgálati vegyi anyagonként elegendő egyetlen NSMTT-kontrollt végezni. Ezután meghatározzák a szövetek valódi életképességét, ehhez az MTT-redukáló anyaggal kezelt élő szövetekkel kapott életképességi arányból levonják az ugyanazon MTT-redukáló anyaggal kezelt elhalt szövetekkel kapott nem specifikus MTT-redukció arányát, amelyet a vizsgálattal párhuzamosan végzett negatív kontrollal korrigálva számítanak ki (NSMTT-arány).

30. Annak érdekében, hogy meghatározható legyen a színes vizsgálati vegyi anyagok, illetve a vízzel vagy izopropanollal való érintkezés következtében elszíneződött vizsgálati vegyi anyagok potenciális zavaró hatása, és dönteni lehessen a kiegészítő kontrollok szükségességéről, el kell végezni a vizsgálati vegyi anyag spektrumelemzését vízben (expozíciós környezet) és/vagy izopropanolban (extraháló oldat). Amennyiben vízben és/vagy izopropanolban a vizsgálati vegyi anyag 570 ± 30 nm-es tartományban nyeli el a fényt, további színezőanyag-kontrollokra van szükség, illetve alternatív megoldásként HPLC/UPLC spektrofotometriás eljárást lehet végezni, amelynek alkalmazásakor ezek a kontrollok nem szükségesek (lásd a 33. és 34. pontot). Hagyományos abszorbancia (OD) mérés esetén az egyes zavaró hatású színes vizsgálati vegyi anyagokkal legalább két élő szövetreplikátumot kezelnek, amelyeken elvégzik a teljes vizsgálatot, de az MTT inkubációs fázis során MTT-mentes oldatba helyezik azokat, hogy létrehozzanak egy nem specifikus elszíneződés ($NSC_{\text{élő}}$) kontrollt. Az élő szövetekre jellemző biológiai változékonyságból kifolyólag az $NSC_{\text{élő}}$ kontrollt a színes vizsgálati vegyi anyag vizsgálatával párhuzamosan kell elvégezni, több vizsgálat esetén pedig (minden egyes vizsgálatmenetnél) minden vizsgálattal egyidejűleg független $NSC_{\text{élő}}$ kontrollt kell végezni. Ezután meghatározzák a szövetek valódi életképességét, ehhez a zavaró hatású vizsgálati vegyi anyaggal kezelt és MTT-oldatban inkubált élő szövetek életképességi arányából levonják a zavaró hatású vizsgálati vegyi anyagnak kitett és MTT nélküli közegben inkubált élő szövetek nem specifikus elszíneződésének arányát, amelyet a korrigálandó vizsgálattal párhuzamosan vizsgáltak ($NSC_{\text{élő}}$ arány).
31. Azon hagyományos abszorbancia (OD) méréssel értékelt vizsgálati vegyi anyagok esetében, amelyek egyaránt okoznak közvetlen MTT-redukciót (lásd a 29. pontot) és színinterferenciát (lásd a 30. pontot), az előző pontokban ismertetett NSMTT és $NSC_{\text{élő}}$ kontrollok mellett szükség van egy harmadik fajta kontrollvizsgálatra is. Általában ez a helyzet áll elő az MTT-vizsgálatot zavaró sötét színű (pl. kék, lila, fekete) vizsgálati vegyi

anyagoknál, mivel saját színük akadályozza, hogy a 29. pontban leírtak szerint értékelni lehessen közvetlen MTT-redukáló hatásukat. Ezek a vizsgálati vegyi anyagok egyaránt kötődhetnek élő és elhalt szövetekhez, ezért az NSMTT-kontroll nem csupán a vizsgálati vegyi anyag által előidézett közvetlen MTT-redukáló hatást korrigálja, hanem az anyag elhalt szövetekhez való kötődéséből eredő színinterferenciát is. Ez viszont a színinterferencia kétszeri korrekciójához vezethet, mivel az NSCélő kontroll már korrigálja a vizsgálati vegyi anyag élő szövetekhez való kötődéséből fakadó színinterferenciát. A színinterferencia esetleges kétszeri korrekciójának kiküszöbölése érdekében szükség van egy harmadik kontrollra, amely az elhalt szövetek esetében méri a nem specifikus elszíneződést (NSC_{elhalt}). E kiegészítő kontroll során a vizsgálati vegyi anyaggal legalább két elhalt szövetreplikátumot kezelnek, amelyeken elvégzik a teljes vizsgálatot, de az MTT inkubációs fázis során MTT-mentes oldatba helyezik azokat. A független vizsgálatok/vizsgálatmenetek számától függetlenül vizsgálati vegyi anyagonként elegendő egyetlen NSC_{elhalt} kontroll, azt azonban az NSMTT-kontrollal egyidejűleg, és ha megoldható, ugyanazon szövettételen kell elvégezni. Ezután meghatározzák a szövetek valódi életképességét, ehhez a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt élő szövetekkel kapott életképességi arányból levonják az NSMTT-arányt és az NSCélő arányát, majd hozzáadják a zavaró hatású vizsgálati vegyi anyaggal kezelt és MTT nélküli közegben inkubált elhalt szövetekkel kapott nem specifikus elszíneződési arányt, amelyet a korrigálandó vizsgálatl párhuzamosan végzett negatív kontrollhoz viszonyítva számítanak ki (NSC_{elhalt} arány).

32. Fontos megjegyezni, hogy a nem specifikus MTT-redukció és a nem specifikus színinterferencia a spektrofotométer linearitási tartománya fölé növelheti a szövetkivonat leolvasott értékeit. Ebből kifolyólag minden laboratóriumnak kereskedelmi forgalomban kapható MTT-formazán (CAS-száma: 57360-69-7) segítségével meg kell határoznia spektrofotométerének linearitási tartományát, mielőtt megkezdene a vizsgálati vegyi anyagok szabályozási célú vizsgálatát. A spektrofotométert használó hagyományos abszorbancia (OD) mérés alkalmas a közvetlen MTT-redukáló hatással bíró és színinterferenciát okozó vizsgálati vegyi anyagok értékelésére, amikor a szövetkivonatok vizsgálati vegyi anyaggal kapott, közvetlen MTT-redukció és/vagy színinterferencia tekintetében nem korrigált OD értékei a spektrofotométer linearitási tartományán belül vannak, illetve amikor a vizsgálati vegyi anyaggal kapott nem korrigált életképességi arány már $\leq 50\%$. Mindazonáltal a negatív kontroll 50 %-ával egyező vagy annál nagyobb NSMTT-arányt és/vagy NSC_{élő} arányt előidéző vizsgálati vegyi anyagok eredményei óvatosan értelmezendők, mivel ezt a határértéket használják a kategorizált és nem kategorizált vegyi anyagok megkülönböztetésére (lásd a 36. pontot).
33. Azon színes vizsgálati vegyi anyagok esetében, amelyek nagy mértékben befolyásolják az MTT-vizsgálatot, és ezért hagyományos abszorbancia (OD) méréssel nem vizsgálhatók, az MTT-formazán HPLC/UPLC spektrofotometriás eljárással történő meghatározását lehet alkalmazni (lásd a 34. pontot) (36). A HPLC/UPLC spektrofotometriás rendszer lehetővé

teszi, hogy az MTT-formazánt mennyiségi meghatározása előtt elkülönítsék a vizsgálati vegyi anyagtól (36). Ezért HPLC/UPLC spektrofotometriás módszer használata esetén a vizsgálati vegyi anyagtól függetlenül soha nincs szükség NSC_{élő} és NSC_{elhalt} kontrollra. Az NSMTT-kontroll ugyanakkor alkalmazandó, ha a vizsgálati vegyi anyag gyaníthatóan közvetlenül redukálja az MTT-t, vagy a színe miatt közvetlen MTT-redukáló hatását nem lehet felmérni (a 29. pontban ismertetett módon). Amennyiben HPLC/UPLC spektrofotometriásan méri az MTT-formazánt, a szövetek életképességi aránya a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt élő szövetekkel kapott MTT-formazán csúcsterület és a párhuzamos negatív kontrollal kapott MTT-formazán csúcsterület aránya lesz. A közvetlen MTT-redukáló hatással rendelkező vizsgálati vegyi anyagok esetében a szövetek valódi életképességét úgy számítják ki, hogy a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt élő szövetekkel kapott életképességi arányból kivonják az NSMTT-arányt. Végül megjegyzendő, hogy azok a közvetlen MTT-redukáló hatású, esetleg színinterferenciát is okozó vegyi anyagok, amelyek a kezelést követően visszamaradnak a szövetben és olyan erős MTT-redukáló hatással bírnak, hogy a vizsgált szövetkivonatok OD-értéke (hagyományos OD mérés esetén), illetve csúcsterülete (HPLC/UPLC spektrofotometriás mérés esetén) kívül esik a spektrofotométer linearitási tartományán, nem értékelhetők, bár ilyen csak igen ritka esetben fordul elő.

34. A HPLC/UPLC spektrofotometria bármely típusú vizsgálati vegyi anyagnál (színes, nem színes, MTT-redukáló vagy nem MTT redukáló hatású) alkalmazható az MTT-formazán mérésére (36). A HPLC/UPLC spektrofotometriás rendszerek sokfélesége miatt szükség van arra, hogy a szövetkivonatok MTT-formazán-tartalmának meghatározása előtt igazolják a HPLC/UPLC spektrofotometriás rendszer minősítését azzal, hogy eleget tesznek az Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerfelügyelete (FDA) által az iparág számára kiadott, bioanalitikus módszerek validálására vonatkozó iránymutatásban (36) (37) szereplő standard minősítési paramétereken alapuló elfogadhatósági kritériumoknak. E kulcsfontosságú paraméterekről és elfogadhatósági kritériumokról a 4. függelék nyújt tájékoztatást. Amint eleget tettek a 4. függelékben meghatározott elfogadhatósági kritériumoknak, a HPLC/UPLC spektrofotometriás rendszer minősítettnek tekintendő, és alkalmas arra, hogy az itt leírt vizsgálati módszerben bemutatott kísérleti feltételek mellett elvégezze az MTT-formazán mérését.

Elfogadhatósági kritériumok

35. Minden olyan vizsgálati módszer esetében, amelynek során érvényes RhE-modell tételeket alkalmaznak (lásd a 23. pontot), a negatív kontrollal kezelt szöveteknek olyan OD-értéket kell mutatniuk, amely tükrözi a szöveteknek a szállítást és az átvételi lépéseket, valamint az összes protokollfolyamatot követő minőségét. A kontrollok OD-értékei nem lehetnek alacsonyabbak a korábbi adatok alapján megállapított határértékeknél. Hasonlóképpen a pozitív kontrollanyaggal, vagyis nátrium-dodecil-szulfát (SDS) 5 %-os vizes oldatával kezelt szöveteknek tükrözniük kell azon képességüket, hogy a vizsgálati módszer feltételei

mellett reagálnak az irritáló vegyi anyagokra (lásd a 3. függelék, további információkért pedig az e vizsgálati iránymutatáshoz tartozó négy vizsgálati modell szabványműveleti eljárását (32) (33) (34) (35)). A szövetreplikátumok közötti, ezzel kapcsolatos megfelelő eltérés, vagyis a szórás mértékének az alkalmazott vizsgálati modellhez tartozó elfogadási határértéken belül kell maradnia (lásd a 3. függelék).

Az eredmények értelmezése és az előrejelzési modell

36. Az egyes vizsgálati vegyi anyagokra vonatkozóan kapott OD-értékek felhasználhatók a negatív kontrollra normalizált életképesség százalékos arányának kiszámításához, amely 100%-ra vonatkozik. HPLC/UPLC spektrofotometria alkalmazása esetén a szövetek életképességi aránya a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt élő szövetekkel kapott MTT-formazán csúcsterület és a párhuzamos negatív kontrollal kapott MTT-formazán csúcsterület arányaként kerül meghatározásra. Az irritáló anyagokat a kategória nélküli vizsgálati vegyi anyagoktól megkülönböztető százalékos sejtleletképesség határértékét, valamint az eredmények értékeléséhez és az irritáló hatású vegyi anyagok meghatározásához alkalmazott statisztikai eljárás(oka)t egyértelműen meg kell határozni, dokumentálni kell, és megfelelőségüket igazolni kell (további információkért lásd a vizsgálati modellek szabványműveleti eljárását). Az irritáló hatás előrejelzésére alkalmazott határértékek az alábbiak:

- A vizsgálati vegyi anyagot szükséges az ENSZ GHS/CLP-rendelet szerint osztályozni és címkézni (2. kategória vagy 1. kategória), ha a szövet expozíciót és kezelés utáni inkubációt követően meghatározott átlagos életképességi aránya kisebb vagy egyenlő ($\leq$) 50 %-kal. Mivel az e vizsgálati módszer alá tartozó RhE vizsgálati modellek nem tudnak különbséget tenni az ENSZ GHS/CLP-rendelet szerinti 1. és 2. kategória között, a vizsgálati vegyi anyag végleges osztályba sorolásához a bőrkorróziós hatására vonatkozó további információkra van szükség [lásd még az OECD IATA-iránymutatását (3)]. Amennyiben a vizsgálati vegyi anyagról (a B.40., B.40bis. vagy B.65. vizsgálati módszer alapján) kiderül, hogy nem korrozív hatású, továbbá az expozíciót és kezelés utáni inkubációt követően a kezelt szövet életképessége kisebb vagy egyenlő ($\leq$) 50 %-kal, az ENSZ GHS/CLP-rendelet 2. kategóriája szerint az adott anyag bőrirritáló hatásúnak tekintendő.
- Ha az expozíciót és kezelés utáni inkubációt követően a kezelt szövet életképessége nagyobb ($>$) mint 50 %, a tagállami szabályozási kerettől függően a vizsgálati vegyi anyag az ENSZ GHS/CLP-rendelet „Kategória nélküli” besorolása szerint bőrirritációt nem okozónak tekinthető.

ADATOK ÉS JELENTÉS

Adatok

37. Mindegyik vizsgálatmenetre vonatkozóan táblázatos jelentést kell készíteni az egyes szövetreplikátumok adatairól (például OD-értékek és számított százalékos sejtelétképességi adatok az egyes vizsgálati vegyi anyagok esetében, a besorolást is beleértve), amelyben szerepelnie kell a megismételt kísérletek adatainak is, ha voltak ilyenek. Továbbá mindegyik vizsgálatmenet esetében meg kell adni az átlagot $\pm$ szórást. Az MTT reagenssel és a színes vizsgálati vegyi anyagokkal megfigyelt kölcsönhatásokat a jelentésben minden vizsgálati vegyi anyag esetében fel kell tüntetni.

Vizsgálati jelentés

38. A vizsgálati jelentésnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálati vegyi anyag és kontrollként szolgáló vegyi anyagok:

- Egy összetevőből álló anyag: kémiai azonosítás, például IUPAC- vagy CAS-névvel, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet alapján, tisztaság, adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb. alapján;
- több összetevőből álló anyagok, UVCB-k és keverékek: amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosítója (lásd fent), mennyiségi előfordulása és releváns fizikai-kémiai tulajdonságai jellemzik;
- fizikai megjelenés, vízdékonyság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok;
- eredet, gyártási szám, ha ismert;
- a vizsgálati vegyi anyag/kontrollként szolgáló vegyi anyagok vizsgálatot megelőző kezelése, ha történt ilyen (például melegítés, porítás);
- a vizsgálati vegyi anyag stabilitása, felhasználási határideje vagy ismételt elemzésének napja, ha ismert;
- tárolási feltételek.

Az alkalmazott RhE-modell és protokoll (valamint használatuk indokolása, amennyiben szükséges)

Vizsgálati körülmények:

- az alkalmazott RhE-modell (és gyártási szám);
- az MTT-formazán mennyiségi meghatározására használt mérőeszköz (*pl.* spektrofotométer) kalibrálási adatai, a hullámhossz és (adott esetben) a sáv szélesség, valamint a mérőeszköz linearitási tartománya; az MTT-formazán számszerű mérésére alkalmazott módszer leírása;

- a HPLC/UPLC-spektrofotometriás rendszer minősítésének leírása, ha releváns; az alkalmazott specifikus RhE-modellre vonatkozó teljes körű alátámasztó adatok, köztük a modell teljesítménye. Ennek többek között az alábbiakat kell magában foglalnia:
 - i. életképesség;
 - ii. barrierfunkció;
 - iii. morfológia;
 - iv. reprodukálhatóság és előre jelezhetőség;
 - v. a modell minőség-ellenőrzése;
- hivatkozás a modellel kapott korábbi adatokra. Ennek többek között magában kell foglalnia a minőség-ellenőrzési adatok elfogadhatóságát tekintettel a korábbi tételadatokra;
- a vizsgálati módszer végrehajtásában való jártasság bizonyítása a módszer rutinszerű használata előtt, a jártassági tesztanyagok vizsgálata révén.

Vizsgálati eljárás:

- az alkalmazott vizsgálati eljárás részletes leírása (ideértve az expozíciós időszak utáni öblítési eljárásokat); a vizsgálati vegyi anyag és a kontrollanyagok dózisa;
- az expozíciós és az expozíció utáni inkubációs időszak hossza és az alkalmazott hőmérséklet;
- a közvetlen MTT-redukáló hatással rendelkező és/vagy színváltozást okozó vizsgálati vegyi anyagokhoz alkalmazott kontrollok feltüntetése, amennyiben releváns;
- vizsgálati vegyi anyagonként és kontrollonként (pozitív kontroll, negatív kontroll, NSMTT, NSC_{élő} és NSC_{elhalt}, ha releváns) használt szövetreplikátumok;
- a használt RhE-modell alapján alkalmazott döntési kritériumok/előrejelzési modell leírása;
- a vizsgálati eljárás (többek között a mosási eljárások) bármilyen változtatásának leírása.

A vizsgálatmenet és a vizsgálat elfogadásának kritériumai:

- a pozitív és negatív kontrollok átlagértéke és elfogadhatósági tartománya a korábbi adatokon alapul; a pozitív és negatív kontrollokban használt szövetreplikátumok közötti elfogadható mértékű variabilitás;
- a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt szövetreplikátumok közötti elfogadható mértékű variabilitás.

Eredmények:

- az egyes vizsgálati vegyi anyagokra, vizsgálatmenetekre és szövetmérésekre vonatkozó adatok, többek között az OD-érték vagy az MTT-formazán csúcsterület, a szövetek

százalékos életképessége, a szövetek átlagos százalékos életképessége és a szórások táblázatba foglalása;

- amennyiben alkalmazandó, a közvetlen MTT-redukáló hatású és/vagy elszíneződést okozó vizsgálati vegyi anyagokhoz használt kontrollok eredményei, ideértve az OD-értéket vagy az MTT-formazán csúcsterületet, az NSMTT, az NSC_{elő} és az NSC_{elhalt} arányát, a szórást és a szövetek helyes végső százalékos életképességét;
- a meghatározott vizsgálatmenet és a vizsgálat elfogadhatósági kritériumai tekintetében a vizsgálati vegyi anyaggal/anyagokkal és a kontrollanyagokkal kapott eredmények;
- a megfigyelt egyéb hatások leírása.
- az alkalmazott előrejelzési modellel/döntési kritériumokkal összhangban kialakított osztályozás.

Az eredmények értékelése

Következtetések

SZAKIRODALOM

- (1) Egyesült Nemzetek Szervezete (ENSZ) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Elérhető a következő címen:
http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.
- (2) EURL-ECVAM (2009). Statement on the “Performance Under UN GHS of Three *In vitro* Assays for Skin Irritation Testing and the Adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM Skin Irritation Performance Standards”, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 9 April 2009. Elérhető a következő címen:
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), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.
- (4) E melléklet B.4., Akut bőrirritáció/bőrkorrózió fejezete.
- (5) E melléklet B.40., *In vitro* bőrkorrózió: transzkután elektromos rezisztencia (TER) vizsgálat című fejezete;
- (6) E melléklet B.40bis., *In vitro* bőrkorrózió: rekonstruált emberi felhámmodellen végzett vizsgálati módszer című fejezet.
- (7) E melléklet B.65., *In vitro* Membrán barrier vizsgálati módszer fejezete.
- (8) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In vitro* Reconstructed Human *Epidermis* (RhE) Test Methods for Skin Irritation in Relation to TG 439. Environment, health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 220). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (9) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34) Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.
- (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, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27 April 2007. Elérhető a következő címen: 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. *Megjegyzés Ezek a két vizsgálati módszer validálásához használt, eredeti teljesítményszabványok. Ezek a teljesítményszabványok már használhatók, mert rendelkezésre áll frissített változatuk (8).*
- (22) EURL-ECVAM. (2008). Statement on the Scientific Validity of *In vitro* Tests for Skin Irritation Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC29), 5 November 2008. https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication/ESAC_Statement_SkinEthic-EpiDerm-FINAL-0812-01.pdf
- (23) OECD (2010). Explanatory Background Document to the OECD Draft Test Guideline on *In vitro* Skin Irritation Testing. Environment, Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, (No 137), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (24) Katoh, M., Hamajima, F., Ogasawara, T. 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), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.
- (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), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.
- (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. Manuscript in preparation.
 - (37) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. 2001. május. Elérhető a következő címen: [<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>].
 - (38) Harvell, J.D., Lamminstausta, K., and Maibach, H.I. (1995). Irritant Contact Dermatitis, in: Practical Contact Dermatitis, pp 7-18, (Ed. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, New York.

- (39) EURL-ECVAM (2009). Performance Standards for *In vitro* Skin Irritation Test Methods Based on Reconstructed Human Epidermis (RhE). *Megjegyzés Ez az ECVAM teljesítményszabványainak aktuális változata, amelyet az ENSZ GHS végrehajtására való tekintettel 2009-ben frissítettek. Ezek a teljesítményszabványok már nem használhatók, mert rendelkezésre áll az e vizsgálati iránymutatáshoz kapcsolódó, frissített változatuk (8).*
- (40) EURL-ECVAM. (2009). ESAC Statement on the Performance Standards (PS) for *In vitro* Skin Irritation Testing Using Reconstructed Human Epidermis, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 8 July 2009.
- (41) EC (2001). Commission Directive 2001/59/EC of 6 August 2001 Adapting to Technical Progress for the 28th Time Council Directive 67/548/EEC on the Approximation of Laws, Regulations and Administrative Provisions Relating to the Classification, Packaging and Labelling of Dangerous Substances, Official Journal of the European Union L225, 1-333.

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Pontosság: a vizsgálati módszerrel kapott eredmények és az elfogadott referenciaértékek közötti egyezés mértéke. A vizsgálati módszer teljesítményének mutatója, valamint a relevanciájának egyik megítélési szempontja. E kifejezést gyakran használják az »egyezés« megfelelőjeként, amely egy adott vizsgálati módszer alkalmazásakor az azonos eredmények arányát fejezi ki (9).

Sejtek életképessége: A sejtpopulációk teljes aktivitását mérő paraméter (például a celluláris mitokondriális dehidrogenázoknak az MTT ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid, tiazolil kék] vitális festéket redukáló képessége), amely – a mért végponttól és az alkalmazott vizsgálati tervtől függően – korrelációt mutat az élő sejtek teljes számával és/vagy életképességével.

Vegyí anyag: anyag vagy keverék.

Egyezés: a kategorikus eredményt adó vizsgálati modellek teljesítményének mutatója, valamint a relevanciájának egyik megítélési szempontja. A kifejezést esetenként használják a pontosság megfelelőjeként, és úgy határozzák meg, mint a helyesen pozitívként vagy negatívként besorolt összes vizsgálati vegyi anyag aránya. Az egyezés nagy mértékben függ a vizsgálat tárgyát képező vizsgálati vegyi anyag típusaiban előforduló pozitív eredmények gyakoriságától (9).

ET₅₀: a referencia-vegyianyag meghatározott, állandó koncentrációban történő alkalmazása esetén a sejt életképességének 50 %-kal való csökkentéséhez szükséges expozíciós idő meghatározásával becsülhető meg, lásd még az IC₅₀-et.

GHS (a vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének az ENSZ által globálisan harmonizált rendszere): a vegyi anyagoknak (anyagoknak és keverékeknek) a fizikai, egészségi és környezeti veszélyek szabványosított típusai és szintjei szerinti osztályokba sorolására és megfelelő kommunikációs elemekkel (például piktogramokkal, figyelmeztetésekkel, figyelmeztető mondatokkal, óvintézkedésekre vonatkozó mondatokkal és biztonsági adatlapokkal) történő jelölésére javaslatokat megfogalmazó rendszer, amelynek célja, hogy az emberek (köztük a munkáltatók, a munkavállalók, a fuvarozók, a fogyasztók és a sürgősségi segítségnyújtók) és a környezet megóvása érdekében egységesítse a vegyi anyagok káros hatásaira vonatkozó információk továbbítását (1).

HPLC: nagy teljesítményű folyadékkromatográfia.

IATA: integrált vizsgálati és értékelési megközelítés.

IC₅₀: annak a koncentrációnak a meghatározásával becsülhető meg, amelynél egy adott referencia-vegyianyag egy meghatározott expozíciós idő elteltével 50%-kal (IC₅₀) csökkenti a szövetek életképességét; lásd még az ET₅₀-et.

Végtelen dózis: az epidermiszen alkalmazott vizsgálati vegyi anyag azon mennyisége, amely meghaladja az epidermisz felszínének teljes és egyenletes befedéséhez szükséges mennyiséget.

Keverék: két vagy több anyagot tartalmazó elegy vagy oldat.

Egy összetevőből álló anyag: olyan, a mennyiségi összetétele alapján meghatározott anyag, amelyben az egyik fő összetevő legalább 80 tömegszázalékban van jelen.

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid; tiazolil kék tetrazólium-bromid.

Több összetevőből álló anyag: olyan, a mennyiségi összetétele alapján meghatározott anyag, amelyben egynél több fő összetevő legalább 10 tömegszázalékban, de 80 tömegszázalékot nem meghaladó koncentrációban van jelen. A több összetevőből álló anyag gyártási folyamat eredménye. A keverék és a több összetevőből álló anyag között az a különbség, hogy a keverék két vagy több anyag összekeverésével, kémiai reakció nélkül jön létre. A több összetevőből álló anyag kémiai reakció eredménye.

NSC_{elhalt}: elhalt szöveteken megfigyelt, nem specifikus elszíneződés.

NSC: élő szöveteken megfigyelt, nem specifikus elszíneződés.

NSMTT: nem specifikus MTT-redukció.

Teljesítményszabványok: hitelesített referenciamódszeren alapuló szabványok, amelyek a javasolt, végrehajtás és funkcionalitás szempontjából hasonló vizsgálati módszer összehasonlíthatósági értékelésének alapjául szolgálnak. Ide tartoznak: i. a vizsgálati módszer alapvető összetevői; ii. a referencia-vegyianyagok minimális jegyzéke, amely a validált vizsgálati módszer által nyújtott teljesítmény elfogadhatóságának igazolására használt vegyi anyagokból került összeállításra; és iii. a validált vizsgálati módszer eredményei alapján meghatározott, hasonló megbízhatósági és pontossági szintek, amelyeket a javasolt vizsgálati módszernek teljesítenie kell a minimális jegyzék referencia-vegyianyagainak felhasználásával történő értékelése során (9).

Pozitív kontroll: a vizsgálati rendszer valamennyi alkotóelemét tartalmazó, ismert pozitív hatást kiváltó vegyi anyaggal kezelt replikátum. Annak biztosítása érdekében, hogy a pozitív kontrollban jelentkező hatás időbeli változását fel lehessen mérni, a pozitív hatás nem lehet túlságosan erőteljes.

Relevancia: a vizsgálat és a vizsgált hatás kapcsolatát adja meg, valamint azt, hogy van-e a vizsgálatnak az adott cél szempontjából értelme és haszna. Azt tükrözi, hogy a vizsgálat mennyire pontosan méri vagy jelzi előre a vizsgált biológiai hatást. A relevancia meghatározása során a vizsgálati módszer pontosságát (az eredmények egyezését) figyelembe kell venni (9).

Megbízhatóság: a vizsgálati módszer laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti időbeli reprodukálhatóságának mértéke ugyanazon protokoll alkalmazása mellett. A

laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti reprodukálhatóság kiszámításával állapítják meg (9).

Helyettesítő vizsgálat: olyan vizsgálat, amelynek célja, hogy a veszélyek azonosítására és/vagy kockázatértékelésre rutinszerűen alkalmazott és elfogadott vizsgálatot helyettesítse, és amelyről megállapították, hogy az elfogadott vizsgálattal összehasonlítva, az összes lehetséges vizsgálati helyzetben és vegyi anyag esetében a humán vagy állati egészség egyenértékű vagy jobb védelmét biztosítja (9).

Vizsgálatmenet: egy vizsgálatmenet során egy vagy több vizsgálati vegyi anyagot vizsgálnak egy párhuzamos negatív kontrollal és egy pozitív kontrollal.

Érzékenység: az összes olyan pozitív/aktív vizsgálati vegyi anyag aránya, amelyet a vizsgálat helyesen sorolt be. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (9).

In vivo bőrirritáció: a vizsgálati vegyi anyag alkalmazását követően 4 órán belül megjelenő, visszafordítható bőrkárosodás. A bőrirritáció az érintett bőrszövet helyileg jelentkező reakció, amely röviddel a stimuláció után megjelenik (38). Kiváltó oka a bőrszövet természetes (nem specifikus) immunrendszerét érintő, helyi gyulladásos reakció. Fő jellemzője, hogy gyulladásos reakciókkal járó visszafordítható folyamat a gyulladásos folyamatokra jellemző legtöbb klinikai tünettől együtt (bőrpír, ödéma, viszketés és fájdalom).

Specificitás: a vizsgálat elvégzésével helyesen besorolt összes negatív/inaktív vizsgálati vegyi anyag aránya. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (9).

Anyag: olyan természetes állapotban előforduló vagy gyártási eljárásból származó kémiai elem és vegyületei, amely a stabilitásának megőrzéséhez szükséges adalékanyagot és az alkalmazott eljárásból származó szennyező anyagokat is tartalmazhat, de nem tartalmaz olyan oldószert, amely az anyag stabilitásának befolyásolása vagy összetételének megváltoztatása nélkül elkülöníthető.

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

UPLC: ultranagy teljesítményű folyadékkromatográfia.

UVCB: ismeretlen vagy változó összetételű anyagok, komplex reakciótermékek vagy biológiai anyagok.

2. függelék

A VIZSGÁLATI MÓDSZER ALÁ TARTOZÓ VIZSGÁLATI MODELLEK

Szám	A vizsgálati modell neve	Validálási vizsgálat típusa	Hivatkozások
1	EpiSkin™	Teljes körű prospektív validálási vizsgálat (2003–2007). E modell alkotóelemeit felhasználták arra, hogy meghatározzák a vizsgálati módszernek az ECVAM eredeti és frissített teljesítményszabványaiba felvett alapvető összetevőit (39) (40) (21)*. Ezenfelül nagyrészt a módszer nem kategorizált és kategorizált anyagok megkülönböztetésével kapcsolatos adatai szolgáltatták az alapot az eredeti teljesítményszabvány* specificitási és érzékenységi értékeinek meghatározásához.	(2) (10) (11) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (23) (32) (39) (40)
2	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	EpiDerm™ (eredeti): Az 1. számú modellel együtt ez a modell is részt vett a 2003 és 2007 között végzett teljes körű előrettekintő validálásban. E modell alkotóelemeit felhasználták arra, hogy meghatározzák a vizsgálati módszernek az ECVAM eredeti és frissített teljesítményszabványaiba felvett alapvető összetevőit (39) (40) (21)*. EpiDerm™ SIT (EPI-200): Az eredeti EpiDerm™ módosított változatát az ECVAM eredeti teljesítményszabványai (21) alapján validálták 2008-ban*	(2) (10) (12) (13) (15) (16) (17) (18) (20) (21) (23) (33) (39) (40) (2) (21) (22) (23) (33)
3	SkinEthic™ RHE	Validálási vizsgálatát az ECVAM eredeti teljesítményszabványai (21) alapján végezték el 2008-ban*	(2) (21) (22) (23) (31)
4	LabCyte EPI-MODEL24 SIT	A validálási vizsgálatot (2011–2012) az OECD 439. vizsgálati iránymutatásában (8) szereplő teljesítményszabványok szerint végezték el, amelyek az ECVAM frissített teljesítményszabványain* alapulnak (39) (40).	(24) (25) (26) (27) (28) (35) (39) (40) és e vizsgálati iránymutatás teljesítményszabványai (8)*

*) Az ECVAM eredeti teljesítményszabványait (21) 2007-ben dolgozták ki. az előrettekintő validálási vizsgálat (16) lezárását követően, amely az 1. és 2. számú vizsgálati modell teljesítményét értékelte az EU veszélyes anyagokról szóló irányelvnek (41) 28. módosításában ismertetett osztályozási rendszer szerint. 2008-ban megjelent az ENSZ által készített GHS (1) és az EU CLP-rendelete, amelyek a nem kategorizált anyagokat a kategorizált anyagoktól megkülönböztető határértéket az *in vivo* 2,0-ás pontszámról 2,3-ra módosították. Annak érdekében, hogy az ECVAM teljesítményszabványait e megváltozott szabályozási követelményhez igazítsák, 2009-ben frissítették pontossági értékeit és a referencia-vegyianyagok jegyzékét (2) (39) (40). Az eredeti teljesítményszabványokhoz hasonlóan frissített változatuk is többnyire az 1. és 2. számú modell adataira támaszkodik (16), ugyanakkor kiegészítette azokat a 3. számú modell referencia-vegyianyagokra vonatkozó adataival. 2010-ben az ECVAM frissített teljesítményszabványait írták elő az e vizsgálati iránymutatás

keretében használandó teljesítményszabványoknak (8). E vizsgálati módszer alkalmazásában az EpiSkin™ számít validált referenciamódszernek, mivel ezt a modellt használták a teljesítményszabványok összes kritériumának kidolgozásához. A validálási vizsgálatok részletes adatait, a vizsgálatok során nyert adatok gyűjteményét, valamint a teljesítményszabványok ENSZ GHS/CLP-rendelet elfogadásából fakadóan szükségessé vált módosításának hátterét az OECD megfelelő, 439. vizsgálati iránymutatásához mellékelt, ECVAM/BfR által kiadott magyarázó háttérdokumentum (23) tartalmazza.

SIT: Skin Irritation Test (bőrirritációs vizsgálat)

RHE: Reconstructed Human Epidermis (rekonstruált emberi felhám)

3. függelék

A VIZSGÁLATI MÓDSZERHEZ TARTOZÓ VIZSGÁLATI MODELLEKRE JELLEMZŐ PROTOKOLLPARAMÉTEREK

A rekonstruált emberi felhámmodellek protokollja sok hasonlóságot mutat, például az expozíció utáni inkubációs időszak hossza mindegyiknél 42 óra (32) (33) (34) (35). Az eltérések jórészt a vizsgálati modellek különböző barrierfunkcióihoz kapcsolódó három paraméternél jelentkeznek, ezek a paraméterek a következők: A) preinkubációs idő és a közeg mennyisége, B) a vizsgálati vegyi anyagok alkalmazása és C) a közeg posztinkubációs mennyisége.

	EpiSkin™ (SM)	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	SkinEthic RHE™	LabCyte EPI-MODEL24 SIT
A) Preinkubáció				
Inkubációs idő	18–24 óra	18–24 óra	< 2 óra	15-30 óra
Közeg mennyisége	2 ml	0,9ml	0,3 vagy 1 ml	0,5ml
B) A vizsgálati vegyi anyag alkalmazása				
Folyadékok esetén	10 µl (26 µl/cm²)	30 µl (47 µl/cm²)	16 µl (32 µl/cm²)	25 µl (83 µl/cm²)
Szilárd anyagok esetén	10 mg (26 mg/cm²) + DV (5 µl)	25 mg (39 mg/cm²) + DPBS (25 µl)	16mg (32 mg/cm²) + DV (10 µl)	25 mg (83 mg/cm²) + DV (25 µl)
Nejlonháló használata	Nem használt	Szükség esetén	Használt	Nem használt
Teljes alkalmazási idő	15 perc	60 perc	42 perc	15 perc
Alkalmazási hőmérséklet	Szobahőm.	a) Szobahőm. 25 percig b) 37 °C-on 35 percig	Szobahőm.	Szobahőm.
C) A közeg posztinkubációs mennyisége				
Közeg mennyisége	2 ml	0,9 ml x 2	2 ml	1 ml
D) Maximális elfogadható eltérés				
A szövetpéldányok közötti szórás	Szórás≤18	Szórás≤18	Szórás≤18	Szórás≤18

SzH: szobahőmérséklet

DV: desztillált víz

DPBS: Dulbecco-féle foszfátpuffert tartalmazó sóoldat

4. függelék

A REKONSTRUÁLT EMBERI FELHÁMSZÖVETBŐL KIVONT MTT-FORMAZÁN MÉRÉSÉRE HASZNÁLT HPLC/UPLC SPETROFOTOMETRIÁS RENDSZER MINŐSÍTÉSÉNEK FŐBB PARAMÉTEREI ÉS ELFOGADHATÓSÁGI KRITÉRIUMAI

Paraméter	Az FDA-iránymutatás szerinti protokoll (36) (37)	Elfogadhatósági kritériumok
Szelektivitás	Izopropanol elemzése, élő vakpróba (nem kezelt élő RhE-szövetekből kivont izopropanol), elhalt vakpróba (nem kezelt elhalt RhE-szövetekből kivont izopropanol)	$\text{Terület}_{\text{interferencia}} \leq \text{Terület}_{\text{AMHÉ}}^1 \cdot 20\%$
Precizitás	Minőség-ellenőrzések (vagyis MTT-formazán 1,6 µg/ml, 16 µg/ml és 160 µg/ml mellett) izopropanolban (n=5)	Variációs koefficiens $\leq 15\%$ vagy $\leq$ az AMHÉ 20 %-a
Pontosság	Minőség-ellenőrzés izopropanolban (n=5)	Eltérési arány $\leq 15\%$ vagy $\leq$ az AMHÉ 20 %-a
Mátrixhatás	Minőség-ellenőrzés élő vakpróbán (n=5)	$85\% \leq \text{Mátrixhatás} \% \leq 115\%$
Átvitel	Izopropanol elemzése egy FMHÉ ² szabvány után	$\text{Terület}_{\text{interferencia}} \leq \text{Terület}_{\text{AMHÉ}} \cdot 20\%$
Megismételhetőség (napon belüli)	3 független kalibrációs görbe (izopropanolba helyezett MTT-formazán 6 egymás utáni 1/3-os hígítása kezdve a FMHÉ-nél, vagyis 200 µg/ml-nél); Minőség-ellenőrzés izopropanolban (n=5)	Kalibrációs görbék: Eltérési arány $\leq 15\%$ vagy $\leq$ az AMHÉ 20 %-a
Megismételhetőség (napok közötti)	1. nap: 1 kalibrációs görbe és minőség-ellenőrzések izopropanolban (n=3) 2. nap: 1 kalibrációs görbe és minőség-ellenőrzések izopropanolban (n=3) 3. nap: 1 kalibrációs görbe és minőség-ellenőrzések izopropanolban (n=3)	Minőség-ellenőrzések: Eltérési arány $\leq 15\%$ és variációs koefficiens $\leq 15\%$
Az MTT-formazán rövid távú stabilitása az RhE szövetkivonatban	Minőség-ellenőrzések élő vakpróbán (n=3) a készítés napján és 24 órás szobahőmérsékleten való tárolás után	Eltérési arány $\leq 15\%$
Az MTT-formazán hosszú távú stabilitása az RhE szövetkivonatban, ha szükséges	Minőség-ellenőrzések élő vakpróbán (n=3) a készítés napján és több napi, meghatározott hőmérsékleten (pl. 4 °C, -20 °C, -80 °C) történő tárolás után	Eltérési arány $\leq 15\%$

¹AMHÉ: Alsó meghatározási határérték, amely 1–2 %-os szöveti életképességet takar, vagyis 0,8 µg/ml.

²FMHÉ: Felső meghatározási határérték, amely legalább kétszer akkora mint a negatív kontroll izopropanolban várható legmagasabb MTT-formazán koncentrációja, vagyis 200 µg/ml.”

(8) A B. rész a következő fejezetekkel egészül ki:

„B.63 REPRODUKCIÓS/FEJLŐDÉSI TOXICITÁSI SZŰRŐVIZSGÁLAT

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 421. vizsgálati iránymutatásában (2016) leírt módszerrel. A vegyi anyagok vizsgálatának OECD-iránymutatásait időszakonként felülvizsgálják a tudományos fejlődés fényében. A szűrővizsgálatról szóló eredeti 421. irányelvet 1995-ben fogadták el egy „előzetes reprodukciós toxicitási szűrővizsgálat” protokollja alapján, amelyet két, 1990-ben Londonban (1) és 1992-ben Tokióban (2) megrendezett szakértői találkozón vitattak meg.
2. Az OECD által 1998-ban indított, a meglévő vizsgálati iránymutatások felülvizsgálatára, valamint az endokrin rendszert esetlegesen károsító anyagok kiszűrésére és vizsgálatára vonatkozó új vizsgálati iránymutatások kidolgozására irányuló, kiemelt fontosságú tevékenység (3) folyamatként e vizsgálati módszert frissítették az endokrin rendszert károsító anyagok tekintetében releváns végpontokkal. Az OECD 407. iránymutatását (Rágcsálókön végzett 28 napos, ismételt dózisú orális toxicitási vizsgálat, e melléklet B.7. fejezete) például 2008-ban továbbfejlesztették olyan paraméterek bevezetésével, amelyek alkalmasak a vizsgálati vegyi anyagok endokrin rendszerre gyakorolt hatásának kimutatására. A 421. vizsgálati iránymutatást abból a célból frissítették, hogy azokba a szűrővizsgálatokat érintő vizsgálati iránymutatásokba, amelyek expozíciós időszakai lefedik a fejlődés egyes érzékeny szakaszait (prenatális vagy korai posztnatális időszakokat), bekerüljenek bizonyos, az endokrin rendszert károsító anyagok tekintetében releváns végpontok.
3. Az endokrin rendszert károsító anyagok kiválasztott további releváns végpontjait, amelyek részét képezik a 443. vizsgálati iránymutatásnak is (Kibővített egygenerációs reprodukciós toxicitási vizsgálat, e melléklet B.56. fejezete), belefoglalták a 421. vizsgálati iránymutatásba azon megvalósíthatósági tanulmány alapján, amely a belefoglalásukkal kapcsolatos tudományos és szakmai kérdésekkel, valamint a vizsgálati terv belefoglalásukhoz szükséges lehetséges módosításaival foglalkozott (4).
4. E vizsgálati módszer célja, hogy korlátozott információkat szolgáltatson a vizsgálati vegyi anyagoknak a hím és női szaporodási teljesítményre, azon belül az ivarmirigyek működésére, a párzási viselkedésre, a fogantatásra, a konceptus fejlődésére és az ellésre gyakorolt hatásairól. A módszer nem képezi a meglévő B.31., B.34., B.35. és B.56. vizsgálati módszer alternatíváját, és nem helyettesíti azokat.

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK

5. Ez a szűrővizsgálati módszer arra használható, hogy kiindulási pontként szolgáló információkat nyújtson a szaporodásra és/vagy a fejlődésre gyakorolt hatásokról, akár a vegyi anyagokra jellemző toxikológiai tulajdonságok felmérésének korai szakaszában, akár az aggodalomra okot adó vegyi anyagok esetében. Használható emellett olyan létező vegyi anyagok kezdeti szűrővizsgálatainak részeként, amelyekről nem vagy csak csekély mértékben állnak rendelkezésre toxikológiai adatok, továbbá szélesebb körű reprodukciós/fejlődési vizsgálatok dózistartomány-kereső vizsgálataként és egyéb releváns esetekben. A vizsgálatok elvégzése során a klinikai tüneteknek, mint a biztonsági értékeléshez használt kísérleti állatok humánus végpontjainak felismeréséről, értékeléséről és használatáról szóló 19. OECD-iránymutatásban (5) ismertetett vezérelveket és szempontokat kell követni.
6. Ez a vizsgálati módszer nem nyújt teljes körű tájékoztatást a szaporodás és a fejlődés minden vonatkozásáról. Alkalmazhatósága különösen a prenatális expozíció posztnatális tüneteinek, valamint a posztnatális expozíció során előidézett hatások kimutatása tekintetében korlátozott. A dóziscsoportokat alkotó állatok viszonylag csekély száma, a végpontok szelektivitása, valamint a vizsgálat rövid időtartama (és egyéb okok) miatt ez a módszer nem szolgáltat bizonyítékot annak végleges megállapítására, hogy az adott vegyi anyag nem gyakorol hatást. Ezen túlmenően, más reprodukciós/fejlődési toxicitási vizsgálatokból nyert adatok hiányában a pozitív eredmények a veszély kezdeti értékelésére használhatók, illetve hozzájárulnak a további vizsgálatok szükségességére és időzítésére vonatkozó döntésekhez.
7. Az endokrin rendszerrel kapcsolatos paraméterek alkalmazásával kapott eredményeket az OECD endokrin rendszert károsító anyagok vizsgálatára és értékelésére vonatkozó fogalmi keretének összefüggésében kell értelmezni (6). Ebben a fogalmi keretben az OECD továbbfejlesztett 421. vizsgálati iránymutatása a 4. szinten helyezkedik el, mint olyan *in vivo* vizsgálat, amely az endokrin rendszer releváns végpontjaira gyakorolt káros hatásokról szolgáltat adatokat. Egy endokrin jel önmagában azonban még nem tekinthető elegendő bizonyítéknak arra, hogy a vizsgálati vegyi anyag az endokrin rendszert károsító anyag lenne.
8. Ez a vizsgálati módszer a vizsgálati vegyi anyag orális adagolását feltételezi. Más beadási mód alkalmazása esetén szükség lehet a módszer kiigazítására.
9. A vizsgálati módszer tervezett szabályozási célt szolgáló adatgenerálás érdekében, keveréken történő alkalmazása előtt meg kell vizsgálni, hogy az megfelelő eredményeket biztosíthat-e erre a célra, és ha igen, miért. Ilyen megfontolások nem szükségesek, ha létezik a keverék vizsgálatára vonatkozó szabályozási követelmény.
10. A használt fogalmak meghatározását az 1. függelék tartalmazza.

A VIZSGÁLAT ELVE

11. A vizsgálati vegyi anyagot fokozatosan növekvő dózisokban kell adagolni hím és nőstény állatok több csoportjának. A hímeket legalább négy hétig kell kezelni, egészen a tervezett elpusztításukat megelőző napig (ez az időtartam magában foglalja a pároztatást megelőző minimum két hetet, a párzási időszakot, valamint a pároztatást követő mintegy két hetes időszakot). Tekintettel a hímek pároztatást megelőző rövid kezelési időszakára, előfordulhat, hogy a termékenység nem kifejezetten érzékeny mutatója a heretoxicitásnak. Ezért a heréken mindenképpen részletes szövettani vizsgálatot kell végezni. A pároztatást megelőző kéthetes kezelési időszak és az azt követően a párzással/termékenységgel kapcsolatban tett megfigyelések, az összesen legalább négy hétig tartó kezelés, majd a hím ivarmirigyek részletes kórszövettani vizsgálata összességében elegendőnek bizonyulnak ahhoz, hogy kimutatható legyen a hím termékenységre és spermatogenezisre gyakorolt hatások többsége.
12. A nőstényeket a vizsgálat teljes időszaka alatt kezelni kell. Ez magában foglalja a párzást megelőző két hetes időszakot (amelynek célja, hogy lefedjen legalább két teljes ivari ciklust), a fogantatáshoz szükséges változó időtartamot, a vemhesség időszakát, az ellést követő legalább tizenhárom napot és a tervezett elpusztítást megelőző napig tartó további kezelést.
13. Az akklimatizációt és az ivari ciklus kezelés előtti felmérését követően megkezdett vizsgálat időtartama a nőstények teljesítményétől függően megközelítőleg 63 nap [legalább 14 napos pároztatás előtti időszak, (legfeljebb) 14 napos párzási időszak, 22 napos vemhesség és 13 napos szoptatás].
14. Az adagolási időszakban az állatokat a toxicitás jeleinek észlelése érdekében minden nap gondosan megfigyelik. A vizsgálati időszak során elpusztult vagy elpusztított állatokat felboncolják, továbbá a vizsgálat befejezése után az életben maradt állatokat is elpusztítják és felboncolják.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Az állatfaj kiválasztása

15. Ezt a vizsgálati módszert patkányok használatára tervezték. Ha az e vizsgálati módszerben meghatározott paramétereket más rágcsálófajon vizsgálják, a döntést részletesen indokolni kell. Az OECD (e melléklet B.7. fejezetének megfelelő) 407. vizsgálati iránymutatása alapján végzett nemzetközi validációs programban a patkány volt az endokrin rendszert károsító anyagok kimutatására használt egyetlen faj. Nem szabad olyan törzseket alkalmazni, amelyek kevésbé termékenyek, vagy amelyekben magas a fejlődési defektusok előfordulási gyakorisága. Korábban vizsgálatban még részt nem vett, egészséges szűz állatokat kell használni. A kísérleti állatokat faj, törzs, nem, súly és kor szerint kell

jellemezni. A vizsgálat kezdetén az állatok tömege közötti eltérésnek minimálisnak kell lennie és nem haladhatja meg az ivaronkénti átlag $\pm 20\%$ -át. Ha a vizsgálatot egy hosszú távú vagy teljes generációnál tartó vizsgálat előzetes kísérleteként végzik, ajánlatos mindkét vizsgálathoz ugyanabból a törzsből való, azonos eredetű állatokat használni.

Az állatok tartása és etetése

16. Minden eljárásnak meg kell felelnie a laboratóriumi állatgondozásra vonatkozó helyi szabványoknak. A kísérleti állatok tartására szolgáló helyiség hőmérsékletének $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ -nak ($\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$) kell lennie. Noha a helyiség relatív páratartalmának legalább 30% -nak kell lennie, és az – a takarítás időtartamától eltekintve – lehetőség szerint nem haladhatja meg a 70% -ot, a célértéknek $50\text{--}60\%$ között kell lennie. A világítás legyen mesterséges, 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást. Az etetéshez standard laboratóriumi takarmány alkalmazható, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett. A takarmány megválasztását a vizsgálati vegyi anyaggal való megfelelő keveredés igénye is befolyásolhatja, ha a vizsgálati vegyi anyagot a takarmánnyal adják be.
17. Az állatok azonos nemű egyedekből álló kisebb csoportokban tartandók; ha tudományos szempontból indokolt, az állatok egyedileg is elhelyezhetők. Ketrecben való csoportos elhelyezés esetén egy ketrecben legfeljebb öt állat tartható. A pároztatást erre a célra alkalmas ketrecekben kell végezni. A vemhes nőstényeket egyedileg kell elhelyezni, és el kell látni az alom kialakításához használt (fészeképítő) anyaggal. A szoptató nőstények és utódaik számára külön ketrecet kell biztosítani.
18. Rendszeresen ellenőrizni kell, hogy a takarmány nem tartalmaz-e szennyező anyagokat. A takarmányból egy mintát a jelentés véglegesítéséig meg kell őrizni.

Az állatok előkészítése

19. Egészséges, fiatal, ivarérett állatokat osztunk véletlenszerűen a kontroll- és kezelt csoportokba. A ketreceket úgy kell elrendezni, hogy minimálisak legyenek a ketrec elhelyezéséből adódó esetleges hatások. Az állatokat az egyedi azonosíthatóság céljából megjelölik, és a vizsgálat megkezdése előtt legalább öt napig a ketrecükben tartják a laboratóriumi körülményekhez való szoktatás céljából.

A dózisok előkészítése

20. A vizsgálati vegyi anyagot ajánlatos orálisan adagolni, kivéve ha más beadási módot tartanak megfelelőbbnek. Orális adagolás esetén a vizsgálati vegyi anyag beadása általában gyomorszondával történik; a vizsgálati vegyi anyagok azonban beadhatók a takarmánnyal vagy az ivóvízzel is.
21. A vizsgálati vegyi anyagot szükség esetén alkalmas vivőanyagban feloldják vagy szuszpendálják. Lehetőség szerint elsősorban vizes oldatot/szuszpenziót ajánlatos alkalmazni, másodsorban olajos (például kukoricacsíra-olajban elkészített) oldatot vagy

emulziót, és csak harmadsorban más vivőanyagokban elkészített oldatot. A víztől eltérő vivőanyagok esetében ismerni kell a vivőanyag toxikológiai tulajdonságait. Meg kell határozni továbbá azt is, hogy a vizsgálati vegyi anyag mennyire stabil és homogén az adott vivőanyagban.

ELJÁRÁS

Az állatok száma és neme

22. Az egyes csoportok kiindulási létszámát ajánlatos 10 hím és 12–13 nőtény egyedben meghatározni. Az expozíciót megelőzően felméri a nőtények ivari ciklusát, és a szokásos 4–5 naptól eltérő időtartamú ciklussal rendelkező állatokat nem használják a vizsgálatban; ezért célszerű néhány plusz nőtényről gondoskodni, hogy végül maradjon csoportonként 10 nőtény. Ha nem mutatkoznak jelentős toxikus tünetek, ezzel a létszámmal várhatóan csoportonként legalább 8 vemhes nőtény biztosítható, ami a vemhes nőtények csoportonkénti elfogadható számának alsó határértéke. A cél az, hogy megfelelő mennyiségű vemhesség és utód jöjjön létre ahhoz, hogy érdemileg fel lehessen mérni a vizsgálati vegyi anyag hatását a termékenységre, a vemhességre, az anyai és a szopási viselkedésre, valamint az F₁ utódnemzedék növekedésére és fejlődésére a fogantatástól az ellést követő 13. napig.

Adagolás

23. Általánosan 3 kezelt csoportot és egy kontrollcsoportot alkalmaznak. A dózisok alapulhatnak az akut toxicitási vizsgálatok adatain vagy az ismételt dózisú vizsgálatok eredményein. A kontrollcsoportba tartozó állatokat a vizsgálati vegyi anyag beadásától eltekintve ugyanolyan módon kell kezelni, mint a vizsgálati csoportokban lévőket. Ha a vizsgálati vegyi anyag beadásához vivőanyagot alkalmaznak, a kontrollcsoportnak a vivőanyagból a felhasznált legnagyobb mennyiséget kell kapnia.
24. A dózisok kiválasztásánál figyelembe veszik a toxicitásra és (toxiko)kinetikára vonatkozóan rendelkezésre álló adatokat. Emellett ügyelni kell arra is, hogy érzékenység tekintetében különbségek lehetnek a vemhes és nem vemhes állatok között. A legmagasabb dózist úgy kell kiválasztani, hogy az toxikus tüneteket keltsen, de ne okozzon halált vagy súlyos szenvedést a kísérleti állatoknak. Ezt követően úgy kell csökkenő sorrendben kiválasztani a kisebb dózisokat, hogy meg lehessen határozni a dózissal összefüggő válaszokat, illetve a legkisebb dózisonál a nem észlelhető káros hatások szintjét (NOAEL). A csökkenő dózisok beállításához gyakran optimális a 2–4-szeres intervallumok alkalmazása, a dózisok közötti nagyon nagy intervallumok (például 10-nél magasabb szorzófaktor) alkalmazásával szemben pedig gyakran előnyben részesítendő egy negyedik vizsgálati csoport beiktatása.

25. Ha általános toxicitást (például testsúlycsökkenést, a májra, a szívre, a tüdőre vagy a vesére kifejtett hatásokat stb.) vagy egyéb, nem feltétlenül toxikus reakcióra utaló változásokat (például csökkent táplálékfogyasztást, májmegnagyobbodást) figyelnek meg, az endokrin rendszer szempontjából érzékeny végpontok tekintetében megfigyelt hatások értelmezésekor óvatosan kell eljárni.

Határérték-vizsgálat

26. Ha egy egyetlen, legalább 1000 mg/testtömeg-kg/nap orális dózis felhasználásával végzett, vagy táplálékkal vagy ivóvízzel történő beadás esetén a táplálékban vagy ivóvízben ezzel egyenértékű százalékos arány alkalmazásával történő és az itt ismertetett eljárások szerint lefolytatott vizsgálat nem idéz elő észlelhető toxikus hatást, és ha a szerkezet tekintetében rokon anyagokra vonatkozó adatok alapján nem is várható a toxicitás bekövetkezése, a teljes, több dózist átfogó tanulmány elvégzése szükségtelennek tekinthető. Határérték-vizsgálatot kell minden esetben alkalmazni, kivéve, ha a humán expozíció magasabb orális dózis alkalmazását teszi szükségessé. Más típusú beadási módok, így például inhalálás vagy dermális alkalmazás esetén a vizsgálati vegyi anyag fizikai-kémiai tulajdonságai gyakran előre jelezhetik a lehetséges koncentráció maximumát.

A dózisok beadása

27. Az állatoknak a vizsgálati vegyi anyagot heti hét napon át, naponta adagolják. Ha a vizsgálati vegyi anyagot szondán át adagolják, lehetőleg egyetlen adagban kell gyomorszondán vagy megfelelő intubációs kanülön át beadni. Az egy alkalommal beadható folyadék maximális mennyisége a kísérleti állat méretétől függ. A térfogat nem haladhatja meg az 1 ml/100 g testtömegarányt, kivéve vizes oldatok esetében, amikor 2 ml/100 g testtömegarány is alkalmazható. A magasabb koncentrációértékek esetén rendszerint fokozottabb hatást kiváltó irritatív vagy korrozív vizsgálati vegyi anyagok kivételével a koncentráció megfelelő beállításával a minimálisra kell csökkenteni a vizsgálati vegyi anyag mennyiségének változásait, hogy a mennyiség valamennyi dózisonál konstans legyen.
28. A takarmánnyal vagy ivóvízzel adagolt vizsgálati vegyi anyagok esetében fontos annak biztosítása, hogy a vizsgálati vegyi anyag beadott mennyisége ne zavarja meg a szokásos táplálékfelvételt vagy a vízháztartás egyensúlyát. Ha a vizsgálati vegyi anyagot a táplálékkal együtt adják be, vagy állandó koncentrációban (ppm) keverik be, vagy az állat testsúlyától függő, állandó nagyságú dózisban adagolják; a kiválasztott alternatívát meg kell nevezni. A gyomorszondával bejuttatott vizsgálati vegyi anyagok esetében a dózist mindig a nap hasonló időszakában kell beadni, és legalább hetente újra be kell állítani ahhoz, hogy az állat testtömegéhez viszonyítva állandó értéken lehessen tartani.

A kísérleti program

29. Az adagolást mindkét nem esetében legalább 2 héttel a pároztatás előtt el kell kezdeni, miután az állatok legalább öt napon keresztül akklimatizálódtak, és (egy kéthetes kezelés előtti időszak során) ellenőrizték, hogy a nőtények ivari ciklusa megfelel-e a normál ciklusidőnek. A vizsgálatot úgy kell időzíteni, hogy az ivari ciklus értékelése röviddel a teljes ivarérettség elérését követően megkezdődjön. Ez az egyes laboratóriumokban használt különféle patkánytörzsek függvényében némileg változó, a Sprague-Dawley törzsbe tartozó patkányok esetében például 10 hetes korukban, a Wistar-törzsbe tartozók esetében pedig 12 hetes korukban következik be. Az utódokkal rendelkező anyaállatokat az ellést követő 13. napon vagy röviddel azután el kell pusztítani. A születés napja (vagyis amikor lezárul az ellés) a post-partum 0. napja. Azokat a nőtényeket, amelyek semmi jelét nem mutatják annak, hogy párosodtak volna, a párzási időszak utolsó napját követő 24–26 nappal el kell pusztítani. Az adagolást a párzási időszakban sem szabad abbahagyni egyik nem esetében sem. A hímeket a párzási időszakot követően továbbra is kezelni kell, legalább a minimális, 28 napos adagolási időszak végéig. Ezt követően leölik, vagy ha úgy ítélik megfelelőnek, megtartják azokat, és egy esetleges második pároztatás céljából tovább folytatják kezelésüket.
30. Az anyaállatok napi szintű kezelését folytatni kell a vemhesség teljes időszakán át egészen a post-partum 13. napjáig vagy az elpusztításukat megelőző napig. Azon vizsgálatoknál, amelyek keretében a vizsgálati vegyi anyagot inhalálás vagy dermális alkalmazás útján adják be, a kezelést folytatni kell legalább a vemhesség 19. napjáig, majd a lehető leghamarabb, de legkésőbb a 4. posztnatalis napon újra kell kezdeni.
31. A kísérleti ütemterv ábráját a 2. függelék tartalmazza.

A pároztatási eljárás

32. Rendes esetben e vizsgálat során 1:1 (egy hím-egy nőtény) pároztatást kell alkalmazni. Ettől abban az esetben lehet eltekinteni, ha a hímek közül elpusztul valamelyik. A nőtényt egy adott hímmel kell összerakni, és addig kell együtt hagyni azokat, amíg meg nem győződtek a párzás megtörténtéről, vagy 2 hét el nem telik. Minden reggel meg kell vizsgálni, hogy a nőtényben észlelhető-e sperma vagy a hüvelydugó. A vemhesség 0. napja definíció szerint az a nap, amikor a párosodás tényét megerősítették (hüvelydugó vagy sperma figyelhető meg a nőtényben). Ha a pároztatás sikertelen volt, fontolóra lehet venni a nőtények újrápároztatását egy azonos csoportbeli és már sikeresen pároztatott hímmel.

Az alom mérete

33. Az ellés utáni negyedik napon az egyes almok egyedszáma a létszám fölötti kölykök véletlenszerű eltávolításával módosítható, hogy almonként az eredmény – amennyire lehetséges – a használt patkánytörzsre jellemző ivaronkénti négy vagy öt utód legyen. Két létszám feletti kölyöktől vérmintát kell venni, egybe kell gyűjteni és fel kell használni a T4

szérumszintek meghatározásához. A kölykök szelektív, például a testtömeg vagy az anogenitális távolság (AGD) alapján történő eltávolítása nem elfogadható. Ha a hím és nőtény utódok száma nem teszi lehetővé a nemenként négy vagy öt azonos nemű utódot tartalmazó almok kialakítását, részleges kiegyenlítés is elfogadható (például hat hím és négy nőtény). Amennyiben az alom egyedszáma a selejtezési célérték (almonként 8 vagy 10 utód) alá csökkenne, nem kell eltávolítani kölyköket. Ha az alom mérete csupán eggyel haladja meg a selejtezési célértéket, csak egy kölyköt távolítanak el, és attól vesznek vért a T4 szérumszintek esetleges értékelésekhez.

34. Ha nem igazítják ki az alom egyedszámát, az ellést követő 4. napon almonként két kölyköt elpusztítanak, és vérmintát vesznek tőlük a pajzsmirigyhormonok szérumkoncentrációjának méréséhez. Lehetőség szerint az almonkénti két kölyök nőtény legyen, hogy maradjanak hímek az emlőbimbó-visszamaradás megállapításához, kivéve abban az esetben, ha a nőtény utódok eltávolítása miatt nem maradna nőtény a vizsgálat végi értékeléshez. Amennyiben az egyedszám az almonkénti 8 vagy 10 utód alá esne (a használt patkánytörzsre jellemző szokásos alommérettől függően), nem kell eltávolítani kölyköket. Ha az alom egyedszáma csupán eggyel haladja meg az alom szokásos méretét, csak egy kölyköt távolítanak el, és attól vesznek vért a T4 szérumszintek esetleges értékelésekhez.

Megfigyelések élő állatban

Klinikai megfigyelések

35. A vizsgálat teljes időtartama alatt általános klinikai megfigyeléseket legalább naponta kell végezni, vagy gyakrabban, ha toxicitás jelei figyelhetők meg. A megfigyeléseket lehetőleg mindig a nap azonos időszakában/időszakaiban kell végezni, figyelembe véve azt is, hogy a várt hatások a dózis beadása után mikor érik el a maximumukat. Feljegyzést kell készíteni a lényeges magatartászavarokról, az elhúzódó vagy nehéz ellés jeleiről, valamint a toxikus hatásra utaló minden egyéb tünetről, beleértve a mortalitást is. A feljegyzéseknek tartalmazniuk kell a toxicitási tünetek fellépésének időpontját, mértékét és időtartamát.

Testtömeg és táplálék-/vízfogyasztás

36. A hímek és nőtények testsúlyát meg kell mérni az adagolás első napján, majd ezt követően legalább hetente és a vizsgálat végén meg kell ismételni a mérést. A nőtényeket a vemhesség alatt a 0., 7., 14. és 20. napon kell megmérni, továbbá az ellést követő 24 órán belül (a post-partum 0. vagy 1. napján) és legalább a post-partum 4. és 13. napján. A megfigyeléseket minden egyes felnőtt állat esetében külön-külön kell rögzíteni.
37. A pároztatás előtt, valamint a vemhesség és a szoptatás ideje alatt a takarmányfogyasztást legalább hetente kell mérni. A párzási időszak során nem kell feltétlenül mérni a takarmányfogyasztást. Ha a vizsgálati vegyi anyagot az ivóvízzel adagolják, ezen időszakok során a vízfogyasztást is mérni kell.

Ivari ciklus

38. A kezelés megkezdése előtt ellenőrizni kell az ivari ciklust, hogy szabályos ciklussal rendelkező nőtények kerüljenek kiválasztásra a vizsgálatához (lásd a 22. pontot). Emellett napi szinten kell vizsgálni a hüvelyi kenetet is, a kezelési időszak kezdetétől mindaddig, amíg be nem bizonyosodik, hogy megtörtént a párzás. Ha felmerül a lehetősége annak, hogy az adagolás megkezdése olyan akut stresszhatást idéz elő, amely módosíthatja az ivari ciklust, a laboratóriumok eljárhatnak úgy is, hogy két hétig kezelik a vizsgált állatokat, majd a pároztatás előtti időszakban legalább két hétig naponta hüvelyi kenetet vesznek az ivari ciklus ellenőrzéséhez, amelyet a párzási időszak során is folyamatosan figyelemmel kísérnek egészen a párzás megtörténteig. A hüvelyi/méhnyaki sejtvételek során ügyelni kell arra, hogy meg ne sérüljön a nyálkahártya, mert az álvemhességet idézhet elő (7) (8).

Az utódok paraméterei

39. A vemhesség nulladik napjától számítandó terhességi (gesztációs) időszakról feljegyzést kell készíteni. Az ellés után minden almot a lehető leghamarabb meg kell vizsgálni a kölykök számának és ivarának, a halvaszületések, élveszületések és fejletlen egyedek (a megfelelő kontrollcsoportba tartozó kölyköknél jelentősen kisebb utódok) számának, valamint a súlyos rendellenességek jelenlétének megállapításához.
40. Az élő kölyköket meg kell számolni, nemüket meg kell állapítani, és az almok egyedeinek súlyát meg kell mérni a születést követő 24 órán belül (a post-partum 0. vagy 1. napján) és legalább a post-partum 4. és 13. napján. A 35. pontban említett megfigyelések mellett az utódok minden rendellenes viselkedéséről be kell számolni.
41. Az anogenitális távolságot (AGD) minden utódon legalább egy alkalommal meg kell mérni a 0. és 4. posztnatális nap között. A kölykök testtömegét azon a napon kell megmérni, amikor az AGD-t is mérik, és az AGD-t normálni kell a kölykök méretére, ami lehetőleg a testtömeg köbgyöke (9). Az OECD 151. vizsgálati iránymutatásának (10) ajánlása szerint a hím utódok emlőbimbóinak/emlőbimbóudvarainak számát meg kell számolni a 12. vagy 13. posztnatális napon.

Klinikai biokémiai vizsgálatok

42. Vérmintákat egy meghatározott helyről kell venni, az alábbi ütemezés szerint:

- almonként legalább két kölyöktől a születést követő 4. napon, amennyiben azt az utódok száma lehetővé teszi (lásd a 33–34. pontot),
- az összes anyaállattól és almonként legalább két kölyöktől a vizsgálat végét jelentő 13. napon, és
- az összes felnőtt hímtől a vizsgálat végén,

A vérmintákat megfelelő körülmények között tárolják. A 13 napos utódoktól és a felnőtt hímeiktől vett vérminták alapján értékelik a pajzsmirigyhormon (T4) szérumszinteket. Szükség esetén a T4 további értékeléséhez felhasználhatók az anyaállatoktól és a 4 napos utódoktól vett vérminták. Ha a vizsgálat szempontjából lényeges, más hormonok is mérhetők. A pajzsmirigyhormon analízisekhez almonként egyesíteni lehet a kölyköktől vett vérmintákat. A pajzsmirigyhormonokra (T4 és TSH) vonatkozó mérésekhez lehetőleg a teljes vérmintát kell használni.

43. A hormonok meghatározásának variabilitását és az azzal kapott abszolút koncentrációt az alábbi tényezők befolyásolhatják:
- az elpusztítás időpontja, tekintettel a hormonkoncentrációk nap folyamán tapasztalható ingadozására,
 - az állatot érő indokolatlan stressz elkerülése érdekében alkalmazott elpusztítási mód, amely hatással lehet a hormonkoncentrációkra,
 - a hormonmeghatározásokhoz alkalmazott, standard görbéjük tekintetében esetlegesen eltérő vizsgálati készletek.
44. A kifejezetten hormon-meghatározási célra szánt plazmamintákat a nap hasonló időpontjában kell gyűjteni. A kereskedelmi fogalomban kapható különböző vizsgálati készletek eltérő számszerű értékeket adnak a hormonkoncentrációk elemzése során.

Patológia

Makroszkópos boncolás

45. A vizsgálat során bekövetkező elpusztítás vagy elhullás időpontjában makroszkóposan meg kell vizsgálni a felnőtt állatokban az esetleges rendellenességeket vagy patológiás elváltozásokat. Külön figyelmet kell szentelni a szaporítószerveknek. A beágyazódási helyek számát fel kell jegyezni. A boncolás napjának reggelén meg kell vizsgálni a hüvelyi kenetet az ivari ciklus aktuális szakaszának meghatározásához, hogy lehetővé váljon a korreláció felállítása a petefészkek kórszövettanával.
46. Az összes hím felnőtt állat heréit és mellékheréit, prosztatáját és ondóhólyagjait a koaguláló mirigyekkel egy egységként meg kell tisztítani minden rátapadt szövetből, és a kiszáradás megelőzése érdekében a boncolást követően a lehető legrövidebb időn belül meg kell mérni nedves tömegüket. Ezen túlmenően további szervtömegmérések végezhetők hímeknél a végbélemelő és a bulbocavernosus izomra, a Cowper-mirigyekre és a glans penisre, nőstényeknél a páros petefészkekre (nedves tömeg) és a méhre (valamint a méhnyakra) kiterjedőleg; ha ezeket a szerveket is bevonják a mérésbe, tömegüket a boncolás után lehető leghamarabb meg kell határozni.
47. Az elhullott és a post-partum 13. napján vagy röviddel azután elpusztított utódokat legalább külsőleg alaposan meg kell vizsgálni, hogy láthatók-e rajtuk súlyos rendellenességek. Különös figyelmet kell szentelni a külső ivarszervek vizsgálatának, és

ezen belül a rendellenes fejlődés jeleinek. A 13. napon almonként 1 hím és 1 nőtény utód pajzsmirigyét meg kell őrizni.

48. Ezenfelül meg kell őrizni az összes felnőtt állat petefészkeit, heréit, a járulékos ivarszerveket (a méhet és a méhnyakat, a mellékheréket, a prosztatát és az ondóhólyagokat a koaguláló mirigyekkel), a pajzsmirigyét, valamint a makroszkópos vizsgálat során léziókat mutató szerveket. A herék és mellékherék rutinvizsgálatához a formalinos fixálás használata nem ajánlott. E szövetek elfogadható vizsgálati módszere a Bouin-féle vagy a módosított Davidson-féle fixáló használata (11). A tunica albugineán a fixálószer gyors bejutása érdekében túlvá óvatosan sekély szúrás lehet ejteni a szerv mindkét végén.

Kórszövettan

49. Részletes szövettani vizsgálatot kell végrehajtani a legmagasabb dózissal kezelt csoportba és a kontrollcsoportba tartozó állatok petefészkein, heréin és mellékheréin (különös figyelmet fordítva a spermatogenezis szakaszaira és a here intersticiális sejtjeinek felépítésére). Amennyiben szükséges, vizsgálni lehet az utódoktól és a felnőtt állatoktól származó egyéb megőrzött szerveket, például a pajzsmirigyét. A pajzsmirigy súlya a fixálást követően is meghatározható. A megtisztítás a szövetkárosodás elkerülése érdekében ez esetben is igen óvatosan, kizárólag a fixálást követően végzendő el. A szövetkárosodás veszélyeztetheti a kórszövettani elemzést. Ha a legmagasabb dózissal kezelt csoport egyedei esetében elváltozások figyelhetők meg, a vizsgálatokat a többi, más dózissal kezelt csoport egyedeire is ki kell terjeszteni. A kórszövettani iránymutatás (11) további információkat tartalmaz az endokrin szövetek boncolásával, fixálásával, metszeteinek elkészítésével és kórszövettani vizsgálatával kapcsolatban.

ADATOK ÉS JELENTÉS

Adatok

50. Az állatokra vonatkozóan egyedi adatsorokat kell felvenni. Emellett minden adatot táblázatos formában is össze kell foglalni, amelyben minden egyes vizsgálati csoport esetében fel kell tüntetni az állatok számát a vizsgálat kezdetén, a vizsgálat során elpusztult vagy humánus okok miatt exterminált állatok számát, az elhullások és a humánus okok miatti elpusztítások időpontját, a termékeny állatok számát, a vemhes nőtények számát, a toxicitás jeleit mutató állatok számát, a megfigyelt toxicitási tünetek leírását, ezen belül bármely toxikus tünet megjelenésének időpontját, valamint ezek időtartamát és súlyosságát, a kórszövettani elváltozások típusait és az almokra vonatkozó minden idevágó adatot. A 3. mellékletben közlésünk egy, a reprodukciós/fejlődési hatások értékelése során nagyon hasznosnak bizonyult táblázatos formájú, összefoglaló jelentést.
51. A vizsgálat korlátozott terjedelme miatt a „szignifikancia” felmérésére szolgáló vizsgálatok formájában végzett statisztikai elemzések számos végpont, különösen a reprodukciós végpontok szempontjából csekély jelentőséggel bírnak. Amennyiben

statisztikai elemzésekre támaszkodnak, még a vizsgálat megkezdése előtt olyan módszert kell választani, amelyik megfelel a vizsgált változók eloszlásának. Az anogenitális távolság és az emlőbimbó-visszamaradás statisztikai elemzésének az utódokra vonatkozó egyedi adatokon kell alapulnia, ugyanakkor figyelembe kell venni az alom által gyakorolt hatásokat. Ahol megfelelő, az elemzés egysége az alom. A kölykök testsúlyára vonatkozó statisztikai elemzésnek a kölykök egyedi adatain kell alapulnia, ugyanakkor figyelembe kell venni az alom által gyakorolt hatásokat. A csoportok alacsony egyedszáma miatt az esetleg rendelkezésre álló (pl. az alomméretre vonatkozó) korábbi kontrolladatok szintén hasznos segítséget nyújthatnak a vizsgálat értelmezéséhez.

Az eredmények értékelése

52. E toxicitási vizsgálat eredményeit a megfigyelt hatások, valamint a boncolási és mikroszkópos eredmények szempontjából kell értékelni. Az értékelés során ki kell térni a vizsgálati vegyi anyag dózisa és a rendellenességek, ezen belül a súlyos léziók, az azonosított célszervek, a terméketlenség, a klinikai rendellenességek, a csökkent reprodukív teljesítmény és egyedszám, a testtömegváltozások, a mortalitásra gyakorolt hatások és egyéb toxikus hatások megléte vagy hiánya, illetve gyakorisága és súlyossága közötti összefüggésekre.
53. A hímek rövid kezelési időszaka miatt a hímekre gyakorolt reprodukciós hatások felmérése során figyelembe kell venni a herék és mellékherék kórszövettanát, valamint a termékenységre vonatkozó adatokat. A szaporodásra/fejlődésre (pl. alomméretre, anogenitális távolságra, emlőbimbó-visszamaradásra, T4 szérumszintekre) vonatkozólag rendelkezésre álló történeti kontrolladatok szintén hasznos segítséget nyújthatnak a vizsgálat értelmezéséhez.
54. A minőség-ellenőrzéshez javasolt történeti kontrolladatokat gyűjteni, a számszerű adatokhoz pedig kiszámítani a variációs együtthatót, különösen az endokrin rendszert károsító anyagok kimutatásával összefüggő paraméterek tekintetében. Ezek az adatok felhasználhatók összehasonlítási célokra a tényleges vizsgálatok kiértékelése során.

Vizsgálati jelentés

55. A vizsgálati jelentésnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálati vegyi anyag:

- eredet, gyártási szám, felhasználási határidő, ha rendelkezésre áll;
- a vizsgálati vegyi anyag stabilitása, ha ismert;

Egy összetevőből álló anyag:

- fizikai megjelenés, vízzoldékonyság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok;

- kémiai azonosítás, például IUPAC- vagy CAS-névvel, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet alapján, tisztaság, adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb. alapján

Több összetevőből álló anyag, UVCB-k és keverékek:

- amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosítója (lásd fent), mennyiségi előfordulása és releváns fizikai-kémiai tulajdonságai révén jellemezve.

Vivőanyag (ha van):

- a vivőanyag megválasztásának indokolása, ha az nem víz.

Kísérleti állatok:

- használt faj/törzs;
- az állatok száma, kora és neme;
- az állatok származása, tartási körülmények, takarmány stb.;
- az egyes állatok testtömege a vizsgálat kezdetekor;
- patkánytól eltérő faj alkalmazásának indokolása.

Vizsgálati körülmények:

- a dózisok kiválasztásának indokolása;
- a vizsgálati vegyi anyag formulázásával/a takarmány előkészítésével, az elért koncentrációval, a készítmény stabilitásával és homogenitásával kapcsolatos adatok;
- a vizsgálati vegyi anyag beadására vonatkozó részletek;
- átszámítás a vizsgálati vegyi anyagnak a takarmányban/ivóvízben meglévő koncentrációjáról (ppm) a tényleges dózissra (mg/kg testsúly/nap), ha ez alkalmazható;
- a táplálék és víz minőségére vonatkozó részletek;
- a selejtezés során a kölykök kiválasztására használt randomizálási eljárás részletes leírása, ha sor került selejtezésre.

Eredmények:

- testsúly és annak változásai;
- táplálék- és vízfogyasztásra vonatkozó adatok, ha rendelkezésre állnak;
- a toxikus reakciók adatai nemenként és dózisonként, beleértve a termékenységet, a gesztációs időt és a toxicitás egyéb tüneteit is;
- a vemhesség időtartama;

- a szaporodásra, az utódokra, a posztnatális növekedésre stb. gyakorolt toxikus vagy egyéb hatások;
- a klinikai megfigyelések jellege, súlyossága és időtartama (a változások visszafordíthatók-e vagy sem);
- normális vagy abnormális ivari ciklust mutató felnőtt nőtények száma és a ciklus időtartama;
- az elveszületések száma és a beágyazódás utáni veszteség;
- utódok testsúlyadatai;
- az összes utód anogenitális távolsága (és az AGD-mérés napján rögzített testsúlyuk);
- emlőbimbó-visszamaradás a hím utódoknál;
- pajzsmirigyhormonok szintje 13 napos kölyköknél és felnőtt hímeknél (és ha mérték, az anyaállatoknál és 4 napos kölyköknél);
- a szemmel jól látható rendellenességeket mutató utódok száma, a külső nemi szervek makroszkopikus értékelése, a fejletlen utódok száma;
- a vizsgálat során bekövetkezett elhullás ideje, illetve hogy az állatok megélték-e a vizsgálat végét;
- a beágyazódások száma, az alomméret és az almokban lévő egyedek mérésakor rögzített testsúlya;
- a testtömeg az elpusztításkor, valamint a szülők szervtömegadatai;
- boncolási eredmények;
- a kórszövettani leletek részletes ismertetése;
- felszívódási adatok (ha vannak);
- adott esetben az eredmények statisztikai feldolgozása.

Az eredmények értékelése.

Következtetések

Az eredmények értelmezése

56. Ez a vizsgálat az ismételt dózisok útján történő kezeléssel összefüggésben kimutatható reprodukciós/fejlődési toxicitás értékelésére szolgál (lásd az 5. és a 6. pontot). Jelezheti a további vizsgálatok szükségességét, és iránymutatást nyújt a későbbi vizsgálatok kialakításához. A szaporodási és fejlődési eredmények értelmezésével kapcsolatban az OECD 43. iránymutatását kell alkalmazni (12). A rágszálókon végzett endokrin és reprodukciós vizsgálatok szövettani értékeléséről szóló 106. OECD-iránymutatás (11)

olyan információkkal szolgál az (endokrin) szervek és a hüvelyi kenet előkészítéséről és értékeléséről, amelyek segítséget nyújthatnak e vizsgálati iránymutatáshoz.

SZAKIRODALOM

- (1) OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Available upon request at Organisation for Economic and Cooperation and Development, Paris.
- (2) OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. Kérésre elérhető a Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezetnél, Párizs.
- (3) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998. Kérésre elérhető a Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezetnél, Párizs.
- (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), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.
- (5) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations. Series on Testing and Assessment, (No 19), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (6) OECD (2011). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.
- (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. o.
- (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), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

- (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), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.
- (12) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 43), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK (LÁSD MÉG: OECD 150. IRÁNYMUTATÁSA (6))

Androgenitás: egy vegyi anyag azon képessége, hogy emlősállatok szervezetében természetes androgén hormonokhoz (például a tesztoszteronhoz) hasonló hatást fejtsen ki.

Antiandrogenitás: egy vegyi anyag azon képessége, hogy emlősállatok szervezetében a természetes androgén hormonok (például a tesztoszteron) hatását gátolja.

Antiösztrogenitás: egy vegyi anyag azon képessége, hogy emlősállatok szervezetében a természetes ösztrogén hormonok (például a 17 β -ösztradiol) hatását gátolja.

Antitiroid hatás: egy vegyi anyag azon képessége, hogy emlősállatok szervezetében a természetes pajzsmirigyhormon (például a T₃) hatását gátolja.

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Fejlődési toxicitás: reprodukciós toxicitás kifejeződése az utódokban pre-, peri-, posztnatális, szerkezeti vagy funkcionális rendellenességek formájában.

Adagolás: általános fogalom, amely a dózist, valamint az adagolás gyakoriságát és időtartamát foglalja magában.

Dózis: a vizsgálati vegyi anyag beadott mennyisége. A dózist a vizsgálati vegyi anyag súlyának és a kísérleti állat egységnyi testsúlyának napi hányadosaként (például mg/testsúlykilogramm/nap), vagy a takarmányban lévő állandó koncentrációként fejezik ki.

Nyilvánvaló toxicitás: általános fogalom, amely a toxicitás vizsgálati vegyi anyag beadását követően kialakuló egyértelmű tüneteire vonatkozik. E tüneteknek elegendőnek kell lenniük a veszély értékeléséhez, továbbá olyan szintet kell képviselniük, amelynél a beadott dózis növelése várhatóan a toxicitás súlyos jeleinek kialakulásához és valószínű mortalitáshoz vezet.

Termékenységgkárosodás: a hím vagy női szaporodási funkciók vagy képesség terén jelentkező rendellenességeket jelenti.

Anyai toxicitás: a vemhes nőstényeket érő káros hatások, amelyek történhetnek specifikusan (közvetlen hatás) vagy nem specifikusan (közvetett hatás).

NOAEL: a „no-observed-adverse-effect level” (nem észlelhető káros hatásszint) rövidítése. Ez a legmagasabb dózis, amelynél még nem figyelhetők meg a kezelés okozta káros hatások.

Ösztrogenitás: egy vegyi anyag azon képessége, hogy emlősállatok szervezetében a természetes ösztrogén hormonokhoz (például a 17 β -ösztradiolhoz) hasonló hatást fejtsen ki.

Reprodukciós toxicitás: az utódoknál jelentkező káros hatásokat és/vagy a hím vagy női szaporodási funkciók vagy képesség csökkenését jelenti.

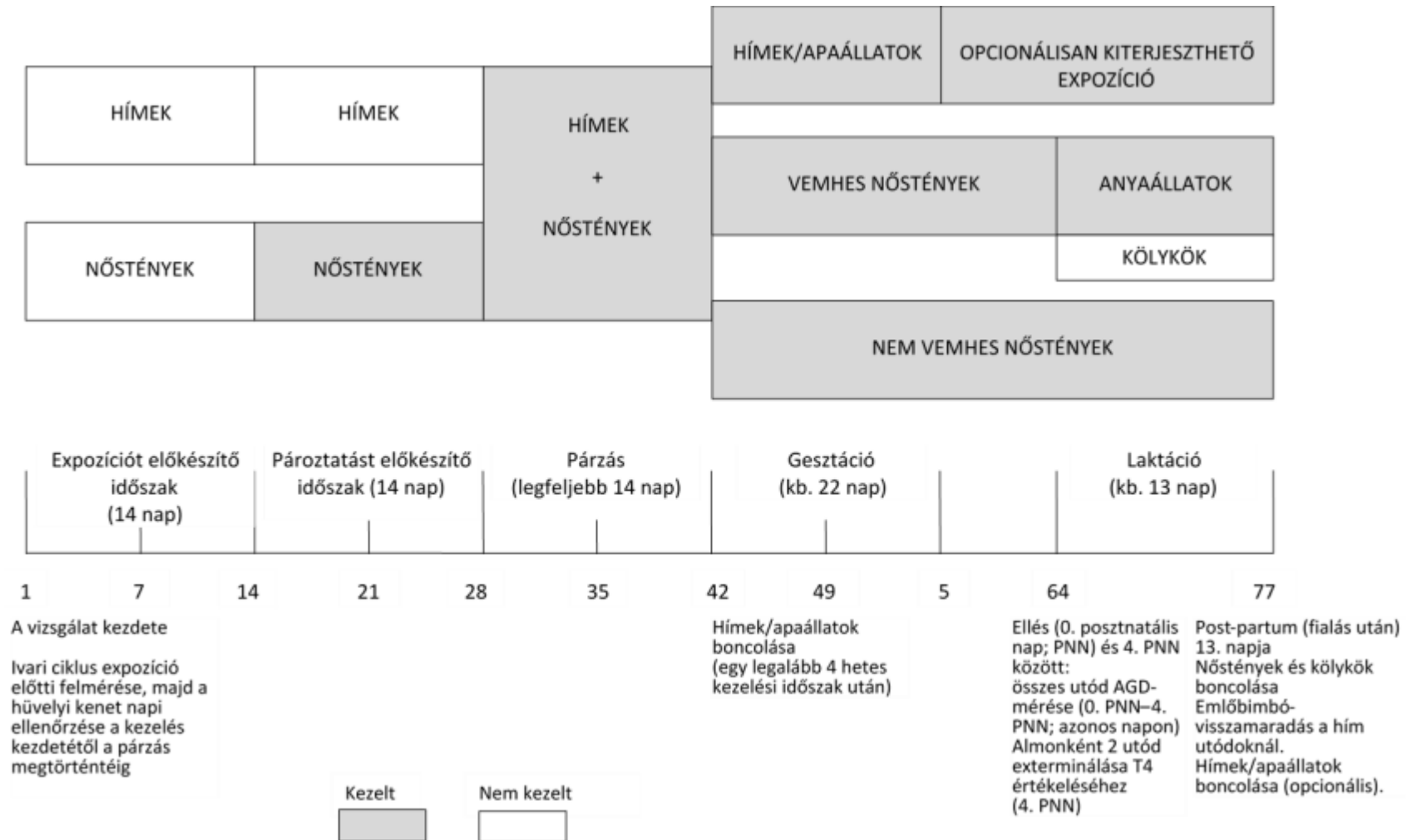
Vizsgálati vegyi anyag: az e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

Tiroid hatás: egy vegyi anyag azon képessége, hogy emlősállatok szervezetében a természetes pajzsmirigyhormonhoz (például a T₃-hoz) hasonló hatást gyakoroljon.

Validáció: tudományos folyamat, amelynek célja egy adott vizsgálati módszer működési követelményeinek és korlátjainak jellemzése, valamint megbízhatóságának és egy adott célhoz kapcsolódó relevanciájának igazolása.

2. függelék

A KÍSÉRLETI ÜTEMTERV ÁBRÁJA, AMELY JELZI A VIZSGÁLAT TELJES 14 NAPOS PÁRZÁSI IDŐSZAKON ALAPULÓ MAXIMÁLIS IDŐTARTAMÁT



3. függelék

TÁBLÁZATOS ÖSSZEFOGLALÓ JELENTÉS A SZAPORODÁSRA/FEJLŐDÉSRE GYAKOROLT HATÁSOKRÓL

MEGFIGYELÉSEK	ÉRTÉKEK				
Adagolás (egységek)	0 (kontroll)	.. .	.. .	.. .	.. .
Kezdő párok (Sz)					
Ivari ciklus (legalább az átlagos időtartam és az irreguláris ciklusok gyakorisága)					
Bizonyítottan párosított nőtények (Sz)					
Vemhességet elért nőtények (Sz)					
Fogantatás napja 1–5. (Sz)					
Fogantatás napja 6– . . . ⁽¹⁾ (Sz)					
Vemhesség ≤ 21 nap (Sz)					
Vemhesség = 22 nap (Sz)					
Vemhesség ≥ 23 nap (Sz)					
Élve született utódokkal rendelkező anyaállatok (Sz)					
Post-partum 4. napján élő utódokkal rendelkező anyaállatok (Sz)					
Beágyazódások/anyaállat (átlag)					
Élő utódok/anyaállat az ellésnél (átlag)					
Élő utódok/anyaállat a 4. napon (átlag)					
Ivararány (h/n) az ellésnél (átlag)					
Ivararány (h/n) a 4. napon (átlag)					
Alom egyedsúlya az ellésnél (átlag)					

⁽¹⁾ a párzási időszak utolsó napja

Alom egyedsúlya a 4. napon (átlag)					
Utódok súlya születéskor (átlag)					
Utódok súlya az AGD-mérés időpontjában (hímek átlaga, nőtények átlaga)					
Utódok AGD-értéke ugyanazon a posztnatális napon, születés – 4. nap (hímek átlaga, nőtények átlaga, posztnatális nap feljegyzése)					
Utódok súlya a 4. napon (átlag)					
Hím utódok emlőbimbó-visszamaradása a 13. napon (átlag)					
Utódok súlya a 13. napon (átlag)					
RENDELLENES UTÓDOK					
Anyaállatok 0-val					
Anyaállatok 1-gyel					
Anyaállatok ≥ 2 -vel					
UTÓDOK ELVESZTÉSE					
Prenatális/poszt-implantációs időszak (beágyazódások mínusz elveszületések száma)					
Anyaállatok 0-vel					
Anyaállatok 1-gyel					
Anyaállatok 2-vel					
Anyaállatok ≥ 3 -mal					
Posztnatális időszak (elveszületések mínusz a 13. posztnatális napon élők száma)					
Anyaállatok 0-vel					
Anyaállatok 1-gyel					
Anyaállatok 2-vel					
Anyaállatok ≥ 3 -mal					

B.64. KOMBINÁLT ISMÉTELT DÓZISÚ TOXICITÁSI VIZSGÁLAT ÉS REPRODUKCIÓS/FEJLŐDÉSI TOXICITÁSI SZŰRŐVIZSGÁLAT

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 422. vizsgálati iránymutatásában (2016) leírt módszerrel. A vegyi anyagok vizsgálatának OECD-iránymutatásait időszakonként felülvizsgálják a tudományos fejlődés fényében. A szűrővizsgálatról szóló eredeti 422. vizsgálati iránymutatást 1996-ban fogadták el a „kombinált ismételt dózisú és reprodukciós/fejlődési szűrővizsgálat” protokollja alapján, amelyet két, 1990-ben Londonban (1) és 1992-ben Tokióban (2) megrendezett szakértői találkozáson vitattak meg.
2. Ez a vizsgálati módszer két vizsgálatot ötvöz, egyfelől egy reprodukciós/fejlődési toxicitási szűrővizsgálatot, amely részben a már létező és nagy mennyiségben előállított vegyi anyagokra vonatkozó eredeti módszer alkalmazása során a tagállamokban szerzett tapasztalatokon, részben a pozitív kontrollanyagokkal végzett kísérletekben szerzett ismereteken alapul (3) (4), másfelől egy ismételt dózisú toxicitási vizsgálatot, amely összhangban áll az OECD 407. vizsgálati iránymutatásával (Rágeszálókön végzett 28 napos, ismételt dózisú orális toxicitási tanulmány, e melléklet B.7. fejezete).
3. Az OECD által 1998-ban indított, a meglévő vizsgálati iránymutatások felülvizsgálatára, valamint az endokrin rendszert esetlegesen károsító anyagok kiszűrésére és vizsgálatára vonatkozó új vizsgálati iránymutatások kidolgozására irányuló, kiemelt fontosságú tevékenység (5) folyamánaként e vizsgálati módszert frissítették az endokrin rendszert károsító anyagok tekintetében releváns végpontokkal. Ebben az összefüggésben az (e melléklet B.7. fejezetének megfelelő) 407. vizsgálati iránymutatást 2008-ban továbbfejlesztették olyan paraméterekkel, amelyek alkalmasak a vizsgálati vegyi anyagok endokrin rendszerre gyakorolt hatásának kimutatására. A 422. vizsgálati iránymutatást abból a célból frissítették, hogy azokba a szűrővizsgálatokat érintő vizsgálati iránymutatásokba, amelyek expozíciós időszakai lefedik a fejlődés egyes érzékeny szakaszait (prenatális vagy korai posztnatális időszakokat), bekerüljenek bizonyos, az endokrin rendszert károsító anyagok tekintetében releváns végpontok.
4. Az endokrin rendszert károsító anyagok tekintetében releváns kiválasztott végpontokat, amelyek részét képezik a 443. vizsgálati iránymutatásnak is (Kibővített egygenerációs reprodukciós toxicitási vizsgálat, amely e melléklet B.56. fejezetének felel meg), belefoglalták a 422. vizsgálati iránymutatásba azon megvalósíthatósági tanulmány alapján, amely a belefoglalásukkal kapcsolatos tudományos és szakmai kérdésekkel, valamint a vizsgálati terv belefoglalásukhoz szükséges lehetséges módosításaival foglalkozott (6).
5. E vizsgálati módszer célja, hogy korlátozott információkat szolgáltatson a vizsgálati vegyi anyagoknak a hím és női szaporodási teljesítményre, azon belül az ivarmirigyek működésére, a párzási viselkedésre, a fogantatásra, a konceptus fejlődésére és az ellésre

gyakorolt hatásairól. A módszer nem képezi a meglévő B.31., B.34., B.35. és B.56. vizsgálati módszer alternatíváját, és nem helyettesíti azokat.

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK

6. Egy vizsgálati vegyi anyag toxikus jellemzőinek értékelése és felmérése során az ismételt dózisú orális toxicitást azután lehet meghatározni, hogy az akut vizsgálatok kezdeti eredményei már rendelkezésre állnak. Ez a vizsgálat ismereteket szolgáltat azokról a lehetséges egészségügyi veszélyekről, amelyek egy viszonylag korlátozott időszakon keresztül ismétlődő expozíció következtében alakulhatnak ki. A módszer egy alapvető, ismételt dózisú toxicitási vizsgálatot foglal magában, amely a 90 napos vizsgálatot nem igénylő vegyi anyagok esetén (például abban az esetben, ha az előállított mennyiség nem halad meg bizonyos határértékeket), vagy egy hosszú távú vizsgálat előzetes vizsgálatként alkalmazható. A vizsgálatok elvégzése során a klinikai tüneteknek, mint a biztonsági értékeléshez használt kísérleti állatok humánus végpontjainak felismeréséről, értékeléséről és használatáról szóló 19. OECD-iránymutatásban (7) ismertetett vezérelveket és szempontokat kell követni.
7. A módszer magában foglal továbbá egy reprodukciós/fejlődési toxicitási vizsgálatot, ezért használható arra is, hogy kiindulási pontként szolgáló információkat nyújtson a hím és női szaporodási teljesítményre, azon belül az ivarmirigyek működésére, a párzási viselkedésre, a fogantatásra, a konceptus fejlődésére és az ellésre gyakorolt lehetséges hatásokról, akár a vegyi anyagokra jellemző toxikológiai tulajdonságok felmérésének korai szakaszában, akár az érintett vegyi anyagok esetében. Ez a vizsgálati módszer nem nyújt teljes körű tájékoztatást a szaporodás és a fejlődés minden vonatkozásáról. Alkalmazhatósága különösen a prenatális expozíció posztnatális tüneteinek, valamint a posztnatális expozíció során esetlegesen előidézett hatásoknak a kimutatása tekintetében korlátozott. A végpontok szelektivitása, a vizsgálat rövid időtartama (és egyéb okok) miatt ez a módszer nem szolgáltat bizonyítékot annak végleges megállapítására, hogy az adott vegyi anyag nem gyakorol hatást a szaporodásra/fejlődésre. Ezen túlmenően, más reprodukciós/fejlődési toxicitási vizsgálatokból nyert adatok hiányában a pozitív eredmények a veszély kezdeti értékelésére használhatók, illetve hozzájárulnak a további vizsgálatok szükségességére és időzítésére vonatkozó döntésekhez.
8. Az endokrin rendszerrel kapcsolatos paraméterek alkalmazásával kapott eredményeket az OECD endokrin rendszert károsító anyagok vizsgálatára és értékelésére vonatkozó fogalmi keretének összefüggésében kell értelmezni (8). Ebben a fogalmi keretben az OECD továbbfejlesztett 422. vizsgálati iránymutatása a 4. szinten helyezkedik el, mint olyan *in vivo* vizsgálat, amely az endokrin rendszer releváns végpontjaira gyakorolt káros hatásokról szolgáltat adatokat. Egy endokrin jel önmagában azonban még nem tekinthető elegendő bizonyítéknak arra, hogy a vizsgálati vegyi anyag az endokrin rendszert károsító anyag lenne.

9. A vizsgálati módszer emellett hangsúlyt fektet a neurológiai hatásokra mint különleges végpontra, valamint az állatok gondos klinikai megfigyelésének jelentőségére a lehető legtöbb információ megszerzése érdekében. A módszer segítségével azonosíthatók a neurotoxikus hatással rendelkező vegyi anyagok, ami aztán további alaposabb, ilyen irányú kutatást indokolhat. Mindezek mellett a módszer alapinformációkkal szolgálhat az immunológiai hatásokkal kapcsolatban is.
10. Más szisztémás toxicitási, reprodukciós/fejlődési toxicitási, neurotoxicitási és/vagy immunotoxicitási vizsgálatokból nyert adatok hiányában a pozitív eredmények a veszély kezdeti értékelésére használhatók, illetve hozzájárulnak a további vizsgálatok szükségességére és időzítésére vonatkozó döntésekhez. A vizsgálat különösen hasznosnak bizonyulhat, ha az OECD szűrővizsgálati információs adatkészletének (SIDS) részeként alkalmazzák olyan létező vegyi anyagok értékelésére, amelyekről nem vagy csak csekély mértékben állnak rendelkezésre toxikológiai adatok, továbbá helyettesíthet két különálló vizsgálatot: az OECD 407. vizsgálati iránymutatásával egyenértékű (e melléklet B.7. fejezetében ismertetett) ismételt dózisú toxicitási vizsgálatot és az OECD 421. vizsgálati iránymutatásával egyenértékű (e melléklet B.63. fejezetében ismertetett) reprodukciós/fejlődési toxicitási vizsgálatot. Használható ezenkívül szélesebb körű reprodukciós/fejlődési vizsgálatok dózistartomány-kereső vizsgálataként és egyéb releváns esetekben.
11. Általában feltételezhető, hogy érzékenység tekintetében különbségek vannak a vemhes és nem vemhes állatok között. Következésképpen a két vizsgálat külön-külön történő elvégzéséhez képest e kombinált vizsgálat keretében bonyolultabb lehet meghatározni olyan dózisokat, amelyek egyaránt alkalmasak az általános szisztémás toxicitás és a specifikus reprodukciós/fejlődési toxicitás felmérésére. Emellett előfordulhat, hogy az önállóan végzett ismételt dózisú vizsgálatához viszonyítva a vizsgálati eredmények nehezebben értelmezhetők az általános szisztémás toxicitás szempontjából, különösen akkor, ha a vizsgálat során nem egy időben értékelik a szérumra és a kórszövettanra vonatkozó paramétereket. A kombinált szűrővizsgálat összetettebb jellege miatt annak végrehajtása jelentős tapasztalatot kíván a toxicitási vizsgálatok terén. xxxMásfelől viszont – amellett, hogy kevesebb számú kísérleti állat részvételét igényli – a kombinált vizsgálat hatékonyabb eszközt nyújthat a szaporodásra/fejlődésre gyakorolt közvetlen hatásoknak a másodlagos, egyéb (szisztémás) hatásoktól való elkülönítéséhez.
12. Ebben a vizsgálatban az adagolási időszak hosszabb az ismételt dózisú vizsgálat szokásos 28 napos időtartamánál. Ugyanakkor csoportonként mindkét nemből kevesebb állat szükséges a vizsgálatához ahhoz képest, mint amikor a reprodukciós/fejlődési toxicitási vizsgálat mellett végezik el a hagyományos 28 napos, ismételt dózisú vizsgálatot.
13. Ez a vizsgálati módszer a vizsgálati vegyi anyag orális adagolását feltételezi. Más beadási mód alkalmazása esetén szükség lehet a módszer kiigazítására.

14. A vizsgálati módszer tervezett szabályozási célt szolgáló adatgenerálás érdekében, keveréken történő alkalmazása előtt meg kell vizsgálni, hogy az megfelelő eredményeket biztosíthat-e erre a célra, és ha igen, miért. Ilyen megfontolások nem szükségesek, ha létezik a keverék vizsgálatára vonatkozó szabályozási követelmény.
15. A használt fogalmak meghatározását az 1. függelék tartalmazza.

A VIZSGÁLAT ELVE

16. A vizsgálati vegyi anyagot fokozatosan növekvő dózisokban kell adagolni hím és nőstény állatok több csoportjának. A hímeket legalább négy hétig kell kezelni, egészen a tervezett leölésüket megelőző napig (ez az időtartam magában foglalja a pároztatást megelőző minimum két hetet, a párzási időszakot, valamint a pároztatást követő mintegy két hetes időszakot). Tekintettel a hímek pároztatást megelőző rövid kezelési időszakára, előfordulhat, hogy a termékenység nem kifejezetten érzékeny mutatója a heretoxicitásnak. Ezért a heréken mindenképpen részletes szövettani vizsgálatot kell végezni. A pároztatást megelőző kétételes kezelési időszak és az azt követően a párzással/termékenységgel kapcsolatban tett megfigyelések, az összesen legalább négy hétig tartó kezelés, majd a hím ivarmirigyek részletes kórszövettani vizsgálata összességében elegendőnek bizonyulnak ahhoz, hogy kimutatható legyen a hím termékenységre és spermatogenezisre gyakorolt hatások többsége.
17. A nőstényeket a vizsgálat teljes időszaka alatt kezelni kell. Ez magában foglalja a párzást megelőző két hetes időszakot (amelynek célja, hogy lefedjen legalább két teljes ivari ciklust), a fogantatáshoz szükséges változó időtartamot, a vemhesség időszakát, az ellést követő legalább tizenhárom napot és a tervezett elpusztítást megelőző napig tartó további kezelést.
18. Az akklimatizációt és az ivari ciklus kezelés előtti felmérését követően megkezdett vizsgálat időtartama a nőstények teljesítményétől függően megközelítőleg 63 nap [legalább 14 napos pároztatás előtti időszak, (legfeljebb) 14 napos párzási időszak, 22 napos vemhesség és 13 napos szoptatás].
19. Az adagolási időszakban az állatokat a toxicitás jeleinek észlelése érdekében minden nap gondosan megfigyelik. A vizsgálat során elpusztult, illetve leölt állatokat felboncolják, illetőleg a vizsgálat befejezése után a túlélő állatokat is leölik és felboncolják.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Az állatfaj kiválasztása

20. Ezt a vizsgálati módszert patkányok használatára tervezték. Ha ebben a 422. vizsgálati iránymutatásban meghatározott paramétereket más rágcsálófajon vizsgálják, a döntést

részletesen indokolni kell. A 407. vizsgálati iránymutatás alapján végzett nemzetközi validációs programban a patkány volt az endokrin rendszert károsító anyagok kimutatására használt egyedüli faj. Nem szabad olyan törzseket alkalmazni, amelyek kevésbé termékenyek vagy amelyekben magas a fejlődési defektusok előfordulási gyakorisága. Korábban vizsgálatban még részt nem vett, egészséges szűz állatokat kell használni. A kísérleti állatokat faj, törzs, nem, súly és kor szerint kell jellemezni. A vizsgálat kezdetén az állatok tömege közötti eltérésnek minimálisnak kell lennie és nem haladhatja meg az ivaronkénti átlag ± 20 %-át. Ha a vizsgálatot egy hosszú távú vagy teljes generáción át tartó vizsgálat előzetes kísérleteként végzik, ajánlatos mindkét vizsgálatához ugyanabból a törzsből való, azonos eredetű állatokat használni.

Az állatok tartása és etetése

21. Minden eljárásnak meg kell felelnie a laboratóriumi állatgondozásra vonatkozó helyi szabványoknak. A kísérleti állatok tartására szolgáló helyiség hőmérsékletének 22°C -nak ($\pm 3^{\circ}$) kell lennie. A relatív páratartalomnak legalább 30 %-nak kell lennie, és a takarítás időtartamától eltekintve lehetőleg ne haladja meg a 70 %-ot. A világítás legyen mesterséges, 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást. Az etetéshez standard laboratóriumi takarmány alkalmazható, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett. A takarmány megválasztását a vizsgálati vegyi anyaggal való megfelelő keveredés igénye is befolyásolhatja, ha a vizsgálati vegyi anyagot a takarmánnyal adják be.
22. Az állatok azonos nemű egyedekből álló kisebb csoportokban tartandók; ha tudományos szempontból indokolt, az állatok egyedileg is elhelyezhetők. Ketreceben való csoportos elhelyezés esetén egy ketrecben legfeljebb öt állat tartható. A pároztatást erre a célra alkalmas ketrecekben kell végezni. A vemhes nőstényeket egyedileg kell elhelyezni, és el kell látni az alom kialakításához használt (fészeképítő) anyaggal. A szoptató nőstények és utódaik számára külön ketrecet kell biztosítani.
23. Rendszeresen ellenőrizni kell, hogy a takarmány nem tartalmaz-e szennyező anyagokat. A takarmányból egy mintát a jelentés véglegesítéséig meg kell őrizni.

Az állatok előkészítése

24. Az egészséges, fiatal, ivarérett állatokat véletlenszerű kiválasztás útján kell a kezelési csoportokba és ketrecekbe osztani. A ketreceket úgy kell elrendezni, hogy minimálisak legyenek a ketrec elhelyezéséből adódó esetleges hatások. Az állatokat az egyedi azonosíthatóság céljából megjelölik, és a vizsgálat megkezdése előtt legalább öt napig a ketrecükben tartják a laboratóriumi körülményekhez való szoktatás céljából.

A dózisok előkészítése

25. A vizsgálati vegyi anyagot ajánlatos orálisan adagolni, kivéve ha más beadási módot tartanak megfelelőbbnek. Orális adagolás esetén a vizsgálati vegyi anyag beadása általában

gyomorszondával történik; a vizsgálati vegyi anyagok azonban beadhatók a takarmánnyal vagy az ivóvízzel is.

26. A vizsgálati vegyi anyagot szükség esetén alkalmas vivőanyagban feloldják vagy szuszpendálják. Lehetőség szerint elsősorban vizes oldatot/emulziót ajánlatos alkalmazni, másodsorban olajos (például kukoricacsíra-olajban elkészített) oldatot vagy emulziót, és csak harmadsorban más vivőanyagokban elkészített oldatot. A víztől eltérő vivőanyagok esetében ismerni kell a vivőanyag toxikológiai tulajdonságait. Meg kell határozni továbbá azt is, hogy a vizsgálati vegyi anyag mennyire stabil és homogén az adott vivőanyagban.

ELJÁRÁS

Az állatok száma és neme

27. Az egyes csoportok kiindulási létszámát ajánlatos 10 hím és 12–13 nőstény egyedben meghatározni. Az expozíciót megelőzően felméri a nőstények ivari ciklusát, és a szokásos 4–5 naptól eltérő időtartamú ciklussal rendelkező állatokat nem használják a vizsgálatban; ezért célszerű néhány plusz nőstényről gondoskodni, hogy végül maradjon csoportonként 10 nőstény. Ha nem mutatkoznak jelentős toxikus tünetek, ezzel a létszámmal várhatóan csoportonként legalább 8 vemhes nőstény biztosítható, ami a vemhes nőstények csoportonkénti elfogadható számának alsó határértéke. A cél az, hogy megfelelő mennyiségű vemhesség és utód jöjjön létre ahhoz, hogy érdemileg fel lehessen mérni a vizsgálati vegyi anyag hatását a termékenységre, a vemhességre, az anyai és a szopási viselkedésre, valamint az F₁ utódnemzedék növekedésére és fejlődésére a fogantatástól az ellést követő 13. napig. Ha időközi leölést terveznek, a csoport létszámát a kísérlet során leölni szándékozott állatok számával meg kell növelni. Meg kell fontolni egy további, ivaronként öt állatból álló kísérő csoport alkalmazását a kontrollcsoportban és a legnagyobb adaggal kezelt csoportban, amelyen a kezelés időszakát követően legalább 14 napig megfigyelhető a szisztémás toxikus hatás visszafordíthatósága, tartóssága vagy késleltetett kialakulása. A kísérő csoportba tartozó állatok nem vesznek részt a pároztatásban, ezért nem használhatók a reprodukciós/fejlődési toxicitás értékelésére.

Adagolás

28. Általánosan 3 kezelt csoportot és egy kontrollcsoportot alkalmaznak. Ha nem állnak rendelkezésre megfelelő általános toxikológiai adatok, az alkalmazandó dózisok meghatározása céljából tartománybehatároló vizsgálat végezhető (azonos törzsből való, azonos eredetű állatokon). A kontrollcsoportba tartozó állatokat a vizsgálati vegyi anyag beadásától eltekintve ugyanolyan módon kell kezelni, mint a vizsgálati csoportokban lévőket. Ha a vizsgálati vegyi anyag beadásához vivőanyagot alkalmaznak, a kontrollcsoportnak a vivőanyagból a felhasznált legnagyobb mennyiséget kell kapnia.

29. A dózisok kiválasztásánál figyelembe veszik a toxicitásra és (toxiko)kinetikára vonatkozóan rendelkezésre álló adatokat. Emellett ügyelni kell arra is, hogy érzékenység tekintetében különbségek lehetnek a vemhes és nem vemhes állatok között. A legmagasabb dózist úgy kell kiválasztani, hogy az toxikus tüneteket keltsen, de ne okozzon halált vagy nyilvánvaló szenvedést a kísérleti állatoknak. Ezután az adagokat fokozatosan csökkentik, azzal a céllal, hogy kimutassák az adagolási szinttől függő hatásokat, illetve a legalacsonyabb adagolási szinten a káros hatások hiányát. Sokszor bizonyul optimálisnak a kettő–négyeszeres intervallum alkalmazása, a nagyon nagy intervallumok (pl. több mint 10-szeres szorzófaktor) alkalmazása helyett pedig gyakran célszerű egy negyedik vizsgálati csoportot beiktatni.
30. Ha általános toxicitást (például testsúlycsökkenést, a májra, a szívre, a tüdőre vagy a vesére kifejtett hatásokat stb.) vagy egyéb, nem feltétlenül toxikus reakcióra utaló változásokat (például csökkent táplálékfogyasztást, májmegnagyobbodást) figyelnek meg, az endokrin rendszer szempontjából érzékeny végpontok tekintetében megfigyelt hatások értelmezésekor óvatosan kell eljárni.

Határérték-vizsgálat

31. Ha egy egyetlen, legalább 1000 mg/testtömeg-kg/nap orális dózis felhasználásával végzett, vagy táplálékkal vagy ivóvízzel történő beadás esetén a táplálékban vagy ivóvízben ezzel egyenértékű (a testsúly alapján végzett számításokon alapuló) százalékos arány alkalmazásával történő és az itt ismertetett eljárások szerint lefolytatott vizsgálat nem idéz elő észlelhető toxikus hatást, és ha a szerkezet tekintetében rokon anyagokra vonatkozó adatok alapján nem is várható a toxicitás bekövetkezése, a teljes, több dózist átfogó tanulmány elvégzése szükségtelennek tekinthető. A határérték-vizsgálat alkalmazandó, kivéve, ha az emberi expozíció ennél nagyobb adagolási szint használatát indokolja. Más típusú beadási módok, így például inhalálás vagy dermális alkalmazás esetén a vizsgálati vegyi anyag fizikai-kémiai tulajdonságai gyakran előre jelezhetik az expozíció lehetséges maximumát.

A dózisok beadása

32. Az állatoknak a vizsgálati vegyi anyagot heti hét napon át, naponta adagolják. Ha a vizsgálati vegyi anyagot szondán át adagolják, lehetőleg egyetlen adagban kell gyomorszondán vagy megfelelő intubációs kanülön át beadni. Az egy alkalommal beadható folyadék maximális mennyisége a kísérleti állat méretétől függ. A térfogat nem haladhatja meg az 1 ml/100 g testtömegarányt, kivéve vizes oldatok esetében, amikor 2 ml/100 g testtömegarány is alkalmazható. A magasabb koncentrációértékek esetén rendszerint fokozottabb hatást kiváltó irritatív vagy korrozív vizsgálati vegyi anyagok kivételével a koncentráció megfelelő beállításával a minimálisra kell csökkenteni a vizsgálati vegyi anyag mennyiségének változásait, hogy a mennyiség valamennyi dózisonál konstans legyen.

33. A takarmánnyal vagy ivóvízzel adagolt vizsgálati vegyi anyagok esetében fontos annak biztosítása, hogy a vizsgálati vegyi anyag beadott mennyisége ne zavarja meg a szokásos táplálékfelvételt vagy a vízháztartás egyensúlyát. Ha a vizsgálati vegyi anyagot a táplálékkal együtt adják be, vagy állandó koncentrációban (ppm) keverik be, vagy az állat testsúlyától függő, állandó nagyságú dózisban adagolják; a kiválasztott alternatívát meg kell nevezni. A gyomorszondával bejuttatott vizsgálati vegyi anyagok esetében a dózist mindig a nap hasonló időszakában kell beadni, és legalább hetente újra be kell állítani ahhoz, hogy az állat testtömegéhez viszonyítva állandó értéken lehessen tartani. Ha a kombinált vizsgálatot egy hosszan tartó vagy teljes generáción át tartó toxicitási vizsgálat előkísérleteként végzik, a két vizsgálatban azonos étrendet alkalmaznak.

A kísérleti program

34. Az adagolást mindkét ivar esetében 2 héttel a pároztatás előtt el kell kezdeni, miután az állatok legalább öt napon keresztül akklimatizálódtak, és (egy kéthetes kezelés előtti időszak során) ellenőrizték, hogy a nőtények ivari ciklusa megfelel-e a normál ciklusidőnek. A vizsgálatot úgy kell időzíteni, hogy az ivari ciklus értékelése röviddel a teljes ivarérettség elérését követően megkezdődjön. Ez az egyes laboratóriumokban használt különféle patkánytörzsek függvényében némileg változó, a Sprague-Dawley törzsbe tartozó patkányok esetében például 10 hetes korukban, a Wistar-törzsbe tartozók esetében pedig 12 hetes korukban következik be. Az utódokkal rendelkező anyaállatokat az ellést követő 13. napon vagy röviddel azután el kell pusztítani. Annak érdekében, hogy a vérvétel előtti éjszaka koplaljanak az anyaállatok (ha ez a kiválasztott módszer), nem feltétlenül szükséges ugyanazon a napon elpusztítani az anyaállatot és utódait. A születés napja (vagyis amikor lezárul az ellés) a post-partum 0. napja. Azokat a nőtényeket, amelyek semmi jelét nem mutatják annak, hogy párosodtak volna, a párzási időszak utolsó napját követő 24–26 nappal el kell pusztítani. Az adagolást a párzási időszakban sem szabad abbahagyni egyik nem esetében sem. A hímeket a párzási időszakot követően továbbra is kezelni kell, legalább a minimális, 28 napos adagolási időszak végéig. Ezt követően leölik, vagy ha úgy ítélik megfelelőnek, megtartják azokat, és egy esetleges második pároztatás céljából tovább folytatják kezelésüket.
35. Az anyaállatok napi szintű kezelését folytatni kell a vemhesség teljes időszakán át egészen a post-partum 13. napjáig vagy az elpusztításukat megelőző napig. Azon vizsgálatoknál, amelyek keretében a vizsgálati vegyi anyagot inhalálás vagy dermális alkalmazás útján adják be, a kezelést folytatni kell legalább a vemhesség 19. napjáig, majd a lehető leghamarabb, de legkésőbb a 4. posztnatális napon (PNN) újra kell kezdeni.
36. Amennyiben vizsgálatot követő megfigyelés céljából létrehoztak kísérő csoportot, a csoportba tartozó állatok nem vesznek részt a pároztatásban. Ezeket az állatokat az anyaállatok első tervezett leölését követően még legalább 14 napig tartják kezelés nélkül,

hogy megfigyeljék a toxikus hatások késleltetett előfordulását, fennmaradását vagy visszafordíthatóságát.

37. A kísérleti ütemterv ábráját a 2. függelék tartalmazza.

Ivari ciklus

38. A kezelés megkezdése előtt ellenőrizni kell az ivari ciklust, hogy szabályos ciklussal rendelkező nőtények kerüljenek kiválasztásra a vizsgálatához (lásd a 27. pontot). Emellett napi szinten kell vizsgálni a hüvelyi kenetet is, a kezelési időszak kezdetétől mindaddig, amíg be nem bizonyosodik, hogy megtörtént a párzás. Ha felmerül a lehetősége annak, hogy az adagolás megkezdése olyan akut stresszhatást idéz elő, amely módosíthatja az ivari ciklust, a laboratóriumok eljárhatnak úgy is, hogy két hétig kezelik a vizsgálati állatokat, majd a pároztatás előtti időszakban legalább két hétig naponta hüvelyi kenetet vesznek az ivari ciklus ellenőrzéséhez, amelyet a párzási időszak során is folyamatosan figyelemmel kísérnek egészen a párzás megtörténteig. A hüvelyi/méhnyaki sejtvételek során ügyelni kell arra, hogy meg ne sérüljön a nyálkahártya, mert az álvemhességet idézhet elő (8) (9).

A pároztatási eljárás

39. Rendes esetben a vizsgálat során 1:1 (egy hím-egy nőtény) pároztatást kell alkalmazni. Ettől abban az esetben lehet eltekinteni, ha a hímek közül elpusztul valamelyik. A nőtényt egy adott hímmel kell összerakni, és addig kell együtt hagyni azokat, amíg meg nem győződtek a párzás megtörténtéről, vagy 2 hét el nem telik. Minden reggel meg kell vizsgálni, hogy a nőtényben észlelhető-e sperma vagy a hüvelydugó. A vemhesség 0. napja definíció szerint az a nap, amikor a párosodás tényét megerősítették (hüvelydugó vagy sperma figyelhető meg a nőtényben). Ha a pároztatás sikertelen volt, fontolóra lehet venni a nőtények újrapároztatását egy azonos csoportbeli és már sikeresen pároztatott hímmel.

Az alom mérete

40. Az ellés utáni negyedik napon az egyes almok egyedszáma a létszám fölötti kölykök véletlenszerű eltávolításával módosítható, hogy almonként az eredmény – amennyire lehetséges – a használt patkánytörzsre jellemző ivaronkénti négy vagy öt utód legyen. Két létszám feletti kölyöktől vérmintát kell venni, egybe kell gyűjteni és fel kell használni a T4 szérumszintek meghatározásához. A kölykök szelektív, például a testtömeg vagy az anogenitális távolság (AGD) alapján történő eltávolítása nem elfogadható. Ha a hím és nőtény utódok száma nem teszi lehetővé a nemenként négy vagy öt azonos nemű utódot tartalmazó almok kialakítását, részleges kiegyenlítés is elfogadható (például hat hím és négy nőtény). Amennyiben az alom egyedszáma a selejtezési célérték (almonként 8 vagy 10 utód) alá csökkenne, nem kell eltávolítani kölyköket. Ha az alom mérete csupán eggyel

haladja meg a selejtezési célértéket, csak egy kölyköt távolítanak el, és attól vesznek vért a T4 szérumszintek esetleges értékelésekhez.

41. Ha nem igazítják ki az alom egyedszámát, az ellést követő 4. napon almonként két kölyköt elpusztítanak, és vérmintát vesznek tőlük a pajzsmirigyhormonok szérumkoncentrációjának méréséhez. Lehetőség szerint az almonkénti két kölyök nőtény legyen, hogy maradjanak hímek az emlőbimbó-visszamaradás megállapításához, kivéve abban az esetben, ha a nőtény utódok eltávolítása miatt nem maradna nőtény a vizsgálat végi értékeléshez. Amennyiben az egyedszám az almonkénti 8 vagy 10 utód alá esne (a használt patkánytörzsre jellemző szokásos alommérettől függően), nem kell eltávolítani kölyköket. Ha az alom egyedszáma csupán eggyel haladja meg az alom szokásos méretét, csak egy kölyköt távolítanak el, és attól vesznek vért a T4 szérumszintek esetleges értékelésekhez.

Megfigyelések

42. Naponta legalább egyszer, lehetőleg minden nap ugyanazon időpont(ok)ban általános klinikai megfigyelést kell végezni, figyelembe véve az adagolást követően várható hatások érvényesülésének csúcsidőszakát. Fel kell jegyezni a kísérleti állatok klinikai állapotát. Naponta legalább kétszer meg kell vizsgálni az összes állatot morbiditás és mortalitás szempontjából.
43. Az első expozíció előtt egyszer (az egyedek közötti összehasonlítás érdekében), azt követően pedig legalább hetente egyszer az összes szülőt részletes klinikai vizsgálatoknak kell alávetni. E megfigyeléseket azokon a ketrecekön kívül, ahol egyébként tartják őket, lehetőleg egy szabványos karámban, minden alkalommal a nap hasonló időszakában végzik el. A megfigyeléseket gondosan feljegyzik; lehetőleg a vizsgálatot végző laboratórium által meghatározott pontozásos rendszer segítségével. Törekedni kell arra, hogy minimálisak legyenek a kísérleti körülmények közötti eltérések, és hogy a megfigyeléseket lehetőleg olyan megfigyelők végezzék, akik nem tudnak a kezelésről. A feljegyzett észleléseknek ki kell terjedniük többek között a bőr, a szőrzet, a szemek és a nyálkahártyák állapota, a váladékok és kiválasztott anyagok előfordulása, valamint az autonóm aktivitás (például könnyezés, szőrzet felborzolódása, pupillaméret, szokatlan légzési ritmusok) tekintetében megfigyelhető változásokra. A járás, a testtartás és a kézbevételre adott reakció megváltozását, valamint a klónusos vagy tónusos görcsök, sztereotip viselkedés (például túlzott mosdás, megkergülés), az elhúzódó vagy nehéz ellés, illetve bármilyen bizarr viselkedésmód (például öncsonkítás, hátrafelé járás) megfigyelt eseteit is fel kell jegyezni (10).
44. A vizsgálat során egy alkalommal minden csoportból véletlenszerűen kiválasztott öt hímen és öt nőtényen meg kell figyelni a különféle (pl. hallószervi, vizuális, proprioceptív) ingerekre adott szenzoros reaktivitást (8) (9) (11), meg kell mérni a fogóerőt (12) és értékelni kell a motoros aktivitást (13). A követendő eljárásokkal kapcsolatban további

részletek a vonatkozó szakirodalomban találhatók. Ettől függetlenül a hivatkozottaktól eltérő alternatív eljárások is alkalmazhatók. A hímek esetében ezeket a funkcionális megfigyeléseket az adagolási időszak vége felé, röviddel tervezett leölésük előtt, de még a hematológiai és klinikai kémiai célú vérvételt megelőzően kell elvégezni (lásd az 53–56. pontot és az 1. lábjegyzetet). A nőstényeknek fiziológiai szempontból hasonló állapotban kell lenniük a funkcionális vizsgálatok során, ezért célszerű vizsgálatukat röviddel tervezett leölésük előtt, a szoptatás utolsó hetében elvégezni (pl. a 6–13. szoptatási napon). Törekedni kell arra, hogy az anyaállatok és kölykeik a lehető legrövidebb ideig legyenek elválasztva egymástól.

45. A vizsgálat vége felé esedékes, egyszeri funkcionális megfigyelések elhagyhatók, ha a vizsgálatot egy azt követő (90 napos) szubkrónikus vagy hosszú távú vizsgálat előzetes tanulmányaként végzik. Ebben az esetben a funkcionális megfigyeléseket az utóbbi vizsgálat részeként kell elvégezni. Másrészt az ismételt dózisú vizsgálat során végzett funkcionális megfigyelések adatainak megléte segítheti az azt követő szubkrónikus vagy hosszú távú vizsgálat során a dózisok kiválasztását.
46. Kivételes esetekben a funkcionális megfigyelések elhagyhatók azon csoportoknál is, amelyek egyébként olyan mértékű toxicitási tüneteket mutatnak, hogy az jelentős mértékben megzavarná a funkcionális vizsgálat eredményeit.
47. A vemhesség nulladik napjától számítandó terhességi (gesztációs) időszakról feljegyzést kell készíteni. Az ellés után minden almot a lehető leghamarabb meg kell vizsgálni a kölykök számának és ivarának, a halvaszületések, élveszületések és fejletlen egyedek (a megfelelő kontrollcsoportba tartozó kölyköknél jelentősen kisebb utódok) számának, valamint a súlyos rendellenességek jelenlétének megállapításához.
48. Az élő kölyköket meg kell számolni, nemüket meg kell állapítani, és az almok egyedeinek súlyát meg kell mérni a születést követő 24 órán belül (a post-partum 0. vagy 1. napján) és legalább a post-partum 4. és 13. napján. A szülőkön végzett (43. és 44. pontban említett) megfigyelések mellett az utódok minden rendellenes viselkedéséről be kell számolni.
49. Az anogenitális távolságot (AGD) minden utódon legalább egy alkalommal meg kell mérni a 0. és 4. posztnatális nap között. A kölykök testtömegét azon a napon kell megmérni, amikor az AGD-t is mérik, és az AGD-t normálni kell a kölykök méretére, ami lehetőleg a testtömeg köbgyöke (14). Az OECD 151. vizsgálati iránymutatásának (15) ajánlása szerint a hím utódok emlőbimbóinak/emlőbimbóudvarainak számát meg kell számolni a 12. vagy 13. posztnatális napon.

Testtömeg és táplálék-/vízfogyasztás

50. A hímek és nőstények testsúlyát meg kell mérni az adagolás első napján, majd ezt követően legalább hetente és a vizsgálat végén meg kell ismételni a mérést. A nőstényeket a vemhesség alatt a 0., 7., 14. és 20. napon kell megmérni, továbbá az ellést követő 24 órán

belül (a post-partum 0. vagy 1. napján) és legalább a post-partum 4. és 13. napján. A megfigyeléseket minden egyes felnőtt állat esetében külön-külön kell rögzíteni.

51. A pároztatás előtt, valamint a vemhesség és a szoptatás ideje alatt a takarmányfogyasztást legalább hetente kell mérni. A párzási időszak során nem kell feltétlenül mérni a takarmányfogyasztást. Ha a vizsgálati vegyi anyagot az ivóvízzel adagolják, ezen időszakok során a vízfogyasztást is mérni kell.

Hematológia

52. A vizsgálat során egy alkalommal minden csoportból véletlenszerűen kiválasztott öt hímen és öt nőtényen el kell végezni az alábbi hematológiai vizsgálatokat: hematokrit, hemoglobin koncentrációk, vörösvértestsám, retikulocitaszám, leukocitaszám (teljes és differenciált vérkép), trombocitaszám és a véralvadási idő/képesség mérése. Ha a vizsgálati vegyi anyagról vagy annak vélt metabolitjairól ismert vagy feltételezhető, hogy oxidáló tulajdonságokkal rendelkeznek, az említett vizsgálatokon kívül többek között a methemoglobin-koncentrációt és a Heinz-testek előfordulását is meg kell határozni.
53. A vérmintákat egy megnevezett helyről kell levenni. A nőtényeknek fiziológiai szempontból hasonló állapotban kell lenniük a vérvétel során. A vemhesség kialakulásának eltérő időpontjából adódó gyakorlati nehézségek elkerülése érdekében a nőtényektől a pároztatás előtti időszak végén is vehető vérminta ahelyett, hogy közvetlenül az állatok elaltatása előtt vagy az elaltatási folyamat részeként vennék le a mintát. A hímektől viszont célszerű közvetlenül az állatok végleges elaltatása előtt vagy az elaltatási folyamat részeként vérmintát venni. Alternatív megoldásként a hímektől is vehető vér a pároztatás előtti időszak végén, amennyiben a nőtények esetén is ez az időpont került kiválasztásra.
54. A vérmintákat megfelelő feltételek mellett kell tárolni.

Klinikai biokémiai vizsgálatok

55. A szövetekben jelentkező fontosabb toxikus hatások és különösen a vesékre és a májra gyakorolt hatás vizsgálata érdekében a klinikai biokémiai értékek meghatározását az egyes csoportokból kiválasztott öt hím és öt nőtény vérmintáján végzik el. A vérvétel előtti éjszaka ajánlatos az állatokat koplaltatni¹. A vérplazma- és vérszérum-meghatározások

¹ Bizonyos szérum- és plazmavizsgálatok, főleg a glükóz meghatározása esetén ajánlatos a vizsgálat előtti éjszaka koplaltatni az állatokat. Ennek fő indoka az, hogy a vizsgálatokat megelőző koplaltatás mellőzése szükségszerűen növelné a kapott eredmények variabilitását, ami így megnehezítené a kevésbé jellegzetes hatások felismerését és értelmezését. Más oldalról megközelítve a kérdést, azt is el kell ismerni, hogy az éjszakai koplaltatás befolyásolja a (vemhes) állatok rendes anyagcseréjét, zavarólag hat a szoptatási és gondozási viselkedésre, és különösen azon vizsgálatok esetében, ahol a vizsgálati vegyi anyagot a táplálékkal

során vizsgálandó elemek: nátrium, kálium, vércukor, összkoleszterin, karbamid, kreatinin, összprotein és albumin, továbbá legalább két, a májsejti hatásokat jelző enzim (pl. alanin-aminotranszferáz, aszpartát-aminotranszferáz és szorbitol dehidrogenáz) és epesavak. Bizonyos körülmények között hasznos információk nyerhetők további (májból vagy máshonnan származó) enzimek, valamint a bilirubin méréséből.

56. Vérmintákat egy meghatározott helyről kell venni, az alábbi ütemezés szerint:

- almonként legalább két kölyöktől a születést követő 4. napon, amennyiben azt az utódok száma lehetővé teszi (lásd a 40–41. pontot),
- az összes anyaállattól és almonként legalább két kölyöktől a vizsgálat végét jelentő 13. napon, és
- az összes felnőtt hímtől a vizsgálat végén.

A vérmintákat megfelelő körülmények között tárolják. A 13 napos utódoktól és a felnőtt hímeiktől vett vérminták alapján értékelik a pajzsmirigyhormon (T4) szérumszinteket. Szükség esetén a T4 további értékeléséhez felhasználhatók az anyaállatoktól és a 4 napos utódoktól vett vérminták. Ha a vizsgálat szempontjából lényeges, más hormonok is mérhetők. A pajzsmirigyhormon analízisekhez almonként egyesíteni lehet a kölyköktől vett vérmintákat. A pajzsmirigyhormonokra (T4 és TSH) vonatkozó mérésekhez lehetőleg a teljes vérmintát kell használni.

57. Kiegészítésként, a vizsgálat utolsó hetében, amikor a vizeletet előre meghatározott időpontokban gyűjtik, az alábbi vizeletminta-vizsgálatokat lehet elvégezni az egyes csoportokból véletlenszerűen kiválasztott öt hím tekintetében: megjelenés, mennyiség, ozmolalitás vagy fajsúly, pH-érték, fehérjék, glukóz és vér/vérsejtek.

58. Ezeken túlmenően megfontolható az általános szöveti roncsolódás szérummarkereinek vizsgálata. Más vizsgálatokat is elvégeznek, ha a vizsgálati vegyi anyagnak ismert vagy feltételezhető hatása van a kapcsolódó anyagcsere-folyamatokra; ilyen pl. a kalcium, a foszfát, éhgyomorra mért triglicerid és glukóz, egyes hormonok, a methemoglobin és a kolinészteráz mérése. Ezeket eseti alapon kell meghatározni.

adagolják, és zavarhatja a vizsgálati vegyi anyaggal való napi kezelést. Ha az éjszakai koplaltatás mellett döntenek, a klinikai biokémiai paramétereket a hímekkel végzett vizsgálat negyedik hetében, a funkcionális megfigyeléseket követően kell meghatározni. Az anyaállatokat a kölykök például 13. posztnatális napon történő eltávolítását követően még egy további napig meg kell tartani. Az anyaállatokat a szoptatás 13–14. napjától koplaltatni kell éjszakánként, és a leöléskor levett vérmintájukat kell felhasználni a klinikai kémiai paraméterek meghatározásához.

59. A hormonok meghatározásának variabilitását és az azzal kapott abszolút koncentrációt az alábbi tényezők befolyásolhatják:
- az elpusztítás időpontja, tekintettel a hormonkoncentrációk nap folyamán tapasztalható ingadozására,
 - az állatot érő indokolatlan stressz elkerülése érdekében alkalmazott elpusztítási mód, amely hatással lehet a hormonkoncentrációkra,
 - a hormonmeghatározásokhoz alkalmazott, standard görbéjük tekintetében esetlegesen eltérő vizsgálati készletek.
60. A kifejezetten hormon-meghatározási célra szánt plazmamintákat a nap hasonló időpontjában kell gyűjteni. A kereskedelmi fogalomban kapható különböző vizsgálati készletek eltérő számszerű értékeket adnak a hormonkoncentrációk elemzése során.
61. Ha a rendelkezésre álló kiinduló adatok nem bizonyulnak elegendőnek, megfontolandó a hematológiai és klinikai biokémiai változók meghatározása az adagolás kezdete előtt, lehetőség szerint az állatok egy, a kísérleti csoportokba nem tartozó csoportjánál. Nőstények esetében az adatok szoptató anyaállatokról kell származzanak.

PATOLÓGIA

Makroszkópos boncolás

62. A vizsgálatokba bevont összes ivarérett állatot teljes körű, beható autopsziának kell alávetni, ideértve a következők alapos vizsgálatát: a test külső felszíne, az összes testnyílás, a koponya, a mellüreg, a hasüreg és ezek tartalma. Külön figyelmet kell szentelni a szaporítószerveknek. A beágyazódási helyek számát fel kell jegyezni. A boncolás napján meg kell vizsgálni a hüvelyi kenetet az ivari ciklus aktuális szakaszának meghatározásához, hogy lehetővé váljon a korreláció felállítása a női szaporítószervek kórszövettanával.
63. Az összes hím felnőtt állat heréit és mellékheréit, prosztatáját és ondóhólyagjait a koaguláló mirigyekkel egy egységként meg kell tisztítani minden rátapadt szövetről, és a kiszáradás megelőzése érdekében a boncolást követően a lehető legrövidebb időn belül meg kell mérni nedves tömegüket. Ezen túlmenően további szervtömegmérések végezhetők hímeknél a végbélemelő és a bulbocavernosus izomra, a Cowper-mirigyekre és a glans penisre, nőstényeknél a páros petefészkekre (nedves tömeg) és a méhre (valamint a méhnyakra) kiterjedőleg; ha ezeket a szerveket is bevonják a mérésbe, tömegüket a boncolás után lehető leghamarabb meg kell határozni. Meg kell őrizni az összes felnőtt állat petefészkeit, heréit, mellékheréit, a járulékos ivarszerveket, valamint a makroszkópikus léziókat mutató szerveket.

64. Ezenfelül a későbbi tervezett kórszövettani vizsgálatok szempontjából leginkább megfelelő fixálószerben meg kell őrizni valamennyi felnőtt hím és nőtény, továbbá minden alomból egy hím és egy nőtény 13 napos kölyök pajzsmirigyét. A pajzsmirigy súlya a fixálást követően is meghatározható. A megtisztítás a szövethárosodás elkerülése érdekében ez esetben is igen óvatosan, kizárólag a fixálást követően végzendő el. A szövethárosodás veszélyeztetheti a kórszövettani elemzést. A vérmintákat egy megnevezett helyről kell venni, közvetlenül az állatok végleges elaltatása előtt vagy aközben, és azokat megfelelő körülmények között kell tárolni (lásd a 56. pontot).
65. Ezen túlmenően (a haldokló és/vagy a vizsgálat vége előtt elaltatott egyedeken kívül) minden csoportból véletlenszerűen kiválasztott legalább öt felnőtt hím és nőtény máját, veséit, mellékveséit, csecsemőmirigyét, lépét, agyát és szívét megtisztítják minden rátapadt szövettől, és a kiszáradás megelőzése érdekében a boncolást követő lehető legrövidebb időn belül megméri nedves tömegüket. Az alábbi testszöveteket konzerválni kell a szövetek típusa és a szándékolt későbbi kórszövettani vizsgálatok szempontjából legmegfelelőbb fixálószerben: szövetet, amelyen van makroszkopikus lézió, az agyat (jellemző részeket, mint pl. a nagyagy, a kisagy, a nyúltagyi híd), a gerincvelőt, a szemet, a gyomrot, a vékony- és vastagbelet (beleértve a Payer-plakkot), a májat, a veséket, a mellékveséket, a lépét, a szívét, a csecsemőmirigyét, a légcsövet és a tüdőt (utóbbit először megtöltik fixálószerrel, és úgy merítik alá), az ivarmirigyeket (heréket és petefészkeket), a járulékos nemi szerveket (a méhet és a méhnyakat, a mellékheréket, a prosztátát és az ondóhólyagokat a koaguláló mirigyekkel), a hüvelyt, a húghólyagot, a nyirokcsomókat (a legközelebbi elvezető nyirokcsomó mellett a laboratórium tapasztalata alapján másik nyirokcsomót is vételezni kell (16)), a perifériás idegeket (csípő vagy sípcsont környéki), lehetőleg az izomzathoz közeli helyről véve, a vázizomzatot és csontot a csontvelővel együtt (metszetet és/vagy egy, friss csontvelőből felszívott mintát). A herék fixálását javasolt Bouin- vagy módosított Davidson-féle fixálószerbe merítéssel végezni (16) (17) (18); e szövetek esetében formalinos fixálás használata nem ajánlott. A tunica albugineán a fixálószer gyors bejutása érdekében túlvá óvatosan sekély szúrást lehet ejteni a szerv mindkét végén. A klinikai és más jellegű megfigyelések alapján további testszövetek vizsgálata is szükséges lehet. A fentieken túl meg kell őrizni minden olyan más szervet is, amely a vizsgálati vegyi anyag ismert tulajdonságai alapján valószínűleg célszervnek tekinthető.
66. Az alábbi szövetek értékes információkat nyújthatnak az endokrin rendszerre gyakorolt hatásokról: ivarmirigyek (petefészkek és herék), járulékos ivarszervek (méh és méhnyak, mellékherék, ondóhólyagok a koaguláló mirigyekkel, a prosztata dorzolaterális és ventrális része), hüvely, agyalapi mirigy, hím emlőmirigy és mellékvese. A hím emlőmirigyek elváltozásairól nem áll rendelkezésre kellő dokumentáció, azonban ez a paraméter igen érzékeny lehet az ösztrogénhatású anyagokra. A 65. pontban nem szereplő szervek/szövetek megfigyelése nem kötelező.

67. Az elhullott és a post-partum 13. napján vagy röviddel azután elpusztított utódokat legalább külsőleg alaposan meg kell vizsgálni, hogy láthatók-e rajtuk súlyos rendellenességek. Különös figyelmet kell szentelni a külső ivarszervek vizsgálatának, és ezen belül a rendellenes fejlődés jeleinek.

Kórszövettan

68. A kontrollcsoport és a magas dózissal kezelt csoport kiválasztott egyedeinek tartósított szerveit és szöveteit teljes kórszövettani vizsgálatnak vetik alá (különös figyelmet fordítva a hím ivarmirigyek spermatogenezisének szakaszaira és a here intersticiális sejtfelépítésének kórszövettanára). Szükség esetén vizsgálni lehet az utódoktól és a fennmaradó felnőtt állatoktól származó pajzsmirigyet. Ha a magas dózissal kezelt csoport egyedei esetében a kezelésnek tulajdonítható elváltozások figyelhetők meg, e vizsgálatokat ki kell terjeszteni más dózissal kezelt csoportok egyedeire is. A kórszövettani iránymutatás (10) további információkat tartalmaz az endokrin szövetek boncolásával, fixálásával, metszeteinek elkészítésével és kórszövettani vizsgálatával kapcsolatban.
69. Minden makroszkopikus léziót meg kell vizsgálni. A NOAEL értelmezéséhez segítséget nyújthat más dózissal kezelt csoportokból származó célszervek vizsgálata, különösen azokból, amelyekben a kezelés állítólag nem járt káros hatással.
70. Kísérő csoport használata esetén azon szerveken és szöveteken kell kórszövettani vizsgálatot végezni, amelyeknél a kezelt csoportok egyedei esetében elváltozásokat lehetett kimutatni.

ADATOK ÉS JELENTÉS

Adatok

71. Az állatokra vonatkozóan egyedi adatsorokat kell felvenni. Emellett minden adatot táblázatos formában is össze kell foglalni, amelyben minden egyes vizsgálati csoport esetében fel kell tüntetni az állatok számát a vizsgálat kezdetén, a vizsgálat során elpusztult vagy humánus okok miatt elaltatott állatok számát, az elhullások és az eutanáziák időpontját, a termékeny állatok számát, a vemhes nőstények számát, a toxicitás jeleit mutató állatok számát, a megfigyelt toxicitási tünetek leírását, ezen belül bármely toxikus tünet megjelenésének időpontját, valamint ezek időtartamát és súlyosságát, a kórszövettani elváltozások típusait és az almokra vonatkozó minden idevágó adatot. A 3. mellékletben közzéteszünk egy, a reprodukciós/fejlődési hatások értékelése során nagyon hasznosnak bizonyult, táblázatos formájú összefoglaló jelentést.
72. A számszerű eredményeket lehetőség szerint megfelelő és általánosan elfogadott statisztikai módszer alkalmazásával kell kiértékelni. A hatás dózistartomány mentén történő összehasonlításaival kiküszöbölhető a több t-próba alkalmazása. A statisztikai módszereket a vizsgálat tervezésekor kell megválasztani. Az anogenitális távolság és az

emlőbimbó-visszamaradás statisztikai elemzésének az utódokra vonatkozó egyedi adatokon kell alapulnia, ugyanakkor figyelembe kell venni az alom által gyakorolt hatásokat. Ahol megfelelő, az elemzés egysége az alom. A kölykök testsúlyára vonatkozó statisztikai elemzésnek a kölykök egyedi adatain kell alapulnia, ugyanakkor figyelembe kell venni az alom által gyakorolt hatásokat. A vizsgálat korlátozott terjedelme miatt a „szignifikancia” felmérésére szolgáló vizsgálatok formájában végzett statisztikai elemzések számos végpont, különösen a reprodukciós végpontok szempontjából csekély jelentőséggel bírnak. A legelterjedtebb módszerek némelyike – különösen a központi érték mérésére szolgáló paraméteres próbák – nem megfelelők. Amennyiben statisztikai elemzésekre támaszkodnak, még a vizsgálat megkezdése előtt olyan módszert kell választani, amelyik megfelel a vizsgált változók eloszlásának.

Az eredmények értékelése

73. E toxicitási vizsgálat eredményeit a megfigyelt hatások, valamint a boncolási és mikroszkópos eredmények szempontjából kell értékelni. Az értékelés során ki kell térni a vizsgálati vegyi anyag dózisa és a rendellenességek, ezen belül a súlyos léziók, az azonosított célszervek, a terméketlenség, a klinikai rendellenességek, a csökkent reprodukív teljesítmény és egyedszám, a testtömegváltozások, a mortalitásra gyakorolt hatások és egyéb toxikus hatások megléte vagy hiánya, illetve gyakorisága és súlyossága közötti összefüggésekre.
74. A hímek rövid kezelési időszaka miatt a hímekre gyakorolt reprodukciós hatások felmérése során figyelembe kell venni a herék és mellékherék kórszövettanát, valamint a termékenységre vonatkozó adatokat. A szaporodásra/fejlődésre (pl. alomméretre, anogenitális távolságra, emlőbimbó-visszamaradásra, T4 szérumszintekre) vonatkozólag rendelkezésre álló korábbi kontrolladatok szintén hasznos segítséget nyújthatnak a vizsgálat értelmezéséhez.
75. A minőség-ellenőrzéshez javasolt történeti kontrolladatokat gyűjteni, a számszerű adatokhoz pedig kiszámítani a variációs együtthatót, különösen az endokrin rendszert károsító anyagok kimutatásával összefüggő paraméterek tekintetében. Ezek az adatok felhasználhatók összehasonlítási célokra a tényleges vizsgálatok kiértékelése során.

Vizsgálati jelentés

76. A vizsgálati jelentésnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálati vegyi anyag:

- eredet, gyártási szám, felhasználási határidő, ha rendelkezésre áll;
- a vizsgálati vegyi anyag stabilitása, ha ismert;

Egy összetevőből álló anyag:

- fizikai megjelenés, vízdékonyság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok;
- kémiai azonosítás, például IUPAC- vagy CAS-névvel, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet alapján, tisztaság, adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb. alapján

Több összetevőből álló anyag, UVCB-k és keverékek:

- amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosítója (lásd fent), mennyiségi előfordulása és releváns fizikai-kémiai tulajdonságai révén jellemezve.

Vivőanyag (ha van):

- a vivőanyag kiválasztásának indokolása, ha az nem víz.

Kísérleti állatok:

- használt faj/törzs;
- az állatok száma, kora és neme;
- az állatok származása, tartási körülmények, takarmány stb.;
- az egyes állatok testtömege a vizsgálat kezdetekor;
- patkánytól eltérő faj alkalmazásának indokolása.

Vizsgálati körülmények:

- a dózisok kiválasztásának indokolása;
- a vizsgálati vegyi anyag formulázásával/a takarmány előkészítésével, az elért koncentrációval, a készítmény stabilitásával és homogenitásával kapcsolatos adatok;
- a vizsgálati vegyi anyag beadására vonatkozó részletek;
- átszámítás a vizsgálati vegyi anyagnak a takarmányban/ivóvízben meglévő koncentrációjáról (ppm) a tényleges dózissá (mg/kg testsúly/nap), ha ez alkalmazható;
- a táplálék és víz minőségére vonatkozó részletek;
- a selejtezés során a kölykök kiválasztására használt randomizálási eljárás részletes leírása, ha sor került selejtezésre.

Eredmények:

- testsúly és annak változásai;
- táplálék- és vízfogyasztásra vonatkozó adatok, ha alkalmazható;
- a toxikus reakciók adatai nemenként és dózisonként, beleértve a termékenységet, a gesztációs időt és a toxicitás egyéb
- tüneteit is;

- a vemhesség időtartama;
- a szaporodásra, az utódokra, a posztnatális növekedésre stb. gyakorolt toxikus vagy egyéb hatások;
- a klinikai megfigyelések jellege, súlyossága és időtartama (a változások visszafordíthatók-e vagy sem);
- az érzékszervi aktivitás, a szorítási erősség és a motoros aktivitás értékelése;
- hematológiai vizsgálatok eredményei, a megfelelő viszonyítási értékekkel;
- a klinikai biokémiai vizsgálatok eredményei, a megfelelő viszonyítási értékekkel;
- normális vagy abnormális ivari ciklust mutató felnőtt nőstények száma és a ciklus időtartama;
- az élveszületések száma és a beágyazódás utáni veszteség;
- a szemmel látható rendellenességeket mutató kölykök száma; a külső nemi szervek makroszkopikus értékelése, a fejletlen utódok száma;
- a vizsgálat során bekövetkezett elhullás ideje, illetve hogy az állatok megélték-e a vizsgálat végét;
- a beágyazódások száma, az alomméret és az almokban lévő egyedek méréskor rögzített testsúlya;
- utódok testsúlyadatai;
- az összes utód anogenitális távolsága (és az AGD-mérés napján rögzített testsúlyuk);
- emlőbimbó-visszamaradás a hím utódoknál;
- pajzsmirigyhormonok szintje 13 napos kölyköknél és felnőtt hímeknél (az anyaállatoknál és 4 napos kölyköknél,
- ha mérték);
- a testtömeg az elpusztításakor, valamint a szülők szervtömegadatai;
- boncolási eredmények;
- a kórszövettani leletek részletes ismertetése;
- felszívódási adatok (ha vannak);
- adott esetben az eredmények statisztikai feldolgozása.

Az eredmények értékelése.

Következtetések

Az eredmények értelmezése

77. Ez a vizsgálat az ismételt dózisok útján történő kezeléssel összefüggésben kimutatható reprodukciós/fejlődési toxicitás értékelésére szolgál. Különösen mivel mind az általános toxicitási, mind a reprodukciós/fejlődési végpontokra hangsúlyt fektetnek, a vizsgálat eredményei lehetővé teszik az általános toxicitás hiányában is fellépő reprodukciós/fejlődési hatások megkülönböztetését azoktól, amelyek csak a szülőkre is toxikus szintek mellett fejeződnek ki (lásd a 7–11. pontot). Jelezheti a további vizsgálatok szükségességét, és iránymutatást nyújthat a későbbi vizsgálatok kialakításához. A szaporodási és fejlődési eredmények értelmezésével kapcsolatban az OECD 43. iránymutatását kell alkalmazni (19). A rágcsálókon végzett endokrin és reprodukciós vizsgálatok szövettani értékeléséről szóló 106. OECD-iránymutatás (16) olyan információkkal szolgál az (endokrin) szervek és a hüvelyi kenet előkészítéséről és értékeléséről, amelyek segítséget nyújthatnak e vizsgálati módszerhez.

SZAKIRODALOM

- (1) OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Kérésre elérhető a Gazdasági Együtműködési és Fejlesztési Szervezetnél, Párizs
- (2) OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. . Kérésre elérhető a Gazdasági Együtműködési és Fejlesztési Szervezetnél, Párizs
- (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, 10th-11th March 1998, kérésre elérhető a Gazdasági Együtműködési és Fejlesztési Szervezetnél, Párizs
- (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), Gazdasági Együtműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.
- (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), Gazdasági Együtműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.
- (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). Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.
- (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) Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.
- (17) Hess RA and Moore BJ. (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. In: *Methods in Reproductive Toxicology*, Chapin RE and Heindel JJ (Eds.). Academic Press: San Diego, CA, pp. 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), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

- (20) OECD (2011), Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (No 150), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK (LÁSD MÉG AZ OECD 150. IRÁNYMUTATÁSÁT (20))

Androgenitás: egy vegyi anyag azon képessége, hogy emlősállatok szervezetében természetes androgén hormonokhoz (például a tesztoszteronhoz) hasonló hatást fejtsen ki.

Antiandrogenitás: egy vegyi anyag azon képessége, hogy emlősállatok szervezetében a természetes androgén hormonok (például a tesztoszteron) hatását gátolja.

Antiösztrogenitás: egy vegyi anyag azon képessége, hogy emlősállatok szervezetében a természetes ösztrogén hormonok (például a 17 β -ösztradiol) hatását gátolja.

Antitiroid hatás: egy vegyi anyag azon képessége, hogy emlősállatok szervezetében a természetes pajzsmirigyhormon (például a T₃) hatását gátolja.

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Fejlődési toxicitás: reprodukciós toxicitás kifejeződése az utódokban pre-, peri-, posztnatális, szerkezeti vagy funkcionális rendellenességek formájában.

Dózis: a vizsgálati vegyi anyag beadott mennyisége. A dózist a vizsgálati vegyi anyag súlyának és a kísérleti állat egységnyi testsúlyának napi hányadosaként (például mg/testsúlykilogramm/nap), vagy a takarmányban lévő állandó koncentrációként fejezik ki.

Adagolás: általános fogalom, amely a dózist, valamint az adagolás gyakoriságát és időtartamát foglalja magában.

Nyilvánvaló toxicitás: általános fogalom, amely a toxicitás vizsgálati vegyi anyag beadását követően kialakuló egyértelmű tünetekre vonatkozik. E tüneteknek elegendőnek kell lenniük a veszély értékeléséhez, továbbá olyan szintet kell képviselniük, amelynél a beadott dózis növelése várhatóan a toxicitás súlyos jeleinek kialakulásához és valószínű mortalitáshoz vezet.

Termékenységkárosodás: a hím vagy női szaporodási funkciók vagy képesség terén jelentkező rendellenességeket jelenti.

Anyai toxicitás: a vemhes nőstényeket érő, a vemhességhez kapcsolható káros hatások, amelyek történhetnek specifikusan (közvetlen hatás) vagy nem specifikusan (közvetett hatás).

NOAEL: a „no-observed-adverse-effect level” (nem észlelhető káros hatásszint) rövidítése. Ez a legmagasabb dózis, amelynél még nem figyelhetők meg a kezelés okozta káros hatások.

Ösztrogenitás: egy vegyi anyag azon képessége, hogy emlősállatok szervezetében a természetes ösztrogén hormonokhoz (például a 17 β -ösztradiolhoz) hasonló hatást fejtsen ki.

Reprodukciós toxicitás: az utódoknál jelentkező káros hatásokat és/vagy a hím vagy női szaporodási funkciók vagy képesség csökkenését jelenti.

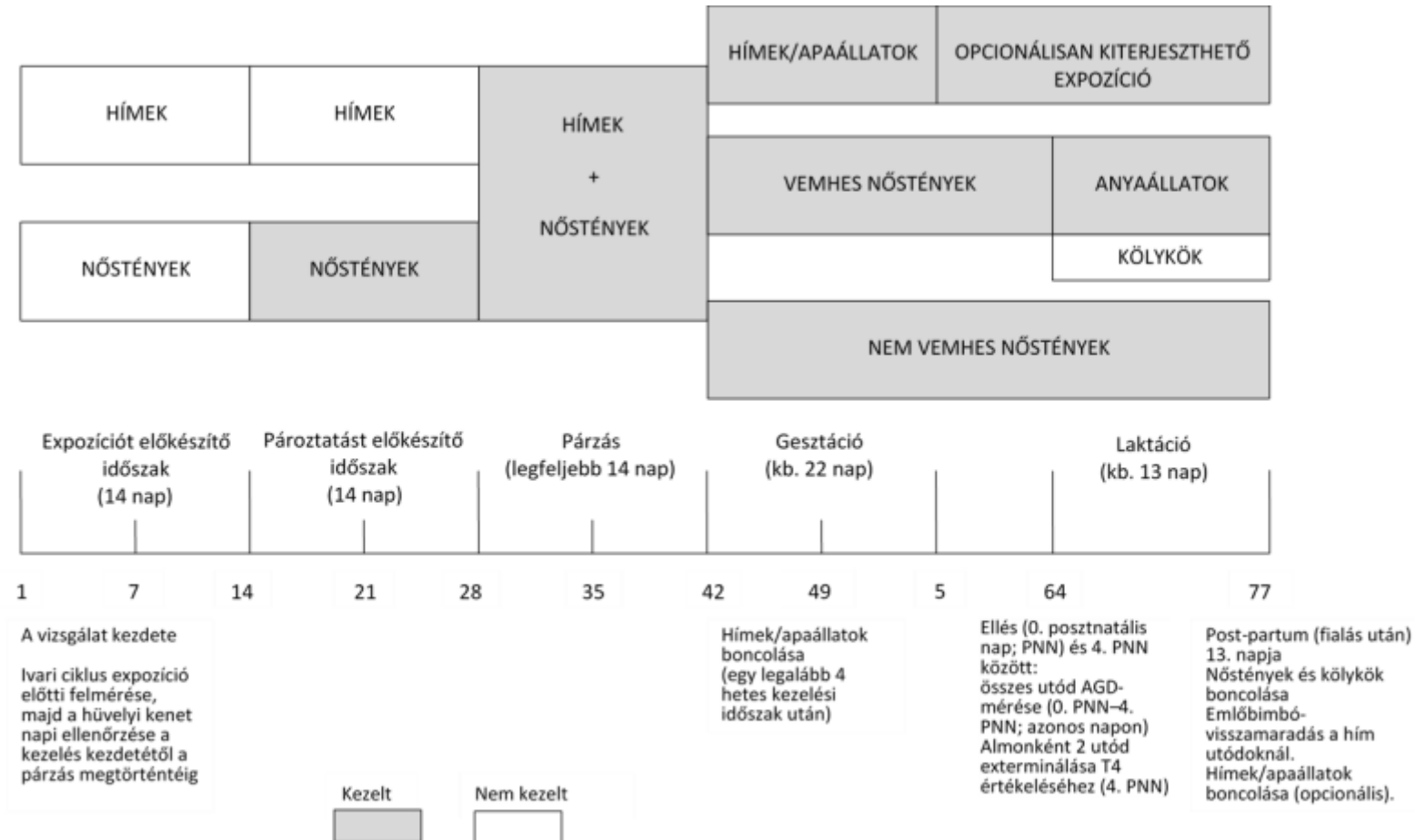
Vizsgálati vegyi anyag: az e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

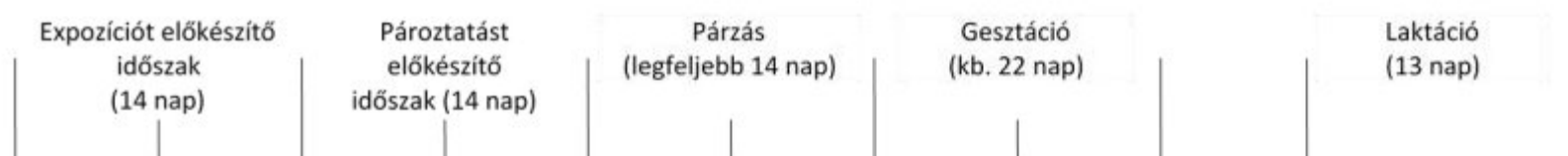
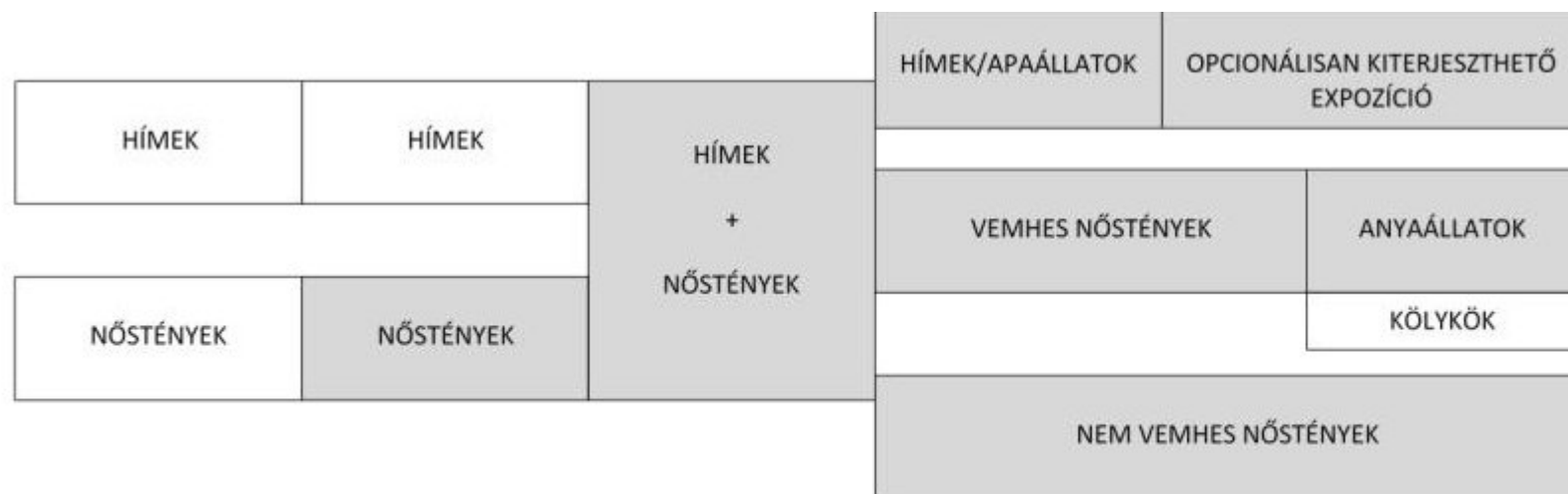
Tiroid hatás: egy vegyi anyag azon képessége, hogy emlősállatok szervezetében a természetes pajzsmirigyhormonhoz (például a T₃-hoz) hasonló hatást gyakoroljon.

Validáció: tudományos folyamat, amelynek célja egy adott vizsgálati módszer működési követelményeinek és korlátjainak jellemzése, valamint megbízhatóságának és egy adott célhoz kapcsolódó relevanciájának igazolása.

2. függelék

A KÍSÉRLETI ÜTEMTERV ÁBRÁJA, AMELY JELZI A VIZSGÁLAT TELJES 14 NAPOS PÁRZÁSI IDŐSZAKON ALAPULÓ MAXIMÁLIS IDŐTARTAMÁT





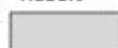
1 7 14 21 28 35 42 49 5 64 77

A vizsgálat kezdete

Ivari ciklus expozíció előtti felmérése, majd a hüvelyi kenet napi ellenőrzése a kezelés kezdetétől a párazás megtörténteig

Hematológia/klinikai kémia hímeknél és nőstényeknél (opcionális)

Kezelt



Nem kezelt



Hímek/apaállatok boncolása
Funkcionális megfigyelések hímeknél (opcionális)
Hematológia/klinikai kémia hímeknél (egy legalább 4 hetes kezelési időszakot követő) elpusztításukkor

Ellés (0. posztnatális nap; PNN) és 4. PNN között:
összes utód AGD-mérése (0. PNN–4. PNN; azonos napon)
Almonként 2 utód exterminálása T4 értékeléséhez (4. PNN)

Post-partum (fialás után) 13. napja
Nőstények és kölykök boncolása
Hímek/apaállatok boncolása (opcionális). Funkcionális megfigyelések hímeknél (opcionális) és nőstényeknél
Hematológia/klinikai kémia hímeknél és nőstényeknél (opcionális)
Emlőbimbó-visszamaradás a hím utódoknál.

3. függelék

TÁBLÁZATOS ÖSSZEFOGLALÓ JELENTÉS A SZAPORODÁSRA/FEJLŐDÉSRE GYAKOROLT HATÁSOKRÓL

MEGFIGYELÉSEK	ÉRTÉKEK				
Adagolás (egységek).....	0 (kontroll)	...	...	...	...
Kezdő párok (Sz)					
Ivari ciklus (legalább az átlagos időtartam és az irreguláris ciklusok gyakorisága)					
Bizonyítottan párosított nőtények (Sz)					
Vemhességet elért nőtények (Sz)					
Fogantatás napja 1–5. (Sz)					
Fogantatás napja 6–... ⁽¹⁾ (Sz)					
Vemhesség ≤ 21 nap (Sz)					
Vemhesség = 22 nap (Sz)					
Vemhesség ≥ 23 nap (Sz)					
Élve született utódokkal rendelkező anyaállatok (Sz)					
Post-partum 4. napján élő utódokkal rendelkező anyaállatok (Sz)					
Beágyazódások/anyaállat (átlag)					
Élő utódok/anyaállat az ellésnél (átlag)					
Élő utódok/anyaállat a 4. napon (átlag)					
Ivararány (h/n) az ellésénél (átlag)					
Ivararány (h/n) a 4. napon (átlag)					
Alom egyedsúlya az ellésnél (átlag)					
Alom egyedsúlya a 4. napon (átlag)					
Utódok súlya születéskor (átlag)					
Utódok súlya az AGD-mérés időpontjában (hímek átlaga, nőtények átlaga)					
Utódok AGD-értéke ugyanazon a posztnatális napon, születés utáni 4. napon (hímek átlaga, nőtények átlaga, posztnatális nap feljegyzése)					
Utódok súlya a 4. napon (átlag)					
Utódok súlya a 13. napon (átlag)					

⁽¹⁾ a párzási időszak utolsó napja

Hím utódok emlőbimbó-visszamaradása a 13. napon (átlag)					
RENDELLENES UTÓDOK					
Anyaállatok 0-val					
Anyaállatok 1-gyel					
Anyaállatok ≥ 2 -vel					
UTÓDOK ELVESZTÉSE					
Prenatális időszak (beágyazódások mínusz elveszületések száma)					
Anyaállatok 0-val					
Anyaállatok 1-gyel					
Anyaállatok 2-vel					
Anyaállatok ≥ 3 -mal					
Posztnatális időszak (élveszületések mínusz a 13. posztnatális napon élők száma)					
Anyaállatok 0-val					
Anyaállatok 1-gyel					
Anyaállatok 2-vel					
Anyaállatok ≥ 3 -mal					

B.65. *IN VITRO* BŐRKORRÓZIÓS MEMBRÁNBARRIER-VIZSGÁLATI MÓDSZER

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 435. vizsgálati iránymutatásában (2015) leírt módszerrel. A bőrkorrózió – az Egyesült Nemzetek Szervezete (ENSZ) által kidolgozott, vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének globálisan harmonizált rendszerében (GHS) (1), valamint az Európai Unió (EU) anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról szóló 1272/2008/EK rendeletében (CLP-rendelet)¹ meghatározottak szerint – valamely vizsgálati vegyi anyag alkalmazását követően megjelenő, visszafordíthatatlan bőrkárosodás, amely a felhámmon át az irhára is áttérjedő látható szövetelhalást okoz. Ez a vizsgálati módszer, amely egyenértékű az OECD 435. átdolgozott vizsgálati iránymutatásával, egy olyan *in vitro* membránbarrier-vizsgálatot foglal magában, amellyel azonosíthatók a korrozív vegyi anyagok. A vizsgálati módszer egy olyan mesterséges membránt alkalmaz, amely az állatbőrhöz hasonló módon reagál a korrozív vegyi anyagokra *in situ*.
2. A hagyományos bőrkorróziós vizsgálatoknál a vizsgálati vegyi anyagot élő állatok bőrére viszik fel, majd egy meghatározott idő elteltével felmérik a szövetkárosodás mértékét (2). E vizsgálati módszeren túl elfogadtak néhány más *in vitro* vizsgálati módszert is a korrozív vegyi anyagok azonosítására használt (az OECD 404. vizsgálati iránymutatásával egyenértékű és e melléklet B.4. fejezetében ismertetett), standardnak számító, nyulakon végzett *in vivo* bőrkorróziós eljárás (2) alternatívájaként (3) (4). Az ENSZ GHS többszintes vizsgálati és értékelési stratégiát határoz meg a bőrkorrózió felméréséhez és osztályozásához, a bőrirritáció/bőrkorrózió vonatkozásában végzett vizsgálatok és értékelések integrált megközelítéseiről (IATA) szóló OECD-iránymutatás 3. és 4. modulja (1) (5) pedig validált és elfogadott *in vitro* vizsgálati módszerek használatát ajánlja. Az integrált vizsgálati és értékelési megközelítés (IATA) információforrásokat és adatelemző eszközöket csoportosító több modult ismertet, továbbá iránymutatást nyújt arra nézve, hogy i. miként integrálhatók és használhatók az ismert vizsgálati és nem vizsgálati adatok a vegyi anyagok potenciális bőrirritációs és bőrkorróziós hatásainak felmérésére, és ii. javaslatot tesz egy, a további vizsgálatok szükségessége esetén alkalmazható megközelítésre, amely kiterjed a negatív vizsgálati eredmények esetére is (5). E moduláris

¹ Az Európai Parlament és a Tanács 1272/2008/EK rendelete (2008. december 16.) az anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról, a 67/548/EGK és az 1999/45/EK irányelv módosításáról és hatályon kívül helyezéséről, valamint az 1907/2006/EK rendelet módosításáról (HL L 353/1., 2008.12.31.).

megközelítés révén az *in vitro* vizsgálati módszerek pozitív eredményei alapján megállapítható a vegyi anyagok korrozivitása anélkül, hogy állatkísérletekre lenne szükség, ezáltal visszaszorul és finomodik az állatok kísérleti felhasználása, és elkerülhető mindaz a fájdalom és szorongás, amely előfordulhatott volna, ha állatokkal végzik a kísérletet.

3. A kereskedelmi forgalomban Corrositex® (6) (7) (8) néven kapható *in vitro* membránbarrier-modellen végzett validálási vizsgálatok kimutatták, hogy a modell egy 163 anyagból és keverékből álló adatbázis (7) tekintetében összességében 79 %-os (128/163) pontossággal, 85 %-os (76/89) érzékenységgel és 70 %-os (52/74) specificitással jelezi előre a bőrkorróziót. A modellt – elismert hitelessége alapján – validált referenciamódszerként arra ajánlják, hogy egy többszintű vizsgálati stratégia részeként alkalmazza a vegyi anyagok által esetlegesen okozott bőrkorróziós veszély felmérésére (5)(7). Mielőtt egy *in vitro* bőrkorróziós membránbarrier-modell szabályozási célú alkalmazásra kerülne, a validált referenciamódszerhez (9) való hasonlóságának biztosítása érdekében az előre meghatározott teljesítményszabványok (10) követelményeinek megfelelően meg kell állapítani a javasolt felhasználása tekintetében fennálló megbízhatóságát, relevanciáját (pontosságát) és korlátait. Az adatok OECD-megállapodás szerinti kölcsönös elfogadása csak azután garantált, hogy a javasolt új vagy átdolgozott módszert a teljesítményszabványok szerint felülvizsgálták és belefoglalták az OECD megfelelő vizsgálati iránymutatásába. Jelenleg egyetlen *in vitro* módszer tartozik az OECD 435. vizsgálati iránymutatása alá, és ez a vizsgálati módszer a kereskedelmi forgalomban beszerezhető Corrositex® modell.
4. A bőrkorrózió felmérésére szolgáló egyéb vizsgálati módszerek a rekonstruált humán bőr (az OECD 431. vizsgálati iránymutatása) (3) és az izolált patkánybőr (az OECD 430. vizsgálati iránymutatása) (4) használatán alapulnak. Emellett e vizsgálati iránymutatás lehetővé teszi azt, hogy a korrozív vegyi anyagokat alkategóriába sorolják az ENSZ GHS három korrozivitási alkategóriája és az ENSZ korróziós veszélyt jelentő anyagok szállítására vonatkozó három csomagolási csoportja szerint. Az eredetileg 2006-ben elfogadott vizsgálati iránymutatást 2015-ben átdolgozták, hogy figyelembe vegyék az IATA-iránymutatást és frissítsék a jártassági tesztanyagok jegyzékét.

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

5. Az alkalmazott fogalmak meghatározása a függelékben található.

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

6. Az e vizsgálati módszer keretében leírt vizsgálat lehetővé teszi a korrozív vizsgálati vegyi anyagok azonosítását és ezen anyagok ENSZ GHS/CLP-rendelet szerinti alkategorizálását (1. táblázat). Emellett a vizsgálati módszer alkalmas arra, hogy a szállításukkal összefüggő

vizsgálati célokból kifolyólag bizonyos kémiai anyagosztályok, pl. szerves és szervetlen savak, savszármazékok¹ és lúgok tekintetében megállapítsák a korrozivitást, illetve annak hiányát (7) (11) (12). Ez a vizsgálati módszer a validált vizsgálati referenciamódszerhez hasonló általános eljárást ír le (7). Ez a vizsgálati módszer ugyan nem biztosít elegendő információt a bőrirritáció felméréséhez, de (az OECD 439. vizsgálati iránymutatásával egyenértékű) B.46. vizsgálati módszer célja kifejezetten az, hogy a bőrirritációs egészségügyi hatásokat *in vitro* határozza meg (13). Egyetlen bőrexpozíció után a bőrt ért helyi hatások teljes kiértékeléséhez a vizsgálatok és értékelések integrált megközelítéseiről szóló OECD-iránymutatást kell tanulmányozni (5).

1. táblázat: Az ENSZ GHS szerinti bőrkorróziós kategóriák és alkategóriák (1)

Korrozív kategória (1. kategória) (alkategóriákat nem használó hatóságoknak)	Alkalmazható korrozív alkategóriák ² (alkategóriákat, pl. a CLP-rendeletet használó hatóságoknak)	Korrozív 3 állapot közül legalább 1 esetében	
		Expozíció	Megfigyelés
Korrozív	1A korrozív alkategória	≤ 3 perc	≤ 1 óra
	1B korrozív alkategória	> 3 perc / ≤ 1 óra	≤ 14 nap
	1C korrozív alkategória	> 1 óra / ≤ 4 óra	≤ 14 nap

7. A validált referenciamódszer (7) korlátja, hogy az előzetes kompatibilitási vizsgálat (lásd a 13. pontot) eredményei alapján számos nem korrozív vegyi anyagra és néhány korrozív vegyi anyagra nem alkalmazható a vizsgálat. A 4,5 és 8,5 közötti pH-értékkel rendelkező vízbázisú vegyi anyagok gyakran nem alkalmasak a vizsgálatra; ugyanakkor az e pH-tartományban vizsgált vegyi anyagok 85 %-a nem bizonyult korrozívnak az állatkísérletek során (7). Az *in vitro* membránbarrier módszer alkalmazható (vízben oldható és oldhatatlan) szilárd anyagok, (vizes és nem vízbázisú) folyadékok, valamint emulziók vizsgálatára. Azonban azokat a vizsgálati vegyi anyagokat, amelyek a kompatibilitási vizsgálat során nem idéznek elő kimutatható változást (vagyis színváltozást a validált vizsgálati referenciamódszer vegyi anyagok észlelésére szolgáló rendszerében (Chemical Detection System, CDS)), a membránbarrier módszertől eltérő vizsgálati módszerekkel kell vizsgálni.

¹ A „savszármazék” egy általános megnevezés, amely tag értelemben véve magában foglalja a valamely vegyi anyagból közvetlenül, módosítás vagy részleges szubsztitúció útján előállított savakat. Ebbe az osztályba tartoznak az anhidridek, a halosavak, a sók és más vegyi anyag típusok.

² A CLP-rendelet az EU-ra vonatkozólag három bőrkorróziós alkategóriát alkalmaz: 1A, 1B és 1C.

A VIZSGÁLAT ELVE

8. A vizsgálati rendszer két összetevőből áll: egy szintetikus makromolekuláris biobarrierből és egy kémiai érzékelő rendszerből (CDS); ez a vizsgálati módszer a kémiai érzékelő rendszeren keresztül – feltételezhetően az élő bőrre ható korróziós mechanizmussal/mechanizmusokkal megegyező módon – detektálja a membránbarrier korrózív vizsgálati vegyi anyagok okozta károsodását, miután a vizsgálati vegyi anyagot a szintetikus makromolekuláris membránbarrier felszínén alkalmazták (7).
9. A membránbarrieren való áthatolás (vagy áttörés) számos eljárással vagy a kémiai érzékelő rendszerrel mérhető, többek között azáltal, hogy a pH-indikátor festék színe vagy az indikátoroldat bizonyos más tulajdonságai megváltoznak a barrier alatt.
10. Meg kell állapítani a membránbarrier hitelességét, vagyis azt, hogy tervezett használata szempontjából releváns és megbízható. Ez magában foglalja annak biztosítását, hogy a különböző preparátumok barriertulajdonságai állandók, például képesek barrierként működni a nem korrózív vegyi anyagokkal szemben, valamint képesek a vegyi anyagok korrózív tulajdonságainak osztályozására az ENSZ GHS különböző korrózitási alkategóriái szerint (1). A besorolás alapja az az idő, amely alatt egy adott vegyi anyag a membránbarrieren áthatolva az indikátoroldatba jut.

A JÁRTASSÁG BIZONYÍTÁSA

11. Az e vizsgálati módszer alá tartozó *in vitro* membránbarrier módszer rutinszerű alkalmazása előtt a laboratóriumoknak a 2. táblázatban felsorolt tizenkét jártassági tesztanyag megfelelő besorolásával igazolniuk kell szakmai jártasságukat. Ha a jegyzékben szereplő valamely anyag nem áll rendelkezésre, illetve ha indokolható, megfelelő *in vivo* és *in vitro* referenciaadatokkal rendelkező más – például a referencia-vegyianyagok jegyzékében feltüntetett (10) – anyag is használható, amennyiben a kiválasztási kritériumok megegyeznek az 1. táblázatban foglaltakkal.

2. táblázat: Jártassági tesztanyagok¹

Anyag ²	CAS-szám	Kémiai osztály	<i>In vivo</i> ENSZ GHS alkategória ³	<i>In vitro</i> ENSZ GHS alkategória ³
Bór-trifluorid-dihidrát	13319-75-0	Szervetlen savak	1A	1A
Salétromsav	7697-37-2	Szervetlen savak	1A	1A
Foszfor-pentaklorid	10026-13-8	Szervetlen savak prekursorai	1A	1A
Valeril-klorid	638-29-9	Savkloridok	1B	1B

Nátrium-hidroxid	1310-73-2	Szervetlen lúgok	1B	1B
1-(2-aminoetil) piperazin	140-31-8	Alifás aminok	1B	1B
Benzolszulfonil-klorid	98-09-9	Savkloridok	1C	1C
N,N-dimetil-benzilamin	103-83-3	Anilinok	1C	1C
Tetraetilén-pentamin	112-57-2	Alifás aminok	1C	1C
Eugenol	97-53-0	Fenolok	NK	NK
Nonil-akrilát	2664-55-3	Akrlátok/metakrlátok	NK	NK
Nátrium-bikarbonát	144-55-8	Szervetlen sók	NK	NK

¹A fentiekben felsorolt tizenkét anyag közül három-három tartozik a korrozív anyagok ENSZ GHS szerinti egyes alkategóriába és három nem korrozív anyag, kereskedelmi forgalomban könnyen beszerezhetők, az ENSZ GHS szerinti alkategóriák pedig minőségi *in vivo* vizsgálatok eredményei alapján kerültek meghatározásra. Ezek az anyagok egy 40 referenciaanyagból álló jegyzékből származnak, részét képezik a validált vizsgálati referenciamódszerhez strukturálisan és funkcionálisan hasonló vizsgálati módszerek pontosságának és megbízhatóságának igazolására kijelölt vegyi anyagok minimális jegyzékének, és az eredetileg a vizsgálati referenciamódszer (Corrositex[®]) (7) (10) (14) validálásához használt 163 referencia-vegyianyagból kerültek kiválasztásra. A kiválasztási eljárás során a lehetőségekhez mérten olyan anyagokat igyekeztek kiválasztani, amelyek: a validált vizsgálati referenciamódszer által mérhető vagy megbecsülhető korrozívítási válaszreakciók tartománya tekintetében reprezentatívak (pl. nincs korrozív hatásuk; az ENSZ I., II. és III. csomagolási csoportja szerinti korróziós hatást váltanak ki); a validálási eljárás során használt kémiai osztályok tekintetében reprezentatívak; jól meghatározott kémiai szerkezettel rendelkeznek; megismételhető eredményeket hoznak a validált vizsgálati referenciamódszer alkalmazásakor; egyértelmű eredményeket hoznak az *in vivo* referenciavizsgálatban; kereskedelmi forgalomban kaphatók; és nem kapcsolódnak hozzájuk vállalhatatlanul magas ártalmatlanítási költségek (14).

²Az anyagokat tisztán vagy legalább 90 %-os tisztasággal vizsgálták.

³Az ENSZ GHS szerinti 1A, 1B és 1C alkategóriának az ENSZ I., II. és III. csomagolási csoportja felel meg. NK: Nem korrozív.

ELJÁRÁS

12. Az alábbi pontok egy, a korrózió felmérésére szolgáló mesterséges membránbarrier vizsgálati módszer (7) (15) összetevőit és eljárásait ismertetik, amelynek alapja a jelenlegi validált referenciamódszer, vagyis a kereskedelmi forgalomban kapható Corrositex[®]. A membránbarrier, valamint a kompatibilitást meghatározó/indikátor- és kategorizáló oldatok összeállíthatók, elkészíthetők vagy kereskedelmi forgalomban beszerezhetők, mint a Corrositex[®] validált referenciamódszer. A validált vizsgálati referenciamódszerhez rendelkezésre áll a vizsgálati módszer mintaprotokollja (7). A vizsgálatot szobahőmérsékleten (17–25 °C) kell elvégezni, az összetevőknek pedig meg kell felelniük az alábbi feltételeknek.

A vizsgálati vegyi anyag kompatibilitási tesztje

13. A membránbarrier-vizsgálat előtt egy kompatibilitási vizsgálat során meg kell határozni, hogy a kémiai érzékelő rendszer képes-e detektálni a vizsgálati vegyi anyagot. Amennyiben a kémiai érzékelő rendszer nem mutatja ki a vizsgálati vegyi anyagot, a membránbarrieres vizsgálati módszer nem alkalmas az adott vizsgálati vegyi anyag potenciális korróziós hatásának értékelésére, ezért más vizsgálati módszert kell alkalmazni. A kompatibilitási vizsgálat során olyan kémiai érzékelő rendszert és expozíciós körülményeket kell alkalmazni, amelyek megegyeznek a későbbi membránbarrier-vizsgálat expozíciójával.

A vizsgálati vegyi anyag időskálán alapuló kategorizálási vizsgálata

14. Amennyiben az a vizsgálati módszer szempontjából releváns, a kompatibilitási vizsgálat során alkalmasnak nyilvánított vizsgálati vegyi anyagokon el kell végezni egy időskálán alapuló kategorizálási vizsgálatot, vagyis egy olyan szűrővizsgálatot, amely megkülönbözteti a gyenge és az erős savakat és a bázisokat. A validált vizsgálati referenciamódszerben például egy időskálán alapuló kategorizálási vizsgálat során határozzák meg, hogy a két időskála közül melyiket használják, annak alapján, hogy kimutattak-e jelentős sav- vagy lúgtartalékot. A bőrkorozivitás és az ENSZ GHS szerinti korrozivitási kategória meghatározásához az adott vizsgálati vegyi anyag sav- vagy lúgtartaléka szerint két különböző, áthatolási időn alapuló időskála áll rendelkezésre.

A MEMBRÁNBARRIERES VIZSGÁLATI MÓDSZER ÖSSZETEVŐI

Membránbarrier

15. A membránbarrier két összetevőből áll: egy fehérjetartalmú makromolekuláris vízbázisú gélből és egy áteresztő membránból. A fehérjetartalmú gél nem ereszt át a folyadékokat és a szilárd anyagokat, ugyanakkor korrózió útján áteresztővé tehető. A teljesen összeállított membránbarriert előre meghatározott körülmények között kell tárolni, amelyek bizonyítottan kizárják a gél minőségromlását, pl. kiszáradását, a mikrobák elszaporodását, elmozdulását, megrepedezését, ami csökkentené teljesítményét. Meg kell határozni az elfogadható tárolási időt, és annak lejártát követően nem szabad felhasználni a membránbarrier-preparátumokat.
16. Az áteresztő membrán fizikai alátámasztást biztosít a fehérjetartalmú gélnek a gélesedési folyamat és a vizsgálati vegyi anyaggal való kezelés során. A membránnak meg kell akadályoznia a gél beesését és elcsúszását, továbbá átjárhatónak kell lennie minden vizsgálati vegyi anyag számára.
17. A fehérjetartalmú gél, amely gélmátrixot képező fehérjékből, például keratinból, kollagénből vagy fehérjekeverékekből tevődik össze, a vizsgálati vegyi anyag célpreparátuma. A fehérjetartalmú anyagot felviszik a membrán felületére, és megvárják, amíg gélesedik, majd ezt követően a membránbarriert az indikátoroldat fölé helyezik. A

fehérjetartalmú gél teljes felületének egyforma vastagságúnak és sűrűségűnek kell lennie, továbbá nem tartalmazhat légbuborékokat és egyéb olyan hibákat, amelyek károsíthatják funkciójának épségét.

A kémiai érzékelő rendszer

18. Az indikátoroldatnak, amely megegyezik a kompatibilitási vizsgálat során alkalmazott oldattal, reagálnia kell a vizsgálati vegyi anyag jelenlétére. Olyan pH-indikátor festéket vagy festékkombinációt (pl. krezolvörös és metilnarancs) kell használni, amely színváltozással reagál a vizsgálati vegyi anyag jelenlétére. A mérési rendszer lehet vizuális vagy elektronikus.
19. A vizsgálati vegyi anyagok barriermembránon keresztüli áthaladásának észlelésére kifejlesztett detektorrendszerek alkalmasságát és megbízhatóságát értékelni kell, hogy igazolni lehessen az általuk észlelhető vegyi anyagok körét és az észlelés mennyiségi korlátait.

A VIZSGÁLAT KIÉRTÉKELÉSE

A vizsgálati módszer alkotóelemeinek összeállítása

20. A membránbarriert az indikátoroldatot tartalmazó ampullába (vagy csőbe) helyezik oly módon, hogy a membrán teljes felületén érintkezzen az indikátoroldattal és ne alakuljanak ki légbuborékok. Ügyelni kell arra, hogy a barrier épsége fennmaradjon.

A vizsgálati vegyi anyag alkalmazása

21. A vizsgálati vegyi anyagot megfelelő, azaz például folyadék esetében 500 µl, finomra porított szilárd anyag esetében 500 mg (7) mennyiségben óvatosan fel kell vinni a membránbarrier felső felszínére, majd egyenletesen szét kell oszlatni a felületen. Minden vizsgálati vegyi anyag és az annak megfelelő kontrollok esetében megfelelő számú, például négy (7) replikátumot kell készíteni (lásd a 23–25. pontot). A vizsgálati vegyi anyag membránbarrierre történő felvitelének időpontját rögzíteni kell. Annak érdekében, hogy a rövid hatóidejű korróziót is pontosan lehessen rögzíteni, a vizsgálati vegyi anyagot szakaszosan kell a replikátum csövekbe felvinni.

A membránbarrieren való áthatolás mérése

22. Minden csövet gondosan megfigyelnek, és feljegyzik az indikátoroldat első elváltozásának, vagyis a barrieren történő áthatolásnak az időpontját, majd meghatározzák a felvitel és a membránbarrieren való áthatolás között eltelt időt.

Kontrollok

23. Azokban a vizsgálatokban, amelyekben a vizsgálati vegyi anyagot vivőanyaggal vagy oldószerrel együtt alkalmazzák, a vivőanyagnak vagy az oldószernek kompatibilisnek kell

lennie a membránbarrier rendszerrel, azaz nem lehet hatással sem a membránbarrier rendszer épségére, sem a vizsgálati vegyi anyag korrozivitására. Adott esetben a vizsgálati vegyi anyaggal párhuzamosan kontrollvizsgálatot kell végezni az oldószerrel (vagy a vivőanyaggal) annak igazolására, hogy az kompatibilis a membránbarrier rendszerrel.

24. A vizsgálati vegyi anyaggal egyidejűleg egy közepesen korrozív anyaggal, például 110 ± 15 mg nátrium-hidroxiddal (amely az ENSZ GHS szerinti 1B alkategóriába tartozik) (7) pozitív (korrozív) kontrollt kell végezni a vizsgálati rendszer által nyújtott teljesítmény elfogadhatóságának értékelésre. A korrozív vizsgálati vegyi anyagok relatív korróziós potenciáljának felméréséhez hasznosnak bizonyulhat egy, a vizsgálati vegyi anyaggal azonos kémiai osztályba tartozó anyaggal végzett második pozitív kontroll. A pozitív kontrollanyagként közepesen korrozív (pl. az ENSZ GHS szerinti 1B alkategóriába tartozó) anyagot kell választani, hogy észlelni lehessen, ha az áthatolási idő elfogadhatatlanul hosszú vagy rövid a meghatározott referenciaértékhez képest, ami azt jelzi, hogy a vizsgálati rendszer nem működik megfelelően. E tekintetben a rendkívül korrozív (az ENSZ GHS szerinti 1A alkategóriába tartozó) vagy a nem korrozív hatású vegyi anyagok használhatósága korlátozott. Ugyanakkor az ENSZ GHS szerinti 1B alkategóriába tartozó korrozív vegyi anyagok lehetővé teszik a túl gyors vagy túl lassú áthatolási idő észlelését. Az enyhén korrozív (az ENSZ GHS szerinti 1C alkategóriába tartozó) anyagok használhatók pozitív kontrollként annak mérésére, hogy a vizsgálati módszer képes-e megbízhatóan különbséget tenni az enyhén korrozív és a nem korrozív hatású vegyi anyagok között. Az alkalmazott megközelítéstől függetlenül a használt pozitív kontrollanyag(ok) áthatolási idejének dokumentált tartománya alapján meg kell határozni a pozitív kontroll válaszreakciójának elfogadható tartományát, úgy mint az átlagérték $\pm 2-3$ standard deviációt. Minden vizsgálat során meg kell állapítani a pozitív kontrollanyag pontos áthatolási idejét, hogy észlelni lehessen az elfogadható tartománytól való eltéréseket.
25. Negatív kontrollként egy negatív (nem korrozív) kontrollanyagot – például 10 % citromsav, 6 % propionsav (7) – is vizsgálni kell a vizsgálati vegyi anyaggal egyidejűleg, amely egy másik minőség-ellenőrzési mérésnek igazolja a membránbarrier épségét.

A vizsgálat elfogadhatósági kritériumai

26. Az egyes ENSZ GHS szerinti korrozivitási alkategóriákra meghatározott időparaméterek alapján a vizsgálati vegyi anyag membránbarrierre történő felvitele és a barrieren való áthatolása között eltelt (percen mért) időt használják a vizsgálati vegyi anyag korrozivitásának előrejelzésére. Ahhoz, hogy egy vizsgálatot elfogadhatónak minősítsenek, a párhuzamos pozitív kontrollnak a várt áthatolási reakcióidőt kell biztosítani (ami például a nátrium-hidroxid pozitív kontrollként való alkalmazása esetén 8–16 perces áthatolási időt jelent), a párhuzamos negatív kontrollanyag nem lehet korrozív, és – amennyiben sor került rá – a párhuzamos oldószeres kontroll nem lehet korrozív és nem

módosíthatja a vizsgálati vegyi anyag korróziós potenciálját. Az e vizsgálati módszer alá tartozó módszer rutinszerű alkalmazását megelőzően a laboratóriumoknak a 2. táblázatban javasolt tizenkét anyag felhasználásával igazolniuk kell szakmai jártasságukat. Az e vizsgálati módszer keretében kidolgozott, a validált referenciamódszerhez (14) strukturálisan és funkcionálisan hasonló, úgynevezett „me-too” vizsgálati módszerek szabályozási célú alkalmazása előtt az előre meghatározott teljesítményszabványok használatával igazolni kell az új módszer megbízhatóságát és pontosságát (10).

Az eredmények értelmezése és a vizsgálati vegyi anyagok korrozivitási osztályba sorolása

27. A vizsgálati vegyi anyag membránbarrierre történő felvitele és a barrieren való áthatolása között eltelt (percben mért) időt használják a vizsgálati vegyi anyag – ENSZ GHS szerinti korrozivitási alkategóriák (1) és adott esetben az ENSZ csomagolási csoportjai (16) szerinti – osztályozására. Az egyes javasolt vizsgálati módszerekre nézve meghatározzák a három korrozivitási alkategóriát elválasztó időértékeket. A kategóriákat elválasztó időértékekre vonatkozó végső döntés során törekedni kell arra, hogy minimalizálják a korrozív veszély alulkategorizálását (vagyis az álnegatív eredményeket). E vizsgálati iránymutatás keretén belül a Corrositex® 3. táblázatban feltüntetett időértékeit kell figyelembe venni, mivel jelenleg ez az egyetlen vizsgálati módszer tartozik a vizsgálati iránymutatáshoz (7).

3. táblázat: Corrositex® előrejelzési modell

Átlagos áthatolási idő (percben)		ENSZ GHS előrejelzés ³
1. kategóriába sorolt vizsgálati vegyi anyagok ¹ (a módszer kategorizálási vizsgálata alapján)	2. kategóriába sorolt vizsgálati vegyi anyagok ² (a módszer kategorizálási vizsgálata alapján)	
0–3 perc	0–3 perc	Korrozív opcionális 1A alkategória
> 3–60 perc	> 3–30 perc	Korrozív opcionális 1B alkategória
> 60–240 perc	> 30–60 perc	Korrozív opcionális 1C alkategória
> 240 perc	> 60 perc	Nem korrozív

¹ Magas sav-/lúgtartalékkal rendelkező vizsgálati vegyi anyagok (6)

² Alacsony sav-/lúgtartalékkal rendelkező vizsgálati vegyi anyagok (6)

³ Az ENSZ GHS szerinti 1A, 1B és 1C alkategóriának az ENSZ I., II. és III. csomagolási csoportja felel meg

ADATOK ÉS JELENTÉS

Adatok

28. Minden kísérlet esetében táblázatba kell foglalni a vizsgálati vegyi anyag és a pozitív kontrollanyag(ok) felvitele és a barrieren való áthatolás között eltelt (percen mért) időt az egyes ismételések adataként, az átlagérték $\pm$ a szórás megadásával.

Vizsgálati jelentés

29. A vizsgálati jelentésnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálati vegyi anyag és kontrollként szolgáló anyagok:

- Egy összetevőből álló anyag: kémiai azonosítás, például IUPAC- vagy CAS-névvel, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet alapján, tisztaság, adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb. alapján;
- több összetevőből álló anyagok, UVCB-k és keverékek: amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosítója (lásd fent), mennyiségi előfordulása és releváns fizikai-kémiai tulajdonságai jellemzik;
- fizikai megjelenés, vízzoldékonyság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok;
- eredet, gyártási szám, ha ismert;
- a vizsgálati vegyi anyag/kontrollanyag kezelése a vizsgálatot megelőzően, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés);
- a vizsgálati vegyi anyag stabilitása, felhasználási határideje vagy ismételt elemzésének napja, ha ismert;
- tárolási feltételek.

Vivőanyag:

- név, (adott esetben) koncentráció, alkalmazott térfogat;
- a vivőanyag megválasztásának indokolása.

Az alkalmazott in vitro membránbarrier-modell és protokoll, ideértve az igazolt pontosságot és megbízhatóságot

Vizsgálati körülmények:

- az alkalmazott műszer és az elkészítési eljárások leírása;
- az alkalmazott *in vitro* membránbarrier eredete és összetétele;
- az indikátoroldat összetétele és jellemzői;
- a kimutatás módszere;

- a vizsgálati vegyi anyag és a kontrollanyagok mennyisége;
- replikátumok száma;
- az időskálán alapuló kategorizálási vizsgálat leírása és indokolása;
- az alkalmazás módja;
- megfigyelési időszakok;
- az alkalmazott értékelési és osztályozási kritériumok leírása;
- a vizsgálati módszer végrehajtásában való jártasság bizonyítása a módszer rutinszerű használata előtt, a jártassági tesztanyagok vizsgálata révén.

Eredmények:

- az egyes replikátumok egyedi vizsgálatából és kontrollmintáiból nyert egyedi nyers adatok táblázatba foglalása;
- a megfigyelt egyéb hatások leírása;
- az alkalmazott előrejelzési modellel/döntési kritériumokkal összhangban kialakított osztályozás.

Az eredmények értékelése

Következtetések

SZAKIRODALOM

- (1) Egyesült Nemzetek Szervezete (ENSZ) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), First Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Elérhető a következő címen: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.
- (2) E melléklet B.4., Akut bőrirritáció/bőrkorrózió fejezete.
- (3) E melléklet B.40bis., *In vitro* bőrkorrózió: rekonstruált emberi felhámmodellen végzett vizsgálati módszer című fejezete.
- (4) E melléklet B.40., *In vitro* bőrkorrózió: transzkután elektromos rezisztencia (TER) vizsgálat című fejezete.
- (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). Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.
- (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. Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs. Elérhető a következő címen: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/PerfStand-TG430-June14.pdf>.

- (11) ECVAM (2001). Statement on the Application of the CORROSITEX® Assay for Skin Corrosivity Testing. 15th Meeting of ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC), Ispra, Italy. ATLA 29, 96-97.
- (12) U.S. DOT (2002). Exemption DOT-E-10904 (Fifth Revision). (September 20, 2002). Washington, D.C., U.S. DOT.
- (13) E melléklet B.46., *In vitro* bőrirritáció: Rekonstruált emberi felhámmodellen végzett vizsgálati módszer című fejezete. ICCVAM (2004). ICCVAM Recommended Performance Standards for *In vitro* Test Methods for Skin Corrosion. NIEHS, NIH Publication No 04-4510. Elérhető a következő címen:
http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/dermal_docs/ps/ps044510.pdf.
- (14) U.S. EPA (1996). Method 1120, Dermal Corrosion. Elérhető a következő címen: <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/1120.pdf>.
- (15) Egyesült Nemzetek Szervezete (ENSZ) (2013). UN Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Model Regulations, 18th Revised Edition (Part, Chapter 2.8), UN, 2013. Elérhető a következő címen: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/unrec/rev18/English/Rev18_Volume1_Part2.pdf.

Függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Pontosság: a vizsgálati módszerrel kapott eredmények és az elfogadott referenciaértékek közötti egyezés mértéke. A vizsgálati módszer teljesítményének mutatója, valamint a relevanciájának egyik megítélési szempontja. E kifejezést gyakran használják az „egyezés” megfelelőjeként, amely egy adott vizsgálati módszer alkalmazásakor az azonos eredmények arányát fejezi ki (9).

Vegyí anyag: anyag vagy keverék.

Kémiai érzékelő rendszer: vizuális vagy elektronikus mérési rendszer indikátoroldattal, amely reagál a vizsgálati vegyi anyagok jelenlétére, például azáltal, hogy módosul a vizsgálati vegyi anyag jelenlétére színváltozással reagáló pH-indikátor festék vagy festékkombináció, illetve más típusú kémiai vagy elektrokémiai reakciók által.

Egyezés: a kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek teljesítményének mutatója, valamint a relevanciájának egyik megítélési szempontja. A kifejezést esetenként használják a pontosság megfelelőjeként, és úgy határozzák meg, mint a helyesen pozitívként vagy negatívként besorolt összes vizsgálati vegyi anyag aránya. Az egyezés nagy mértékben függ a vizsgálat tárgyát képező vizsgálati vegyi anyag típusaiban előforduló pozitív eredmények gyakoriságától (9).

GHS (a vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének globálisan harmonizált rendszere): a vegyi anyagoknak (anyagoknak és keverékeknek) a fizikai, egészségi és környezeti veszélyek szabványosított típusai és szintjei szerinti osztályokba sorolására és megfelelő kommunikációs elemekkel (például piktogramokkal, figyelmeztetésekkel, figyelmeztető mondatokkal, óvintézkedésekre vonatkozó mondatokkal és biztonsági adatlapokkal) történő jelölésére javaslatokat megfogalmazó rendszer, amelynek célja, hogy az emberek (köztük a munkáltatók, a munkavállalók, a fuvarozók, a fogyasztók és a sürgősségi segélyszolgálatok) és a környezet megóvása érdekében egységesítse a vegyi anyagok káros hatásaira vonatkozó információk továbbítását (1).

IATA: integrált vizsgálati és értékelési megközelítés.

Keverék: két vagy több anyagot tartalmazó elegy vagy oldat.

Egy összetevőből álló anyag: olyan, a mennyiségi összetétele alapján meghatározott anyag, amelyben az egyik fő összetevő legalább 80 tömegszázalékban van jelen.

Több összetevőből álló anyag: olyan, a mennyiségi összetétele alapján meghatározott anyag, amelyben egynél több fő összetevő legalább 10 tömegszázalékban, de 80 tömegszázalékot nem meghaladó koncentrációban van jelen. A több összetevőből álló anyag gyártási folyamat eredménye. A keverék és a több összetevőből álló anyag között az a különbség, hogy a keverék két vagy több anyag összekeverésével, kémiai reakció nélkül jön létre. A több összetevőből álló anyag kémiai reakció eredménye.

NK: nem korrozív.

Teljesítményszabványok: hitelesített referenciamódszeren alapuló szabványok, amelyek a javasolt, végrehajtás és funkcionalitás szempontjából hasonló vizsgálati módszer összehasonlíthatósági értékelésének alapjául szolgálnak. Ide tartoznak: i. a vizsgálati módszer alapvető összetevői; ii. a referencia-vegyianyagok minimális jegyzéke, amely a validált vizsgálati módszer által nyújtott teljesítmény elfogadhatóságának igazolására használt vegyi anyagokból került összeállításra; és iii. a validált vizsgálati módszer eredményei alapján meghatározott, azokhoz hasonló megbízhatósági és pontossági szint, amelyet a javasolt vizsgálati módszernek teljesítenie kell a referencia-vegyianyagok minimális jegyzéke szerinti értékelése során (9).

Relevancia: a vizsgálati módszer és a vizsgált hatás kapcsolatát adja meg, valamint azt, hogy van-e a vizsgálatnak az adott cél szempontjából értelme és haszna. Azt tükrözi, hogy a vizsgálati módszer mennyire pontosan méri vagy jelzi előre a vizsgált biológiai hatást. A relevancia meghatározása során a vizsgálati módszer pontosságát (az eredmények egyezését) figyelembe kell venni (9).

Megbízhatóság: a vizsgálati módszer laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti időbeli reprodukálhatóságának mértéke ugyanazon protokoll alkalmazása mellett. A laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti reprodukálhatóság kiszámításával állapítják meg (9).

Érzékenység: az összes olyan pozitív/aktív vegyi anyag aránya, amelyet a vizsgálati módszer helyesen sorolt be. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (9).

***In vivo* bőrkorrózió:** a vizsgálati vegyi anyag alkalmazását követően négy órán belül megjelenő, visszafordíthatatlan bőrkárosodás, azaz a felhámot át az irhára is áttérjedő látható szövetelhalás. A korróziós tünetek jellemzően fekély, vérzés, véres hegesedés és – 14 napos megfigyelés végén – a bőr kifehéredése miatt elszíneződés, teljes szőrhullásos területek és hegek. A kérdéses lézió értékeléséhez figyelembe kell venni a kórszövetet.

Specificitás: a vizsgálati módszerrel helyesen besorolt összes negatív/inaktív vegyi anyag aránya. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (9).

Anyag: olyan természetes állapotban előforduló vagy gyártási eljárásból származó kémiai elem és vegyületei, amely a stabilitásának megőrzéséhez szükséges adalékanyagot és az alkalmazott eljárásból származó szennyező anyagokat is tartalmazhat, de nem tartalmaz olyan oldószert, amely az anyag stabilitásának befolyásolása vagy összetételének megváltoztatása nélkül elkülöníthető.

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

UVCB: ismeretlen vagy változó összetételű anyagok, komplex reakciótermékek vagy

biológiai anyagok.

B.66. STABILAN TRANSZFEKTÁLT TRANSZAKTIVÁCIÓS *IN VITRO* VIZSGÁLATOK ÖSZTROGÉNRECEPTOROK AGONISTÁINAK ÉS ANTAGONISTÁINAK ÉSZLELÉSÉRE

ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS

Az OECD teljesítményalapú vizsgálati iránymutatása

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 455. vizsgálati iránymutatásában (2016) leírt módszerrel. A 455. teljesítményalapú vizsgálati iránymutatás (PBTG) az ösztrogénreceptorok agonistáinak és antagonistáinak észlelésére szolgáló stabilan transzfektált transzaktivációs *in vitro* vizsgálatok (ER TA vizsgálatok) módszertanát ismerteti. Az iránymutatás több mechanikusan és funkcionálisan hasonló vizsgálati módszert tartalmaz az ösztrogénreceptor (vagyis az ER α és/vagy ER β ösztrogénreceptor) agonistáinak és antagonistáinak azonosítására, és a veszély értékelésére szolgáló új és átdolgozott vizsgálati módszerek validálásáról és nemzetközi elfogadásáról szóló OECD-irányelvben (1) megfogalmazott validálási elvekkel összhangban megkönnyíti az új – hasonló vagy módosított – vizsgálati módszerek kidolgozását. A teljesítményalapú vizsgálati iránymutatás alapjául szolgáló, teljes körűen validált (a 2. és a 3. függelékben ismertetett) vizsgálati referenciamódszerek a következők:
 - a stabilan transzfektált transzaktivációs (STTA) vizsgálat (2), amely (h) ER α -HeLa-9903 sejtvonalat alkalmaz; valamint
 - a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat (3), amely VM7Luc4E2 sejtvonalat¹ alkalmaz, ami elsősorban a humán ösztrogénreceptor α -t, kisebb mértékben a humán ösztrogénreceptor β -t fejezi ki (4) (5).

Az ugyanezt a veszélyességi végpontot célzó hasonló vizsgálatok kidolgozásához és validálásához rendelkezésre állnak és alkalmazandók teljesítményszabványok (6) (7). A teljesítményszabványok lehetővé teszik a 455. teljesítményalapú vizsgálati iránymutatás időben történő módosítását, hogy az új, hasonló vizsgálatokat be lehessen építeni az átdolgozott iránymutatásba; hasonló vizsgálatok azonban csak

¹ 2016 júniusa előtt ezt a sejtvonalat BG1Luc sejtvonálnak nevezték. A BG-1 sejteket eredetileg Greisinger és munkatársai (1998) írták le (35), később pedig a National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) kutatói karakterizálták (36). Nemrégiben rájöttek arra, hogy a kutatók a BG-1 sejtek két különböző variánsát, a BG-1 Fr-t és a BG-1 NIEHS-t használják. Li és munkatársai (2014) (37) a két BG-1 sejtvarianál részletes elemzése, többek között DNS-vizsgálatuk elvégzése révén kimutatták, hogy a BG-1 Fr egyedi sejtvarianál, és hogy a BG-1 NIEHS, vagyis a vizsgálat kidolgozásához eredetileg használt sejtvarianál nem a BG1 humán petefészekrák sejtvarianála, hanem az MCF7 humán mellráksejtvarianál variánsa. A vizsgálatban alkalmazott sejtvarianál, eredeti elnevezésén a BG1Luc4E2 (38), immár VM7Luc4E2 néven szerepel („V” = variáns; „M7” = MCF7 sejtek). Hasonlóképpen a vizsgálat jelenlegi elnevezése az VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktiváció. Bár ez módosítja a vizsgálat alapjául szolgáló sejtvarianál eredetét, nem befolyásolja sem a közzétett validálási tanulmányokat, sem a vizsgálat hasznosságát és alkalmazhatóságát az ösztrogén/antiösztrogén hatású vegyi anyagok szűrésére.

azután foglalhatók bele az iránymutatásba, hogy az OECD felülvizsgálta és jóváhagyta a teljesítményszabványok alkalmazását. A 455. vizsgálati iránymutatás alá tartozó vizsgálatok egységesen felhasználhatók az OECD-tagállamok ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálatok eredményeire vonatkozó követelményeinek kialakításához, ugyanakkor biztosítják az adatok kölcsönös elfogadásának előnyeit.

A vizsgálati módszerhez tartozó vizsgálatok háttere és elvei

2. Az OECD 1998-ban kiemelt fontosságú tevékenységet indított az endokrin rendszert esetlegesen károsító vegyi anyagok kiszűrésére és vizsgálatára vonatkozó meglévő vizsgálati iránymutatások felülvizsgálata, valamint új vizsgálati iránymutatások kidolgozása érdekében. Az OECD endokrin rendszert károsító anyagok vizsgálatára és értékelésére szolgáló fogalmi keretét 2012-ben átdolgozták. Az elvi keretrendszer eredeti és átdolgozott változatát mellékletként csatolták az endokrin rendszert károsító vegyi anyagok értékelésére vonatkozó szabványosított vizsgálati iránymutatásokról szóló OECD-iránymutatáshoz (8). Az elvi keretrendszer öt szintet határoz meg, amelyek mindegyike a biológiai komplexitás egy különálló szintjének felel meg. Az e vizsgálati módszer keretében ismertetett ösztrogénreceptor (ER) transzaktivációs (TA) vizsgálatok a 2. szinten helyezkednek el, amely magában foglalja „*a kiválasztott endokrin mechanizmus(ok)ról/útvonal(ak)ról adatokat szolgáltató in vitro vizsgálatokat*”. Ez a vizsgálati módszer *in vitro* transzaktivációs (TA) vizsgálatokra alkalmas, amelyek célja az ösztrogénreceptor (ER) agonistáinak és antagonistáinak azonosítása.
3. Az ösztrogének ösztrogénreceptorokkal való kölcsönhatása befolyásolhatja az ösztrogén kontrollálta gének átírását (transzkripcióját), ami sejtes folyamatok indukciójához vagy gátlásához vezethet, beleértve azokat, amelyek szükségesek a sejtosztódáshoz, a normál magzati fejlődéshez és a szaporodási funkciókhoz (9) (10) (11). A normál ösztrogénrendszerek zavara károsan befolyásolhatja a normál egyedfejlődést (ontogenezist), a reprodukciós egészséget és a reprodukív rendszer integritását.
4. Az *in vitro* transzaktivációs vizsgálatokban a receptor és ligandumja közötti direkt vagy indirekt kölcsönhatások egy riporter gén bekapcsolását (transzkripcióját) szabályozzák. Az ilyen vizsgálatokat széles körben használják specifikus sejtmagi receptorok, például ösztrogénreceptorok által szabályozott génkifejeződés értékelésére (12) (13) (14) (15) (16). Javasolt felhasználási területük az ösztrogénreceptorok által szabályozott ösztrogénhatású transzaktiváció észlelése (17) (18) (19). A sejtmagi ösztrogénreceptoroknak legalább két fő altípusa létezik, az α és a β , amelyeket különböző gének kódolnak. A megfelelő fehérjéknek eltérő biológiai funkciói vannak, eltérő a szöveti jelenlétük és ligandumkötő affinitásuk (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26). A sejtmagi ösztrogénreceptor α a klasszikus ösztrogénválaszt közvetíti (27) (28) (29) (30), ezért az ösztrogénreceptorok aktiválásának és gátlásának mérésére kifejlesztett modellek többsége az ösztrogénreceptor α -ra specifikus. A vizsgálatokat arra használják, hogy

azonosítsanak olyan vegyi anyagokat, amelyek aktiválják (vagy gátolják) az ösztrogénreceptorokat a ligandumkötésben, a kötés révén létrejött receptor-ligandum komplex specifikusan DNS válaszelemekhez kötődik és transzaktivál egy riporter gént, megnövelve ezáltal a markerfehérje celluláris kifejeződését. E vizsgálatokban különféle riporter gének alkalmazhatók. A luciferáz alapú rendszerekben a luciferáz enzim a luciferin szubsztrátot átalakítja, miközben biolumineszcens fény keletkezik, amely luminométerrel számszerűen mérhető. Gyakori riporterre példák lehetnek még a fluoreszcens fehérjék génjei és a *lacZ* gén, ez utóbbi a β -galaktozidázt kódolja, egy olyan enzimet, amely képes a szintelen X-gal szubsztrátot (5-bromo-4-kloro-indolil-galaktopiranozid) kék terméké alakítani, amelynek mennyisége spektrofotométerrel mérhető. Ezek a riporterok kereskedelmi forgalomban kapható vizsgálati készletekkel gyorsan és költséghatékonyan értékelhetők.

5. A stabilan transzfektált transzaktivációs és a VM7Luc transzaktivációs vizsgálatok validálási tanulmányai igazolták, hogy e vizsgálatok tervezett felhasználásuk tekintetében relevánsak és megbízhatóak (3) (4) (5) (30). A lumineszcencián alapuló, mellrák sejtvonalat alkalmazó ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálatok teljesítményszabványait az ICCVAM befoglalta a „LUMI-CELL® ösztrogénreceptor (VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs) vizsgálati módszer: a vegyi anyagok humán ösztrogénreceptorokra kifejtett agonista és antagonist aktivitásának azonosítására szolgáló *in vitro* vizsgálat” című (3), vizsgálati módszert értékelő jelentésébe. Ezeket a teljesítményszabványokat módosították, hogy alkalmazhatók legyenek mind a stabilan transzfektált transzaktivációs, mind a VM7Luc transzaktivációs vizsgálatra (2).
6. A vizsgálati módszerben használt fogalmak és rövidítések meghatározását az 1. függelék tartalmazza.

A transzaktivációs vizsgálatok alkalmazási területe és korlátai

7. E vizsgálatokat szűrési és rangsorolási célra ajánlják, ugyanakkor a mechanizmusra vonatkozólag is képesek adatokat szolgáltatni, amelyek felhasználhatók egy bizonyítékok súlyozásán (WoE) alapuló megközelítésben. A vizsgálatok tárgya egy vegyi anyag ösztrogénreceptorokhoz való kötődése által előidézett transzaktiváció *in vitro* rendszerben. Ezért az eredményekből nem lehet közvetlenül következtetni az intakt *in vivo* endokrin rendszerben megvalósuló összetett jelátvitelre és szabályozásra.
8. Habár az ösztrogénreceptorok által kiváltott transzaktivációt az endokrin zavarok (ED) hátterében álló egyik fő mechanizmusként tartják számon, más mechanizmusok is okozhatnak endokrin zavarokat, többek között i. az endokrin rendszeren belüli más receptorokkal és enzimrendszerekkel való interakciók, ii. hormonszintézis, iii. a hormonok metabolikus aktiválása és/vagy inaktiválása, iv. hormonok elszállítása a célszövetekhez és v. hormonok kiürülése a szervezetből.

Ezekkel a hatásmechanizmusokkal a tárgyalt vizsgálati módszerhez kapcsolódó vizsgálatok egyike sem foglalkozik.

9. E vizsgálati módszer célja, hogy felmérje a vegyi anyagok ösztrogénreceptor-dependens transzkripció aktiválására (vagyis agonistaként való viselkedésre) és gátlására (vagyis antagonistaként való viselkedésre) való képességét. Egyes vegyi anyagok a sejttípustól függően agonistaként és antagonistaként is viselkedhetnek, ezek az úgynevezett szelektív ösztrogénreceptor modulátorok (SERM). Az e vizsgálatokban negatívnak minősített vegyi anyagok tovább vizsgálhatók egy ösztrogénreceptorhoz kötődési tesztben, mielőtt megállapításra kerülne, hogy nem kötődnek a receptorhoz. Tekintettel az *in vitro* sejtszrendszerek korlátozott metabolikus képességére, a vizsgálatok valószínűleg csak a kiindulási molekula hatásáról szolgáltatnak információt. Mivel a validálás során csak egykomponensű anyagokat használtak, a vizsgálat keverékekre való alkalmazhatósága nem vetődött fel. Mindazonáltal a vizsgálati módszer elvileg alkalmazható több összetevőből álló anyagok, UVCB-k és keverékek vizsgálatára. A vizsgálati módszer tervezett szabályozási célt szolgáló adatgenerálás érdekében, több összetevőből álló anyagokon, UVCB-ken és keveréken történő alkalmazása előtt meg kell vizsgálni, hogy az megfelelő eredményeket biztosíthat-e erre a célra, és ha igen, miért. Ilyen megfontolások nem szükségesek, ha létezik a keverék vizsgálatára vonatkozó szabályozási követelmény.
10. Az 1. táblázat tájékoztatási céllal ismerteti az e vizsgálati módszer által leírt mindkét teljes körűen validált vizsgálati referenciamódszerben tesztelt 34 anyagra vonatkozó agonista vizsgálati eredményeket. A szóban forgó anyagok közül 26-et egyértelmű ösztrogénreceptor agonistaként határoztak meg, a többi 8-at negatívnak minősítették a közzétett jelentések, többek között az *in vitro* ösztrogénreceptor-kötődési és transzaktivációs vizsgálatok és/vagy az uterotrofikus vizsgálat alapján (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34). A 2. táblázat pedig ismerteti az e vizsgálati módszer által leírt mindkét teljes körűen validált vizsgálati referenciamódszerben vizsgált 15 anyagra vonatkozó antagonistá vizsgálati eredményeket. Ezen anyagok közül 4-et egyértelmű/feltételezett ösztrogénreceptor antagonistaként határoztak meg, míg 10-et negatívnak minősítettek a közzétett jelentések, többek között az *in vitro* ösztrogénreceptor-kötődési és transzaktivációs vizsgálatok alapján (2) (3) (18) (31). Az 1. és 2. táblázatban összefoglalt adatok vonatkozásában 100 %-os egyezés mutatható ki a két vizsgálati referenciamódszer között valamennyi anyag besorolása tekintetében (az antagonistá vizsgálatban szereplő mifepriszton kivételével), és minden anyagot helyesen osztályoztak ösztrogénreceptor agonistaként, ösztrogénreceptor antagonistaként vagy negatívként. E vegyi anyag-csoportról, valamint a validálási tanulmányok során a stabilan transzfektált transzaktivációs és a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálatban tesztelt egyéb vegyi anyagokról az ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat teljesítményszabványai nyújtanak bővebb tájékoztatást (6) (7), 2. függelék (1., 2., és 3. táblázat).

1. táblázat: A stabilan transzfektált transzaktivációs és a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat eredményeinek áttekintése azon anyagok vonatkozásában, amelyeket mindkét agonista vizsgálatban teszteltek, és ösztrogénreceptor agonistaként (POZ) vagy negatívként (NEG) azonosítottak

	Anyag	CAS-szám	STTA-vizsgálat ¹			VM7Luc ER TA vizsgálat ²		Osztályozás alapját képező adatforrás ⁴		
			ER TA aktivitás	PC ₁₀ érték (M)	PC ₅₀ érték ^b (M)	ER TA aktivitás	EC ₅₀ érték ^{b,3} (M)	Egyéb ER TA-k	ER-kötés	Uterotrofikus
1	17β-ösztadiol	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-ösztadiol	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-etinilösztadiol	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)	NT	NT
5	19-nortesztozteron	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-kumolfenol	599-64-4	POZ	$1,49 \times 10^{-7}$	$1,60 \times 10^{-6}$	POZ	$3,20 \times 10^{-7}$	POZ (5/5)	POZ	NT
7	4-terc-oktilfenol	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	520-36-5	POZ	$1,31 \times 10^{-7}$	$5,71 \times 10^{-7}$	POZ	$1,60 \times 10^{-6}$	POZ (26/26)	POZ	NT
9	Atrazin	1912-24-9	NEG	-	-	NEG	-	NEG (30/30)	NEG	NT
10	Biszfenol-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	Biszfenol-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	Butilbenzil-ftalát ^b	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	Kortikoszteron ^a	50-22-6	NEG	-	-	NEG	-	NEG (6/6)	NEG	NT
14	Kumesztrol ^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	NT
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	Dietilstilbösztrol ^b	56-53-1	POZ	$<1,00 \times 10^{-11}$	$2,04 \times 10^{-11}$	POZ	$3,34 \times 10^{-11}$	POZ (42/42)	POZ	NT
17	Di-n-butil-ftalát	84-74-2	POZ	$4,09 \times 10^{-6}$		POZ	$4,09 \times 10^{-6}$	POZ (6/11)	POZ	NEG
18	Etilparabén	120-47-8	POZ	$5,00 \times 10^{-6}$	(nincs PC ₅₀)	POZ	$2,48 \times 10^{-5}$	POZ		NT
19	Esztron ^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	Geniszen ^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	NT
22	Kempferol ^b	520-18-3	POZ	$1,36 \times 10^{-7}$	$1,21 \times 10^{-6}$	POZ	$3,99 \times 10^{-6}$	POZ (23/23)	POZ	NT
23	Kepone ^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	NT
24	Ketokonazol	65277-42-1	NEG	-	-	NEG	-	NEG (2/2)	NEG	NT

25	Linuron ^a	330-55-2	NEG	-	-	NEG	-	NEG (8/8)	NEG	NT
26	meso-Hexestrol	84-16-2	POZ	$<1,00 \times 10^{-11}$	$2,75 \times 10^{-11}$	POZ	$1,65 \times 10^{-11}$	POZ (4/4)	POZ	NT
27	Metil-tesztoszteron	58-18-4	POZ	$1,73 \times 10^{-7}$	$4,11 \times 10^{-6}$	POZ	$2,68 \times 10^{-6}$	POZ (5/6)	POZ	NT
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	NT
29	Noretynodrel	68-23-5	POZ	$1,11 \times 10^{-11}$	$1,50 \times 10^{-9}$	POZ	$9,39 \times 10^{-10}$	POZ (5/5)	POZ	NT
30	p,p'-Metoxiklór	72-43-5	POZ	$1,23 \times 10^{-6}$	(nincs PC ₅₀) ^b	POZ	$1,92 \times 10^{-6}$	POZ (24/27)	POZ	POZ
31	Fenobarbitál	57-30-7	NEG	-	-	NEG	-	NEG (2/2)	NEG	NT
32	Reszerpin	50-55-5	NEG	-	-	NEG	-	NEG (4/4)	NEG	NT
33	Spironolakton	52-01-7	NEG	-	-	NEG	-	NEG (4/4)	NEG	NT
34	Tesztoszteron	58-22-0	POZ	$2,82 \times 10^{-8}$	$9,78 \times 10^{-6}$	POZ	$1,75 \times 10^{-5}$	POZ (5/10)	POZ	NT

Rövidítések: CAS-szám = Vegyianyag Nyilvántartási Szolgálat (CAS) nyilvántartási szám; M = moláris; EC₅₀ = a vizsgálati anyag maximális tényleges hatásának felét kiváltó koncentráció; NEG = negatív; POZ = pozitív; NT = nem tesztelt; PC¹⁰ (és PC₅₀) = a vizsgálati anyagnak az a koncentrációja, amelynél a kiváltott válasz a pozitív kontroll (E2, 1 nM) egyes lemezekén indukált válaszához 10 %-a (illetve PC₅₀ esetében 50 %-a).

^aA stabilan transzfektált transzaktivációs és a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálatban tesztelt, gyakori előfordulása, ösztrogénreceptor agonistának vagy negatívnak minősített anyagok, amelyeket a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat validálási tanulmányban a pontosság értékelésére használtak (az ICCVAM VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálatról szóló értékelő jelentése, 4-1. táblázat (3)).

^bMivel nem álltak fent citotoxicitásból vagy oldhatatlanságból fakadó korlátok, a maximális vizsgált koncentráció 1×10^{-5} M (stabilan transzfektált transzaktivációs vizsgálat) és 1×10^{-3} M (VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat) volt.

^cA zárójelben feltüntetett szám a pozitív (POZ) vagy negatív (NEG) kategóriába sorolt vizsgálati eredmények és a referenciavizsgálatok teljes számának aránya.

¹A „Jelentéstervezet az ösztrogén hatású aktivitás észlelésére szolgáló stabilan transzfektált transzaktivációs vizsgálat elővalidálásáról és laborközi validálásáról – a humán ösztrogénreceptor alfa által közvetített riportergén hER-HeLa-9903 sejtvonallal történő vizsgálata” (2) által közölt értékek.

²Az ICCVAM „LUMI-CELL® ösztrogénreceptor (VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs) vizsgálati módszer: ösztrogénreceptorok agonistáinak és antagonistáinak azonosítására szolgáló *in vitro* módszer” című, vizsgálati módszert értékelő jelentése (3).

³Az átlagos EC₅₀ értékek a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat validálási tanulmányában részt vevő laboratóriumok (XDS, ECVAM és Hijosi) által szolgáltatott adatok alapján kerültek meghatározásra (3).

4 Az ösztrogénreceptor agonista és negatív besorolás alapját az ösztrogénreceptor-kötődési és transzaktivációs vizsgálati módszerek felülvizsgálatára vonatkozó ICCVAM-háttérdokumentumokban (31) szereplő információk és az ICCVAM felülvizsgálati háttérdokumentumainak véglegesítése után kiadott és átdolgozott publikációkban közzétett információk képezik (2) (3) (18) (31) (33) (34).

Megjegyzések: A vizsgálati módszer alapján végzett egyes vizsgálatok mérőszámai eltérőek. Bizonyos helyzetekben – teljes dózis-válasz görbe hiányában – nem lehet meghatározni az EC₅₀ értékét. Bár a PC₁₀ érték a stabilan transzfektált transzaktivációs vizsgálat fő mérőszámainak egyike, előállhatnak további helyzetek, ahol a PC_x fog hasznos információt nyújtani.

2. táblázat: A stabilan transzfektált transzaktivációs és a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat eredményeinek összevetése azon anyagok vonatkozásában, amelyeket mindkét antagonistá vizsgálatban teszteltek, és ösztrogénreceptor antagonistaként (POZ) vagy negatívként (NEG) azonosítottak

	Anyag ^a	CAS-szám	ER STTA-vizsgálat ¹		VM7Luc ER TA vizsgálat ²		ER STTA vizsgált anyagok hatása ⁴	ICCVAM ⁵ konszenzuson alapuló besorolás	MeSH ⁶ Kémiai osztály	Termékosztály ⁷
			ER TA aktivitás	IC ₅₀ érték ^b (M)	ER TA aktivitás	IC ₅₀ érték ^{b,3} (M)				
1	4-hidroxitamoxifén	68047-06-3	POZ	$3,97 \times 10^{-9}$	POZ	$2,08 \times 10^{-7}$	mérsékelten POZ	POZ	Szénhidrogén (ciklikus)	Gyógyszer
2	Dibenzo[a,h]antracén	53-70-3	POZ	Nincs IC ₅₀	POZ	Nincs IC ₅₀	POZ	FP	Policiklikus vegyület	Laboratóriumi vegyi anyag, természetes termék
3	Mifepriszton	84371-65-3	POZ	$5,61 \times 10^{-6}$	NEG	-	enyhén POZ	NEG	Szteroid	Gyógyszer
4	Raloxifen-hidroklorid	82640-04-8	POZ	$7,86 \times 10^{-10}$	POZ	$1,19 \times 10^{-9}$	mérsékelten POZ	POZ	Szénhidrogén (ciklikus)	Gyógyszer
5	Tamoxifén	10540-29-1	POZ	$4,91 \times 10^{-7}$	POZ	$8,17 \times 10^{-7}$	POZ	POZ	Szénhidrogén (ciklikus)	Gyógyszer
6	17β-ösztradiol	50-28-2	NEG	-	NEG	-	FN	FN	Szteroid	Gyógyszer, állatgyógyászati hatóanyag
7	Apigenin	520-36-5	NEG	-	NEG	-	NEG	NEG	Heterociklikus vegyület	Festék, természetes termék, gyógyszerészeti köztes termék
8	Atrazin	1912-24-9	NEG	-	NEG	-	NEG	FN	Heterociklikus vegyület	Gyomirtó szer
9	Di-n-butil-ftalát	84-74-2	NEG	-	NEG	-	NEG	NEG	Észter, ftálsav	Kozmetikai összetevő, ipari vegyi anyag, lágyítószer
10	Fenarimol	60168-88-9	NEG	-	NEG	-	nem vizsgált	FN	Heterociklikus vegyület, pirimidin	Gombaölő szer
11	Flavon	525-82-6	NEG	-	NEG	-	FN	FN	Flavonid, heterociklikus vegyület	Természetes termék, gyógyszer
12	Flutamid	13311-84-7	NEG	-	NEG	-	NEG	FN	Amid	Gyógyszer, állatgyógyászati hatóanyag
13	Geniszten	446-72-0	NEG	-	NEG	-	FN	NEG	Flavonid, heterociklikus vegyület	Természetes termék, gyógyszer
14	p-n-nonilfenol	104-40-5	NEG	-	NEG	-	nem vizsgált	NEG	Fenol	Köztes vegyi anyag

15	Rezveratrol	501-36-0	NEG	-	NEG	-	FN	NEG	Szénhidrogén (ciklikus)	Természetes termék

Rövidítések: CAS-szám = Vegyi anyag Nyilvántartási Szolgálat (CAS) nyilvántartási szám; M = moláris; IC₅₀ = a vizsgálati anyag maximális gátló hatásának felét kiváltó koncentráció; NEG = negatív; FN = feltételezhetően negatív; POZ = pozitív; FP = feltételezhetően pozitív.

^aA stabilan transzfektált transzaktivációs és a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálatban tesztelt, gyakori előfordulását, ösztrogénreceptor antagonistának vagy negatívnak minősített anyagok, amelyeket a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat validálási tanulmányban a pontosság értékelésére használtak (2) (3).

^bMivel nem álltak fent citotoxicitásból vagy oldhatatlanságból fakadó korlátok, a maximális vizsgált koncentráció 1 x 10⁻³ M (stabilan transzfektált transzaktivációs vizsgálat) és 1 x 10⁻⁵ M (VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat) volt.

¹ Ösztrogénreceptorok által közvetített aktivitás észlelésére szolgáló, stabilan transzfektált transzaktivációs vizsgálat validálási jelentése, B rész (2).

²Az ICCVAM „LUMI-CELL ösztrogénreceptor (VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs) vizsgálati módszer: ösztrogénreceptorok agonistáinak és antagonistáinak azonosítására szolgáló *in vitro* módszer” című, vizsgálati módszert értékelő jelentése (3).

³Az átlagos IC₅₀ értékek a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat validálási tanulmányában részt vevő laboratóriumok (XDS, ECVAM és Hijosi) által szolgáltatott adatok alapján kerültek meghatározásra (3).

⁴ A vizsgálat anyagok ösztrogénreceptor stabilan transzfektált transzaktivációs aktivitására az ösztrogénreceptor-kötődési vizsgálat CERi által dokumentált adataiból, az uterotrofikus vizsgálatból és a szabadon hozzáférhető szakirodalomban (2) szereplő információkból ismert hatásuk alapján következtek.

⁵ Az ösztrogénreceptor antagonistá vagy negatív besorolás alapját az ösztrogénreceptor-kötődési és transzaktivációs vizsgálatok felülvizsgálatára vonatkozó ICCVAM-háttérdokumentumokban (31) szereplő információk és az ICCVAM felülvizsgálati háttérdokumentumainak véglegesítése után kiadott és átdolgozott publikációkban közzétett információk képezik (2) (3) (18) (31).

⁶ Az anyagok egy vagy több kémiai osztályba sorolása az Egyesült Államok nemzetközileg elismert szabványosított osztályozási rendszere, a Medicine's Medical Subject Headings (MeSH) nemzeti könyvtára alapján történt (elérhető a következő címen: <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁷ Az anyagok egy vagy több termékosztályba sorolása az Egyesült Államok Medicine's Hazardous Substances Data Bank nemzeti könyvtára alapján történt (elérhető a következő címen: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).

AZ ÖSZTROGÉNRECEPTOR TRANSZAKTIVÁCIÓS VIZSGÁLAT ÖSSZETEVŐI

A vizsgálat alapvető összetevői

11. Ez a vizsgálati módszer olyan vizsgálatokra alkalmazható, amelyek stabilan transzfektált vagy endogén ösztrogénreceptor α -t, valamint egy stabilan transzfektált, egy vagy több ösztrogén válaszelemmel szabályozott riportergén konstrukciót használnak, amelyben azonban más receptorok, például ösztrogénreceptor β is jelen lehet. Ezek a vizsgálat alapvető összetevői.

Kontrollok

12. Meg kell határozni az egyes agonista és antagonist vizsgálatokhoz javasolt, párhuzamosan tesztelt referenciaszabvány alapját. A párhuzamos kontrollok (negatív, pozitív és oldószeres) arra szolgálnak, hogy igazolják a vizsgálat tesztkörülmények közötti megfelelő működését, és megteremtsek az alapját az egyes kísérletek összevetésének; általában részét képezik a szóban forgó kísérlet elfogadhatósági kritériumainak (1).

Standard minőség-ellenőrzési eljárások

13. Az egyes vizsgálatokhoz meghatározott standard minőség-ellenőrzési eljárásokat kell végezni annak biztosítása érdekében, hogy a sejtvonalak több passzálást követően is stabilak maradjanak, mikoplazmától (vagyis bakteriális fertőzéstől) mentesek legyenek, és később is megismételhetők legyenek az ösztrogénreceptor által közvetített várt válaszreakciók. Emellett ellenőrizni kell a sejtvonalak megfelelő azonosságát, valamint az egyéb fertőző ágensek (pl. gombák, élesztő és vírusok) hiányát.

A laboratórium jártasságának igazolása

14. Mielőtt ismeretlen vegyi anyagokat tesztelnének az e vizsgálati módszerhez kapcsolódó bármely vizsgálatnál, a laboratóriumoknak igazolniuk kell az adott vizsgálat alkalmazásában szerzett jártasságukat. A jártasság igazolásához minden laboratóriumnak tesztelnie kell az agonista vizsgálat 3. táblázatban feltüntetett 14 jártassági tesztanyagát és az antagonist vizsgálat 4. táblázatban szereplő 10 jártassági tesztanyagát. E jártassági vizsgálatok bizonyítják a vizsgálati rendszer reagálóképességét is. A jártassági tesztanyagok jegyzéke az ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálatok teljesítményszabványjaiban (6) megadott referenciaanyagok egy csoportjából tevődik össze. Ezek az anyagok kereskedelmi forgalomban beszerezhetők, olyan kémiai osztályokat képviselnek, amelyeknél gyakori az ösztrogénreceptor agonista vagy antagonist aktivitás, az ösztrogénreceptor agonistáktól és antagonistáktól elvárt potenciál megfelelő tartományát képviselik (erőstől a gyengéig) és vannak közöttük negatív besorolású anyagok is. A jártassági tesztanyagok vizsgálatát legalább kétszer, különböző napokon meg kell ismételni. A jártasság az egyes jártassági tesztanyagok megfelelő (pozitív/negatív) osztályba sorolásával igazolható. A vizsgálat elsajátítása során a jártassági vizsgálatot minden technikusként meg kell ismételni.

Sejttípustól függően e jártassági tesztanyagok némelyike szelektív ösztrogénreceptor modulátorként viselkedhet, vagyis kifejthet agonista és antagonistá aktivitást is. Azonban a jártassági tesztanyagok 3. és 4. táblázatban ismertetett besorolása ismert domináns aktivitásuk alapján történt, azt kell figyelembe venni a jártassági értékelés során.

15. A vizsgálat teljesítményének igazolása és minőség-ellenőrzés céljából minden laboratóriumnak referenciaszabványok (pl. 17β -ösztradiol és tamoxifén), kontrollként szolgáló pozitív és negatív vegyi anyagok, valamint oldószeres kontrollanyagok (pl. DMSO) adataiból álló agonista és antagonistá adatbázisokat kell létrehozniuk. Az induló adatbázist legalább 10 független agonista (pl. 17β -ösztradiol) és 10 független antagonistá (pl. tamoxifén) vizsgálatmenet alapján kell létrehozni. Az adatbázist ki kell bővíteni e referenciaszabványok és oldószeres kontrollanyagok későbbi elemzéseiből származó eredményekkel, hogy az idő múlásával is biztosítani lehessen a biológiai vizsgálat konzisztenciáját és teljesítményét.

3. táblázat: Az agonista vizsgálathoz használatos jártassági tesztanyagok (14) jegyzéke⁸

Szám ⁷	Anyag	CAS-szám	Várt válasz ¹	STTA-vizsgálat			VM7Luc ER TA vizsgálat		MeSH kémiai osztály ⁵	Termékosztály ⁶
				PC ₁₀ érték (M) ²	PC ₅₀ érték (M) ²	Vizsgálati koncentrációtartomány (M)	VM7Luc EC ₅₀ érték (M) ³	Legmagasabb konc. dózisbehatároláshoz (M) ⁴		
14	Dietilstilbösztrol	56-53-1	POZ	$<1,00 \times 10^{-11}$	$2,04 \times 10^{-11}$	10^{-14} – 10^{-8}	$3,34 \times 10^{-11}$	$3,73 \times 10^{-4}$	Szénhidrogén (ciklikus)	Gyógyszer, állatgyógyászati hatóanyag
12	17 α -ösztadiol	57-91-0	POZ	$4,27 \times 10^{-11}$	$6,44 \times 10^{-10}$	10^{-11} – 10^{-5}	$1,40 \times 10^{-9}$	$3,67 \times 10^{-3}$	Szteroid	Gyógyszer, állatgyógyászati hatóanyag
15	meso-Hexestrol	84-16-2	POZ	$<1,00 \times 10^{-11}$	$2,75 \times 10^{-11}$	10^{-11} – 10^{-5}	$1,65 \times 10^{-11}$	$3,70 \times 10^{-3}$	Szénhidrogén (ciklikus), fenol	Gyógyszer, állatgyógyászati hatóanyag
11	4-terc-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	Köztes vegyi anyag
9	Geniszten	446-72-0	POZ	$2,24 \times 10^{-9}$	$2,45 \times 10^{-8}$	10^{-11} – 10^{-5}	$2,71 \times 10^{-7}$	$3,70 \times 10^{-4}$	Flavonid, heterociklikus vegyület	Természetes termék, gyógyszer
6	Biszfénol-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	Köztes vegyi anyag
2	Kempferol	520-18-3	POZ	$1,36 \times 10^{-7}$	$1,21 \times 10^{-6}$	10^{-11} – 10^{-5}	$3,99 \times 10^{-6}$	$3,49 \times 10^{-3}$	Flavonid, heterociklikus vegyület	Természetes termék
3	Butilbenzil-ftalát	85-68-7	POZ	$1,14 \times 10^{-6}$	$4,11 \times 10^{-6}$	10^{-11} – 10^{-5}	$1,98 \times 10^{-6}$	$3,20 \times 10^{-4}$	Karbonsav, észter, ftálsav	Lágyítószer, ipari vegyi anyag
4	p,p'-Methoxyklór	72-43-5	POZ	$1,23 \times 10^{-6}$	-	10^{-11} – 10^{-5}	$1,92 \times 10^{-6}$	$2,89 \times 10^{-3}$	Szénhidrogén (halogénezett)	Növényvédő szer, állatgyógyászati hatóanyag
1	Etilparabén	120-47-8	POZ	$5,00 \times 10^{-6}$	-	10^{-11} – 10^{-5}	$2,48 \times 10^{-5}$	$6,02 \times 10^{-3}$	Karbonsav, fenol	Gyógyszer, konzerváló szer
17	Atrazin	1912-24-9	NEG	-	-	10^{-10} – 10^{-4}	-	$4,64 \times 10^{-4}$	Heterociklikus vegyület	Gyomirtó szer
20	Spironolakton	52-01-7	NEG	-	-	10^{-11} – 10^{-5}	-	$2,40 \times 10^{-3}$	Lakton, szteroid	Gyógyszer
21	Ketokonazol	65277-42-1	NEG	-	-	10^{-11} – 10^{-5}	-	$9,41 \times 10^{-5}$	Heterociklikus vegyület	Gyógyszer
22	Reszerpin	50-55-5	NEG	-	-	10^{-11} – 10^{-5}	-	$1,64 \times 10^{-3}$	Heterociklikus vegyület,	Gyógyszer, állatgyógyászati

									indol	hatóanyag

Rövidítések: CAS-szám = Vegyianyag Nyilvántartási Szolgálat (CAS) nyilvántartási szám; EC₅₀ = a vizsgálati anyag maximális tényleges hatásának felét kiváltó koncentráció; NEG = negatív; POZ = pozitív;

PC¹⁰ (és PC₅₀) = a vizsgálati anyagnak az a koncentrációja, amelynél a kiváltott válasz a pozitív kontroll (E2, 1 nM) egyes lemezekén indukált válaszához 10 %-a (illetve PC₅₀ esetében 50 %-a).

¹Az ösztrogénreceptor agonista aktivitás pozitív vagy negatív besorolásának alapját az ösztrogénreceptor-kötődési és transzaktivációs vizsgálatok felülvizsgálatára vonatkozó ICCVAM-háttérdokumentumok (31) és az ICCVAM felülvizsgálati háttérdokumentumainak véglegesítése után kiadott és átdolgozott referenciavizsgálatokból nyert empirikus adatok és egyéb információk képezik

(2) (3) (18) (31) (32) (33) (34).

²A „Jelentéstervezet az ösztrogén hatású aktivitás észlelésére szolgáló stabilan transzfektált transzaktivációs vizsgálat elővalidálásáról és laborközi validálásáról – a humán ösztrogénreceptor alfa által közvetített riportergén hER-HeLa-9903 sejtvonallal történő vizsgálata” (30) által közölt értékek.

³Az átlagos EC₅₀ értékek a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat validálási tanulmányában részt vevő laboratóriumok (XDS, ECVAM és Hijosi) által szolgáltatott adatok alapján kerültek meghatározásra (3).

⁴A jelzett koncentrációértékek a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat validálása során (dózisbehatárolás céljából) vizsgált legmagasabb koncentrációk. Amennyiben az egyes laboratóriumok eltérő koncentrációértékeket alkalmaztak, a legmagasabb koncentráció került feltüntetésre. Lásd az ICCVAM „LUMI-CELL® ösztrogénreceptor (VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs) vizsgálati módszer: a vegyi anyagok humán ösztrogénreceptorokra kifejtett agonista és antagonisták aktivitásának azonosítására szolgáló *in vitro* vizsgálat” című (3), vizsgálati módszert értékelő jelentésének 4-10. táblázatát.

⁵Az anyagok egy vagy több kémiai osztályba sorolása az Egyesült Államok nemzetközileg elismert szabványosított osztályozási rendszere, a Medicine’s Medical Subject Headings (MeSH) nemzeti könyvtára alapján történt (elérhető a következő címen: <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁶Az anyagok egy vagy több termékosztályba sorolása az Egyesült Államok Medicine’s Hazardous Substances Database nemzeti könyvtára alapján történt (elérhető a következő címen: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>)

⁷A teljesítményszabványok (6) 1. táblázatából (az ösztrogénreceptor agonisták meghatározása pontosságának értékelésére használt referencia vegyi anyagok (22) jegyzéke).

⁸Amennyiben egy adott jártassági tesztanyag kereskedelmi forgalmazása megszűnik, akkor használható helyette egy azonos besorolású, hasonló potenciállal és hatásmechanizmussal rendelkező, azonos kémiai osztályba tartozó anyag.

4. táblázat: Az antagonistá vizsgálatához használatos jártassági tesztanyagok (10) jegyzéke

	Anyag ^a	CAS-szám	ER STTA-vizsgálat ¹			VM7Luc ER TA vizsgálat ²			ER STTA ¹ vizsgált anyagok hatása	ICCVAM ⁵ konszenzuson alapuló besorolás	MeSH ⁶ Kémiai osztály	Termékosztály ⁷
			ER TA aktivitás	IC ₅₀ (M)	Vizsgálati koncentrációtartomány (M)	ER TA aktivitás	IC ₅₀ ³ (M)	Legmagasabb konc. dózisbehatároláshoz (M) ⁴				
1	4-hidroxitamoxifén	68047-06-3	POZ	$3,97 \times 10^{-9}$	$10^{-12} - 10^{-7}$	POZ	$2,08 \times 10^{-7}$	$2,58 \times 10^{-4}$	mérsékelten POZ	POZ	Szénhidrogén (ciklikus)	Gyógyszer
2	Raloxifen- hidroklorid	82640-04-8	POZ	$7,86 \times 10^{-10}$	$10^{-12} - 10^{-7}$	POZ	$1,19 \times 10^{-9}$	$1,96 \times 10^{-4}$	mérsékelten POZ	POZ	Szénhidrogén (ciklikus)	Gyógyszer
3	Tamoxifén	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	Szénhidrogén (ciklikus)	Gyógyszer
4	17β-ösztadiol	50-28-2	NEG	-	$10^{-9} - 10^{-4}$	NEG	-	$3,67 \times 10^{-3}$	negatívnak kell lennie*	FN	Szteroid	Gyógyszer, állatgyógyászati hatóanyag
5	Apigenin	520-36-5	NEG	-	$10^{-9} - 10^{-4}$	NEG	-	$3,70 \times 10^{-4}$	NEG	NEG	Heterociklikus vegyület	Festék, természetes termék, gyógyszerészeti köztes termék
6	Di-n-butyl-ftalát	84-74-2	NEG	-	$10^{-8} - 10^{-3}$	NEG	-	$3,59 \times 10^{-3}$	NEG	NEG	Észter, ftálsav	Kozmetikai összetevő, ipari vegyi anyag, lágysítószer
7	Flavon	525-82-6	NEG	-	$10^{-8} - 10^{-3}$	NEG	-	$4,50 \times 10^{-4}$	negatívnak kell lennie*	FN	Flavonid, heterociklikus vegyület	Természetes termék, gyógyszer
8	Geniszen	446-72-0	NEG	-	$10^{-9} - 10^{-4}$	NEG	-	$3,70 \times 10^{-4}$	negatívnak kell lennie*	NEG	Flavonid, heterociklikus vegyület	Természetes termék, gyógyszer
9	p-n-nonilfenol	104-40-5	NEG	-	$10^{-9} - 10^{-4}$	NEG	-	$4,54 \times 10^{-4}$	nem vizsgált	NEG	Fenol	Köztes vegyi anyag
10	Rezveratrol	501-36-0	NEG	-	$10^{-8} - 10^{-3}$	NEG	-	$4,38 \times 10^{-4}$	negatívnak kell lennie*	NEG	Szénhidrogén (ciklikus)	Természetes termék

Rövidítések: CAS-szám = Vegyianyag Nyilvántartási Szolgálat (CAS) nyilvántartási szám; M = moláris; IC₅₀ = a vizsgálati anyag maximális gátló hatásának felét kiváltó koncentráció; NEG = negatív; FN = feltételezhetően negatív; POZ = pozitív.

* a szakirodalmi áttekintésben negatívként besorolva (2).

^aA stabilan transzfektált transzaktivációs és a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálatban tesztelt, gyakori előfordulású, ösztrogénreceptor antagonistának vagy negatívnak minősített anyagok, amelyeket a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat validálási tanulmányban a pontosság értékelésére használtak (2) (3).

¹ ösztrogénreceptorok által közvetített aktivitás észlelésére szolgáló, stabilan transzfektált transzaktivációs vizsgálat validálási jelentése, B rész (2).

²Az ICCVAM „LUMI-CELL ösztrogénreceptor (VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs) vizsgálati módszer: ösztrogénreceptorok agonistáinak és antagonistáinak azonosítására szolgáló *in vitro* módszer” című, vizsgálati módszert értékelő jelentése (3).

³Az átlagos IC₅₀ értékek a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat validálási tanulmányában részt vevő laboratóriumok (XDS, ECVAM és Hijosi) által szolgáltatott adatok alapján kerültek meghatározásra (3).

⁴A jelzett koncentrációértékek a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat validálása során (dózisbehatárolás céljából) vizsgált legmagasabb koncentrációk. Amennyiben az egyes laboratóriumok eltérő koncentrációértékeket alkalmaztak, a legmagasabb koncentráció került feltüntetésre. Lásd az ICCVAM vizsgálati módszert értékelő jelentésének 4-11. táblázatát. A „LUMI-CELL® ER (VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs) vizsgálati módszer: a vegyi anyagok humán ösztrogénreceptorokra kifejtett agonista és antagonisták aktivitásának azonosítására szolgáló *in vitro* vizsgálat” című (3), vizsgálati módszert értékelő jelentésébe.

⁵Az ösztrogénreceptor antagonisták vagy negatív besorolás alapját az ösztrogénreceptor-kötődési és transzaktivációs vizsgálati módszerek felülvizsgálatára vonatkozó ICCVAM-háttérdokumentumokban (31) szereplő információk és az ICCVAM felülvizsgálati háttérdokumentumainak véglegesítése után kiadott és átdolgozott publikációkban közzétett információk képezik (2) (3) (18) (31).

⁶ Az anyagok egy vagy több kémiai osztályba sorolása az Egyesült Államok nemzetközileg elismert szabványosított osztályozási rendszere, a Medicine’s Medical Subject Headings (MeSH) nemzeti könyvtára alapján történt (elérhető a következő címen: <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁷ Az anyagok egy vagy több termékosztályba sorolása az Egyesült Államok Medicine’s Hazardous Substances Data Bank nemzeti könyvtára alapján történt (elérhető a következő címen: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).

A vizsgálatmenet elfogadhatósági kritériumai

16. A vizsgálatmenetek elfogadására vagy elvetésére az egyes kísérletekben alkalmazott referenciaszabványok és kontrollanyagok eredményeinek értékelése alapján kerül sor. A referenciaszabványok PC_{50} (EC_{50}) vagy IC_{50} értékének meg kell felelnie a választott vizsgálat elfogadhatósági kritériumainak (ezeket a stabilan transzfektált transzaktivációs vizsgálat esetében a 2. függelék, a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat esetében a 3. függelék tartalmazza), és minden elfogadott kísérletben megfelelően kell besorolni az összes pozitív/negatív kontrollanyagot. A vizsgálat következetes végrehajtásának képességét bizonyítani kell azáltal, hogy a laboratóriumok adatbázist hoznak létre és tartanak fent a referenciaszabványok és kontrollanyagok adataiból (lásd a 15. pontot). A laboratóriumon belüli reprodukálhatóság mérésére használhatók a referenciaszabványok átlagához illesztett, több kísérletből származó paraméterekből álló görbe standard deviációi (SD) vagy variációs koefficiensei (CV). Ezenkívül érvényesülniük kell az elfogadhatósági kritériumokra vonatkozó alábbi elveknek is:

- Elegendő mennyiségű adattal kell rendelkezni ahhoz, hogy számszerűen értékelni lehessen az ösztrogénreceptor aktivitást (agonista vizsgálat esetén) vagy gátlást (antagonista vizsgálat esetén) (vagyis a hatékonyságot és a potenciált).
- A megfelelő érzékenység biztosítása érdekében a referenciaösztrogén referenciakonzentrációjánál kifejtett átlagos riporter aktivitásnak – a vivőanyag (oldószeres) kontroll esetén tapasztalt aktivitáshoz képest – el kell érnie legalább a vizsgálatokban meghatározott minimumszintet. A stabilan transzfektált transzaktivációs és a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat esetén ez a minimumszint az egyes lemezekon vizsgált vivőanyagos kontrollok átlagának négyszerese.
- A vizsgált koncentrációknak a vizsgálati vegyi anyagok oldhatósági tartományán belül kell maradniuk és nem okozhatnak citotoxicitást.

Az adatok elemzése

17. A válaszok pozitív vagy negatív kategóriába sorolásakor az egyes vizsgálatokhoz meghatározott adatértelmezési eljárásra kell támaszkodni.
18. Az elfogadhatósági kritériumok (16. pont) teljesítése jelzi a vizsgálat megfelelő működését, de nem garantálja az egyes vizsgálatmenetek adatainak pontosságát. Az adatok pontosságát az jelzi a legjobban, ha az első vizsgálatmenet eredményei megismételhetők. Amennyiben két vizsgálatmenet bizonyította az eredmény reprodukálhatóságát (például egy adott vizsgálati vegyi anyag mindkét vizsgálatmenetben pozitívnak bizonyult), akkor harmadik vizsgálatmenetre nincs szükség.
19. Ha két vizsgálatmenet nem bizonyítja az eredmény reprodukálhatóságát (például egy vizsgálati vegyi anyag az egyik vizsgálatmenetben pozitívnak, a másikban negatívnak

minősült), vagy magasabb fokú bizonyosságot kell szerezni a vizsgálat kimeneteléről, legalább három egymástól független vizsgálatmenetet kell lefolytatni. Ebben az esetben az osztályozás alapja a három vizsgálatmenet során kialakult két megegyező eredmény lesz.

Az adatok értelmezésének általános kritériumai

20. Jelenleg nincs általánosan elfogadott módszer az ösztrogénreceptor transzaktivációs adatok értelmezésére. Ugyanakkor az ösztrogénreceptor által közvetített aktivitás kvalitatív (pl. pozitív/negatív) és/vagy kvantitatív (pl. EC_{50} , PC_{50} , IC_{50}) értékelésének empirikus adatokon és megalapozott tudományos véleményen kell nyugodnia. A pozitív eredményeket lehetőség szerint jellemezni kell mind a vivőanyag (oldószeres) kontrollhoz vagy referenciaösztrogénhez képest előidézett hatás mértékével, mind a hatást kiváltó koncentrációval (pl. EC_{50} , PC_{50} , RPC_{Max} , IC_{50} stb.).

Vizsgálati jelentés

21. A vizsgálati jelentésnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálat:

- az alkalmazott vizsgálat;
- kontroll/referenciaszabvány/vizsgálati vegyi anyag;
- eredet, gyártási szám, felhasználási határidő, ha rendelkezésre áll;
- a vizsgálati vegyi anyag stabilitása, ha ismert;
- a vizsgálati vegyi anyag oldhatósága és stabilitása az oldószerben, ha ismert;
- adott esetben a pH-érték, az ozmolalitás és a kicsapódás mérése abban a tápfolyadékban, amelyhez a vizsgálati vegyi anyagot hozzáadták.

Egy összetevőből álló anyag:

- fizikai megjelenés, vízdékonyság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok;
- kémiai azonosítás, például IUPAC- vagy CAS-névvel, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet alapján, tisztaság, adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb. alapján

Több összetevőből álló anyag, UVCB-k és keverékek:

- amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosítója (lásd fent), mennyiségi előfordulása és releváns fizikai-kémiai tulajdonságai révén jellemezve.

Oldószer/vivőanyag:

- jellemzés (az anyag természete, forgalmazója és gyártási száma);

- az oldószer/vivőanyag kiválasztásának indokolása;
- a vizsgálati vegyi anyag oldhatósága és stabilitása az oldószerben/vivőanyagban, ha ismert.

Sejtek:

- a sejtek típusa és eredete;
 - endogén módon fejeződött ki az ösztrogénreceptor? Ha nem, mely receptor(oka)t transzfektálták?;
 - az alkalmazott riporterkonstrukció(k) (ideértve a forrást);
 - transzfektálási módszer;
 - a stabil transzfekció fenntartására alkalmazott szelekció (ahol van);
 - a transzfektálási módszer releváns a stabil sejtvonalak szempontjából?
- sejtpasszálások száma (felolvasztástól);
- passzált sejtek száma felolvasztáskor;
- a sejtenyészetek fenntartásának módszerei.

Vizsgálati körülmények:

- oldhatóság korlátai;
- az életképesség felmérésére alkalmazott módszer leírása;
- a közeg összetétele, CO₂-koncentráció;
- a vizsgálati vegyi anyag koncentrációi;
- a hozzáadott vivőanyag és vizsgálati vegyi anyag mennyisége;
- inkubációs hőmérséklet és páratartalom;
- a kezelés időtartama;
- sejtsűrűség a kezelés elején és annak időtartama alatt;
- pozitív és negatív referenciaszabványok;
- riporter reagensek (a termék neve, forgalmazója és gyártási száma);
- azok a kritériumok, amelyek meghatározzák, hogy a vizsgálatmenetek pozitívnak, negatívnak vagy többféleképpen értelmezhetőnek tekintendők-e.

Elfogadhatóság ellenőrzése:

- az egyes vizsgálati lemezek indukciós faktorai, illetve hogy az indukciós faktorok a dokumentált kontrollok alapján megfelelnek-e a vizsgálatához szükséges minimumnak;

- az elfogadhatósági kritériumok tényleges értékei, pl. a párhuzamos pozitív kontrollok/referenciaszabványok $\log_{10}EC_{50}$, $\log_{10}PC_{50}$, $\log IC_{50}$ és Hill-merekségi értékei.

Eredmények:

- nyers és normalizált adatok;
- az indukciós faktor maximális szintje;
- citotoxicitási adatok;
- ha létezik, a legkisebb hatásos koncentráció (LEC);
- adott esetben az RPC_{Max} , PC_{Max} , PC_{50} , IC_{50} és/vagy EC_{50} értékek;
- amennyiben lehetséges, a koncentráció-válasz összefüggés;
- statisztikai elemzések, ha végeztek ilyeneket, hiba- és megbízhatósági számításokkal (pl. SEM, SD, CV vagy 95% CI), és annak leírása, hogy milyen módon kapták ezeket az értékeket.

Az eredmények értékelése

Következtetések

SZAKIRODALOM

- (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.), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.
- (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), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.
- (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): p. 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): p. 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.), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.
- (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.), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.
- (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.), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

- (9) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept. *Climacteric*, 5 Suppl 2: p. 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): p. 1073-89.
- (11) Younes M. and Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 135(1): p. 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): p. 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): p. 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): p. 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): p. 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): p. 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): p. 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): p. 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): p. 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): p. 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): p. 105-12.
- (25) Deroo B.J. and Buensuceso A.V. (2010). Minireview: Estrogen Receptor- β : Mechanistic Insights from Recent Studies, *Molecular Endocrinology*, 24(9): p. 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): p. 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): p. 1460-1468.
- (28) Toft D. (1972). The Interaction of Uterine Estrogen Receptors with DNA, *Journal of Steroid Biochemistry*, 3(3): p. 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: p. 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):p. 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.

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS RÖVIDÍTÉSEK

Elfogadhatósági kritériumok: a kísérleti kontrollok és referenciaszabványok megfelelőségére vonatkozó minimális előírások. Ahhoz, hogy egy kísérlet érvényesnek minősüljön, meg kell felelni valamennyi elfogadhatósági kritériumnak.

Pontosság (egyezőség): a vizsgálati eredmények és az elfogadott referenciaértékek közötti egyezés eltérése. A vizsgálat megfelelőségének mutatója, és relevanciájának egyik szempontja. E kifejezést gyakran használják az „egyezőség” szinonimájaként, amely arra utal, hogy egy adott vizsgálat milyen arányban szolgáltat helyes eredményeket (1).

Agonista: olyan anyag, amely egy specifikus receptorhoz kötődve valamilyen választ, pl. transzkripciót vált ki.

Antagonista: a receptor ligandumok vagy vegyi anyagok azon típusa, amely egy receptorhoz kötődve nem vált ki biológiai válaszreakciót, hanem gátolja vagy tompítja az agonisták által indukált válaszokat.

Antiösztrogén aktivitás: egy vegyi anyag azon képessége, hogy gátolja az ösztrogénreceptorok által közvetített 17β -ösztradiol hatását.

Sejtmorfológia: egy szövettenyészetet tartalmazó lemez egyetlen lyukában lévő egyrétegű sejtek alakja és megjelenési formája. Az elhaló sejtek gyakran a normálistól eltérő sejtmorfológiával rendelkeznek.

CF: Az OECD endokrin rendszert károsító anyagok vizsgálatára és értékelésére szolgáló fogalmi kerete.

Aktív szén/dextrán kezelés: a sejt kultúrához használt szérum kezelési módja. Az aktív szénnel/dextránnal végzett kezelés (szaknyelven „stripping-eljárás”) során eltávolítják az endogén hormonokat és hormonmegkötő fehérjéket.

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Citotoxicitás: a sejtstruktúrát vagy a sejtfunkciót érő káros hatások, amelyek végső soron sejtpusztuláshoz vezethetnek, kimutatásához összevetik a lyukban növekvő sejtek számában az expozíciós időszak végére bekövetkezett csökkenést vagy a mérhető sejtfunkciók csökkenését a párhuzamos vivőanyagos kontrollal.

CV: variációs koefficiens.

DCC-FBS: dextránbevonatú aktív szénnel kezelt magzati borjú szérum.

DMEM: Dulbecco-féle módosított Eagle-tápoldat.

DMSO: dimetil-szulfoxid.

E2: 17 β -ösztradiol

EC₅₀: a vizsgálati vegyi anyag maximális hatásának felét kiváltó koncentráció.

ED: az endokrin rendszer károsítása.

hER α : humán ösztrogénreceptor alfa.

hER β : humán ösztrogénreceptor béta.

EFM: ösztrogénmentes közeg. A Dulbecco-féle módosított Eagle-tápoldat (DMEM) kiegészítve 4,5 % dextránbevonatú aktív szénnel kezelt magzati borjú szérummal, 1,9 % L-glutaminnal és 0,9 % penicillinnel és sztreptomocinnel.

ER: ösztrogénreceptor.

ERE: ösztrogén válaszelem.

Ösztrogénhatású aktivitás: egy vegyi anyag azon képessége, hogy a 17 β -ösztradiolhoz hasonlóan ösztrogénreceptorokhoz kötődjön és aktiválja azokat. Ezzel a vizsgálati módszerrel a humán ösztrogénreceptor alfa által közvetített ösztrogénhatású aktivitás észlelhető.

ER TA: ösztrogénreceptor transzaktiváció.

FBS: magzati borjú szérum.

HeLa: humán méhnyakból származó halhatatlan sejtvonal.

HeLa9903: egy hER α -val és egy luciferáz riportergénnel stabilan transzfektált HeLa-sejt szubklónja.

IC₅₀: egy gátló vizsgálati vegyi anyag maximális tényleges hatásának felét kiváltó koncentráció.

ICCVAM: alternatív módszerek validálásával foglalkozó ügynökségközi koordinációs bizottság.

Laboratóriumok közötti reprodukálhatóság: annak a mutatója, hogy különböző minősített laboratóriumok milyen mértékben képesek ugyanazon protokoll alkalmazásával és ugyanazon anyagok vizsgálatával hasonló kvalitatív és kvantitatív eredményeket elérni. A laboratóriumok közötti reprodukálhatóság az elővalidálási és validálási folyamat során kerül meghatározásra, és annak mértékét jelzi, hogy az adott vizsgálat mennyire sikeresen vihető át laboratóriumok között; más néven laboratóriumok közötti megismételhetőség (1).

Laboratóriumon belüli reprodukálhatóság: annak meghatározása, hogy egy adott laboratóriumon belül dolgozó szakemberek milyen mértékben képesek egy meghatározott protokoll alapján különböző időpontokban sikeresen megismételni az eredményeket. Más

néven „laboratóriumon belüli megismételhetőség” (1).

LEC: a legkisebb hatásos koncentráció a vizsgálati vegyi anyag azon legalacsonyabb koncentrációja, amely választ vált ki (vagyis a vizsgálati vegyi anyag legkisebb koncentrációja, amelynél az indukciós faktor statisztikailag eltér a párhuzamos vivőanyagok kontrolltól).

Me-too vizsgálat: olyan vizsgálatok köznap elnevezése, amelyek strukturálisan és funkcionálisan hasonlóak egy validált és elfogadott, referenciaként szolgáló vizsgálati módszerhez. A hasonló vizsgálati módszer szinonimája.

MT: metallotionein.

MMTV: egér emlőtumor vírus.

OHT: 4-hidroxitamoxifén.

PBTG: teljesítményalapú vizsgálati iránymutatás.

PC (pozitív kontroll): erős hatást kifejtő anyag, lehetőség szerint 17β -ösztradiol, amelyet befoglalnak minden vizsgálatba, hogy biztosítsák a vizsgálat megfelelő működését.

PC₁₀: a vizsgálati vegyi anyagnak az a koncentrációja, amelynél az agonista vizsgálat során mért aktivitás a pozitív kontroll (a stabilan transzfektált transzaktivációs vizsgálatnál 1nM E2) egyes lemezekén indukált maximális aktivitásának 10 %-a.

PC₅₀: a vizsgálati vegyi anyagnak az a koncentrációja, amelynél az agonista vizsgálat során mért aktivitás a pozitív kontroll (E2 a vizsgálati módszerben megadott referenciakonzentrációban) egyes lemezekén indukált maximális aktivitásának 50 %-a.

PC_{Max}: a vizsgálati vegyi anyag RPC_{Max} hatást kiváltó koncentrációja.

Teljesítményszabványok: validált vizsgálaton alapuló szabványok, amelyek a javasolt, végrehajtás és funkcionalitás szempontjából hasonló vizsgálat összehasonlíthatósági értékelésének alapjául szolgálnak. Ide tartoznak: (1) a vizsgálat alapvető összetevői; (2) a referencia-vegyianyagok minimális jegyzéke, amely a validált vizsgálati módszer elfogadható teljesítményének igazolására használt vegyi anyagokból került összeállításra; és (3) a validált vizsgálati módszer eredményei alapján meghatározott, hasonló megbízhatósági és pontossági szintek, amelyeket a javasolt vizsgálatnak teljesítenie kell a minimális jegyzék referencia-vegyianyagainak felhasználásával történő értékelése során (1).

Jártassági tesztanyagok: a teljesítményszabványokban megadott referenciaanyagokon belüli alcsoport, amelyet a laboratóriumok felhasználhatnak a szabványosított vizsgálati módszerben való szakmai jártasságuk igazolására. Ezeket az anyagokat általában az alapján választják ki, hogy összességükben lefedik a válaszreakciók lehetséges tartományát, kereskedelmi forgalomban kaphatók és rendelkezésre állnak rájuk vonatkozó minőségi referenciaadatok.

Jártasság: annak igazolása, hogy a laboratórium képes megfelelően lefolytatni egy adott vizsgálatot, mielőtt ismeretlen anyagokat tesztelne.

Referenciaösztrogén (pozitív kontroll, PC): 17 β -ösztradiol (E2, CAS-száma: 50-28-2).

Referenciaszabvány: egy adott vizsgálat megfelelőségének bizonyítására használt referenciaanyag. A stabilan transzfektált transzaktivációs és a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat referenciaszabványa a 17 β -ösztradiol.

Vizsgálati referenciamódszerek: A 455. teljesítményalapú vizsgálati iránymutatás alapját képező vizsgálatok.

Relevancia: valamely vizsgálat és a vizsgált hatás kapcsolatát adja meg, valamint azt, hogy van-e a vizsgálatnak az adott cél szempontjából értelme és haszna. Azt tükrözi, hogy a vizsgálat mennyire pontosan méri vagy jelzi előre a vizsgált biológiai hatást. A relevancia meghatározása során a vizsgálat pontosságát (az eredmények egyezését) figyelembe kell venni (1).

Megbízhatóság: a vizsgálat laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti időbeli reprodukálhatóságának mértéke ugyanazon protokoll alkalmazása mellett. A laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti reprodukálhatóság kiszámításával állapítják meg.

RLU: relatív fényegység.

RNS: ribonukleinsav.

RPC_{Max}: valamely vizsgálati vegyi anyag által előidézett maximális szintű válasz, amelyet ugyanazon lemezen vizsgált 1 nM mennyiségű E2 által kiváltott válasz százalékában adnak meg.

RPMI: RPMI-1640 tápoldat kiegészítve 0,9 % penicillinnel és sztreptomocinnel, valamint 8,0 % magzati borjú szérummal (FBS).

Vizsgálatmenet: egyszeri kísérlet, amelynek során értékelik a vizsgálat biológiai eredményére gyakorolt kémiai hatást. Minden vizsgálatmenet egy teljes kísérletnek felel meg, amelyet közös sejtkészletből származó, ugyanabban az időben replikátum lyukakba kiszélesztett sejteken végeznek el.

Független vizsgálatmenet: más sejtkészletből származó sejtekkel, frissen hígított vegyi anyagokkal, különböző napokon vagy ugyanazon a napon más szakemberek által végzett különálló, független kísérlet, amelynek során értékelik a vizsgálat biológiai eredményére gyakorolt kémiai hatást.

SD: standard deviáció.

Érzékenység: az összes olyan pozitív/aktív anyag aránya, amelyet a vizsgálat helyesen sorolt be. A kategorikus eredményt adó vizsgálat pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálat relevanciájának megítélésében (1).

Specificitás: az összes olyan negatív/aktív anyag aránya, amelyet a vizsgálat helyesen sorolt be. A kategorikus eredményt adó vizsgálat pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálat relevanciájának megítélésében (1).

Stabil transzfekció: amikor a DNS-t olyan módon transzfektálják a tenyésztett sejtekbe, hogy az stabilan integrálódik a sejtek genomjába, lehetővé téve ezáltal a transzfektált gének stabil kifejeződését. A stabilan transzfektált sejtek klónjainak szelektálását stabil markerekkel végzik (pl. G418-rezisztencia alapján).

STTA-vizsgálat: stabilan transzfektált transzaktivációs vizsgálat, a HeLa 9903 sejtvonalat alkalmazó ösztrogénreceptor alfa transzkripció aktivációs vizsgálat.

Tanulmány: egyetlen, konkrét anyag meghatározott vizsgálattal való értékeléséhez végzett teljes körű kísérleti munka. A tanulmány magában foglal minden lépést, egyebek mellett a vizsgálati anyag vizsgálati közegben végzett hígítási tesztjeit, az előzetes dózistartomány-kereső vizsgálatmeneteket, az összes szükséges teljes körű vizsgálatmenetet, az adatok elemzését, a minőség-ellenőrzést és a toxicitás felmérését. A tanulmány lezárásakor lehetővé válik a vizsgálati vegyi anyag toxicitási célpontra kifejtett és az alkalmazott vizsgált által értékelt hatásának besorolása (pl. aktív, inaktív vagy nem meggyőző), valamint a pozitív referencia-vegyianyaghoz viszonyított potenciáljának megbecslése.

Anyag: a REACH-rendelet¹² értelmében az anyag természetes állapotban előforduló vagy gyártási folyamatból származó kémiai elem és vegyületei, amely az anyag stabilitásának megőrzéséhez szükséges adalékanyagot és az alkalmazott folyamatból származó szennyező anyagot is tartalmazhat, de nem tartalmaz olyan oldószert, amely az anyag stabilitásának befolyásolása vagy összetételének megváltoztatása nélkül elkülöníthető. Az ENSZ GHS (1) egy ehhez nagyon hasonló meghatározást alkalmaz.

TA (transzaktiváció): az mRNS szintézis elindítása egy specifikus kémiai jel, például az ösztrogén ösztrogénreceptorhoz való kötődésének hatására.

Vizsgálat: e vizsgálati módszer keretében a vizsgálat azon hitelesnek elfogadott módszertanok egyike, amelyek eleget tesznek a meghatározott teljesítési kritériumoknak. A vizsgálat összetevői közé tartozik például a specifikus sejtvonala a hozzá kapcsolódó tenyésztési körülményekkel, a vizsgálat elvégzéséhez használt specifikus tápoldat, a lemez elrendezésének körülményei, a vizsgálati vegyi anyag elrendezése és hígítása, továbbá bármely más szükséges minőség-ellenőrzési intézkedés és a kapcsolódó adatkiértékelési lépések.

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

¹² Az Európai Parlament és a Tanács 1907/2006/EK rendelete (2006. december 18.) a vegyi anyagok regisztrálásáról, értékeléséről, engedélyezéséről és korlátozásáról (REACH), az Európai Vegyianyag-ügynökség létrehozásáról, az 1999/45/EK irányelv módosításáról, valamint a 793/93/EGK tanácsi rendelet, az 1488/94/EK bizottsági rendelet, a 76/769/EGK tanácsi irányelv, a 91/155/EGK, a 93/67/EGK, a 93/105/EK és a 2000/21/EK bizottsági irányelv hatályon kívül helyezéséről (HL L 304., 2007.11.22., 1. o.).

Transzkripció: mRNS szintézis.

UVCB: ismeretlen vagy változó összetételű vegyi anyagok, komplex reakciótermékek vagy biológiai anyagok.

Validált vizsgálati módszer: olyan vizsgálat, amelynek az adott céllal kapcsolatos relevanciája (pontosságát is ideértve) és megbízhatósága validálási vizsgálatok alapján megállapítást nyert. Fontos megjegyezni, hogy a validált vizsgálati módszer a javasolt felhasználási célra nem feltétlenül kínál megfelelő pontosságú és megbízhatóságú elfogadható eljárást (1).

Validálás: az az eljárás, amelynek révén megállapítják egy bizonyos megközelítés, módszer, vizsgálat, eljárás vagy értékelés adott célra való megbízhatóságát és relevanciáját (1).

VC (Vivóanyagok kontroll): a vizsgálati és a kontrollként szolgáló vegyi anyagok feloldására használt oldószert önmagában, az oldott vegyi anyag nélkül, vivóanyagként vizsgálják.

VM7: immortalizált adenokarcinoma sejtvonal, amely endogénen fejezi ki az ösztrogénreceptort.

VM7Luc4E2: a VM7Luc4E2 sejtvonal VM7 immortalizált humán adenokarcinoma sejtekből származik, amelyek endogén módon kifejezik az ösztrogénreceptor mindkét formáját (ER α és ER β), és ezt a sejtvonalat stabilan transzfektálták a pGudLuc7 plazmiddal. Ez a plazmid az egér emlőtumor vírus (MMTV) promóter előtt négy szintetikus oligonukleotid kópián hordozza az ösztrogén válaszleletet, és a szentjánosbogár luciferáz gén expresszióját szabályozza.

Gyenge pozitív kontroll: a referencia-vegyianyagok jegyzékéből kiválasztott gyenge hatást kifejtő anyag, amelyet belefoglalnak minden vizsgálatba, hogy biztosítsák a vizsgálat megfelelő működését.

2. függelék

STABILAN TRANSZFEKTÁLT HUMÁN ÖSZTROGÉNRECEPTOR A TRANSZAKTIVÁCIÓS VIZSGÁLAT VEGYI ANYAGOK ÖSZTROGÉNHATÁSÚ AGONISTA ÉS ANTAGONISTA AKTIVITÁSÁNAK ÉSZLELÉSÉRE HERA-HELA-9903 SEJTVONALBAN

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK (LÁSD MÉG AZ ÁLTALÁNOS BEVEZETÉST)

1. Ez a transzaktivációs (TA) vizsgálat hER α -HeLa-9903 sejtvonalat használ a humán ösztrogénreceptor alfa (hER α) által közvetített ösztrogénhatású agonista aktivitás észlelésére. A stabilan transzfektált transzaktivációs (STTA) vizsgálat validálási tanulmányát a japán Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI) végezte el, hER α -HeLa-9903 sejtvonalat használva a humán ösztrogénreceptor alfa (hER α) által közvetített ösztrogénhatású agonista és antagonisták aktivitás észlelésére, amely tanulmány bizonyította, hogy a vizsgálat tervezett felhasználása tekintetében releváns és megbízható (1).
2. A vizsgálat kifejezetten azt a célt szolgálja, hogy a kémiai lumineszcencia mint végpont mérése révén észlelje a hER α által közvetített transzaktivációt. Azonban beszámoltak arról, hogy az 1 μ M-nél magasabb fitoösztrogén-koncentrációnál a luciferáz riportergén túlzott aktiválása miatt nem receptorok által közvetített lumineszcencia jelek észlelhetők (2) (3). Bár a dózis-válasz görbe arra utal, hogy az ER-rendszer ténylegesen alacsonyabb koncentrációknál aktiválódik, a magas fitoösztrogén-koncentráció mellett vagy feltehetőleg a luciferáz riportergént a fitoösztrogénhez hasonlóan túlzottan aktiváló vegyületek magas koncentrációja mellett kapott luciferáz-kifejeződést körültekintően meg kell vizsgálni stabilan transzfektált ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálati rendszerekben (1. függelék).
3. E vizsgálat szabályozási célra való alkalmazása előtt el kell olvasni az „ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS” és „AZ ÖSZTROGÉNRECEPTOR TRANSZAKTIVÁCIÓS VIZSGÁLAT ÖSSZETEVŐI” részt. Az ebben a vizsgálati iránymutatásban használt fogalmak és rövidítések meghatározását a 2.1. függelék tartalmazza.

A VIZSGÁLAT ELVE (LÁSD MÉG AZ ÁLTALÁNOS BEVEZETÉST)

4. A vizsgálat az ösztrogénreceptor ligandumhoz kötődésének jelzésére szolgál. A ligandum kötődését követően a receptor-ligandum komplex transzlokálódik a sejtmagba, ahol specifikus DNS válaszlemekhez kötődve transzaktivál egy szentjánosbogár luciferáz riportergént, ami megnöveli a luciferáz enzim celluláris kifejeződését. A luciferin egy szubsztrát, amit a luciferáz enzim átalakít és közben biolumineszcens fény keletkezik, amely luminométerrel számszerűen mérhető. A luciferáz-aktivitás számos kereskedelmi forgalomban kapható vizsgálati készlettel gyorsan és költséghatékonyan értékelhető.

5. A vizsgálati rendszer humán méhnyakdaganatból származó hER α -HeLa-9903 sejtvonalat használ, két stabilan inzertált konstrukcióval: i. a hER α expressziós konstrukcióval (amely a teljes humán ösztrogénreceptort kódolja), és ii. egy szentjánosbogár luciferáz riporterkonstrukcióval, amely egy vitellogenin ösztrogén válaszelem ötször ismétlődő szakaszát tartalmazza hozzákapcsolva egy egér metallotionein promóter TATA-boxához. Az egér metallotionein promóter TATA-box génkonstrukció biztosítja a legjobb teljesítményt, ezért használata általánosan elterjedt. Következésképpen a hER α -HeLa-9903 sejtvonala képes mérni egy adott vizsgálati vegyi anyag azon képességét, hogy beindítja a humán ösztrogénreceptor alfa által irányított luciferáz gén kifejeződést.
6. ösztrogénreceptor agonista vizsgálat esetén az adatok értelmezése azon alapul, hogy a vizsgálati vegyi anyag által előidézett maximális szintű válasz megegyezik-e vagy meghaladja-e a pozitív kontrollanyagként használt 17 β -ösztradiol (E2) indukáláshoz alkalmazott maximális (1 nM) koncentrációja által keltett agonista válasz 10 %-át (vagyis a PC₁₀ értékét). ösztrogénreceptor antagonist vizsgálat esetén az adatok értelmezése azon alapul, hogy a válasz előidézi-e a kiegészítő kontroll (25 pM E2) által kiváltott válaszhoz képest az aktivitás legalább 30 %-os csökkenését, citotoxicitás nélkül. Az adatok elemzésének és értelmezésének részleteivel a 34–48. pont foglalkozik.

ELJÁRÁS

Sejtvonalak

7. A vizsgálathoz stabilan transzfektált hER α -HeLa-9903 sejtvonalat kell használni. A sejtvonala egy anyagátadási megállapodás aláírását követően beszerezhető a japán Collection of Research Bioresources (JCRB) sejtbankból¹³.
8. A vizsgálat során kizárólag mikoplazmamentesnek nyilvánított sejtek használhatók. A mikoplazma-fertőzés érzékeny detektálására az RT-PCR (valós idejű polimeráz láncreakció) módszer alkalmazandó (4) (5) (6).

A sejtvonala stabilitása

9. A sejtvonala stabilitásának nyomon követéséhez az agonista vizsgálat során referenciaszabványként E2-t, 17 α -ösztradiolt, 17 α -metiltesztoszteront és kortikoszteront kell használni, emellett a vizsgálat minden elvégzése során legalább egy alkalommal fel kell venni

¹³ JCRB sejtbank: National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Asagi Saito, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Japán Fax: +81-72-641-9812.

egy teljes koncentráció-válasz görbét az 1. táblázatban szereplő koncentrációtartományban, és az eredményeknek meg kell felelniük az 1. táblázatban feltüntetett eredményeknek.

10. Antagonista vizsgálat során minden vizsgálatmenetben párhuzamosan meg kell határozni két referenciaszabvány, a tamoxifén és a flutamid teljes koncentrációgörbéjét. Ellenőrizni kell továbbá, hogy e két vegyi anyagot a kvalitatív osztályozás során helyesen sorolták-e pozitív, illetve negatív kategóriába.

Sejttenyésztés és a leültetés körülményei

11. A sejteket fenolvörösmentes, 60 mg/l kanamicin antibiotikummal és 10 %-os dextránbevonatú aktív szénnel kezelt magzati borjú szérummal (DCC-FBS) kiegészített Eagle-féle minimum esszenciális tápoldatban (Eagle's Minimum Essential Medium, EMEM), CO₂ inkubátorban (5 % CO₂), 37 ± 1 °C-on kell fenntartani. 75–90 %-os konfluencia elérését követően a sejteket tovább kell oltani egy 100 mm-es sejttenyésztő edénybe, 10 ml térfogatban 0,4 x 10⁵–1 x 10⁵ sejt/ml sűrűségben. 10 %-os FBS-EMEM (vagyis DCC-FBS-sel kiegészített EMEM) sejtsuszpenziót kell készíteni, majd a sejteket egy mikrotiterlemez lyukaiba 1 x 10⁴ sejt/(100 µl x lyuk) sűrűségben ki kell széleszteni. A vegyi anyaggal való kezelést megelőzően a sejteket 5 %-os CO₂-tartalmú inkubátorba n 37° ± 1° C-on 3 órán át preinkubálni kell. A műanyag edénynek nem lehet ösztrogénhatású aktivitása.
12. A válasz integritása érdekében a fagyasztott sejt kultúra sejtjein legalább két, de legfeljebb 40 passzálást kell végrehajtani a kondicionált tápoldatban. A hERα-HeLa-9903 sejt vonal esetében ez három hónapnál kevesebb időt vesz igénybe. A nem megfelelő tenyésztési körülmények között növekvő sejtek hatékonysága csökkenhet.
13. A DCC-FBS elkészíthető a 2.2. függelékben leírtak szerint, de kereskedelmi forrásból is beszerezhető.

Elfogadhatósági kritériumok

Az ösztrogénreceptor agonista vizsgálatához használandó pozitív és a negatív referenciaszabványok

14. A tanulmány előtt és alatt a vizsgálati rendszer reakcióképességét ellenőrizni kell egy erős ösztrogén (E2), egy gyenge ösztrogén (17α-ösztadiol) és egy nagyon gyenge agonista (17α-metiltesztoszteron) megfelelő koncentrációkban való alkalmazásával, valamint egy negatív anyaggal (kortikoszteron). A validálási tanulmányból (1) származó elfogadható értéktartományokat a 1. táblázat ismerteti. E 4 párhuzamosan vizsgálandó referenciaszabványt bele kell foglalni minden kísérletbe, vizsgálatuk eredményének pedig az elfogadható határértékeken belül kell lennie. Ellenkező esetben meg kell határozni, hogy mi okból nem teljesültek az elfogadhatósági kritériumok (pl. a sejtek kezelése, a szérum és az antibiotikum minősége és koncentrációja), a vizsgálatot pedig meg kell ismételni. Az elfogadhatósági kritériumok teljesülése esetén az EC₅₀, a PC₅₀ és a PC₁₀ értékek minimális szórása érdekében törekedni kell a sejttenyésztésben részt vevő anyagok következetes használatára. A négy

párhuzamosan vizsgált referenciaszabvány – amelyeket minden kísérletben vizsgálni kell (azonos körülmények között, ideértve az anyagokat, a sejtek passzási számát és a technikusokat is) – biztosíthatja a vizsgálat érzékenységét, mivel a három pozitív referenciaszabvány PC₁₀ értékének az elfogadhatósági tartományba kell esnie, csakúgy mint PC₅₀ és EC₅₀ értékeknek, ha meghatározható (lásd az 1. táblázatot).

1. táblázat: Az ösztrogénreceptor agonista vizsgálatához használandó négy referenciaszabvány elfogadhatósági tartománya

Elnevezés	logPC ₅₀	logPC ₁₀	logEC ₅₀	Hill-merekség	Vizsgálati tartomány
17β-ösztadiol (E2) CAS-szám: 50-28-2	-11,4~-10,1	<-11	-11,3~-10,1	0,7~1,5	10 ⁻¹⁴ ~10 ⁻⁸ M
17α-ösztadiol CAS-szám: 57-91-0	-9,6~-8,1	-10,7~-9,3	-9,6~-8,4	0,9~2,0	10 ⁻¹² ~10 ⁻⁶ M
Kortikoszteron CAS-szám: 50-22-6	–	–	–	–	10 ⁻¹⁰ ~10 ⁻⁴ M
17α-metiltesztoszteron CAS-szám: 58-18-4	-6,0~-5,1	-8,0~-6,2	–	–	10 ⁻¹¹ ~10 ⁻⁵ M

Az ösztrogénreceptor antagonistá vizsgálatához használandó pozitív és negatív referenciaszabványok

15. A tanulmány előtt és alatt a vizsgálati rendszer reakcióképességét egy pozitív anyag (tamoxifén) és egy negatív anyag (flutamid) megfelelő koncentrációkban való alkalmazásával ellenőrizni kell. A validálási tanulmányból (1) származó elfogadható értéktartományokat a 2. táblázat ismerteti. E két párhuzamosan vizsgálandó referenciaszabványt bele kell foglalni minden kísérletbe, vizsgálatuk eredményét pedig a kritériumoknak megfelelően kell értékelni. Ha az eredmény nem elfogadható, meg kell határozni, hogy mi okból nem teljesültek a kritériumok (pl. a sejtek kezelése, a szérum és az antibiotikum minősége és koncentrációja), a vizsgálatot pedig meg kell ismételni. Emellett meg kell határozni a pozitív anyag (tamoxifén) IC₅₀ értékét, és az eredménynek az elfogadható határértékeken belül kell lennie. Az elfogadhatósági kritériumok teljesülése esetén az IC₅₀ értékének minimális szórása érdekében mindenképpen biztosítani kell a sejtenyésztésben részt vevő anyagok következetes használatát. A két párhuzamosan vizsgált referenciaszabvány – amelyeket minden kísérletben vizsgálni kell (azonos körülmények között, ideértve az anyagokat, a sejtek passzási számát és a technikusokat) – képes biztosítani a vizsgálat érzékenységét (lásd a 2. táblázatot).

2. táblázat: Az ösztrogénreceptor antagonistá vizsgálatához használandó két referenciaszabvány kritériuma és elfogadhatósági tartománya

Elnevezés	Kritériumok	LogIC ₅₀	Vizsgálati tartomány
Tamoxifén CAS-szám: 10540-29-1	Pozitív: meg kell határozni az IC ₅₀ értéket	-5,942~-7,596	10 ⁻¹⁰ ~10 ⁻⁵ M

Flutamid CAS-szám: 13311-84-7	Negatív: nem kell meghatározni az IC ₃₀ értéket	-	10 ⁻¹⁰ ~10 ⁻⁵ M

Pozitív és vivőanyagok kontrollok

16. A pozitív kontrollt az ösztrogénreceptor agonista vizsgálat esetén (1 nM mennyiségű E2) és az ösztrogénreceptor antagonistá vizsgálat esetén (10 µM mennyiségű TAM) lemezenként legalább három ismétlésben kell végrehajtani. A vizsgálati vegyi anyag feloldására használt vivőanyagot vivőanyagok kontroll keretében lemezenként legalább három ismétlésben kell vizsgálni. Amennyiben a pozitív kontroll során a vizsgálati vegyi anyagától eltérő vivőanyagot alkalmaznak, e vivőanyagok kontroll mellett egy másik vivőanyagok kontrollt kell végezni legalább három ismétlésben, a pozitív kontrollal azonos lemezen.

Az ösztrogénreceptor agonista vizsgálat minőségi kritériumai

17. A pozitív kontroll (1 nM E2) során tapasztalt átlagos luciferáz-aktivitás minden lemezen legalább a vivőanyagok kontroll átlagértékének négyszerese legyen. E kritérium meghatározása a validálási tanulmány végpontértékeinek megbízhatóságán alapul (a dokumentált értékek négyszeres és harmincszoros között helyezkednek el).
18. A vizsgálat minőség-ellenőrzése szempontjából a párhuzamos pozitív kontroll (1 nM E2) PC₁₀ értékének megfelelő indukciós faktor nagyobbnak kell lennie, mint a párhuzamos vivőanyagok kontroll indukciós faktora (=1) plusz a standard deviáció kétszerese (1+2SD). Rangsorolási célból a PC₁₀ érték a statisztikai elemzéshez képest leegyszerűsítheti a szükséges adatelemzést. Bár a statisztikai elemzés információt nyújt a szignifikanciáról, nem szolgáltat a koncentráció alapján megállapított potenciálhoz hasonló kvantitatív paramétert, ezért rangsorolás céljára kevésbé alkalmas.

Az ösztrogénreceptor antagonistá vizsgálat minőségi kritériumai

19. A kiegészítő kontroll (25 pM mennyiségű E2) luciferáz-aktivitásának átlaga lemezenként legalább négyszerese legyen a vivőanyagok kontroll átlagértékének. E kritérium meghatározása a validálási tanulmány végpontértékeinek megbízhatóságán alapul.
20. A vizsgálat minőség-ellenőrzése szempontjából az 1 nM mennyiségű E2 relatív transzkripciós aktiválásának (RTA) meg kell haladnia a 100 %-ot, az 1 µM mennyiségű 4-hidroxitamoxifén (OHT) relatív transzkripciós aktiválás értékének kisebbnek kell lennie 40,6 %-nál, a 100 µM digitonin (Dig) relatív transzkripciós aktiválás értéke pedig nem haladhatja meg a 0 %-ot.

A laboratórium jártasságának igazolása (lásd a vizsgálati módszer „AZ ÖSZTROGÉNRECEPTOR TRANZAKTIVÁCIÓS VIZSGÁLAT ÖSSZETEVŐI” részének 14. pontját, valamint 3. és 4. táblázatát).

Vivőanyag

21. Párhuzamos vivőanyagok kontrollként dimetil-szulfoxidot (DMSO) vagy más megfelelő oldószert kell használni, azonos koncentrációban a különböző pozitív és negatív kontrollok és a vizsgálati vegyi anyag tesztelése során. A vizsgálati vegyi anyagokat olyan oldószerben kell feloldani, amelyik szolubilizálja az adott vizsgálati vegyi anyagot és elegyedik a sejtek tápoldatával. A megfelelő vivőanyagok közé tartozik a víz, az etanol (95–100 %-os tisztaságban) és a dimetil-szulfoxid. Dimetil-szulfoxid használata esetén az anyag mennyisége nem haladhatja meg a 0,1 térfogatszázalékot. Minden vivőanyag esetében igazolni kell, hogy maximális alkalmazott térfogatuk nem fejt ki citotoxikus hatást és nem befolyásolja a vizsgálat teljesítményét.

Vizsgálati vegyi anyagok előkészítése

22. Általában a vizsgálati vegyi anyagokat dimetil-szulfoxidban vagy más alkalmas oldószerben fel kell oldani, és ugyanazzal az oldószerral sorozatban 1:10 arányban hígítani kell, elkészítve az oldatokat a tápoldattal való hígításhoz.

Oldhatóság és citotoxicitás: a dózisbehatárolás szempontjai

23. Elővizsgálatot kell végezni a vizsgálandó vegyi anyag megfelelő koncentrációtartományának meghatározására, illetve annak megállapítására, hogy a vizsgálati vegyi anyaggal kapcsolatban felmerül-e oldhatósági és citotoxicitási probléma. A vegyi anyagokat először a legmagasabb, vagyis 1 µl/ml, 1 mg/ml vagy 1 mM koncentrációig vizsgálják, melyek közül a legalacsonyabb a mérvadó. Az elővizsgálat során megfigyelt citotoxicitási szint vagy oldhatatlanság alapján az első végleges vizsgálatmenetben a legmagasabb elfogadható koncentrációtól (pl. 1 mM, 100 µM, 10 µM stb.) induló logaritmikus hígítási oldatsorozatban kell vizsgálni a vegyi anyagot, és fel kell jegyezni az esetlegesen tapasztalt zavarosságot, kicsapódást vagy citotoxicitást. A második, illetve ha szükséges a harmadik vizsgálatmenet koncentrációértékeit megfelelően ki kell igazítani, hogy jó koncentráció-válasz görbe alakuljon ki, és ki lehessen zárni azokat a koncentrációkat, amelyek oldhatatlannak bizonyultak vagy túlzott citotoxicitást idéztek elő.
24. Az ER-agonisták és ER-antagonisták esetében a magas szintű citotoxicitás szignifikánsan módosíthatja vagy megakadályozhatja a tipikusan szigmoid választ, ezért figyelembe kell venni az adatok értelmezésénél. Olyan citotoxicitási vizsgálati módszereket kell alkalmazni, amelyek információt nyújtanak a 80 %-os sejtleletképeségről, a megfelelő vizsgálatot a laboratórium tapasztalata alapján kell kiválasztani.
25. Amennyiben a citotoxicitási vizsgálat eredményei azt jelzik, hogy a vizsgálati vegyi anyag koncentrációja legalább 20 %-kal csökkenti a sejtszámot, ezt a koncentrációt citotoxikusnak kell tekinteni, és a citotoxikus vagy afeletti koncentrációkat ki kell zárni az értékelésből.

Vegyi anyaggal történő kezelés és a vizsgálati lemez elrendezése

26. A vegyi anyag hígításának elkészítése (1. és 2. lépés) és a sejtek kezelése (3. lépés) az alábbiak szerint is elvégezhető:

1. lépés: Az egyes vizsgálati vegyi anyagokkal DMSO-dal vagy megfelelő oldószerrel hígítási sorozatot kell készíteni, és a három ismétléses elrendezésben kell elhelyezni a mikrotiterlemez lyukaiban az előkísérletben megállapított dózistartománynak megfelelő végső koncentrációsorozat szerint (egy tipikus oldatsorozat például az 1 mM, 100 μ M, 10 μ M, 1 μ M, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM és 10 pM (10^{-3} – 10^{-11} M)).

2. lépés: Vegyi anyag hígítása: az oldószerben először 1,5 μ l mennyiségű vizsgálati vegyi anyagot oldjunk fel a tápoldat 500 μ l-jéhez számított koncentrációban.

3. lépés: A sejtek kezelése a vegyi anyaggal: a (2. lépésben elkészített) tápoldattal hígított 50 μ l mennyiségű anyagot adjuk hozzá a lyukanként és 100 μ l-enként 10^4 sejtet tartalmazó vizsgálati lyukakhoz.

Az egyes lyukakba helyezendő tápoldat végleges ajánlott térfogata 150 μ l. A vizsgálati minták és a referenciaszabványok elosztása történhet a 3. és 4. táblázatban foglaltak szerint.

3. táblázat: Példa az ösztrogénreceptor agonista vizsgálatához használt vizsgálati lemezen tesztelt referenciaszabványok koncentrációértékeire

Sor	17 α -metiltesztoszteron			Kortikoszteron			17 α -ösztradiol			E2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1. konc. (10 μ M)	→	→	100 μ M	→	→	1 μ M	→	→	10 nM	→	→
B	2. konc. (1 μ M)	→	→	10 μ M	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	3. konc. (100 nM)	→	→	1 μ M	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	4. konc. (10 nM)	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	5. konc. (1 nM)	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	6. konc. (100 pM)	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	7. konc. (10 pM)	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Vivőanyagok kontroll (0,1 % DMSO); PC: Pozitív kontroll (1 nM E2).

27. A referenciaszabványokat (E2, 17 α -ösztradiol, 17 α -metiltesztoszteron és kortikoszteron) minden vizsgálatmenetben tesztelni kell (3. táblázat). Minden vizsgálati lemezen legyenek pozitív kontrollként szolgáló, a maximális indukciót előidéző 1 nM mennyiségű E2-vel kezelt lyukak, és kizárólag DMSO-dal (vagy megfelelő oldószerrel) kezelt, vivőanyagok kontrollként szolgáló lyukak (4. táblázat). Amennyiben egy adott kísérlet során különböző forrásból származó (pl. eltérő passzálásból, más tételből származó stb.) sejteket alkalmaznak, a referenciaszabványokat minden egyes sejtforráshoz külön vizsgálni kell.

4. táblázat: Példa az ösztrogénreceptor agonista vizsgálatához használt vizsgálati lemez elrendezésére a vizsgálati és kontrollanyagok különböző koncentrációjánál

Sor	1. vizsgálati vegyi anyag			2. vizsgálati vegyi anyag			3. vizsgálati vegyi anyag			4. vizsgálati vegyi anyag		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

A	1. konc. (10 µM)	→	→	1 mM	→	→	1 µM	→	→	10 nM	→	→
B	2. konc. (1 µM)	→	→	100 µM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	3. konc. (100 nM)	→	→	10 µM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	4. konc. (10 nM)	→	→	1 µM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	5. konc. (1 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	6. konc. (100 pM)	→	→	10 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	7. konc. (10 pM)	→	→	1 nM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Vívőanyagos kontroll (0,1 % DMSO); PC: Pozitív kontroll (1 nM E2).

5. táblázat: Példa az ösztrogénreceptor antagonistá vizsgálatához használt vizsgálati lemez elrendezésére a referenciaszabványok különböző koncentrációjánál

Sor	Tamoxifén			Flutamid			1. vizsgálati vegyi anyag			2. vizsgálati vegyi anyag		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1. konc. (10 µM)	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→
B	2. konc. (1 µM)	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→
C	3. konc. (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	4. konc. (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	5. konc. (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	6. konc. (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1 % DMSO	→	→	→	→	→	1 µM OHT	→	→	100 µM Dig	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Vívőanyagos kontroll (0,1 % DMSO), PC: Pozitív kontroll (1 nM E2), OHT: 4-hidroxitamoxifén, Dig: Digitonin.

 = 25 pM E2-vel kiegészítve

28. A vegyi anyagok antagonistá aktivitásának értékeléséhez az A–G sor vizsgálati lyukaihoz hozzá kell adni 25 pM E2-t. A referenciaszabványokat (tamoxifén és flutamid) minden vizsgálatmenetben tesztelni kell. Minden vizsgálati lemezen legyenek pozitív kontrollként szolgáló, a hERα-HeLa-9903 sejtvonal minőség-ellenőrzésére használható 1 nM E2-vel kezelt lyukak, DMSO-dal (vagy megfelelő oldószerrel) kezelt, vívőanyagos kontrollként szolgáló lyukak, 0,1 % DMSO-dal kezelt, „kiegészítő kontrollként” szolgáló lyukak, amelyek DMSO mellett E2-t is tartalmaznak, 1 µM végső koncentrációjú 4-hidroxitamoxifennel kezelt lyukak, valamint 100 µM digitonionnal kezelt lyukak (5. táblázat). A további vizsgálati lemezeken a referenciaszabványokat tartalmazó lyukak kivételével ugyanezt az elrendezést kell alkalmazni (6. táblázat). Amennyiben egy adott kísérlet során különböző forrásból származó (pl. eltérő passzálásból, más tételből származó stb.) sejteket alkalmaznak, a referenciaszabványokat minden egyes sejtforráshoz külön vizsgálni kell.

6. táblázat: Példa az ösztrogénreceptor antagonistá vizsgálatához használt vizsgálati lemez elrendezésére a vizsgálati és kontrollanyagok különböző koncentrációjánál

Sor	1. vizsgálati vegyi anyag	2. vizsgálati vegyi anyag	3. vizsgálati vegyi anyag	4. vizsgálati vegyi anyag

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1. konc. (10 µM)	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→
B	2. konc. (1 µM)	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→
C	3. konc. (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	4. konc. (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	5. konc. (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	6. konc. (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1 % DMSO	→	→	→	→	→	1 µM OHT	→	→	100 µM Dig	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Vívőanyagok kontroll (0,1 % DMSO), PC: Pozitív kontroll (1 nM E2), OHT: 4-hidroxitamoxifén, Dig: Digitonin.

 : 25 pM E2-vel kiegészítve.

29. Adott esetben meg kell bizonyosodni arról, hogy nem érvényesül perem-hatás, ha gyaníthatóan fennáll peremhatás, annak kiküszöbölése érdekében módosítani kell a lemez elrendezését. Például olyan elrendezés alkalmazható, amelyen a széleken lévő lyukak üresen maradnak.
30. A vegyi anyagok hozzáadását követően a vizsgálati lemezeket 5 %-os CO₂-tartalmú inkubátorba 37° ±1° C-on 20–24 órán át inkubálni kell, hogy a riportergén termékei kifejeződjenek.
31. Rendkívül illékony vegyületek esetén egyedi szempontokat is figyelembe kell venni. Ilyenkor ugyanis a kontrollanyagot tartalmazó közeli lyukak álpozitív eredményt hozhatnak, amit a várt és az ismert kontrollértékek fényében kell értékelni. Abban a néhány esetben, amikor az illékonyság gondot okozhat, „zárófólia” használatával hatékonyan izolálhatók az egyes lyukak a vizsgálat során, ezért ilyen esetekben zárófólia alkalmazása ajánlott.
32. A vizsgálatok függetlenségének biztosítása érdekében az azonos vegyi anyaggal végzett végleges vizsgálatokat különböző napokon kell megismételni.

Luciferáz vizsgálat

33. A vizsgálathoz kereskedelmi forgalomban beszerezhető luciferáz vizsgálati reagens [pl. Steady-Glo® luciferáz vizsgálati rendszer (Promega, E2510 vagy ezekkel egyenértékű rendszer)] vagy standard luciferáz vizsgálati rendszer (pl. Promega, E1500 vagy ezekkel egyenértékű rendszer) is használható, amennyiben teljesülnek az elfogadhatósági kritériumok. A vizsgálati reagenst a használt luminométer érzékenysége alapján kell kiválasztani. Standard luciferáz vizsgálati rendszer alkalmazása esetén a szubsztrátum hozzáadása előtt sejtkultúrát lizáló reagenst (pl. Promega, E1531 vagy ezekkel egyenértékű reagenst) kell használni. A luciferáz reagenst a gyártó utasításai szerint kell alkalmazni.

AZ ADATOK ELEMZÉSE

Ösztrogénreceptor agonista vizsgálat

34. Az ösztrogénreceptor agonista vizsgálat esetében a pozitív kontrollhoz (1 nM E2) viszonyított, relatív transzkripciós aktivitás meghatározásához egy adott lemez lumineszcencia jelei az alábbi lépések végrehajtásával elemezhetők (ezzel egyenértékű más matematikai eljárások is elfogadhatók):

1. lépés Számítsuk ki a VC átlagértékét.
2. lépés Az adatok normalizálásához a VC átlagértékét vonjuk ki az egyes lyukaknál kapott értékből.
3. lépés Számítsuk ki a normalizált PC átlagértékét.
4. lépés Osszuk el a lemez egyes lyukainak normalizált értékét a PC normalizált átlagértékével (PC=100 %).

Az egyes lyukak végső értéke adja meg az adott lyuk PC-válaszhoz viszonyított, relatív transzkripciós aktivitását.

5. lépés Számítsuk ki a vizsgálati vegyi anyag egyes koncentrációcsoportjaira jellemző relatív transzkripciós aktivitás átlagértékét. A válasznak két vetülete van: az átlagos transzkripciós aktivitás (válasz) és az adott koncentráció, amelynél bekövetkezik a válasz (lásd a következő részt).

Az EC₅₀, PC₅₀ és PC₁₀ indukció szempontjai

35. Az EC₅₀ meghatározásához teljes koncentráció-válasz görbére van szükség, ennek létrehozása azonban a vizsgált koncentrációtartomány korlátaiból fakadóan (például citotoxicitás vagy oldhatósági problémák miatt) nem mindig megvalósítható vagy nem mindig praktikus. Mivel azonban az EC₅₀ és az indukció maximális szintje (ami a Hill-egyenlet felső értékének felel meg) lényeges információt hordozó paraméterek, lehetőség szerint bele kell foglalni őket a jelentésbe. Az EC₅₀ és az indukció maximális szintjének meghatározásához megfelelő statisztikai szoftvert kell használni (ilyen például a Graphpad Prism statisztikai szoftver). Amennyiben a koncentráció-válasz adatokra alkalmazható a Hill-féle logisztikai egyenlet, az EC₅₀ értékét az alábbi egyenlettel kell kiszámítani (7):

$$Y = \text{görbe alja} + (\text{görbe teteje} - \text{alja}) / (1 + 10^{\exp((\log EC_{50} - X) \times \text{Hill-meredekség})})$$
, ahol:

az X a koncentráció logaritmus; valamint

az Y a válasz, az Y a szigmoid görbe aljánál kezdődik és a tetejéig halad. A Hill-féle logisztikai egyenletben a görbe aljához rögzítik a nullpontot.

36. Az egyes vizsgálati vegyi anyagok tekintetében az alábbi adatokat kell biztosítani:

az RPC_{max} értéket, amely valamely vizsgálati vegyi anyag által előidézett maximális szintű

válasz, amelyet ugyanazon lemezen vizsgált 1 nM mennyiségű E2 által kiváltott válasz százalékában adnak meg, továbbá a PC_{Max} értéket (az RPC_{Max} választ kiváltó koncentráció); valamint

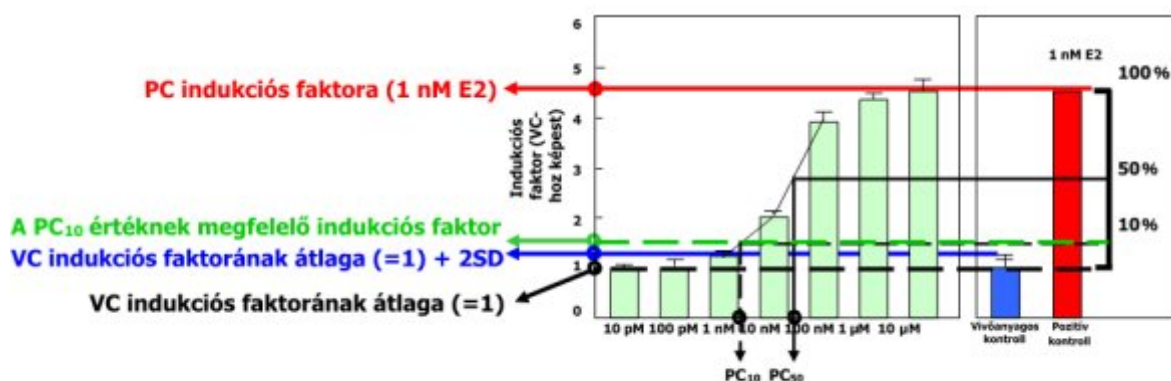
pozitív vegyi anyagok esetében azokat a koncentrációkat, amelyeknél PC_{10} , illetve adott esetben PC_{50} hatás figyelhető meg.

37. A PC_x értéket interpolációval lehet számítani az X-Y koordinátatengely 2 pontja között, az egyik pontnak közvetlenül a PC_x érték felett, a másiknak közvetlenül alatta kell elhelyezkednie. Amennyiben a közvetlenül a PC_x érték felett elhelyezkedő adatpont koordinátája (a,b), az alatta elhelyezkedő adatponté pedig (c,d), akkor a PC_x érték az alábbi egyenlet alapján határozható meg:

$$\log[PC_x] = \log[c] + (x-d)/(d-b)$$

38. A PC-értékek leírását az alábbi 1. ábra ismerteti.

1. ábra: Példa a PC-értékek meghatározására. A PC (1 nM mennyiségű E2) minden vizsgálati lemezen megtalálható



Ösztrogénreceptor antagonistá vizsgálat

39. Az ösztrogénreceptor antagonistá vizsgálat esetében a kiegészítő kontrollhoz (25 pM E2) viszonyított, relatív transzkripciós aktivitás meghatározásához egy adott lemez lumineszcencia jelei az alábbi lépések végrehajtásával elemezhetők (ezzel egyenértékű más matematikai eljárások is elfogadhatók):

1. lépés: Számítsuk ki a VC átlagértékét.

2. lépés: Az adatok normalizálásához a VC átlagértékét vonjuk ki az egyes lyukaknál kapott értékből.

3. lépés: Számítsuk ki a normalizált kiegészítő kontroll átlagértékét.

4. lépés: Osszuk el a lemez egyes lyukainak normalizált értékét a normalizált kiegészítő kontroll átlagértékével (kiegészítő kontroll=100 %).

Az egyes lyukak végső értéke adja meg az adott lyuknak a kiegészítő kontroll válaszához viszonyított, relatív transzkripciós aktivitását.

5. lépés: Számítsuk ki az egyes kezelések során megfigyelt relatív transzkripciós aktivitás átlagértékét.

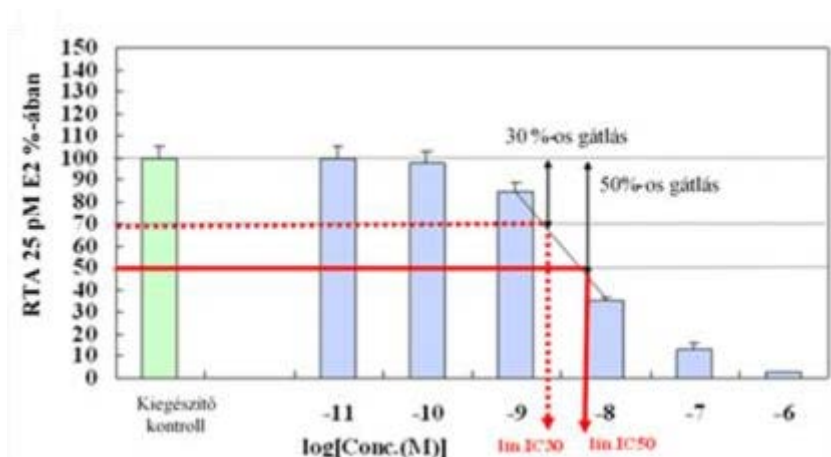
Az IC₃₀ és IC₅₀ indukció szempontjai

40. A pozitív vegyi anyagok esetében meg kell adni azokat a koncentrációkat, amelyeknél IC₃₀, illetve adott esetben IC₅₀ hatás figyelhető meg.

41. Az IC_x értéket interpolációval lehet kiszámítani az X-Y koordinátatengely 2 pontja között, az egyik pontnak közvetlenül az IC_x érték felett, a másikkal közvetlenül alatta kell elhelyezkednie. Amennyiben a közvetlenül az IC_x érték felett elhelyezkedő adatpont koordinátája (c,d), az alatta elhelyezkedő adatponté pedig (a,b), akkor az IC_x érték az alábbi egyenlet alapján határozható meg:

$$\ln IC_x = a - (b - (100 - x)) \cdot (a - c) / (b - d)$$

2. ábra: Példa az IC-értékek meghatározására A kiegészítő kontroll (25 pM E2) minden vizsgálati lemezen megtalálható



RTA: relatív transzkripció aktivitás

42. Az eredményeknek két (vagy három) független vizsgálatmeneten kell alapulniuk. Amennyiben két vizsgálatmenet összevethető, vagyis reprodukálható eredményeket ad, akkor harmadik vizsgálatmenetre nincs szükség. Az eredmények akkor elfogadhatók, ha:

- teljesülnek az elfogadhatósági kritériumok (e kritériumokat lásd a 14–20. pontban),
- megismételhetők.

Az adatok értelmezésének kritériumai

7. táblázat: Pozitív és negatív besorolás feltételei az ösztrogénreceptor agonista vizsgálatoknál

Pozitív	Amikor az RPC_{Max} érték két vagy három vizsgálatmenetből kettőben megegyezik a pozitív kontroll által előidézett válasz 10 %-ával, vagy meghaladja azt.
Negatív	Amikor az RPC_{Max} érték két vagy három vizsgálatmenetből kettőben nem éri el legalább a pozitív kontroll által előidézett válasz 10 %-át.

8. táblázat: Pozitív és negatív besorolás feltételei az ösztrogénreceptor antagonistá vizsgálatoknál

Pozitív	Amikor két vagy három vizsgálatmenetből kettőben számítható IC_{30} érték.
Negatív	Amikor két vagy három vizsgálatmenetből kettőben nem számítható IC_{30} érték.

43. Az adatok értelmezésének kritériumait a 7. és a 8. táblázat tartalmazza. A pozitív eredményeket jellemezni kell mind a kiváltott hatás mértékével, mind a hatást előidéző koncentrációval. E két cél egyszerre teljesíthető azáltal, ha az eredményeket abban a koncentrációban fejezik ki, amelynél a PC-értékek 50 %-át (PC_{50}) vagy 10 %-át (PC_{10}) elérték az agonista vizsgálatban, és a kiegészítő kontroll értékének 50 %-a (IC_{50}) vagy 30 %-a (IC_{30}) gátlódott az antagonistá vizsgálatban. Egy adott vizsgálati vegyi anyag pozitívnak

minősül, ha a vizsgálati vegyi anyag által előidézett maximális válasz (RPC_{Max}) két vagy három vizsgálatmenetből kettőben megegyezik a pozitív kontroll által előidézett válasz 10 %-ával, vagy meghaladja azt, ugyanakkor negatívnak tekintendő, ha az RPC_{Max} értéke két vagy három vizsgálatmenetből kettőben nem éri el legalább a pozitív kontroll által előidézett válasz 10 %-át.

44. Az ösztrogénreceptor agonista vizsgálat PC_{10} , PC_{50} és PC_{Max} értékeinek, valamint az ösztrogénreceptor antagonistá vizsgálat IC_{30} és IC_{50} értékeinek kiszámításához igénybe lehet venni a vizsgálati iránymutatáshoz tartozó és az OECD nyilvános weboldalan¹ rendelkezésre álló táblázatot.

45. A PC_{10} vagy PC_{50} és az IC_{30} vagy IC_{50} értékek legalább két alkalommal történő meghatározása általában elegendőnek bizonyul. Ha azonban egy adott koncentrációtartományba tartozó adatoknál az alapvonal szórása elfogadhatatlanul magas variációs koefficiensű (CV; %), megkérdőjelezhető az adatok megbízhatósága, és be kell azonosítani a nagy szórás okát. A PC_{10} érték meghatározásához használt adatpontok nyers adatainak (vagyis a lumineszcencia intenzitására vonatkozó adatoknak) három ismétlésből számolt variációs koefficiense nem érheti el a 20 %-ot.

46. Az elfogadhatósági kritériumok teljesítése jelzi a vizsgálati rendszer megfelelő működését, de nem garantálja az egyes vizsgálatmenetek adatainak pontosságát. Az adatok pontosságát az biztosítja a legjobban, ha az első vizsgálatmenet eredményei megismételhetők.

47. Azon ösztrogénreceptor agonista vizsgálatok esetében, amelyeknél a pozitív vizsgálati vegyi anyagok – különösen a PC_{10} – PC_{49} értékkel rendelkező és a gyaníthatóan túlzott luciferáz-aktivitást okozó vegyi anyagok – tekintetében több információra van szükség, mint amit a szűrési és rangsorolási célú vizsgálati iránymutatás biztosít, egy $ER\alpha$ antagonistá használatával megerősíthető, hogy a megfigyelt luciferáz-aktivitást kizárólag az $ER\alpha$ idézi elő (lásd a 2.1. függelék).

VIZSGÁLATI JELENTÉS

48. Lásd „AZ ÖSZTROGÉNRECEPTOR TRANSZAKTIVÁCIÓS VIZSGÁLAT ÖSSZETEVŐI” című 20. pontot.

¹ <http://www.oecd.org/env/testguidelines>

SZAKIRODALOM

- (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), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.
- (2) Escande A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol.*, 71, 1459-1469.
- (3) Kuiper G.G., *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, *Endocrinol.*, 139, 4252-4263.
- (4) Spaepen M., *et al.* (1992). Detection of Bacterial and Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Polymerase Chain Reaction, *FEMS Microbiol. Lett.*, 78(1), 89-94.
- (5) Kobayashi H., *et al.* (1995). Rapid Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Enzymatic Detection of Polymerase Chain Reaction (PCR) Products, *J. Vet. Med. Sci.*, 57(4), 769- 71.
- (6) Dussurget O. 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.

2.1. függelék

ÁLPOZITÍV EREDMÉNYEK: A NEM RECEPTOR ÁLTAL KÖZVETÍTETT LUMINESZCENCIA JELEK ÉRTÉKELÉSE

1. Az ösztrogénreceptor agonista vizsgálat álpozitív eredményei keletkezhetnek abból, hogy a luciferáz gént nem az ösztrogénreceptor által közvetített aktiválás indukálta, a géntermék közvetlenül aktiválódott, illetve a vizsgálatról független fluoreszcencia lépett fel. Az ilyen jellegű hatásokra a dózis-válasz görbe hiányosságából vagy szokatlan formájából lehet következtetni. Amennyiben gyaníthatóan ilyen hatások játszanak közre, meg kell vizsgálni egy ösztrogénreceptor antagonistá (pl. nem toxikus koncentrációban alkalmazott 4-hidroxitamoxifén (OHT)) válaszra gyakorolt hatását. A tisztán antagonistá ICI 182780 nem feltétlenül alkalmas erre a célra, mivel az ICI 182780 megfelelő koncentrációja csökkentheti a VC értékét, ami befolyásolja az adatelemzést.
2. E megközelítés hitelességének biztosítása érdekében az alábbiakat kell vizsgálni ugyanazon a lemezen:
 - az ismeretlen vegyi anyag agonista hatású aktivitása 10 μ M OHT-vel és anélkül vizsgálva,
 - VC (három ismétlés),
 - OHT (három ismétlés),
 - agonista pozitív kontrollként 1 nM E2 (három ismétlés),
 - 1 nM E2 + OHT (három ismétlés).

Az adatok értelmezésének kritériumai

Megjegyzés: Valamennyi lyukat a vivőanyag azonos koncentrációjával kell kezelni.

- Amennyiben az ismeretlen vegyi anyag agonista hatású aktivitását NEM befolyásolja az ER-antagonistával való kezelése, akkor „negatívnak” minősítendő.
- Ha az ismeretlen vegyi anyag agonista hatású aktivitását teljesen gátolta a kezelés, akkor a döntési kritériumokat kell alkalmazni.
- Amennyiben a legalacsonyabb koncentrációnál az agonista hatású aktivitás megegyezik a PC₁₀ válasszal vagy meghaladja azt, az ismeretlen vegyi anyag gátlása eléri vagy meghaladja a PC₁₀ választ. Meg kell határozni a kezeletlen és az ER-antagonistával kezelt lyukak válaszreakciója közötti különbséget, és ez a különbség tekintendő valós válasznak, ez alapján kell kiszámítani a kategóriába sorolási döntést lehetővé tévő, megfelelő paramétereket.

Az adatok elemzése

Ellenőrizzük a teljesítményszabványokat.

Ellenőrizzük az azonos feltételekkel kezelt lyukak közötti variációs koefficiens.

1. Számítsuk ki a VC átlagát.
2. A VC átlagát vonjuk ki az egyes OHT-vel **nem** kezelt lyukaknál kapott értékből.
3. Számítsuk ki az OHT átlagát.
4. A VC átlagát vonjuk ki az egyes OHT-vel kezelt lyukaknál kapott értékből.
5. Számítsuk ki a PC átlagát.
6. Számítsuk ki a többi lyuk pozitív kontrollhoz viszonyított, relatív transzkripció aktivitását.

2.2. függelék

A DEXTRÁNBEVONATÚ AKTÍV SZÉNNEEL (DCC) KEZELT SZÉRUM ELKÉSZÍTÉSE

1. A szérum dextránbevonatú aktív szénnel (DCC) történő kezelése egy általánosan használt módszer arra, hogy az ösztrogénhatású vegyületeket eltávolítsák a tápoldatot kiegészítő szérumból, biztosítva ezáltal, hogy a szérumban lévő maradék ösztrogének ne torzítsák el a válasz. Ezen eljárás keretében 500 ml magzati borjú szérumot (FBS) kezelnek.

Alkotóelemek

2. Az alábbi anyagokra és eszközökre lesz szükség:

Anyagok

Aktív szén

Dextrán

Magnézium-klorid-hexahidrát ($\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$)

Szacharóz

1 M HEPES pufferoldat (pH-értéke 7,4)

Szűrőrendszerrel előállított ultra nagy tisztaságú víz

Eszközök

Autokláv üvegedény (mérete szükség szerint módosítandó), általános laboratóriumi centrifuga (amely beállítható 4 °C-os hőmérsékletre)

Az eljárás

3. Az alábbi eljárást 50 ml-es centrifugacsövek használatához alakítottuk:

[1. nap] Készítsük el a dextránbevonatú aktív szén szuszpenziót, ehhez szükséges 1 l ultra nagy tisztaságú víz, ami 1,5 mM MgCl_2 -t, 0,25 M szacharózt, 2,5 g aktív szenet, 0,25 g dextránt és 5 mM HEPES puffert tartalmaz, majd 4 °C-on kevertessük egy éjszakán át.

[2. nap] Adagoljuk a szuszpenziót 50 ml-es centrifugacsövekbe, és 10 000 rpm sebességgel 4 °C-on centrifugáljuk 10 percig. Távolítsuk el a felülúszót, és az aktív szén üledék felét tároljuk 4 °C-on, ez a 3. napon kerül felhasználásra. Az aktív szén üledék másik felét szuszpendáljuk FBS-sel, amelyet előzőleg a kicsapódások elkerülése érdekében lassan felolvasztottunk és 56 °C-on 30 percig inaktiváltunk, majd helyezzük a szuszpenziót autoklávozott üvegedénybe, például Erlenmeyer-lombikba. Óvatosan kevertessük a szuszpenziót 4 °C-on egy éjszakán keresztül.

[3. nap] Adagoljuk az FBS-t tartalmazó szuszpenziót centrifugacsövekbe, és 10 000 rpm sebességgel 4 °C-on centrifugáljuk 10 percig. Gyűjtsük össze az FBS-t, és adjuk hozzá a második napon készített és eltárolt aktív szén üledéket. Szuszpendáljuk fel az aktív szén üledéket, majd a szuszpenziót egy autoklávozott üvegedényben óvatosan kevertessük 4 °C-on egy éjszakán keresztül.

[4. nap] Adagoljuk ki a szuszpenziót, és 10 000 rpm sebességgel 4 °C-on centrifugáljuk 10 percig, majd egy 0,2 µm steril szűrőn való átszűréssel sterilizáljuk a felülúszót. Ez a dextránbevonatú aktív szénrel kezelt magzati borjú szérum -20 °C-on tárolandó, és egy évig felhasználható.

3. FÜGGELÉK

ÖSZTROGÉNRECEPTOR AGONISTÁK ÉS ANTAGONISTÁK ÉSZLELÉSÉRE SZOLGÁLÓ VM7LUC ÖSZTROGÉNRECEPTOR TRANSZAKTIVÁCIÓS VIZSGÁLAT

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK (LÁSD MÉG AZ ÁLTALÁNOS BEVEZETÉST)

1. Ez a vizsgálat VM7Luc4E2 sejtvonalak¹ használatára épül. A vizsgálatot az Országos Toxikológiai Program Alternatív Toxikológiai Módszerek Értékelésével Foglalkozó Ügynökségközi Központja (NICEATM) és az alternatív módszerek validálásával foglalkozó ügynökségközi koordinációs bizottság (ICCVAM) validálta (1). A VM7Luc sejtvonalak elsősorban endogén ER α , kisebb mértékben endogén ER β receptorokat fejeznek ki (2) (3) (4).
2. Ez a vizsgálat anyagok széles skálájára alkalmazható, feltéve, ha oldódnak dimetil-szulfoxidban (DMSO; CAS-szám: 67-68-5), nem lépnek reakcióba a DMSO-dal vagy a sejttenyésztő közeggel, és a vizsgált koncentrációkban nem citotoxikusak. Amennyiben DMSO nem használható, más vivőanyag, például etanol vagy víz is alkalmazható (lásd a 12. pontot). A VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs (ant)agonista vizsgálat bizonyított hatékonysága arra enged következtetni, hogy a vizsgálat során nyert adatok információt nyújthatnak az ER-közvetített hatásmechanizmusokról, és alkalmasak az anyagok további vizsgálatra való rangsorolására.
3. Ezt a vizsgálatot kifejezetten arra a célra tervezték, hogy a kémiai lumineszcencia mint végpont mérése révén észlelje a hER α és a hER β által közvetített transzaktivációt. A kémiai lumineszcenciát széles körben alkalmazzák a biológiai vizsgálatok során, mert a lumineszcencia nagy érzékenységgel mérhető a háttérzajhoz képest(10). A sejtalapú vizsgálatokban azonban a szentjánosbogár luciferáz aktivitását megzavarhatják olyan

¹ 2016 júniusa előtt ezt a sejtvonalat BG1Luc sejtvonálnak nevezték. A BG-1 sejteket eredetileg Greisinger és munkatársai (1998) írták le (12), később pedig a National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) kutatói karakterizálták (13). Nemrégiben rájöttek arra, hogy a kutatók a BG-1 sejtek két különböző variánsát, a BG-1 Fr-t és a BG-1 NIEHS-t használják. Li és munkatársai (2014) (14) a két BG-1 sejtvarianst részletes elemzése, többek között DNS-vizsgálatuk elvégzése révén kimutatták, hogy a BG-1 Fr egyedi sejtvarianst, és hogy a BG-1 NIEHS, vagyis a vizsgálat kidolgozásához eredetileg használt sejtvarianst nem a BG1 humán petefészekrák sejtvonala, hanem az MCF7 humán mellráksejtvarianst. A vizsgálatban alkalmazott sejtvarianst, eredeti elnevezésén a BG1Luc4E2 (15), immár VM7Luc4E2 néven szerepel („V” = variáns; „M7” = MCF7 sejtek). Hasonlóképpen a vizsgálat jelenlegi elnevezése az VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktiváció. Bár ez módosítja a vizsgálat alapjául szolgáló sejtvarianst eredetét, nem befolyásolja sem a közzétett validálási tanulmányokat, sem a vizsgálat hasznosságát és alkalmazhatóságát az ösztrogén/antiösztrogén hatású vegyi anyagok szűrésére.

anyagok, amelyek gátlólag hatnak a luciferáz enzimre, és ezáltal egyaránt előidézhethetnek látszólagos gátlást és fehérjestabilizációból fakadó erősebb lumineszcenciát(10). Emellett néhány luciferáz alapú ER riporter gént vizsgálóban beszámoltak arról, hogy az 1 μ M-nél magasabb fitoösztrogén-koncentrációnál a luciferáz riporter gént túlzott aktiválása miatt nem receptorok által közvetített lumineszcencia jelek észlelhetők(9) (11). Bár a dózis-válasz görbe arra utal, hogy az ER-rendszer ténylegesen alacsonyabb koncentrációknál aktiválódik, a magas fitoösztrogén-koncentráció mellett vagy feltehetőleg a luciferáz riporter gént a fitoösztrogénhez hasonlóan túlzottan aktiváló vegyületek magas koncentrációja mellett kapott luciferáz-kifejeződést körültekintően kell vizsgálni a stabilan transzfektált ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálati rendszerekben(see Appendix 2).

4. E vizsgálat szabályozási célra való alkalmazása előtt el kell olvasni az „ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS” és „AZ ÖSZTROGÉNRECEPTOR TRANSZAKTIVÁCIÓS VIZSGÁLAT ÖSSZETEVŐI” részt. A vizsgálati módszerben használt fogalmak és rövidítések meghatározását az 1. függelék tartalmazza.

A VIZSGÁLAT ELVE (LÁSD MÉG AZ ÁLTALÁNOS BEVEZETÉST)

5. Ez a vizsgálat arra szolgál, hogy jelezze az ösztrogénreceptor ligandumhoz kötődését, amely ezt követően mint receptor-ligandum komplex transzlokálódik a sejtmagba. A receptor-ligandum komplex a sejtmagban a specifikus DNS válaszelemekhez kötődve transzaktiválja a riporter gént (*luc*), aminek eredményeként luciferáz termelődik, majd fény szabadul fel, amelynek mennyisége luminométerrel meghatározható. A luciferáz-aktivitás számos kereskedelmi forgalomban kapható készlettel gyorsan és költséghatékonyan értékelhető. A VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktiváció során egy ösztrogénreceptor-reszponzív humán emlő adenokarcinoma sejtvonalat, a VM7-et használják, amelyet egy szentjánosbogár luciferáz riporter konstrukcióval stabilan transzfektáltak, a riporter gén az egér emlőtumor vírus (MMTV) promóter előtt található négy ösztrogén válaszelem szabályozása alatt áll, így lehet észlelni *in vitro* az ösztrogénreceptor agonista vagy antagonistá hatást kiváltó anyagokat. Ez az MMTV-promóter más szteroid és nem szteroid hormonokra csak csekély mértékben aktiválódik (8). Az adatok értelmezésének kritériumait részletesen a 41. pont ismerteti. Röviden: a pozitív válasz olyan koncentráció-válasz görbe alapján ismerhető fel, amely legalább három pontot tartalmaz, amelyeknek a szórása nem fed át (átlag $\pm$ SD), valamint a (normalizált relatív fényegységben [RLU] mért) válasz amplitúdója eléri a referenciaszabvány maximális értékének legalább 20 %-át (a referenciaszabvány a 17 β -ösztradiol [E2; CAS-szám: 50-28-2] az agonista vizsgálat esetén, a raloxifen-hidroklorid [Ral; CAS-szám: 84449-90-1]/E2 az antagonistá vizsgálat esetén).

ELJÁRÁS

Sejtvonal

6. A vizsgálathoz stabilan transzfektált VM7Luc4E2 sejtvonalat kell használni. A sejtvonal jelenleg kizárólag szakmai licencszerződés birtokában szerezhető be a Kaliforniai Egyetemtől, Davis, Kalifornia, USA¹ és a Xenobiotic Detection Systems Inc. vállalatától, Durham, Észak-Karolina, USA².

A sejtvonal stabilitása

7. A sejtvonal stabilitásának és integritásának megőrzése érdekében a fagyasztott sejtkultúrából származó sejteket legalább két passzálásig megfelelő tápoldatban kell növeszteni (lásd a 9. pontot). A sejteket legfeljebb 30 alkalommal szabad passzálni. A VM7Luc4E2 sejtvonal esetében a 30 passzálás mintegy három hónapot vesz igénybe.

Sejtenyésztés és a leültetés körülményei

8. Az összes anyag és módszer minőségének biztosítása érdekében az Iránymutatás a megfelelő sejtenyésztési gyakorlathoz (5) (6) című dokumentumban meghatározott eljárások szerint kell eljárni, hogy garantálni lehessen az elvégzett tevékenységek integritását, hitelességét és megismételhetőségét.
9. A VM7Luc4E2 sejteket 0,9 % penicillinnel és sztreptomocinnal, valamint 8,0 % magzati borjú szérummal (FBS) kiegészített RPMI 1640 tápoldatban tartják fenn, egy erre a célra alkalmas szövetenysztő inkubátorban 37 °C-on (± 1 °C), 90 %-os (± 5 %) páratartalom és 5,0 %-os (± 1 %) CO₂-tartalom mellett.
10. Mintegy 80 %-os konfluencia elérését követően a VM7Luc4E2 sejteket szubkultúrákat hoznak létre és a leültetés előtt egy ösztrogénmentes környezetben 48 órán át kondicionálják, majd a sejteket leültetik egy 96 lyukú lemezre, ahol a vizsgálati vegyi anyaggal kezelik és elemzik a luciferáz-aktivitás ösztrogénfüggő indukcióját. Az ösztrogénmentes tápoldat (EFM) egy fenolvörösmentes Dulbecco-féle módosított Eagle-tápoldat (DMEM), kiegészítve 4,5 % dextránbevonatú aktív szénnel kezelt magzati borjú szérummal (FBS), 1,9 % L-glutaminnal, valamint 0,9 % penicillinnel és sztreptomocinnal. A műanyag edényeken nem történhet ösztrogénhatású aktivitás [lásd a részletes protokollt (7)].

Elfogadhatósági kritériumok

¹ Michael S. Denison, Ph.D. Professor, Dept. of Environmental Toxicology, 4241 Meyer Hall, One Shields Ave, University of California, Davis, CA 95616, e-mail-cím: msdenison@ucdavis.edu, (530) 754-8649

² Xenobiotic Detection Systems Inc. 1601 East Geer Street, Suite S, Durham NC, 27704 USA, e-mail-cím: info@dioxins.com, telefonszám: 919-688-4804, fax: 919-688-4404

11. Valamely vizsgálat elfogadására vagy elvetésére az egyes 96 lyukú lemezekon végzett kísérletekben alkalmazott referenciaszabványok és kontrollok eredményeinek értékelése alapján kerül sor. Minden referenciaszabványt több koncentrációban kell tesztelni, és minden referenciaszabvány- és kontrollanyag-koncentrációt több mintán kell vizsgálni. Az eredményeket össze kell vetni az e paraméterek minőség-ellenőrzésére szolgáló adatokkal, amelyek a laboratórium által a jártasság bizonyítása során létrehozott agonista és antagonistá adatbázisokból származnak. Ezeket az adatbázisokat a referenciaszabványokra és a kontrollanyagokra kapott értékekkel folyamatosan frissítik. A felszerelés vagy a laboratóriumi körülmények változása esetén új adatbázisok létrehozására lehet szükség.

Agonista vizsgálat

Dózistartomány- kereső vizsgálat

- Indukció: A lemezen tapasztalt aktivitás indukciós faktorának méréséhez el kell osztani az E2 referenciaszabvány átlagos legmagasabb relatív fényegységét (RLU) a DMSO-kontroll átlagos RLU-értékével. Általában ötszörös indukció figyelhető meg, de a legalább négyszeres indukció már elfogadható.
- DMSO-kontroll eredményei: Az oldószeres kontroll RLU-értékeinek nem szabad meghaladniuk a dokumentált oldószeres kontrollok átlagos RLU-értékére jellemző standard deviáció 2,5-szeresét.
- Azt a kísérletet, amelyben e két elfogadhatósági kritérium bármelyike nem teljesül, figyelmen kívül kell hagyni és meg kell ismételni.

Teljes körű vizsgálat

Az agonista dózistartomány-kereső vizsgálat elfogadhatósági kritériumai mellett az alábbiakat foglalja magában:

- Referenciaszabvány eredményei: Az E2 referenciaszabvány koncentráció-válasz görbéje legyen szigmoid formájú és tartalmazzon legalább három értéket a koncentráció-válasz görbe lineáris szakaszán.
- Pozitív kontroll eredményei: A metoxiklórral végzett kontroll RLU-értékei haladják meg a DMSO átlagától való standard deviáció háromszorosával növelt DMSO-átlagot.
- Azt a kísérletet, amelyben valamely elfogadhatósági kritérium nem teljesül, figyelmen kívül kell hagyni és meg kell ismételni.

Antagonista vizsgálat

Dózistartomány- kereső vizsgálat

- Aktivitás csökkenése: A lemezen tapasztalt aktivitás csökkenésének méréséhez el kell osztani a Ral/E2 referenciaszabvány átlagos legmagasabb RLU-értékét a DMSO-kontroll átlagos RLU-értékével. Általában ötszörös csökkenés figyelhető meg, de a legalább háromszoros csökkenés már elfogadható.

- E2-kontroll eredményei: Az E2-kontroll RLU-értékeinek nem szabad meghaladniuk a dokumentált E2-kontrollok átlagos RLU-értékére jellemző standard deviáció 2,5-szeresét.
- DMSO-kontroll eredményei: A DMSO-kontroll RLU-értékeinek nem szabad meghaladniuk a dokumentált oldószeres kontrollok átlagos RLU-értékére jellemző standard deviáció 2,5-szeresét.
- Azt a kísérletet, amelyben valamely elfogadhatósági kritérium nem teljesül, figyelmen kívül hagyják és megismétlik.

Teljes körű vizsgálat

Az antagonistá dózistartomány-kereső vizsgálat elfogadhatósági kritériumai mellett az alábbiakat foglalja magában:

- Referenciaszabvány eredményei: A Ral/E2 referenciaszabvány koncentráció-válasz görbéje legyen szigmoid formájú és tartalmazzon legalább három értéket a koncentráció-válasz görbe lineáris szakaszán.
- Pozitív kontroll eredményei: A tamoxifénnel/E2-vel végzett kontroll RLU-értékei nem haladhatják meg az E2-kontroll átlagától való standard deviáció háromszorosával csökkentett E2-átlagot.
- Azt a kísérletet, amelyben valamely elfogadhatósági kritérium nem teljesül, figyelmen kívül hagyják és megismétlik.

Referenciaszabványok, pozitív és vivőanyagok kontrollok

Vivőanyagok kontroll (agonista és antagonistá vizsgálat)

12. A vizsgálati vegyi anyagok feloldására használt vivőanyagot vivőanyagok kontroll keretében vizsgálni kell. A VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat validálása során használt vivőanyag 1 térfogatszázaléknyi dimetil-szulfoxid (DMSO, CAS-szám: 67-68-5) (lásd a 24. pontot). DMSO-tól eltérő vivőanyag használata esetén valamennyi referenciaszabványt, kontrollanyagot és vizsgálati vegyi anyagot ugyanabban a vivőanyagban kell tesztelni, ha alkalmazandó.

Referenciaszabvány (agonista dózisbehatárolás)

13. A referenciaszabvány az E2 (CAS-szám: 50-28-2). A dózistartomány-kereső vizsgálatban a referenciaszabvány az E2 négy elemből álló koncentrációsorozata ($1,84 \times 10^{-10}$, $4,59 \times 10^{-11}$, $1,15 \times 10^{-11}$ és $2,87 \times 10^{-12}$ M), minden egyes koncentrációértéket replikátumban kell vizsgálni.

Referenciaszabvány (agonista teljes körű vizsgálat)

14. A teljes körű vizsgálatban az E2 1:2 arányban hígított 11 elemes ($3,67 \times 10^{-10}$ és $3,59 \times 10^{-13}$ M között terjedő) koncentrációsorozatból áll, a koncentrációértékeket replikátumban vizsgálják.

Referenciaszabvány (antagonista dózisbehatárolás)

15. A referenciaszabvány a Ral (CAS-szám: 84449-90-1) és az E2 (CAS-szám: 50-28-2) kombinációja. A dózistartomány-kereső vizsgálatban a Ral/E2 a Ral három elemből álló hígított koncentrációsorozatából ($3,06 \times 10^{-9}$, $7,67 \times 10^{-10}$ és $1,92 \times 10^{-10}$ M) és az E2 fix koncentrációjából ($9,18 \times 10^{-11}$ M) tevődik össze, minden koncentrációértéket replikátumban vizsgálnak.

Referenciaszabvány (antagonista teljes körű vizsgálat)

16. A teljes körű vizsgálatban a Ral/E2 a Ral 1:2 arányban hígított ($2,45 \times 10^{-8}$ és $9,57 \times 10^{-11}$ M között terjedő) koncentrációsorozatából és az E2 fix koncentrációjából ($9,18 \times 10^{-11}$ M) tevődik össze, a Ral/E2 kilenc koncentrációértékének mindegyikét replikátumban vizsgálják.

Gyenge pozitív kontroll (agonista)

17. A gyenge pozitív kontroll az ösztrogénmentes közegben vizsgált $9,06 \times 10^{-6}$ M *p,p'*-metoxiklór (metoxiklór; CAS-száma: 72-43-5).

Gyenge pozitív kontroll (antagonista)

18. A gyenge pozitív kontroll az ösztrogénmentes közegben, $9,18 \times 10^{-11}$ M E2 jelenlétében vizsgált $3,36 \times 10^{-6}$ M tamoxifén (CAS-száma: 10540-29-1).

E2-kontroll (csak antagonista vizsgálat esetén)

19. Az alapvonal negatív kontrollként szolgáló E2-kontroll az ösztrogénmentes közegben vizsgált $9,18 \times 10^{-11}$ M E2.

Indukciós faktor (agonista)

20. A referenciaszabvány (E2) által előidézett luciferáz-aktivitás méréséhez el kell osztani az E2 referenciaszabvány átlagos legmagasabb RLU-értékét a DMSO-kontroll átlagos RLU-értékével; az eredménynek négyszeresnél nagyobb indukciót kell jeleznie.

Indukciós faktor (antagonista)

21. A referenciaszabvány (Ral/E2) által előidézett átlagos luciferáz-aktivitás méréséhez el kell osztani a Ral/E2 referenciaszabvány átlagos legmagasabb RLU-értékét a DMSO-kontroll átlagos RLU-értékével, és az eredménynek háromszorosnál nagyobb csökkenést kell mutatnia.

A laboratórium jártasságának igazolása (lásd a vizsgálati módszer „AZ ÖSZTROGÉNRECEPTOR TRANSZAKTIVÁCIÓS VIZSGÁLAT ÖSSZETEVŐI” részének 14. pontját, valamint 3. és 4. táblázatát).

Vivőanyag

22. A vizsgálati vegyi anyagokat olyan oldószerben kell feloldani, amelyik szolubilizálja a vizsgálati vegyi anyagot és elegyedik a tápoldattal. A megfelelő vivőanyagok közé tartozik a víz, az etanol (95–100 %-os tisztaságban) és a dimetil-szulfoxid. Dimetil-szulfoxid

használata esetén az anyag mennyisége nem haladhatja meg az 1 térfogatszázalékot. Minden vivőanyag esetében igazolni kell, hogy maximális alkalmazott térfogatuk nem fejt ki citotoxikus hatást és nem zavarja a vizsgálat teljesítményét. A referenciaszabványokat és kontrollanyagokat 100 %-os oldószerben feloldják, majd ösztrogénmentes közegben a megfelelő koncentrációkra hígítják.

Vizsgálati vegyi anyagok előkészítése

23. A vizsgálati vegyi anyagokat 100 %-os DMSO-ban (vagy megfelelő oldószerben) feloldják, majd ösztrogénmentes közegben a megfelelő koncentrációkra hígítják. Feloldás és hígítás előtt meg kell várni, hogy minden vizsgálati vegyi anyag szobahőmérsékletű legyen. A vizsgálati vegyi anyag oldatait minden kísérlethez frissen kell elkészíteni. Az oldatban nem lehet szemmel látható kicsapódás és az oldat nem lehet zavaros. A referenciaszabványok és kontrollanyagok nagy tételben is előkészíthetők; a referenciaszabványok és kontrollanyagok végleges oldatait, valamint a vizsgálati vegyi anyagokat minden egyes kísérlethez frissen kell készíteni, és az elkészítéstől számított 24 órán belül fel kell használni.

Oldhatóság és citotoxicitás: a dózisbehatárolás szempontjai

24. A dózistartomány-kereső vizsgálat hét koncentrációban és duplikátumban vizsgált 1 : 10 arányú oldatsorozatból áll. A vizsgálati vegyi anyagokat először a legmagasabb koncentrációig vizsgálják, ami az agonista vizsgálat esetében 1 mg/ml (~1 mM), az antagonist vizsgálat esetében pedig 20 µg/ml (~10 µM). A dózistartomány-kereső kísérletek az alábbiak meghatározására szolgálnak:

- a vizsgálati vegyi anyag teljes körű vizsgálat során alkalmazandó induló koncentrációértékei;
- a vizsgálati vegyi anyag teljes körű vizsgálat során alkalmazandó (1:2 vagy 1:5 arányú) hígításai.

25. Az agonista és antagonist vizsgálati protokollokba belefoglalták a sejtleletképeség/citotoxicitás mérését (7), ami részét képezi mind a dózistartomány-kereső, mind a teljes körű vizsgálatnak. A VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat validálása során (1) a sejtleletképeség megállapítása céljából egy lépcsőzetes kvalitatív vizuális megfigyelési módszerrel mérték fel a citotoxicitást; a citotoxicitás meghatározásához azonban kvantitatív módszert is lehet alkalmazni (lásd a protokollt (7)). Az életképeséget több mint 20 %-kal csökkentő vegyi anyag-koncentrációkra vonatkozó adatok nem használhatók.

Vegyi anyaggal történő kezelés és a vizsgálati lemez elrendezése

26. A sejteket megszámlálják és ösztrogénmentes tápoldatban (lyukanként 2×10^5 sejt sűrűségben) 96 lyukú szövettényesztő lemezre szélesztik ki, majd 24 órán át inkubálják, hogy a sejtek kitapadjanak a lemezre. Ezt követően az ösztrogénmentes tápoldatot eltávolítják, és a sejteket ösztrogénmentes tápoldatba adagolt vizsgálati és referencia vegyi anyagokkal 19–24

órán keresztül inkubálják. Rendkívül illékony anyagok esetén egyedi szempontokat is figyelembe kell venni, mivel a kontrollanyagot tartalmazó közeli lyukak álpozitív eredményhez vezethetnek. Ilyen esetekben a „zárófólia” használata hatékonyan izolálhatja az egyes lyukakat a vizsgálat során, ezért alkalmazása ajánlott.

Dózistartomány-kereső vizsgálatok

27. A dózistartomány-kereső vizsgálat során a 96 lyukú lemez összes lyukának felhasználásával akár hat vizsgálati vegyi anyag is tesztelhető hét koncentrációban, duplikátumban, 1:10 arányú hígítási sorozatban (lásd az 1. és a 2. ábrát).

- Az *agonista* dózistartomány-kereső vizsgálat során referenciaszabványként az E2 négy koncentrációját mérik duplikátumban, és négy lyukat tartanak fent a DMSO-kontroll számára.
- Az *antagonista* dózistartomány-kereső vizsgálat során pedig referenciaszabványként a Ral/E2 három koncentrációját mérik $9,18 \times 10^{-11}$ M E2-vel duplikátumban, és három-három lyukat tartanak fent az E2 és a DMSO-kontroll számára.

1. ábra: A 96 lyukú lemez elrendezése agonista dózistartomány-kereső vizsgálatához

	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

Rövidítések: E2-1 és E2-4 között = az E2 referenciaszabvány koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); TC1-1 és TC1-7 között = az 1. vizsgálati vegyi anyag (TC1) koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); TC2-1 és TC2-7 között = a 2. vizsgálati vegyi anyag (TC2) koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); TC3-1 és TC3-7 között = a 3. vizsgálati vegyi anyag (TC3) koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); TC4-1 és TC4-7 között = a 4. vizsgálati vegyi anyag (TC4) koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); TC5-1 és TC5-7 között = az 5. vizsgálati vegyi anyag (TC5) koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); TC6-1 és TC6-7 között = a 6. vizsgálati vegyi anyag (TC6) koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); VC = vivőanyagok kontroll (DMSO [1 térfogatszázalék EFM-ben]).

2. ábra: A 96 lyukú lemez elrendezése antagonistá dózistartomány-kereső vizsgálatához

	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

Rövidítések: E2 = E2-kontroll; Ral-1 és Ral-3 között = a raloxifen/E2 referenciaszabvány koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); TC1-1 és TC1-7 között = az 1. vizsgálati vegyi anyag (TC1) koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); TC2-1 és TC2-7 között = a 2. vizsgálati vegyi anyag (TC2) koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); TC3-1 és TC3-7 között = a 3. vizsgálati vegyi anyag (TC3) koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); TC4-1 és TC4-7 között = a 4. vizsgálati vegyi anyag (TC4) koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); TC5-1 és TC5-7 között = az 5. vizsgálati vegyi anyag (TC5) koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); TC6-1 és TC6-7 között = a 6. vizsgálati vegyi anyag (TC6) koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); VC = vivőanyagok kontroll (DMSO [1 térfogatszázalék EFM-ben]).

Megjegyzés: Minden vizsgálati vegyi anyagot $9,18 \times 10^{-11}$ M E2 jelenlétében kell vizsgálni.

28. Az egyes lyukakba helyezendő tápoldat végleges ajánlott térfogata 200 µl. Csak olyan vizsgálati lemezek használhatók, amelyek valamennyi lyukában a sejtek életképessége legalább 80 %.

29. A teljes körű **agonista** vizsgálat induló koncentrációértékeinek meghatározását részletesen ismerteti az agonista protokoll (7). Röviden az alábbi kritériumoknak kell megfelelni:

- Amennyiben a vizsgálati vegyi anyag koncentrációgörbéjén nincs olyan pont, amelyik meghaladná a DMSO-kontroll átlagától való standard deviáció háromszorosával növelt átlagot, a teljes körű vizsgálatot 1:2 arányban hígított, 11 elemből álló koncentrációsorozattal kell végrehajtani, a maximális oldható koncentrációval kezdve.
- Amennyiben a vizsgálati vegyi anyag koncentrációgörbéjén vannak olyan pontok, amelyek meghaladják a DMSO-kontroll átlagától való standard deviáció háromszorosával növelt átlagot, a teljes körű vizsgálat 11 koncentrációjú hígítási rendszerének induló koncentrációértéke egy loggal magasabb legyen annál a koncentrációnál, amely a dózisbehatárolás során a legmagasabb kiigazított RLU-értéket adta. A 11 koncentrációjú hígítási rendszer alapja az 1:2 vagy 1:5 arányú hígítás, az alábbi kritériumok alapján:

Az 1:2 arányban hígított, 11 elemből álló koncentrációsorozat akkor alkalmazandó, ha az eredményül kapott koncentrációtartomány – a dózistartomány-kereső vizsgálat koncentráció-válasz görbéje alapján – magában foglalja a válaszok teljes tartományát. Ellenkező esetben 1:5 arányú hígítást kell alkalmazni.

- Amennyiben valamely vizsgálati vegyi anyag dózistartomány-kereső vizsgálata kétfázisú koncentráció-válasz görbét eredményez, a teljes körű vizsgálat során mindkét fázist figyelembe kell venni.

30. A teljes körű **antagonista** vizsgálat induló koncentrációértékeinek meghatározását részletesen ismerteti az antagonista protokoll (7). Röviden az alábbi kritériumoknak kell megfelelni:

- Amennyiben a vizsgálati vegyi anyag koncentrációgörbéjén nincs olyan pont, ami kisebb mint az E2-kontroll átlagától való standard deviáció háromszorosával csökkentett átlag, a teljes körű vizsgálatot 1:2 arányban hígított, 11 elemből álló koncentrációsorozattal kell végrehajtani, a maximális oldható koncentrációval kezdve.
- Amennyiben a vizsgálati vegyi anyag koncentrációgörbéjén vannak olyan pontok, amelyek nem haladják meg az E2-kontroll átlagától való standard deviáció háromszorosával csökkentett átlagot, a teljes körű vizsgálat 11 koncentrációjú hígítási rendszerének induló koncentrációértéke az alábbiak egyike kell legyen:
 - a dózisbehatárolás során a legalacsonyabb kiigazított RLU-értéket adó koncentráció;
 - a maximális oldható koncentráció (lásd az antagonista protokoll (7) 14-2. ábráját);

- a legalacsonyabb citotoxikus koncentráció (vonatkozó példához lásd az antagonista protokoll (7) 14-3. ábráját).
- A 11 koncentrációjú hígítási rendszer alapja az 1:2 vagy 1 : 5 arányú hígítás, az alábbi kritériumok alapján:

Az 1:2 arányban hígított, 11 elemből álló koncentrációsorozat akkor alkalmazandó, ha az eredményül kapott koncentrációtartomány – a dózistartomány-kereső vizsgálat koncentráció-válasz görbéje alapján – magában foglalja a válaszok teljes tartományát. Ellenkező esetben 1:5 arányú hígítást kell alkalmazni.

Teljes körű tesztelés

31. A teljes körű vizsgálat egy 11 elemes koncentrációsorozatból áll (1:2 vagy 1:5 arányú hígítás alkalmazandó a teljes körű vizsgálat induló koncentrációértékének meghatározási kritériumai alapján), és minden koncentrációértéket három ismételtsben mérnek egy 96 lyukú lemezen (lásd a 3. és 4. ábrát).
- Az *agonista* teljes körű vizsgálat során referenciaszabványként az E2 11 koncentrációját mérik replikátumban. Mindegyik lemezen négy replikátum lyukat tartanak fent a DMSO-kontroll és négy replikátum lyukat a metoxiklórral végzett kontroll ($9,06 \times 10^{-6}$ M) számára.
- Az *antagonista* teljes körű vizsgálat során referenciaszabványként a Ral/E2 kilenc koncentrációját mérik $9,18 \times 10^{-11}$ M E2-vel duplikátumban, emellett négy replikátum lyukat tartanak fent a $9,18 \times 10^{-11}$ M E2-kontroll, négy replikátum lyukat a DMSO-kontroll és négy replikátum lyukat a $3,36 \times 10^{-6}$ M tamoxifén kontroll számára.

3. ábra: A 96 lyukú lemez elrendezése agonista teljes körű vizsgálathoz

	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	Met
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Met
G	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Met
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Met

Rövidítések: TC11-1 és TC1-11 között = a 1. vizsgálati vegyi anyag koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); TC2-1 és TC2-11 között = a 2. vizsgálati vegyi anyag koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); E2-1 és E2-11 között = az E2 referenciaszabvány koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); Met = p,p'-metoxiklórral végzett gyenge pozitív kontroll; VC = 1 térfogatszázalék DMSO-dal EFM-ben végzett vivőanyagos kontroll.

4. ábra: A 96 lyukú lemez elrendezése antagonistá teljes körű vizsgálathoz

	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

Rövidítések: E2 = E2-kontroll; Ral-1 és Ral-9 között = a raloxifen/E2 referenciaszabvány koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); Tam = tamoxifénnel/E2-vel végzett gyenge pozitív kontroll; TC1-1 és TC1-11 között = az 1. vizsgálati vegyi anyag (TC1) koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); TC2-1 és TC2-11 között = a 2. vizsgálati vegyi anyag (TC2) koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); VC = vivőanyagos kontroll (DMSO [1 térfogatszázalék EFM-ben]).

Megjegyzés: Amint az már említésre került, minden referencia és vizsgálati anyagot tartalmazó lyuk fix koncentrációban ($9,18 \times 10^{-11}$ M) E2-t tartalmaz.

32. A vizsgálatok függetlenségének biztosítása érdekében az azonos vegyi anyaggal végzett teljes körű vizsgálatokat különböző napokon kell megismételni. Legalább két teljes körű vizsgálatot kell végezni. Ha az egyik vizsgálat eredménye ellentmond a másikénak (pl. az

egyik pozitív, a másik negatív), vagy ha az egyik vizsgálat nem megfelelő eredményre vezetett, egy további, harmadik vizsgálatra van szükség.

A lumineszcencia mérése

33. A lumineszcencia 300 és 650 nm közötti tartományban mérhető, a mérés egy injektor luminométer és egy szoftver segítségével történik, ez utóbbi szabályozza az injektált térfogatot és a mérési időközöt (7). Az egyes lyukak által kibocsátott fényt lyukankénti RLU-ban fejezik ki.

AZ ADATOK ELEMZÉSE

Az EC₅₀ /IC₅₀ érték meghatározása

34. Az EC₅₀ érték (a vizsgálati vegyi anyag maximális hatásának felét kiváltó koncentráció [agonisták esetében]) és az IC₅₀ érték (a vizsgálati vegyi anyag maximális gátló hatásának felét kiváltó koncentráció [antagonisták esetében]) a koncentráció-válasz adatok alapján kerül meghatározásra. A legalább egy koncentrációban pozitívnak bizonyult vizsgálati vegyi anyagoknál a vizsgálati vegyi anyag félmaksimalis választ kiváltó koncentrációját (IC₅₀ vagy EC₅₀) Hill-féle funkcióanalízissel vagy annak megfelelő alternatívájával számítják ki. A Hill-féle funkcióanalízis egy négy paraméteres logisztikai-matematikai modell, amely az alábbi egyenlet révén összekapcsolja a vizsgálati vegyi anyag koncentrációját a válasszal (ami általában egy szigmoid görbe formáját veszi fel):

$$Y = \text{Görbe alja} + \frac{(\text{Görbe teteje} - \text{Görbe alja})}{1 + 10^{(\lg EC_{50} - X) \text{Hill-merekség}}}$$

ahol:

Y = a válasz (vagyis az RLU-értékek);

X = a koncentráció logaritmus;

Görbe alja = a minimális válasz;

Görbe teteje = a maximális válasz;

lg EC₅₀ (vagy lg IC₅₀) = az X logaritmus, a görbe teteje és alja közötti válasz;

Hill-merekség = a görbe mereksége.

A modell kikalkulálja a felső, alsó, merekségi, IC₅₀ és EC₅₀ paraméterek legjobb mérőszámait. Az EC₅₀ és IC₅₀ értékek meghatározásához megfelelő statisztikai szoftvert kell használni (ilyen például a Graphpad Prism^R statisztikai szoftver).

Kiugró értékek meghatározása

35. A statisztikai eredmények megfelelő értékelését megkönnyíti, ha a vizsgálat során (egyebek mellett) elvégeznek egy Q-tesztet (az adatelemzésből kizárando „használatatlan” lyukak azonosításáról lásd az agonista és antagonistá protokollt (7)).
36. Az E2 referenciaszabvány (két mintájú) replikátumai esetében az E2 bármely koncentrációjú replikátumának kiigazított RLU-értéke akkor tekinthető kiugrónak, ha az adott érték 20 %-kal alatta vagy felette van az adatbázisban az adott koncentrációra vonatkozó kiigazított RLU-értéknek.

Luminométerrel mért adatok begyűjtése és kiigazítása dózistartomány-kereső vizsgálatához

37. A luminométer által szolgáltatott nyers adatokat át kell vezetni a vizsgálat céljára létrehozott táblázatsablonba. Meg kell határozni, hogy vannak-e a vizsgálatból kizárando kiugró adatok. (Lásd az elemzés során meghatározott paraméterekre vonatkozó elfogadhatósági kritériumokat.) Az alábbi számításokat kell elvégezni:

Agonista vizsgálat

1. lépés Számítsuk ki a DMSO vivőanyagos kontroll (VC) átlagértékét.
2. lépés Az adatok normalizálásához a DMSO VC átlagértékét vonjuk ki az egyes lyukaknál kapott értékből.
3. lépés Számítsuk ki a referenciaszabvány (E2) átlagos indukciós faktorát.
4. lépés Számítsuk ki a vizsgálati vegyi anyagok átlagos EC₅₀ értékét.

Antagonista vizsgálat

1. lépés Számítsuk ki a DMSO VC átlagértékét.
2. lépés Az adatok normalizálásához a DMSO VC átlagértékét vonjuk ki az egyes lyukaknál kapott értékből.
3. lépés Számítsuk ki a referenciaszabvány (Ra/E2) átlagos redukciós faktorát.
4. lépés Számítsuk ki az E2 referenciaszabvány átlagértékét.
5. lépés Számítsuk ki a vizsgálati vegyi anyagok átlagos IC₅₀ értékét.

A teljes körű vizsgálat során a luminométerrel mért adatok begyűjtése és kiigazítása

38. A luminométer által szolgáltatott nyers adatokat át kell vezetni a vizsgálat céljára létrehozott táblázatsablonba. Meg kell határozni, hogy vannak-e a vizsgálatból kizárando kiugró adatok. (Lásd az elemzés során meghatározott paraméterekre vonatkozó elfogadhatósági kritériumokat.) Az alábbi számításokat végzik el:

Agonista vizsgálat

1. lépés Számítsuk ki a DMSO VC átlagértékét.
2. lépés Az adatok normalizálásához a DMSO VC átlagértékét vonjuk ki az egyes lyukaknál kapott értékből.
3. lépés Számítsuk ki a referenciaszabvány (E2) átlagos indukciós faktorát.
4. lépés Számítsuk ki az E2 és a vizsgálati vegyi anyagok átlagos EC₅₀ értékét.
5. lépés Számítsuk ki a metoxiklór átlagos kiigazított RLU-értékét.

Antagonista vizsgálat

1. lépés Számítsuk ki a DMSO VC átlagértékét.
2. lépés Az adatok normalizálásához a DMSO VC átlagértékét vonjuk ki az egyes lyukaknál kapott értékből.
3. lépés Számítsuk ki a referenciaszabvány (Ral/E2) átlagos indukciós faktorát.
4. lépés Számítsuk ki a Ral/E2 és a vizsgálati vegyi anyagok átlagos IC₅₀ értékét.
5. lépés Számítsuk ki a tamoxifén átlagos kiigazított RLU-értékét.
6. lépés Számítsuk ki az E2 referenciaszabvány átlagértékét.

Az adatok értelmezésének kritériumai

39. A VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat célja, hogy egy bizonyítékok súlyozásán (WoE) alapuló megközelítés részeként segítsen rangsorolni az anyagokat az endokrin zavarokat mérő *in vivo* vizsgálatokhoz. E rangsorolási folyamat egyik lépése az, amikor a vizsgálati vegyi anyagokat ösztrogénreceptor agonista vagy ösztrogénreceptor antagonisták aktivitás szempontjából pozitívként vagy negatívként azonosítják. Az 1. táblázat ismerteti azokat a döntési kritériumokat, amelyek alapján a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat validálási tanulmánya során pozitívnak vagy negatívnak minősítették az anyagokat.

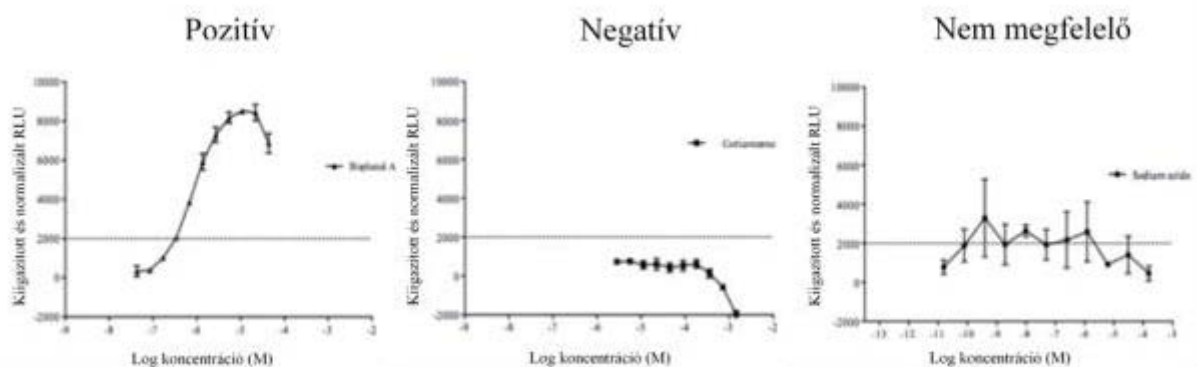
1. táblázat: Pozitív és negatív döntési kritériumok

AGONISTA AKTIVITÁS	
Pozitív	- Az ösztrogénreceptor agonista aktivitás szempontjából <i>pozitívnak</i> minősített minden vizsgálati vegyi anyag koncentráció-válasz görbéjén lennie kell egy alapvonalnak, amelyet egy pozitív meredekség követ, amely egy platóban vagy csúcspontban zárul. Bizonyos esetekben e három jellemző közül csak kettő határozható meg (alapvonal-meredekség vagy meredekség-csúcspont). - A pozitív meredekséget meghatározó vonalnak legalább három olyan pontot kell tartalmaznia, amelyeknek a szórása nem fed át (átlag $\pm$ SD). Az alapvonalat alkotó pontok nem számítanak, de a görbe lineáris szakasza tartalmazhatja a csúcspontot vagy a plató első pontját. - A pozitív besoroláshoz szükséges továbbá, hogy a válasz amplitúdója (vagyis az alapvonal és a csúcspont közötti különbség) elérje legalább az E2 referenciaszabvány maximális értékének 20 %-át (vagyis legalább 2 000 RLU-t, amikor az [E2] referenciaszabvány kiigazított maximális válaszáértéke 10 000 RLU). - Amennyiben megoldható, meg kell határozni minden pozitív vizsgálati vegyi anyag EC₅₀ értékét.
Negatív	Egy adott koncentráció átlagos kiigazított RLU-értéke megegyezik azzal az értékkel, vagy alatta marad annak az értéknek, amely a DMSO-kontroll átlagos RLU-értéke plusz a DMSO RLU-értékétől való standard deviáció háromszorosa.

Nem megfelelő	Azok az adatok nem tekinthetők hitelesnek, amelyek jelentős kvalitatív vagy kvantitatív korlátok miatt az aktivitás meglétét vagy hiányát mutatják, és ezért nem megfelelőnek kell minősíteni azokat, és nem használhatók fel a vizsgálati vegyi anyag pozitívként vagy negatívként való besorolásához. Ilyenkor a vegyi anyagokat újbóli vizsgálatnak kell alávetni.
ANTAGONISTA AKTIVITÁS	
Pozitív	- A vizsgálati anyag adatai olyan koncentráció-válasz görbét rajzolnak ki, amelyik egy platóból induló negatív meredekség követ. - A negatív meredekséget meghatározó vonal legalább három pontot tartalmaz egymást nem fedő hibaszávokkal; az alapvonalat alkotó pontok nem számítanak, de a görbe lineáris szakasza tartalmazhatja a plató első pontját. - A Ral/E2 referenciaszabvány maximális értékéhez képest legalább 20 %-ot kell csökkennie az aktivitásnak (vagyis legfeljebb 8 000 RLU lehet, amikor a [Ral/E2] referenciaszabvány kiigazított maximális válaszártéke 10 000 RLU). - A vizsgálati vegyi anyag legmagasabb nem toxikus koncentrációja legfeljebb 1×10^{-5} M lehet. - Amennyiben megoldható, meg kell határozni minden pozitív vizsgálati vegyi anyag IC_{50} értékét.
Negatív	Minden $1,0 \times 10^{-5}$ M-nél kisebb koncentrációnak megfelelő adatpont az ED_{80} érték felett helyezkedik el (ami megegyezik az E2 válasz 80 %-ával vagy 8 000 RLU-val).
Nem megfelelő	Azok az adatok nem tekinthetők hitelesnek, amelyek jelentős kvalitatív vagy kvantitatív korlátok miatt az aktivitás meglétét vagy hiányát mutatják, és ezért nem megfelelőnek kell minősíteni azokat, és nem használhatók fel a vizsgálati vegyi anyag pozitívként vagy negatívként való besorolásához. Ilyenkor a vegyi anyagot újbóli vizsgálatnak kell alávetni.

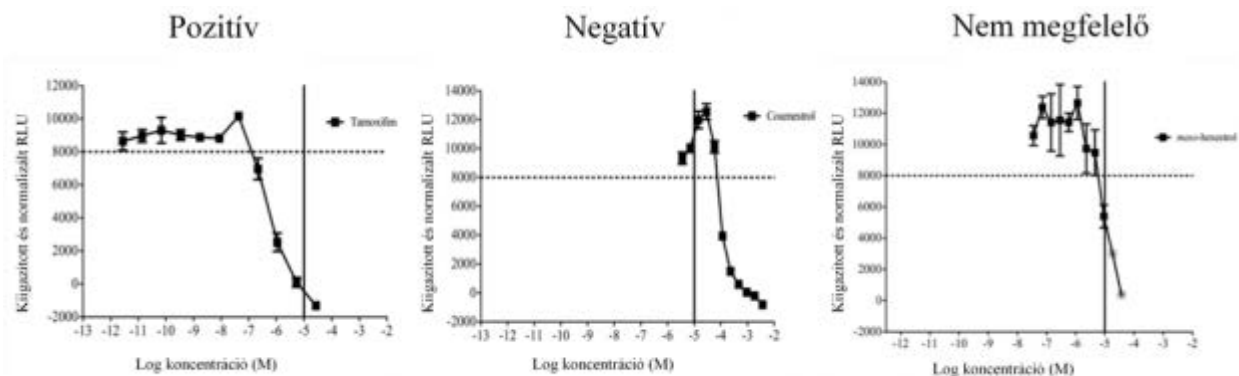
40. A pozitív eredményeket – ha lehetséges – jellemezni kell mind a kiváltott hatás mértékével, mind a hatást előidéző koncentrációval. A pozitív, negatív és nem megfelelő adatokra az 5. és a 6. ábra szolgáltat példákat.

5. ábra: Agonista példák: pozitív, negatív és nem megfelelő adatok



A szaggatott vonal az E2 válasz 20 %-át jelzi, ami 2 000 kiigazított és normalizált RLU-nak felel meg.

6. ábra: Antagonista példák: pozitív, negatív és nem megfelelő adatok



A szaggatott vonal a Ral/E2 válasz 80 %-át jelzi, ami 8 000 kiigazított és normalizált RLU-nak felel meg.

Az egybefüggő vonal az $1,00 \times 10^{-5}$ M koncentrációt jelzi. Ahhoz, hogy egy választ pozitívnak lehessen tekinteni, alatta kell maradnia a 8 000 RLU-t jelző vonalon, és a koncentrációja nem haladhatja meg az $1,00 \times 10^{-5}$ M értéket.

A meso-hexestrol grafikonon csillaggal jelzett koncentrációk „2” vagy annál nagyobb életképességi pontszámot jeleznek.

A meso-hexestrol vizsgálat eredményei nem megfelelőnek tekintendők, mert az egyetlen 8 000 RLU alatti válasz $1,00 \times 10^{-5}$ M koncentrációnál fordul elő.

41. Az EC_{50} és az IC_{50} érték kiszámítható a négy paraméteres Hill-féle funkcióanalízis alkalmazásával (részleteket lásd az agonista és az antagonista protokollban (7)). Az elfogadhatósági kritériumok teljesítése jelzi a rendszer megfelelő működését, de nem garantálja az egyes vizsgálatmenetek adatainak pontosságát. Az adatok pontosságát az biztosítja a legjobban, ha az első vizsgálatmenet eredményei megismételhetők (lásd „AZ ÖSZTROGÉNRECEPTOR TRANSZAKTIVÁCIÓS VIZSGÁLAT ÖSSZETEVŐI” című 19. pontot).

VIZSGÁLATI JELENTÉS

42. Lásd „AZ ÖSZTROGÉNRECEPTOR TRANSZAKTIVÁCIÓS VIZSGÁLAT ÖSSZETEVŐI” című 20. pontot.

SZAKIRODALOM

- (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): p. 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: p. 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) (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.

4. FÜGGELÉK

A VEGYI ANYAGOK ÖSZTROGÉNHA TÁSÚ AGONISTA ÉS ANTAGONISTA AKTIVITÁSÁNAK ER α CALUX SEJTVONALLAL TÖRTÉNŐ ÉSZLELÉSÉRE SZOLGÁLÓ, STABILAN TRANSZFEKTÁLT HUMÁN ÖSZTROGÉNRECEPTOR ALFA TRANSZAKTIVÁCIÓS VIZSGÁLAT

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK (LÁSD MÉG AZ ÁLTALÁNOS BEVEZETÉST)

1. Az ösztrogénreceptor α CALUX transzaktivációs vizsgálat humán U2OS sejtvonalat használ a humán ösztrogénreceptor alfa (hER α) által közvetített ösztrogénhatású agonista és antagonisták aktivitás észlelésére. A stabil transzfekciós ER α CALUX biológiai vizsgálat validálási tanulmányát a BioDetection Systems BV (Amszterdam, Hollandia) végezte, amely tanulmány bizonyította, hogy a vizsgálat tervezett felhasználása tekintetében releváns és megbízható (1). Az ER α CALUX sejtvonal kizárólag stabilan transzfektált humán ER α -t fejez ki (2) (3).
2. A vizsgálat kifejezetten azt a célt szolgálja, hogy a biolumineszcencia mint végpont mérése révén észlelje a hER α által közvetített transzaktivációt. A biolumineszcenciát általánosan alkalmazzák a biológiai vizsgálatok során, a magas jel/háttér arány miatt (4).
3. Az 1 μ M-nél magasabb fitoösztrogén-koncentrációnál a luciferáz riportergén túlzott aktiválásáról számoltak be, ami nem receptorok által közvetített lumineszcenciához vezet (5) (6) (7). Ezért az ennél magasabb fitoösztrogén-koncentrációértékeket vagy a luciferáz-kifejeződést túlzottan aktiváló más hasonló vegyületeket körültekintően kell vizsgálni a stabilan transzfektált ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálatok során (lásd a 2. függelék).
4. E vizsgálat szabályozási célra való alkalmazása előtt el kell olvasni az „ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS” és „AZ ÖSZTROGÉNRECEPTOR TRANSZAKTIVÁCIÓS VIZSGÁLAT ÖSSZETEVŐI” részt. A vizsgálati módszerben használt fogalmak és rövidítések meghatározását az 1. függelék tartalmazza.

A VIZSGÁLAT ELVE (LÁSD MÉG AZ ÁLTALÁNOS BEVEZETÉST)

5. Ez a biológiai vizsgálat arra szolgál, hogy értékelje az ösztrogénreceptor ligandumhoz kötődését, és a receptor-ligandum komplex ezt követő transzlokációját a sejtmagba. A sejtmagban a receptor-ligandum komplex specifikus DNS válaszlemekhez kötődve transzaktivál egy széntjánosbogár luciferáz riportergént, ami megnöveli a luciferáz enzim celluláris kifejeződését. A luciferázhoz luciferin szubsztrátumot adagolnak, ezt követően a

luciferin biolumineszcens terméké alakul. A felszabaduló fény könnyen észlelhető, mennyisége luminométer segítségével meghatározható.

6. A vizsgálati rendszer stabilan transzfektált ER α CALUX sejteket alkalmaz. Az ER α CALUX sejtek a humán oszteoblasztás oszteoszarkóma U2OS sejtvonalból származnak. A humán U2OS sejteket a kalcium-foszfát transzfekciós módszerrel stabilan transzfektálták a 3xHRE-TATA-Luc és pSG5-neo-hER α konstrukciókkal. Az U2OS sejtvonal bizonyult a legjobb jelöltnek arra, hogy ösztrogén-reszponzív (és egyéb szteroidhormon-reszponzív) riporter sejtvonalként szolgáljon, ami azon a megfigyelésen alapul, hogy az U2OS sejtvonal csekély szintű endogén riporter aktivitást mutatott vagy egyáltalán nem mutatott endogén riporter aktivitást. Az endogén receptorok hiányát csak luciferáz riporter plazmidokkal mérték, amelyek a riporter ligandumok hozzáadását követően nem mutattak aktivitást. Emellett ez a sejtvonal erős hormon közvetítésű válaszokat adott hasonló receptorok tranzienst transzfekciója esetén (2) (3) (8).
7. Amikor az ER α CALUX sejtvonallal vizsgálják a vegyi anyagok ösztrogénhatású vagy antiösztrogén-hatású aktivitását, szükség van elővizsgálatra és teljes körű vizsgálatmenetekre. Az elővizsgálat során állapítják meg a vizsgálati vegyi anyagok oldhatóságát, citotoxicitását és pontosított koncentrációtartományát a teljes körű vizsgálatokhoz. A teljes körű vizsgálatmenetekben az ER α CALUX biológiai vizsgálat során tesztelik a vizsgálati vegyi anyagok pontosított koncentrációtartományát, majd agonista vagy antagonisták aktivitás szempontjából elvégzik besorolásukat.
8. Az adatok értelmezésének kritériumait részletesen a 59. pont ismerteti. Röviden: a vizsgálati vegyi anyag akkor tekinthető pozitív agonistának, ha az anyag legalább két egymást követő koncentrációértéke olyan választ ad, amely megegyezik a referenciaszabványként használt 17 β -ösztradiol maximális válaszával 10 %-ával (PC₁₀), illetve meghaladja azt. A vizsgálati vegyi anyag akkor minősíthető pozitív antagonistának, ha az anyag legalább két egymást követő koncentrációértéke olyan választ ad, amely megegyezik a referenciaszabványként használt tamoxifén maximális válaszával 80 %-ával (PC₈₀), illetve alacsonyabb annál.

ELJÁRÁS

Sejtvonalak

9. A vizsgálathoz stabilan transzfektált U2OS ER α CALUX sejtvonalat kell használni. A sejtvonal szakmai licenszszereződés birtokában szerezhető be a BioDetection Systems BV vállalatától (Amszterdam, Hollandia).
10. Csak mikoplazmamentes sejtkultúrák használhatók. A felhasznált sejttételeknek vagy igazoltan mikoplazmafertőzés-mentesnek kell lenniük, vagy használat előtt el kell végezni

rajtuk egy mikoplazma vizsgálatot. A mikoplazma-fertőzés detektálására az RT-PCR (valós idejű polimeráz láncreakció) alkalmazandó (9).

A sejtvonal stabilitása

11. A CALUX sejtek stabilitásának és integritásának megőrzése érdekében a sejteket folyékony nitrogénben (-80°C -on) kell tárolni. Miután felolvasztották a sejteket, hogy új tenyészetet hozzanak létre, a sejteket legalább kétszer át kell ültetni, mielőtt felhasználnák azokat vegyi anyagok ösztrogénhatású agonista és antagonistáinak aktivitásának értékelésére. A sejteket legfeljebb 30 alkalommal szabad passzálni.
12. Annak nyomon követése érdekében, hogy a sejtvonal az idő múlásával is megőrzi stabilitását, a referenciaszabvány EC_{50} vagy IC_{50} értékének mérésével ellenőrizni kell az agonista és antagonistá vizsgálati rendszer válaszadási képességét. Emellett ellenőrizni kell a pozitív kontrollminta (PC) és a negatív kontrollminta (NC) relatív indukciós képességét. Az eredményeknek meg kell felelniük az $\text{ER}\alpha$ CALUX biológiai vizsgálat agonista (3C táblázat) vagy antagonistá (4C táblázat) tesztjére vonatkozó elfogadhatósági kritériumoknak. Az agonista, illetve az antagonistá vizsgálat referenciaszabványát, pozitív és negatív kontrollanyagát az 1. táblázat, illetve a 2. táblázat ismerteti.

Sejtenyésztés és a leültetés körülményei

13. Az U2OS sejteket pH-indikátor fenolvöröst tartalmazó, továbbá magzati borjú szérummal (7,5 %), nem esszenciális aminosavakkal (1 %), 10 egység/ml penicillinnel és sztreptomocinnel, valamint szelekciós markerként szolgáló genetecinnel (G-418) kiegészített tápoldatban (DMEM/F12 (1 : 1)) kell tenyészteni. A sejteket 5 %-os CO_2 -tartalmú inkubátorba kell helyezni, 37°C -os hőmérséklet és 100 %-os páratartalom biztosítása mellett. 85–95 %-os konfluencia elérését követően a sejteket vagy tovább kell oltani, vagy elő kell készíteni a 96 lyukú mikrotiterlemezekbe történő leoltáshoz. Ez utóbbi esetben a sejteket egy ösztrogénmentes DMEM/F12 (1 : 1) tápoldatban 1×10^5 sejt/ml sűrűségben felfuszpendálják és a homogenizált sejtszuszpenziót 100 μl -ként kiszélesztik a 96 lyukú mikrotiterlemez lyukaiba, a tápoldat itt fenolvörösmentes, tartalmaz 5 térfogatszázalék dextránbevonatú aktív szénnel kezelt magzati borjú szérumot, 1 térfogatszázalék nem esszenciális aminosavakat és 10 egység/ml penicillin és sztreptomocint). A kezelést megelőzően a sejteket CO_2 inkubátorban (5 % CO_2 , 37°C , 100 % páratartalom) 24 órán keresztül preinkubálni kell. A műanyag edények legyenek ösztrogénmentesek.

Elfogadhatósági kritériumok

14. A vizsgálati vegyi anyag(ok) agonista és antagonistá aktivitását egy vizsgálatssorozaton keresztül mérik fel. Egy vizsgálatssorozat legfeljebb 6 mikrotiterlemezről áll. Minden vizsgálatssorozat magában foglalja a referenciaszabvány egy teljes oldatsorozatát, egy pozitív

kontrollmintát, egy negatív kontrollmintát és az oldószeres kontrollokat. Az 1. és a 2. ábra ismerteti az agonista és az antagonistá vizsgálsorozatokhoz használt lemez elrendezését.

15. A referenciaszabványok, a vizsgálati vegyi anyagok, az oldószeres kontrollanyagok, valamint a pozitív és negatív kontrollanyagok minden egyes oldatát triplikátumban kell vizsgálni. Mindhárom ismétlés eredményeinek meg kell felelniük a 3A és 4A táblázatban szereplő követelményeknek.
16. Minden vizsgálsorozat első lemezén megméri a referenciaszabvány (agonista vizsgálat esetén a 17 β -ösztradiol; antagonistá vizsgálat esetén a tamoxifén) teljes oldatsorozatát. Annak érdekében, hogy a másik 5 mikrotiterlemez elemzésének eredményeit össze lehessen vetni a referenciaszabvány teljes koncentráció-válasz görbét tartalmazó első mikrotiterlemezzel, minden lemeznek 3 kontrollmintát kell tartalmaznia: az oldószeres kontrollt, a vizsgált referenciaszabvány legmagasabb koncentrációját és a referenciaszabvány körülbelüli EC₅₀ (agonista) vagy IC₅₀ (antagonista) koncentrációját. Az első lemez és a másik 5 lemez kontrollmintái átlagának aránya meg kell feleljen a 3C táblázatban (agonista vizsgálat) vagy a 4C táblázatban (antagonista vizsgálat) feltüntetett követelményeknek.
17. Meg kell határozni a vizsgálsorozatán belüli egyes mikrotiterlemezek z-tényezőt (10). A z-tényezőt a referenciaszabvány legmagasabb és legalacsonyabb koncentrációjánál kapott válasz alapján kell kiszámítani. A mikrotiterlemezek eredményei akkor tekinthetők hitelesnek, ha eleget tesznek a 3C táblázatban (agonista vizsgálat) vagy a 4C táblázatban (antagonista vizsgálat) feltüntetett követelményeknek.
18. A referenciaszabványnak szigmoid formájú dózis-válasz görbét kell eredményeznie. A referenciaszabvány oldatsorozatának válaszai alapján meghatározott EC₅₀ vagy IC₅₀ értéknek meg kell felelnie a 3C táblázatban (agonista vizsgálat) vagy a 4C táblázatban (antagonista vizsgálat) szereplő követelményeknek.
19. Minden vizsgálsorozatnak tartalmaznia kell egy pozitív és egy negatív kontrollmintát. Mind a pozitív, mind a negatív kontrollminta kalkulált relatív indukciós hatásának eleget kell tennie a 3C táblázatban (agonista vizsgálat) vagy a 4C táblázatban (antagonista vizsgálat) feltüntetett követelményeknek.
20. A referenciaszabvány legmagasabb koncentrációjának indukciós faktorát minden mérés során úgy határozzák meg, hogy elosztják a 17 β -ösztradiol referenciaszabvány átlagos legmagasabb relatív fényegység (RLU) válaszát a referencia oldószerrel végzett kontroll átlagos RLU-válaszával. Az indukciós faktornak eleget kell tennie a 3C táblázatban (agonista vizsgálat) vagy a 4C táblázatban (antagonista vizsgálat) feltüntetett, indukciós faktorra vonatkozó követelményeknek.
21. Kizárólag a fenti elfogadhatósági kritériumoknak megfelelő mikrotiterlemezek tekinthetők hitelesnek, és használhatók fel a vizsgálati vegyi anyagok által adott válasz értékelésére.

22. Az elfogadhatósági kritériumok egyaránt vonatkoznak az elővizsgálatra és a teljes körű vizsgálatmenetekre.

1. táblázat: Az agonista CALUX biológiai vizsgálatához használt referenciaszabvány, pozitív kontrollanyag (PC) és negatív kontrollanyag (NC) koncentrációi

	Anyag	CAS-szám	Vizsgálati tartomány (M)
Referenciaszabvány	17 β -ösztadiol	50-28-2	1,0*10 ⁻¹³ –1,0*10 ⁻¹⁰
Pozitív kontroll (PC)	17 α -metiltesztoszteron	58-18-4	3,0*10 ⁻⁰⁶
Negatív kontroll (NC)	kortikoszteron	50-22-6	1,0*10 ⁻⁰⁸

2. táblázat: Az antagonistá CALUX biológiai vizsgálatához használt referenciaszabvány, pozitív kontrollanyag (PC) és negatív kontrollanyag (NC) koncentrációi

	Anyag	CAS-szám	Vizsgálati tartomány (M)
Referenciaszabvány	tamoxifén	10540-29-1	3,0*10 ⁻⁰⁹ –1,0*10 ⁻⁰⁵
Pozitív kontroll (PC)	4-hidroxitamoxifén	68047-06-3	1,0*10 ⁻⁰⁹
Negatív kontroll (NC)	rezveratrol	501-36-0	1,0*10 ⁻⁰⁵

3. táblázat: Az agonista ER α CALUX biológiai vizsgálat elfogadhatósági kritériumai

A – egy lemezen lévő egyes minták		Kritérium
1	A három ismétlésben vizsgált lyukak maximális SD-ja %-ban (a NC, a PC, a vizsgálati vegyi anyag és a referenciaszabvány minden oldata	< 15 %
2	A három ismétlésben vizsgált lyukak maximális SD-ja %-ban (a referenciaszabvány és a vizsgálati vegyi anyag oldószeres kontrolljai	< 30%
3	Az LDH maximális csökkenése, ami a citotoxicitás mérőszáma.	< 120%
B – egy mikrotiterlemezen belül		
4	A referenciaszabvány oldószeres kontrolljának (C0; 1. lemez) és a vizsgálati vegyi anyag oldószeres kontrolljának (SC; 2–x. lemez) aránya	0,5–2,0
5	A kb. EC ₅₀ és a referenciaszabvány legmagasabb koncentrációjának aránya az 1. lemezen, valamint a kb. EC ₅₀ és a referenciaszabvány legmagasabb koncentrációjának aránya a 2–x. lemezen (C4, C8)	0,70–1,30

6	Az egyes lemezek z-tényezője	> 0,6

C – egy analízissorozatban belül (egy sorozat összes lemeze)

7	A referenciaszabvány görbéje szigmoid formájú	Igen (17β-ösztadiol)
8	A 17β-ösztadiol referenciaszabvány EC ₅₀ tartománya	4*10 ⁻¹² –4*10 ⁻¹¹ M
9	A legmagasabb 17β-ösztadiol koncentráció minimális indukciós faktora, a referenciaszabvány oldószeres kontrolljához képest.	5
10	PC relatív indukciója (%)	> 30 %
11	NC relatív indukciója (%)	< 10 %

Kb.: körülbelül; PC: pozitív kontroll; NC: negatív kontroll; SC: a vizsgálati vegyi anyag oldószeres kontrollja; C0: a referenciaszabvány oldószeres kontrollja; SD: standard deviáció; LDH: laktát-dehidrogenáz.

4. táblázat: Az antagonist ERα CALUX biológiai vizsgálat elfogadhatósági kritériumai

A – egy lemezen lévő egyes minták		Kritérium
1	A három ismétlésben vizsgált lyukak maximális SD-ja %-ban (az NC, a PC, a vizsgálati vegyi anyag és a referenciaszabvány minden oldata, valamint az oldószeres kontroll (C0) tekintetében)	< 15 %
2	A három ismétlésben vizsgált lyukak maximális SD-ja %-ban (a vivőanyag kontroll (VC) és a referenciaszabvány legmagasabb koncentrációja (C8) tekintetében)	< 30%
3	Az LDH maximális csökkenése, ami a citotoxicitás mérőszáma.	< 120%
B – egy mikrotiterlemezben belül		
4	A referenciaszabvány oldószeres kontrolljának (C0; 1. lemez) és a vizsgálati vegyi anyag oldószeres kontrolljának (SC; 2–x. lemez) aránya	0,70–1,30
5	Az 1. lemez referenciaszabvány-koncentrációinak kb. IC ₅₀ értékének és a 2–x. lemez referenciaszabvány-koncentrációinak kb. IC ₅₀ értékének (C4) aránya	0,70–1,30
6	Az 1. lemez legmagasabb referenciaszabvány-koncentrációinak és a 2–x. lemez legmagasabb referenciaszabvány-koncentrációinak (C8) aránya	0,50–2,0
7	Az egyes lemezek z-tényezője	> 0,6

C – egy analízissorozatban belül (egy sorozat összes lemeze)

8	A referenciaszabvány görbéje szigmoid formájú	Igen (tamoxifén)
9	A referenciaszabvány (tamoxifén) IC ₅₀ tartománya	1*10 ⁻⁸ –1*10 ⁻⁷ M
10	A referenciaszabvány oldószeres kontrolljának minimális indukciós faktora, a tamoxifén legmagasabb koncentrációjához képest.	2,5
11	PC relatív indukciója (%)	< 70%
12	NC relatív indukciója (%)	> 85 %

Kb.: körülbelül; PC: pozitív kontroll; NC: negatív kontroll; VC: vízóanyag kontroll (az agonista referenciaszabvány fix koncentrációja nélküli oldószeres kontroll); SC: a vizsgálati vegyi anyag oldószeres kontrollja; C0: a referenciaszabvány oldószeres kontrollja; SD: standard deviáció; LDH: laktát-dehidrogenáz.

Oldószeres/vivőanyagok kontroll, referenciaszabványok, pozitív kontrollok, negatív kontrollok

23. Mind az elővizsgálatban, mind a teljes körű vizsgálatmenetekben ugyanazt a kontrollként szolgáló oldószert/vivőanyagot, referenciaszabványokat, pozitív és negatív kontrollanyagokat kell használni. Emellett változatlanul kell hagyni a referenciaszabványok, pozitív és negatív kontrollanyagok koncentrációértékeit is.

Oldószeres kontroll

24. A vizsgálati vegyi anyagok feloldására használt oldószert oldószeres kontroll keretében vizsgálni kell. Az ER α CALUX biológiai vizsgálat validálása során vivőanyagként dimetil-szulfoxidot alkalmaztak (DMSO, 1 térfogatszázalékban, CAS-száma: 67-68-5). DMSO-tól eltérő oldószer használata esetén valamennyi referenciaszabványt, kontrollanyagot és vizsgálati vegyi anyagot ugyanabban a vivőanyagban kell tesztelni. Az antagonista tanulmányok oldószeres kontrollja fix koncentrációban (körülbelül EC₅₀ koncentrációban) tartalmazza az agonista referenciaszabványt, a 17 β -ösztradiolt. Az antagonista tanulmányokhoz használt oldószer teszteléséhez vivőanyagok kontrollt kell készíteni és tesztelni.

Vivőanyagok kontroll (antagonista vizsgálat)

25. Az antagonista hatás vizsgálatához a vizsgálati tápoldatot az agonista referenciaszabvány, a 17 β -ösztadiol fix koncentrációjával (körülbelül EC₅₀ koncentrációval) egészítik ki. Az antagonista hatásuk felmérése céljából vizsgált vizsgálati vegyi anyagok feloldásához alkalmazott oldószer teszteléséhez az agonista referenciaszabványként használt 17 β -ösztadiol fix koncentrációjától mentes vizsgálati közeget kell készíteni. Ez a kontrollminta az úgynevezett vivőanyagok kontroll. Az ER α CALUX biológiai vizsgálat validálása során vivőanyagként dimetil-szulfoxidot alkalmaztak (DMSO, 1 térfogatszázalékban, CAS-száma: 67-68-5). DMSO-tól eltérő oldószer használata esetén valamennyi referenciaszabványt, kontrollanyagot és vizsgálati vegyi anyagot ugyanabban a vivőanyagban kell tesztelni.

Referenciaszabványok

26. Az agonista referenciaszabvány a 17 β -ösztadiol (1. táblázat). A referenciaszabványok a 17 β -ösztadiol nyolc koncentrációjából álló oldatsorozatot foglalnak magunkban ($1,0 \cdot 10^{-13}$, $3,0 \cdot 10^{-13}$, $1,0 \cdot 10^{-12}$, $3,0 \cdot 10^{-12}$, $6,0 \cdot 10^{-12}$, $1,0 \cdot 10^{-11}$, $3,0 \cdot 10^{-11}$, $1,0 \cdot 10^{-10}$ M).
27. Az antagonista referenciaszabvány a tamoxifén (2. táblázat). A referenciaszabványok egy, a tamoxifén nyolc koncentrációjából álló oldatsorozatot foglalnak magunkban ($3,0 \cdot 10^{-9}$, $1,0 \cdot 10^{-8}$, $3,0 \cdot 10^{-8}$, $1,0 \cdot 10^{-7}$, $3,0 \cdot 10^{-7}$, $1,0 \cdot 10^{-6}$, $3,0 \cdot 10^{-6}$, $1,0 \cdot 10^{-5}$ M). Az antagonista referenciaszabvány minden egyes koncentrációját együtt inkubálják az agonista referenciaszabványként szolgáló 17 β -ösztadiol fix koncentrációjával ($3,0 \cdot 10^{-12}$ M).

Pozitív kontroll

28. Az agonista tanulmányok pozitív kontrollanyaga a 17 α -metiltesztoszteron (1. táblázat).

29. Az antagonista tanulmányok pozitív kontrollanyaga a 4-hidroxitamoxifén (2. táblázat). Az antagonista pozitív kontrollanyagot együtt inkubálják az agonista referenciaszabványként szolgáló 17 β -ösztradiol fix koncentrációjával ($3,0 \cdot 10^{-12}$ M).

Negatív kontroll

30. Az agonista tanulmányok negatív kontrollanyaga a kortikoszteron (1. táblázat).
31. Az antagonista tanulmányok negatív kontrollanyaga a rezveratrol (2. táblázat). Az antagonista negatív kontrollanyagot együtt inkubálják az agonista referenciaszabványként szolgáló 17 β -ösztradiol fix koncentrációjával ($3,0 \cdot 10^{-12}$ M).

A laboratórium jártasságának igazolása (lásd a vizsgálati módszer „AZ ÖSZTROGÉNRECEPTOR TRANSZAKTIVÁCIÓS VIZSGÁLAT ÖSSZETEVŐI” részének 14. pontját, valamint 3. és 4. táblázatát).

Vivőanyag

32. A vizsgálati vegyi anyagok feloldásához olyan oldószert kell használni, amelyik teljesen szolubilizálja a vizsgálati vegyi anyagot és elegyedik a sejtek tápoldatával. A megfelelő oldószerek közé tartozik a DMSO, a víz és az etanol (95–100 %-os tisztaságban). Amennyiben DMSO-t használnak oldószerként, az inkubálás alatt a DMSO maximális koncentrációja nem haladhatja meg az 1 térfogatszázalékot. Az oldószert alkalmazása előtt tesztelni kell, hogy nem okoz-e citotoxicitást, és nem zavarja-e a vizsgálatok teljesítményét.

A referenciaszabványok, a pozitív és negatív kontrollanyagok, valamint a vizsgálati vegyi anyagok előkészítése

33. A referenciaszabványokat, a pozitív és negatív kontrollanyagokat, valamint a vizsgálati vegyi anyagokat 100 %-os DMSO-ban (vagy más megfelelő oldószerben) kell feloldani. A megfelelő oldatokat (oldatsorozatot) ugyanabban az oldószerben kell elkészíteni. Feloldás előtt meg kell várni, hogy minden anyag szobahőmérsékletű legyen. A referenciaszabványok, a pozitív és negatív kontrollanyagok, valamint a vizsgálati vegyi anyagok frissen készített törzsoldataiban nem lehet szemmel látható kicsapódás és az oldatok nem lehet zavarosak. A referenciaszabványok és kontrollanyagok nagy tételben is előkészíthetők. A vizsgálati vegyi anyagok törzsoldatait minden kísérlet előtt frissen kell elkészíteni. A referenciaszabványok, a pozitív és negatív kontrollanyagok, valamint a vizsgálati vegyi anyagok végső oldatait minden egyes kísérlethez frissen kell készíteni, és az elkészítéstől számított 24 órán belül fel kell használni.

Oldhatóság, citotoxicitás és dózisbehatárolás

34. Az elővizsgálat során meghatározzák a vizsgálati vegyi anyagok választott oldószerben való oldhatóságát. Elkészítik a maximális, 0,1 M törzsoldat-koncentrációt. Amennyiben ennél a koncentrációnál oldhatósági problémák jelentkeznek, alacsonyabb koncentrációjú

törzsoldatokat kell készíteni mindaddig, amíg a vizsgálati vegyi anyagok teljesen oldhatónak nem bizonyulnak. Az elővizsgálat során a vizsgálati vegyi anyagok 1 : 10 arányú oldatsorozatát tesztelik. Az agonista és antagonistá vizsgálat maximális vizsgált koncentrációja az 1 mM. Az elővizsgálat megfelelően pontosítja a vizsgálati vegyi anyagok koncentrációtartományát, a teljes körű vizsgálatmenetek során ezt a tartományt kell vizsgálni. A teljes körű vizsgálat során a következő hígítási arányokat kell alkalmazni: 1x-es, 3x-os, 10x-es, 30x-os, 100x-os, 300x-os, 1000x-es és 3000x-es.

35. A citotoxicitás vizsgálata egyaránt része az agonista és az antagonistá vizsgálati protokollnak (11). Mind az elővizsgálat, mind a teljes körű vizsgálatmenetek tartalmazzak citotoxicitási vizsgálatot. Az ER α CALUX biológiai vizsgálat validálása során a citotoxicitás felmérésére a laktát-dehidrogenáz (LDH) szivárgását vizsgáló tesztet használták, és emellett kvalitatív vizuális módszerrel (lásd a 4.1. függelék) megfigyelték a vizsgálati vegyi anyagokkal kezelt sejteket. Ugyanakkor a citotoxicitás meghatározásához használhatók más kvantitatív módszerek is (pl. a tetrazólium alapú kolorimetriás (MTT) vizsgálat vagy a CALUX citotoxicitási biológiai vizsgálat). Általában véve a vizsgálati vegyi anyagok azon koncentrációi, amelyek a sejteletképesség több mint 20 %-os visszaesését okozzák, citotoxikusnak tekintendők, így az adatok értékeléséhez nem használhatók. Az LDH szivárgását vizsgáló teszt esetében a vizsgálati vegyi anyag koncentrációja akkor minősül citotoxikusnak, ha az LDH-szivárgás aránya meghaladja a 120 %-ot.

Vegyi anyaggal történő kezelés és a vizsgálati lemez elrendezése

36. A megfelelő sűrűséget elérő sejt kultúra sejtjeit tripszin hozzáadással elválasztják a sejtenyésztő edény aljától, majd a sejteket ösztrogénmentes vizsgálati tápoldatban 1×10^5 sejt/ml sűrűsége állítják be. Az újrassuszpendált sejteket 100 μ l mennyiségben kiszélesztik a 96 lyukú mikrotiterlemez belső lyukaiba. A lemezen a szélső sorok lyukait 200 μ l foszfátpuffert tartalmazó sóoldattal (PBS) töltik meg (lásd az 1. és 2. ábrát). A leültetett sejteket 24 órán keresztül CO₂ inkubátorban preinkubálják (5 % CO₂, 37 °C, 100 % páratartalom mellett).
37. A preinkubációt követően a lemezekon megfigyelik a citotoxicitás (lásd a 4.1. függelék), a fertőzés és a konfluencia szabad szemmel látható jeleit. A vizsgálatához kizárólag olyan lemezek használhatók fel, amelyeken nem látható citotoxicitás és fertőzés, a konfluencia mértéke pedig eléri a 85 %-ot. A belső lyukakban lévő sejtekről óvatosan lecserélik a tápoldatot, és 200 μ l ösztrogénmentes vizsgálati tápoldattal töltik fel, amely tartalmazza a referenciaszabványokat, a vizsgálati vegyi anyagokat, a pozitív és negatív kontrollanyagokat és az oldószerek megfelelő oldatsorozatát (5. táblázat: agonista tanulmányok; 6. táblázat: antagonistá tanulmányok). A referenciaszabványokat, a vizsgálati vegyi anyagokat, a pozitív és a negatív kontrollanyagokat, valamint az oldószereket három ismétlésben kell vizsgálni. Az 1. ábra ismerteti az agonista vizsgálati lemez elrendezését. A 2. ábra ismerteti az antagonistá vizsgálati lemez elrendezését. Az elővizsgálatához és a teljes körű vizsgálatához

alkalmazott lemezek elrendezése azonos. Az antagonista vizsgálat során minden belső lyuk – a vivőanyagot (VC) tartalmazó lyukakat kivéve – tartalmazza az agonista referenciaszabványként szolgáló 17 β -ösztradiol fix koncentrációját is ($3,0 \cdot 10^{-12}$ M). C8-as és C4-es koncentrációjú referenciaszabványnak szerepelnie kell minden vizsgálati vegyi anyagot tesztelő lemezen.

38. Miután minden vegyi anyaggal kezelték a sejteket, a 96 lyukú mikrotiterlemezeket ismét 24 órán keresztül CO₂ inkubátorban inkubálják (5 % CO₂, 37 °C, 100 % páratartalom mellett).

1. ábra: A 96 lyukú mikrotiterlemezek elrendezése agonista hatás elővizsgálathoz és értékeléséhez

1. lemez

	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	NK	
F		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NK	
G		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NK	
H												

Többi lemez

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC ₅₀)	
F		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC ₅₀)	
G		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC ₅₀)	
H												

C0 = a referenciaszabvány oldószere.

C(1–8) = a referenciaszabvány oldatsorozata (1–8, az alacsonytól a magas koncentráció felé).

PC = pozitív kontroll.

NK = negatív kontroll.

TCx-(1–8) = vizsgálati vegyi anyag oldatai (1–8, az alacsonytól a magas koncentráció felé) az x. vizsgálati vegyi anyag elővizsgálatához és agonista hatásának felméréséhez.

SC = a vizsgálati vegyi anyag oldószeres kontrollja (optimális esetben azonos a C0-val, de lehetőleg másik tételből származzon).

Szürke cellák: = szélső lyukak, 200 μ l PBS-sel feltöltve.

2. ábra: A 96 lyukú mikrotiterlemezek elrendezése antagonista hatás elővizsgálathoz és értékeléséhez

1. lemez

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	NK	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
F	NK	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
G	NK	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
H											

Többi lemez

	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 (IC ₅₀)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
F		C4 (IC ₅₀)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
G		C4 (IC ₅₀)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
H												

C0 = a referenciaszabvány oldószere.

C(1–8) = a referenciaszabvány oldatsorozata (1–8, az alacsonytól a magas koncentráció felé).

NK = negatív kontroll.

PC = pozitív kontroll.

TCx-(1–8) = vizsgálati vegyi anyag oldatai (1–8, az alacsonytól a magas koncentráció felé) az x. vizsgálati vegyi anyag elővizsgálatához és agonista hatásának felméréséhez.

SC = a vizsgálati vegyi anyag oldószeres kontrollja (optimális esetben azonos a C0-val, de lehetőleg másik tételből származzon).

VC = vivőanyagos kontroll (oldószeres kontroll, az agonista referenciaszabvány, a 17β-ösztadiol fix koncentrációja nélkül).

Szürke cellák: = szélső lyukak, 200 µl PBS-sel feltöltve.

Megjegyzés: minden belső lyuk – a vivőanyagot (VC) tartalmazó lyukakat kivéve – magában foglalja az agonista referenciaszabványként szolgáló 17β-ösztadiol fix koncentrációját is (3,0*10⁻¹² M).

A lumineszcencia mérése

39. A lumineszcencia mérésének részletes leírása megtalálható az agonista és az antagonisták vizsgálati protokollban (10). A lyukakban lévő tápoldatot el kell távolítani, majd a sejteket 24 órás inkubálást követően lizálni kell, hogy feltárják a sejtmembránt, és mérhetővé váljon a luciferáz-aktivitás.

40. A lumineszcencia méréséhez ebben az eljárásban 2 injektorral felszerelt luminométert kell használni. A luciferáz reakció megkezdéséhez beinjektálják a luciferin szubsztrátot. A reakciót 0,2 M NaOH hozzáadásával állítják le. A reakciót azért kell leállítani, hogy ne terjedjen át a lumineszcencia az egyik lyukból a másikba.

41. Az egyes lyukak által kibocsátott fényt lyukankénti relatív fényegységekben (RLU-ban) fejezik ki.

Elővizsgálat

42. Az elővizsgálat elemzésének eredményei alapján határozzák meg a vizsgálati vegyi anyagok teljes körű vizsgálatban alkalmazandó pontosított koncentrációtartományát. Az elővizsgálat eredményeinek értékeléséről és a vizsgálati vegyi anyagok teljes körű vizsgálatban alkalmazandó pontosított koncentrációtartományáról az agonista és az antagonistá vizsgálati protokoll nyújt részletes tájékoztatást (10). Az alábbiak csak röviden összefoglalják azt az eljárást, amelynek alapján meghatározható az agonista és az antagonistá vizsgálatban használt vizsgálati vegyi anyagok koncentrációtartománya. Az oldatsorozat elemeinek meghatározásához az 5. és a 6. táblázat nyújt iránymutatást.

Az agonista hatások felmérésére szolgáló koncentrációértékek kiválasztása

43. Az elővizsgálat során a vizsgálati vegyi anyagokat az 5. táblázatban (agonista vizsgálat) és a 6. táblázatban (antagonista vizsgálat) jelzett oldatsorozatban kell vizsgálni. Minden koncentrációértéket három-három lyukban kell vizsgálni, az 1. ábrán (agonista vizsgálat) és a 2. ábrán (antagonista vizsgálat) szereplő lemezelrendezésben.
44. Kizárólag az analízis elfogadhatósági kritériumoknak (3. táblázat) megfelelő eredményei tekinthetők hitelesnek, és használhatók fel a vizsgálati vegyi anyagok válaszanak értékelésére. Amennyiben az elemzéssorozat egy vagy több mikrotiterlemeze nem felel meg az elfogadhatósági kritériumoknak, az adott mikrotiterlemezeket újbóli elemzésnek kell alávetni. Ha a referenciaszabvány teljes sorozatát tartalmazó első lemez nem teljesíti az elfogadhatósági kritériumokat, ismételten el kell végezni az egész vizsgálatssorozat (mind a 6 lemez) elemzését.
45. A vizsgálati vegyi anyagok kezdeti koncentrációtartományait ki kell igazítani és az elővizsgálatot meg kell ismételni, ha:
- citotoxicitást figyeltek meg. Ilyenkor az elővizsgálatot a vizsgálati vegyi anyag alacsonyabb, nem citotoxikus koncentrációival kell megismételni;
 - a vizsgálati vegyi anyag elővizsgálata nem biztosított teljes dózis-válasz görbét, mert a vizsgált koncentrációértékek maximális indukciót idéztek elő. Ilyenkor az elővizsgálatot a vizsgálati vegyi anyag alacsonyabb koncentrációival kell megismételni.
46. Érvényes dóziszfüggő válasz esetén azt a (legalacsonyabb) koncentrációt kell kiválasztani, amely maximális indukciót hoz létre, ugyanakkor nem okoz citotoxicitást. A vizsgálati vegyi anyag teljes körű vizsgálatmenetekben tesztelendő legnagyobb koncentrációja e kiválasztott koncentráció háromszorosa legyen.
47. A vizsgálati vegyi anyag pontosított teljes oldatsorozatát az 5. táblázatban szereplő hígítási lépések szerint kell elkészíteni, kiindulva a fenti eljárás alapján meghatározott legnagyobb koncentrációtól.

48. Azokat a vizsgálati vegyi anyagokat, amelyek nem váltanak ki agonista hatást, az elővizsgálat során azonosított legnagyobb nem toxikus koncentrációtól kezdve kell vizsgálni a teljes körű vizsgálatban.

Az antagonisták hatásainak felmérésére szolgáló koncentrációértékek kiválasztása

49. Kizárólag az analízis elfogadhatósági kritériumoknak (4. táblázat) megfelelő eredményei tekinthetők hitelesnek, és használhatók fel a vizsgálati vegyi anyagok válaszáértékelésére. Amennyiben az elemzéssorozat egy vagy több mikrotiterlemez nem felel meg az elfogadhatósági kritériumoknak, az adott mikrotiterlemezeket újbóli elemzésnek kell alávetni. Ha a referenciaszabvány teljes sorozatát tartalmazó első lemez nem teljesíti az elfogadhatósági kritériumokat, ismételt el kell végezni az egész vizsgálatssorozat (mind a 6 lemez) elemzését.
50. A vizsgálati vegyi anyagok kezdeti koncentrációtartományait ki kell igazítani és az elővizsgálatot meg kell ismételni, ha:
- citotoxicitást figyeltek meg. Ilyenkor az elővizsgálatot a vizsgálati vegyi anyag alacsonyabb, nem citotoxikus koncentrációival kell megismételni;
 - a vizsgálati vegyi anyag elővizsgálata nem biztosított teljes dózis-válasz görbét, mert a vizsgált koncentrációértékek maximális gátlást idéztek elő. Ilyenkor az elővizsgálatot a vizsgálati vegyi anyag alacsonyabb koncentrációival kell megismételni.
51. Érvényes dózisfüggő válasz esetén azt a (legalacsonyabb) koncentrációt kell kiválasztani, amely maximális gátlást hoz létre, ugyanakkor nem okoz citotoxicitást. A vizsgálati vegyi anyag teljes körű vizsgálatmenetekben tesztelendő legnagyobb koncentrációja e kiválasztott koncentráció háromszorosa legyen.
52. A vizsgálati vegyi anyag pontosított teljes oldatsorozatát a 6. táblázatban szereplő hígítási lépések szerint kell elkészíteni, kiindulva a fenti eljárás alapján meghatározott legnagyobb koncentrációtól.
53. Azokat a vizsgálati vegyi anyagokat, amelyek nem váltanak ki antagonisták hatást, az elővizsgálat során tesztelt legnagyobb nem toxikus koncentrációtól kezdve kell vizsgálni a teljes körű vizsgálatban.

Teljes körű vizsgálatmenetek

54. A pontosított koncentrációtartományok meghatározását követően a teljes körű vizsgálatmenetek során a vizsgálati vegyi anyagokat az 5. táblázatban (agonista vizsgálat) és a 6. táblázatban (antagonista vizsgálat) jelzett oldatsorozatban kell vizsgálni. Minden koncentrációértéket három-három lyukban kell vizsgálni, az 1. ábrán (agonista vizsgálat) és a 2. ábrán (antagonista vizsgálat) szereplő lemezelrendezésben.

55. Kizárólag az analízis elfogadhatósági kritériumoknak (3. és 4. táblázat) megfelelő eredményei tekinthetők hitelesnek, és használhatók fel a vizsgálati vegyi anyagok válaszáának értékelésére. Amennyiben az elemzéssorozat egy vagy több mikrotiterlemez nem felel meg az elfogadhatósági kritériumoknak, az adott mikrotiterlemezeket újbóli elemzésnek kell alávetni. Ha a referenciaszabvány teljes sorozatát tartalmazó első lemez nem teljesíti az elfogadhatósági kritériumokat, ismételt el kell végezni az egész vizsgálatsorozat (mind a 6 lemez) elemzését.

5. táblázat: Az agonista vizsgálathoz használt referenciaanyagok, kontrollanyagok és vizsgálati vegyi anyagok koncentrációi és oldatai

Referencia 17β- ösztadiol konc. (M)		TCx – elővizsgálat oldatai		TCx – teljes körű vizsgálatmenet oldatai		Kontrollok 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	NK	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 – x. vizsgálati vegyi anyag

PC – pozitív kontroll (17α-metiltesztoszteron)

NK –negatív kontroll (kortikoszteron)

C0 – a referenciaszabvány oldószeres kontrollja

SC – a vizsgálati vegyi anyag oldószeres kontrollja

6. táblázat: Az antagonistá vizsgálathoz használt referenciaanyagok, kontrollanyagok és vizsgálati vegyi anyagok koncentrációi és oldatai

Referencia tamoxifén konc. (M)		TCx – elővizsgálat oldatai		TCx – teljes körű vizsgálatmenet oldatai		Kontrollok 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	NK	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	Hozzáadott agonista 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	17β- ösztadiol	3,0*10 ⁻¹²
C8	1,0*10 ⁻⁰⁵						

TCx – x. vizsgálati vegyi anyag

PC – pozitív kontroll (4-hidroxitamoxifén)

NK –negatív kontroll (rezveratrol)

C0 – a referenciaszabvány oldószeres kontrollja

SC – a vizsgálati vegyi anyag oldószeres kontrollja

VC – vivőanyag os kontroll (nem tartalmazza az agonista referenciaszabványként szolgáló 17β-ösztadiol fix koncentrációját (3,0*10⁻¹² M))

Adatgyűjtés és adatelemzés

56. Az elővizsgálat és a teljes körű vizsgálatmenetek lefolytatását követően meg kell határozni az agonista vizsgálat EC₁₀, EC₅₀, PC₁₀ és PC₅₀ értéket, valamint a maximális indukciót (TC_{xmax}). Antagonista vizsgálat esetében az IC₂₀, IC₅₀, PC₈₀ és PC₅₀ értéket, valamint a maximális indukciót (TC_{xmax}) kell kiszámolni. E paraméterek grafikus ábrázolása látható a 3. ábrán (agonista vizsgálat) és 4. ábrán (antagonista vizsgálat). A szükséges paraméterek kiszámítása az egyes vizsgálati vegyi anyagok relatív (a 100 %-nak vett referenciaszabvány maximális indukciójához viszonyított) indukcióján alapul. Az adatok értékeléséhez nem lineáris regressziót (változó meredekség 4 paraméter alapján) kell alkalmazni, az alábbi egyenlet szerint:

$$Y = \text{Görbe alja} + \frac{(\text{Görbe teteje} - \text{Görbe alja})}{(1 + 10^{((\lg EC_{50} - X) * \text{Hill-meredekség}))}}$$

ahol:

X = a dózis vagy a koncentráció logaritmusa

Y = válasz (relatív indukció (%))

Görbe teteje = maximális indukció (%)

Görbe alja = minimális indukció (%)

LogEC₅₀ = annak a koncentrációnak a logaritmusa, amely a maximális válasz 50 %-át idézi elő

Hill-meredekség = a Hill-meredekség meredekségi tényezője

57. A luminométer által szolgáltatott, relatív fényegységekben (RLU) kifejezett nyers adatokat át kell vezetni az elővizsgálat és a teljes körű vizsgálatmenetek adatelemzése céljára létrehozott táblázatsablonba. A nyers adatoknak meg kell felelniük a 3A és 3B táblázatban (agonista vizsgálat) vagy a 4A és 4B táblázatban (antagonista vizsgálat) feltüntetett elfogadhatósági kritériumoknak. Amennyiben a nyers adatok megfelelnek az elfogadhatósági kritériumoknak, az alábbi kalkulációs lépéseken keresztül meg kell határozni a szükséges paramétereket:

Agonista vizsgálat

- Az egyes referenciaszabványok nyers adatainak elemzéséből származó eredményből vonjuk ki a referenciaszabvány oldószeres kontrolljának átlagos RLU-értékét.
- Az egyes vizsgálati vegyi anyagok nyers adatainak elemzéséből származó eredményből vonjuk ki a vizsgálati vegyi anyag oldószeres kontrolljának átlagos RLU-értékét.
- Számítsuk ki a referenciaszabvány egyes koncentrációértékeinek relatív indukcióját. Határozzuk meg 100 %-ként a referenciaszabvány legmagasabb koncentrációjának indukcióját.
- Számítsuk ki a vizsgálati vegyi anyagok egyes koncentrációinak a referenciaszabvány 100 %-nak vett legnagyobb koncentrációjához viszonyított, relatív indukcióját.
- Értékeljük az analízis eredményeit nem lineáris regresszió technikájával (változó meredekség, 4 paraméter).
- Határozzuk meg a referenciaszabvány EC_{50} és EC_{10} értékét.
- Határozzuk meg a vizsgálati vegyi anyagok EC_{50} és EC_{10} értékét.
- Határozzuk meg a vizsgálati vegyi anyagok maximális relatív indukcióját (TC_{max}).
- Határozzuk meg a vizsgálati vegyi anyagok PC_{10} és PC_{50} értékét.

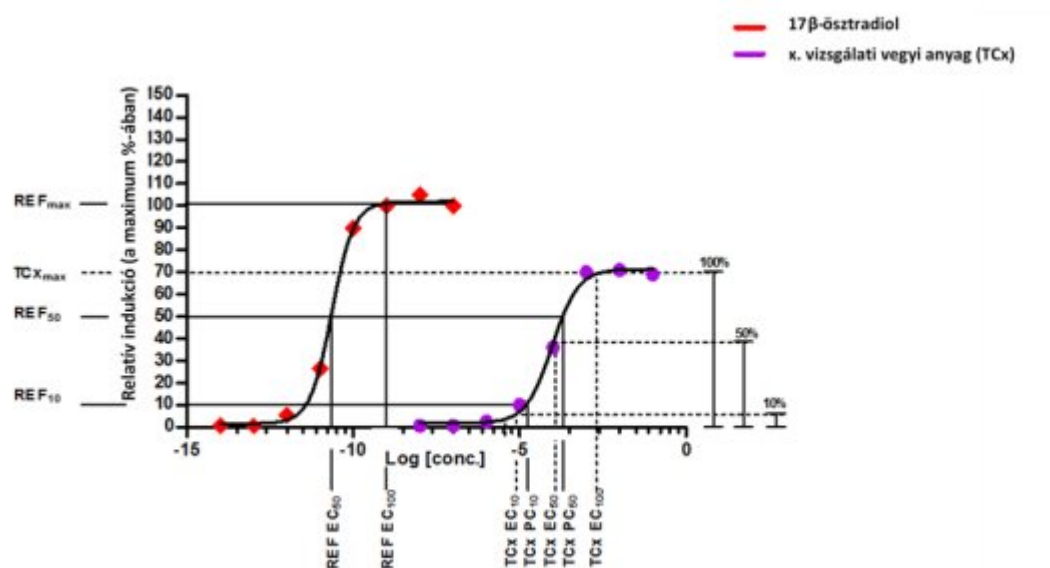
A vizsgálati vegyi anyagok esetében citotoxicitás vagy oldhatósági problémák miatt nem mindig hozható létre teljes dózis-válasz görbe. Ekkor nem lehet meghatározni az EC_{50} , EC_{10} és PC_{50} értékét. Ilyen esetben csak a PC_{10} és TC_{max} értéke határozható meg.

Antagonista vizsgálat

- Az egyes referenciaszabványok nyers adatainak elemzéséből származó eredményből vonjuk ki a referenciaszabvány legnagyobb koncentrációjának átlagos RLU-értékét.
- Az egyes vizsgálati vegyi anyagok nyers adatainak elemzéséből származó eredményből vonjuk ki a referenciaszabvány legnagyobb koncentrációjának átlagos RLU-értékét.
- Számítsuk ki a referenciaszabvány egyes koncentrációértékeinek relatív indukcióját. Határozzuk meg 100 %-ként a referenciaszabvány legalacsonyabb koncentrációjának indukcióját.
- Számítsuk ki a vizsgálati vegyi anyagok egyes koncentrációinak a referenciaszabvány 100 %-nak vett legalacsonyabb koncentrációjához viszonyított, relatív indukcióját.
- Értékeljük az analízis eredményeit nem lineáris regresszió technikájával (változó meredekség, 4 paraméter).
- Határozzuk meg a referenciaszabvány IC_{50} és IC_{20} értékét.
- Határozzuk meg a vizsgálati vegyi anyagok IC_{50} és IC_{20} értékét.
- Határozzuk meg a vizsgálati vegyi anyagok minimális relatív indukcióját (TC_{min}).

- Határozzuk meg a vizsgálati vegyi anyagok PC_{80} és PC_{50} értékét.

3. ábra: Az agonista vizsgálatban meghatározott paraméterek áttekintése



EC_{10} = egy anyag azon koncentrációja, amely a maximális válaszábanak 10 %-át váltja ki.

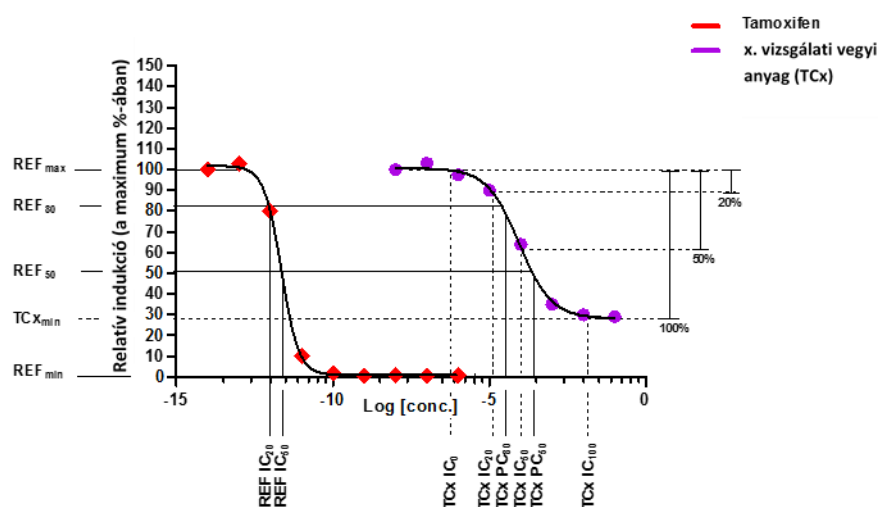
EC_{50} = egy anyag azon koncentrációja, amely a maximális válaszábanak 50%-át váltja ki.

PC_{10} = egy vizsgálati vegyi anyag azon koncentrációja, amely a referenciaszabvány EC_{10} értékével megegyező választ vált ki.

PC_{50} = egy vizsgálati vegyi anyag azon koncentrációja, amely a referenciaszabvány EC_{50} értékével megegyező választ vált ki.

TCx_{max} = a vizsgálati vegyi anyag maximális relatív indukciója.

4. ábra: Az antagonistista vizsgálatban meghatározott paraméterek áttekintése



IC₂₀ = egy anyag azon koncentrációja, amely a maximális válaszábanak 80 %-át váltja ki (20 %-os gátlást idéz elő).

IC₅₀ = egy anyag azon koncentrációja, amely a maximális válaszábanak 50%-át váltja ki (50%-os gátlást idéz elő).

PC₈₀ = egy vizsgálati vegyi anyag azon koncentrációja, amely a referenciaszabvány IC₂₀ értékével megegyező választ vált ki.

PC₅₀ = egy vizsgálati vegyi anyag azon koncentrációja, amely a referenciaszabvány IC₅₀ értékével megegyező választ vált ki.

TC_{xmin} = a vizsgálati vegyi anyag minimális relatív indukciója.

A vizsgálati vegyi anyagok esetében citotoxicitás vagy oldhatósági problémák miatt nem mindig hozható létre teljes dózis-válasz görbe. Ekkor nem lehet meghatározni az IC₅₀, IC₂₀ és PC₅₀ értékét. Ilyen esetben csak a PC₂₀ és TC_{min} értéke határozható meg.

58. Az eredményeknek két (vagy három) független vizsgálatmeneten kell alapulniuk. Amennyiben két vizsgálatmenet összevethető, vagyis reprodukálható eredményeket ad, akkor harmadik vizsgálatmenetre nincs szükség. Az eredmények akkor elfogadhatók, ha:

- teljesülnek az elfogadhatósági kritériumok (e kritériumokat lásd a 14–22. pontban),
- megismételhetők.

Az adatok értelmezésének kritériumai

59. Az adatok értelmezéséhez és annak eldöntéséhez, hogy egy adott vizsgálati vegyi anyag pozitív vagy negatív besorolást kapjon, az alábbi kritériumokat kell figyelembe venni:

Agonista vizsgálat

Minden teljes körű vizsgálatmenet tekintetében valamely vizsgálati vegyi anyag az alábbi esetben tekinthető **pozitívnak**:

1. A TC_{max} megegyezik a referenciaszabvány maximális válaszábanak 10 %-ával (REF₁₀), vagy meghaladja azt.
2. A vizsgálati vegyi anyag legalább 2 egymást követő koncentrációja megegyezik az REF₁₀ értékével, vagy meghaladja azt.

Minden teljes körű vizsgálatmenet tekintetében valamely vizsgálati vegyi anyag az alábbi esetben tekinthető **negatívnak**:

1. A TC_{max} nem haladja meg a referenciaszabvány maximális válaszábanak 10 %-át (REF₁₀).
2. A vizsgálati vegyi anyag kevesebb mint két koncentrációja egyezik meg az REF₁₀ értékével, vagy haladja meg azt.

Antagonista vizsgálat

Minden teljes körű vizsgálatmenet tekintetében valamely vizsgálati vegyi anyag az alábbi esetben tekinthető **pozitívnak**:

1. A TC_{min} megegyezik a referenciaszabvány maximális válaszával (REF₈₀ = 20 %-os gátlás), vagy alacsonyabb annál.
2. A vizsgálati vegyi anyag legalább 2 egymást követő koncentrációja megegyezik az REF₈₀ értékével, vagy alacsonyabb annál.

Minden teljes körű vizsgálatmenet tekintetében valamely vizsgálati vegyi anyag az alábbi esetben tekinthető **negatívnak**:

1. A TC_{min} meghaladja a referenciaszabvány maximális válaszával (REF₈₀ = 20 % gátlás).
 2. A vizsgálati vegyi anyag legfeljebb egy koncentrációja egyezik meg az REF₈₀ értékével, vagy alacsonyabb annál.
60. Egy adott vizsgálati vegyi anyag pozitív válasza által előidézett hatás jellemzése érdekében a jelentésbe egyaránt bele kell foglalni a kiváltott hatás mértékét (agonista vizsgálatnál: TC_{max} ; antagonistá vizsgálatnál: TC_{min}) és a hatást előidéző koncentrációt (agonista vizsgálatnál: EC₁₀, EC₅₀, PC₁₀, PC₅₀; antagonistá vizsgálatnál: IC₂₀, IC₅₀, PC₈₀, PC₅₀).

VIZSGÁLATI JELENTÉS

61. Lásd „AZ ÖSZTROGÉNRECEPTOR TRANSZAKTIVÁCIÓS VIZSGÁLAT ÖSSZETEVŐI” című 20. pontot.

SZAKIRODALOM

- (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). Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs
- (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

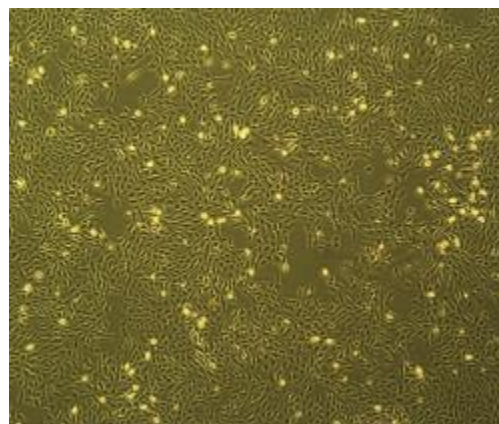
contamination in cell cultures by enzymatic detection of polymerase chain reaction (PCR) products. *J. Vet. Med. Sci.*, 57(4), 769-771.

- (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, the Netherlands.

4.1. függelék: A sejteletképesség vizuális megfigyelése

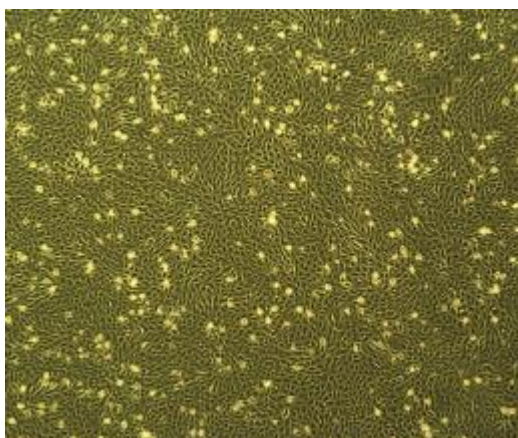


< 5 %-os konfluencia. A sejteket éppen most oltották át. 100 %-os sejteletképesség. Osztályozás: „nincs citotoxicitás”



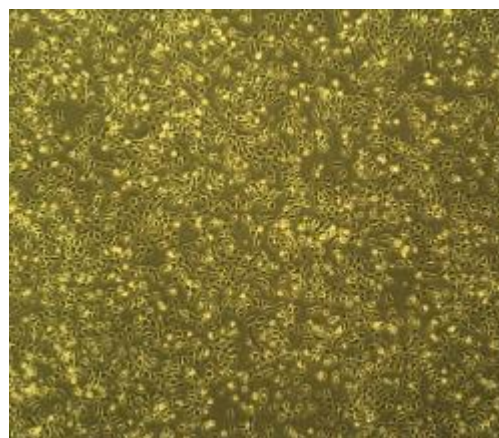
> 85 %-os konfluencia. A sejteket ebben a stádiumban kezelik a vizsgálati vegyi anyagokkal. > 95 %-os sejteletképesség.

Osztályozás: „nincs citotoxicitás”

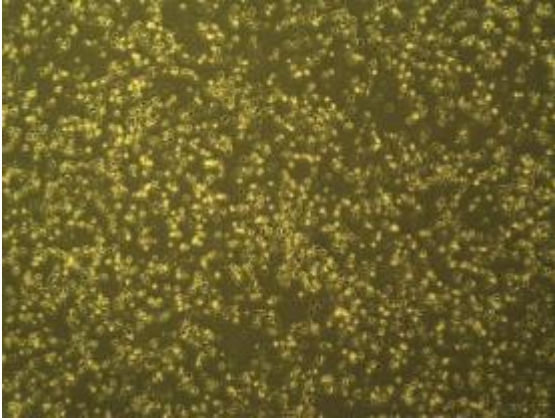


> 95%-os konfluencia. A sejtek sűrűn sorakoznak egymás mellett és kezdenek túlbujáznani. > 95 %-os sejteletképesség.

Osztályozás: „nincs citotoxicitás”



< 25 %-os sejteletképesség. A sejtek elválnak egymástól és a közöttük lévő kontaktus csökken. A sejtek kerek formát öltenek. Osztályozás: „citotoxicitás”



< 5 %-os sejtelétképesség. A sejtek teljesen elválnak egymástól és a közöttük lévő kontaktus megszűnik. A sejtek kerek formát öltenek. Osztályozás: „citotoxicitás”

B.67. EMLŐSSEJTEKEN TIMIDIN-KINÁZ GÉNNEL VÉGZETT *IN VITRO* GÉN MUTÁCIÓS VIZSGÁLATOK

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 490. vizsgálati iránymutatásával (2016). A vizsgálati módszereket a tudományos fejlődés, a szabályozási igények és az állatok kíméletének figyelembevételével rendszeresen felülvizsgálják és átdolgozzák. A timidin-kináz (TK) lókuszt alkalmazó egérlimfóma-vizsgálat (MLA) és TK6 vizsgálat eredetileg a B.17. vizsgálati módszer részét képezte. Később azonban a genotoxicitás vizsgálatával foglalkozó nemzetközi műhely (IWGT) MLA szakértői munkacsoportja az egérlimfóma-vizsgálat elfogadhatósági kritériumaira és adatainak értelmezésére vonatkozólag nemzetközi harmonizált ajánlásokat dolgozott ki (1) (2) (3) (4) (5), ezeket az ajánlásokat foglalja magában ez az új, B.67. vizsgálati módszer. Ez a vizsgálati módszer az egérlimfóma-vizsgálathoz készült, és mivel timidin-kináz lókuszt alkalmaz, a TK6 vizsgálatra is érvényes. Az egérlimfóma-vizsgálatot széles körben alkalmazzák szabályozási célból, a TK6 vizsgálatot viszont sokkal ritkábban. Megjegyzendő, hogy a végpontok hasonlósága ellenére a két sejtvonal nem helyettesíthető egymással, ezért a szabályozási programok adott szabályozási célra jogosan részesítik előnyben az egyiket a másikkal szemben. Az MLA validálása például bizonyította, hogy a vizsgálat nem csupán a génmutáció észlelésére alkalmas, hanem a szerkezeti kromoszómakárosodást okozó vizsgálati vegyi anyagok kiszűrésére is. E vizsgálati módszer a genetikai toxikológiai vizsgálati módszerek sorozatának részét képezi. Az OECD kidolgozott egy, a genetikai toxikológiai vizsgálatokról tömör tájékoztatást nyújtó, az OECD genetikai toxikológiára vonatkozó vizsgálati iránymutatásainak közelmúltbeli változásait áttekintő dokumentumot (6).
2. Az emlőssejteken végzett *in vitro* génmutációs vizsgálatok célja a vegyi anyagok által előidézett génmutációk észlelése. Az ezekben a vizsgálatokban használt sejtvonalak forward (előremutató) mutációkat mérnek riportergénekben, konkrétan az endogén timidin-kináz génben (*TK* emberi sejtekben és *Tk* rágsálók sejtekben, e vizsgálati módszer keretében együttes megnevezésük *TK*). Ezt a vizsgálati módszert két sejtvonal használatára tervezték: az egyik az L5178Y TK^{+/−}-3.7.2C egérlimfóma-sejtvonal (általános nevén az L5178Y), a másik a TK6-os humán limfoblasztoid sejtvonal (elterjedt nevén a TK6). Bár a két sejtvonal eredetét, sejtnövekedését, p53 státuszát stb. tekintve különbözik egymástól, a *TK* génmutációs vizsgálatok hasonló módon végezhetők el mindkét sejttípusban, a vizsgálati módszerben leírtak szerint.

3. A timidin-kináz gén autoszomális és heterozigóta jellege lehetővé teszi, hogy a $TK^{+/-}$ > $TK^{-/-}$ mutációt követően észlelni lehessen a timidin-kináz enzimmel nem rendelkező sejtekből álló életképes telepeket. Az enzimhiányt okozhatják a TK gént érintő genetikai események, amelyek lehetnek génmutációk (pontmutációk, a leolvasási keret eltolódása, kisebb deléciók stb.) és kromoszomális események (nagy deléciók, kromoszóma-átrendeződések és mitotikus rekombináció). Ez utóbbi események a heterozigótaság elvesztését okozhatják, ami a humán tumorgenezisben szerepet játszó tumorszupresszor gének gyakori genetikai változása. Az egérlimfóma-vizsgálat elvileg képes detektálni a *TK* gént hordozó teljes kromoszóma magorsókárosodásból és/vagy mitotikus nondisziunkcióból fakadó elvesztését. A citogenetikus és a molekuláris analízis együttes alkalmazása egyértelműen mutatja, hogy az egérlimfóma-vizsgálat timidin-kináz mutánsainak egy része nondisziunkcióval jött létre. A bizonyítékok súlyozása azonban arra utal, hogy a TK génmutációs vizsgálatok a standard (e vizsgálati módszerben ismertett) citotoxicitási kritériumok alkalmazásával nem képesek megbízhatóan kimutatni aneugéneket, ezért ezek a vizsgálatok aneugének észlelésére nem megfelelők (7) (8) (9).
4. A TK génmutációs vizsgálatokban a timidin-kináz mutánsok két eltérő fenotípus csoportba oszthatók: a normális növekedési sebességű mutánsok, amelyek a heterozigóta timidin-kináz sejtekkel megegyező ütemben növekednek, és a lassan nöövő mutánsok, amelyeknek hosszabb a generációs ideje. A normális növekedési sebességű és a lassan nöövő mutánsokat az egérlimfóma-vizsgálatban nagy és kis telepmutánsokként, a TK6 vizsgálatban pedig gyorsan és lassan megjelenő telepmutánsokként tartják számon. Az egérlimfóma-vizsgálat nagy és kis telepmutánsainak molekuláris és citogenetikus természetét már részletesen feltárták (8) (10) (11) (12) (13). A TK6 vizsgálat gyorsan és lassan megjelenő mutánsainak molekuláris és citogenetikus természetét is széles körű vizsgálatnak vetették alá (14) (15) (16) (17). Mindkét sejtípus lassan nöövő mutánsait genetikai károsodás érte, amely a TK lókuszt közelében elhelyezkedő, feltételezhetően növekedést szabályozó gén(ek)e)t érinti, és amely kiváltja a megduplázódási idő elhúzóódását, azaz a lassan megjelenő vagy kis telepek létrejöttét (18). A lassan nöövő mutánsok megjelenését alapvető szerkezeti kromoszóma-rendellenességeket előidéző vegyi anyagokkal hozták összefüggésbe. Azok a sejtek, amelyeknél a mutáció nem érinti a TK lókuszt közelében elhelyezkedő, feltételezhetően növekedést szabályozó gén(ek)e)t, a szülői sejtekhez hasonló ütemben nőnek és normális sebességgel nöövő mutánsokká válnak. A kezdetben normális növekedési sebességű mutánsoknál a vegyi anyagok elsődlegesen pontmutációkat okozó mutagének. Ebből következően mind a lassan nöövő, mind a normális növekedési sebességű mutánsokat meg kell számolni ahhoz, hogy számba vehessék az összes mutánst, és támpontokat lehessen szerezni arra

nézve, hogy a vizsgálati vegyi anyag milyen típusú károsodás(oka)t idéz elő (mutagén vs. klasztogén) (10) (12) (18) (19).

5. A vizsgálati iránymutatáshoz kapcsolódó vizsgálati módszert úgy építették fel, hogy egyaránt biztosítson mindkét vizsgálatra (egérlimfóma-vizsgálat és TK6) érvényes általános információkat, és egyedi iránymutatást az egyes vizsgálatokhoz.
6. Az alkalmazott fogalommeghatározások az 1. függelékben találhatók.

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

7. Az *in vitro* végrehajtott vizsgálatok rendszerint külső forrásból származó metabolikus aktiválás használatát teszik szükségessé. Az exogén metabolikus aktivációs rendszer nem utánozza teljesen az *in vivo* körülményeket.
8. Ügyelni kell arra, hogy ne álljanak elő olyan körülmények, amelyek álpozitív – tehát nem a vizsgálati vegyi anyag és a sejt genetikai anyagának kölcsönhatásából származó – eredményhez (hanem a vizsgálati rendszerrel való esetleges kölcsönhatáshoz) vezethetnének; ilyen körülmény többek között a pH-érték vagy az ozmolalitás változása, a tápfolyadék összetevőivel való kölcsönhatás (20) (21) vagy a túlzott mértékű citotoxicitás (22) (23) (24). Az egérlimfóma-vizsgálat és a TK6 vizsgálat szempontjából a 28. pontban meghatározott, ajánlott citotoxicitási felső határértékeket meghaladó citotoxicitás minősül túlzott mértékűnek. Emellett a timidin bázisanalóg, vagy timidin bázisanalógnaként viselkedő vizsgálati vegyi anyagok növelhetik a mutánsok gyakoriságát azáltal, hogy a sejtkezelés alatt elősegítik a spontán háttérmutánsok szelektív növekedését, így a megfelelő értékelés biztosítása érdekében további vizsgálati módszerek használatát teszik szükségessé (25).
9. A mesterséges nanoanyagok esetében e vizsgálati módszer egyedi adaptálására lehet szükség, amelyet azonban ez a vizsgálati módszer nem ismertet.
10. E vizsgálati módszer tervezett szabályozási célt szolgáló adatgenerálás érdekében, keveréken történő alkalmazása előtt meg kell vizsgálni, hogy az megfelelő eredményeket biztosíthat-e erre a célra, és ha igen, miért. Ilyen megfontolások nem szükségesek, ha létezik a keverék vizsgálatára vonatkozó szabályozási követelmény.
11. Azok a mutáns sejtek, amelyek a $TK^{+/-} > TK^{-/-}$ mutáció miatt nem mutatnak timidinkináz-enzimaktivitást, rezisztensek a pirimidin bázisanalóg trifluoro-timidin (TFT) citotoxikus hatásaival szemben. A *TK* proficiens sejtek érzékenyek a TFT-re, ami a celluláris metabolizmus gátlását okozza, és megállítja a további sejtosztódást. Így tehát a mutáns sejtek TFT jelenlétében képesek sejtburjánzásra és látható telepek létrehozására, míg a timidin-kinázt tartalmazó sejtek nem képesek erre.

A VIZSGÁLAT ELVE

12. Szuszpenzióban növvő sejteket megfelelő időtartamig (lásd a 33. pontot) külső forrásból származó metabolikus aktivációval és anélkül (lásd a 19. pontot) kezelik a vizsgálati vegyi anyaggal, majd a sejt kultúrát átültetik, hogy meghatározzák a citotoxicitást és lehetővé tegyék a fenotípus expressziót a mutáns kiválasztása előtt. A citotoxicitást az egérlimfóma-vizsgálat esetében a relatív teljes növekedés (RTG – lásd a 25. pontot), a TK6 esetében pedig a relatív túlélés (RS – lásd a 26. pontot) alapján határozzák meg. A kezelt tenyészeteket tápoldatban tartják, az egyes sejt típusokra jellemző megfelelő ideig (lásd a 37. pontot), hogy lehetővé váljon az indukált mutációk közel optimális fenotípus expressziója. A fenotípus expressziót követően a mutációs gyakoriságot úgy határozzák meg, hogy leültetnek ismert számú sejtet a szelekciós ágenszt tartalmazó tápoldatba a mutáns telepek kimutatására, valamint a szelekciós ágenszt nem tartalmazó tápoldatba a kolóniaképző képesség (életképesség) meghatározására. Megfelelő inkubációs idő után megszámlálják a telepeket. A mutációs gyakoriság kiszámításának alapja a mutáns telepek száma, kiigazítva a mutáns kiválasztásának idején mért kolóniaképző képességgel.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Előkészületek

Sejtek

13. Az egérlimfóma-vizsgálat esetén: Mivel az egérlimfóma-vizsgálat kidolgozását és jellemzését az L5178Y sejtek $TK^{+/-}$ -3.7.2C alvonalára alapozták, az egérlimfóma-vizsgálathoz ezt az alvonalat kell használni. Az L5178Y sejt vonal a DBA/2 egér vonalból származó, metilkolantrénnel indukált csecsemőmirigy limfómából származik (26). Clive és munkatársai az L5178Y (Clive-féle jelöléssel $TK^{+/+}$ -3) sejteket etil-metán-szulfonáttal kezelték, majd bróm-dezoxiuridint szelekciós ágensként használva izolálták a $TK^{-/-}$ (Clive-féle jelöléssel $TK^{-/-}$ -3.7) klónt. A $TK^{-/-}$ klónból egy spontán keletkezett $TK^{+/-}$ klónt (Clive-féle jelöléssel $TK^{+/-}$ -3.7.2.) és egy alklónt (Clive-féle jelöléssel $TK^{+/-}$ -3.7.2C) izoláltak és jellemeztek az egérlimfóma-vizsgálathoz (27). A sejt vonal kariotípusát közzétették (28) (29) (30) (31). Modális kromoszómaszáma 40. A sejt vonal tartalmaz egy metacentrikus kromoszómát (t12;13), amely egy kromoszómának tekintendő. Az egér timidin-kináz lókusza a 11. kromoszóma távoli végén helyezkedik el. Az L5178Y $TK^{+/-}$ -3.7.2C sejt vonal mindkét p53 allélján mutáció figyelhető meg, és mutáns p53 fehérjét hoz létre (32) (33). Valószínűleg a $TK^{+/-}$ -3.7.2C sejt vonal p53 státusza felelős azért, hogy a vizsgálat képes észlelni a nagymérvű károsodásokat (17).
14. A TK6 esetében A TK6 egy humán limfoblasztoid sejt vonal. A kiinduló sejt vonal egy Epstein-Barr vírussal transzformált sejt vonal, a WI-L2, amely eredetileg egy örökletes

szferocitózisban szenvedő 5 éves fiútól származik. A sejtvonal első izolált klónját, a HH4-et ICR191-gyel mutagenizálták, majd létrehozták a heterozigóta timidin-kináz sejtvonalat, a TK6-ot (34). A TK6 sejtek szinte diploid állapotúak, kromoszómakészletük jellemzői a következők: 47, XY, 13+, t(14; 20), t(3; 21) (35). A humán timidin-kináz lókusza a 17. kromoszóma hosszú karján helyezkedik el. A TK6 p53-kompetens sejtvonal, mivel mindkét allélon vad típusú p53-szekvenciával rendelkezik, és csak vad típusú p53 fehérjét fejez ki (36).

15. Mind az egér-limfóma, mind a TK6 vizsgálatra érvényes, hogy az induló sejt-készlet létrehozása vagy lefagyasztása előtt ajánlatos a laboratóriumnak meggyőződnie a sejtek mikoplazmafertőzés-mentességéről, meghatározni a sejtek kariotípusát vagy megfestenie azokat a kromoszómákat, amelyek a timidin-kináz lókuszt hordozzák és ellenőriznie a sejtpopuláció megduplázódási idejét. A laboratóriumban használt sejteknél meg kell állapítani a normál sejtciklus-időtartamot, és annak összhangban kell lennie a publikált jellemzőkkel (16) (19) (37). A mester törzskészletet -150 °C-on vagy az alatti hőmérsékleten kell tárolni, és minden munkakészletet ebből kell elkészíteni.
16. Nagy mennyiségű fagyasztott munkakészlet létrehozását megelőzően, vagy közvetlenül a munkakészletek kísérleti felhasználása előtt szükség lehet arra, hogy a tenyészetet megtisztítsák a jelen lévő mutáns sejtektől [kivéve, ha az oldószeres kontroll mutációs gyakorisága (MF) már az elfogadható tartományon belül van – lásd az egérlimfóma-vizsgálat 2. táblázatát)]. Ehhez metotrexáttal (aminopterinnel) szelektálják a timidinkináz-hiányos sejteket, majd timidint, hipoxantint és glicint (L5178Y) vagy 2'-deoxicitidint (TK6) adagolnak a sejt-kultúrához, hogy biztosítsák a TK-kompetens sejtek (19) (38) (39) és a TK6 (40) optimális növekedését. A sejtenyészetek fenntartásához általános gyakorlati tanácsok, valamint konkrétan az L5178Y és a TK6 sejtekre vonatkozó tanácsok a (19) (31) (37) (39) (41) szakirodalmi hivatkozásban találhatók. Azoknak a laboratóriumoknak, amelyek mester törzskészletet igényelnek az egérlimfóma- vagy a TK6 vizsgálat elvégzéséhez, illetve új törzskészletet kívánnak beszerezni, rendelkezésére áll egy megfelelően jellemzett sejteket tartalmazó törzsgyűjtemény (37).

Tápfolyadék és tenyésztési körülmények

17. Mindkét vizsgálatban megfelelő tápfolyadékot és inkubációs feltételeket kell biztosítani a tenyészetek fenntartásához (pl. tenyésztőedények, 5 %-os CO₂-koncentrációjú, vízgőzzel telített levegő és 37 °C-os inkubációs hőmérséklet). A sejtenyészeteket mindig olyan körülmények között kell tartani, amelyek biztosítják az exponenciális növekedési szakaszt. Különösen fontos, hogy a tápfolyadékot és a tenyésztési körülményeket úgy válasszák meg, hogy azok biztosítsák az optimális növekedési feltételeket az expressziós időszak alatt, és mind a mutáns, mind a vad

típusú sejtvonalak kolóniaképző készsége optimális legyen. Az egérlimfóma- és a TK6 vizsgálatban egyaránt fontos az is, hogy a tenyésztési körülmények biztosítsák mind a nagy telepmutások/gyorsan megjelenő timidin kináz mutánsok, mind a kis telepmutások/lassan megjelenő timidin kináz mutánsok optimális fejlődését. A sejttenyésztés további részleteiről – egyebek mellett a lószérum megfelelő iválásának szükségességéről, ha a mutánsok kiválasztása során RPMI tápfolyadékot használnak – a (19) (31) (38) (39) (40) (42) szakirodalmi hivatkozás nyújt tájékoztatást.

A tenyészetek előkészítése

18. A sejteket tárolt törzskultúrákból indítva tápfolyadékba oltják le olyan sejtszámmal, hogy a szuszpenzióban növő sejtek a teljes kezelési és expressziós időszakban exponenciálisan növekedjenek.

Metabolikus aktiválás

19. L5178Y és TK6 sejtek használata esetén exogén metabolikus aktivációs rendszereket kell alkalmazni, mivel ezek a sejtek nem rendelkeznek megfelelő endogén metabolikus képességgel. Amennyiben az ettől való eltérés nem indokolt, az alapértelmezetten ajánlott, legáltalánosabban használt rendszer a rágcslók (általában patkányok) enziminduktorral (ilyen például az Aroclor 1254 (43) (44) (45) vagy fenobarbitál és β -naftoflavon kombinációjával (46) (47) (48) (49) (50) (51)) kezelt májából preparált, kofaktor-kiegészítésű posztnitokondriális frakció (S9). Ez utóbbi kombináció nem ütközik a környezetben tartósan megmaradó szerves szennyező anyagokról szóló stockholmi egyezményrel (52), és kiderült róla, hogy olyan hatékony, mint az Aroclor 1254 a vegyes funkciójú oxidázok indukálásához (45) (46) (47) (48) (49). Az S9 frakció jellemzően 1–2 térfogatszázalék koncentrációban használatos, de a végső vizsgálati tápfolyadékban mennyisége 10 térfogatszázalékra növelhető. Az alkalmazott exogén metabolikus aktivációs rendszer vagy metabolikus induktor típusának és koncentrációjának megválasztását befolyásolhatja a vizsgálati vegyi anyagok osztálya.

A vizsgálati vegyi anyagok előkészítése

20. A szilárd halmazállapotú vizsgálati vegyi anyagokat a sejtek kezelése előtt megfelelő oldószerrel elő kell kezelni, és szükség esetén hígítani kell (lásd a 21. pontot). A folyékony halmazállapotú vizsgálati vegyi anyagok közvetlenül hozzáadhatók a vizsgálati rendszerhez és/vagy hígíthatók a vizsgálati rendszer kezelése előtt. A gáz halmazállapotú vagy illékony vizsgálati vegyi anyagokat a standard protokollok megfelelő módosításával, például légmentesen lezárt tenyésztőedényekben történő kezeléssel kell vizsgálni (53) (54) (55). A vizsgálati vegyi anyagot tartalmazó készítményeket közvetlenül a kezelés előtt kell előállítani, kivéve, ha a stabilitási adatok a tárolhatóságot bizonyítják.

VIZSGÁLATI KÖRÜLMÉNYEK

Oldószerek

21. Az oldószert oly módon kell kiválasztani, hogy optimális oldhatóságot biztosítson a vizsgálati vegyi anyagnak, ugyanakkor ne befolyásolja hátrányosan a vizsgálat lebonyolítását, vagyis ne változtassa meg a sejtek növekedését, ne befolyásolja a vizsgálati vegyi anyag integritását, ne lépjen reakcióba a tenyésztőedénnyel, és ne károsítsa a metabolikus aktivációs rendszert. Amennyiben lehetséges, először valamilyen vizes oldószer (vagy tápfolyadék) használatát érdemes megfontolni. Jól bevált oldószer a víz vagy a dimetil-szulfoxid. A végleges kezelési közegben a szerves oldószerek koncentrációja általában ne haladja meg az 1 térfogatszázalékot, a vizes oldószereké (só oldat vagy víz) pedig a 10 térfogatszázalékot. A jól bevált szerves oldószerektől eltérő oldószerek (például etanol vagy acetone) használatakor a vizsgálati vegyi anyaggal és a vizsgálati rendszerrel való összeegyeztethetőségükre utaló adatokkal kell alátámasztani használatukat, és azt, hogy a használt koncentrációnál nem genotoxikusak. Alátámasztó adatok hiányában szükséges nem kezelt kontrollok alkalmazása (lásd a fogalommeghatározásokat az 1. függelékben) annak bizonyítására, hogy a kiválasztott oldószer nem vált ki káros vagy mutagén hatást.

A CITOTOXICITÁS MÉRÉSE ÉS A KEZELÉS SORÁN ALKALMAZOTT KONCENTRÁCIÓSZINTEK KIVÁLASZTÁSA

22. A vizsgálati vegyi anyag legmagasabb koncentrációjának meghatározása során kerülendő az olyan koncentráció, amely hamis pozitív válaszreakciókat válthat ki, ilyen a túlzott citotoxicitást okozó koncentráció (lásd a 28. pontot), a tápfolyadékban történő kicsapódást okozó koncentráció (lásd a 29. pontot), illetve a pH vagy az ozmolalitás jelentős változását okozó koncentráció (lásd a 8. pontot). Ha a vizsgálati vegyi anyag a hozzáadásakor jelentős változást okoz a tápfolyadék pH-jában, a pH a kezelésre szolgáló végleges tápfolyadék pufferelésével kiigazítható, hogy elkerülhetők legyenek a hamis pozitív eredmények és megfelelő tenyésztési feltételeket lehessen fenntartani.
23. A koncentráció kiválasztása a citotoxicitás és egyéb megfontolások alapján történik (lásd a 27–30. pontot). Bár a fő vizsgálatban alkalmazandó koncentrációk jobb meghatározásához egy előzetes vizsgálatban érdemes meghatározni a citotoxicitást, az előzetes vizsgálat nem követelmény. Még ha sor is kerül a citotoxicitás előzetes meghatározására, a fő vizsgálat során minden kultúrára el kell végezni a citotoxicitás mérését. Amennyiben koncentrációtartomány-behatároló kísérletet végeznek, a kísérletnek le kell fednie a koncentrációk széles körét, a kísérlet pedig lezárható a kezelést követő 1. napon, vagy folytatható a 2. napon történő expresszióig és a

mutánsok kiválasztásáig (ha bebizonyosodik, hogy a használt koncentrációértékek megfelelőek).

24. A citotoxicitást minden vizsgálati és kontrollként szolgáló sejtkultúra esetében meg kell határozni: az egérlimfóma- (2) és a TK6 (15) vizsgálatban alkalmazott módszert a nemzetközileg elfogadott gyakorlat alapján dolgozták ki.
25. Az egérlimfóma-vizsgálat esetében mind az agarlemezen, mind a mikrotiterlemezen való tenyésztés során a citotoxicitást a relatív teljes növekedés (RTG) alapján kell értékelni, amelyet eredetileg Clive és Spector határozott meg 1975-ben (2). Ez a mérés magában foglalja a sejtek kezelése során tapasztalt relatív szuszpenziós növekedést (RSG: a vizsgálati kultúra összevetése az oldószeres kontrollal), az expressziós időt és a mutánsok kiválasztásának idején megfigyelt relatív kolóniaképző képességet (RCE: a vizsgálati kultúra összevetése az oldószeres kontrollal) (2). Megjegyzendő, hogy a relatív szuszpenziós növekedés számol a vizsgálati kultúrában a kezelés alatt bekövetkezett sejtpusztulással (a képletet lásd a 2. függelékben).
26. A TK6 esetében a citotoxicitást a relatív túlélés alapján kell értékelni, ami a közvetlenül a kezelést követően leültetett sejtek kolóniaképző képessége, kiigazítva a kezelés során végbement sejtpusztulással, majd a kapott sejtszám összevetve a negatív kontrollal (amelynek túlélési aránya 100 %-nak tekintendő) (a képletet lásd a 2. mellékletben).
27. Legalább négy, az elfogadhatósági kritériumokat (megfelelő citotoxicitás, sejtszám stb.) teljesítő kísérleti koncentráció eredményét kell értékelni (az oldószeres és a pozitív kontrollokon túl). Bár két párhuzamos tenyészet használata ajánlott, az egyes vizsgált koncentrációknál párhuzamos vagy szimpla kezelt tenyészetek használhatók. A párhuzamos tenyészetekben adott koncentráció mellett kapott eredményeket külön kell dokumentálni, az adatelemzéshez azonban összevonhatók (55). Az alacsony citotoxicitást vagy a citotoxicitás hiányát mutató vizsgálati vegyi anyagok esetében rendszerint megközelítőleg kétszeres-háromszoros koncentrációs intervallumok helyénvalóak. Citotoxicitás esetén olyan koncentrációkat kell választani, amelyek lefedik a 28. pontban ismertetett, citotoxicitást okozó koncentrációtól azokig a koncentrációkig terjedő tartományt, ahol mérsékelt vagy alacsony a citotoxicitás, illetve nem jelentkezik citotoxicitás. Számos vizsgálati vegyi anyagnak meredek a koncentráció-válasz görbéje, és annak érdekében, hogy a citotoxicitás teljes tartományát le lehessen fedni, vagy részletesen meg lehessen vizsgálni a koncentráció-válasz összefüggést, szükség lehet egymáshoz közelebbi koncentrációk és négynél több koncentráció használatára, különösen olyan helyzetekben, ahol megismételt kísérlet szükséges (lásd a 70. pontot). Négynél több koncentráció alkalmazásának különösen egyedi tenyészet alkalmazása esetében lehet jelentősége.

28. Ha a legnagyobb koncentráció a citotoxicitáson alapul, a legmagasabb koncentrációval 10 és 20 % közötti relatív teljes növekedést kell megelőzni az egérlimfóma-vizsgálat, és 10 és 20 % közötti relatív túlélést a TK6 vizsgálat esetén (67. pont).
29. A legalacsonyabb oldhatatlan koncentrációnál alacsonyabb koncentrációk mellett nem citotoxikus, nehezen oldható vizsgálati vegyi anyagok esetében a legmagasabb analizált koncentrációnak a vizsgálati vegyi anyaggal történő kezelés végén szemmel vagy inverz mikroszkóp segítségével látható zavarosságot vagy kicsapódást kell okoznia. Még abban az esetben is, ha citotoxicitás a legalacsonyabb oldhatatlan koncentráció felett jön létre, ajánlatos egyetlen egy, zavarosságot vagy látható kicsapódást okozó koncentrációt vizsgálni, mivel a kicsapódás fals hatásokat eredményezhet. Mivel az egérlimfóma- és a TK6 vizsgálat szuszpenzióban növekvő kultúrákat használ, különösen ügyelni kell annak biztosítására, hogy a kicsapódás ne zavarja a vizsgálat lebonyolítását. Hasznos lehet emellett a tápfolyadékban való oldhatóság meghatározása a kísérlet előtt.
30. Ha nem figyelhető meg kicsapódás vagy korlátozó citotoxicitás, a legmagasabb vizsgálati koncentrációnak 10 mM-nek, 2 mg/ml-nek vagy 2 µl/ml-nek kell megfelelnie, melyek közül a legalacsonyabb a mérvadó (57) (58). Ha a vizsgálati vegyi anyag nem meghatározott összetételű, például ismeretlen vagy változó összetételű anyag, komplex reakciótermék vagy biológiai anyag [vagyis úgynevezett ismeretlen vagy változó összetételű vegyi anyag (UVCB)], környezeti extraktum stb., előfordulhat, hogy kellő citotoxicitás hiányában a legmagasabb koncentrációnak magasabbnak (például 5 mg/ml-nek) kell lennie ahhoz, hogy növekedjen az egyes összetevők koncentrációja. Megjegyzendő azonban, hogy ezek a követelmények eltérőek lehetnek a humán gyógyszerek esetében (59).

Kontrollok

31. Minden kísérleti körülménynél párhuzamos negatív kontrollokat kell használni (lásd a 21. pontot), amelyeknél csak oldószert alkalmaznak a kezelt közegben, és a kezelésük ugyanolyan módon történik, mint a kezelt tenyészeteké.
32. Párhuzamos pozitív kontrollok szükségesek annak igazolására, hogy a laboratórium képes az alkalmazott vizsgálati protokoll feltételei mellett mutagének azonosítására, hogy (adott esetben) az exogén metabolikus aktivációs rendszer eredményes, továbbá hogy megfelelően detektálhatók mind a kis telepmutánsok/lassan megjelenő TK6-mutánsok, mind a nagy telepmutánsok/gyorsan megjelenő TK6-mutánsok. Pozitív kontrollokra vonatkozó példák az alábbi 1. táblázatban találhatók. Indokolt esetben pozitív kontrollként alternatív anyagok használhatók. Mivel az emlőssejtek genetikai toxicitás szempontjából metabolikus aktiválással és anélkül végzett *in vitro* vizsgálatait a párhuzamosan lefolytatott, azonos időtartamú, rövid távú (3–4 órá)

kezelések esetében kellően szabványosítottak, a pozitív kontrollok használata a metabolikus aktiválást igénylő mutagénekre korlátozódhat. Ebben az esetben egyetlen pozitív kontroll válaszreakciója a metabolikus aktiváló rendszer aktivitását és a vizsgálati rendszer reagálóképességét is bizonyítja. Hosszú távú (vagyis 24 órás, S9 nélküli) kezelés esetén azonban saját pozitív kontrollt kell végezni, mivel a kezelés időtartama eltér a metabolikus aktiválás alkalmazása mellett végzett vizsgálatétól. Mindegyik pozitív kontrollt egy vagy több olyan koncentrációban kell alkalmazni, amely a háttérértékekhez viszonyítva reprodukálható és kimutatható növekedést okoz, hogy bizonyítani lehessen a vizsgálati rendszer érzékenységét, és a választ nem veszélyeztetheti a vizsgálati módszerben meghatározott határértékeket meghaladó citotoxicitás (lásd a 28. pontot).

1. táblázat: A laboratóriumok jártasságának értékeléséhez és a pozitív kontrollok kiválasztásához ajánlott referenciaanyagok

Kategória	Anyag	CAS-szám
1. Metabolikus aktiválás nélkül is aktív mutagének		
Metil-metánszulfonát	66-27-3	
Mitomycin-C	50-07-7	
4-Nitro-kinolin-N-oxid	56-57-5	
2. Metabolikus aktiválást igénylő mutagének		
Benzo(a)pirén	50-32-8	
Ciklofoszfamid monohidrát	50-18-0 (6055-19-2)	
7,12-Dimetil-benz[a]antracén	57-97-6	
3-metilcolantrén	56-49-5	

ELJÁRÁS

Kezelés a vizsgálati vegyi anyaggal

33. A proliferáló sejteket metabolikus aktivációs rendszer jelenlétében és hiányában kezelik a vizsgálati vegyi anyaggal. Az expozíciónak megfelelő időtartamig kell tartania (ez rendszerint 3–4 óra). Megjegyzendő azonban, hogy ezek a követelmények eltérőek lehetnek a humán gyógyszerek esetében (59). Amennyiben az egérlimfóma-vizsgálatban a rövid távú kezelés negatív eredményre vezet, és léteznek a hosszabb kísérlet szükségességét alátámasztó adatok [pl. nukleozidanalógok, nehezen oldható vegyi anyagok esetében (5) (59)], fontolóra kell venni a vizsgálat hosszabb – vagyis 24 órás, S9 kiegészítők nélküli – kezeléssel járó elvégzését.

34. Az egyes vizsgálati (kontroll és kezelt) tenyészetekhez a vizsgálat bármely szakaszában alkalmazott minimális sejtszámnak a spontán mutációs gyakoriságon kell alapulnia. Az általános iránymutatás szerint minden kísérleti tenyészetben elegendő sejtet kell kezelni és passzálni ahhoz, hogy a vizsgálat minden szakaszában (kezelés, fenotípusos expresszió és mutánsok kiválasztása) előforduljon legalább 10, ideális esetben azonban 100 spontán mutáció (56).
35. Az egérlimfóma-vizsgálatban az ajánlott elfogadható spontán mutációs gyakoriság $35 \cdot 10^{-6}$ (agarlemezen) és $50 \cdot 10^{-6}$ (mikrotiterlemezen) között van (lásd a 2. táblázatot). Ahhoz, hogy minden vizsgálati sejt kultúrában legyen legalább 10, de ideális esetben 100, a kezelést túlélő spontán mutáns, legalább $6 \cdot 10^6$ sejt kezelése szükséges. Ilyen mennyiségű sejt kezelése, valamint a kifejeződés és a mutánsok kiválasztását lehetővé tévő kolóniaképzés során a megfelelő sejtszám fenntartása a kísérlet minden szakaszában garantálja a spontán mutánsok megfelelő számát (10 vagy több), még a 90 %-os citotoxicitást (vagyis 10 %-os relatív teljes növekedést) okozó koncentrációkkal kezelt tenyészetek esetében is (19) (38) (39).
36. A TK6 vizsgálatban a spontán mutációs gyakoriság rendszerint 2 és $10 \cdot 10^{-6}$ közé esik. Ahhoz, hogy minden sejt kultúrában legyen legalább 10, a kezelést túlélő spontán mutáns, legalább $20 \cdot 10^6$ sejt kezelése szükséges. Ilyen mennyiségű sejt kezelése még a 90 %-os citotoxicitást (10 %-os relatív túlélést) kiváltó koncentrációkkal kezelt tenyészetek esetében is megfelelő számú (10 vagy több) spontán mutánst biztosít. Emellett az expressziós időszak során elegendő számú sejtet kell tenyészteni, majd kiszéleszteni a mutánsok kiválasztásához (60).

A fenotípusos expresszió ideje, valamint a citotoxicitás és a mutációs gyakoriság mérése

37. A kezelési időszak végén a sejteket meghatározott – az egyes sejt vonalakra jellemző – ideig fenntartják, hogy lehetővé tegyék az újonnan indukált mutánsok fenotípusának közel optimális expresszióját. Az egérlimfóma-vizsgálatban a fenotípusos expressziós időszak 2 nap. A TK6 vizsgálatban a fenotípusos expressziós időszak 3–4 nap. 24 órás kezelési időszak esetén az expressziós időszak a kezelés végét követően veszi kezdetét.
38. A fenotípusos expressziós időszakban a sejteket naponta megszámlálják. Az egérlimfóma-vizsgálatban a naponta mért sejtszám alapján számítják ki a napi szuszpenziós növekedést (SG). A 2 napos expressziós időszakot követően a sejteket szuszpendálják szelekciós ágenst tartalmazó, illetve szelekciós ágens nélküli tápfolyadékban, hogy meghatározzák a mutánsok számát (a szelekciós lemezek) és a kolóniaképző képességet (az életképességet mérő lemezek). Az egérlimfóma-vizsgálatban két egyenértékű módszer létezik a mutánsok kiválasztását célzó kolóniaképzésre: az egyik lágyagar, a másik 96 lyukú lemezbe helyezett tápfolyadék

használatán alapul (19) (38) (39). A TK6 vizsgálatban a kolóniaképzés 96 lyukú lemezbe helyezett tápfolyadékban zajlik (16).

39. A trifluor-timidin (TFT) a timidin kináz mutánsok egyetlen ajánlott szelekciós ágense (61).
40. Az egérlimfóma-vizsgálatban az agarlemezeken és a mikrotiterlemezeken 10–12 napi inkubálást követően végzik el a számlálást. A TK6 vizsgálatban a mikrotiterlemezeken fejlődő telepeken 10–14 nap elteltével számlálják meg a gyorsan megjelenő mutánsokat. A lassan növekvő (lassan megjelenő) TK6-mutánsok kinyeréséhez a gyorsan megjelenő mutánsok számba vételét követően a sejtekhez ismét tápfolyadékot és TFT-t kell adni, majd a lemezeket további 7–10 napon keresztül inkubálni kell (62). A lassú és normál fejlődésű timidin kináz mutánsok megszámlálására vonatkozó szempontokat lásd a 42–44. pontban.
41. A két vizsgálat, azon belül az egérlimfóma-vizsgálat két módszerének (agarlemez és mikrotiterlemez) megfelelő számlálási módját a 2. függelék tartalmazza. Az egérlimfóma-vizsgálat agarlemezes módszerénél a mutációs gyakoriság meghatározásához megszámlálják a telepeket, és a mutáns telepek számát kiigazítják a kolóniaképző képességgel. Az egérlimfóma-vizsgálat mikrotiterlemezes módszerénél és a TK6 vizsgálatnál a kolóniaképző képességet mind a mutánsok kiválasztására, mind a kolóniaképző képesség mérésére szolgáló lemezeken Poisson-elosztással állapítják meg (63). A mutációs gyakoriságot a két lemezen tapasztalt kolóniaképző készség alapján határozzák meg.

Mutáns telepek jellemzése

42. Amennyiben az egérlimfóma-vizsgálatban a vizsgálati vegyi anyag pozitív eredményt ad (lásd a 62–63. pontot), a telep méretének vagy növekedésének meghatározásával jellemezni kell a telepeket a vizsgált tenyészetek közül legalább egynél (általában a legnagyobb elfogadható pozitív koncentrációnál), valamint a negatív és a pozitív kontrollonál. Ha a vizsgálati vegyi anyag negatívnak bizonyul (lásd a 64. pontot), a mutáns telepek jellemzését a negatív és a pozitív kontrollon kell elvégezni. Az egérlimfóma-vizsgálat mikrotiterlemezes módszere esetén a kis telepmutánsok azok, amelyek a lyuk átmérőjének kevesebb mint 25 %-át fedik be, a nagy telepmutánsok pedig azok, amelyek a lyuk átmérőjének több mint 25 %-át fedik be. Az agarlemezes módszerben automatikus telepszámlálással határozzák meg a mutáns telepek számát és méretét. A telepméret mérésének módjairól a szakirodalom nyújt részletes tájékoztatást (19) (38) (40). A negatív és a pozitív kontrollok esetén a telepek jellemzése arra szolgál, hogy igazolja a vizsgálatok megfelelő végrehajtását.
43. A vizsgálati vegyi anyag nem minősíthető negatívnak, ha sem a nagy, sem a kis telepmutánsokat nem észlelik megfelelően a pozitív kontrollban. A telepek jellemzése

általános tájékoztatást nyújthat arról, hogy a vizsgálati vegyi anyag képes-e pontmutációkat és/vagy kromoszomális eseményeket előidézni (4. pont).

44. TK6: a normális növekedési sebességű és a lassan növvő mutánsok elkülönítésének alapja az eltérő inkubációs idő (lásd a 40. pontot). A TK6 vizsgálatban általában minden tenyészetnél – így a negatív és a pozitív kontrolloknál is – számba veszik mind a gyorsan, mind a lassan megjelenő mutánsokat. A negatív és a pozitív kontroll telepjellemzései arra szolgálnak, hogy igazolják a vizsgálatok megfelelő végrehajtását. A vizsgálati vegyi anyag nem minősíthető negatívnak, ha sem a gyorsan, sem a lassan megjelenő mutánsokat nem észleli megfelelően a pozitív kontroll. A telepek jellemzése általános tájékoztatást nyújthat arról, hogy a vizsgálati vegyi anyag képes-e pontmutációkat és/vagy kromoszomális eseményeket előidézni (4. pont).

A laboratórium jártassága

45. A laboratóriumoknak a vizsgálat rutinszerű alkalmazása előtti elegendő tapasztalat igazolása érdekében kísérletsorozatot kell végrehajtaniuk referenciaként szolgáló, különböző mechanizmussal ható pozitív anyagokkal (legalább egy metabolikus aktiválással és legalább egy metabolikus aktiválás nélkül ható, az 1. táblázatban felsoroltak közül kiválasztott anyaggal), és különböző negatív kontrollokkal (nem kezelt tenyészetek és különféle oldószerek/vivőanyagok használatával). E pozitív és negatív kontrollok válaszreakcióinak összhangban kell lenniük a szakirodalommal. Ez nem vonatkozik azokra a laboratóriumokra, amelyek tapasztalattal rendelkeznek, azaz amelyeknek a rendelkezésére áll a 47–50. pontban meghatározott, dokumentált adatbázis. Az egérlimfóma-vizsgálatban a pozitív és a negatív kontrollból nyert adatoknak összhangban kell lenniük a genotoxicitás vizsgálatával foglalkozó nemzetközi műhely ajánlásaival (lásd a 2. táblázatot).
46. A pozitív kontrollként kiválasztott anyagokat (lásd az 1. táblázatot) meg kell vizsgálni metabolikus aktiválás nélkül rövid és hosszú kezelési idővel (ha végeznek hosszú időtartalmú kezelést) és metabolikus aktiválást alkalmazó rövid kezelési idővel is, a laboratórium mutagén hatású vegyi anyagok kimutatásában és a metabolikus aktivációs rendszer hatékonyságának meghatározásában való jártasságának bizonyítására, valamint be kell mutatni, hogy a laboratórium megfelelően végzi a kezelés alatt a sejtenyésztest, a fenotípusos expressziót és a mutánsok kiválasztását, továbbá, hogy a kiértékelési eljárások is megfelelőek. A vizsgálati rendszer érzékenységének és dinamikus tartományának bizonyítása érdekében a kiválasztott anyagok koncentrációtartományát úgy kell megválasztani, hogy reprodukálható és koncentrációval összefüggő növekedést biztosítson a háttérértékekhez viszonyítva.

Történeti kontrolladatok

47. A laboratóriumnak meg kell állapítania a következőket:

- a pozitív történeti kontrollok tartománya és eloszlása,
- a negatív (nem kezelt, oldószeres) történeti kontrollok tartománya és eloszlása.

48. A negatív történeti kontrollok dokumentált eloszlásához kapcsolódó első adatgyűjtés során a párhuzamos negatív kontrolloknak összhangban kell lenniük a negatív kontrollokra vonatkozóan közzétett adatokkal. Amint több kísérleti adat adódik a kontrollok eloszlásához, a párhuzamos negatív kontrolloknak ideális esetben az eloszlás 95 %-os ellenőrzési határértékén belül kell lenniük (64) (65).

49. A laboratórium negatív történeti kontrollokat tartalmazó adatbázisát első lépésként legalább 10 kísérlettel kell kiépíteni, de az adatbázisnak lehetőség szerint legalább 20, összehasonlítható kísérleti körülmények között végzett kísérletet kell tartalmaznia. A laboratóriumoknak minőségellenőrzési módszereket, például ellenőrzési diagramokat (C-diagramokat vagy X-bar diagramokat (65)) kell alkalmazniuk annak meghatározására, hogy a pozitív és a negatív kontrollokra vonatkozó adataik mennyire változóak, valamint annak bizonyítására, hogy náluk a módszertan „ellenőrzés alatt” áll (66). A dokumentált adatok gyűjtésére és használatára vonatkozó további részletek és ajánlások megtalálhatók a szakirodalomban (64).

50. A negatív kontrollokra vonatkozó adatoknak tartalmazniuk kell a szimpla tenyészetből vagy lehetőség szerint a párhuzamos tenyészetekből származó mutációs gyakoriságot, ahogyan az a 27. pontban szerepel. A párhuzamos negatív kontrolloknak ideális esetben a laboratórium negatív történeti kontrollokat tartalmazó adatbázisa szerinti eloszlás 95 %-os ellenőrzési határértékén belül kell lenniük. Amennyiben a negatív kontrollokra vonatkozó adatok a 95 %-os ellenőrzési határértékén kívül esnek, akkor számíthatók be a kontrollok dokumentált eloszlásába, ha ezek az adatok nem szélsőségesen kiugró értékek, továbbá bizonyíték van arra, hogy a vizsgálati rendszer „ellenőrzés alatt áll” (lásd a 49. pontot), valamint arra, hogy nem áll fenn szakmai vagy emberi mulasztás.

51. A kísérleti protokoll bármely módosítását meg kell vizsgálni abból a szempontból, hogy az adatok összhangban vannak-e a laboratórium meglévő történeti kontrolladatbázisaival. Jelentősebb következtetések fennállása esetén új történeti kontrolladatbázist kell létrehozni.

ADATOK ÉS JELENTÉS

Az eredmények értékelése

52. Az adatok ismertetésének az egérlimfóma és a TK6 vizsgálat esetében is ki kell terjednie a kezelt és a kontrollként szolgáló tenyészetekre, a citotoxicitás (relatív

teljes növekedés vagy relatív túlélés) kiszámításához szükséges adatokra és a mutációs gyakoriságra, az alábbiakban meghatározottak szerint.

53. Az egérlimfóma-vizsgálatban az egyes tenyészetekre vonatkozólag meg kell adni a relatív szuszpenziós növekedést, a relatív teljes növekedést, a mutánsok kiválasztásának idején mért kolóniaképző képességet és a mutáns telepek számát (agarlemez használata esetén), illetve az üres lyukak számát (mikrotiterlemez használata esetén). A mutációs gyakoriságot a mutáns sejtek száma és 1 millió túlélő sejt hányadosaként kell kifejezni. Pozitív válasz esetén meg kell adni a kis és a nagy telepek mutációs gyakoriságát (és/vagy a teljes mutációs gyakoriság arányát) a vizsgálati vegyi anyag legalább egy koncentrációjánál (általában a legnagyobb pozitív koncentrációnál), valamint a negatív és a pozitív kontrolloknál. Negatív válasz esetén a negatív és a pozitív kontroll kis és nagy telepeinek mutációs gyakoriságát kell megadni.
54. A TK6 vizsgálatban az egyes tenyészetekre vonatkozólag meg kell adni a relatív túlélést, a mutánsok kiválasztásának idején mért kolóniaképző képességet, valamint a gyorsan és a lassan megjelenő mutánsoknál megfigyelt üres lyukak számát. A mutációs gyakoriságot a mutáns sejtek számának és a túlélő sejtek számának hányadosaként kell meghatározni, továbbá meg kell adni a teljes mutációs gyakoriságot, valamint a gyorsan és a lassan megjelenő mutánsok mutációs gyakoriságát (és/vagy a teljes mutációs gyakoriság arányát).

Elfogadhatósági kritériumok

55. Egy adott vizsgálati vegyi anyag összesített eredményeinek meghatározása előtt mind az egérlimfóma, mind a TK6 vizsgálatban teljesíteni kell az alábbi kritériumokat:
- Két kísérleti körülmény (rövid időtartamú kezelés metabolikus aktiválással és metabolikus aktiválás nélkül – lásd a 33. pontot) vizsgálatára került sor, kivéve, ha az egyik pozitív eredményeket hozott.
 - Megfelelő számú sejt és koncentrációérték elemezhető (lásd a 27. és a 34–36. pontot).
 - A legmagasabb koncentráció kiválasztására vonatkozó kritériumok összhangban vannak a 28–30. pontban ismertetett legmagasabb koncentrációkkal.

Negatív és pozitív kontrollok elfogadhatósági kritériumai

56. Miután az IWGT mIA szakértői munkacsoportja az egérlimfóma-vizsgálatból származó adatok széles körét elemezte, nemzetközi konszenzus jött létre az egérlimfóma-vizsgálatra vonatkozó konkrét elfogadhatósági kritériumokról (1) (2) (3) (4) (5). Ezért ez a vizsgálati módszer konkrét ajánlásokat fogalmaz meg a negatív és a pozitív kontrollok elfogadhatóságára, valamint az egérlimfóma-vizsgálatban

tesztelt anyagok eredményeinek kiértékelésére vonatkozólag. A TK6 vizsgálat jelentősen kisebb adatbázissal rendelkezik, amelyet nem értékelt munkacsoport.

57. Az egérlimfóma-vizsgálat minden kísérletét értékelni kell abból a szempontból, hogy a kezeletlen/oldószeres kontroll teljesíti-e az IWGT mIA munkacsoportja által felállított elfogadhatósági kritériumokat ((4) és az alábbi 2. táblázat) a következő mutatók tekintetében: (1) mutációs gyakoriság (az IWGT eltérő mutációs gyakoriságot minősített elfogadhatónak az egérlimfóma-vizsgálat agarlemezes és mikrotiterlemezes vizsgálatánál), (2) a mutánsok kiválasztásának idején mért kolóniaképző képesség (CE) és (3) az oldószeres kontroll során tapasztalt szuszpenziós növekedés (SG) (a képleteket lásd a 2. függelékben).

2. táblázat: Az egérlimfóma-vizsgálat elfogadhatósági kritériumai

Paraméter	Lágyagar módszer	Mikrotiter módszer
Mutációs gyakoriság	35–140 x 10 ⁻⁶	50–170 x 10 ⁻⁶
Kolóniaképző képesség	65–120 %	65–120 %
Szuszenziós növekedés	8–32-szeres (3–4 órás kezelés) 32–180-szoros (24 órás kezelés, ha végeztek ilyen)	8–32-szeres (3–4 órás kezelés) 32–180-szoros (24 órás kezelés, ha végeztek ilyen)

58. Az egérlimfóma-vizsgálatban minden kísérletet értékelni kell abból a szempontból is, hogy a pozitív kontroll(ok) teljesíti(k)-e az IWGT munkacsoport által kidolgozott két alábbi elfogadhatósági kritérium legalább egyikét:

- A pozitív kontrollnak elő kell idéznie a teljes mutációs gyakoriság abszolút növekedését, vagyis a spontán háttér mutációs gyakoriságot legalább 300 x 10⁻⁶ mértékben meghaladó növekedést kell kiváltania [indukált MF (IMF)]. A kis kolóniáknál megfigyelt mutációs gyakoriságnak legalább 40 %-ban indukált mutációs gyakoriságnak kell lennie.
- A pozitív kontrollnál a kis kolóniák mutációs gyakorisága legalább 150 x 10⁻⁶ mértékben haladja meg a párhuzamos kezeletlen/oldószeres kontrollnál tapasztalt mutációs gyakoriságot (azaz a kis kolóniák indukált mutációs gyakorisága 150 x 10⁻⁶).

59. A TK6 vizsgálatban akkor elfogadhatók a kísérletek, amikor a párhuzamos negatív kontroll a 48–49. pont szerint befoglalható a laboratórium negatív történeti kontrollokat tartalmazó adatbázisába. Ezenfelül a párhuzamos pozitív kontrolloknak (lásd a 32. pontot) a pozitív történeti kontrollokat tartalmazó adatbázisban generált válaszokkal összeegyeztethető válaszreakciókat, valamint a párhuzamos negatív kontrollhoz viszonyítva statisztikailag szignifikáns növekedést kell előidézniük.

60. Mindkét vizsgálat esetében a pozitív kontrolltenyészetnél megfigyelt citotoxicitás felső határának meg kell egyeznie a vizsgált kultúráknál tapasztalt citotoxicitás felső határával. Ez azt jelenti, hogy a relatív teljes növekedés/relatív túlélés nem csökkenhet 10 % alá. Elegendő egyetlen koncentrációt (több koncentrációérték használata esetén a pozitív kontrolltenyészetek egyik koncentrációját) vizsgálni annak igazolására, hogy a pozitív kontroll elfogadhatósági kritériumai teljesülnek. Emellett szükséges az is, hogy a pozitív kontroll mutációs gyakorisága a laboratórium által meghatározott elfogadhatósági tartományon belül legyen.

Az eredmények értékelése és értelmezése

61. Az IWGT egérlimfóma szakértői munkacsoportja jelentős munka keretében megállapította az egérlimfóma-vizsgálat pozitív válaszána biológiai relevanciáját és kritériumait (4). Ezért ez a vizsgálati módszer konkrét ajánlásokat fogalmaz meg az egérlimfóma-vizsgálatban tesztelt vizsgálati vegyi anyagok eredményeinek kiértékelésére vonatkozólag (lásd a 62–64. pontot). A TK6 vizsgálat jelentősen kisebb adatbázissal rendelkezik, amelyet nem értékelt munkacsoport. Ebből adódóan a TK6 vizsgálatból származó adatok értelmezésére vonatkozó ajánlások általánosabban fogalmaznak (lásd a 65–66. pontot). Mindkét vizsgálatra nézve megfogalmaztak kiegészítő ajánlásokat (lásd a 67–71. pontot).

EGÉRLIMFÓMA-VIZSGÁLAT

62. Ajánlatos egységes megközelítést alkalmazni a pozitív és negatív válaszok meghatározására, mert ez biztosítja a megnövekedett mutációs gyakoriság biológiai relevanciáját. A más vizsgálatoknál általánosan alkalmazott statisztikai elemzés helyett az egérlimfóma-vizsgálat egy előre meghatározott indukált mutációs gyakoriságot (vagyis a mutációs gyakoriság párhuzamos kontrollal összevetett növekedését) veszi alapul, az úgynevezett globális értékelési faktort (GEF), amely a részt vevő laboratóriumok által elvégzett negatív kontrollokból nyert mutációs gyakorisági adatok eloszlásának elemzése alapján került meghatározásra (4). A GEF az egérlimfóma-vizsgálat agarlemez vltózata esetén 90×10^{-6} , mikrotiterlemez vltózata esetén pedig 126×10^{-6} .
63. Amennyiben valamennyi elfogadhatósági kritérium teljesül, a vizsgálati vegyi anyag egyértelműen pozitívnak minősül, ha a vizsgált kísérleti körülmények bármelyikében (lásd a 33. pontot) a mutációs gyakoriság párhuzamos háttérértékhez viszonyított növekedése meghaladja a GEF-et, és a növekedés (pl. egy trendpróbával) koncentrációfüggést mutat. Ezt követően úgy tekintendő, hogy a vizsgálati vegyi anyag képes mutációt előidézni ebben a vizsgálati rendszerben.
64. Amennyiben valamennyi elfogadhatósági kritérium teljesül, a vizsgálati vegyi anyag egyértelműen negatívnak minősül, ha a vizsgált kísérleti körülmények (lásd a 33. pontot) egyikében sem figyeltek meg koncentrációfüggő választ, illetve ha

növekedett is a mutációs gyakoriság, a növekedés mértéke nem haladja meg a GEF-et. Ezt követően úgy tekintendő, hogy a vizsgálati vegyi anyag ebben a vizsgálati rendszerben nem képes mutációt előidézni.

TK6

65. Amennyiben valamennyi elfogadhatósági kritérium teljesül, a vizsgálati vegyi anyag egyértelműen pozitívnak minősül, ha a vizsgált kísérleti körülmények bármelyikében (lásd a 33. pontot):

- legalább az egyik vizsgálati koncentráció statisztikailag szignifikáns növekedést mutat a párhuzamos negatív kontrollhoz viszonyítva,
- a megfelelő trendpróbával történő értékelés arra utal, hogy a növekedés koncentrációfüggő (lásd a 33. pontot),
- ezen eredmények bármelyike a negatív történeti kontrolladatok eloszlásán (például Poisson-eloszlású 95 %-os ellenőrzési határértéken) kívül esik; lásd a 48. pontot).

Mindezen kritériumok teljesülése esetén úgy tekintendő, hogy a vizsgálati vegyi anyag képes mutációt előidézni ebben a vizsgálati rendszerben. A legmegfelelőbb statisztikai módszerekre vonatkozó ajánlások megtalálhatók a szakirodalomban (66) (67).

66. Amennyiben valamennyi elfogadhatósági kritérium teljesül, a vizsgálati vegyi anyag egyértelműen negatívnak minősül, ha valamennyi vizsgált kísérleti körülmény mellett (lásd a 33. pontot):

- a vizsgálati koncentrációk egyike sem mutat statisztikailag szignifikáns növekedést a párhuzamos negatív kontrollhoz viszonyítva,
- a megfelelő trendpróbával végzett értékelés nem mutat koncentrációfüggő növekedést,
- valamennyi eredmény a negatív történeti kontrolladatok eloszlásán (például Poisson-eloszlású 95 %-os ellenőrzési határértéken) belül van; lásd a 48. pontot).

Ezt követően úgy tekintendő, hogy a vizsgálati vegyi anyag ebben a vizsgálati rendszerben nem képes mutációt előidézni.

Az egérlimfóma- és a TK6 vizsgálatra egyaránt vonatkozó szempontok:

67. Ha a legnagyobb koncentráció a citotoxicitáson alapul, a legmagasabb koncentrációval 10 és 20 % közötti relatív teljes növekedést/relatív túlélést kell megcélozni. Megegyezés szerint körültekintően kell eljárni a 10 és 20 % közötti relatív teljes növekedésnél/relatív túlélésnél jelentkező pozitív eredmények értékelése során, és az eredmények nem tekinthetők pozitívnak, ha a mutációs gyakoriság növekedése csak 10 %-os vagy az alatti relatív teljes növekedésnél/relatív túlélésnél tapasztalható (ha ez értékelt) (2) (59).

68. Bizonyos körülmények között további információk segítséget nyújthatnak egy adott vizsgálati vegyi anyag nem mutagén jellegének meghatározásához, amikor egyik tenyészetnél sem mutatható ki 10–20 %-os relatív teljes növekedés/relatív túlélés közé eső relatív teljes növekedés. Az alábbi helyzetek tartoznak ide: (1) A 100 % és 20 % közötti relatív teljes növekedési/relatív túlélési tartományba eső adatpontoknál nincsenek mutagenitásra utaló jelek (pl. nincs dóziszfüggő válasz, a mutációs gyakoriság nem haladja meg a párhuzamos negatív kontrollét vagy a dokumentált háttérérték-tartományt stb.), és legalább egy adatpont a 20 % és 25 % közötti relatív teljes növekedési/relatív túlélési tartományba esik. (2) A 100 % és 25 % közötti relatív teljes növekedési/relatív túlélési tartományba eső adatpontoknál nincsenek mutagenitásra utaló jelek (pl. nincs dóziszfüggő válasz, a mutációs gyakoriság nem haladja meg a párhuzamos negatív kontrollét vagy a dokumentált háttérérték-tartományt stb.), és egy negatív adatpont kissé a 10 %-os relatív teljes növekedés/relatív túlélés alatt helyezkedik el. A vizsgálati vegyi anyag mindkét helyzetben negatívnak minősíthető.
69. Az egyértelműen pozitív vagy negatív válasz igazolása nem követelmény.
70. Olyan esetekben, amikor a válaszreakció – a fentiekben leírtak szerint – nem egyértelműen negatív vagy pozitív, illetve egy adott eredmény biológiai relevanciája megállapításának alátámasztása érdekében az adatokat szakértői vélemény és/vagy további vizsgálatok alapján kell értékelni. Hasznos lehet egy megismételt kísérlet lehetőleg módosított kísérleti körülmények melletti elvégzése [pl. a koncentrációk felosztásának módosításával megnövelni a valószínűségét annak, hogy az adatpontok a 10–20 %-os relatív teljes növekedési/relatív túlélési tartományba esnek, más metabolikus aktiválási feltételek (S9 koncentrációjának vagy forrásának megváltoztatása) vagy más kezelési időtartam alkalmazása].
71. Ritka esetekben az adatkészlet – még további vizsgálatok után is – eleve kizárja a pozitív vagy negatív eredményekre vonatkozó következtetést. Ezért a vizsgálati vegyi anyag válaszreakcióját kétértelműnek kell minősíteni (amit úgy kell értelmezni, hogy egyenlő valószínűséggel tekinthető pozitívnak és negatívnak).

VIZSGÁLATI JELENTÉS

72. A vizsgálati jelentésnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálati vegyi anyag:

- eredet, gyártási szám, felhasználási határidő, ha rendelkezésre áll;
- a vizsgálati vegyi anyag stabilitása, ha ismert;
- a vizsgálati vegyi anyag oldhatósága és stabilitása az oldószerben, ha ismert;

- adott esetben a pH-érték, az ozmolalitás és a kicsapódás mérése abban a tápfolyadékban, amelyhez a vizsgálati vegyi anyagot hozzáadták.

Egy összetevőből álló anyag:

- fizikai megjelenés, vízdékonyság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok;
- kémiai azonosítás, például IUPAC- vagy CAS-névvel, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet alapján, tisztaság, adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb. alapján

Több összetevőből álló anyag, UVCB-k és keverékek:

- amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosítója (lásd fent), mennyiségi előfordulása és releváns fizikai-kémiai tulajdonságai révén jellemezve.

Oldószer:

- az oldószer kiválasztásának indokolása;
- az oldószernek a végleges tápfolyadékban belüli aránya.

Sejtek:

Laboratóriumi törzstenyészetek esetén:

- a sejtek típusa és eredete, valamint a vizsgálólaboratóriumban rendelkezésre álló dokumentált adataik;
- kariotípus jellemzői és/vagy modális kromoszómaszám;
- a sejtenyészetek fenntartásának módszerei.
- a mikoplazmamentesség;
- sejt megduplázódási ideje.

Vizsgálati körülmények:

- a koncentrációk kiválasztásának és a sejtenyészetek számának indokolása; beleértve például a citotoxicitási adatokat és az oldhatóságra vonatkozó korlátokat;
- a közeg összetétele, CO₂-koncentráció, páratartalom;
- a vizsgálati vegyi anyag koncentrációja a tápfolyadékban belüli végső koncentrációjaként kifejezve (például µg vagy mg/a tápfolyadék ml-e vagy mM-ja);
- a tápfolyadékhoz adott oldószer és vizsgálati vegyi anyag koncentrációja (és/vagy térfogata);
- inkubációs hőmérséklet;

- inkubációs idő;
- a kezelés időtartama;
- sejtsűrűség a kezelés időtartama alatt;
- a metabolikus aktivációs rendszer típusa és összetétele (az S9 eredete, az S9 keverék elkészítési módszerei, az S9 keverék és az S9 koncentrációja vagy térfogata a végleges tápfolyadékban, az S9 minőségellenőrzése);
- pozitív és negatív kontrollként szolgáló anyagok, végső koncentráció az egyes kezelési körülmények esetén;
- az expressziós időszak hossza (beleértve a leültetett sejtek számát, a szubkultúrákat és a tápfolyadékok cseréjét, ha szükséges);
- a szelekciós ágens neve és koncentrációja;
- egérlimfóma-vizsgálat esetén jelezni kell az alkalmazott vizsgálat típusát (agarlemez és mikrotiterlemez);
- a vizsgálatok elfogadhatóságának kritériumai;
- az életképes és mutáns sejtek számának megállapítására használt módszerek;
- a citotoxicitás mérésére alkalmazott módszerek;
- a citotoxicitás és az alkalmazott módszer szempontjából lényeges kiegészítő információk;
- a leültetést követően végzett inkubálás időtartama;
- azon telepek meghatározása, amelyek méretét és típusát figyelembe vették (beleértve a „kis” és „nagy” telepekre vonatkozó kritériumokat is);
- azok a kritériumok, amelyek meghatározzák, hogy a vizsgálatok pozitívnak, negatívnak vagy többféleképpen értelmezhetőnek tekintendők-e;
- adott esetben a pH-érték, az ozmolalitás és a kicsapódás meghatározására alkalmazott módszerek.

Eredmények:

- az egyes tenyészetek esetében kezelt sejtek és átültetett sejtek száma;
- citotoxicitási paraméterek (egérlimfóma-vizsgálat esetében a relatív teljes növekedés, a TK6 esetében a relatív túlélés);
- a kicsapódás jelei és a meghatározás időpontja;
- a szelektív és nem szelektív folyadékba leültetett sejtek száma;
- a telepek száma a nem szelektív közegben és a rezisztens telepek száma a szelektív közegben, valamint az ezeknél tapasztalható mutációs gyakoriság;

- a negatív és pozitív kontrollok telepeinek mérete, és ha a vizsgálati vegyi anyag pozitív, legalább egy koncentráció és a hozzá kapcsolódó mutációs gyakoriság;
- amennyiben lehetséges, a koncentráció-válasz összefüggés;
- a párhuzamos negatív (oldószeres) és pozitív kontrollokra vonatkozó adatok (koncentrációk és oldószeresek);
- történeti negatív (oldószeres) és pozitív kontroll adatok (koncentrációk és oldószeresek), tartományokkal, átlagértékekkel és standard eltérésekkel; a dokumentált kontrolladatok alapjául szolgáló vizsgálatok száma;
- statisztikai elemzések (az egyes tenyészetek és adott esetben összevont párhuzamos tenyészetek tekintetében), valamint p-értékek, ha meghatározásra kerültek; és az egérlimfóma-vizsgálat esetében a GEF értékelése.

Az eredmények értékelése

Következtetések

SZAKIRODALOM

- (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, (April 2000), *Environ. Mol. Mutagen.*, 40 (4): 292-299.
- (3) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Delongchamp, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A., Wakuri, S. 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, Párizs.
- (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. USA*, 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. (Manuscript in preparation).
- (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. In: 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., 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 (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. In: *In vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. de Serres F.J., *et al.* (Eds, Elsevier, North-Holland, pp. 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. In: *Genotoxic Effects of Airborne Agents* Tice R.R., Costa D.L. and Schaich K.M. (Eds.). New York, Plenum, pp. 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. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Ed.), Cambridge University Press, pp. 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. Elérhető a következő címen: [<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.), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.
- (67) Fleiss J.L., Levin B. and Paik M.C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Aneugén: olyan vegyi anyag vagy folyamat, amely a mitózissal vagy meiózissal történő sejtosztódási ciklus elemeivel kölcsönhatásba lépve a sejtek vagy organizmusok aneuploidiját eredményezi.

Aneuploidia: a normális diploid (vagy haploid) kromoszómaszámtól egyetlen kromoszómával vagy egynél több, szám feletti kromoszómával, de nem teljes kromoszómakészlettel (kromoszómakészletekkel) (poliploidia) való bármely eltérés.

Báziscserét okozó mutagének: azok a vegyi anyagok, amelyek a bázispárok szubsztitúcióját okozzák a DNS-ben.

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Kolóniaképző képesség: azon alacsony sűrűséggel leültetett sejtek százalékaránya, amelyek képesek megszámlálható teleppé fejlődni.

Klasztogén: bármely olyan vegyi anyag vagy folyamat, amely sejtek vagy szervezetek populációjában szerkezeti kromoszóma-rendellenességeket okoz.

Citotoxicitás: az e vizsgálati módszerbe tartozó vizsgálatok esetében a citotoxicitás az egérlymfóma-vizsgálat esetében a relatív teljes növekedés (RTG), a TK6 vizsgálat esetében a relatív túlélés (RS) csökkenését jelenti.

Forward (előremutató) mutáció: a mutáns alak szülőktől származó típusától eltérő olyan génmutáció, amely a kódolt protein enzimaktivitásának vagy funkciójának változását vagy elvesztését eredményezi.

Frameshiftet okozó mutagének: azok a vegyi anyagok, amelyek egy vagy több bázispár addícióját vagy delícióját okozzák a DNS-ben.

Genotoxikus: általános kifejezés, amely magába foglalja a DNS- vagy kromoszómakárosodás valamennyi típusát, köztük a DNS-töréseket, adduktok képződését, átrendeződéseket, mutációkat, kromoszómaaberrációkat és aneuploidiat. A genotoxikus hatások nem minden típusa eredményez mutációkat vagy stabil kromoszómakárosodást.

Mitotikus rekombináció: a mitózis során a homológ kromatidok rekombinációja, ami kettős szálú DNS-töréseket vagy a heterozigótaság elvesztését okozhatja.

Mutagén: örökletes elváltozást idéz elő a génekben lévő DNS-bázispár-szekvenciá(k)ban vagy a kromoszómák szerkezetében (kromoszómaaberrációk).

Mutációs gyakoriság: a megfigyelt mutáns sejtek száma elosztva az életképes sejtek számával.

Fenotípusos expresszió ideje: a kezelést követő időtartam, amely során a genetikai változás rögzül a genomban, és a korábban meglévő géntermékek olyan mértékben kiürülnek, hogy a fenotípus-tulajdonság megváltozik.

Relatív túlélés: A relatív túlélést a kezelés okozta citotoxicitás mutatójaként használják a TK6 vizsgálatban. A relatív túlélés a közvetlenül a sejtkelést követően leültetett sejtek relatív kolóniaképző képessége (CE) kiigazítva a kezelés során a sejtszámban bekövetkezett veszteséggel, és összevetve a negatív kontroll kolóniaképző képességével.

Relatív szuszpenziós növekedés (RSG): Az egérlimfóma-vizsgálatban a vizsgált sejtkultúra relatív teljes kétnapos szuszpenziós növekedése összevetve a negatív/oldószeres kontroll teljes kétnapos szuszpenziós növekedésével (Clive and Spector, 1975). A relatív szuszpenziós növekedésnek magában kell foglalnia a vizsgált kultúra által a kezelési időszakban a negatív/oldószeres kontrollhoz viszonyítva elért relatív növekedést.

Relatív teljes növekedés (RTG): Az egérlimfóma-vizsgálat esetében a relatív teljes növekedést a kezelés okozta citotoxicitás mutatójaként használják. A relatív teljes növekedés a vizsgált kultúrák relatív (a vívíanyagos kontrollhoz viszonyított) növekedését méri a vizsgálat kezelési, kétnapos kifejeződési és a mutánsok kiválasztására szolgáló kolóniaképzési szakaszában. Az egyes vizsgált kultúrák relatív teljes növekedését megszorozzák a vizsgált kultúra mutánsok kiválasztásának idején mért relatív kolóniaképző képességével, és a negatív/oldószeres kontroll kolóniaképző képességének arányában fejezik ki (Clive and Spector, 1975).

S9 májfrakciók: 9 000 g centrifugálás utáni májhomogenátum felülúszója, azaz a nyers májextraktum.

S9 keverék: az S9 májfrakció és a metabolikus enzimaktivitáshoz szükséges kofaktorok keveréke.

Szuszenziós növekedés: A sejtek számának növekedési faktora az egérlimfóma-vizsgálat kezelési és kifejeződési szakaszában. A szuszpenziós növekedés meghatározásához rövid idejű (3–4 órás) kezelésnél megszorozzák az 1. napon tapasztalt növekedési faktort a 2. napon észlelt növekedési faktoral. 24 órás kezelés alkalmazása esetén a szuszpenziós növekedés a 24 órás kezelés során mért növekedési faktor és az 1. és 2. expressziós napon mért növekedési faktorok szorzata.

Oldószeres kontroll: a csak a vizsgálati vegyi anyag feloldására használatos oldószert tartalmazó kontrolltenyészetek meghatározására szolgáló általános kifejezés.

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

Nem kezelt kontrollok: nem kezelt (azaz sem a vizsgálati vegyi anyaggal, sem oldószerral nem kezelt), de a vizsgálati vegyi anyagot befogadó tenyészetekkel azonos módon feldolgozott tenyészetek.

2. függelék

KÉPLETEK

Citotoxicitás

Az egérlimfóma-vizsgálat mindkét (agarlemez és mikrotiterlemez) változatánál

A citotoxicitást a relatív teljes növekedés (RTG) alapján határozzák meg, amely magában foglalja a kétnapos expressziós időszak során elért relatív szuszpenziós növekedést (RSG) és a mutánsok kiválasztásának idején meghatározott relatív kolóniaképző képességet (RCE). Az RTG, az RSG és az RCE értékét százalékos arányszámként fejezik ki.

A relatív szuszpenziós növekedés (RSG) kiszámítása: Az 1. szuszpenziós növekedés (SG_1) az 1. napon a 0. naphoz képest megfigyelt növekedési sebesség (1. napi sejtkoncentráció/0. napi sejtkoncentráció), a 2. szuszpenziós növekedés (SG_2) pedig a 2. napon az 1. naphoz képest tapasztalt növekedési sebesség (2. napi sejtkoncentráció/1. napi sejtkoncentráció). Az RSG a kezelt kultúra teljes szuszpenziós növekedése ($SG_1 \times SG_2$) a kezeletlen/oldószeres kontrollhoz viszonyítva. Azaz: $RSG = [SG_{1(vizsgált)} \times SG_{2(vizsgált)}] / [SG_{1(kontroll)} \times SG_{2(kontroll)}]$ Az SG_1 értékét a sejtkelés kezdetén használt induló sejtkoncentráció alapján kell meghatározni. Ezzel megállapíthatók a vizsgált kultúra(k)ban a sejtkelés során a citotoxicitás terén bekövetkezett változások.

Az RCE a vizsgált kultúra relatív kolóniaképző képességének és a kezeletlen/oldószeres kontroll relatív kolóniaképző képességének aránya, amelyet a mutánsok kiválasztásának időpontjában határoznak meg.

Relatív teljes növekedés (RTG): $RTG = RSG \times RCE$

TK6

Relatív túlélés (RS):

A citotoxicitást a relatív túlélés alapján értékelik, ami a közvetlenül a kezelést követően leültetett sejtek kolóniaképző képessége (CE), kiigazítva a kezelés során a sejtszámban bekövetkezett veszteséggel, és összevetve a negatív kontrollok (túlélési arányuk 100 %-nak tekintendő) kolóniaképző képességével. A kezelés során végbement sejtpusztulás miatt szükséges kiigazítás az alábbi módon számítható ki:

$$\text{Kiigazított CE} = CE \times \frac{\text{A sejtek száma a kezelés végén}}{\text{A sejtek száma a kezelés kezdetén}}$$

A vizsgálati vegyi anyaggal kezelt tenyészetek relatív túlélése az alábbi módon határozható meg:

$$\text{Relatív túlélés} = \frac{\text{Kiigazított kolóniaképző készség kezelt tenyészetben}}{\text{Kiigazított kolóniaképző készség oldószeres kontrollban}} \times 100$$

Mutációs gyakoriság az egérlimfóma- és a TK6 vizsgálat esetében

A mutációs gyakoriság (MF) a szelektív közegben növvő mutáns telepek kolóniaképző képességének (CE_M) és a nem szelektív közegben fejlődő telepek kolóniaképző képességének (CE_V) aránya, amelyet a mutánsok kiválasztásának időpontjában határoznak meg. Azaz: $MF = CE_M / CE_V$. E két kolóniaképző készséget az agarlemezes és a mikrotiterlemezes kolóniaképző módszer esetén az alábbiakban leírtak szerint kell meghatározni.

Az egérlimfóma-vizsgálat agarlemezes változata: Az egérlimfóma-vizsgálat lágyagarlemezes változatában a szelekciós lemezen lévő telepek száma (C_M) és a nem szelekciós, vagyis a kolóniaképző képesség (életképesség) meghatározására szolgáló lemezen lévő telepek száma (C_V) a kolóniák közvetlen megszámlálásával állapítható meg. Amikor 600 sejtet ültetnek le a szelekciós lemezek (C_M) és a nem szelekciós, vagyis a kolóniaképző képesség (életképesség) meghatározására szolgáló lemezek (C_V) kolóniaképző képességének (CE) meghatározásához, és 3×10^6 sejtet használnak a mutánsok kiválasztására, akkor:

$$CE_M = C_M / (3 \times 10^6) = (C_M / 3) \times 10^{-6}$$

$$CE_V = C_V / 600$$

Mikrotiterlemezes egérlimfóma- és a TK6 vizsgálat: Az egérlimfóma-vizsgálat mikrotiterlemezes változatában a C_M és a C_V értékét a mikrotiterlemezek teljes lyukszámának (TW) és a lyukankénti telepek feltételezhető számának (P) szorzataként határozzák meg.

$$C_M = P_M \times TW_M$$

$$C_V = P_V \times TW_V$$

A Poisson-elosztás nulla valószínűségi változójából kiindulva (Furth és munkatársai, 1981) a P -t a következő módon kapjuk meg:

$$P = -\ln(EW / TW)$$

Ahol az EW az üres lyukak, a TW pedig az összes lyuk száma. Ebből következően:

$$CE_M = C_M / T_M = (P_M \times TW_M) / T_M$$

$$CE_V = C_V / T_V = (P_V \times TW_V) / T_V$$

Az egérlimfóma-vizsgálat mikrotiterlemezes változatában a kis és nagy telepek mutációs gyakoriságát azonos módon határozzák meg, a kis és nagy telepek üres

lyukainak száma alapján.

A TK6 vizsgálatban a kis és nagy telepek mutációs gyakoriságát a gyorsan és a lassan megjelenő mutánsok száma alapján állapítják meg.

B.68. RÖVID EXPOZÍCIÓS IDEJŰ *IN VITRO* VIZSGÁLATI MÓDSZER i) A SÚLYOS SZEMKÁROSODÁST OKOZÓ VEGYI ANYAGOK ÉS ii) A SZEMIRRITÁCIÓ VAGY A SÚLYOS SZEMKÁROSODÁS TEKINTETÉBEN BESOROLÁST NEM IGÉNYLŐ VEGYI ANYAGOK AZONOSÍTÁSÁRA

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 491. vizsgálati iránymutatásában (2017) leírt módszerrel. A rövid expozíciós idejű (STE) vizsgálati módszer egy *in vitro* eljárás, amely bizonyos helyzetekben és meghatározott korlátok mellett alkalmazható a súlyos szemkárosodást okozó, valamint a súlyos szemkárosodás vagy szemirritáció tekintetében besorolást nem igénylő vegyi anyagok (anyagok és keverékek) veszélyességi osztályba sorolására és címkézésére, az Egyesült Nemzetek Szervezete (ENSZ) által kidolgozott, vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének globálisan harmonizált rendszerében (GHS) (1), valamint az Európai Unió (EU) anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról szóló 1272/2008/EK rendeletében (CLP-rendelet)¹ meghatározottak szerint.
2. A vegyi anyagok szemet érintő veszélyességi potenciáljának értékelése évek óta elsősorban egy nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálattal (az OECD 405. vizsgálati iránymutatásával egyenértékű B.5. vizsgálati módszerrel (8)) történik. Általánosan elfogadott, hogy az előre látható jövőben egyetlen alternatívaként használható *in vitro* vizsgálat sem tudja majd teljes körűen helyettesíteni a nyulakon végzett szemvizsgálatot a különböző kémiai osztályoknál felmerülő súlyos szemkárosodási/szemirritációs válaszreakciók teljes skálájának előrejelzésében. Előfordulhat azonban, hogy egy-egy (többszintű) vizsgálati stratégián belüli alternatív vizsgálati módszerek stratégiai kombinációja teljes körűen helyettesíteni tudja a nyulakon végzett szemvizsgálatot (2). A felülről építkező megközelítést olyan vegyi anyagok vizsgálatához dolgozták ki, amelyek a rendelkezésre álló információk alapján várhatóan rendkívül irritáló hatásúak lehetnek, vagy súlyos szemkárosodást idézhetnek elő. Ezzel szemben az alulról építkező megközelítés olyan vegyi anyagok vizsgálatához alkalmazandó, amelyek a meglévő információk alapján várhatóan nem okoznak a besorolás szükségességéhez elegendő szemirritációt. Bár a rövid expozíciós idejű vizsgálati módszer nem helyettesíti teljes körűen a nyulakon végzett

¹ Az Európai Parlament és a Tanács 1272/2008/EK rendelete (2008. december 16.) az anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról, a 67/548/EGK és az 1999/45/EK irányelv módosításáról és hatályon kívül helyezéséről, valamint az 1907/2006/EK rendelet módosításáról (HL L 353/1., 2008.12.31.).

in vivo szemvizsgálatot, többszintű vizsgálati stratégia – például felülről vagy alulról építkező megközelítés – részeként, szabályozói követelmények szerinti osztályozásra és címkézésre alkalmazva azonban használható arra, hogy további vizsgálatok szükségessége nélkül azonosítsa i. a súlyos szemkárosodást okozó (vagyis az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategóriába tartozó) vegyi anyagokat és ii. a szemirritáció vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében besorolást nem igénylő (azaz az ENSZ-GHS/CLP-rendelet „Kategória nélküli” csoportjába tartozó) vegyi anyagokat (kivéve a rendkívül illékony anyagokat és a felületaktív anyagoktól eltérő szilárd vegyi anyagokat) (1) (2). Azok a vegyi anyagok azonban, amelyek a rövid expozíciós idejű vizsgálati módszer alapján előreláthatólag nem okoznak súlyos szemkárosodást (ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategória), vagy az ENSZ-GHS/CLP-rendelet „Kategória nélküli” csoportjába tartoznak (nem váltanak ki sem szemirritációt, sem súlyos szemkárosodást), a végleges osztályba sorolásukhoz további vizsgálatot tesznek szükségessé. Ezenfelül a rövid expozíciós idejű vizsgálati módszernek az ENSZ-GHS/CLP-rendelettől eltérő osztályozási rendszeren belüli, alulról építkező megközelítés keretében történő alkalmazásáról egyeztetni kell a megfelelő szabályozó hatóságokkal. A legmegfelelőbb vizsgálati módszer kiválasztásához és e vizsgálati módszer alkalmazásához a súlyos szemkárosodási és bőrirritációs vizsgálatok és értékelések integrált megközelítéseiről szóló OECD-iránymutatás újít támpontokat (14).

3. E vizsgálati módszer ismerteti azokat az eljárásokat, amelyek felhasználhatók a vizsgálati vegyi anyagok szemet érintő veszélyességi potenciáljának értékelésére az alapján, hogy képesek-e a rövid expozíciós idejű vizsgálati rendszerben citotoxicitást kiváltani. A vegyi anyagoknak a szaruhártya felhámsejtjeire gyakorolt citotoxikus hatása fontos hatásmechanizmus, ami a szaruhártya felhámjának károsodásához és szemirritációhoz vezet. A rövid expozíciós idejű vizsgálati módszerben a sejtek életképességét az alapján mérik, hogy az MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid), más néven tiazolil kék tetrazólium-bromid vitális festéket élő sejtek enzimatisz úton kék formazán kristályá alakítják, amelynek mennyiségét a sejtekből történő kivonás után meghatározzák (3). Az ily módon megállapított sejtéletképességet összevetik az oldószeres kontrollnál mért életképességgel (ez a relatív életképesség), majd ennek alapján megbecsülik a vizsgálati vegyi anyag szemet érintő veszélyességi potenciálját. Egy adott vizsgálati vegyi anyagot akkor sorolnak az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategóriába, ha 5 %-os és 0,05 %-os koncentrációja egyaránt 70 %-os vagy az alatti ($\leq 70\%$) sejtéletképességet idéz elő. Ezzel szemben akkor jelzik előre, hogy valamely vizsgálati vegyi anyag az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerint „Kategória nélküli”, ha 5 %-os és 0,05 %-os koncentrációja egyaránt 70 %-ot meghaladó ($> 70\%$) sejtéletképességet eredményez.

4. E vizsgálati módszer esetében a „vizsgálati vegyi anyag” kifejezés a vizsgálat tárgyát képező vegyi anyagra vonatkozik, és nem a rövid expozíciós idejű vizsgálati módszer anyagok és/vagy keverékek vizsgálatára való alkalmazhatóságához kapcsolódik. A fogalmak meghatározása a függelékben található.

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

5. Ez a vizsgálati módszer a Kao Corporation által kidolgozott protokollon alapul (4), amelyen két különböző validálási vizsgálatot végeztek el: az egyiket a japán állatkísérletek alternatív módszereivel foglalkozó társaság validálásért felelős bizottsága (JSAAE) (5), a másikat pedig a japán alternatív módszerek validálásával foglalkozó központ (JaCVAM) (6) hajtotta végre. A validálási tanulmány jelentései és vizsgálati módszer felülvizsgálatára vonatkozó háttérdokumentumok alapján a NICEATM/ICCVAM szakértői vizsgálatot végzett (7).
6. A súlyos szemkárosodást okozó (az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategóriába tartozó) (1) vegyi anyagok (anyagok és keverékek) azonosítására történő alkalmazásakor a rövid expozíciós idejű vizsgálati módszer 125 (anyagokat és keverékeket is tartalmazó) vegyi anyag vizsgálatára során nyert adatainak általános pontossága 83 % (104/125), álpozitív aránya 1 % (1/86), álnegatív aránya pedig 51 % (20/39) a nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálat adataival való összevetéskor (7). Az álnegatív eredmények aránya ebben az összefüggésben nem kritikus jelentőségű, mivel minden 5 %-os koncentrációban legfeljebb 70 %-os, és 0,05 %-os koncentrációban 70 %-nál nagyobb sejtéletképességet kiváltó vizsgálati vegyi anyag vizsgálatára sor kerülne más, megfelelően validált *in vitro* vizsgálati módszerekkel, vagy – a szabályozási követelményektől függően, és a jelenleg ajánlott lépcsőzetes vizsgálati stratégiával és bizonyítékok súlyozásán alapuló megközelítéssel összhangban (1) (8) – utolsó lehetőségként nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálattal. Elsősorban egy összetevőből álló anyagok vizsgálatára került sor, bár a keverékek vizsgálatára vonatkozóan is rendelkezésre áll korlátozott mennyiségű információ. A vizsgálati módszer mindazonáltal a több összetevőből álló anyagok és keverékek vizsgálatára technikailag alkalmazható. E vizsgálati módszer tervezett szabályozási célt szolgáló adatgenerálás érdekében, keveréken történő alkalmazása előtt azonban meg kell vizsgálni, hogy az megfelelő eredményeket biztosíthat-e erre a célra, és ha igen, miért. Ilyen megfontolások nem szükségesek, ha létezik a keverék vizsgálatára vonatkozó szabályozási követelmény. A rövid expozíciós idejű vizsgálati módszer nem mutat egyéb hiányosságokat az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategóriába tartozó vizsgálati vegyi anyagok azonosítására történő alkalmazásakor. A vizsgálók mérlegelhetik e vizsgálati módszer vizsgálati vegyi anyagon való alkalmazását, amely esetben az 5 %-os és 0,05 %-os koncentrációban egyaránt legfeljebb 70 %-os sejtéletképességet további vizsgálat nélkül az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti

1. kategóriába sorolandó súlyos szemkárosodást okozó reakcióra utaló jelként kell elfogadni.
7. A szemirritáció és a súlyos szemkárosodás tekintetében besorolást nem igénylő (az ENSZ-GHS/CLP-rendelet „Kategória nélküli” csoportjába tartozó) vegyi anyagok (anyagok és keverékek) azonosítására történő alkalmazásakor a rövid expozíciós idejű vizsgálati módszer 130 (anyagokat és keverékeket is tartalmazó) vegyi anyag vizsgálata során nyert adatainak általános pontossága 85 % (110/130), álnegatív aránya 12 % (9/73), álpozitív aránya pedig 19 % (11/57) a nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálat adataival való összevetéskor (7). Amikor a rendkívül illékony anyagok és a felületaktív anyagoktól eltérő szilárd vegyi anyagok nem szerepelnek az adatbázisban, a vizsgálati módszer általános pontossága 90 %-ra (92/102), álnegatív aránya 2 %-ra (1/54), álpozitív aránya pedig 19 %-ra (9/48) javul (7). Ebből következően a szemirritáció és a súlyos szemkárosodás tekintetében besorolást nem igénylő (az ENSZ-GHS/CLP-rendelet „Kategória nélküli” csoportjába tartozó) vizsgálati vegyi anyagok azonosítására történő alkalmazásakor a rövid expozíciós idejű vizsgálati módszer potenciális hiányossága az álnegatív eredmények magas aránya i) a 6 kPa-t meghaladó gőznyomású rendkívül illékony anyagok, valamint ii) a felületaktív anyagoktól eltérő szilárd vegyi anyagok (anyagok és keverékek) és a kizárólag felületaktív anyagokból álló keverékek körében. Ezeket a vegyi anyagokat kizárják a rövid expozíciós idejű vizsgálati módszer alkalmazási köréből (7).
8. A 6. és a 7. pontban említett vegyi anyagokon túlmenően a rövid expozíciós idejű vizsgálati módszer adatbázisa magában foglalja 40 keverék belső vizsgálatokból származó adatait is, amelyek pontossága 88 % (35/40), álpozitív aránya 50 % (5/10), álnegatív aránya pedig 0 % (0/30) a Draize-féle *in vivo* szemvizsgálathoz képest, az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti osztályozási rendszerben besorolást nem igénylő keverékek előrejelzése terén (9). Ezért a rövid expozíciós idejű vizsgálati módszer alulról építkező megközelítés részeként alkalmazható az ENSZ-GHS/CLP-rendelet „Kategória nélküli” csoportjába tartozó keverékek azonosítására, kivételt képeznek ez alól – a szilárd anyagokra vonatkozó korlátozás kiterjesztésével – a csak felületaktív anyagokból álló keverékektől eltérő szilárd keverékek. Ezenfelül a 6 kPa-t meghaladó gőznyomású anyagokat tartalmazó keverékeket az esetleges alulkategorizálás elkerülése érdekében körültekintően kell értékelni, és előrejelzett besorolásukat eseti alapon kell megindokolni.
9. Az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategóriába tartozó, de a 2., 2A. vagy 2B. kategóriába alulosztályozott vegyi anyagok, valamint az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti „Kategória nélküli” csoportba tartozó, de a 2., 2A. vagy 2B. kategóriába felülosztályozott vegyi anyagok jelentős száma miatt a rövid expozíciós idejű vizsgálati módszer nem alkalmazható a vizsgálati vegyi anyagok ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 2. kategóriába tartozóként, illetve ENSZ-

GHS/CLP-rendelet szerinti 2A. kategóriába (szemirritáló hatású) vagy 2B. kategóriába (enyhén szemirritáló hatású) tartozóként történő azonosítására (7). E célból egy másik megfelelő módszerrel végzett további vizsgálatra lehet szükség.

10. A rövid expozíciós idejű vizsgálati módszer olyan vizsgálati vegyi anyagokhoz alkalmazható, amelyek oldhatók vagy legalább 5 perc alatt egyenletesen felszuszpendálhatók fiziológias sóoldatban, 5 % dimetil-szulfoxidot (DMSO) tartalmazó sóoldatban vagy ásványolajban. A rövid expozíciós idejű vizsgálati módszer nem alkalmazható olyan vizsgálati vegyi anyagokhoz, amelyek nem oldhatók vagy egyenletesen nem szuszpendálhatók legalább 5 perc alatt fiziológias sóoldatban, 5 % DMSO-t tartalmazó sóoldatban vagy ásványolajban. A rövid expozíciós idejű vizsgálati módszerben az ásványolaj használatát a rövid expozíciós idő teszi lehetővé. Ennek köszönhetően a rövid expozíciós idejű vizsgálati módszer alkalmas vízben oldhatatlan vizsgálati vegyi anyagok (pl. hosszú láncú zsíralkoholok vagy ketonok) szemet érintő veszélyességi potenciáljának előrejelzésére, amennyiben azok elegendenek legalább a három fent javasolt oldószer egyikében (4).
11. E vizsgálati módszer esetében a „vizsgálati vegyi anyag” kifejezés a vizsgálat tárgyát képező vegyi anyagra vonatkozik¹¹ és nem a rövid expozíciós idejű vizsgálati módszer anyagok és/vagy keverékek vizsgálatára való alkalmazhatóságához kapcsolódik.

A VIZSGÁLAT ELVE

12. A rövid expozíciós idejű vizsgálati módszer egy citotoxicitáson alapuló *in vitro* vizsgálat, amelyet 96 lyukú polikarbonát mikrolemezen tenyésztett, konfluens egyrétegű SIRC-sejteken (a Statens Serum Institut által előállított nyúl szaruhártya sejteken) hajtanak végre (4). A sejteket öt percen át kezelik a vizsgálati vegyi anyaggal, majd MTT-vizsgálattal mennyiségileg meghatározzák a citotoxicitást, amit a SIRC-sejtek relatív életképességként fejeznek ki (4). A sejtéletképesség csökkenése alapján jelzik előre a szemkárosodáshoz vezető potenciális káros hatásokat.
13. A vizsgálati jelentés szerint a nyúl szemébe csepegtetett oldatok 80 %-a három–négy percen belül kiürül a kötőhártyazsákon keresztül, míg az emberi szembe csepegtetett

¹ 2013 júniusában az OECD együttes ülése megállapodott abban, hogy ahol csak lehetséges, az új és átdolgozott vizsgálati módszerekben következetesebben alkalmazzák a „vizsgálati vegyi anyag” kifejezést a vizsgálat tárgyát képező vegyi anyagra.

oldatok több mint 80 %-a egy-két percen belül kiürül (10). A rövid expozíciós idejű vizsgálati módszer igyekszik közelíteni egymáshoz ezeket az expozíciós időket, és a citotoxicitás mint végpont révén értékeli, hogy a vizsgálati vegyi anyaggal történő ötperces kezelésüket követően milyen mértékű károsodás keletkezett a SIRC-sejtekben.

A JÁRTASSÁG BIZONYÍTÁSA

14. A vizsgálati módszerben ismertetett rövid expozíciós idejű eljárás rutinszerű alkalmazása előtt a laboratóriumoknak az 1. táblázatban ajánlott tizenegy anyag megfelelő besorolásával igazolniuk kell szakmai jártasságukat. Ezeket az anyagokat úgy választották ki, hogy a nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálat (405. vizsgálati iránymutatás) eredményei és az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti osztályozási rendszer (1) alapján a súlyos szemkárosodási vagy szemirritációs válaszreakciók teljes tartománya szempontjából reprezentatívak legyenek. A kiválasztás másik kritériuma az volt, hogy az anyagok kereskedelmi forgalomban beszerezhetők legyenek, azokra vonatkozóan magas minőségű *in vivo* referenciaadatok álljanak rendelkezésre, és a rövid expozíciós idejű vizsgálati módszerből származó, magas minőségű *in vitro* adatok álljanak rendelkezésre (3). Ha a jegyzékben szereplő valamely anyag nem áll rendelkezésre, illetve ha indokolható, megfelelő *in vivo* és *in vitro* referenciaadatokkal rendelkező más anyag is használható, amennyiben kiválasztása az itt ismertetett kritériumok szerint történik.

1. táblázat: A jártassági tesztanyagok jegyzéke

Anyag	CAS-szám	Kémiai osztály ¹	Halmazállapot	<i>In vivo</i> ENSZ-GHS/CLP kat. ²	Rövid expozíciós idejű vizsgálat oldószere	Rövid expozíciós idejű vizsgálat ENSZ-GHS/CLP kat.
Benzalkónium-klorid (10 %, vizes oldat)	8001-54-5	Óniumvegyület	Folyadék	1. kategória	Sóoldat	1. kategória
Triton X-100 (100 %)	9002-93-1	Éter	Folyadék	1. kategória	Sóoldat	1. kategória
Acid Red 92	18472-87-2	Heterociklikus vegyület; Brómvegyület; Klórvegyület	Szilárd	1. kategória	Sóoldat	1. kategória
Nátrium-hidroxid	1310-73-2	Lúg; Szervetlen vegyi anyag	Szilárd	1. kategória ³	Sóoldat	1. kategória

Butirolakton	96-48-0	Lakton; Heterociklikus vegyület	Folyadék	2A. kategória (CLP szerinti 2. kategória)	Sóoldat	Előrejelzés nem végezhető
1-oktanol	111-87-5	Alkohol	Folyadék	2A./B. ⁴ kategóri a (CLP szerinti 2. kategória)	Ásványolaj	Előrejelzés nem végezhető
Ciklopentanol	96-41-3	Alkohol; Szénhidrogén, ciklikus	Folyadék	2A./B. ⁵ kategóri a (CLP szerinti 2. kategória)	Sóoldat	Előrejelzés nem végezhető
2-etoxietil-acetát	111-15-9	Alkohol; Éter	Folyadék	Kategória nélküli	Sóoldat	Kategória nélküli
Dodekán	112-40-3	Szénhidrogén, aciklikus	Folyadék	Kategória nélküli	Ásványolaj	Kategória nélküli
Metil-izobutil-ke-ton	108-10-1	Keton	Folyadék	Kategória nélküli	Ásványolaj	Kategória nélküli
n,n-Dimetil- guanidin-szulfát	598-65-2	Amidin; Kénvegyület	Szilárd	Kategória nélküli	Sóoldat	Kategória nélküli

Rövidítések: CAS-szám = Vegyianyag Nyilvántartási Szolgálat (CAS) nyilvántartási szám.

¹A kémiai osztályba sorolásra a NICEATM korábbi publikációiban szereplő információk alapján került sor, illetve ilyen információk hiányában a Medicine's Medical Subject Headings (MeSH[®]) nemzeti könyvtárának adatai alapján (a ChemIDplus[®]-on [Nemzeti Orvostudományi Könyvtár] keresztül, elérhető a <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/> címen), az anyagok szerkezete pedig a NICEATM alapján került meghatározásra.

²A nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálat (az OECD 405. vizsgálati iránymutatása) eredményei alapján és az ENSZ-GHS/CLP-rendelet (1) felhasználásával.

³Az 1. kategóriába sorolásának alapja a 100 %-os nátrium-hidroxid bőrkorróziós hatása (bőrkorróziós hatású jártassági tesztanyagként szerepel az OECD 435. vizsgálati iránymutatásában) és az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategória kritériumai (1).

⁴A 2A. vagy 2B. kategóriába sorolás az ENSZ-GHS rendszerének a két kategória megkülönböztetésére szolgáló kritériuma értelmezésétől függ, azaz hat állatból kettőnél, illetve hat állatból négyenél a hetedik napig fennmaradó hatások szükségesek a 2A. kategóriába soroláshoz. Az *in vivo* adatbázis 2 tanulmányon alapul, amelyek mindegyikét három állaton végezték el. Az egyik tanulmányban hátról két állaton a 7. napon is tapasztalhatóak voltak a hatások, ami igazolta a 2A. kategóriába sorolást (11), míg a második tanulmányban mindhárom állatnál minden végpont teljesen meggyógyult (a hatást értékelő pontszám nulla volt), így az anyagot a 2B. kategóriába sorolták (12).

⁵A 2A. vagy 2B. kategóriába sorolás az ENSZ-GHS rendszerének a két kategória megkülönböztetésére szolgáló kritériuma értelmezésétől függ, azaz három állatból egynél, illetve három állatból kettőnél a hetedik napig fennmaradó hatások szükségesek a 2A. kategóriába soroláshoz. Az *in vivo* vizsgálatot három állaton végezték. Az egy állaton megfigyelt szaruhártya-opálódástól és kötőhártya-vörösségtől eltekintve minden végpont a 7. napra vagy már korábban teljesen begyógyult (a hatást értékelő pontszáma nulla volt). Annak az egy állatnak, amely nem gyógyult meg teljesen a hetedik napra, mind a szaruhártya opálódását, mind a kötőhártya vörösségét értékelő pontszáma 1 volt (a 7. napon), majd a 14. napra teljesen meggyógyult (11).

ELJÁRÁS

Egyrétegű sejtenyészet elkészítése

15. A rövid expozíciós idejű vizsgálati módszerhez nyúl szaruhártya eredetű sejtvonalat, SIRC-et kell használni. Ajánlatos a SIRC-sejteket egy megfelelő minősítéssel

rendelkező sejtbankból, például az Amerikai Fajtakultúra Gyűjteményből (CCL60) beszerezni.

16. A SIRC-sejteket 10 % magzati borjú szérummal (FBS), 2 mM L-glutaminnal, 50–100 egység/ml penicillinnel és 50–100 µg/ml sztreptomicinnel kiegészített Eagle-féle minimum esszenciális tápfolyadékot (MEM) tartalmazó sejtenyészítő edényben, valamint 37 °C-os, 5 %-os CO₂-tartalmú és vízgőzzel telített környezetben kell tenyészteni. A sejtenyészítő edényben konfluenssé vált sejteket tripszin-etilén-diamin-tetraecetsavas oldattal fel kell szuszpendálni, sejtkaparó használatával vagy anélkül. A rutinszerű vizsgálat megkezdése előtt a sejteket (2–3 passzálassal) felszaporítják a sejtenyészítő edényben, felolvasztás után azonban legfeljebb 25 passzálig tartják fenn.
17. Ezt követően a rövid expozíciós idejű vizsgálatban való felhasználásra kész sejteket megfelelő sűrűségben előkészítik, majd kiszélesztik 96 lyukú lemezekbe. A sejtek ajánlott kiszélesztési sűrűsége lyukanként $6,0 \times 10^3$ sejt, ha a sejtek a kiszélesztést követő negyedik napon kerülnek felhasználásra, illetve lyukanként $3,0 \times 10^3$ sejt, ha a sejteket a kiszélesztést követő ötödik napon használják fel, a tenyésztéshez használt térfogat 200 µl. A rövid expozíciós idejű vizsgálatához használt, megfelelő sűrűségben kiszélesztett sejtek a vizsgálat idejére, vagyis az átoltást követő negyedik vagy ötödik napra 80 %-ot meghaladó konfluenciával rendelkeznek majd.

A vizsgálati vegyi anyagok és a kontrollanyagok alkalmazása

18. A vizsgálati vegyi anyagok feloldásához vagy szuszpendálásához alkalmazott oldószer tekintetében a fiziológiás sóoldat legyen az első választás. Amennyiben a vizsgálati vegyi anyag rosszul oldódik, vagy legalább öt percig nem lehet egyenletesen szuszpendálni a sóoldatban, akkor az 5 % DMSO-t (CAS-száma: 67-68-5) tartalmazó sóoldat legyen a második választás. Azon vizsgálati vegyi anyagok esetében, amelyek sem sóoldatban, sem 5 % DMSO-t tartalmazó sóoldatban nem oldhatók vagy nem szuszpendálhatók egyenletesen legalább öt percig, az ásványolaj (CAS-száma: 8042-47-5) legyen a harmadik választás.
19. A vizsgálati vegyi anyagot 5 tömegszázalékos koncentrációban feloldják vagy egyenletesen szuszpendálják a választott oldószerben, majd tízszeres oldatsorozatot létrehozva további hígítással elkészítik 0,5 %-os és 0,05 %-os koncentrációját. Minden vizsgálati vegyi anyagot tesztelni kell 5 %-os és 0,05 %-os koncentrációban is. A 96 lyukú lemezen fenntartott sejtkultúrákat szobahőmérsékleten öt percen át kezelik a lyukanként 200 µl mennyiségű vizsgálati vegyi anyag 5 %-os vagy 0,05 %-os koncentrációjú oldatával (vagy szuszpenziójával). A vizsgálati vegyi anyagok (egy vagy több összetevőből álló anyagok, illetve keverékek) nagyjából tisztának tekintendők, ha a vizsgálati módszerben meghatározottak szerint hígítják vagy szuszpendálják őket, függetlenül a valós tisztaságtól.

20. A 16. pontban ismertetett tápoldatot kell vivőanyagok kontrollként használni az összes ismétlés valamennyi lemezén. Emellett a sejteket az összes ismétlés minden lemezén vizsgálni kell oldószeres kontrollmintákban is. A 18. pontban felsorolt oldószerekről bizonyítást nyert, hogy nem befolyásolják károsan a SIRC-sejtek életképességét.
21. A rövid expozíciós idejű vizsgálati módszerben az összes ismétlés valamennyi lemezén 0,01 % nátrium-lauril-szulfátot (SLS) tartalmazó sóoldatot kell használni pozitív kontrollként. A pozitív kontroll sejteleképességének meghatározása érdekében minden ismétlés összes lemezének tartalmaznia kell egy sóoldatos oldószeres kontrollt is.
22. Egy vakpróbára is szükség van az optikai sűrűség kompenzálásának meghatározásához, a vakpróbához használt lyukak csak foszfátpuffert tartalmazó sóoldatot tartalmaznak, nincs bennük se kalcium és magnézium (PBS-), se sejt.
23. Minden egyes mintát (az 5 %-os és 0,05 %-os koncentrációjú vizsgálati vegyi anyagot, a tápoldatos kontrollt, az oldószeres kontrollt és a pozitív kontrollt) minden ismétlés során triplikátumban kell vizsgálni úgy, hogy a sejteket szobahőmérsékleten öt percig kezelik a megfelelő vizsgálati vagy kontrollanyag 200 µl-ével.
24. A referenciaanyagok jól használhatók egy adott vegyi anyag- vagy termékosztályba tartozó ismeretlen vegyi anyagok szemirritációs hatásának értékelésére vagy valamely szemirritációs anyag relatív irritatív hatásának az irritatív hatás egy adott tartományán belüli értékelésére.

A sejtek életképességének mérése

25. A kezelést követően a sejteket kétszer átmoszák 200 µl foszfátpuffert tartalmazó sóoldattal, majd hozzáadnak 200 µl MTT-oldatot (0,5 mg MTT/ml tápoldat). Két óra inkubációt (37 °C, 5 % CO₂) követően az MTT-oldatot leszűrjük, majd az MTT-formazán kivonásához 200 µl 0,04 N izopropanolos sósavval 60 percen át kezelik sötétben és szobahőmérsékleten, végül 570 nm-en mikrotiterlemez-olvasóval megméri az MTT-formazán oldat abszorbanciáját. A vizsgálati vegyi anyagok csak abban az esetben befolyásolják az MTT-vizsgálat eredményét (színező vagy közvetlen MTT-redukáló hatásuk révén), ha a kezelést követő átmosás után jelentős mennyiségű vizsgálati vegyi anyag marad a vizsgálati rendszerben, ami előfordul a 3D-s rekonstruált emberi szaruhártya modell vagy a rekonstruált emberi felhámmodell szövetei esetén, azonban a rövid expozíciós idejű vizsgálati módszerben használt 2D-s sejtkultúrákra nem jellemző.

Az eredmények értelmezése és az előrejelzési modell

26. Ezt követően az egyes vizsgálati vegyi anyagokra vonatkozó optikai sűrűség (OD) értéket kell felhasználni a 100 %-nak vett oldószeres kontrollhoz viszonyított

sejtéletkéesség kiszámításához. A százalékban kifejezett relatív sejtéletkéességet úgy számolják ki, hogy a vizsgálati vegyi anyag OD-értékét elosztják az oldószeres kontroll OD-értékével, miután mindkét értékből kivonták a vakpróba OD-értékét.

$$\text{Sejtéletkéesség (\%)} = \frac{(a \text{ vizsgálati vegyi anyag } OD_{570} \text{ értéke}) - (a \text{ vakpróba } OD_{570} \text{ értéke})}{(a \text{ oldószeres kontroll } OD_{570} \text{ értéke}) - (a \text{ vakpróba } OD_{570} \text{ értéke})} \times 100$$

Hasonlóképpen határozzák meg az egyes oldószeres kontrollok százalékban kifejezett relatív sejtéletkéességét is: minden oldószeres kontroll OD-értékét elosztják a tápoldatos kontroll OD-értékével, miután mindkét értékből kivonták a vakpróba OD-értékét.

27. Három egymástól független ismétlést kell végezni, mindhárom triplikátum lyukkal (vagyis n=9). Az egyes független ismétléseken belül minden vizsgálati vegyi anyaghoz és oldószeres kontrollhoz tartozó három lyuk számtani átlaga alapján számítják ki a relatív sejtéletkéesség számtani átlagát. A sejtéletkéesség végső számtani átlagát a három független ismétlésből határozzák meg.

28. A vizsgálati vegyi anyagok súlyos szemkárosodást okozóként (az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategóriába tartozóként), valamint a szemirritáció vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében besorolást nem igénylő (az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerint kategória nélküli) vegyi anyagokként történő meghatározására szolgáló sejtéletkéességi határértékek az alábbiakban szerepelnek.

2. táblázat: A rövid expozíciós idejű vizsgálati módszer előrejelzési modellje

Sejtéletkéesség		ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti besorolás	Alkalmazási kör
5 %-nál	0,05%-nál		
> 70 %	> 70 %	Kategória nélküli	Anyagok és keverékek, kivéve: i) a 6 kPa-t meghaladó gőznyomású rendkívül illékony anyagok ¹ , és ii) a felületaktív anyagoktól eltérő szilárd vegyi anyagok (anyagok és keverékek) és a kizárólag felületaktív anyagokból álló keverékek.
≤ 70 %	> 70 %	Előrejelzés nem végezhető	Nem alkalmazandó
≤ 70 %	≤ 70 %	1. kategória	Anyagok és keverékek ²

¹A 6 kPa-t meghaladó gőznyomású anyagokat tartalmazó keverékeket az esetleges alulkategorizálás elkerülése érdekében körültekintően kell értékelni, és előrejelzett besorolásukat eseti alapon kell megindokolni.

²Elsősorban egy összetevőből álló anyagok vizsgálatából nyert eredmények alapján, bár a keverékek vizsgálatára vonatkozóan is rendelkezésre állnak korlátozott mennyiségű adatok. A vizsgálati módszer mindazonáltal a több összetevőből álló anyagok és keverékek vizsgálatára technikailag alkalmazható. E vizsgálati módszer tervezett szabályozási célt szolgáló adatgenerálás érdekében, keveréken történő alkalmazása előtt meg kell vizsgálni, hogy az megfelelő eredményeket biztosíthat-e erre a célra, és ha igen, miért. Ilyen megfontolások nem szükségesek, ha létezik a keverék

vizsgálatára vonatkozó szabályozási követelmény.

Elfogadhatósági kritériumok

29. A vizsgálat eredményei akkor ítélték elfogadhatónak, amikor az alábbi kritériumok mindegyike teljesül:

- a) A tápfolyadék (sejtekről leszívott tápoldat) kontroll optikai sűrűsége a vakpróba optikai sűrűségének kivonása után legalább 0,3.
- b) Az oldószeres kontroll tápoldatos kontrollhoz viszonyított életképessége legalább 80 %. Amennyiben az egyes ismétlésekben több oldószeres kontrollt végeznek, minden kontrollnak 80 %-ot meghaladó sejtleletképességet kell eredményeznie ahhoz, hogy minősíteni lehessen az adott oldószerrel tesztelt vizsgálati vegyi anyagokat.
- c) A pozitív kontroll (0,01 % SLS) sejtleletképessége a dokumentált adatok átlaga körüli két szóráson belül van. A pozitív kontroll alsó és felső elfogadhatósági határértékét rendszeresen, vagyis háromhavonta, illetőleg a vizsgálatokat rendszertelenül, azaz havi egy alkalomnál ritkábban végző laboratóriumok esetében minden elfogadható vizsgálat után aktualizálni kell. Amennyiben valamely laboratórium nem végez elegendő számú kísérletet a pozitív kontrollok statisztikailag megbízható eloszlásának megállapítására, akkor elfogadható, hogy amíg az első rutinszerűen végzett belső vizsgálatok alapján meghatározzák az eloszlást, a módszer kidolgozói által megállapított alsó és felső elfogadhatósági határértékeket használják, amelyek laboratóriumuk dokumentált adatai szerint 21,1 % és 62,3 %.
- d) A három független ismétlés alapján meghatározott végső sejtleletképesség szórása sem a vizsgálati vegyi anyag 5 %-os, sem a 0,05 %-os koncentrációjánál nem érheti el a 15 %-ot.

Ha e kritériumok közül egy vagy több nem teljesül, az eredményeket érvénytelennek kell nyilvánítani, és másik három független ismétlést kell végezni.

ADATOK ÉS JELENTÉS

Adatok

30. Minden ismétlés tekintetében az egyes lyukakra vonatkozó adatokat (pl. a sejtleletképességi értékeket), az összesített átlagot, a szórást és a besorolást bele kell foglalni a vizsgálati jelentésbe.

Vizsgálati jelentés

31. A vizsgálati jelentésnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálati vegyi anyag és kontrollként szolgáló anyagok

- Egy összetevőből álló anyag: kémiai azonosítás, például IUPAC- vagy CAS-névvel, CAS-szám(ok), SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet és/vagy más azonosítók alapján;
- Több összetevőből álló anyagok, UVCB-k és keverékek: amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosságával (lásd fent), tisztaságával, mennyiségi előfordulásával és releváns fizikai-kémiai tulajdonságaival (lásd fent) jellemezve; amennyiben rendelkezésre állnak;
- fizikai megjelenés, illékonyság, pH-érték, LogP-érték, molekulatömeg, kémiai osztály, valamint a vizsgálat elvégzése szempontjából releváns további fizikai-kémiai tulajdonságok, amennyiben rendelkezésre állnak;
- tisztaság, adott és a gyakorlatban megvalósítható esetben a szennyeződések kémiai azonosítója stb.;
- vizsgálat előtti kezelés, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés);
- tárolási feltételek és stabilitás, amennyiben rendelkezésre állnak.

Vizsgálati módszer körülményei és eljárásai

- a megbízó, a vizsgálatot végző laboratórium és a vizsgálatvezető neve és címe;
- az alkalmazott vizsgálati módszer leírása;
- az alkalmazott sejtvonala, annak eredete, valamint a vizsgálatához használt sejtek passzálásainak száma és konfluenciájának mértéke;
- az alkalmazott vizsgálati eljárás részletei;
- az alkalmazott ismétlések és replikátumok száma;
- a vizsgálati vegyi anyag alkalmazott koncentrációi (ha eltér az ajánlottaktól);
- az oldószer kiválasztásának indoklása minden egyes vizsgálati vegyi anyag esetében;
- a vizsgálati vegyi anyagnak való expozíció időtartama (ha eltér az ajánlottól);
- a vizsgálati eljárás bármilyen változtatásának leírása;
- az alkalmazott értékelési és döntési kritériumok leírása;
- hivatkozás a pozitív történeti kontrollok átlagértékére és szórásaira;
- a vizsgálati módszer végrehajtásában való laboratóriumi jártasság bizonyítása (például jártassági tesztanyagok vizsgálatával) vagy a vizsgálati módszer idővel reprodukálható végrehajtásának bizonyítása.

Eredmények

- A replikátum lyukankénti OD-értékek, az egyes független ismétlések OD-értékeinek számtani átlaga, az egyes független ismétlések sejtleletkéességi aránya és a három

ismétlés alapján meghatározott átlagos sejtelképességi arány és szórás táblázatba foglalása az összes vizsgálati vegyi anyagra és kontrollanyagra, valamint minden vizsgált koncentrációra vonatkozólag;

- a tápoldatos, az oldószeres és a pozitív kontroll eredményei, amelyek igazolják a vizsgálat elfogadhatósági kritériumainak való megfelelést;
- a megfigyelt egyéb hatások leírása;
- az alkalmazott előrejelzési modellel/döntési kritériumokkal összhangban, az összesített eredmények alapján kialakított osztályozás.

Az eredmények értékelése

Következtetések

SZAKIRODALOM

- (1) Egyesült Nemzetek Szervezete (ENSZ) (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. Elérhető a következő címen: 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, pp.1855-1869.
- (7) ICCVAM (2013). Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document, NIH. Elérhető a következő címen: [http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf].
- (8) E melléklet B.5., Akut szemirritáció/szemkorrózió című fejezete.
- (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)), Brussels, Belgium.

- (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). Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.
- (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). Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

Függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Pontosság: a vizsgálati módszerrel kapott eredmények és az elfogadott referenciaértékek közötti egyezés mértéke. A vizsgálati módszer teljesítményének mutatója, valamint a relevanciájának egyik megítélési szempontja. E kifejezést gyakran használják az egyezés megfelelőjeként, amely egy adott vizsgálati módszer alkalmazásakor az azonos eredmények arányát fejezi ki (13).

Referencia-vegyianyag: a vizsgálati vegyi anyaggal való összevetéshez referenciaként használt anyag. A referencia-vegyianyagnak a következő tulajdonságokkal kell rendelkeznie: i. állandó és megbízható forrás(ok)ból kell származnia; ii. a vizsgálati vegyi anyagok osztályához hasonló szerkezettel és funkcionalitással kell rendelkeznie; iii. ismert fizikai-kémiai tulajdonságokkal kell rendelkeznie; iv. rendelkezésre kell állnia az ismert hatásait alátámasztó adatoknak; és v.. a kívánt hatástartományban ismert hatásúnak kell lennie.

Alulról építkező megközelítés: a szemirritáció vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében feltehetőleg besorolást nem igénylő vizsgálati vegyi anyag esetén alkalmazott lépcsőzetes megközelítés, amely a besorolást nem igénylő vegyi anyagok (negatív eredmény) más vegyi anyagokhoz (pozitív eredmény) viszonyított meghatározásával kezdődik.

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Szemirritáció: a vizsgálati vegyi anyagnak a szem elülső felszínén történő alkalmazását követően megjelenő és az alkalmazástól számított 21 napon belül teljes mértékben visszafordítható szemelváltozás. Megfelel a „reverzibilis szemkárosodás” fogalmának és az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 2. kategóriának.

Álnegatív arány: a vizsgálati módszer alkalmazása során tévesen negatívnak minősített pozitív vegyi anyagok részaránya. A vizsgálati módszer teljesítőképességének egyik mutatója.

Álpozitív arány: a vizsgálati módszer alkalmazása során tévesen pozitívnak minősített negatív vegyi anyagok részaránya. A vizsgálati módszer teljesítőképességének egyik mutatója.

Veszély: valamely anyag vagy helyzet azon sajátossága, hogy káros hatásokat képes előidézni az élő szervezet, rendszer vagy (al)populáció anyagnak való expozíciójakor.

Tápoldatos kontroll: a vizsgálati rendszer valamennyi alkotóelemét tartalmazó kezeletlen replikátum. Ezt a mintát a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt mintákkal és más kontrollmintákkal együtt kell feldolgozni annak megállapításához, hogy az oldószer kölcsönhatásba lép-e a vizsgálati rendszerrel.

Keverék: két vagy több anyagot tartalmazó elegy vagy oldat.

Egy összetevőből álló anyag: olyan, a mennyiségi összetétele alapján meghatározott anyag, amelyben az egyik fő összetevő legalább 80 tömegszázalékban van jelen.

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid; tiazolil kék tetrazólium-bromid.

Több összetevőből álló anyag: olyan, a mennyiségi összetétele alapján meghatározott anyag, amelyben egynél több fő összetevő legalább 10 tömegszázalékban, de 80 tömegszázalékot nem meghaladó koncentrációban van jelen. A több összetevőből álló anyag gyártási folyamat eredménye. A keverék és a több összetevőből álló anyag között az a különbség, hogy a keverék két vagy több anyag összekeverésével, kémiai reakció nélkül jön létre. A több összetevőből álló anyag kémiai reakció eredménye.

OD: optikai sűrűség.

Pozitív kontroll a vizsgálati rendszer valamennyi alkotóelemét tartalmazó, ismert pozitív hatást kiváltó anyaggal kezelt replikátum. Annak biztosítása érdekében, hogy a pozitív kontrollban jelentkező hatás időbeli változását fel lehessen mérni, a pozitív hatás nem lehet túlságosan erőteljes.

Relevancia: a vizsgálat és a vizsgált hatás kapcsolatát adja meg, valamint azt, hogy van-e a vizsgálatnak az adott cél szempontjából értelme és haszna. Azt tükrözi, hogy a vizsgálat mennyire pontosan méri vagy jelzi előre a vizsgált biológiai hatást. A relevancia meghatározása során a vizsgálati módszer pontosságát (az eredmények egyezését) figyelembe kell venni (10).

Megbízhatóság: a vizsgálati módszer laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti időbeli reprodukálhatóságának mértéke ugyanazon protokoll alkalmazása mellett. Megállapítása a laboratóriumon belüli és a laboratóriumok közötti reprodukálhatóság, valamint a laboratóriumon belüli megismételhetőség kiszámításával történik (13).

Érzékenység: az összes olyan pozitív/aktív vegyi anyag aránya, amelyet a vizsgálat helyesen sorolt be. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (10).

Súlyos szemkárosodás: a vizsgálati vegyi anyagnak a szem külső felületére való juttatását követően olyan szövetkárosodás kialakulása vagy a látás olyan súlyos fizikai romlása, amely a beadást követően 21 napon belül nem fordítható vissza teljes mértékben. Megfelel az „irreverzibilis szemkárosodás” fogalmának és az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategóriának.

Oldószeres/vivőanyagok kontroll: a vizsgálati rendszer valamennyi alkotóelemét az oldószerrel vagy vivőanyaggal együtt tartalmazó nem kezelt minta, amelyet a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt mintákkal és más kontrollmintákkal együtt kell feldolgozni az ugyanazon oldószerben feloldott vagy ugyanazon vivőanyaggal felvitt vizsgálati vegyi anyaggal kezelt minták kiindulási értékeinek megállapítása érdekében. Párhuzamos tápoldatos kontrollal elvégzett vizsgálata esetén ez a minta azt is

bizonyítja, hogy az oldószer vagy vivőanyag kölcsönhatásba lép-e a vizsgálati rendszerrel.

Specificitás: a vizsgálat elvégzésével helyesen besorolt összes negatív/inaktív vegyi anyag aránya. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (13).

Anyag: olyan természetes állapotban előforduló vagy gyártási eljárásból származó kémiai elem és vegyületei, amely a stabilitásának megőrzéséhez szükséges adalékanyagot és az alkalmazott eljárásból származó szennyező anyagokat is tartalmazhat, de nem tartalmaz olyan oldószert, amely az anyag stabilitásának befolyásolása vagy összetételének megváltoztatása nélkül elkülöníthető.

Felületaktív anyag: olyan vegyi anyag (például mosószer), amely csökkentheti a folyadékok felületi feszültségét, és így lehetővé teszi, hogy habozzanak vagy áthatoljanak szilárd anyagokon; nedvesítőszerként is ismert.

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

Többszintű vizsgálati stratégia: olyan lépcsőzetes vizsgálati stratégia, amelynek keretében a vizsgálati vegyi anyagra vonatkozó valamennyi információt meghatározott sorrendben áttekintik, és az egyes szinteken az adatok bizonyító erejének elemzésével meghatározzák, hogy a következő szintre való továbblépés előtt a veszélyességi osztályozásra vonatkozó döntéshez elegendő információ áll-e rendelkezésre. Ha a vizsgálati vegyi anyag irritatív hatása a rendelkezésre álló információk alapján megállapítható, további vizsgálatra nincs szükség. Ha a vizsgálati vegyi anyag irritatív hatása a rendelkezésre álló információk alapján nem állapítható meg, több lépcsőben egymás után állatkísérleteket kell végezni mindaddig, amíg az egyértelmű besorolás meg nem állapítható.

Felülről építkező megközelítés: a feltehetőleg súlyos szemkárosodást okozó vizsgálati vegyi anyag esetén alkalmazott lépcsőzetes megközelítés, amely a súlyos szemkárosodást okozó vegyi anyagok (pozitív eredmény) más vegyi anyagokhoz (negatív eredmény) viszonyított meghatározásával kezdődik.

A vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének az Egyesült Nemzetek Szervezete által globálisan harmonizált rendszere (ENSZ-GHS): a vegyi anyagoknak (anyagoknak és keverékeknek) a fizikai, egészségi és környezeti veszélyek szabványosított típusai és szintjei szerinti osztályokba sorolására és megfelelő kommunikációs elemekkel (például piktogramokkal, figyelmeztetésekkel, figyelmeztető mondatokkal, óvintézkedésekre vonatkozó mondatokkal és biztonsági adatlapokkal) történő jelölésére javaslatokat megfogalmazó rendszer, amelynek célja, hogy az emberek (köztük a munkáltatók, a munkavállalók, a fuvarozók, a fogyasztók és a sürgősségi segítségnyújtók) és a környezet megóvása érdekében egységesítse a vegyi anyagok káros hatásaira vonatkozó információk továbbítását (1).

ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategória: lásd: „Súlyos szemkárosodás”.

ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 2. kategória: lásd: „Szemirritáció”.

ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerint kategória nélküli: az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. és 2. kategóriába (illetve az ENSZ-GHS 2A. vagy 2B. kategóriába) nem besorolt vegyi anyagok.

UVCB: ismeretlen vagy változó összetételű anyagok, komplex reakciótermékek vagy biológiai anyagok.

B.69. AZ EMBERI SZARUHÁRTYÁHOZ HASONLÓ REKONSTRUÁLT FELHÁMON (RhCE) ALAPULÓ VIZSGÁLATI MÓDSZER A SZEMIRRITÁCIÓ VAGY A SÚLYOS SZEMKÁROSODÁS TEKINTETÉBEN BESOROLÁST NEM IGÉNYLŐ VEGYI ANYAGOK AZONOSÍTÁSÁRA

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 492. vizsgálati iránymutatásában (2017) leírt módszerrel. A *súlyos szemkárosodás* az Egyesült Nemzetek Szervezete (ENSZ) által kidolgozott, vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének globálisan harmonizált rendszerében (GHS) (1), valamint az Európai Unió (EU) anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról szóló 1272/2008/EK rendeletében (CLP-rendelet)¹ meghatározottak szerint a vizsgálati vegyi anyagnak a szem külső felületére való juttatását követően olyan szövetkárosodás kialakulása vagy a látás olyan súlyos fizikai romlása, amely a beadást követően 21 napon belül nem fordítható vissza teljes mértékben. Szintén az ENSZ-GHS és a CLP-rendelet szerint a *szemirritáció* a vizsgálati vegyi anyagnak a szem elülső felszínén történő alkalmazását követően megjelenő és az alkalmazástól számított 21 napon belül teljes mértékben visszafordítható szemelváltozásokra utal. A súlyos szemkárosodást okozó vizsgálati vegyi anyagok az ENSZ-GHS és a CLP-rendelet szerinti 1. kategóriába, míg a szemirritációt kiváltó vizsgálati vegyi anyagok az ENSZ-GHS és a CLP-rendelet szerinti 2. kategóriába sorolandók. A szemirritáció vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében be nem sorolt vizsgálati vegyi anyagok olyan vegyi anyagok, amelyek nem tesznek eleget az ENSZ-GHS és a CLP-rendelet szerinti 1. vagy 2. (2A. vagy 2B.) kategóriába való besorolás követelményeinek, vagyis azokra az ENSZ-GHS és a CLP-rendelet szerint kategória nélkülként történik hivatkozás.
2. A súlyos szemkárosodás/szemirritáció vizsgálata jellemzően kísérleti állatokon történő vizsgálatot foglal magában (B.5. vizsgálati módszer (2)). A legmegfelelőbb vizsgálati módszer kiválasztásához és e vizsgálati módszer alkalmazásához a súlyos szemkárosodásra vonatkozó és bőrirritációs vizsgálatok és értékelések integrált megközelítéseiről szóló OECD-iránymutatás nyújt támpontokat (39).
3. Ez a vizsgálati módszer egy olyan *in vitro* eljárást ismertet, amely lehetővé teszi a szemirritáció vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében besorolást és címkézést nem

¹ Az Európai Parlament és a Tanács 1272/2008/EK rendelete (2008. december 16.) az anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról, a 67/548/EGK és az 1999/45/EK irányelv módosításáról és hatályon kívül helyezéséről, valamint az 1907/2006/EK rendelet módosításáról (HL L 353/1., 2008.12.31.).

igénylő vegyi anyagok (anyagok és keverékek) ENSZ-GHS és CLP-rendelet szerinti azonosítását. A módszerben az emberi szaruhártyahámhoz hasonló rekonstruált felhámot (RhCE) alkalmaznak, amely nagy hasonlósággal modellezi az emberi szaruhártya felhámjának szövettani, morfológiai, biokémiai és fiziológiai tulajdonságait. Négy másik *in vitro* vizsgálati módszert validáltak, nyilvánítottak tudományosan megalapozottnak és fogadtak el, a B.47. (3), B.48. (4), B.61. (5) és B.68. (6) vizsgálati módszert, amelyek mindegyike a súlyos szemkárosodással/szemirritációval mint az emberi egészség károsodásának egyik végpontjával foglalkozik.

4. E vizsgálati módszer két validált, kereskedelmi forgalomban kapható RhCE-modellt alkalmazó vizsgálatot foglal magában. Az EpiOcular™ szemirritációs vizsgálat (EIT) és a SkinEthic™ emberi szaruhártya felhám (HCE) használatán alapuló szemirritációs vizsgálat (EIT) alkalmazásával elvégezték a szemirritáció/súlyos szemkárosodás felmérésének validálási tanulmányait (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13). Mindkét vizsgálat kereskedelmi forgalomban beszerezhető RhCE-szövetkonstrukciót alkalmaz vizsgálati rendszerként, amelyre az alábbiakban validált referenciamódszerként – mint VRM1 és VRM2 – történik hivatkozás. E validálási tanulmányok és független szakértői vizsgálatuk (9) (12) alapján megállapítást nyert, hogy az EpiOcular™ EIT és a SkinEthic™ HCE EIT képes megfelelően azonosítani az ENSZ-GHS szerint szemirritáció vagy súlyos szemkárosodás tekintetében besorolást és címkézést nem igénylő vegyi anyagokat (anyagokat és keverékeket egyaránt), és a vizsgálatok e célra történő alkalmazását tudományosan megalapozottnak tekintik és ajánlják (13).
5. Jelenleg általánosan elfogadott, hogy az előre látható jövőben egyetlen *in vitro* vizsgálati módszer sem tudja majd teljes körűen helyettesíteni a Draize-féle *in vivo* szemvizsgálatot (2) (14) a különböző kémiai osztályoknál felmerülő szemkárosodási/szemirritációs válaszreakciók teljes skálájának előrejelzésében. Előfordulhat azonban, hogy egy-egy (többszintű) vizsgálati stratégián, például az alulról/felülről építkező megközelítésen belüli több alternatív vizsgálati módszer stratégiai kombinációja teljes körűen helyettesíteni tudja a Draize-féle szemvizsgálatot (15). Az alulról építkező megközelítés (15) akkor alkalmazandó, amikor a meglévő információk alapján valamely vegyi anyag várhatóan nem okoz a besorolás szükségességéhez elegendő szemirritációt, míg a felülről építkező megközelítés (15) akkor alkalmazandó, amikor a meglévő információk alapján valamely vegyi anyag várhatóan súlyos szemkárosodást idéz elő. Az EpiOcular™ EIT és a SkinEthic™ HCE EIT vizsgálat ajánlott az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerint a szemirritáció vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében besorolást nem igénylő (kategória nélküli) vegyi anyagok további vizsgálatot nem igénylő azonosítására, olyan vizsgálati stratégia keretében, mint a Scott és munkatársai által javasolt alulról/felülről építkező megközelítés, például az alulról építkező megközelítés első

lépéseként, vagy a felülről építkező megközelítés egyik utolsó lépéseként (15). Az EpiOcular™ EIT és a SkinEthic™ HCE EIT azonban nem alkalmas az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategória (súlyos szemkárosodás) és az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 2. kategória (szemirritáció) megkülönböztetésére. Ezt a különbségtételt a vizsgálati stratégiai egy másik szintjén kell megvalósítani (15). Azok a vizsgálati vegyi anyagok, amelyeket az EpiOcular™ EIT vagy a SkinEthic™ HCE EIT vizsgálattal szemirritáció/súlyos szemkárosodás tekintetében besorolást igénylőként azonosítottak, végleges kategorizálásuk (ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti nem besorolt, 2. kategória vagy 1. kategória) érdekében további (*in vitro* és/vagy *in vivo*) vizsgálatokat tesznek szükségessé, például a B.47., B.48., B.61. vagy B.68. vizsgálati módszer alkalmazásával.

6. E vizsgálati módszer ismerteti azt az eljárást, amely felhasználható a vizsgálati vegyi anyagok szemet érintő veszélyességi potenciáljának értékelésére az alapján, hogy az MTT-vizsgálat mérései szerint (16) képesek-e RhCE szövetkonstrukcióban citotoxicitást kiváltani (lásd a 21. pontot). A vizsgálati vegyi anyaggal való kezelést követően az RhCE szövet életképességét a negatív kontrollanyaggal kezelt szövetekkel való összevetésben határozzák meg (életképességi arány), amelyet azután felhasználnak a vizsgálati vegyi anyag szemet érintő veszélyességi potenciáljának előrejelzéséhez.
7. Az EpiOcular™ EIT és a SkinEthic™ HCE EIT vizsgálatához hasonló RhCE-alapú, új vagy módosított *in vitro* vizsgálatok validálásának megkönnyítéséhez rendelkezésre állnak az OECD 34. vizsgálati iránymutatásában (18) szereplő elvekkel összhangban kidolgozott teljesítményszabványok (17), amelyek lehetővé teszik az OECD 492. vizsgálati iránymutatásának időben történő módosítását az új vizsgálatok e vizsgálati iránymutatásba való beépítéséhez. Az adatok OECD-megállapodás szerinti kölcsönös elfogadása csak a teljesítményszabványoknak megfelelően validált vizsgálatok esetében lesz garantált, ha e vizsgálatokat az OECD felülvizsgálta és belefoglalta a megfelelő vizsgálati iránymutatásba.

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

8. A fogalommeghatározások az 1. függelékben találhatók.

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

9. Ez a vizsgálati módszer kereskedelmi forgalomban kapható, háromdimenziós RhCE-szövetkonstrukció használatán alapul, amelyet (az EpiOcular™ OCL-200 esetében) primér humán epidermális keratinocita sejtekből vagy (a SkinEthic™ HCE/S esetében) immortalizált humán szaruhártya felhámsejtekből állítottak elő. Az EpiOcular™ OCL-200 és a SkinEthic™ HCE/S RhCE szövetkonstrukciók

hasonlatosak az *in vivo* szaruhártya felhám háromdimenziós felépítéséhez, és e szövetkonstrukciókat a vizsgált faj sejtjeiből állították elő (19) (20). Emellett a vizsgálatok közvetlenül mérik a citotoxicitást, a vegyi anyag szaruhártyán történő áthatolása és az általa előidézett sejt- és szövetkárosodás alapján; ez a citotoxicitási reakció határozza azután meg az *in vivo* súlyos szemkárosodási/szemirritációs vizsgálat összesített eredményét. A sejtkárosodás számos hatásmechanizmuson keresztül valósulhat meg (lásd a 20. pontot), de a citotoxicitás fontos, ha nem elsődleges szerepet játszik egy adott vegyi anyag által kiváltott általános súlyos szemkárosodási/szemirritációs reakció mechanisztikus meghatározásában, ami a szövetkárosodás hátterében álló fizikai-kémiai folyamatoktól függetlenül *in vivo* többnyire a szaruhártya opázosodásában, szivárványhártya-gyulladásban, a kötőhártya vörösségében és/vagy kötőhártya-vizenyőben nyilvánul meg.

10. A vizsgálati módszert alátámasztó validálási tanulmányban vegyi anyagok széles skáláját tesztelték, köztük számos, kémiai típus, kémiai osztály, molekulatömeg, LogP-érték, kémiai szerkezet stb. szempontjából eltérő anyagot. Az EpiOcular™ EIT validációs adatbázisa összesen 113 vegyi anyagot tartalmazott, amelyek – az OECD QSAR-eszköztár alapján végzett egyik elemzése szerint – 95 különböző szerves funkciós csoportba tartoznak (8). E vegyi anyagok többsége egykomponensű anyag, de a tanulmány kiterjedt néhány több összetevőből álló anyagra is (azon belül 3 homopolimerre, 5 kopolimerre és 10 kvázi polimerre). Halmazállapotuk és az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti kategóriák tekintetében a 113 vizsgálati vegyi anyag a következőképpen oszlik meg: 13 1. kategóriába tartozó folyadék, 15 1. kategóriába tartozó szilárd anyag, 6 2A. kategóriába tartozó folyadék, 10 2A kategóriába tartozó szilárd anyag, 7 2B. kategóriába tartozó folyadék, 7 2B. kategóriába tartozó szilárd anyag, 27 kategória nélküli folyadék és 28 kategória nélküli szilárd anyag (8). A SkinEthic™ HCE EIT validációs adatbázisa összesen 200 vegyi anyagot tartalmazott, amelyek 165 különféle szerves funkciós csoportba tartoznak (8) (10) (11). E vegyi anyagok többsége egy összetevőből álló anyag, de a tanulmány kiterjedt néhány több összetevőből álló anyagra is (azon belül 10 polimerre). Halmazállapotuk és az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti kategóriák tekintetében a 200 vizsgálati vegyi anyag a következőképpen oszlik meg: 27 1. kategóriába tartozó folyadék, 24 1. kategóriába tartozó szilárd anyag, 19 2A. kategóriába tartozó folyadék, 10 2A kategóriába tartozó szilárd anyag, 9 2B. kategóriába tartozó folyadék, 8 2B. kategóriába tartozó szilárd anyag, 50 kategória nélküli folyadék és 53 kategória nélküli szilárd anyag (10) (11).
11. A vizsgálati módszer alkalmazható anyagokra és keverékekre, valamint szilárd anyagokra, folyadékokra, félszilárd anyagokra és viaszos anyagokra. A folyadékok lehetnek vizesek vagy nem vizesek; a szilárd anyagok lehetnek vízben oldódóak vagy oldhatatlanok. Ahol megoldható, a szilárd anyagokat alkalmazásuk előtt finom porrá kell őrölni; a mintát előzetesen nem szükséges más módon kezelni. Gázokat és

aeroszolókat validálási tanulmány keretében nem vizsgáltak. Bár elképzelhető, hogy ezek is vizsgálhatók az RhCE-technikával, a jelenlegi vizsgálati módszer nem engedi meg gázok és aeroszolok vizsgálatát.

12. Azok a vizsgálati vegyi anyagok, amelyek (jellegükből fakadóan vagy a kezelés után) ugyanabban a tartományban nyelik el a fényt, mint az MTT-formazán, és azok a vizsgálati vegyi anyagok, amelyek közvetlenül is képesek redukálni az MTT vitális festéket (MTT-formazánná), befolyásolhatják a szövet életképességének mérését, ennek korrigálása érdekében adaptált kontrollokra van szükség. Az esetlegesen szükséges adaptált kontrollok típusa függ a vizsgálati vegyi anyag által előidézett interferencia típusától és az MTT-formazán mennyiségének meghatározásához használt eljárástól (lásd a 36–42. pontot).
13. Az elővalidálási (21) (22) és a teljes körű validálási (8) (10) (11) tanulmányok eredményei igazolták, hogy az EpiOcular™ EIT és a SkinEthic™ HCE EIT egyaránt alkalmazható a vizsgálatok elvégzésében tapasztalattal nem rendelkező laboratóriumokban, továbbá a laboratóriumon belül és a laboratóriumok között is reprodukálható. E tanulmányok alapján az EpiOcular™ EIT vizsgálat 113 vegyi anyag adataira vonatkozó előrejelzéseinek egyezése alapján meghatározott várható reprodukálhatósági szintje a laboratóriumokon belül 95 %, a laboratóriumok között pedig 93 %. A SkinEthic™ HCE EIT vizsgálat 120 vegyi anyag adataira vonatkozó előrejelzéseinek egyezése alapján meghatározott várható reprodukálhatósági szintje a laboratóriumokon belül 92 %, a laboratóriumok között pedig 95 %.
14. Az EpiOcular™ EIT vizsgálat a szemirritáció vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében besorolást nem igénylő vegyi anyagok ENSZ-GHS és CLP-rendelet osztályozási rendszere szerinti azonosítására alkalmazható. A validálási tanulmányban (8) gyűjtött adatok alapján az EpiOcular™ EIT általános pontossága 80 % (112 vegyi anyag alapján), érzékenysége 96 % (57 vegyi anyag alapján), álnegatív aránya 4 % (57 vegyi anyag alapján), specificitása 63 % (55 vegyi anyag alapján) és álpozitív aránya 37 % (55 vegyi anyag alapján) a referenciaként szolgáló nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálatból (B.5. vizsgálati módszer) származó (2) (14), az ENSZ-GHS és a CLP-rendelet osztályozási rendszere szerint azonosított adatokkal való összevetésben. Abban a tanulmányban, amelyben az EpiOcular™ EIT vizsgálattal 97 folyékony mezőgazdasági vegyszerkészítményt teszteltek, a vizsgálati módszer e keveréktípus tekintetében hasonló teljesítményt nyújtott, mint a validálási tanulmány során (23). A 97 készítmény eloszlása a következő: 21 1. kategóriájú, 19 2A. kategóriájú, 14 2B. kategóriájú és 43 kategória nélküli anyag, amelyek besorolása a referenciaként szolgáló nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálatból (B.5. vizsgálati módszer) származó adatok alapján az ENSZ-GHS osztályozási rendszere szerint történt (2) (14). A besorolás általános pontossága 82 % (97 készítmény alapján), érzékenysége 91 % (54 készítmény alapján), álnegatív aránya 9 % (54 készítmény

alapján), specificitása 72 % (43 készítmény alapján) és álpozitív aránya 28 % (43 készítmény alapján) volt (23).

15. A SkinEthic™ HCE EIT vizsgálat a szemirritáció vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében besorolást nem igénylő vegyi anyagok ENSZ-GHS és CLP-rendelet osztályozási rendszere szerinti azonosítására alkalmazható. A validálási tanulmányban (10) (11) gyűjtött adatok alapján a SkinEthic™ HCE EIT általános pontossága 84 % (200 vegyi anyag alapján), érzékenysége 95 % (97 vegyi anyag alapján), álnegatív aránya 5 % (97 vegyi anyag alapján), specificitása 72 % (103 vegyi anyag alapján) és álpozitív aránya 28 % (103 vegyi anyag alapján) a referenciaként szolgáló nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálatból (B.5. vizsgálati módszer) származó (2) (14), az ENSZ-GHS és a CLP-rendelet osztályozási rendszere szerint azonosított adatokkal való összevetésben.
16. A két RhCE vizsgálat anyagoknál vagy keverékeknél elért álnegatív aránya belül marad azon a 12 %-os általános valószínűségi arányon, amellyel a vegyi anyagokat az ENSZ-GHS és a CLP-rendelet szerinti 2. kategóriájába vagy az ENSZ-GHS és a CLP-rendelet kategória nélküli csoportjába sorolják a Draize-féle *in vivo* szemvizsgálatban, ismételt vizsgálatok esetén; ez a módszerre jellemző vizsgálaton belüli variabilitásnak tudható be (24). A két RhCE vizsgálati módszer anyagoknál vagy keverékeknél mért álpozitív aránya e vizsgálati módszerben nem kritikus jelentőségű, mivel a (44. pontban szereplő) megállapított határértékkel megegyező vagy az alatti szövet-életképességet kiváltó vizsgálati vegyi anyagokon további vizsgálatokat kell végezni más *in vitro* vizsgálati módszerekkel, vagy utolsó lehetőségként – a szabályozási követelményektől függően, az adatok bizonyító erejének mérlegelésén alapuló megközelítés keretébe tartozó lépcsőzetes vizsgálati stratégia segítségével – nyulakon végzett vizsgálatokkal. Ezek a vizsgálati módszerek valamennyi típusú vegyi anyagra alkalmazhatók, az alkalmazásuk során kapott negatív eredményt a szemirritáció és a súlyos szemkárosodás tekintetében nem besorolandóként kell elfogadni (az ENSZ-GHS és a CLP-rendelet kategória nélküli csoportja). Az EpiOcular™ EIT és a SkinEthic™ HCE EIT vizsgálat az ENSZ-GHS/CLP-rendelettől eltérő osztályozási rendszeren belüli alkalmazásáról egyeztetni kell a megfelelő szabályozó hatóságokkal.
17. E vizsgálati módszer korlátai közé tartozik, hogy nem teszi lehetővé a szemirritáció/reverzibilis szemkárosodás (2. kategória) és a súlyos szemkárosodás/irreverzibilis szemkárosodás (1. kategória) ENSZ-GHS és CLP-rendelet szerinti megkülönböztetését, sem a szemirritáló hatás (opcionális 2A. kategória) és enyhén szemirritáló hatás (opcionális 2B. kategória) ENSZ-GHS szerinti megkülönböztetését (1). E célokból más *in vitro* vizsgálati módszerekkel végzett további vizsgálatra van szükség.

18. E vizsgálati módszer esetében a „vizsgálati vegyi anyag” kifejezés a vizsgálat tárgyát képező vegyi anyagra vonatkozik¹ és nem az RhCE vizsgálati módszer anyagok és/vagy keverékek vizsgálatára való alkalmazhatóságához kapcsolódik.

A VIZSGÁLAT ELVE

19. A vizsgálati vegyi anyagot legalább két háromdimenziós RhCE szövetkonstrukcióra viszik fel topikálisan, majd a kezelést és a kezelés utáni inkubációs időszakot követően meghatározzák a szövet-életképességet. Az RhCE szöveteket primér humán epidermális keratinocita sejtekből vagy immortalizált humán szaruhártya felhámsejtekből rekonstruálták, amelyeket több napon keresztül tenyésztettek, hogy egy olyan többrétegű, erősen differenciált laphámszövetet alkossanak, amely morfológiáját tekintve hasonló az emberi szaruhártya hámszövetéhez. Az EpiOcular™ RhCE szövetkonstrukció legalább 3 réteg élő sejtből és egy nem keratinizált felszínből tevődik össze, szaruhártyaszerű felépítése analóg az *in vivo* megtalálhatóval. A SkinEthic™ HCE RhCE szövetkonstrukció legalább 4 réteg élő sejtből áll, a normál emberi szaruhártya felhámhoz hasonlóan magában foglalva a bazális hengerhámsejteket, a közbenső szárnyas sejteket és a felszíni laphámsejteket (20) (26).
20. A vegyi anyagok által kiváltott súlyos szemkárosodás/szemirritáció – amely *in vivo* főként a szaruhártya opázosodásában, szivárványhártya-gyulladásban, a kötőhártya vörösségében és/vagy kötőhártya-vizenyőben nyilvánul meg – egy kaszkád jellegű folyamat eredménye, amelynek első lépéseként a vegyi anyag a szaruhártyán és/vagy a kötőhártyán áthatolva sejtkárosodást idéz elő. Sejtkárosodás bekövetkezhet számos hatásmechanizmuson, többek között a következőkön keresztül: sejtmembrán lízis (pl. felületaktív anyagok, szerves oldószerek váltják ki); makromolekulák (különösen fehérjék) koagulációja (pl. felületaktív anyagok, szerves oldószerek, lúgok és savak váltják ki); lipidek szappanosodása (pl. lúgok váltják ki); és alkilációk, illetve a makromolekulákkal kialakított egyéb kovalens kapcsolatok (pl. fehérítők, peroxidok és alkiláló szerek váltják ki) (15) (27) (28). Kimutatták azonban, hogy a citotoxicitás a szövetkárosodás hátterében álló fizikai-kémiai folyamatoktól függetlenül fontos, ha nem elsődleges szerepet tölt be egy adott vegyi anyag által kiváltott általános súlyos szemkárosodási/szemirritációs reakció mechanisztikus meghatározásában (29) (30). Ezenkívül a vegyi anyagok súlyos szemkárosodási/szemirritációs potenciálját

¹ 2013 júniusában az OECD együttes ülése megállapodott abban, hogy ahol csak lehetséges, az OECD új és átdolgozott vizsgálati iránymutatásaiban következetesebben alkalmazzák a „vizsgálati vegyi anyag” kifejezést a vizsgálat tárgyát képező vegyi anyagra.

elsősorban a kezdeti sérülés mértéke határozza meg (31), amely korrelációt mutat a sejtpusztulás mértékével (29), valamint a kiváltott reakciók és a végső következmények nagyságrendjével (32). Ennek megfelelően a nagyon enyhén irritáló anyagok általában csak a szaruhártya felhámjának felszínén fejtenek ki hatást, az enyhén és mérsékelten irritáló anyagok többnyire a felhámot és a kötőszövet felszínét károsítják, míg a súlyosan irritáló anyagok a felhámban, a kötőszövet belső rétegeiben és esetenként a szaruhártya belhámjában tesznek kárt (30) (33). A vizsgálati vegyi anyaggal történő topikális kezelését követően az RhCE szövetkonstrukció életképességének – a súlyos szemkárosodás/szemirritáció tekintetében besorolást nem igénylő (az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerint nem besorolt) vegyi anyagok azonosítása céljából történő – mérése azon a feltevésen alapul, hogy a súlyos szemkárosodást vagy szemirritációt okozó összes vegyi anyag citotoxicitást idéz elő a szaruhártya felhámjában és/vagy a kötőhártyában.

21. Az RhCE szövet életképességét hagyományosan az alapján mérik, hogy az MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid; tiazolil kék tetrazólium-bromid; CAS-száma: 298-93-1)] vitális festéket a szövet élő sejtjei enzimatisz utón kék MTT-formazán kristállyá átalakítják, amelyet a szövetből történő kivonás után mennyiségileg meghatároznak (16). Azok a vegyi anyagok azonosíthatók az ENSZ-GHS/CLP-rendelet (nem besorolt) kategóriájának megfelelően besorolást és címkézést nem igénylő vegyi anyagokként, amelyek nem csökkentik a szövet-életképességet egy meghatározott határérték alá (vagyis az EpiOcular™ EIT és a SkinEthic™ HCE EITL¹ vizsgálatban 60 % alá, a SkinEthic™ HCE EITS² vizsgálatban pedig 50 % alá) (lásd a 44. pontot).

A JÁRTASSÁG BIZONYÍTÁSA

22. Az RhCE vizsgálatok szabályozási célú rutinszerű alkalmazása előtt a laboratóriumoknak az 1. táblázatban felsorolt tizenöt jártassági tesztanyag besorolásának helyes előrejelzésével igazolniuk kell szakmai jártasságukat. Ezeket a vegyi anyagokat a vizsgálati referenciamódszereken végzett validálási tanulmányokban használt vegyi anyagok közül választották ki (8) (10) (11). A lehetőségekhez mérten olyan vegyi anyagok kerülnek kiválasztásra, amelyek: i. különféle halmazállapotúak; ii. a nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálat (B.5.

¹ EITL: a SkinEthic™ HCE folyadékokra alkalmazott szemirritációs vizsgálata.

² EITS: a SkinEthic™ HCE szilárd anyagokra alkalmazott szemirritációs vizsgálata.

vizsgálati módszer) (2) (14) magas minőségű eredményei, az ENSZ-GHS osztályozási rendszer (1., 2A., 2B. vagy nem besorolt kategória) (1) és a CLP-rendelet szerinti osztályozási rendszer (1., 2. vagy nem besorolt kategória) alapján lefedik a súlyos szemkárosodás/szemirritáció *in vivo* reakcióinak teljes tartományát; iii. lefedik az *in vivo* besorolást befolyásoló különböző hatásokat (24) (25); iv. a validálási tanulmányban használt kémiai osztályok tekintetében reprezentatívak (8) (10) (11); v. lefedik a megfelelő szerves funkcionális csoportok széles körét (8) (10) (11); vi. jól meghatározott kémiai szerkezettel rendelkeznek (8) (10) (11); vii. színesek és/vagy közvetlen MTT-redukáló hatásúak; viii. megismételhető eredményeket hoztak az RhCE vizsgálati módszereken végzett validálási tanulmányok során; ix. besorolásukat helyesen jelezték előre az RhCE vizsgálati módszerek validálási tanulmánya során; x. az RhCE vizsgálati módszerekből származó kiváló minőségű adatok alapján lefedik az *in vitro* válaszreakciók teljes tartományát (0–100 %-os életképesség); xi. kereskedelmi forgalomban kaphatók; és xii. nem kapcsolódnak hozzájuk kiemelkedően magas beszerzési és/vagy ártalmatlanítási költségek. Amennyiben valamely felsorolt vegyi anyag nem áll rendelkezésre, illetve más megalapozott okból kifolyólag nem alkalmazható, akkor a fenti kritériumoknak megfelelő – például a vizsgálati referenciamódszer validálása során alkalmazott vegyi anyagok közül származó – vegyi anyag is használható. Az ilyen eltéréseket azonban meg kell indokolni.

1. táblázat: A jártassági tesztanyagok jegyzéke

Kémiai név	CAS-szám	Szerves funkciós csoport ¹	Halmazállapot	VRM1 életképessége (%) ²	VRM2 életképessége (%) ³	VRM szerinti előrejelzés	MTT-redukciós hatás	Színinterferencia
<i>In vivo 1. kategória⁴</i>								
Metil-tioglikolát	2365-48-2	Karbonsavészter; Tioalkohol	F	10,9 ± 6,4	5,5 ± 7,4	Előrejelzés nem végezhető	I (erősen)	N
Hidroxietil-akrilát	818-61-1	Akrlát; Alkohol	F	7,5 ± 4,7 ⁵	1,6 ± 1,0	Előrejelzés nem végezhető	N	N
2,5-dimetil-2,5-hexándiol	110-03-2	Alkohol	Sz	2,3 ± 0,2	0,2 ± 0,1	Előrejelzés nem végezhető	N	N
Nátrium-oxalát	62-76-0	Oxokarboxilsav	Sz	29,0 ± 1,2	5,3 ± 4,1	Előrejelzés nem végezhető	N	N
<i>In vivo 2A. kategória⁴</i>								
2,4,11,13-tetraaza-tetradekán-diimid-amid, N,N"-bisz(4-klórfe- nil)-3,12-diimino-, di-D-glükonát (20 %, vizes oldat) ⁶	18472-51-0	Aromás szénhidrogén halogenid; Aril-halogenid; Dihidroxilcsoport; Guanidin	F	4,0 ± 1,1	1,3 ± 0,6	Előrejelzés nem végezhető	N	I (enyhén)
Nátrium-benzoát	532-32-1	Aril; Karbonsav	Sz	3,5 ± 2,6	0,6 ± 0,1	Előrejelzés nem végezhető	N	N
<i>In vivo 2B. kategória⁴</i>								
Dietil-toluamid	134-62-3	Benzamid	F	15,6 ± 6,3	2,8 ± 0,9	Előrejelzés nem végezhető	N	N

Kémiai név	CAS-szám	Szerves funkciók csoport ¹	Halmazállapot	VRM1 életképessége (%) ²	VRM2 életképessége (%) ³	VRM szerinti előrejelzés	MTT-redukciós hatás	Színinterferencia
2,2-dimetil-3-metilén-biciklo [2.2.1] heptán	79-92-5	Alkán, tercier szenekhez sorolva; Alkén; Bicikloheptán; áthidalt gyűrűs karbociklusok; Cikloalkán	Sz	4,7 ± 1,5	15,8 ± 1,1	Előrejelzés nem végezhető	N	N
<i>In vivo nem besorolt⁴</i>								
1-etil-3-metilimidazolum-etil-szulfát	342573-75-5	Alkoxi; Ammóniumsó; Aril; Imidazol; Szulfát	F	79,9 ± 6,4	79,4 ± 6,2	Kat. nélküli	N	N
Dikaprilit-éter	629-82-3	Alkoxi; Éter	F	97,8 ± 4,3	95,2 ± 3,0	Kat. nélküli	N	N
Piperonil-butoxid	51-03-6	Alkoxi; Benzodioxol; benzil; Éter	F	104,2 ± 4,2	96,5 ± 3,5	Kat. nélküli	N	N
hidrogénezett ricinusolaj polietilén-glikolja (PEG-40)	61788-85-0	Acilál; Alkohol; Allil; Éter	Viszkózus	77,6 ± 5,4	89,1 ± 2,9	Kat. nélküli	N	N
1-(4-Klorofenil)-3-(3,4-diklorofenil)-karbamid	101-20-2	Aromás szénhidrogén halogenid; Aril-halogenid; Karbamidszármazékok	Sz	106,7 ± 5,3	101,9 ± 6,6	Kat. nélküli	N	N
2,2'-metilén-bisz(6-(2H-benzotriazol-2-il)-4-(1,1,3,3-tetrametil-butil)fenol)	103597-45-1	Alkán, kvaterner szenekhez sorolva; Fúziós aromás karbociklus; Fúziós telített heterociklusok; Kinoid vegyületek prekursorai; Terc-butil	Sz	102,7 ± 13,4	97,7 ± 5,6	Kat. nélküli	N	N
Kálium-tetrafluorborát	14075-53-7	Szervetlen só	Sz	88,6 ± 3,3	92,9 ± 5,1	Kat. nélküli	N	N

Rövidítések: CAS-szám = Vegyi anyag Nyilvántartási Szolgálat (CAS) nyilvántartási szám; ENSZ-GHS = a vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének az Egyesült Nemzetek Szervezete által globálisan harmonizált rendszere (1); VRM1 = az EpiOcular™ EIT validált referenciamódszer; VRM2 = a SkinEthic™ HCE EIT validált referenciamódszer; Színinterferencia = az MTT-formázán hagyományos abszorbania (optikai sűrűség, OD) mérését zavaró színinterferencia.

¹Az OECD eszköztár 3.1. beágyazott elemzése szerinti szerves funkció csoport (8).

²Az EURL ECVAM/Cosmetics Europe szemirritációs validálási tanulmánya (EIVS) során végzett EpiOcular™ EIT vizsgálatban kapott eredmények alapján (8).

³A validálási tanulmány során végzett SkinEthic™ HCE EIT vizsgálatban kapott eredmények alapján (10) (11).

⁴A nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálat (B.5. vizsgálati módszer/az OECD 405. vizsgálati iránymutatása) (2) (14) eredményei alapján és az ENSZ-GHS felhasználásával.

⁵A CEFIC konzorcium *in vitro* szemirritációs vizsgálati stratégiájához (CON4EI) végzett tanulmány eredményei alapján.

⁶A 2A. vagy 2B. kategóriába sorolás az ENSZ-GHS rendszerének a két kategória megkülönböztetésére szolgáló kritériuma értelmezésétől függ, azaz három állatból egynél, illetve három állatból kettőnél a hetedik napig fennmaradó hatások szükségesek a 2A. kategóriába soroláshoz. Az *in vivo* vizsgálatot három állaton végezték. Az egy állaton megfigyelt szaruhártya-opálosodástól eltekintve minden végpont a 7. napra vagy már korábban teljesen begyógyult (a hatást értékelő pontszáma nulla volt). Annak az egy állatnak, amely nem gyógyult meg teljesen a hetedik napra, a szaruhártya opálosodását értékelő pontszáma 1 volt (a hetedik napon), majd a 9. napra teljesen meggyógyult.

23. A jártassági vizsgálat részeként ajánlott, hogy a felhasználók az RhCE szövetkonstrukció gyártója által meghatározottak szerint, átvétel után ellenőrizzék a szövetek barrierjellemzőit (lásd a 25., 27. és 30. pontot). Ez különösen fontos, ha a szöveteket nagy távolságra/hosszú ideig szállították. Ha egy vizsgálatot már sikeresen igazoltak, valamint jártasságot szereztek az alkalmazásában és bizonyították azt, ilyen jellegű ellenőrzéseket nem szükséges rutinszerűen végezni. Ha azonban egy vizsgálatot rutinszerűen alkalmaznak, a barrierjellemzőket javasolt továbbra is rendszeres időközönként ellenőrizni.

ELJÁRÁS

24. E vizsgálati módszerhez jelenleg a tudományosan megalapozottnak nyilvánított EpiOcular™ EIT és SkinEthic™ HCE EIT vizsgálat tartozik (9) (12) (13), amelyekre a szöveg validált referenciamódszerként is hivatkozik (az előbbi sorrend szerint VRM1 és VRM2). Az RhCE vizsgálati módszerekhez rendelkezésre állnak szabványműveleti eljárások, amelyeket alkalmazni kell e vizsgálati módszerek laboratóriumi végrehajtása és igénybevétele során (34) (35). A következő pontok és a 2. függelék ismertetik az RhCE vizsgálatok főbb összetevőit és eljárásait.

AZ RHCE VIZSGÁLATI MÓDSZER ÖSSZETEVŐI

Általános feltételek

25. A megfelelő emberi eredetű sejtekből rekonstruált szaruhártyaszerű háromdimenziós felhámszövetet fokozatosan rétegzett, de nem elszarusodott sejtekből kell előállítani. Az RhCE szövetkonstrukciót úgy készítik, hogy porózus szintetikus membránt inzertálnak, amelyen keresztül a tápanyagok eljutnak a sejtekhez. A rekonstruált szaruhártyaszerű felhamban élő, nem keratinizált epitelsejtek több rétegének kell jelen lennie. Az RhCE szövetkonstrukció felhámjának felszíne közvetlenül érintkezzen a levegővel, hogy a szaruhártya felhámjának *in vivo* kezeléséhez hasonló módon közvetlenül kezelni lehessen topikálisan a vizsgálati vegyi anyaggal. Az RhCE szövetkonstrukciónak megfelelő ellenálló képességgel rendelkező funkcionális barriert kell képeznie a citotoxikus referencia-vegyianyagok, pl. a Triton X-100 vagy a nátrium-dodecil-szulfát (SDS) gyors áthatolása ellen. A barrierfunkciót bizonyítani kell, ennek értékeléséhez meghatározható az az expozíciós idő, amely alatt egy adott, állandó koncentrációjú referencia-vegyianyag (pl. 100 µl mennyiségű 0,3 térfogatszázalékos Triton X-100) hatására a szövetek életképessége 50 %-kal csökken (ET₅₀), vagy az a referencia-vegyianyag koncentráció, amely meghatározott idejű expozíciót (pl. 30 perces kezelés 50 µl SDS-sel) követően 50 %-kal csökkenti a szövetek életképességét (IC₅₀) (lásd a 30. pontot). Az RhCE szövetkonstrukció folyadékzáró tulajdonságainak meg kell akadályozniuk, hogy a vizsgálati vegyi anyag

passzáljon az élő szövet szélei körül, amely a szaruhártya expozíciójának rossz modellezését eredményezné. Az RhCE szövetkonstrukció előállításához használt emberi eredetű sejteknek baktérium-, vírus-, mikoplazma- és gombafertőzéstől mentesnek kell lenniük. A forgalmazónak ellenőriznie kell, hogy a szövetkonstrukció steril, gomba- és baktériumfertőzéstől mentes.

Funkcionális feltételek

Életképesség

26. A szövetek életképességének számszerű mérése MTT-vizsgálattal történik (16). Az RhCE szövetkonstrukció élő sejtjei az MTT vitális festéket kék MTT-formazán kicsapódássá redukálják, amelyet azután izopropanol (vagy hasonló oldószer) használatával kivonnak a szövetből. A kivont MTT-formazán mennyisége meghatározható hagyományos abszorbancia (optikai sűrűség, OD) méréssel vagy HPLC/UPLC spektrofotometriás eljárással (36). Az extraháló oldószer optikai sűrűségének (OD) eléggé alacsonynak, azaz 0,1 alattinak kell lennie. Az RhCE szövetkonstrukció felhasználóinak biztosítaniuk kell, hogy az alkalmazott RhCE szövetkonstrukció minden egyes tétele megfeleljen a negatív kontrollra vonatkozóan meghatározott kritériumoknak. A vizsgálati referenciamódszerek negatív kontrolljaira vonatkozó OD-értékek elfogadhatósági tartományát a 2. táblázat ismerteti. A HPLC/UPLC spektrofotometriás eljárás alkalmazása esetén a negatív kontroll elfogadhatósági feltételeként a 2. táblázatban szereplő negatív kontrollra vonatkozó OD-tartományok szolgálnak. A vizsgálati jelentésben dokumentálni kell, hogy a negatív kontrollanyaggal kezelt szövetek stabilak a tenyészetben (hasonló szövet-életképességi értékeket adnak) a vizsgálat során alkalmazott expozíciós időszak alatt. A szövet gyártójának a szövet készítés során hasonló eljárást kell lefolytatnia a szövettételek jóváhagyása előtti minőség-ellenőrzéskor, erre az esetre azonban a 2. táblázatban szereplőktől eltérő elfogadhatósági kritériumok alkalmazhatók. Az RhCE szövetkonstrukció előállítójának/forgalmazójának meg kell határoznia a negatív kontroll során nyert OD-értékek (a vizsgálati módszer minőség-ellenőrzési körülményei mellett érvényes) elfogadhatósági tartományát (alsó és felső határértékeket).

2. táblázat: A negatív kontroll OD-értékének elfogadhatósági tartománya (a vizsgálat felhasználói számára)

Vizsgálat	Alsó elfogadási határ	Felső elfogadási határ
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM1 (mind a folyadékok, mind a szilárd anyagok protokolljánál)	> 0,8 ¹	< 2,5
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM2 (mind a folyadékok, mind a szilárd anyagok)	> 1,0	≤ 2,5

protokolljánál)		

¹Ez az elfogadhatósági határérték figyelembe veszi az esetlegesen hosszabbra nyúló (pl. 4 napot meghaladó) szállítási/tárolási időt, amelyről kimutatták, hogy nem befolyásolja a vizsgálati módszer teljesítményét (37).

Barrierfunkció

27. Az RhCE szövetkonstrukciónak megfelelő vastagsággal és ellenálló képességgel kell rendelkeznie ahhoz, hogy például az ET₅₀ alapján végzett becslések szerint (Triton X-100 esetében) vagy az IC₅₀ alapján végzett becslések szerint (SDS esetén) (3. táblázat) meg tudja akadályozni a citotoxikus referencia-vegyianyagok gyors áthatolását. Az RhCE szövetkonstrukció előállítójának/forgalmazójának, a szövetek végfelhasználóhoz történő kiszállításakor bizonyítania kell az alkalmazott RhCE szövetkonstrukció minden egyes tételének barrierfunkcióját (lásd a 30. pontot).

Morfológia

28. Az RhCE szövetkonstrukció szövettani vizsgálatának igazolnia kell az emberi szaruhártyához hasonló felhámfelépítést (legalább 3 élő epitelsejtekből álló réteg és egy nem keratinizált felszín). A validált referenciamódszerek tekintetében az előállítónak/forgalmazónak gondoskodnia kell a szövetkonstrukció megfelelő morfológiájáról, ezért ezt a vizsgálati módszer felhasználójának az egyes alkalmazott szövettételeknél nem szükséges ismételten igazolnia.

Reprodukálhatóság

29. A vizsgálati módszer alkalmazása során végzett pozitív és negatív kontrollok eredményeinek igazolniuk kell a módszer időbeni megismételhetőségét.

Minőség-ellenőrzés

30. Az RhCE szövetkonstrukció csak abban az esetben használható, ha előállítója/forgalmazója igazolja, hogy az alkalmazott RhCE szövetkonstrukció minden egyes tétele megfelel a gyártás utáni jóváhagyásra vonatkozóan meghatározott feltételeknek, amelyek közül az életképességre (26. pont) és a barrierfunkcióra (27. pont) vonatkozó kritériumok a leglényegesebbek. Az ET₅₀ vagy IC₅₀ érték által mért (lásd a 25. és a 26. pontot) barrierfunkció elfogadhatósági tartományát (alsó és felső határértékét) az RhCE szövetkonstrukció előállítójának/forgalmazójának kell meghatároznia. A 3. táblázat ismerteti az ET₅₀ és az IC₅₀ érték azon elfogadhatósági tartományát, amelyet (a validált referenciamódszerekben) az RhCE szövetkonstrukciók előállítója/forgalmazója a tételjóváhagyás előtti minőség-ellenőrzés során alkalmaz. A gyártás utáni jóváhagyásra vonatkozóan meghatározott feltételeknek való megfelelést igazoló adatokat az RhCE szövetkonstrukció előállítójának/forgalmazójának a vizsgálati módszer felhasználójának rendelkezésére kell bocsátania, hogy ezeket az információkat fel tudják tüntetni a vizsgálati jelentésben. Kizárólag a gyártás utáni felszabadításra vonatkozóan meghatározott

összes feltételnek megfelelő szövetekkel elért eredmények fogadhatók el a szemirritáció vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében besorolást és címkézést nem igénylő vegyi anyagok ENSZ-GHS és CLP-rendelet szerinti besorolásának megbízható előrejelzéseként.

3. táblázat: Tételjóváhagyás előtti minőség-ellenőrzés kritériumai

Vizsgálat	Alsó elfogadási határ	Felső elfogadási határ
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM1 (100 µl 0,3 térfogatszázalékos Triton X-100)	ET ₅₀ = 12,2 perc	ET ₅₀ = 37,5 perc
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM2 (30 perces kezelés 50 µl SDS-sel)	IC ₅₀ = 1 mg/ml	IC ₅₀ = 3,2 mg/ml

A vizsgálati vegyi anyag és a kontrollanyagok alkalmazása

31. Minden vizsgálatmenetben valamennyi vizsgálati vegyi anyaghoz és kontrollanyaghoz legalább két szövetreplikátumot kell használni. Két különböző kezelési protokoll alkalmazható, az egyik folyékony, a másik szilárd vizsgálati vegyi anyagokhoz (34) (35). Mindkét módszer és protokoll esetében a vizsgálati vegyi anyaggal történő kezelés előtt a szövetkonstrukció felületét be kell nedvesíteni kalcium- és magnéziummentes Dulbecco-féle foszfátpuffert tartalmazó sóoldattal (Ca²⁺/Mg²⁺-mentes DPBS), megteremtve ezzel az emberi szemre jellemző nedves feltételeket. A szövetek kezelése a vizsgálati vegyi anyag(ok)nak és a kontrollanyagoknak való expozícióval veszi kezdetét. Mindkét validált referenciamódszer mindkét kezelési protokolljában a vizsgálati vegyi anyagot és a kontrollanyagot megfelelő mennyiségben kell alkalmazni ahhoz, hogy az egyenletesen fedje a felhám felszínét, ugyanakkor el kell kerülni a végtelen dózis alkalmazását (lásd a 32. és 33. pontot) (2. függelék).
32. A validált referenciamódszerekben a 37 °C-on vagy alacsonyabb hőmérsékleten (szükség esetén finnpipettával) pipettázható vizsgálati vegyi anyagokat folyadékként kell kezelni, ellenkező esetben szilárd anyagokként kezelendők (lásd a 33. pontot). A validált referenciamódszerekben a folyékony vizsgálati vegyi anyagokat egyenletesen kell elosztatni a szövet felszínén (ehhez legalább 60 µl/cm² mennyiség szükséges) (lásd a 2. függelék (33) (34)). A szövet megfelelő dózissal történő kezelése érdekében a lehetőségekhez mérten kerülni kell, hogy az inzertre (a szövet felszínére) felvitt vizsgálati vegyi anyag kis térfogata miatt kapilláris hatás (hajszálcsövesség) alakuljon ki. A folyékony vizsgálati vegyi anyaggal kezelt szöveteket a szokásos tenyésztési körülmények mellett (37 ±2 °C, 5 ±1 %-os CO₂, legalább 95 %-os relatív páratartalom) 30 percig inkubálni kell. Az inkubációs idő lejártával a folyékony vizsgálati vegyi anyagot és a kontrollanyagokat óvatosan el kell távolítani a szövet felszínéről, ehhez szobahőmérsékleten Ca²⁺/Mg²⁺-mentes DPBS-sel alaposan át kell mosni a szövetet. Az átmosást követően a szövetet az alkalmazott validált

referenciamódszertől függően változó, előre meghatározott időtartamig frissen készített, szobahőmérsékletű tápoldatba kell meríteni (ezáltal eltávolíthatók a szövetbe abszorbeált vizsgálati vegyi anyagok). Kizárólag a VMR1 esetén az MTT-vizsgálat végrehajtása előtt a szövetet frissen készített tápoldatban, szokásos tenyésztési körülmények között expozíció utáni inkubációnak kell alávetni (lásd a 2. függelék (34) (35)).

33. A validált referenciamódszerekben a 37 °C-os hőmérsékletig nem pipettázható vizsgálati vegyi anyagokat szilárd anyagokként kell kezelni. A vizsgálati vegyi anyagokat olyan mennyiségben kell alkalmazni, amely képes befedni a szövet teljes felületét, ehhez legalább 60 mg/cm² mennyiségre van szükség (lásd a 2. függelék). A szilárd anyagokat, amikor csak lehetséges finom por alakban kell vizsgálni. A szilárd vizsgálati vegyi anyaggal kezelt szöveteket egy előre meghatározott (az alkalmazott validált referenciamódszertől függő) időszakon keresztül a szokásos tenyésztési körülmények közepette inkubálják (lásd a 2. függelék (34) (35)). Az expozíciós idő lejártával a szilárd vizsgálati vegyi anyagot és a kontrollanyagokat óvatosan el kell távolítani a szövet felszínéről, ehhez szobahőmérsékleten Ca²⁺/Mg²⁺-mentes DPBS-sel alaposan át kell mosni a szövetet. Az átmosást követően kerül sor az expozíció utáni merítésre, amikor a szövetet az alkalmazott validált referenciamódszertől függően változó, előre meghatározott időtartamig frissen készített, szobahőmérsékletű tápoldatba merítik (ezáltal eltávolíthatók a szövetbe abszorbeált vizsgálati vegyi anyagok), majd az MTT-vizsgálatot megelőzően frissen készített tápoldatban, szokásos tenyésztési körülmények között expozíció utáni inkubálásra kerül sor (lásd a 2. függelék (34) (35)).
34. Minden vizsgálatmenetben párhuzamos negatív és pozitív kontrollokkal bizonyítani kell, hogy a szövetek (negatív kontroll alapján meghatározott) életképessége és (pozitív kontroll alapján meghatározott) érzékenysége a dokumentált adatok alapján meghatározott elfogadhatósági tartományba esik. A párhuzamos negatív kontroll szolgáltatja emellett az alapvonalat (a 100 %-os szövet-életképességet) a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt szövetek relatív életképességi arányának (életképesség_{vizsgált} aránya) kiszámításához. A validált referenciamódszerekhez ajánlott pozitív kontrollanyag a tiszta metil-acetát (CAS-száma: 79-20-9, forgalmazza például a Sigma-Aldrich, katalógusszáma: 45997; folyadék). A VMR1, illetve a VMR2 vizsgálatához alkalmazandó ajánlott negatív kontrollanyag az ultra nagy tisztaságú víz, illetve a Ca²⁺/Mg²⁺-mentes DPBS. Ezeket a kontrollanyagokat használták a validált referenciamódszerekben végzett validálási tanulmányokban, és ezekhez áll rendelkezésre a legtöbb ismert adat. A megfelelő alternatív pozitív vagy negatív kontrollanyagok alkalmazását tudományosan és kellő mértékben alá kell támasztani. A negatív és pozitív kontrollanyagokat ugyanazon protokoll(ok) alapján kell tesztelni, mint a vizsgálatmenetben részt vevő vizsgálati vegyi anyagokat (vagyis a

folyadékokhoz és/vagy a szilárd anyagokhoz készült protokollal). A folyékony vizsgálati vegyi anyagok tesztelésével párhuzamosan végzett kontrolllok (lásd a 32. pontot) vagy a szilárd vizsgálati vegyi anyagok tesztelésével párhuzamosan végzett kontrolllok (lásd a 33. pontot) leírása szerint a kijuttatást követően és még az MTT-vizsgálatot megelőzően sor kerül az expozícióra, az átmosásra, az expozíciót követő merítésre és adott esetben az expozíciót követő inkubálásra (lásd a 35. pontot) (34) (35). Az azonos vizsgálatmenetben tesztelt azonos halmazállapotú (folyékony vagy szilárd) vizsgálati vegyi anyagok esetében elegendő egyetlen negatív és pozitív kontrollt vizsgálni.

A szövetek életképességének mérése

35. Az MTT-vizsgálat egy szabványosított kvantitatív eljárás (16), amelyet e vizsgálati módszer során a szövetek életképességének méréséhez kell alkalmazni. A vizsgálat kompatibilis a háromdimenziós szövetkonstrukcióban történő használattal. Az MTT-vizsgálatot közvetlenül az expozíció utáni inkubációs időszakot követően hajtják végre. A validált referenciamódszerekben az RhCE szövetkonstrukciót a szokásos tenyésztési körülmények mellett 180 percre (± 15 perc) 0,3 ml mennyiségű, 1 mg/ml koncentrációjú MTT-oldatba helyezik. Az MTT vitális festéket az RhCE szövetkonstrukció élő sejtjei kék MTT-formazán kicsapódássá redukálják. Ezt követően a kicsapódott kék MTT-formazán terméket megfelelő mennyiségű izopropanol (vagy hasonló oldószer) használatával kivonják a szövetből (34) (35). A folyékony vizsgálati vegyi anyaggal tesztelt szövetek esetében a szövetek tetejéről és aljáról is ki kell vonni az MTT-t, míg a szilárd vizsgálati vegyi anyagokkal és színes folyadékokkal tesztelt szöveteknél csak a szövet aljáról kell kivonni az MTT-t (ezáltal minimalizálni lehet az izopropanol extraháló oldat esetleges átszennyezését a szöveten maradt vizsgálati vegyi anyaggal). A nehezen lemosható folyékony vizsgálati vegyi anyaggal tesztelt szöveteknél szintén megengedhető, hogy a terméket csak a szövet aljáról vonják ki. A párhuzamosan vizsgált negatív és pozitív kontrollanyagokat a vizsgálati vegyi anyaggal azonos módon kell kezelni. A kivont MTT-formazán mennyisége meghatározható hagyományos abszorbancia (OD) méréssel egy sávszűrő alkalmazásával 570 nm hullámhosszon (maximum ± 30 nm-es eltérés megengedett), vagy egy HPLC/UPLC spektrofotometriás eljárás útján (lásd a 42. pontot) (11) (36).
36. A vizsgálati vegyi anyag optikai tulajdonságai vagy az MTT-re gyakorolt kémiai hatása folytán befolyásolhatja az MTT-formazán mérését, ami a szövet-életképesség helytelen megbecsüléséhez vezet. A vizsgálati vegyi anyagok befolyásolhatják az MTT-formazán mérését azáltal, hogy közvetlenül kék MTT-formazánná redukálják az MTT-t és/vagy azáltal, hogy színinterferenciát okoznak, ha a vizsgálati vegyi anyag jellegénél fogva vagy a kezelési eljárás következtében az MTT-formazánnal azonos OD-tartományban (vagyis kb. 570 nm-en) nyeli el a fényt. A vizsgálat előtt előzetes

méréseket kell végezni, amelyek lehetővé teszik a potenciálisan közvetlen MTT-redukáló hatással rendelkező és/vagy színinterferenciát okozó vegyi anyagok azonosítását, és további kontrollokat kell alkalmazni e vizsgálati vegyi anyagok potenciális zavaró hatásának észleléséhez és korrekciójához (lásd a 37–41. pontot). Ez különösen fontos abban az esetben, amikor egy adott vizsgálati vegyi anyagot nem távolítottak el teljesen az RhCE szövetkonstrukcióból a mosás során, vagy amikor az anyag áthatol a szaruhártyaszerű felhámon, és így az MTT-vizsgálat elvégzése során jelen van az RhCE szövetkonstrukcióban. Azon vizsgálati vegyi anyagok esetében, amelyek (jellegükénél fogva vagy a kezelés következtében) az MTT-formazánnal azonos tartományban nyelik el a fényt, és amelyek túlságosan zavaró hatásúak, vagyis erőteljes adszorpciót mutatnak 570 ± 30 nm-en, ezért az MTT-formazán hagyományos abszorbancia (OD) mérésével nem vizsgálhatók, az MTT-formazán HPLC/UPLC spektrofotometriás eljárással történő meghatározását lehet alkalmazni (lásd a 41. és 42. pontot) (11) (36). A validált referenciamódszerek szabványműveleti eljárásai részletes leírással szolgálnak arról, hogyan lehet észlelni és korrigálni a közvetlen MTT-redukáló hatást és a színezőanyagok okozta zavaró hatást (34) (35). A VRM1, illetve a VRM2 vizsgálatához rendelkezésre álló, a III., illetve IV. függelékben közzétett szemléltető folyamatábrák irányutatót nyújtanak ahhoz, hogyan lehet azonosítani és kezelni a közvetlen MTT-redukáló és/vagy színinterferenciát okozó vegyi anyagokat.

37. Annak érdekében, hogy azonosítani lehessen azon vizsgálati vegyi anyagok potenciális zavaró hatását, amelyek (jellegükénél fogva vagy a kezelés következtében) az MTT-formazánnal azonos tartományban nyelik el a fényt, és dönteni lehessen a további kontrollok szükségességéről, a vizsgálati vegyi anyagot vízbe és/vagy izopropanolba helyezik, és megfelelő ideig szobahőmérsékleten inkubálják (lásd a 2. függelék (34) (35)). Ha a VRM1 vizsgálatban (lásd a 3. függelék) a vízbe és/vagy izopropanolba helyezett vizsgálati vegyi anyag 570 ± 20 nm-es tartományban kellő mennyiségű fényt nyeli el, vagy ha a VRM2 vizsgálatban (lásd a 4. függelék) a vizsgálati vegyi anyag vízzel történő elegyítése során színes oldat keletkezik, a vizsgálati vegyi anyag feltehetően befolyásolja az MTT-formazán hagyományos abszorbancia (OD) mérését és további színezőanyag-kontrollokra van szükség, illetve alternatív megoldásként HPLC/UPLC spektrofotometriás eljárást lehet végezni, amelynek alkalmazásakor ezek a kontrollok nem szükségesek (lásd a 41. és 42. pontot, valamint a III. és IV. függelék) (34) (35). Hagyományos abszorbancia (OD) mérés esetén az egyes zavaró hatású vizsgálati vegyi anyagokkal legalább két élő szövetreplikátumot kezelnek, amelyeken elvégzik a teljes vizsgálatot, de az MTT inkubációs fázis során MTT-mentes oldatba helyezik azokat, hogy létrehozzanak egy élő szöveteken végzett nem specifikus elszíneződés ($NSC_{\text{élő}}$) kontrollt (34) (35). Az élő szövetekre jellemző biológiai változékonyságból kifolyólag az $NSC_{\text{élő}}$ kontrollt a színes vizsgálati vegyi anyag vizsgálatával párhuzamosan kell elvégezni, több

vizsgálat esetén pedig (minden egyes vizsgálatmenetnél) minden vizsgálattal egyidejűleg független NSC_{élő} kontrollt kell végezni. Ezután meghatározzák a szövetek valódi életképességét, ehhez a zavaró hatású vizsgálati vegyi anyaggal kezelt és MTT-oldatban inkubált élő szövetek életképességi arányából (Életképesség_{vizsgált} arány) levonják a zavaró hatású vizsgálati vegyi anyagnak kitett és MTT-mentes közegben inkubált élő szövetek nem specifikus elszíneződésének arányát, amelyet a korrigálandó vizsgálattal párhuzamosan vizsgáltak (NSC_{élő} arány), tehát a szövetek valódi életképessége = [Életképesség_{vizsgált} arány] - [NSC_{élő} arány].

38. A közvetlen MTT-redukáló hatással rendelkező anyagok azonosítása érdekében minden vizsgálati vegyi anyagot friss MTT-oldatba kell helyezni. Az MTT-oldathoz megfelelő mennyiségű vizsgálati vegyi anyagot adagolnak, majd a keveréket mintegy 3 órán keresztül a szokásos tenyésztési körülmények közepette inkubálják (lásd a III. és a IV. függelék) (34) (35). Amennyiben a vizsgálati vegyi anyagot tartalmazó MTT-keverék (illetve oldhatatlan vizsgálati vegyi anyag esetén szuszpenzió) színe kékre/lilára változik, a vizsgálati vegyi anyag feltételezhetően közvetlenül redukálja az MTT-t, ezért kiegészítő funkcionális ellenőrzést kell végezni elhalt RhCE szövetkonstrukciókon, független vizsgálat keretében, hagyományos abszorbancia (OD) mérés, illetve HPLC/UPLC spektrofotometriás eljárás útján. E kiegészítő funkcionális ellenőrzés során elhalt szöveteket használnak, amelyek reziduális metabolikus aktivitással rendelkeznek csupán, ugyanakkor az élő szövetekhez hasonló módon abszorbeálják és magukban tartják a vizsgálati vegyi anyagot. A VRM1 elhalt szöveget úgy állítják elő, hogy a szöveteket alacsony hőmérsékletnek teszik ki („fagyasztással előlt szövet”). A VRM2 elhalt szöveget pedig úgy állítják elő, hogy a szöveteket hosszabb ideig (legalább 24 ±1 órán keresztül) vízben inkubálják, majd alacsony hőmérsékleten tárolják („vízben előlt” szövet). Az egyes MTT-redukáló hatású vizsgálati vegyi anyagokkal legalább két elhalt szövetreplikátumot kezelnek, amelyeken elvégzik a teljes vizsgálatot azzal a céllal, hogy egy nem specifikus MTT-redukciós (NSMTT) kontrollt hozzanak létre (34) (35). A független vizsgálatok/vizsgálatmenetek számától függetlenül vizsgálati vegyi anyagonként elegendő egyetlen NSMTT-kontrollt végezni. Ezután meghatározzák a szövetek valódi életképességét, ehhez az MTT-redukáló anyaggal kezelt élő szövetekkel kapott életképességi arányból (Életképesség_{vizsgált} arány) levonják az ugyanazon MTT-redukáló anyaggal kezelt elhalt szövetekkel kapott nem specifikus MTT-redukció arányát, amelyet a korrigálandó vizsgálattal párhuzamosan végzett negatív kontrollhoz viszonyítva számítanak ki (NSMTT-arány), tehát a szövetek valódi életképessége = [Életképesség_{vizsgált} arány] - [NSMTT-arány].
39. Azon hagyományos abszorbancia (OD) méréssel értékelt vizsgálati vegyi anyagok esetében, amelyek egyaránt okoznak színinterferenciát (lásd a 37. pontot) és közvetlen MTT-redukciót (lásd a 38. pontot), az előző pontokban ismertetett NSMTT és NSC_{élő}

kontrollok mellett szükség van egy harmadik fajta kontrollra is. Általában ez a helyzet áll elő a fényt 570 ± 30 nm-en elnyelő, sötét színű (pl. kék, lila, fekete) vizsgálati vegyi anyagoknál, mivel saját színük akadályozza, hogy a 38. pontban leírtak szerint értékelni lehessen közvetlen MTT-redukáló hatásukat. Ilyen esetben alapértelmezetten el kell végezni mind az NSMTT, mind az NSC_{élő} kontrollt. Előfordulhat, hogy azokat a vizsgálati vegyi anyagokat, amelyeken NSMTT és NSC_{élő} kontrollt is végeztek, mind az élő, mind az elhalt szövetek abszorbeálják és magukban tartják. Ilyenkor az NSMTT kontroll nem csupán a vizsgálati vegyi anyag által előidézett közvetlen MTT-redukáló hatást korrigálja, hanem esetleg az anyag elhalt szövetek általi abszorpciójából és benntartásából eredő színinterferenciát is. Ez viszont a színinterferencia kétszeri korrekciójához vezethet, mivel az NSC_{élő} kontroll már korrigálja a vizsgálati vegyi anyag élő szövetek általi abszorpciójából és benntartásából fakadó színinterferenciát. A színinterferencia esetleges kétszeri korrekciójának kiküszöbölése érdekében szükség van egy harmadik kontrollra, amely az elhalt szövetek esetében méri a nem specifikus elszíneződést (NSC_{elhalt}) (lásd a III. és IV. függelék) (34) (35). E kiegészítő kontroll során a vizsgálati vegyi anyaggal legalább két elhalt szövetreplikátumot kezelnek, amelyeken elvégzik a teljes vizsgálatot, de az MTT inkubációs fázis során MTT-mentes oldatba helyezik azokat. A független vizsgálatok/vizsgálatmenetek számától függetlenül vizsgálati vegyi anyagoként elegendő egyetlen NSC_{elhalt} kontroll, azt azonban az NSMTT kontrollal egyidejűleg és ugyanazon szövettételen kell elvégezni. Ezután meghatározzák a szövetek valódi életképességét, ehhez a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt élő szövetekkel kapott életképességi arányból (Életképesség_{vizsgált} arány) levonják az NSMTT-arányt és levonják az NSC_{élő} arányt, majd hozzáadják a zavaró hatású vizsgálati vegyi anyaggal kezelt és MTT-mentes közegben inkubált elhalt szövetekkel kapott nem specifikus elszíneződési arányt, amelyet a korrigálandó vizsgálattal párhuzamosan végzett negatív kontrollhoz viszonyítva számítanak ki (NSC_{elhalt} arány), tehát a szövetek valódi életképessége = [Életképesség_{vizsgált} arány] - [NSMTT-arány] - [NSC_{élő} arány] + [NSC_{elhalt} arány].

40. Lényeges megjegyezni, hogy (hagyományos abszorbancia mérés esetén) a nem specifikus MTT-redukció és a nem specifikus színinterferencia a spektrofotométer linearitási tartománya fölé növelheti a szövetkivonat OD-értéket, és (HPLC/UPLC spektrofotometriás mérés esetén) a nem specifikus MTT-redukció a spektrofotométer linearitási tartománya fölé növelheti a szövetkivonat MTT-formazán csúcsterületét is. Ebből kifolyólag fontos, hogy minden laboratórium például MTT-formazán (CAS-száma: 57360-69-7, forgalmazza például a Sigma-Aldrich vállalat, Cat# M2003) segítségével az OD-értékre/csúcsterületre vonatkozólag meghatározza spektrofotométerének linearitási tartományát, mielőtt megkezdene a vizsgálati vegyi anyagok szabályozási célú vizsgálatát.

41. A spektrofotométert használó hagyományos abszorbancia (OD) mérés akkor alkalmazható a közvetlen MTT-redukáló hatással bíró és színinterferenciát okozó vizsgálati vegyi anyagok értékelésére, amikor az MTT-formazán mérésekor tapasztalt zavaró hatás nem túl erőteljes (vagyis a szövetkivonatok vizsgálati vegyi anyaggal kapott, közvetlen MTT-redukció és/vagy színinterferencia tekintetében nem korrigált OD-értékei a spektrofotométer linearitási tartományán belül vannak). Mindazonáltal a negatív kontroll 60 %-ával (a VRM1, valamint a VRM2 folyadékokra vonatkozó protokollja esetén) vagy 50 %-ával (a VRM2 szilárd anyagokra vonatkozó protokollja esetén) egyező vagy annál nagyobb NSMTT-arányt és/vagy NSC_{elő} arányt előidéző vizsgálati vegyi anyagok eredményei óvatosan értelmezendők, mivel ezeket a határértékeket használják a validált referenciamódszerekben a kategorizált és a nem kategorizált vegyi anyagok megkülönböztetésére (lásd a 44. pontot). Ha viszont a vizsgálati vegyi anyag túl erőteljesen zavarja az MTT-formazán mérését (vagyis a vizsgált szövetkivonatok nem korrigált OD-értékei kívül esnek a spektrofotométer linearitási tartományán), a standard abszorbancia (OD) nem mérhető. Az MTT-formazán hagyományos abszorbancia (OD) mérését túlzott mértékben befolyásoló színes vizsgálati vegyi anyagok, illetve vízzel vagy izopropanollal való érintkezés következtében elszíneződött vizsgálati vegyi anyagok mérése elvégezhető HPLC/UPLC spektrofotometriás eljárás útján (lásd a III. és IV. függelékét). A HPLC/UPLC rendszer ugyanis lehetővé teszi, hogy az MTT-formazánt mennyiségi meghatározása előtt elkülönítsék a vegyi anyagtól (36). Ezért HPLC/UPLC spektrofotometriás módszer használata esetén a vizsgálati vegyi anyagtól függetlenül soha nincs szükség NSC_{elő} és NSC_{elhalt} kontrollra. Az NSMTT-kontroll ugyanakkor alkalmazandó (a 38. pontban ismertetett módon), ha a vizsgálati vegyi anyag gyaníthatóan közvetlenül redukálja az MTT-t. Az NSMTT-kontroll akkor is alkalmazandó, ha a vizsgálati vegyi anyag (saját vagy vízzel való érintkezés következtében kialakult) színe miatt közvetlen MTT-redukáló hatását nem lehet a 38. pontban ismertetett módon felmérni. Amennyiben HPLC/UPLC spektrofotometriásan mérik az MTT-formazánt, a szövetek életképességi aránya a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt élő szövetekkel kapott MTT-formazán csúcsterület és a párhuzamos negatív kontrollal kapott MTT-formazán csúcsterület aránya lesz. A közvetlen MTT-redukáló hatással rendelkező vizsgálati vegyi anyagok esetében a szövetek valódi életképességét a 38. pont utolsó mondatában leírt módon számítják ki: $[\text{Életképesség}_{\text{vizsgált}} \text{ arány}] - [\text{NSMTT-arány}]$. Végül megjegyzendő, hogy azok a közvetlen MTT-redukáló hatású, vagy színinterferenciát is okozó közvetlen MTT-redukáló vegyi anyagok, amelyek a kezelést követően visszamaradnak a szövetben és olyan erős MTT-redukáló hatással bírnak, hogy a vizsgált szövetkivonatok OD-értéke (hagyományos OD mérés esetén), illetve csúcsterülete (HPLC/UPLC spektrofotometriás mérés esetén) kívül esik a spektrofotométer linearitási tartományán, az RhCE vizsgálati módszerekkel nem értékelhetők, bár ilyen csak igen ritka esetben fordul elő.

42. A HPLC/UPLC spektrofotometria bármely típusú vizsgálati vegyi anyagnál (színes, nem színes, MTT-redukáló vagy nem MTT redukáló hatású) alkalmazható az MTT-formazán mérésére (11) (36). A HPLC/UPLC spektrofotometriás rendszerek sokfélesége miatt a felhasználók nem tudnak azonos rendszerkörülményeket teremteni. Ezért a szövetkivonatok MTT-formazán-tartalmának meghatározása előtt igazolni kell a HPLC/UPLC spektrofotometriás rendszer minősítését azzal, hogy eleget tesznek az Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerfelügyelete (FDA) által az iparág számára kiadott, bioanalitikus módszerek validálására vonatkozó iránymutatásban (36) (38) szereplő standard minősítési paramétereken alapuló elfogadhatósági kritériumoknak. E kulcsfontosságú paraméterekről és elfogadhatósági kritériumokról a 5. függelék nyújt tájékoztatást. Amint eleget tettek a 5. függelékben meghatározott elfogadhatósági kritériumoknak, a HPLC/UPLC spektrofotometriás rendszer minősítettnek tekintendő, és alkalmas arra, hogy az itt leírt vizsgálati módszerben bemutatott kísérleti feltételek mellett elvégezze az MTT-formazán mérését.

Elfogadhatósági kritériumok

43. Minden olyan vizsgálatmenet esetében, amelynek során a minőség-ellenőrzési kritériumoknak megfelelő RhCE szövettételeket alkalmaznak (lásd a 30. pontot), a negatív kontrollanyaggal kezelt szöveteknek olyan OD-értéket kell mutatniuk, amely tükrözi a szöveteknek a szállítási és az átvételi lépéseket, valamint az összes protokollfolyamatot követő minőségét, és nem léphetik túl a dokumentált adatok alapján meghatározott, 2. táblázatban szereplő határértékeket (lásd a 26. pontot). Hasonlóképpen a pozitív kontrollanyaggal, vagyis a metil-acetáttal kezelt szövetek negatív kontrollhoz viszonyított átlagos életképességének 50 % alatt kell maradnia a VRM1 folyadékokra és szilárd anyagokra vonatkozó protokolljában, míg a VRM2 protokoll esetén legfeljebb 30 % (folyadékokra vonatkozó protokoll) vagy 20 % (szilárd anyagokra vonatkozó protokoll) lehet, mert ez igazolja, hogy a vizsgálati módszer feltételei mellett a szövetek képesek reagálni egy irritáló vizsgálati vegyi anyagra (34) (35). A vizsgálati vegyi anyagokkal és kontrollanyagokkal kezelt szövetreplikátumok variabilitásának az elfogadott határértékeken belül kell maradnia (vagyis két szövetreplikátum variabilitása közötti különbség nem haladhatja meg a 20 %-ot, illetve három szövetreplikátum közötti standard deviáció (SD) nem haladhatja meg a 18 %-ot). Amennyiben egy adott vizsgálatmenet negatív vagy pozitív kontrollja kívül esik az elfogadott tartományon, a vizsgálatmenetet érvénytelennek kell nyilvánítani, és meg kell ismételni. Amennyiben egy adott vizsgálati vegyi anyaggal kezelt szövetreplikátumok közötti variabilitás kívül esik az elfogadott tartományon, a vizsgálatot érvénytelennek kell nyilvánítani, és a vizsgálati vegyi anyagot újbóli vizsgálatnak kell alávetni.

Az eredmények értelmezése és az előrejelzési modell

44. Az egyes vizsgálati vegyi anyagokkal kezelt szövetkivonat-replikátumokra vonatkozóan kapott OD-értékek/csúcsterületek alapján kell meghatározni a (100 %-nak vett) negatív kontrollra normalizált átlagos szövet-életképesség százalékos arányát (a szövetreplikátumok átlagát). A 4. táblázat ismerteti a szemirritáció vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében besorolást nem igénylő (az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti kategória nélküli) vizsgálati vegyi anyagok azonosítására használt százalékos szövet-életképességi határértékeket. Az eredmények tehát az alábbiak szerint értelmezendők:

- A vizsgálati vegyi anyagot nem szükséges az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerint osztályozni és címkézni (vagyis az anyag kategória nélküli), ha a szövet kezelést és expozíció utáni inkubációt követően megállapított átlagos életképességi aránya meghaladja (>) a szövet-életképesség meghatározott százalékos határértékét (lásd a 4. táblázatot). Ebben az esetben más vizsgálati módszerekkel végzett további vizsgálatra nincs szükség.
- Amennyiben a szövet kezelést és expozíció utáni inkubációt követően megállapított átlagos életképességi aránya megegyezik a szövet-életképesség meghatározott százalékos határértékével vagy annál kisebb ($\leq$) (lásd a 4. táblázatot), besorolása nem előrejelezhető. Ebben az esetben más vizsgálati módszerekkel végzett további vizsgálatra van szükség, mert az RhCE vizsgálati módszerek álpozitív eredményhez vezethetnek (lásd a 14. és 15. pontot), továbbá nem tudnak különbséget tenni az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. és 2. kategória között (lásd a 17. pontot).

4. táblázat: Az ENSZ-GHS/CLP-rendelet osztályozási rendszere szerinti előrejelzési modellek

VRM szerinti	Kategória nélküli	Előrejelzés nem végezhető
VRM 1 – EpiOcular™ EIT (mindkét protokoll)	Átlagos szövet-életképesség > 60 %	Átlagos szövet-életképesség $\leq$ 60 %
VRM 2 – SkinEthic™ HCE EIT (folyadékokra vonatkozó protokoll)	Átlagos szövet-életképesség > 60 %	Átlagos szövet-életképesség $\leq$ 60 %
VRM2 – SkinEthic™ HCE EIT (szilárd anyagokra vonatkozó protokoll)	Átlagos szövet-életképesség > 50%	Átlagos szövet-életképesség $\leq$ 50%

45. Egyértelmű eredmény esetén legalább két szövetreplikátum vizsgálatából álló egyszeri vizsgálatnak elegendőnek kell lennie az adott vizsgálati vegyi anyag esetében. Határértéken lévő eredmények esetében azonban, ha például az egyes szövetreplikátumok eredményei nem egyeznek és/vagy a szövetek átlagos életképességi aránya 60 ± 5 % (VRM1, valamint a VRM2 folyadékokra vonatkozó protokollja esetén) vagy 50 ± 5 % (a VRM2 szilárd anyagokra vonatkozó protokollja

esetén), megfontolandó egy második vizsgálat lefolytatása, és ha az első és a második vizsgálat eredményei különböznek, egy harmadiké is.

46. A keverékek bizonyos típusainál, ahol megfelelő és indokolt, mérlegelni lehet más százalékos szövet-életképességi határértékek alkalmazását a besorolt és a nem besorolt vizsgálati vegyi anyagok közötti különbségtételhez, hogy az adott keveréktípusok tekintetében javítani lehessen a vizsgálati módszer általános teljesítményét (lásd a 14. pontot). A referencia-vegyianyagok hasznosnak bizonyulhatnak ismeretlen vizsgálati vegyi anyagok vagy termékosztályok súlyos szemkárosodási/szemirritációs potenciáljának értékelésére vagy valamely besorolt vegyi anyag szemre kifejtett relatív toxicitási hatásának a pozitív válaszreakciók egy adott tartományán belüli értékelésére.

ADATOK ÉS JELENTÉS

Adatok

47. Mindegyik vizsgálati vegyi anyagra vonatkozóan táblázatos jelentést kell készíteni a vizsgálatmenetben tesztelt egyes szövetreplikátumok adatairól (például OD-értékek/MTT-formazán csúcsterületek, a vizsgálati vegyi anyagra és a kontrollanyagokra vonatkozólag meghatározott százalékos szövet-életképességi adatok és az RhCE vizsgálati módszer végső előrejelzése), amelyben szerepelnie kell a megismételt kísérletek adatainak is, ha voltak ilyenek. Emellett minden vizsgálati vegyi anyagra és kontrollanyagra vonatkozólag fel kell tüntetni a jelentésben az átlagos szövet-életképességi arányt és a két szövetreplikátum életképessége közötti különbséget (ha $n=2$ szövetreplikátum) vagy a standard deviációt (ha $n \geq 3$ szövetreplikátum). Ezenfelül bele kell foglalni a jelentésbe azt is, ha valamely vizsgálati vegyi anyagról megfigyelték, hogy közvetlen MTT-redukáló hatása és/vagy színinterferencia miatt befolyást gyakorol az MTT-formazán mérésére.

Vizsgálati jelentés

48. A vizsgálati jelentésnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálati vegyi anyag

Egy összetevőből álló anyag

- kémiai azonosítása, például IUPAC- vagy CAS-névvel, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet és/vagy más azonosítók alapján;
- fizikai megjelenés, illékonyság, pH-érték, LogP-érték, molekulatömeg, kémiai osztály, valamint a vizsgálat elvégzése szempontjából releváns további fizikai-kémiai tulajdonságok, amennyiben rendelkezésre állnak;

- tisztaság, adott és a gyakorlatban megvalósítható esetben a szennyeződések kémiai azonosítója stb.;
- vizsgálat előtti kezelés, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés);
- tárolási feltételek és stabilitás, amennyiben rendelkezésre állnak.

Több összetevőből álló anyagok, UVCB-k és keverékek

- amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosítójával (lásd fent), tisztaságával, mennyiségi előfordulásával és releváns fizikai-kémiai tulajdonságaival (lásd fent) jellemezve; amennyiben rendelkezésre állnak;
- fizikai megjelenés és a vizsgálat elvégzése szempontjából releváns további fizikai-kémiai tulajdonságok, amennyiben rendelkezésre állnak;
- tisztaság, adott és a gyakorlatban megvalósítható esetben a szennyeződések kémiai azonosítója stb.;
- vizsgálat előtti kezelés, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés);
- tárolási feltételek és stabilitás, amennyiben rendelkezésre állnak.

Pozitív és negatív kontrollanyagok

- kémiai azonosítása, például IUPAC- vagy CAS-névvel, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet és/vagy más azonosítók alapján;
- fizikai megjelenés, illékonyság, molekulatömeg, kémiai osztály, valamint a vizsgálat elvégzése szempontjából releváns további fizikai-kémiai tulajdonságok, amennyiben rendelkezésre állnak;
- tisztaság, adott és a gyakorlatban megvalósítható esetben a szennyeződések kémiai azonosítója stb.;
- vizsgálat előtti kezelés, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés);
- tárolási feltételek és stabilitás, amennyiben rendelkezésre állnak;
- adott esetben az ultra nagy tisztaságú víztől, illetve a $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -mentes DPBS-től eltérő negatív kontrollanyag használatának indokolása;
- adott esetben a tiszta metil-acetáttól eltérő pozitív kontrollanyag használatának indokolása;
- a pozitív és negatív kontrollanyagok a vizsgálatmenet elfogadhatósági kritériumainak való megfelelést bizonyító korábbi eredményei.

A megbízó és a vizsgálatot végző laboratórium adatai

- A megbízó, a vizsgálatot végző laboratórium és a vizsgálatvezető neve és címe.

Az alkalmazott RhCE szövetkonstrukció és protokoll (valamint használatuk indokolása, amennyiben szükséges)

A vizsgálati módszer körülményei

- az alkalmazott RhCE szövetkonstrukció és gyártási szám;
- az MTT-formazán mennyiségi meghatározására használt hullámhossz és (adott esetben) a sáv szélesség, valamint a mérőeszköz (pl. spektrofotométer) linearitási tartománya;
- az MTT-formazán számszerű mérésére alkalmazott módszer leírása;
- az alkalmazott HPLC/UPLC-spektrofotometriás rendszer leírása, ha releváns;
- az alkalmazott specifikus RhCE szövetkonstrukcióra vonatkozó teljes körű alátámasztó adatok, köztük a modell teljesítménye. Ennek többek között az alábbiakat kell magában foglalnia:
 - i) a minőség-ellenőrzés során mért életképesség (forgalmazó által szolgáltatott adat);
 - ii) a vizsgálati módszer feltételei mellett mért életképesség (felhasználó által szolgáltatott adat);
 - iii) barrierfunkció minőség-ellenőrzése;
 - iv) morfológia, ha rendelkezésre áll;
 - v) reprodukálhatóság és előrejelző képesség;
 - vi) az RhCE szövetkonstrukció egyéb minőség-ellenőrzési paraméterei, ha vannak;
- hivatkozás az RhCE szövetkonstrukcióval kapott korábbi adatokra. Ennek többek között az alábbiakat kell magában foglalnia: a minőség-ellenőrzési adatok elfogadhatósága tekintettel a korábbi tételadatokra;
- nyilatkozat arról, hogy a vizsgálatot végző intézmény a jártassági tesztanyagok vizsgálata révén bizonyította a vizsgálati módszer végrehajtásában való jártasságát annak rutinszerű használata előtt.

A vizsgálatmenet és a vizsgálat elfogadásának kritériumai

- a pozitív és negatív kontrollok átlaga és elfogadhatósági tartománya a korábbi adatokon alapul;
- a pozitív és negatív kontrollokban használt szövetreplikátumok közötti elfogadható mértékű variabilitás;
- a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt szövetreplikátumok közötti elfogadható mértékű variabilitás.

Vizsgálati eljárás

- az alkalmazott vizsgálati eljárás részletei;

- a vizsgálati vegyi anyag és a kontrollanyagok alkalmazott dózisa;
- az expozíció, az expozíció utáni mérítés és az expozíció utáni inkubáció időtartama és az alkalmazott hőmérséklet (adott esetben);
- a vizsgálati eljárás bármilyen változtatásának leírása;
- a közvetlen MTT-redukáló hatással rendelkező és/vagy színváltozást okozó vizsgálati vegyi anyagokhoz alkalmazott kontrollok feltüntetése, amennyiben releváns;
- vizsgálati vegyi anyagonként és kontrollonként (pozitív kontroll, negatív kontroll, NSMTT, NSC_{élő} és NSC_{elhalt}, ha releváns) használt szövetreplikátumok száma.

Eredmények

- az egyes vizsgálati vegyi anyagokra és kontrollanyagokra, minden vizsgálatmenetre (ideértve az esetlegesen elvégzett megismételt kísérleteket is) és replikátummérésre vonatkozó adatok, többek között az OD-érték vagy az MTT-formazán csúcsterület, a szövetek életképességi aránya, a szövetek átlagos életképességi aránya, a szövetreplikátumok közötti eltérések vagy standard deviáció és a végső előrejelzés táblázatba foglalása;
- amennyiben alkalmazandó, a közvetlen MTT-redukáló hatású és/vagy színes vizsgálati vegyi anyagokhoz használt kontrollok eredményei, ideértve az OD-értéket vagy az MTT-formazán csúcsterületet, az NSMTT, az NSC_{élő} és az NSC_{elhalt} arányt, a szövetreplikátumok közötti különbséget vagy standard deviációt, a szövetek helyes végső életképességi arányát és a végső előrejelzést;
- a vizsgálatmenet és a vizsgálat meghatározott elfogadhatósági kritériumai tekintetében a vizsgálati vegyi anyaggal/anyagokkal és a kontrollanyagokkal kapott eredmények;
- az egyéb megfigyelt hatások leírása, például a szövetek valamely színes vizsgálati vegyi anyag okozta elszíneződése.

Az eredmények értékelése

Következtetések

SZAKIRODALOM

- (1) UN (2015). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, New York and Geneva: Egyesült Nemzetek. Elérhető a következő címen:
http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.
- (2) E melléklet B.5., Akut szemirritáció/szemkorrózió című fejezete.
- (3) E melléklet B.47., Szarvasmarha-szaruhártya opacitásának és permeabilitásának mérésén alapuló vizsgálati módszer i. a súlyos szemkárosodást okozó vegyi anyagok és ii. a szemirritáció vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében besorolást nem igénylő vegyi anyagok azonosítására című fejezete.
- (4) E melléklet B.48., Izolált csirkeszem vizsgálatán alapuló vizsgálati módszer i. a súlyos szemkárosodást okozó vegyi anyagok és ii. a besorolást nem igénylő vegyi anyagok azonosítására című fejezete.
- (5) E melléklet B.61., Fluoreszcein-szivárgáson alapuló vizsgálati módszer a szemkorróziót és a súlyos szemirritációt okozó anyagok azonosítására című fejezete.
- (6) E melléklet B.68., Rövid expozíciós idejű *in vitro* vizsgálati módszer i). a súlyos szemkárosodást okozó vegyi anyagok és ii). a szemirritáció vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében besorolást nem igénylő vegyi anyagok azonosítására című fejezete.
- (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. Elérhető a következő címen:
<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 of 17 November 2014; EUR 28173 EN; doi: 10.2787/043697. Elérhető a következő címen: <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103702>.

- (10) Alépée, N., Leblanc, V., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Lelièvre, D., Meloni, M., Nardelli, L., Roper, C.S, Santirocco, E., Toner, F., Van Rompay, A., Vinall, J., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory validation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using liquid chemicals. *Toxicol. In vitro* 31, 43-53.
- (11) Alépée, N., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Meloni, M., Nardelli, L., Vinall, C.J., Toner, F., Roper, C.S, Van Rompay, A.R., Leblanc, V., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory evaluation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using solid chemicals and overall performance of the test method with regard to solid and liquid chemicals testing. *Toxicol. In vitro* 34, 55-70.
- (12) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2016). ESAC Opinion on the SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). ESAC Opinion No 2016-02 of 24 June 2016; EUR 28175 EN; doi : 10.2787/390390. Elérhető a következő címen: <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. (Manuscript in Preparation).
- (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. Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.
- (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. Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.
- (19) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Hayden, P., Kubilus, J., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2011). Development of the EpiOcular™ Eye Irritation Test for Hazard Identification and Labelling of Eye Irritating Chemicals in Response to the Requirements of the EU Cosmetics Directive and REACH Legislation. *Altern. Lab. Anim.* 39, 339-364.
- (20) Nguyen, D.H., Beuerman, R.W., De Wever, B., Rosdy, M. (2003). Three-dimensional construct of the human corneal epithelium for *in vitro* toxicology. In: Salem, H., Katz, S.A. (Eds), *Alternative Toxicological Methods*, CRC Press, pp. 147-159.
- (21) Pfannenbecker, U., Bessou-Touya, S., Faller, C., Harbell, J., Jacob, T., Raabe, H., Tailhardat, M., Alépée, N., De Smedt, A., De Wever, B., Jones, P., Kaluzhny, Y., Le Varlet, B., McNamee, P., Marrec-Fairley, M., Van Goethem, F. (2013). Cosmetics Europe multi-laboratory pre-validation of the EpiOcular™ reconstituted Human Tissue Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In vitro* 27, 619-626.
- (22) Alépée, N., Bessou-Touya, S., Cotovio, J., de Smedt, A., de Wever, B., Faller, C., Jones, P., Le Varlet, B., Marrec-Fairley, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., van Goethem, F., McNamee, P. (2013). Cosmetics Europe Multi-Laboratory Pre-Validation of the SkinEthic™ Reconstituted Human Corneal Epithelium Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In vitro* 27, 1476-1488.
- (23) Kolle, S.N., Moreno, M.C.R., Mayer, W., van Cott, A., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R. (2015). The EpiOcular™ Eye Irritation Test is the Method of Choice for *In vitro* Eye Irritation Testing of Agrochemical Formulations: Correlation Analysis of EpiOcular™ Eye Irritation Test and BCOP Test Data to UN GHS, US EPA and Brazil ANIVSA Classifications. *Altern. Lab. Anim.* 43, 1-18.
- (24) Adriaens, E., Barroso, J., Eskes, C., Hoffmann, S., McNamee, P., Alépée, N., Bessou-Touya, S., De Smedt, A., De Wever, B., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Zuang, V. (2014). Retrospective Analysis of the Draize Test

for Serious Eye Damage/Eye Irritation: Importance of Understanding the *In vivo* Endpoints Under UN GHS/EU CLP for the Development and Evaluation of *In vitro* Test Methods. *Arch. Toxicol.* 88, 701-723.

- (25) Barroso, J., Pfannenbecker, U., Adriaens, E., Alépée, N., Cluzel, M., De Smedt, A., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Templier, M., McNamee, P. (2017). Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation *in vivo* data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD). *Arch. Toxicol.* 91, 521-547.
- (26) Meloni, M., De Servi, B., Marasco, D., Del Prete, S. (2011). Molecular mechanism of ocular surface damage: Application to an *in vitro* dry eye model on human corneal epithelium. *Molecular Vision* 17, 113-126.
- (27) Hackett, R.B., McDonald, T.O. (1991). Eye Irritation. In *Advances in Modern Toxicology: Dermatoxicology* Marzulli F.N. and Maibach H.I. (Eds.), 4th Edition, pp. 749–815. Washington, DC, USA: Hemisphere Publishing Corporation.
- (28) Fox, D.A., Boyes, W.K. (2008). Toxic Responses of the Ocular and Visual System. In Cassaret and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons Klaassen C.D.(Ed.), 7th Edition, pp. 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. Elérhető a következő címen: [\[https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index\]](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. Elérhető a következő címen: <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. 2001. május. Elérhető a következő címen: <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, Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Pontosság: a vizsgálati módszerrel kapott eredmények és az elfogadott referenciaértékek közötti egyezés mértéke. A vizsgálati módszer teljesítőképességét mutatja, és „relevanciájának” egyik megítélési szempontja. E kifejezést gyakran használják az „egyezés” megfelelőjeként, amely egy adott vizsgálati módszer alkalmazásakor az azonos eredmények arányát fejezi ki (18).

Referencia-vegyianyag: a vizsgálati vegyi anyaggal való összevetéshez referenciaként használt vegyi anyag. A referencia-vegyianyagnak a következő tulajdonságokkal kell rendelkeznie: i. állandó és megbízható forrás(ok)ból kell származnia, ami lehetővé teszi azonosítását és jellemzését; ii. a vizsgálati vegyi anyag(ok)éhoz hasonló szerkezeti, funkcionális és/vagy kémiai vagy termékosztályba kell tartoznia; iii. ismert fizikai-kémiai tulajdonságokkal kell rendelkeznie; iv. rendelkezésre kell állnia az ismert hatásait alátámasztó adatoknak; és v.. a kívánt hatástartományban ismert hatásúnak kell lennie.

Alulról építkező megközelítés: a szemirritáció vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében feltehetőleg besorolást és címkézést nem igénylő vizsgálati vegyi anyag esetén alkalmazott lépcsőzetes megközelítés, amely a besorolást és címkézést nem igénylő vegyi anyagok (negatív eredmény) más vegyi anyagokhoz (pozitív eredmény) viszonyított meghatározásával kezdődik.

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Egyezés: Lásd a „pontosság” meghatározását.

Szaruhártya: a szemgolyó elülső részén az íriszt és a pupillát fedő és a szem belsejébe a fényt bevezető, áttetsző rész.

CV: variációs koefficiens.

Dev: eltérés.

EIT: Eye Irritation Test (szemirritációs vizsgálat).

EURL ECVAM: Állatkísérletek Alternatíváinak Uniós Referencialaboratóriuma.

Szemirritáció: a vizsgálati vegyi anyagnak a szem elülső felszínén történő alkalmazását követően megjelenő és az alkalmazástól számított 21 napon belül teljes mértékben visszafordítható szemelváltozások. Megfelel a „reverzibilis szemkárosodás” fogalmának és az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 2. kategóriának.

ET₅₀: az az expozíciós idő, amely alatt egy adott, állandó koncentrációjú referencia-vegyianyag hatására a szövet életképessége 50 %-kal csökken.

Álnegatív arány: a vizsgálati módszer alkalmazása során tévesen negatívnak minősített

pozitív anyagok részaránya. A vizsgálati módszer teljesítőképességének egyik mutatója.

Álpozitív arány: a vizsgálati módszer alkalmazása során tévesen pozitívnak minősített negatív anyagok részaránya. A vizsgálati módszer teljesítőképességének egyik mutatója.

Veszély: valamely anyag vagy helyzet azon sajátossága, hogy káros hatásokat képes előidézni az élő szervezet, rendszer vagy (al)populáció anyagnak való expozíciójakor.

HCE: SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (emberi szaruhártya felhámshövet).

HPLC: nagy teljesítményű folyadékkromatográfia.

IC₅₀: az a referencia-vegyianyag koncentráció, amely meghatározott idejű expozíciót (pl. 30 perces SDS-sel történő kezelést) követően 50 %-kal csökkenti a szövetek életképességét.

Végtelen dózis: az RhCE szövetkonstrukcióra alkalmazott vizsgálati vegyi anyag azon mennyisége, amely meghaladja a felhám felszínének teljes és egyenletes befedéséhez szükséges mennyiséget.

Irreverzibilis szemkárosodás: lásd: „Súlyos szemkárosodás”.

LLOQ: mennyiségi meghatározás alsó határértéke.

LogP: az oktanol/víz megoszlási koefficiens logaritmus.

Keverék: két vagy több anyagot tartalmazó elegy vagy oldat.

Egy összetevőből álló anyag: olyan, a mennyiségi összetétele alapján meghatározott anyag, amelyben az egyik fő összetevő legalább 80 tömegszázalékban van jelen.

Több összetevőből álló anyag: olyan, a mennyiségi összetétele alapján meghatározott anyag, amelyben egynél több fő összetevő legalább 10 tömegszázalékban, de 80 tömegszázalékot nem meghaladó koncentrációban van jelen. A több összetevőből álló anyag gyártási folyamat eredménye. A keverék és a több összetevőből álló anyag között az a különbség, hogy a keverék két vagy több anyag összekeverésével, kémiai reakció nélkül jön létre. A több összetevőből álló anyag kémiai reakció eredménye.

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid; tiazolil kék tetrazólium-bromid.

Negatív kontroll: a vizsgálati rendszer valamennyi alkotóelemét tartalmazó minta, amelyet egy olyan anyaggal kezelnek, amelyről ismert, hogy a vizsgálati rendszerben nem vált ki pozitív hatást. Ezt a mintát a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt mintákkal és más kontrollmintákkal együtt feldolgozzák fel, és e minta alapján határozzák meg a 100 %-os szövet-életképességet.

Nem besorolt: a szemirritáció tekintetében (az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 2., és az ENSZ-GHS szerinti 2A. vagy 2B. kategóriába tartozóként) nem besorolt vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében (az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategóriába

tartozóként) nem besorolt vegyi anyagok. Megfelelnek az „ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti kategória nélküli” vegyi anyagoknak.

NSC_{elhalt}: elhalt szöveteken megfigyelt, nem specifikus elszíneződés.

NSC_{elő}: élő szöveteken megfigyelt, nem specifikus elszíneződés.

NSMTT: nem specifikus MTT-redukció.

OD: optikai sűrűség.

Teljesítményszabványok: hitelesített, tudományosan megalapozottnak nyilvánított referenciamódszeren alapuló szabványok, amelyek a javasolt, végrehajtás és funkcionalitás szempontjából hasonló vizsgálati módszer összehasonlíthatósági értékelésének alapjául szolgálnak. Ide tartoznak: i. a vizsgálati módszer alapvető összetevői; ii. a referencia-vegyianyagok minimális jegyzéke, amely a validált vizsgálati módszer által nyújtott teljesítmény elfogadhatóságának igazolására használt vegyi anyagokból került összeállításra; és iii. a validált vizsgálati módszer eredményei alapján meghatározott, hasonló megbízhatósági és pontossági szintek, amelyeket a javasolt vizsgálati módszernek teljesítenie kell a minimális jegyzék referencia-vegyianyagainak felhasználásával történő értékelése során (18).

Pozitív kontroll a vizsgálati rendszer valamennyi alkotóelemét tartalmazó minta, amelyet egy olyan anyaggal kezelnek, amelyről ismert, hogy a vizsgálati rendszerben pozitív hatást vált ki. Ezt a mintát a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt mintákkal és más kontrollmintákkal együtt dolgozzák fel. Annak biztosítása érdekében, hogy a pozitív kontrollban jelentkező hatás időbeli változását fel lehessen mérni, a pozitív hatás nem lehet túlságosan erőteljes.

Relevancia: a vizsgálat és a vizsgált hatás kapcsolatát adja meg, valamint azt, hogy van-e a vizsgálatnak az adott cél szempontjából értelme és haszna. Azt tükrözi, hogy a vizsgálat mennyire pontosan méri vagy jelzi előre a vizsgált biológiai hatást. A relevancia meghatározása során a vizsgálati módszer pontosságát (az eredmények egyezését) figyelembe kell venni (18).

Megbízhatóság: a vizsgálati módszer laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti időbeli reprodukálhatóságának mértéke ugyanazon protokoll alkalmazása mellett. Megállapítása a laboratóriumon belüli és a laboratóriumok közötti reprodukálhatóság, valamint a laboratóriumon belüli megismételhetőség kiszámításával történik (18).

Helyettesítő vizsgálat: olyan vizsgálat, amelynek célja, hogy a veszélyek azonosítására és/vagy kockázatértékelésre rutinszerűen alkalmazott és elfogadott vizsgálatot helyettesítse, és amelyről megállapították, hogy az elfogadott vizsgálattal összehasonlítva, az összes lehetséges vizsgálati helyzetben és vegyi anyag esetében a humán vagy állati egészség egyenértékű vagy jobb védelmét biztosítja (18).

Reprodukálhatóság: ugyanazon vizsgálati vegyi anyag ugyanazon vizsgálati protokollal végzett ismételt vizsgálata során kapott eredmények egyezése (lásd: „megbízhatóság”) (18).

Reverzibilis szemkárosodás: lásd: „Szemirritáció”.

RhCE: Reconstructed human Cornea-like Epithelium (az emberi szaruhártyahámhoz hasonló rekonstruált felhám).

Vizsgálatmenet: egy vizsgálatmenet során egy vagy több vizsgálati vegyi anyagot vizsgálnak egy párhuzamos negatív kontrollal és egy pozitív kontrollal.

SD: standard deviáció.

Érzékenység: az összes olyan pozitív/aktív vizsgálati vegyi anyag aránya, amelyet a vizsgálat helyesen sorolt be. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (18).

Súlyos szemkárosodás: a vizsgálati anyagnak a szem külső felületére való juttatását követően olyan szövetskárosodás kialakulása vagy a látás olyan súlyos fizikai romlása, amely a beadást követően 21 napon belül nem fordítható vissza teljes mértékben. Megfelel az „irreverzibilis szemkárosodás” fogalmának és az „ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategóriának”.

Szabványműveleti eljárások: formális, írásba foglalt eljárások, amelyek részletesen ismertetik bizonyos rutinjellegű és vizsgálat-specifikus laboratóriumi műveletek végrehajtási módját. Kidolgozásukat a helyes laboratóriumi gyakorlatok teszik szükségessé.

Specifitás: a vizsgálat elvégzésével helyesen besorolt összes negatív/inaktív vizsgálati vegyi anyag aránya. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (18).

Anyag: olyan természetes állapotban előforduló vagy gyártási eljárásból származó kémiai elem és vegyületei, amely a stabilitásának megőrzéséhez szükséges adalékanyagot és az alkalmazott eljárásból származó szennyező anyagokat is tartalmazhat, de nem tartalmaz olyan oldószert, amely az anyag stabilitásának befolyásolása vagy összetételének megváltoztatása nélkül elkülöníthető.

Vizsgálat: egyetlen vizsgálati vegyi anyag egyidejű tesztelése legalább két szövetreplikátumon, a megfelelő szabványműveleti eljárásban meghatározott módon.

Szövet-életképesség: egy sejtpopuláció rekonstruált szöveten belüli teljes aktivitását, például az életfontosságú MTT-festékanyag csökkentésének képességét mérő paraméter, amely a mért végponttól és az alkalmazott vizsgálat felépítésétől függően korrelál az élő sejtek teljes számával és/vagy az életképességükkel.

Felülről építkező megközelítés: a feltehetőleg súlyos szemkárosodást okozó vegyi anyag esetén alkalmazott lépcsőzetes megközelítés, amely a súlyos szemkárosodást okozó vegyi anyagok (pozitív eredmény) más vegyi anyagokhoz (negatív eredmény) viszonyított meghatározásával kezdődik.

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

Többszintű vizsgálati stratégia: lépcsőzetes vizsgálati stratégia, amely a vizsgálati módszereket egymást követően alkalmazza. A vizsgálati vegyi anyagra vonatkozó valamennyi információt áttekintik az egyes szinteken, és a bizonyítékok súlyozásával meghatározzák, hogy a stratégia következő szintjére való továbblépés előtt a veszélyességi osztályozásra vonatkozó döntéshez elegendő információ áll-e rendelkezésre. Ha a vizsgálati vegyi anyag veszélyességi potenciálja/hatáserőssége a rendelkezésre álló információk alapján az adott szinten megállapítható, további vizsgálatra nincs szükség (18).

ULOQ: mennyiségi meghatározás felső határértéke.

A vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének az Egyesült Nemzetek Szervezete által globálisan harmonizált rendszere (ENSZ-GHS): a vegyi anyagoknak (anyagoknak és keverékeknek) a fizikai, egészségi és környezeti veszélyek szabványosított típusai és szintjei szerinti osztályokba sorolására és megfelelő kommunikációs elemekkel (például piktogramokkal, figyelmeztetésekkel, figyelmeztető mondatokkal, óvintézkedésekre vonatkozó mondatokkal és biztonsági adatlapokkal) történő jelölésére javaslatokat megfogalmazó rendszer, amelynek célja, hogy az emberek (köztük a munkáltatók, a munkavállalók, a fuvarozók, a fogyasztók és a sürgősségi segélyszolgálatok) és a környezet megóvása érdekében egységesítse a vegyi anyagok káros hatásaira vonatkozó információk továbbítását (1).

ENSZ-GHS és CLP-rendelet szerinti 1. kategória: lásd: „Súlyos szemkárosodás”.

ENSZ-GHS és CLP-rendelet szerinti 2. kategória: lásd: „Szemirritáció”.

ENSZ-GHS és CLP-rendelet szerint nem besorolt: az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. vagy 2. (illetve az ENSZ-GHS szerinti 2A. vagy 2B.) kategóriába való besorolás követelményeinek nem megfelelő vegyi anyagok. Megfelelnek a „Kategória nélküli” vegyi anyagoknak.

UPLC: ultranagy teljesítményű folyadékkromatográfia.

UVCB: ismeretlen vagy változó összetételű anyagok, komplex reakciótermékek vagy biológiai anyagok.

Érvényes vizsgálati módszer: olyan vizsgálati módszer, amely kellően relevánsnak és megbízhatónak minősül egy adott célra, és amely tudományosan megalapozott elveken alapul. Egy-egy vizsgálati módszer abszolút értelemben soha nem érvényes, kizárólag meghatározott céllal összefüggésben az (18).

Validált vizsgálati módszer: olyan vizsgálati módszer, amelynek az adott céllal kapcsolatos relevanciája (pontosságát is ideértve) és megbízhatósága validálási vizsgálatok alapján megállapítást nyert. Fontos megjegyezni, hogy a validált vizsgálati módszer a javasolt felhasználási célra nem feltétlenül kínál megfelelő pontosságú és megbízhatóságú elfogadható eljárást (18).

VRM: validált referenciamódszer.

VRM1: az 1. validált referenciamódszer az EpiOcular™ EIT vizsgálatra utal.

VRM2: a 2. validált referenciamódszer a SkinEthic™ HCE EIT vizsgálatra utal.

A bizonyítékok súlyozása: a rendelkezésre álló különféle érvek és ellenérvek mérlegelésének folyamata az adott vizsgálati anyag veszélyességével kapcsolatban a megfelelő következtetés levonása és alátámasztása céljából.

2. függelék

A SZEMIRRITÁCIÓ VAGY A SÚLYOS SZEMKÁROSODÁS TEKINTETÉBEN BESOROLÁST ÉS CÍMKÉZÉST NEM IGÉNYLŐ VEGYI ANYAGOK AZONOSÍTÁSÁRA HITELESÍTETT RHCE VIZSGÁLATOK FŐBB ÖSSZETEVŐI

A vizsgálat összetevői	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Protokollok	Folyadékok (15 percig pipettálható 37 ± 1 °C vagy alacsonyabb hőmérsékleten)	Szilárd anyagok (nem pipettálható)	Folyadékok és viszkozus anyagok (pipettálható)	Szilárd anyagok (nem pipettálható)
A modell felülete	0,6 cm ²	0,6 cm ²	0,5 cm ²	0,5 cm ²
A szövetreplikátumok száma	Legalább 2	Legalább 2	Legalább 2	Legalább 2
Színinterferencia előzetes felmérése	50 µl + 1 ml H₂O 60 percig 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO₂, ≥ 95 % RH mellett (nem színes vizsgálati vegyi anyagok esetében), vagy 50 µl + 2 ml izopropanol 2–3 óráig szobahőmérsékleten keverve (színes vizsgálati vegyi anyagok esetében) → ha a vizsgálati vegyi anyag OD-értéke 570 ± 20 nm-en az izopropanol vagy a víz OD-értékének levonását követően nagyobb mint 0,08 (ami megközelítőleg a negatív kontroll OD-átlagának 5 %-a), élő szöveteken adaptált kontrollt kell végezni.	50 mg + 1 ml H₂O 60 percig 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO₂, ≥ 95 % RH mellett (nem színes vizsgálati vegyi anyagok esetében) és/vagy 50 mg + 2 ml izopropanol 2–3 óráig szobahőmérsékleten keverve (színes és nem színes vizsgálati vegyi anyagok esetében) → ha a vizsgálati vegyi anyag OD-értéke 570 ± 20 nm-en az izopropanol vagy a víz OD-értékének levonását követően nagyobb mint 0,08 (ami megközelítőleg a negatív kontroll OD-átlagának 5 %-a), élő adaptált kontrollt kell végezni.	10 µl + 90 µl H₂O 30 ± 2 percig szobahőmérsékleten (18–28 °C) keverve → ha a vizsgálati vegyi anyag elszíneződik, élő szöveteken adaptált kontrollt kell végezni	10 mg + 90 µl H₂O 30 ± 2 percig szobahőmérsékleten keverve → ha a vizsgálati vegyi anyag elszíneződik, élő szöveteken adaptált kontrollt kell végezni

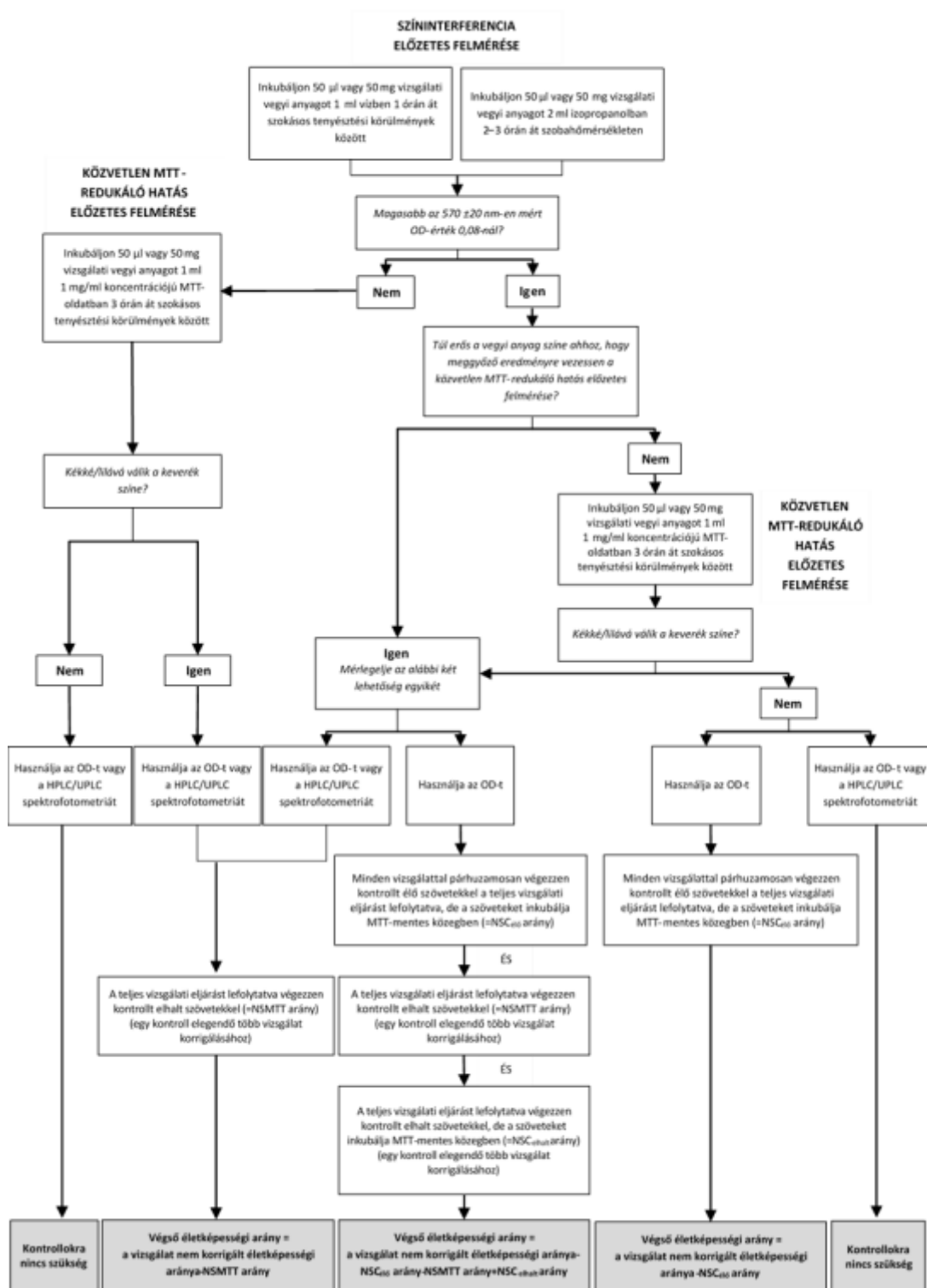
A vizsgálat összetevői	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Közvetlen MTT-redukáló hatás előzetes felmérése	50 µl + 1 ml MTT 1 mg/ml koncentrációjú oldata 180 ±15 percig 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH mellett → ha az oldat színe kékre/lilára vált, fagyasztással előlt adaptált kontrollt kell végezni (negatív kontrollként MTT-oldatba helyezett 50 µl steril ionmentesített vizet használnak)	50 mg + 1 ml MTT 1 mg/ml koncentrációjú oldata 180 ±15 percig 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH mellett → ha az oldat színe kékre/lilára vált, fagyasztással előlt adaptált kontrollt kell végezni (negatív kontrollként MTT-oldatba helyezett 50 µl steril ionmentesített vizet használnak)	30 µl + 300 µl MTT 1 mg/ml koncentrációjú oldata 180 ±15 percig 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH mellett → ha az oldat színe kékre/lilára vált, vízben előlt adaptált kontrollt kell végezni (negatív kontrollként MTT-oldatba helyezett 30 µl steril ionmentesített vizet használnak)	30 mg + 300 µl MTT 1 mg/ml koncentrációjú oldata 180 ±15 percig 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH mellett → ha az oldat színe kékre/lilára vált, vízben előlt adaptált kontrollt kell végezni (negatív kontrollként MTT-oldatba helyezett 30 µl steril ionmentesített vizet használnak)
Előkezelés	20 µl Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -mentes DPBS 30 ± 2 percig 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH mellett, fénytől védve.	20 µl Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -mentes DPBS 30 ± 2 percig 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH mellett, fénytől védve.	-	-
A kezelési dózisok és alkalmazásuk	50 µl (83,3 µl/cm ²)	50 mg (83,3 mg/cm ²) kalibrált eszközzel mérve (e.g. egy csapott kanál, amit 50 mg nátrium-kloridra kalibráltak).	10 µl Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -mentes DPBS + 30 ± 2 µl (60 µl/cm ²) Viszkózus anyagokhoz nejlonháló használata ajánlott	30 µl Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -mentes DPBS + 30 ± 2 mg (60 mg/cm ²)
Expozíciós idő és hőmérséklet	30 perc (± 2 perc) tápoldatban 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH mellett	6 óra (± 0,25 óra) tápoldatban 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH mellett	30 perc (± 2 perc) tápoldatban 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH mellett	4 óra (± 0,1 óra) tápoldatban 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH mellett
Átmosás szobahőmérsékleten	3 alkalommal 100 ml Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -mentes DPBS-ben	3 alkalommal 100 ml Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -mentes DPBS-ben	20 ml Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -mentes DPBS	25 ml Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -mentes DPBS
Expozíció utáni mérítés	12 perc (± 2 perc) szobahőmérsékleten tápoldatban	25 perc (± 2 perc) szobahőmérsékleten tápoldatban	30 perc (± 2 perc) 37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % RH tápoldatban	30 perc (± 2 perc) szobahőmérsékleten tápoldatban

A vizsgálat összetevői	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Expozíció utáni inkubáció	120 perc (± 15 perc) tápoldatban 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH mellett	18 óra (± 0,25 óra) tápoldatban 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH mellett	Nincs	18 óra (± 0,5 óra) tápoldatban 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH mellett
Negatív kontroll	50 µl H ₂ O Párhuzamosan vizsgálva	50 µl H ₂ O Párhuzamosan vizsgálva	30 ± 2µl Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -mentes DPBS Párhuzamosan vizsgálva	30 ± 2µl Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -mentes DPBS Párhuzamosan vizsgálva
Pozitív kontroll	50 µl metil-acetát Párhuzamosan vizsgálva	50 µl metil-acetát Párhuzamosan vizsgálva	30 ± 2µl metil-acetát Párhuzamosan vizsgálva	30 ± 2µl metil-acetát Párhuzamosan vizsgálva
MTT-oldat	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
MTT inkubációs idő és hőmérséklet	180 perc (± 15 perc) 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH mellett	180 perc (± 15 perc) 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH mellett	180 perc (± 15 perc) 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH mellett	180 perc (± 15 perc) 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH mellett
Extraháló oldószer	2 ml izopropanol (kinyerés az inzert tetejéről és aljáról a szövet átszűrésével)	2 ml izopropanol (kinyerés az inzert aljáról a szövet átszűrésével)	1,5 ml izopropanol (kinyerés az inzert tetejéről és aljáról)	1,5 ml izopropanol (kinyerés az inzert aljáról)
Extrakciós időtartam és hőmérséklet	2–3 óra rázatással (~120 rpm) szobahőmérsékleten vagy éjszaka 4–10 °C-on	2–3 óra rázatással (~120 rpm) szobahőmérsékleten vagy éjszaka 4–10 °C-on	4 óra rázatással (~120 rpm) szobahőmérsékleten vagy ráztatás nélkül legalább egész éjszaka 4–10 °C-on	Legalább 2 óra rázatással (~120 rpm) szobahőmérsékleten
OD leolvasás	570 nm (550–590 nm) referenciaszűrő nélkül	570 nm (550–590 nm) referenciaszűrő nélkül	570 nm (540–600 nm) referenciaszűrő nélkül	570 nm (540–600 nm) referenciaszűrő nélkül
Szövet minőség-ellenőrzése	Kezelés 100 µl 0,3 térfogatszázalékos Triton X-100-zal 12,2 perc ≤ ET ₅₀ ≤ 37,5 perc	Kezelés 100 µl 0,3 térfogatszázalékos Triton X-100-zal 12,2 perc ≤ ET ₅₀ ≤ 37,5 perc	30 perces kezelés nátrium-dodecil-szulfáttal (SDS) (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC ₅₀ ≤ 3,5 mg/ml	30 perces kezelés nátrium-dodecil-szulfáttal (SDS) (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC ₅₀ ≤ 3,2 mg/ml

A vizsgálat összetevői	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Elfogadhatósági kritériumok	1. A negatív kontrollal kezelt szövetreplikátumok átlagos OD-értékének 0,8-nál nagyobbak és 2,5-nél kisebbnek kell lennie 2. A pozitív kontrollal 30 percen át kezelt szövetreplikátumok átlagos, a negatív kontroll százalékában kifejezett életképessége nem érheti el az 50 %-ot 3. A két szövetreplikátum életképessége közötti különbség nem érheti el a 20 %-ot.	1. A negatív kontrollal kezelt szövetreplikátumok átlagos OD-értékének 0,8-nál nagyobbak és 2,5-nél kisebbnek kell lennie 2. A pozitív kontrollal 6 órán át kezelt szövetreplikátumok átlagos, a negatív kontroll százalékában kifejezett életképessége nem érheti el az 50 %-ot 3. A két szövetreplikátum életképessége közötti különbség nem érheti el a 20 %-ot.	1. A negatív kontrollal kezelt szövetreplikátumok átlagos OD-értékének 1,0-nál nagyobbak, de legfeljebb 2,5-nek kell lennie 2. A pozitív kontrollal 30 percen át kezelt szövetreplikátumok átlagos, a negatív kontroll százalékában kifejezett életképessége nem haladhatja meg a 30 %-ot 3. A két szövetreplikátum életképessége közötti különbség nem érheti el a 20 %-ot.	1. A negatív kontrollal kezelt szövetreplikátumok átlagos OD-értékének 1,0-nál nagyobbak, de legfeljebb 2,5-nek kell lennie 2. A pozitív kontrollal 4 órán át kezelt szövetreplikátumok átlagos, a negatív kontroll százalékában kifejezett életképessége legfeljebb 20 % lehet 3. A két szövetreplikátum életképessége közötti különbség nem érheti el a 20 %-ot.

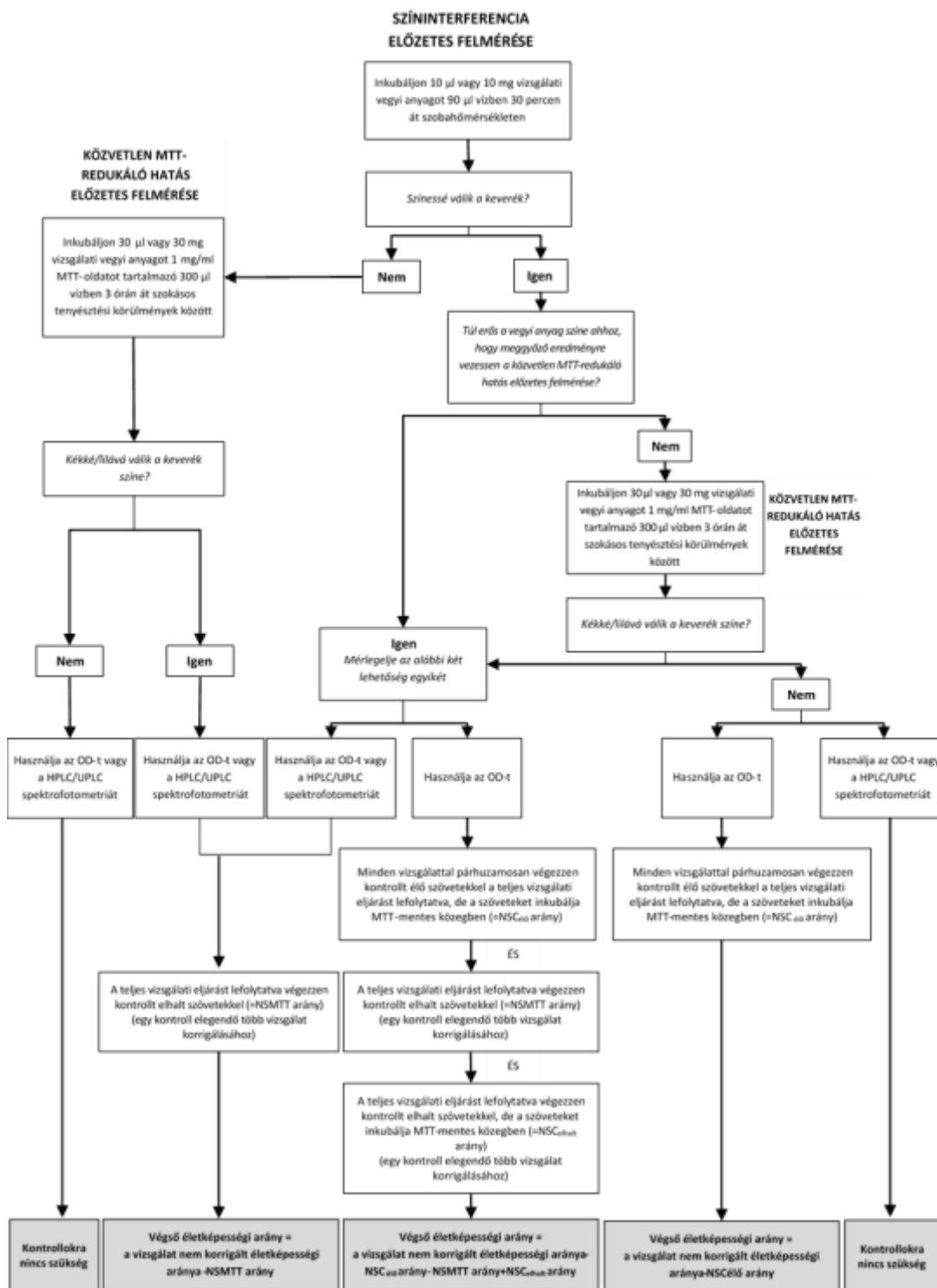
3. függelék

A VRM1 SZABVÁNYMŰVELETI ELJÁRÁSÁN ALAPULÓ SZEMLÉLTETŐ FOLYAMATÁBRA ARRÓL, HOGYAN LEHET AZONOSÍTANI ÉS KEZELNI A KÖZVETLEN MTT-REDUKÁLÓ ÉS/VAGY SZÍNINTERFERENCIÁT OKOZÓ VEGYI ANYAGOKAT



4. függelék

A VRM2 SZABVÁNYMŰVELETI ELJÁRÁSÁN ALAPULÓ SZEMLÉLTETŐ FOLYAMATÁBRA ARRÓL, HOGYAN LEHET AZONOSÍTANI ÉS KEZELNI A KÖZVETLEN MTT-REDUKÁLÓ ÉS/VAGY SZÍNINTERFERENCIÁT OKOZÓ VEGYI ANYAGOKAT



5. függelék

AZ RHCE SZÖVETKONSTRUKCIÓKBÓL KIVONT MTT-FORMAZÁN MÉRÉSÉRE HASZNÁLT HPLC/UPLC SPEKTROFOTOMETRIÁS RENDSZER MINŐSÍTÉSÉNEK FŐBB PARAMÉTEREI ÉS ELFOGADHATÓSÁGI KRITÉRIUMAI

Paraméter	Az FDA-iránymutatás szerinti protokoll (36) (38)	Elfogadhatósági kritériumok
Szelektivitás	Izopropanol elemzése, élő vakpróba (nem kezelt élő RhCE-szövetekből kivont izopropanol), elhalt vakpróba (nem kezelt elhalt RhCE-szövetekből kivont izopropanol), és egy festék (pl. metilénkék) elemzése	$\text{Terület}_{\text{interferencia}} \leq \text{Terület}_{\text{AMHÉ}}^1 20\ %-a$
Precizitás	Minőség-ellenőrzések (vagyis MTT-formazán 1,6 µg/ml, 16 µg/ml és 160 µg/ml mellett) izopropanolban (n=5)	Variációs koeficiens $\leq 15\ %$ vagy $\leq$ az AMHÉ 20 %-a
Pontosság	Minőség-ellenőrzés izopropanolban (n=5)	Eltérési arány $\leq 15\ %$ vagy $\leq$ az AMHÉ 20 %-a
Mátrixhatás	Minőség-ellenőrzés élő vakpróbán (n=5)	$85\ \% \leq \text{Mátrixhatás } \% \leq 115\ \%$
Átvitel	Izopropanol elemzése egy FMHÉ ² szabvány után	$\text{Terület}_{\text{interferencia}} \leq \text{Terület}_{\text{AMHÉ}} 20\ %-a$
Megismételhetőség (napon belüli)	3 független kalibrációs görbe (izopropanolba helyezett MTT-formazán 6 egymás utáni 1/3-os hígítása kezdve a FMHÉ-nél, vagyis 200 µg/ml-nél); Minőség-ellenőrzés izopropanolban (n=5)	Kalibrációs görbék: Eltérési arány $\leq 15\ %$ vagy $\leq$ az AMHÉ 20 %-a
Megismételhetőség (napok közötti)	1. nap: 1 kalibrációs görbe és minőség-ellenőrzések izopropanolban (n=3) 2. nap: 1 kalibrációs görbe és minőség-ellenőrzések izopropanolban (n=3) 3. nap: 1 kalibrációs görbe és minőség-ellenőrzések izopropanolban (n=3)	Minőség-ellenőrzések: Eltérési arány $\leq 15\ %$ és variációs koeficiens $\leq 15\ \%$
Az MTT-formazán rövid távú stabilitása az RhCE szövetkivonatban	Minőség-ellenőrzések élő vakpróbán (n=3) a készítés napján és 24 órás szobahőmérsékleten való tárolás után	Eltérési arány $\leq 15\ \%$
Az MTT-formazán hosszú távú stabilitása az RhCE szövetkivonatban, ha szükséges	Minőség-ellenőrzések élő vakpróbán (n=3) a készítés napján és több napon keresztül -20 °C-on való tárolás után	Eltérési arány $\leq 15\ \%$

¹ LLOQ: mennyiségi meghatározás alsó határértéke, amely 1–2 %-os szöveti életképességet takar, vagyis 0,8 µg/ml.

² ULOQ: mennyiségi meghatározás felső határértéke, amely legalább kétszer akkora, mint a negatív kontroll izopropanolban várható legmagasabb MTT-formazán koncentrációja (~70 µg/ml a VRM-ben), vagyis 200 µg/ml.

B.70. A VEGYI ANYAGOK ÖSZTROGÉNRECEPTOROKHOZ KÖTÉSI AFFINITÁSÁNAK HUMÁN REKOMBINÁNS ÖSZTROGÉNRECEPTORRAL (hrER) TÖRTÉNŐ ÉSZLELÉSÉRE SZOLGÁLÓ *IN VITRO* VIZSGÁLATOK

ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS

Az OECD teljesítményalapú vizsgálati iránymutatása

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 493. vizsgálati iránymutatásában (2015) leírt módszerrel. A 493. teljesítményalapú vizsgálati iránymutatás (PBTG) az ösztrogénreceptorokhoz kötési affinitást mutató anyagok észlelésére szolgáló humán rekombináns *in vitro* vizsgálatok (humán ösztrogénreceptor-kötési vizsgálatok) módszertanát ismerteti. Az iránymutatás az ösztrogénreceptort (vagyis az ER α -t) kötő anyagok azonosítását lehetővé tévő két, végrehajtás és funkcionalitás szempontjából hasonló vizsgálati módszert tartalmaz, és a veszély értékelésére szolgáló új és átdolgozott vizsgálati módszerek validálásáról és nemzetközi elfogadásról szóló OECD-irányelvben (1) megfogalmazott validálási elvekkel összhangban megkönnyíti az új – hasonló vagy módosított – vizsgálati módszerek kidolgozását. E teljesítményalapú vizsgálati módszer alapjául szolgáló, teljes körűen validált (a 2. és a 3. függelékben ismertetett) vizsgálati referenciamódszerek a következők:

- a teljes hosszúságú humán rekombináns ER α használatán alapuló Freyberger-Wilson-féle (FW) *in vitro* ösztrogénreceptor-kötési vizsgálat (2), valamint
- a Chemical Evaluation and Research Institute (CERI) által kidolgozott *in vitro* ösztrogénreceptor-kötési vizsgálat, amely humán rekombináns fehérje ligandumkötő-doménjének használatán alapul (2).

A rendelkezésre álló teljesítményszabványok (3) megkönnyítik az ugyanezt a veszélyes végpontot célzó hasonló vizsgálati módszerek kidolgozását és validálását, és lehetővé teszik a 493. teljesítményalapú vizsgálati iránymutatás időben történő módosítását, hogy az új, hasonló vizsgálatokat be lehessen építeni az átdolgozott iránymutatásba. Hasonló vizsgálatok azonban csak azután foglalhatók bele az iránymutatásba, hogy az OECD felülvizsgálta és jóváhagyta a teljesítményszabványok teljesülését. A 493. vizsgálati iránymutatás alá tartozó vizsgálatok egységesen felhasználhatók az OECD-tagállamok ösztrogénreceptor-kötési vizsgálatok eredményeire vonatkozó követelményeinek kialakításához, ugyanakkor biztosítják az adatok kölcsönös elfogadásának előnyeit.

A vizsgálati módszerhez tartozó vizsgálatok háttere és elvei

2. Az OECD 1998-ban kiemelt fontosságú tevékenységet indított az endokrin rendszert esetlegesen károsító vegyi anyagok kiszűrésére és vizsgálatára vonatkozó meglévő vizsgálati iránymutatások felülvizsgálata, valamint új vizsgálati iránymutatások kidolgozása érdekében. Az OECD endokrin rendszert károsító anyagok vizsgálatára és értékelésére szolgáló fogalmi keretét 2012-ben átdolgozták. Az elvi keretrendszer eredeti

és átdolgozott változatát mellékletként csatolták az endokrin rendszert károsító vegyi anyagok értékelésére vonatkozó szabványosított vizsgálati iránymutatásokról szóló iránymutatáshoz (4). Az elvi keretrendszer öt szintet határoz meg, amelyek mindegyike a biológiai komplexitás egy különálló szintjének felel meg. Az e vizsgálati módszer keretében ismertetett ösztrogénreceptor-kötési vizsgálatok a 2. szinten helyezkednek el, amely magában foglalja „*a kiválasztott endokrin mechanizmus(ok)ról/útvonal(ak)ról adatokat szolgáltató in vitro vizsgálatokat*”. Ez a vizsgálati módszer olyan *in vitro* receptorkötési vizsgálatokhoz használatos, amelyek célja a humán ösztrogénreceptor alfa (ER α) ligandumainak azonosítása.

3. Egyértelműen bizonyították az *in vitro* ösztrogénreceptor-kötési vizsgálat biológiai funkciók terén betöltött jelentőségét. Az ösztrogénreceptor-kötési vizsgálatokat abból a célból hozták létre, hogy beazonosítsák az ösztrogén hormon szignalizációs útvonalát potenciálisan zavaró vegyi anyagokat, és az elmúlt két évtized során széles körben alkalmazták őket az ösztrogénreceptor szöveti eloszlásának jellemzésére, valamint az ösztrogénreceptor agonistáinak/antagonistáinak azonosítására. Ezek a vizsgálatok az ösztrogén szignalizációs útvonalának első lépését jelentő ligandum-receptor kölcsönhatással foglalkoznak, ami kulcsfontosságú szerepet tölt be minden gerinces élőlény szaporodási funkciójában.
4. Az ösztrogének és az ösztrogénreceptorok kölcsönhatása befolyásolhatja az ösztrogénhatásra érzékeny gének transzkripcióját és okozhat nem-genomiális hatásokat, amelyek többek között a sejtosztódás, a normál magzati fejlődés és a szaporodási funkciók sejtszintű előidézéséhez vagy gátlásához vezethetnek (5) (6) (7). A normál ösztrogénrendszerek zavara károsan befolyásolhatja a normál egyedfejlődést (ontogenezist), a reprodukciós egészséget és a reprodukív rendszer integritását. A nem megfelelő ösztrogénreceptor szignál olyan hatásokat válthat ki, mint a hormonfüggő daganatos betegségek megemelkedett kockázata, a termékenység csökkenése, valamint a magzati növekedési és fejlődési rendellenességek (8).
5. Az *in vitro* kötési vizsgálatok egy anyagnak a specifikus receptor ligandumkötő helyével történő közvetlen kölcsönhatásán alapulnak, ami a géntranszkripciót szabályozza. A humán rekombináns ösztrogénreceptor alfa (hrER α) kötési vizsgálat főként a radioaktívan jelölt ligandum (a [^{3} H]-17 β -ösztradiol) ösztrogénreceptorhoz történő kötését méri a vizsgálati vegyi anyag (vagyis a kompetítor) növekvő koncentrációjának jelenlétében. Az ösztrogénreceptorok iránt nagy affinitást mutató vizsgálati vegyi anyagok alacsonyabb koncentrációban versenyeznek a radioaktívan jelölt ligandummal azokhoz a vegyi anyagokhoz képest, amelyek kisebb affinitást mutatnak a receptor iránt. A vizsgálat két fő összetevőből áll: egy telítési kötési kísérletből, amelynek során meghatározzák a receptor-ligandum kölcsönhatás paramétereit és dokumentálják az ösztrogénreceptor-specifikusságot, majd egy kompetitív kötési kísérletből, amely jellemzi a vizsgálati vegyi anyag és a radioaktívan jelölt ligandum ER-kötőhelyekért folytatott vetélkedését.

6. A CER1 és a Freyberger–Wilson kötési vizsgálat validálási tanulmánya igazolta, hogy e vizsgálatok tervezett felhasználásuk tekintetében relevánsak és megbízhatóak (2).
7. A vizsgálati módszerben használt fogalmak és rövidítések meghatározását az 1. függelék tartalmazza.

A receptorkötési vizsgálatok alkalmazási területe és korlátai

8. E vizsgálatokat szűrési és rangsorolási célra ajánlják, ugyanakkor a molekuláris kiváltó eseményre vonatkozólag is képesek adatokat szolgáltatni, amelyek felhasználhatók egy bizonyítékok súlyozásán (WoE) alapuló megközelítésben. A vizsgálatok tárgya az ösztrogénreceptor α ligandumkötő doménjén *in vitro* létrejövő kémiai kötés. Ezért az eredményekből nem lehet közvetlenül következtetni az intakt *in vivo* endokrin rendszerben megvalósuló összetett jelátvitelre és szabályozásra.
9. A természetes ligandum, a 17β -ösztradiol megkötése az első lépése annak a molekuláris eseménysorozatnak, amely aktiválja a célgén transzkripcióját, majd végül egy fiziológiai változást idéz elő (9). Tehát az ösztrogénreceptor α ligandumkötő doménjéhez való kötetést az ösztrogénreceptorok által kiváltott endokrin zavarok (ED) egyik fő mechanizmusaként tartják számon, bár más mechanizmusok is okozhatnak endokrin zavarokat, többek között i. az ösztrogénreceptor α ligandumkötő régióján kívüli részeivel létrejött kölcsönhatások, ii. az ösztrogén jelátvitel szempontjából releváns más receptorokkal, mint pl. az ösztrogénreceptor β -val, az ösztrogénreceptorokkal kapcsolt g-fehérjékkel, az endokrin rendszeren belüli más receptorokkal és enzimrendszerekkel létrejött kölcsönhatások, iii. hormonszintézis, iv. a hormonok metabolikus aktiválása és/vagy inaktiválása, v. hormonok elszállítása a célszövetekhez és vi. hormonok kiürülése a szervezetből. E hatásmechanizmusokkal a vizsgálati módszer alá tartozó vizsgálatok egyike sem foglalkozik.
10. E vizsgálati módszer célja, hogy felmérje az anyagok humán ösztrogénreceptor α -hoz való kötődési képességét, és nem teszi lehetővé az ösztrogénreceptor α agonistái és antagonistái közötti különbségtételt. E vizsgálatok nem foglalkoznak továbbá az eseménysorozat későbbi történéseivel, például a géntranszkripcióval vagy a fiziológiai változásokkal. Mivel a validálás során csak különálló, egy komponensű anyagokat használtak, a vizsgálat keverékekre való alkalmazhatósága nem vetődött fel. Mindazonáltal a vizsgálatok elvileg alkalmazhatók több összetevőből álló anyagok és keverékek vizsgálatára. A vizsgálati módszer tervezett szabályozási célt szolgáló adatgenerálás érdekében, keveréken történő alkalmazása előtt meg kell vizsgálni, hogy az megfelelő eredményeket biztosíthat-e erre a célra, és ha igen, miért. Ilyen megfontolások nem szükségesek, ha létezik a keverék vizsgálatára vonatkozó szabályozási követelmény.
11. A sejtmentes receptorrendszerek nem rendelkeznek saját metabolikus képességgel, metabolikus enzimrendszerekkel kombinált használatukat pedig nem validálták.

Elképzelhető, hogy kidolgozható lenne egy metabolikus aktivitást magában foglaló vizsgálat, ez azonban további validálást tenne szükségessé.

12. Azok a vegyi anyagok, amelyek denaturálhatják a fehérjét (vagyis a receptor fehérjét), például a felületaktív anyagok, vagy amelyek módosíthatják a vizsgálati puffer pH-értékét, nem vizsgálhatók, vagy csak olyan koncentrációkban vizsgálhatók, amelyek nem idéznek elő ilyen hatásokat. Ezen túlmenően egy adott vizsgálati vegyi anyag tesztelhető koncentrációtartományát a vizsgálati pufferben való oldhatósága is korlátozza.
13. Az 1. táblázat tájékoztatási céllal ismerteti az e vizsgálati módszer által leírt mindkét teljes körűen validált vizsgálatban tesztelt 24 anyagra vonatkozó eredményeket. A szóban forgó anyagok közül 17-et ösztrogénreceptorhoz kötődő anyagként határoztak meg, 6-ot pedig nem kötődőnek minősítették a közzétett vizsgálati jelentésnek, többek között az *in vitro* ösztrogénreceptor transzkripciós aktivációs vizsgálatok és/vagy az uterotrofikus vizsgálat alapján (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). Az 1. táblázatban összefoglalt adatok vonatkozásában 10^{-4} M koncentrációig szinte 100 %-os egyezés mutatható ki a két vizsgálat között valamennyi anyag besorolása tekintetében, és minden anyagot helyesen osztályoztak ösztrogénreceptorhoz kötődő és nem kötődő anyagként. Erről az anyagcsoportról, valamint a validálási tanulmányok során az ösztrogénreceptor-kötési vizsgálatokban tesztelt egyéb anyagokról a humán ösztrogénreceptorhoz-kötési vizsgálat teljesítményszabványai nyújtanak bővebb tájékoztatást (3), lásd a 2. függelék (1., 2., és 3. táblázat).

1. táblázat: A Freyberger–Wilson (FW) és a CERI humán ösztrogénreceptor-kötési vizsgálat során tesztelt anyagok ösztrogénreceptorhoz kötődő és nem kötődő anyagként való besorolása a várt válasszal való összevetésben

	Az anyag neve	CAS-szám	Várt válasz	FW vizsgálat		CERI vizsgálat		MESH kémiai osztály	Termékosztály
				Koncentráció-tartomány (M)	Besorolás	Koncentráció-tartomány (M)	Besorolás		
1	17β-ösztradiol	50-28-2	Kötődő	1x10 ⁻¹¹ –1x10 ⁻⁶	Kötődő	1x10 ⁻¹¹ –1x10 ⁻⁶	Kötődő	Szteroid	Gyógyszer, állatgyógyászati hatóanyag
2	Noretynodrel	68-23-5	Kötődő	3x10 ⁻⁹ –30x10 ⁻⁴	Kötődő	3x10 ⁻⁹ –30x10 ⁻⁴	Kötődő	Szteroid	Gyógyszer, állatgyógyászati hatóanyag
3	Noretindron	68-22-4	Kötődő	3x10 ⁻⁹ –30x10 ⁻⁴	Kötődő	3x10 ⁻⁹ –30x10 ⁻⁴	Kötődő	Szteroid	Gyógyszer, állatgyógyászati hatóanyag
4	Di- <i>n</i> -butil-ftalát	84-74-2	Nem kötődő*	1x10 ⁻¹⁰ –1x10 ⁻⁴	Nem kötődő**†	1x10 ⁻¹⁰ –1x10 ⁻⁴	Nem kötődő**†	Szénhidrogén (ciklikus), észter	Lágyítószer, köztes vegyi anyag
5	Dietilstilbösztrol	56-53-1	Kötődő	1x10 ⁻¹⁰ –1x10 ⁻³	Kötődő	1x10 ⁻¹⁰ –1x10 ⁻³	Kötődő	Szénhidrogén (ciklikus), fenol	Gyógyszer, állatgyógyászati hatóanyag
6	17α-etinilösztradiol	57-63-6	Kötődő	1x10 ⁻¹⁰ –1x10 ⁻³	Kötődő	1x10 ⁻¹⁰ –1x10 ⁻³	Kötődő	Szteroid	Gyógyszer, állatgyógyászati hatóanyag
7	Mezo-hexestrol	84-16-2	Kötődő	1x10 ⁻¹⁰ –1x10 ⁻³	Kötődő	1x10 ⁻¹⁰ –1x10 ⁻³	Kötődő	Szénhidrogén (ciklikus), fenol	Gyógyszer, állatgyógyászati hatóanyag
8	Geniszen	446-72-0	Kötődő	1x10 ⁻¹⁰ –1x10 ⁻³	Kötődő	1x10 ⁻¹⁰ –1x10 ⁻³	Kötődő	Szénhidrogén (heterociklikus), flavonid	Természetes termék
9	Equol	531-95-3	Kötődő	1x10 ⁻¹⁰ –1x10 ⁻³	Kötődő	1x10 ⁻¹⁰ –1x10 ⁻³	Kötődő	Fitoösztrogén metabolit	Természetes termék
10	Butil-parabén (nátrium-butil-4-hidroxibenzóát)	94-26-8	Kötődő	1x10 ⁻¹⁰ –1x10 ⁻³	Kötődő	1x10 ⁻¹⁰ –1x10 ⁻³	Kötődő	Parabén	Tartósítószer
11	Nonilfenol (keverék)	84852-15-3	Kötődő	1x10 ⁻¹⁰ –1x10 ⁻³	Kötődő	1x10 ⁻¹⁰ –1x10 ⁻³	Kötődő	Alkil-fenol	Köztes vegyület
12	<i>o,p'</i> -DDT	789-02-6	Kötődő	1x10 ⁻¹⁰ –1x10 ⁻³	Kötődő	1x10 ⁻¹⁰ –1x10 ⁻³	Kötődő	Szerves klór	Rovarölő szer
13	Kortikoszteron	50-22-6	Nem kötődő*	1x10 ⁻¹⁰ –1x10 ⁻⁴	Nem kötődő	1x10 ⁻¹⁰ –1x10 ⁻⁴	Nem kötődő	Szteroid	Természetes termék
14	Zearalenon	17924-92-4	Kötődő	1x10 ⁻¹⁰ –1x10 ⁻³	Kötődő	1x10 ⁻¹⁰ –1x10 ⁻³	Kötődő	Szénhidrogén (heterociklikus), lakton	Természetes termék
15	Tamoxifén	10540-29-1	Kötődő	1x10 ⁻¹⁰ –1x10 ⁻³	Kötődő	1x10 ⁻¹⁰ –1x10 ⁻³	Kötődő	Szénhidrogén (ciklikus)	Gyógyszer, állatgyógyászati hatóanyag
16	5α-dihidroteszteron	521-18-6	Kötődő	1x10 ⁻¹⁰ –1x10 ⁻³	Kötődő	1x10 ⁻¹⁰ –1x10 ⁻³	Kötődő	Szteroid, nem fenolos	Természetes termék
17	Biszfénol-A	80-05-7	Kötődő	1x10 ⁻¹⁰ –1x10 ⁻³	Kötődő	1x10 ⁻¹⁰ –1x10 ⁻³	Kötődő	Fenol	Köztes vegyi anyag
18	4-n-heptilfenol	1987-50-4	Kötődő	1x10 ⁻¹⁰ –1x10 ⁻³	Kétértelmű ^a	1x10 ⁻¹⁰ –1x10 ⁻³	Kötődő	Alkil-fenol	Köztes
19	Kepone (klórdekon)	143-50-0	Kötődő	1x10 ⁻¹⁰ –1x10 ⁻³	Kötődő	1x10 ⁻¹⁰ –1x10 ⁻³	Kötődő	Szénhidrogén (halogénezett)	Peszticid
20	Benz(a)antracén	56-55-3	Nem kötődő	1x10 ⁻¹⁰ –1x10 ⁻³	Nem kötődő ^b	1x10 ⁻¹⁰ –1x10 ⁻³	Nem kötődő ^b	Aromás szénhidrogén	Köztes

21	Enterolakton	78473-71-9	<i>Kötődő</i>	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kötődő	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kötődő	Fitoösztrogén	Természetes termék
22	Progeszteron	57-83-0	<i>Nem kötődő*</i>	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Nem kötődő	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Nem kötődő	Szteroid	Természetes termék
23	Oktil-trietoxi-szilán	2943-75-1	<i>Nem kötődő</i>	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Nem kötődő	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Nem kötődő	Szilán	Felületmódosító
24	Atrazin	1912-24-9	<i>Nem kötődő*</i>	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Nem kötődő	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Nem kötődő	Heterociklikus vegyület	Gyomirtó szer

*Oldhatósági határérték $< 1 \times 10^{-4}$ M.

*A di-*n*-butil-ftalát (DBP) nem kötődő anyagként való alkalmazása és besorolása 10^{-4} M koncentrációig történő vizsgálatán alapul, mivel az elővalidálási tanulmányok során néhány laboratóriumban 10^{-3} M koncentrációban oldhatatlannak bizonyult (pl. zavarosságot mutatott).

† A validálási tanulmány során a di-*n*-butil-ftalátot (DBP) kódolt vizsgálati anyagként tesztelték, 10^{-3} M koncentrációig. E feltételek mellett bizonyos laboratóriumok a legmagasabb koncentrációnál (10^{-3} M) a radioaktív ligandum kötődésének csökkenését figyelték meg és/vagy kétértelmű görbeillesztést tapasztaltak. E vizsgálatmenetek tekintetében a DBP a CERI vizsgálatot alkalmazó öt laboratórium közül háromban, és a Freyberger–Wilson vizsgálatot alkalmazó hat laboratórium közül ötben „kétértelmű” vagy „kötődő” besorolást kapott (lásd a (2) referencia IV.B.3a,b és VI.A részeit).

^a Besorolása nem egyezik a várt besorolással. Mivel a 4-*n*-heptilfenolt öt laboratórium közül három „kétértelműnek” vagy „nem kötődőnek” minősítette, az átlag alapján kétértelmű besorolást kapott. Az alaposabb vizsgálat feltárta, hogy ennek oka a vegyi anyag oldhatósági korlátaiban keresendő, amelyek megakadályozták a teljes kötési görbe létrehozását.

^b A benz(a)antracén a validálási tanulmány során új besorolást kapott, nem kötődő (vagyis negatív) anyagként azonosították a közzétett szakirodalom alapján, amely igazolta, hogy az anyag *in vitro* megfigyelt ösztrogénhatású aktivitása (16) elsősorban metabolikus aktiválásától függ(17)(18). Az anyag enzimatis metabolikus aktiválása nem várható az ezen intervalidálási tanulmány keretében alkalmazott sejtmentes humán ösztrogénreceptor-kötési vizsgálatokban. Ezért a Freyberger–Wilson és a CERI vizsgálat kísérleti körülményei között történő alkalmazása szempontjából az anyag helyes besorolása a „nem kötődő”.

A humán ÖSZTROGÉNRECEPTOR-KÖTÉSI VIZSGÁLAT ÖSSZETEVŐI

A vizsgálat alapvető összetevői

14. Ez a vizsgálati módszer olyan vizsgálatokra vonatkozik, amelyek ösztrogénreceptort és a receptorhoz kellően nagy affinitással kötődő ligandumot alkalmaznak, amely a vizsgálat során markerként/nyomjelzőként használható, és a vizsgálati vegyi anyagok növekvő koncentrációjával lezorítható. A kötési vizsgálatok az alábbi két fő összetevőből állnak: 1) telítési kötés és 2) kompetitív kötés. A telítési kötési vizsgálat során ellenőrzik a receptor preparátumok specifikusságát és aktivitását, a kompetitív kötési kísérlet során pedig értékelik a vizsgálati vegyi anyagok humán ösztrogénreceptorhoz való kötési képességét.

Kontrollok

15. Meg kell határozni, hogy mi alapján javasolják a párhuzamosan vizsgált referenciaösztrogént és kontrollanyagokat. Az egyidejűleg elvégzett kontrollok (oldószeres (vivőanyag), pozitív (ösztrogénreceptorhoz kötődő; erős és gyenge affinitással rendelkező) és negatív (nem kötődő) kontrollok) arra szolgálnak, hogy igazolják a vizsgálat tesztkörülmények közötti megfelelő működését, és megteremtsék az alapját az egyes kísérletek összevetésének; általában részét képezik a szóban forgó kísérlet elfogadhatósági kritériumainak (1). Minden vizsgálatmenetben ugyanazon a lemezen vizsgálni kell a referenciaösztrogén teljes

koncentrációgörbéjét és a kontrollanyagokat (vagyis a gyengén kötődő és a nem kötődő anyagot). Az összes többi lemeznek az alábbiakat kell tartalmazniuk: 1) az E2 és a gyengén kötődő anyag magas koncentrációját (amely megközelítőleg teljesen leszorítja a radioaktívan jelölt ligandumot) és közepes koncentrációját (amely körülbelül az IC₅₀ hatásának felel meg), három ismételtsében; 2) az oldószer és a nem specifikus kötődés vizsgálatát, három-három ismételtsében.

Standard minőség-ellenőrzési eljárások

16. El kell végezni az egyes vizsgálatokhoz meghatározott standard minőség-ellenőrzési eljárásokat annak érdekében, hogy garantálni lehessen a receptorok aktivitását, a vegyi anyag megfelelő koncentrációértékeit, a tűréshatárok többszöri ismételtsen keresztüli stabilitását, valamint a várt ösztrogénreceptor-kötési válaszreakciók biztosításának hosszú távú képességét.

A laboratórium jártasságának igazolása

17. Mielőtt ismeretlen vegyi anyagokat tesztelnének az e vizsgálati módszerhez kapcsolódó bármely vizsgálattal, a laboratóriumoknak igazolniuk kell az adott vizsgálat alkalmazásában szerzett jártasságukat azáltal, hogy végrehajtanak az ösztrogénreceptor preparátum specifikusságának és aktivitásának ellenőrzésére szolgáló telítési vizsgálatokat, valamint a referenciaösztrogént és a kontrollokat (gyengén kötődő és nem kötődő anyagokat) is tesztelő kompetitív kötési vizsgálatokat. A laboratóriumoknak adatbázist kell létrehozniuk a referenciaösztrogénnel és a kontrollanyagokkal különböző napokon végzett 3–5 független kísérletről származó eredményekből. Ezek a kísérletek teremtik meg az alapját annak, hogy a laboratóriumok a referenciaösztrogénre és a kontrollanyagokra vonatkozólag dokumentált adatokkal rendelkezzenek, amelyeket a jövőbeni vizsgálatmenetek során felhasználnak a vizsgálat elfogadhatóságának értékeléséhez.
18. A vizsgálati rendszer reakcióképességét a 2. táblázatban felsorolt jártassági tesztanyagok vizsgálata révén is meg kell erősíteni. A jártassági tesztanyagok jegyzéke az ösztrogénreceptor-kötési vizsgálatok teljesítményszabványaiban (3) megadott referenciaanyagok egy csoportjából tevődik össze. Ezek az anyagok kereskedelmi forgalomban beszerezhetők, olyan kémiai osztályokat képviselnek, amelyeknél gyakori az ösztrogénreceptor-kötési aktivitás, a várt ösztrogénreceptor-kötési potenciál megfelelő (erőstől a gyengéig terjedő) tartományát képviselik, és vannak közöttük nem kötődő (azaz negatív) anyagok. Az egyes jártassági tesztanyagok vizsgált koncentrációértékeinek le kell fedniük a 2. táblázatban szereplő tartományt. Minden anyag esetében legalább három kísérletet kell végezni, és az eredményeknek összhangban kell lenniük a vegyi anyag várt aktivitásával. Az összes kísérletet független módon (vagyis a receptor, a vizsgálati vegyi anyagok és a reagens frissen készített oldataival) kell végrehajtani, minden egyes koncentrációértéket három ismételtsében vizsgálva. A jártasság az egyes jártassági tesztanyagok megfelelő (pozitív/negatív) osztályba sorolásával igazolható. A vizsgálatok elsajátítása során a jártassági vizsgálatot minden szakembernek el kell végeznie.

2. táblázat: A humán ösztrogénreceptor kompetitív kötési vizsgálatokban használt kontrollanyagok és jártassági tesztanyagok jegyzéke¹

Szám	Az anyag neve	CAS-szám ²	Várt válasz ^{3,4}	Vizsgálati koncentrációtartomány (M)	MeSH kémiai osztály ⁵	Termékosztály ⁶
Kontrollanyagok (referenciaösztrogén, gyengén kötődő és nem kötődő anyag)						
1	17- β -ο ζ τραδιολ	50-28-2	Kötődő	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Szteroid	Gyógyszer, állatgyógyászati hatóanyag
2	Noretynodrel (vagy) Noretindron	68-23-5 (vagy) 68-22-4	Kötődő	3×10^{-9} – 30×10^{-6}	Szteroid	Gyógyszer, állatgyógyászati hatóanyag
3	Oktil-trietoxi-szilán	2943-75-1	Nem kötődő	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Szilán	Felületmódosító
Jártassági tesztanyagok⁶						
4	Dietilstilbösztrol	56-53-1	Kötődő	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Szénhidrogén (ciklikus), fenol	Gyógyszer, állatgyógyászati hatóanyag
5	17 α -etinilösztadiol	57-63-6	Kötődő	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Szteroid	Gyógyszer, állatgyógyászati hatóanyag
6	mezo-Hexestrol	84-16-2	Kötődő	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Szénhidrogén (ciklikus), fenol	Gyógyszer, állatgyógyászati hatóanyag
7	Tamoxifén	10540-29-1	Kötődő	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Szénhidrogének (ciklikus)	Gyógyszer, állatgyógyászati hatóanyag
8	Geniszten	446-72-0	Kötődő	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Heterociklikus vegyület, flavonid	Természetes termék
9	Biszfénol-A	80-05-7	Kötődő	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Fenol	Köztes vegyi anyag
10	Zearalenon	17924-92-4	Kötődő	1×10^{-11} – 1×10^{-3}	Heterociklikus vegyület, lakton	Természetes termék

11	Butil-parabén	94-26-8	Kötődő	1×10^{-11} – 1×10^{-3}	Karbonsav, fenol	Tartósítószer
12	Atrazin	1912-24-9	Nem kötődő	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Heterociklikus vegyület	Gyomirtó szer
13	Di-n-butil-ftalát (DBP) ⁷	84-74-2	Nem kötődő ⁸	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Szénhidrogén (ciklikus), észter	Lágyítószer, köztes vegyi anyag
14	Kortikoszteron	50-22-6	Nem kötődő	1×10^{-11} – 1×10^{-4}	Szteroid	Természetes termék

¹ Amennyiben egy adott jártassági tesztanyag kereskedelmi forgalmazása megszűnik, akkor használható helyette egy ösztrogénreceptor-kötés tekintetében azonos besorolású, hasonló potenciállal rendelkező, azonos kémiai osztályba tartozó anyag.

² Rövidítések: CAS-szám = Vegyianyag Nyilvántartási Szolgálat (CAS) nyilvántartási szám.

³ Az anyagok ER α -hoz kötődő és nem kötődő kategóriába sorolására a CERI és a Freyberger–Wilson humán ösztrogénreceptor-kötési vizsgálat validálási tanulmányának keretében került sor (2).

⁴ Az ösztrogénreceptor-kötési aktivitás besorolásának alapját az ösztrogénreceptor-kötési és transzaktiválási vizsgálatok felülvizsgálatára vonatkozó ICCVAM-háttérdocumentumok (9), valamint a hivatkozásokban szereplő, közzétett és átdolgozott tanulmányokból nyert empirikus adatok és egyéb információk képezik (10) (11) (12) (13) (14) (15).

⁵ Az anyagok egy vagy több kémiai osztályba sorolása az Egyesült Államok nemzetközileg elismert szabványosított osztályozási rendszere, a Medicine's Medical Subject Headings (MeSH) nemzeti könyvtára alapján történt (elérhető a következő címen: <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁶ Az anyagok egy vagy több termékosztályba sorolása az Egyesült Államok Medicine's Hazardous Substances Database nemzeti könyvtára alapján történt (elérhető a következő címen: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).

⁷ A legfeljebb 10^{-4} M koncentrációig vizsgált DPB használható alternatív nem kötődő kontrollanyagként.

⁸ Az anyag oldhatósági határértéke 10^{-4} M. A di-n-butil-ftalát (DBP) nem kötődő anyagként való alkalmazása és besorolása 10^{-4} M koncentrációig történő vizsgálatán alapul, mivel az elővalidálási tanulmányok során néhány laboratóriumban 10^{-3} M koncentrációban oldhatatlannak bizonyult (pl. zavarosságot mutatott).

A vizsgálati vegyi anyagok oldhatósági vizsgálata és koncentrációtartományuk behatárolása

19. Előzetes vizsgálatot kell végezni az egyes vizsgálati vegyi anyagok oldhatósági határértékének meghatározására, valamint a vizsgálat során alkalmazandó megfelelő koncentrációtartomány megállapítására. A vizsgálati vegyi anyagok oldhatósági határértékét először oldószerben kell meghatározni, majd a vizsgálati körülmények mellett meg kell erősíteni. A vizsgálat során tesztelt végső koncentráció nem haladhatja meg az 1 mM-t. A koncentrációtartomány-behatároló vizsgálatnak magában kell foglalnia egy oldószeres kontrollt és a legmagasabb elfogadható koncentrációtól (pl. 1 mM, illetve az oldhatósági határértéktől függően ennél alacsonyabb koncentrációtól) induló, nyolc koncentrációból álló logaritmikus hígítási sorozatot, az esetlegesen tapasztalt zavarosságot vagy kicsapódást fel kell jegyezni. A második és a harmadik kísérlet koncentrációértékeit úgy kell megválasztani, hogy jobban illeszkedjenek a koncentráció-válasz görbéhez.

A vizsgálatmenet elfogadhatósági kritériumai

20. A vizsgálatmenetek elfogadására vagy elvetésére a minden kísérletben vizsgált referenciaösztrogén és kontrollanyagok eredményeinek értékelése alapján kerül sor. Először is, az 1. lemez tekintetében minden kísérlet referenciaként szolgáló kontrollanyagainak görbeillesztési paramétereiből (pl. az IC_{50} és a Hill-meredekség) létrehozott teljes koncentrációgörbéknek meg kell felelniük a teljesítménymutatóknak, amit a CERI és a Freyberger–Wilson vizsgálat protokolljában (2. és 3. függelék) feltüntetett eredmények, valamint a vizsgálatot végző laboratórium történeti kontrolladatai alapján értékelnek. Minden kísérletben helyesen kell besorolni valamennyi kontrollanyagot (a referenciaösztrogén, valamint a gyengén kötődő és a nem kötődő anyagot). Másodszor pedig fel kell mérni, hogy az összes többi lemezen végzett kontrollok eredményei egybevágóak-e az 1. lemez eredményeivel. A vizsgálati vegyi anyag megfelelő koncentrációtartományát kell vizsgálni ahhoz, hogy egyértelműen meg lehessen határozni a kompetitív kötési görbe telítési csúcsát. A vizsgálati vegyi anyag egyes koncentrációinak ismétlései közötti, illetve a három független vizsgálatmenet közötti eltéréseknek észszerűnek és tudományosan védhetőnek kell lenniük. A vizsgálat következetes végrehajtásának képességét bizonyítani kell azáltal, hogy a laboratóriumok adatbázist hoznak létre és tartanak fent a referenciaösztrogén és a kontrollanyagok adataiból. A laboratóriumon belüli reprodukálhatóság mérésére használhatók a referenciaösztrogén és a kontrollként szolgáló gyengén kötődő anyag több kísérletből származó görbeillesztési paramétereinek átlagának standard deviációi (SD) vagy variációs koefficiensei (CV). Az egyes vizsgálatmenetek lemezein vizsgált kontrollanyagok és minden vizsgálati vegyi anyag eredményeinek értelmezése során szakmai megítélés alapján kell dönteni.

Ezenkívül érvényesülniük kell az elfogadhatósági kritériumokra vonatkozó alábbi elveknek is:

- elegendő mennyiségű adattal kell rendelkezni ahhoz, hogy számszerűen értékelni lehessen az ösztrogénreceptor-kötést;

- a vizsgált koncentrációknak a vizsgálati vegyi anyag oldhatósági tartományán belül kell maradniuk.

Az adatok elemzése

21. A telítési és a kompetitív kötési adatok meghatározott adatelemzési eljárásának meg kell felelnie a receptor és a ligandum közötti kölcsönhatások jellemzésére vonatkozó főbb elveknek. A telítési kötési adatokat jellemzően egy nem-lineáris regressziós modellel elemzik, amellyel meghatározható mind a teljes, mind a nem specifikus kötődés. A $B_{\max}$ és a K_d értékek meghatározásakor a ligandum csökkenése miatt szükség lehet korrekcióra (pl. Swillens, 1995 (19)). A kompetitív kötési vizsgálatok adatait általában transzformálják (pl. a specifikus kötődés arányát és a vizsgálati vegyi anyag koncentrációit ($\log M$)). Az egyes vizsgálati vegyi anyagok $\log (IC_{50})$ értékének megbecsüléséhez egy megfelelő nem-lineáris görbeillesztő szoftvert kell használni, amely illeszteni tud a négyparaméteres Hill-egyenletre. A kezdeti elemzést követően meg kell határozni a görbeillesztési paramétereket, és vizuálisan ellenőrizni kell, hogy a kötési adatok mennyire illeszkednek a létrehozott kompetitív kötési görbére. Bizonyos esetekben a legjobban illeszkedő görbe meghatározásához további elemzésre lehet szükség (pl. a görbe tetejének és/vagy aljának szűkítésére, a 10 %-os szabály alkalmazására, lásd a 4. függelékét és a 2. referenciát (a III.A.2. részben)).
22. Az elfogadhatósági kritériumok (20. pont) teljesítése jelzi a vizsgálati rendszer megfelelő működését, de nem garantálja egy adott vizsgálat adatainak pontosságát. Az adatok pontosságát az jelzi a legjobban, ha az első vizsgálat helyes eredményei megismételhetők.

Az adatok értelmezésének általános kritériumai

23. Jelenleg nincs általánosan elfogadott módszer az ösztrogénreceptor-kötési adatok értelmezésére. Ugyanakkor a humán ösztrogénreceptor által közvetített aktivitás kvalitatív (pl. kötődő/nem kötődő) és/vagy kvantitatív (pl. $\log IC_{50}$, relatív kötődési affinitás (RBA) stb.) értékelésének empirikus adatokon és megalapozott tudományos véleményen kell nyugodnia.

Vizsgálati jelentés

24. A vizsgálati jelentésnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálat:

- az alkalmazott vizsgálat.

Kontroll/referencia/vizsgálati vegyi anyag

- eredet, gyártási szám, felhasználási határidő, ha rendelkezésre áll;
- a vizsgálati vegyi anyag stabilitása, ha ismert;
- a vizsgálati vegyi anyag oldhatósága és stabilitása az oldószerben, ha ismert;

- adott esetben a pH-érték, az ozmolalitás és a kicsapódás mérése abban a tápfolyadékban, amelyhez a vizsgálati vegyi anyagot hozzáadták.

Egy összetevőből álló anyag:

- fizikai megjelenés, vízdékonyság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok;
- kémiai azonosítás, például IUPAC- vagy CAS-névvel, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet alapján, tisztaság, adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb. alapján;

Több összetevőből álló anyag, UVCB-k és keverékek:

- amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosítója (lásd fent), mennyiségi előfordulása és releváns fizikai-kémiai tulajdonságai által jellemezve.

Oldószer/vivőanyag:

- jellemzés (az anyag természete, forgalmazója és gyártási száma);
- az oldószer/vivőanyag kiválasztásának indokolása;
- a vizsgálati vegyi anyag oldhatósága és stabilitása az oldószerben/vivőanyagban, ha ismert.

Receptorok:

- a receptorok eredete (forgalmazó, katalógusszám, receptor faj, a forgalmazó által megadott aktív receptor koncentráció, a forgalmazó által kiadott tanúsítvány);
- a receptorok jellemzése (többek között a telítési kötési vizsgálat eredményei): K_d , B_{max} ;
- a receptorok tárolása;
- radioaktívan jelölt ligandum;
- forgalmazó, katalógusszám, tétel, specifikus aktivitás.

Vizsgálati körülmények:

- a vizsgálati körülmények között fennálló oldhatósági korlátok;
- a kötési vizsgálat pufferének összetétele;
- a receptor koncentrációja;
- a nyomjelző (vagyis a radioaktívan jelölt ligandum) koncentrációja;
- a vizsgálati vegyi anyag koncentrációi;
- a vivőanyag aránya a végső vizsgálatban;
- inkubációs hőmérséklet és idő;
- a kötött és a szabad ligandumok elkülönítésére használt módszer;
- pozitív és negatív kontrollanyagok/referenciaanyagok;

- kritériumok, amelyek eldöntik, hogy a vizsgálatok pozitívnak, negatívnak vagy többféleképpen magyarázhatónak tekintendők-e.

Elfogadhatóság ellenőrzése:

- a párhuzamos pozitív kontrollok/referenciaanyagok tényleges IC_{50} és Hill-merekségi értéke.

Eredmények:

- nyers adatok és a kötött/szabad ligandumokra vonatkozó adatok;
- adott esetben denaturálást ellenőrző vizsgálat;
- ha létezik, a legkisebb hatásos koncentráció (LEC);
- adott esetben az RBA és/vagy az IC_{50} értéke;
- amennyiben lehetséges, a koncentráció-válasz összefüggés;
- statisztikai elemzések, ha végeztek ilyeneket, hiba- és megbízhatósági számításokkal (pl. SEM, SD, CV vagy 95 % CI), és annak leírása, hogy milyen módon kapták ezeket az értékeket.

Az eredmények értékelése:

- a 10 %-os szabály alkalmazása.

Következtetések

SZAKIRODALOM

- (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), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.
- (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), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.
- (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), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.
- (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), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.
- (5) Cavaillès V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept, Climacteric, 5 Suppl 2: p.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): p. 1073-89.
- (7) Younes M. and Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 135(1): p. 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), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.
- (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. p. 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.

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS RÖVIDÍTÉSEK

10 %-os szabály: annak lehetősége, hogy az elemzésből kizárják azokat az adatpontokat, amelyek esetében a [³H]17β-ösztadiol specifikus kötődési arányát mérő ismételések átlaga legalább 10 %-kal meghaladja a valamely alacsonyabb koncentrációnál megfigyelt átlagértéket (lásd a 4. függelék).

Elfogadhatósági kritériumok: a kísérleti kontrollok és referenciaszabványok megfelelőségére vonatkozó minimális előírások. Ahhoz, hogy egy kísérlet érvényesnek minősüljön, meg kell felelni valamennyi elfogadhatósági kritériumnak.

Pontosság (egyezőség): a vizsgálati eredmények és az elfogadott referenciaértékek közötti egyezés eltérése. A vizsgálat megfelelőségének mutatója, és relevanciájának egyik szempontja. E kifejezést gyakran használják az „egyezőség” szinonimájaként, amely arra utal, hogy egy adott vizsgálat milyen arányban szolgáltat helyes eredményeket (1).

CF: Az OECD endokrin rendszert károsító anyagok vizsgálatára és értékelésére szolgáló fogalmi kerete.

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

CV: variációs koefficiens.

E2: 17β-ösztadiol

ED: az endokrin rendszer károsítása.

hERα: humán ösztrogénreceptor alfa.

ER: ösztrogénreceptor.

Ösztrogénhatású aktivitás: egy vegyi anyag azon képessége, hogy a 17β-ösztadiolhoz hasonlóan ösztrogénreceptorokhoz kötődjön. Ezzel a vizsgálati módszerrel a humán ösztrogénreceptor alfához való kötődés észlelhető.

IC₅₀: egy gátló vizsgálati vegyi anyag maximális tényleges hatásának felét kiváltó koncentráció.

ICCVAM: alternatív módszerek validálásával foglalkozó ügynökségközi koordinációs bizottság.

Laboratóriumok közötti reprodukálhatóság: annak a mutatója, hogy különböző minősített laboratóriumok milyen mértékben képesek ugyanazon protokoll alkalmazásával és ugyanazon anyagok vizsgálatával hasonló kvalitatív és kvantitatív eredményeket elérni. A laboratóriumok közötti reprodukálhatóság az elővalidálási és validálási folyamat során kerül meghatározásra, és annak mértékét jelzi, hogy az adott vizsgálat mennyire sikeresen vihető át laboratóriumok között; más néven laboratóriumok közötti megismételhetőség (1).

Laboratóriumon belüli reprodukálhatóság: annak meghatározása, hogy egy adott laboratóriumon belül dolgozó szakemberek milyen mértékben képesek egy meghatározott

protokoll alapján különböző időpontokban sikeresen megismételni az eredményeket. Más néven „laboratóriumon belüli megismételhetőség” (1).

LEC: a legkisebb hatásos koncentráció a vizsgálati vegyi anyag azon legalacsonyabb koncentrációja, amely választ vált ki (vagyis a vizsgálati vegyi anyag legkisebb koncentrációja, amelynél az indukciós tényező statisztikailag eltér a párhuzamos vivőanyagok kontrolltól).

Me-too vizsgálat: olyan vizsgálatok köznapi elnevezése, amelyek strukturálisan és funkcionálisan hasonlóak egy validált és elfogadott, referenciaként szolgáló vizsgálati módszerhez. A hasonló vizsgálati módszer szinonimája.

PBTG: teljesítményalapú vizsgálati iránymutatás.

Teljesítményszabványok: validált vizsgálati módszeren alapuló szabványok, amelyek a javasolt, végrehajtás és funkcionalitás szempontjából hasonló vizsgálat összehasonlíthatósági értékelésének alapjául szolgálnak. Ide tartoznak: (1) a vizsgálat alapvető összetevői; (2) a referencia-vegyianyagok minimális jegyzéke, amely a validált vizsgálati módszer elfogadható teljesítményének igazolására használt vegyi anyagokból került összeállításra; és (3) a validált vizsgálati módszer eredményei alapján meghatározott, hasonló megbízhatósági és pontossági szintek, amelyeket a javasolt vizsgálatnak teljesítenie kell a minimális jegyzék referencia-vegyianyagainak felhasználásával történő értékelése során (1).

Jártassági tesztanyagok: a teljesítményszabványokban megadott referenciaanyagokon belüli alcsoport, amelyet a laboratóriumok felhasználhatnak egy adott szabványosított vizsgálatban való szakmai jártasságuk igazolására. Ezeket az anyagokat általában az alapján választják ki, hogy összességükben lefedik a válaszreakciók lehetséges tartományát, kereskedelmi forgalomban kaphatók és rendelkezésre állnak rájuk vonatkozó minőségi referenciaadatok.

Jártasság: annak igazolása, hogy a laboratórium képes megfelelően lefolytatni egy adott vizsgálatot, mielőtt ismeretlen anyagokat tesztelne.

Referenciaösztrogén: 17 β -ösztradiol (E2, CAS-száma: 50-28-2).

Vizsgálati referenciamódszerek: A 493. teljesítményalapú vizsgálati iránymutatás alapját képező vizsgálatok.

RBA: relatív kötési affinitás. Valamely anyag relatív kötési affinitását az anyag log (IC₅₀) értékének a 17 β -ösztradiol log (IC₅₀) értékéhez viszonyított arányaként határozzák meg.

Relevancia: valamely vizsgálat és a vizsgált hatás kapcsolatát adja meg, valamint azt, hogy van-e a vizsgálatnak az adott cél szempontjából értelme és haszna. Azt tükrözi, hogy a vizsgálat mennyire pontosan méri vagy jelzi előre a vizsgált biológiai hatást. A relevancia meghatározása során a vizsgálat pontosságát (az eredmények egyezését) figyelembe kell venni (1).

Megbízhatóság: a vizsgálat laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti időbeli reprodukálhatóságának mértéke ugyanazon protokoll alkalmazása mellett. A laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti reprodukálhatóság kiszámításával állapítják meg.

SD: standard deviáció.

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

Validált vizsgálati módszer: olyan vizsgálat, amelynek az adott céllal kapcsolatos relevanciája (pontosságát is ideértve) és megbízhatósága validálási vizsgálatok alapján megállapítást nyert. Fontos megjegyezni, hogy a validált vizsgálati módszer a javasolt felhasználási célra nem feltétlenül kínál megfelelő pontosságú és megbízhatóságú elfogadható eljárást (1).

Validálás: az az eljárás, amelynek révén megállapítják egy bizonyos megközelítés, módszer, vizsgálat, eljárás vagy értékelés adott célra való megbízhatóságát és relevanciáját (1).

2. függelék

A FREYBERGER-WILSON-FÉLE TELJES HOSSZÚSÁGÚ REKOMBINÁNS ÖSZTROGÉNRECEPTOR α (ER α) HASZNÁLATÁN ALAPULÓ *IN VITRO* TELÍTÉSI ÉS KOMPETITÍV KÖTÉSI VIZSGÁLATOK

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK (LÁSD MÉG AZ ÁLTALÁNOS BEVEZETÉST)

1. Ez az *in vitro* ösztrogénreceptor (ER α) telítési és kompetitív kötési vizsgálat teljes hosszúságú humán ER α (hrER α) receptort alkalmaz, amelyet bakulovírus-sal fertőzött rovarsejtekben termeltetnek és izolálnak. A Freyberger és Wilson által kidolgozott protokollt több laboratórium részvételével zajló, nemzetközi validálási tanulmánynak (2) vetették alá, amely bizonyította, hogy a vizsgálat tervezett felhasználása tekintetében releváns és megbízható.
2. A vizsgálat egy szűrési eljárás, amelynek révén azonosíthatók a teljes hosszúságú humán ösztrogénreceptor α -hoz kötődni képes anyagok. A vizsgálatot annak meghatározására alkalmazzák, hogy egy adott vizsgálati vegyi anyag képes-e vetélkedni a 17 β -ösztradiollal a humán ösztrogénreceptor α -hoz való kötődésért. A vizsgálat kvantitatív eredményei magukban foglalhatják az IC₅₀ értéket (vagyis azt a koncentrációt, amelyre a vizsgálati vegyi anyagnak szüksége van ahhoz, hogy a [³H]-17 β -ösztradiol felét leszorítsa a humán ösztrogénreceptor α -ról), valamint a vizsgálati vegyi anyag humán ösztrogénreceptor α -hoz való relatív – a 17 β -ösztradiolhoz viszonyított – kötési affinitását. A vegyi anyagok szűrése céljából a vizsgálat elfogadható kvalitatív eredményei kiterjedhetnek a vizsgálati vegyi anyagok humán ösztrogénreceptor α -hoz kötődő, nem kötődő, illetve nem egyértelmű kategóriába sorolására, ezek meghatározására a kötési görbékre vonatkozó kritériumok alapján kerül sor.
3. A vizsgálat radioaktív ligandumot használ, ezért a laboratóriumnak rendelkeznie kell radioaktív anyagok használatára vonatkozó engedéllyel. A radioaktív izotópokkal és veszélyes vegyi anyagokkal végzett valamennyi folyamat során be kell tartani a nemzeti jogszabályok által előírt rendelkezéseket és eljárásokat.
4. E vizsgálat szabályozási célra való alkalmazása előtt el kell olvasni az „ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS” és „A humán ÖSZTROGÉNRECEPTOR-KÖTÉSI VIZSGÁLAT ÖSSZETEVŐI” részt. Az ebben a vizsgálati iránymutatásban használt fogalmak és rövidítések meghatározását az 1. függelék tartalmazza.

A VIZSGÁLATI ELVEK (LÁSD MÉG AZ ÁLTALÁNOS BEVEZETÉST)

5. A humán ösztrogénreceptor α -kötési vizsgálat azt méri, hogy milyen mértékben képes egy radioaktívan jelölt ligandum (a [³H]17 β -ösztradiol) az ösztrogénreceptorhoz kötődni egy

adott vizsgálati vegyi anyag (a kompetítor) növekvő koncentrációjának jelenlétében. Az ösztrogénreceptorok iránt nagy affinitást mutató vizsgálati vegyi anyagok alacsonyabb koncentrációban versenyeznek a radioaktívan jelölt ligandummal azokhoz a vegyi anyagokhoz képest, amelyek kisebb affinitást mutatnak a receptor iránt.

6. A vizsgálat két fő összetevőből áll: egy telítési kötési kísérletből, amelynek során meghatározzák a receptor és a ligandum közötti kölcsönhatás paramétereit, majd egy ezután végzett kompetitív kötési kísérletből, amelynek révén jellemzik a vizsgálati vegyi anyag és a radioaktívan jelölt ligandum ösztrogénreceptor-kötőhelyekért folytatott vetélkedését.
7. A telítési kötési kísérlet célja, hogy a kompetitív kötési kísérlet előkészítéseként meghatározzák a receptorok egy adott tételének kötési affinitását és a receptorok számát. A telítési kötési kísérlet egyensúlyi állapotban méri egy fix koncentrációjú ösztrogénreceptor természetes ligandumához való kötési affinitását (amelynek mutatója a disszociációs állandó, a K_d) és a receptor aktív kötőhelyeinek koncentrációját (B_{max}).
8. A kompetitív kötési kísérletben azt mérik, hogy egy adott anyag milyen mértékű affinitással rendelkezik arra, hogy versenyezzen a [^3H]17 β -ösztradiollal az ösztrogénreceptorral formált kötésért. Az affinitást a vizsgálati vegyi anyag azon koncentrációjával számszerűsítik, amely egyensúlyi állapotban meggátolja a [^3H]17 β -ösztradiol specifikus kötődésének 50 %-át (ez az úgynevezett „50 %-os gátlást kiváltó koncentráció” vagy IC_{50}). Az affinitás mérhető emellett a relatív kötési affinitással is (RBA, az ösztradiol ugyanazon vizsgálatmenetben, de külön mért IC_{50} értékéhez viszonyított affinitás). A kompetitív kötési kísérlet azt méri, hogy milyen mértékben kötődik egy fix koncentrációban alkalmazott [^3H]17 β -ösztradiol a vizsgálati vegyi anyag széles skálát (nyolc nagyságrendet) lefedő koncentrációja jelenlétében. Ezt követően – ahol lehetséges – az adatokat a Hill-egyenlet olyan formájára illesztik (Hill, 1910), amely meghatározza, hogy milyen mértékben szorítják le az egy kötőhelyet elfoglaló kompetitív kötődő anyagok a radioaktív ligandumot. A radioaktívan jelölt ösztradiol egyensúlyi állapotban történő leszorításának mértéke alapján jellemzik a vizsgálati vegyi anyagot kötődő, nem kötődő, vagy kétértelmű választ adó anyagként.

ELJÁRÁS

A humán ösztrogénreceptor α fehérje elfogadható teljesítményének igazolása

9. A telítési és a kompetitív kötési vizsgálatok rutinszerű alkalmazása előtt a humán ösztrogénreceptor α minden új tételéről bizonyítani kell, hogy megfelelő teljesítményt nyújt abban a laboratóriumban, ahol használni fogják. A megfelelő teljesítmény egy két lépésből álló eljárással bizonyítható. Ez a két lépés a következő:
 - A humán ösztrogénreceptor α -specifikusságának és -telítettségének igazolása érdekében végezzünk el egy telítési [^3H]-17 β -ösztradiol kötési vizsgálatot. Az adatok nem-lineáris regressziós analízise (pl. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995), majd azt követő

Scatchard-plot ábrázolása az egyes hrER α -tégekre vonatkozólag dokumentálja a [^3H]-17 β -ösztradiol humán ösztrogénreceptor α -hoz való kötési affinitását (K_d) és a receptorok számát ($B_{\max}$).

- Végezzünk el egy kompetitív kötési vizsgálatot a kontrollanyagok (a referenciaösztrogén (17 β -ösztradiol), egy gyengén kötődő anyag (pl. noretynodrel vagy noretindron) és egy nem kötődő anyag (oktil-trietoxi-szilán, OTES)) használatával. Valamennyi laboratóriumnak létre kell hoznia egy adatbázist annak dokumentálására, hogy a referenciaösztrogén és a gyengén kötődő anyag IC_{50} értékét és más releváns mutatóit következetesen határozta meg a különböző kísérletek és az eltérő hrER α -tégek vizsgálata során. A kontrollanyagok kompetitív kötési görbéjét alkotó paramétereknek a 95 %-os konfidenciaintervallumon belül kell lenniük (lásd az 1. táblázatot), amelynek értékeit a vizsgálat validálási tanulmányában részt vevő laboratóriumok adatai alapján határozták meg (2).

1. táblázat: A Freyberger–Wilson humán ösztrogénreceptor-kötési vizsgálatban használt referenciaösztrogén és gyengén kötődő anyag teljesítményére vonatkozó kritériumok

Anyag	Paraméter	Átlag ^a	Standard deviáció (n)	95 %-os konfidenciaintervallumok ^b	
				Alsó határ	Felső határ
17β-ösztradiol	Görbe teteje (%)	100,44	10,84 (67)	97,8	103,1
	Görbe alja (%)	0,29	1,25 (67)	-0,01	0,60
	Hill-meredekség	-1,06	0,20 (67)	-1,11	-1,02
	LogIC ₅₀ (M)	-8,92 ^c	0,18 (67)	-8,97	-8,88
Noretynodrel	Görbe teteje (%)	99,42	8,90 (68)	97,27	101,60
	Görbe alja (%)	2,02	3,42 (68)	1,19	2,84
	Hill-meredekség	-1,01	0,38 (68)	-1,10	-0,92
	Log IC ₅₀ (M)	-6,39	0,27 (68)	-6,46	-6,33
Noretindron^c	Görbe teteje (%)	96,14	8,44 (27)	92,80	99,48
	Görbe alja (%)	2,38	5,02 (27)	0,40	4,37
	Hill-meredekség	-1,41	0,32 (27)	-1,53	-1,28
	LogIC ₅₀ (M)	-5,73	0,27 (27)	-5,84	-5,62

^a Az átlag (n) $\pm$ standard deviáció (SD) értékét becsült görbeillesztési paraméterek (négyparaméteres Hill-egyenlet) segítségével számolták ki a validálási tanulmány során négy laboratórium által kontroll céljából végzett vizsgálatmenetek során (lásd a 2. referencia N. függelékét).

^b A 95 %-os konfidenciaintervallum útmutatóként szolgál az elfogadhatósági kritériumokhoz.

^c A validálási tanulmány során a 4. alfeladatban a noretindron vizsgálata opcionális volt (lásd a 2. referenciát és a 4. alfeladatot). Az átlag $\pm$ SD (n) értékét tehát becsült görbeillesztési paraméterek (négyparaméteres Hill-egyenlet) segítségével számolták ki két laboratórium által kontroll céljából végzett vizsgálatmenetek során.

Az IC₅₀ tartománya függ a receptor preparátum K_d értékétől és a radioaktívan jelölt ligandum egyes laboratóriumokban alkalmazott koncentrációjától. Megengedhető, hogy a vizsgálat lefolytatásának körülményei alapján az IC₅₀ tartományát megfelelő mértékben módosítsák.

A laboratórium jártasságának igazolása

10. Lásd a vizsgálati módszer „**A humán ÖSZTROGÉNRECEPTOR-KÖTÉSI VIZSGÁLAT ÖSSZETEVŐI**” részének 17. és 18. pontját, valamint 2. táblázatát. Minden (telítési és kompetitív kötési) vizsgálatnak három független (vagyis a receptor, a vegyi anyagok és a reagensek frissen készített oldataival végezett), különböző napokon lefolytatott vizsgálatmenetből kell állnia, az egyes vizsgálatmeneteknek pedig három ismétlést kell tartalmazniuk.

A receptor (hrER α) koncentrációjának meghatározása

11. Az aktív receptor koncentrációja tételenként és tárolási feltételek szerint kissé változó. Ebből adódóan a forgalmazótól való átvételkor meg kell határozni az aktív receptor koncentrációját. Így megállapítható az aktív receptor vizsgálatmenet során alkalmazandó megfelelő koncentrációja.

12. A kompetitív kötési vizsgálatnak megfelelő körülmények között (vagyis 1 nM [^3H]-ösztradiollal) a receptort 0,25, 0,5, 0,75 és 1 nM névleges koncentrációban inkubálni kell 1 μM nem jelölt ösztradiol jelenlétében (nem specifikus kötődés) és annak hiányában (teljes kötődés). A specifikus kötődést, amely a teljes és a nem specifikus kötődés különbségeként határozható meg, ábrázolni kell a receptor névleges koncentrációja függvényében. A receptort abban a névleges koncentrációban kell használni a telítési és a kompetitív kötési kísérletek során, amelynél a specifikus kötődési értékei megegyeznek a hozzáadott radioaktívan jelölt ösztradiol kötési értékeinek 20 %-ával. A humán ösztrogénreceptor 0,5 nM-es végső koncentrációja többnyire eleget tesz ennek a feltételnek.
13. Amennyiben a 20 %-os feltétel több próbálkozás után sem teljesül, ellenőrizni kell, hogy nincsenek-e potenciális hibák a kísérlet elrendezésében. A 20 %-os feltétel nem teljesülése jelezheti azt is, hogy a rekombináns tételben nagyon csekély az aktív receptorok száma, ilyen esetben fontolóra kell venni másik receptortétel alkalmazását.

Telítési vizsgálat

14. A [^3H]17 β -ösztradiolt kell kiértékelni nyolc növekvő koncentrációban, három ismételtsben, az alábbi három kitétellel (lásd a 2. táblázatot):
- Nem jelölt 17 β -ösztradiol nélkül és ösztrogénreceptorral. Ez alapján határozható meg a teljes kötődés a csak [^3H]17 β -ösztradiolt tartalmazó lyukakban mért radioaktivitás alapján.
 - A jelölt 17 β -ösztradiolhoz képest 1000-szeres koncentrációjú nem jelölt 17 β -ösztradiol jelenlétében és ösztrogénreceptorral. Ez az állapot arra szolgál, hogy az aktív kötőhelyek telítődjenek nem jelölt 17 β -ösztradiollal, így a lyukakban mért radioaktivitás alapján meghatározható a nem specifikus kötődés. A fennmaradó, receptorhoz kötődő radioaktív ösztrogének feltételezhetően nem specifikus helyre kötődőnek, mivel a nem jelölt ösztrogének olyan magas koncentrációban vannak jelen, hogy elfoglalják a receptor valamennyi szabad specifikus kötőhelyét.
 - Nem jelölt 17 β -ösztradiol és ösztrogénreceptor nélkül (így meghatározható a teljes radioaktivitás).

A [^3H]-17 β -ösztradiol és a nem jelölt 17 β -ösztradiol oldatainak elkészítése

15. A [^3H]-17 β -ösztradiol oldatainak elkészítéséhez a [^3H]-17 β -ösztradiol 12 nM koncentrációjú törzsoldatához vizsgálati pufferrel beállítjuk a kezdeti, 0,12 nM-től 12 nM-ig terjedő koncentrációtartományt. Ezen oldatokból 40 μl -t adagolunk a 96 lyukú mikrotiterlemez megfelelő vizsgálati lyukaiba (160 μl végtérfogatban), így megkapjuk a vizsgálat végső, 0,03 és 3,0 nM közötti koncentrációértékeit. A vizsgálati puffer, a [^3H]-17 β -ösztradiol törzsoldatának és oldatainak elkészítését, valamint a koncentrációértékek meghatározását részletesen ismerteti a Freyberger–Wilson protokoll (2).
16. A 17 β -ösztradiol etanolos oldatait vizsgálati puffer hozzáadásával kell hígítani, elkészítve a nyolc növekvő elemből álló, 0,06 μM -tól 6 μM -ig terjedő kezdeti koncentrációsorozatot.

Ezekből az oldatokból 80 µl-t adagolunk a 96 lyukú mikrotiterlemez megfelelő vizsgálati lyukaiba (160 µl végtérfogatban), így megkapjuk a vizsgálat végső, 0,03 µM és 3,0 µM közötti koncentrációértékeit. A nem specifikus kötődést tesztelő lyukakban a nem jelölt 17β-ösztadiol 1000-szeres feleslegben kell legyen a jelölt [³H]-17β-ösztadiol végső koncentrációjához képest. A nem jelölt 17β-ösztadiol oldatainak elkészítését részletesen ismerteti a Freyberger–Wilson protokoll (2).

17. A receptornak azt a névleges koncentrációját kell alkalmazni, amelyik 20 %-os ($\pm 5\%$) specifikus kötődést vált ki (lásd a 12–13. pontot). A humán ösztrogénreceptor α oldatot közvetlenül használat előtt kell elkészíteni.
18. A 96 lyukú mikrotiterlemezeket a 2. táblázatban foglaltak szerint készítik el, az egyes koncentrációértékeket 3 ismétlésben vizsgálva. A [³H]-17β-ösztadiol, a nem jelölt 17β-ösztadiol, a puffer és a receptor lemezenkénti koncentrációértékeit és térfogatát a 2.2. függelék tartalmazza.

2. táblázat: Mikrotiterlemez elrendezése a telítési kötési vizsgálathoz

	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			Teljes kötődés (oldószer)
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			Nem specifiku kötődés
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-ösztadiol

ER: ösztrogénreceptor

E₂: nem jelölt 17β-ösztadiol

19. A vizsgálati mikrotiterlemezeket 16–20 órán keresztül 2–8 °C-os hőmérsékleten inkubálni kell, a lemezeket az inkubáció ideje alatt rázógépre kell helyezni.

A humán ösztrogénreceptor α-hoz kötődött [³H]-17β-ösztadiol mérése

20. A humán ösztrogénreceptor α-hoz kötődött [³H]-17β-ösztadiolokat elkülönítjük a szabad [³H]-17β-ösztadioloktól, ehhez minden lyukhoz hozzáadunk 80 µl hideg DCC szuszpenziót, ezt követően a mikrotiterlemezeket 10 percen át rázatjuk, majd mintegy 2 500 rpm sebességgel 10 percen keresztül centrifugáljuk. Annak érdekében, hogy e folyamat

során minimálisra szorítsuk a kötött [³H]-17β-ösztradiolok humán ösztrogénreceptor α-ról történő disszociációját, nagyon fontos, hogy a pufferek és a vizsgálati lyukak hőmérsékletét 2 és 8 °C között tartsuk, és minden lépést gyorsan végezzünk el. A lemezek hatékony és gyors feldolgozásához szükség van egy mikrotiterlemez-rázógépre.

21. 50 µl felülúszóban az ösztrogénreceptor α-hoz kötött [³H]-17β-ösztradiolt átvisszük egy második mikrotiterlemezre, nagy figyelemmel végezve a transzfert, nehogy a DCC-hez hozzáérve átszennyezzük a lyukakat.

22. Ezt követően mindegyik lyukhoz (A1–B12 és D1–E12) 200 µl szcintillációs folyadékot adunk, amely képes a radioaktív sugárzás mozgási energiáját fényenergiává alakítani. A G1–H12 lyukak (a teljes percenkénti bomlás (dpms) mutatói) a [³H]-17β-ösztradiol (40 µl) hígítási sorozatát tartalmazzák, amelyet közvetlenül a mérési lemez lyukaiba töltött szcintillációs folyadékba kell helyezni a 3. táblázat szerinti elosztásban, ezek a lyukak tehát csak 200 µl szcintillációs folyadékot és a [³H]-17β-ösztradiol megfelelő hígítását tartalmazzák. Ezek a mérőszámok azt jelzik, hogy mennyi dpms-ben kifejezett [³H]-17β-ösztradiolt adtunk hozzá a teljes kötődést és a nem specifikus kötődést vizsgáló lyukakhoz.

3. táblázat: Mikrotiterlemez elrendezése telítési kötési vizsgálathoz, radioaktivitás mérése

	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			Teljes kötődés (oldószer)
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			Nem specifikus kötődés
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 (teljes dpms)			0,06 nM [³ H] E ₂			0,08 nM [³ H] E ₂			0,10 nM [³ H] E ₂			Teljes dpms*
H	0,30 nM [³ H] E ₂			0,60 nM [³ H] E ₂			1,0 nM [³ H] E ₂			3,0 nM [³ H] E ₂			

[³H] E₂: [³H]-17β-ösztradiol

ER: ösztrogénreceptor

E₂: nem jelölt 17β-ösztradiol

dpms: percenkénti bomlás

*A [³H] jelölt ösztradiol radioaktív hígítási sorozatát közvetlenül a G1–H12 lyukakban lévő 200 µl szcintillációs folyadékhoz kell adni.

23. A mérés megkezdése előtt legalább 2 órát kell várni, a radioaktivitás mérési ideje pedig mintánként 40 perc legyen. A lyukankénti dpm értékének meghatározásához mikrotiterlemez-szcintillációs számlálót kell alkalmazni, és korrigálni kell az elnyelődött veszteség értékét. Amennyiben nem áll rendelkezésre mikrotiterlemezhez használható szcintillációs számláló, a minták hagyományos számlálóval is mérhetők. Ez esetben fontolóra lehet venni a számlálásra fordított idő csökkentését.

Kompetitív kötési vizsgálat

24. A kompetitív kötési vizsgálat azt méri, hogy egy állandó koncentrációjú [^3H]-17 β -ösztadiol milyen mértékben képes kötődni az adott vizsgálati vegyi anyag növekvő koncentrációja mellett. Egy vizsgálatmeneten belül minden koncentrációt három párhuzamos ismételtesben kell vizsgálni. Emellett minden vizsgálati vegyi anyagot három nem egyidejűleg végzett vizsgálatmenetben kell tesztelni. A vizsgálatot egy vagy több 96 lyukú mikrotiterlemezen kell elvégezni.

Kontrollok

25. A vizsgálat végrehajtása során minden egyes kísérletben párhuzamosan vizsgálni kell az oldószert és a kontrollanyagokat (a referenciaösztrogént, valamint a gyengén kötődő és a nem kötődő anyagot). Minden vizsgálatmenetben ugyanazon a lemezen vizsgálni kell a referenciaösztrogén teljes koncentrációgörbéjét és a kontrollanyagokat (vagyis a gyengén kötődő és a nem kötődő anyagot). Az összes többi lemeznek tartalmaznia kell i. az E2 és a gyengén kötődő anyag magas (maximális leszorítást eredményező) és közepes (körülbelül IC₅₀ hatást kiváltó) koncentrációját, három ismételtesben; ii. az oldószeres kontrollt és a nem specifikus kötődés mérését, legalább három-három ismételtesben. A vizsgálati puffer, a kontrollanyagok, a [^3H]-17 β -ösztadiol, a humán ösztrogénreceptor α és a vizsgálati vegyi anyagok oldatainak elkészítési eljárását a 2. referencia ismerteti (K függelék, lásd a Freyberger–Wilson vizsgálati protokollt).

Oldószeres kontroll:

26. Az oldószeres kontroll igazolja, hogy az oldószer nem lép kölcsönhatásra a vizsgálati rendszerrel, emellett méri a teljes kötődést (TB). Az ajánlott oldószer az etanol. Amennyiben a vizsgálati vegyi anyag legmagasabb koncentrációja nem oldható etanolban, akkor alternatívaként DMSO is használható. Az etanol, illetve DMSO használata esetén a DMSO koncentrációja a végső vizsgálati lyukakban 1,5 %, de nem haladhatja meg a 2 %-ot.

Puffer kontroll:

27. A puffer kontroll (BC) nem tartalmazhatja sem az oldószert, sem a vizsgálati vegyi anyagot, csak a vizsgálat összes többi összetevőjét. A puffer kontroll eredményeit összevetik az oldószeres kontroll eredményeivel annak ellenőrzésére, hogy az alkalmazott oldószer nincs hatással a vizsgálati rendszerre.

Erősen kötődő anyag (referenciaösztrogén)

28. A 17β -ösztradiol (CAS-száma: 50-28-2) az endogén ligandum, és magas affinitással kötődik az ösztrogénreceptor α altípusához. Minden humán ösztrogénreceptor α kompetitív kötési vizsgálathoz nem jelölt 17β -ösztradiollal el kell készíteni egy standard görbét, amely lehetővé teszi a variabilitás értékelését, ha a laboratóriumon belül egy későbbi időpontban ismét elvégzik a vizsgálatot. A nem jelölt 17β -ösztradiolból nyolc hígítást kell készíteni etanolban, és a vizsgálati lyukakba helyezni a következő koncentrációtartományban: 100 nM-tól 10 pM-ig ($-7[\log M]$ és $-11[\log M]$ között) és a következő elosztásban: ($-7[\log M]$, $-8[\log M]$, $-8,5[\log M]$, $-9[\log M]$, $-9,5[\log M]$, $-10[\log M]$, $-11[\log M]$). A nem jelölt 17β -ösztradiol legmagasabb koncentrációja (1 μM) egyben a nem specifikus kötődés indikátoraként is szolgál. Ezt a koncentrációt a 4. táblázatban az „NSB” rövidítés különbözteti meg, bár ez is részét képezi a standard görbének.

Gyengén kötődő anyag

29. A vizsgálatba bele kell foglalni egy gyengén kötődő anyagot (a noretynodrelt (CAS-száma: 68-23-5) vagy a noretindront (CAS-száma: 68-22-4)), hogy igazolja az egyes kísérletek érzékenységét, és lehetővé tegye a variabilitás értékelését, ha a vizsgálatot egy későbbi időpontban megismétlik. A gyengén kötődő anyagból nyolc oldatot kell készíteni etanolban, és a vizsgálati lyukakba helyezni a következő koncentrációtartományban: 3 nM-tól 30 μM -ig ($-8,5[\log M]$ és $-4,5[\log M]$ között) és a következő elosztásban: $-4,5[\log M]$, $-5[\log M]$, $-5,5[\log M]$, $-6[\log M]$, $-6,5[\log M]$, $-7[\log M]$, $-7,5[\log M]$, $-8,5[\log M]$.

Nem kötődő anyag

30. Negatív (nem kötődő) kontrollanyagként oktil-trietoxi-szilánt (OTES, CAS-száma: 2943-75-1) kell alkalmazni. Ez biztosítja, hogy a vizsgálat végrehajtása során detektálni lehessen, ha a vizsgálati vegyi anyagok nem kötődnek a humán ösztrogénreceptor α -hoz. A nem kötődő anyagból nyolc oldatot kell készíteni etanolban, és a vizsgálati lyukakba helyezni a következő koncentrációtartományban: 0,1 nM–1 000 μM ($-10[\log M]$ és $-3[\log M]$ között), logaritmikus lépésközlőként. Alternatív nem kötődő kontrollanyagként di-*n*-butil-ftalát (DBP) használható. Ez utóbbi anyagról kimutatták, hogy maximális oldhatósága $-4[\log M]$.

A humán ösztrogénreceptor α koncentrációja

31. A receptort abban a mennyiségben kell alkalmazni, amelyik 1 nM radioaktív ligandum jelenlétében 20 %-os ($\pm 5\%$) specifikus kötődést vált ki (lásd a 2. függelék 12–13. pontját). A humán ösztrogénreceptor α oldatot közvetlenül használat előtt kell elkészíteni.

[^3H]- 17β -ösztradiol

32. A [^3H]- 17β -ösztradiolt 1,0 nM koncentrációban kell a vizsgálati lyukakba helyezni.

Vizsgálati vegyi anyagok

33. Első lépésként oldhatósági vizsgálatot kell végezni az egyes vizsgálati vegyi anyagok oldhatósági határértékének meghatározására, valamint a vizsgálati protokoll végrehajtása során alkalmazandó megfelelő koncentrációtartomány megállapítására. A vizsgálati vegyi

anyagok oldhatósági határértékét először oldószerben kell meghatározni, majd a vizsgálati körülmények mellett meg kell erősíteni. A vizsgálat során tesztelt végső koncentráció nem haladhatja meg az 1 mM-t. A koncentrációtartomány-behatároló vizsgálatnak magában kell foglalnia egy oldószeres kontrollt és a legmagasabb elfogadható koncentrációtól (pl. 1 mM, illetve az oldhatósági határértéktől függően ennél alacsonyabb koncentrációtól) induló, 8 koncentrációból álló logaritmikus hígítási sorozatot, az esetlegesen tapasztalt zavarosságot vagy kicsapódást fel kell jegyezni (lásd még a 35. pontot). A vizsgálati vegyi anyagot a koncentrációtartomány behatárolására szolgáló előzetes vizsgálatban meghatározott, 8 log koncentrációintervallumot tartalmazó görbe alapján kell tesztelni. A második és a harmadik kísérlet koncentrációértékeit úgy kell megválasztani, hogy jobban illeszkedjenek a koncentráció-válasz görbéhez.

34. A vizsgálati vegyi anyag oldatait megfelelő oldószerben kell elkészíteni (lásd a 2. függelék 26. pontját). Amennyiben a vizsgálati vegyi anyag legmagasabb koncentrációja sem etanolban, sem DMSO-ban nem oldható, és a hozzáadott oldószer mennyiségének növelése miatt a végső vizsgálatához használt csőben az oldószer koncentrációja túllépné az elfogadható határértéket, a legmagasabb koncentráció az eggyel alacsonyabb koncentrációra csökkenthető. Ebben az esetben hozzá lehet adni egy további koncentrációértéket a koncentrációsorozat alacsonyabb értékeket tartalmazó végéhez. A sorozat többi koncentrációértékét változatlanul kell hagyni.
35. A vizsgálati vegyi anyag mikrotiterlemezbe adagolt oldatait figyelemmel kell követni, mivel a vizsgálati vegyi anyag a vizsgálati lyukakba helyezést követően kicsapódhat. A kicsapódást tartalmazó vizsgálati lyukak adatait ki kell zárni a görbeillesztésből, és fel kell jegyezni az adatok kizárásának okát.
36. Amennyiben a vizsgálati vegyi anyag $\log(\text{IC}_{50})$ értékére vonatkozólag léteznek más forrásokból származó korábbi adatok, érdemes lehet geometriailag elosztani az oldatokat (pl. hogy 0,5 log egységnyire helyezkedjenek el a $\log(\text{IC}_{50})$ várt értéke körül). A végső eredménynek a $\log(\text{IC}_{50})$ mindkét oldalán kellő távolságban eloszló koncentrációkat kell mutatnia, beleértve a görbe tetejét és alját, hogy a kötési görbét megfelelően lehessen jellemezni.

Vizsgálati lemez elrendezése

37. A mikrotiterlemezeket fel kell címkézni, és kódokkal kell ellátni a hatszoros inkubálásnak alávetett oldószeres kontrollt, a referenciaösztrogén legmagasabb koncentrációját – amely egyben a nem specifikus kötődés (NSB) mutatója – és a puffer kontrollt, valamint a háromszor inkubált nem kötődő kontrollanyag (oktil-trietoxi-szilán) mind a nyolc koncentrációját, a referenciaösztrogén 7 alacsonyabb koncentrációját, a gyengén kötődő anyag nyolc dózist képviselő koncentrációit és minden egyes vizsgálati vegyi anyag (TC) 8 koncentrációját. Az alábbi 4. táblázat példát szolgáltat egy olyan lemezrendezésre, amely biztosítja a referenciaösztrogén és a kontrollanyagok teljes koncentrációgörbéjét. A többi mikrotiterlemez a vizsgálati vegyi anyagok mérésére szolgál, emellett tartalmazniuk kell a

lemezen belüli ellenőrzésre szolgáló kontrollanyagokat, vagyis 1) az E2 és a gyengén kötődő anyag magas (maximális leszorítást eredményező) és közepes (körülbelül IC_{50} hatást kiváltó) koncentrációját, három ismételtesben; 2) az oldószeres kontrollt és a nem specifikus kötődés mérését, hat-hat ismételtesben (lásd az 5. táblázatot). A 2.3. függelék példát szolgáltat arra, hogy milyen lemezelrendezést lehet alkalmazni a kompetitív vizsgálatban három ismeretlen vizsgálati vegyi anyag teszteléséhez. A 4. és az 5. táblázatban feltüntetett koncentrációértékek a vizsgálatban használt végső koncentrációkat jelzik. Az E2 maximális koncentrációja 1×10^{-7} M legyen, a gyengén kötődő anyag legmagasabb koncentrációja pedig az 1. lemezen használt legmagasabb koncentráció legyen. Az IC_{50} koncentrációját a laboratóriumnak kell meghatároznia, a kontrollanyagok adatait tartalmazó adatbázisa alapján. Ennek az értéknek közelítenie kell a validálási tanulmányok során nyert értékhez (lásd az 1. táblázatot).

4. táblázat: A kompetitív kötési vizsgálatához használt mikrotiterlemez azon elrendezése, amely biztosítja a referenciaösztrogén és a kontrollanyagok teljes koncentrációgörbáját (1. lemez).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (csak oldószer)			TB (csak oldószer)			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})			Üres*		
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	Üres (radioaktívhoz)**			Üres (radioaktívhoz)**			Puffer kontroll			Puffer kontroll		

Ebben a példában a gyengén kötődő anyag a noretynodrel (NE).

* ténylegesen üres, nem használt lyuk.

** a lyukat nem használják az inkubáció alatt, de használják a teljes hozzáadott radioaktivitás ellenőrzésére.

5. táblázat: A kompetitív kötési vizsgálatához használt mikrotiterlemez azon elrendezése, amely biztosítja a vizsgálati vegyi anyagok és a lemezen belüli ellenőrzésre szolgáló kontrollanyagok teljes koncentrációgörbáját

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (csak oldószer)			TB (csak oldószer)			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})

Ebben a példában a gyengén kötődő anyag a noretynodrel (NE).

A kompetitív kötési vizsgálat elvégzése

38. Amint az a 6. táblázatból is látszik, a lyukakba 80 µl kontrollként szolgáló oldószert és puffert, referenciaösztrógent, gyengén kötődő anyagot, nem kötődő anyagot és vizsgálati pufferben előkészített vizsgálati vegyi anyagokat kell adagolni. Ezt követően minden egyes lyukhoz hozzá kell adni 4 nM koncentrációjú [³H]-17β-ösztradiolt 40 µl mennyiségben. Mintegy 10–15 perces, 2–8 °C hőmérsékleten végzett óvatos ráztatás után hozzá kell adni a 40 µl mennyiségű humán ösztrogénreceptor α oldatot. A vizsgálati mikrotiterlemezeket 16–20 órán keresztül 2–8 °C-os hőmérsékleten inkubálni kell, a lemezeket az inkubáció ideje alatt rázógépre kell helyezni.

6. táblázat: A humán ösztrogénreceptor kompetitív kötési vizsgálat mikrotiterlemezeire helyezett vizsgálati összetevők térfogata

Térfogat (µl)	Összetevő
80	Nem jelölt 17β-ösztradiol, noretynodrel, OTES, vizsgálati vegyi anyagok, oldószer vagy puffer
40	4 nM [³ H]-17β-ösztradiol oldat
40	hrERα oldat, a meghatározott koncentrációban
160	Teljes térfogat az egyes vizsgálati lyukakban

39. Ezt követően a telítési kötési vizsgálat 20–23. pontjában ismertetett módon minden lyukhoz hozzáadnak 80 µl hideg DCC szuszpenziót, hogy elkülönítsék a humán ösztrogénreceptor α-hoz kötődött [³H]-17β-ösztradiolt a szabad [³H]-17β-ösztradioltól, majd megméri a humán ösztrogénreceptor α-hoz kötődött [³H]-17β-ösztradiolok mennyiségét.

40. A H1 és H6 közötti lyukakban (amelyeket a 4. táblázat üres (radioaktívhoz) címen jelöl) méri a 40 µl mennyiségű [³H] jelölt ösztradiol percenkénti bomlását. A 40 µl-nek megfelelő mennyiséget közvetlenül a H1–H6 lyukakban lévő szcintillációs folyadékhoz kell adni.

Elfogadhatósági kritériumok

Telítési kötési vizsgálat

41. A specifikus kötődési görbének a [³H]-17β-ösztradiol fokozódó koncentrációban való alkalmazása miatt egy platóban kell végződnie, ami jelzi a humán ösztrogénreceptor α ligandummal való telítettségét.

42. A [^3H]-17 β -ösztadiol 1 nM koncentrációjánál megfigyelt specifikus kötődésnek a minden vizsgálatmenetben mért átlagos teljes radioaktivitás 15–25 %-os elfogadhatósági tartományán belül kell maradnia. E tartománytól való esetenkénti kis mértékű elérés még elfogadható, de ha a vizsgálatmenetek eredménye következetesen kívül esik ezen a tartományon, illetve ha egy adott vizsgálatmenet eredménye jelentősen eltér tőle, akkor ki kell igazítani a fehérjekoncentrációt és meg kell ismételni a telítési vizsgálatot.
43. Az adatoknak egy lineáris Scatchard-plotot kell alkotniuk.
44. A nem specifikus kötődés nem lehet túlzott mértékű. A nem specifikus kötődés értéke jellemzően nem érheti el a teljes kötődés 35 %-át. Ugyanakkor a nem specifikus kötődés aránya esetenként meghaladhatja ezt a határértéket, ha a radioaktívan jelölt 17 β -ösztadiol legalacsonyabb vizsgált koncentrációjánál nagyon alacsony percenkénti bomlást mérnek.

Kompetitív kötési vizsgálat

45. A nem jelölt 17 β -ösztadiol növekvő koncentrációban leszorítja a [^3H]-17 β -ösztadiolt a receptorról, és ez összhangban van az egy kötőhelyes kompetitív kötéssel.
46. A referenciaösztrogén (vagyis a 17 β -ösztadiol) IC_{50} és K_d értékének nagyjából egyenlőnek kell lennie a [^3H]-17 β -ösztadiol moláris koncentrációjával; a disszociációs állandót a telítési kötési vizsgálatban határozzák meg.
47. A teljes specifikus kötődésnek rendre a 20 ± 5 %-os elfogadhatósági tartományon belül kell maradnia, ha a vizsgálatmenetekben az egyes lyukakhoz hozzáadott összes radioaktívan jelölt anyag átlagos mért koncentrációja 1 nM volt. E tartománytól való esetenkénti kis mértékű elérés még elfogadható, de ha a vizsgálatmenetek eredménye következetesen kívül esik ezen a tartományon, illetve ha egy adott vizsgálatmenet eredménye jelentősen eltér ettől, akkor ki kell igazítani a fehérjekoncentrációt.
48. Az oldószer nem módosíthatja a vizsgálat érzékenységet vagy megismételhetőségét. Az oldószeres kontroll (Tb-ként jelölve) eredményeit összevetik a puffer kontroll eredményeivel annak ellenőrzésére, hogy az alkalmazott oldószer nincs hatással a vizsgálati rendszerre. Amennyiben a TB kontroll és a puffer kontroll hasonló eredményre vezet, akkor az oldószer nem befolyásolja a vizsgálatot.
49. A nem kötődő anyag maximális 10^{-3} M (OTES) vagy 10^{-4} M (DBP) koncentrációnál legfeljebb 25 % [^3H]-17 β -ösztadiolt szoríthat le a humán ösztrogénreceptor α -ról.
50. A Freyberger–Wilson humán ösztrogénreceptor-kötési vizsgálat validálási tanulmányából származó adatok alapján a referenciaösztrogénre és két gyengén kötődő anyagra (pl. noretynodrel, noretindron) vonatkozó teljesítménykritériumokat dolgoztak ki (2. referencia N. függeléke). A validálási tanulmányban részt vevő laboratóriumok 95 %-os konfidenciaintervallumot adtak meg az átlag (n) $\pm$ SD értékéhez minden kontroll vizsgálatmenetben. 95 %-os konfidenciaintervallumot számoltak a görbeillesztési

paraméterekre (vagyis a görbe tetejére, aljára, a Hill-merekségre és a $\log IC_{50}$ -re), a referenciaösztrogénre és a gyengén kötődő anyagokra, valamint a gyengén kötődő anyagok referenciaösztrogénhez viszonyított $\log_{10}RBA$ értékére vonatkozólag, ami teljesítménykritériumként szolgál a pozitív kontrollanyagok számára. Az 1. táblázat ismerteti a görbeillesztési paraméterek várt tartományait, amelyek használhatók teljesítménykritériumként. A gyakorlatban az IC_{50} tartománya a receptor preparátum K_d értékétől és a ligandum koncentrációjától függően kissé változó lehet.

51. A potenciális vizsgálati vegyi anyagok széles skálája, valamint potenciális affinitásuk és az eredmények (pl. teljes görbe, részleges görbe, nem illeszthető görbe) változatossága miatt a vizsgálati vegyi anyagok görbeillesztési paramétereire nézve nem dolgoztak ki teljesítménykritériumokat. Egy adott vizsgálati vegyi anyag egyes vizsgálatmeneteiből származó eredmények értékelése során azonban szakmai megítélés alapján kell dönteni. A vizsgálati vegyi anyag megfelelő koncentrációtartományát kell használni ahhoz, hogy egyértelműen meg lehessen határozni a kompetitív görbe (pl. 90–100 %-os kötődést jelző) platóját. A vizsgálati vegyi anyag különböző koncentrációin történő ismétlések eltérései közötti és a három független vizsgálatmenet közötti variabilitásnak észszerű mértéken belül kell maradnia és tudományosan védhetőnek kell lennie. Egy adott vizsgálati vegyi anyag minden vizsgálatmenetében elvégzett kontrollok eredményeinek meg kell közelíteniük a Freyberger–Wilson vizsgálat teljesítménymutatóit, és összhangban kell lenniük minden releváns laboratórium történeti kontrolladataival.

AZ ADATOK ELEMZÉSE

Telítési kötési vizsgálat

52. Mérti kell mind a teljes, mind a nem specifikus kötődést. Ezen értékek alapján számolható ki a $[^3H]$ -17 β -ösztradiol növekvő koncentrációin létrejött egyensúlyi állapotokban kiváltott specifikus kötődés úgy, hogy a teljes kötődésből kivonják a nem specifikus kötődést. A specifikus kötődés és a $[^3H]$ -17 β -ösztradiol koncentrációi közötti függvényt ábrázoló grafikon a maximális specifikus kötődésre jellemző platóban végződik, amely azt az állapotot jelzi, amikor a humán ösztrogénreceptor α telítődött $[^3H]$ -17 β -ösztradiollal. Emellett az adatok elemzése dokumentálja, hogy a $[^3H]$ -17 β -ösztradiol egyetlen, nagy affinitású kötőhelyhez kapcsolódik. A nem specifikus, a teljes és a specifikus kötődést egy telítési kötési görbén kell ábrázolni. Az adatokat a továbbiakban nem-lineáris regressziós analízissel kell elemezni (pl. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995), végül pedig egy Scatchard-plot grafikonon ábrázolni.
53. Az adatelemzés során kizárólag a teljes kötődési adatok alapján meg kell határozni a B_{max} és a K_d értékét, feltételezve, hogy a nem specifikus kötődés lineáris, más módszer alkalmazását indokolni kell. A legjobban illeszkedő görbét pedig robusztus regresszióval kell meghatározni, az ettől való eltérést indokolni kell. A robusztus regresszió alkalmazásának módszerét meg kell adni. Abban az esetben, ha a B_{max} és a K_d értékét a

telítési kötési adatok alapján határozzák meg, mindig korrigálni kell a ligandum koncentrációjának csökkenését (például a Swillens, 1995 által leírt módszerrel).

Kompetitív kötési vizsgálat

54. A kompetitív kötési görbe a [^3H]-17 β -ösztradiol specifikus kötődésének és a kompetitor ($\log_{10}$ egységekben feltüntetett) koncentrációjának összefüggését ábrázolja. A vizsgálati vegyi anyag azon koncentrációja, amely meggátolja a [^3H]-17 β -ösztradiol maximális specifikus kötődésének 50 %-át, az IC_{50} érték.
55. A pozitív kontrollanyagok (pl. a referenciaösztrogén és a gyengén kötődő anyag) becsült $\log(\text{IC}_{50})$ értékének meghatározásához egy megfelelő nem-lineáris görbeillesztő szoftvert kell használni, amely illeszteni tudja egy négyparaméteres Hill-egyenlet görbáját (pl. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). A görbék illesztése során a görbe tetejét, alját, meredekségét jelző értékeket és a $\log(\text{IC}_{50})$ értékét általában szabadon ábrázolják. A legjobban illeszkedő görbét robusztus regresszióval kell meghatározni, az ettől való eltérést indokolni kell. A ligandum csökkenését nem kell korrigálni. A kezdeti analízist követően minden kötési görbét ellenőrizni kell, hogy megfelelően illeszkedik-e a modellre. A gyengén kötődő anyag relatív kötési affinitását a gyengén kötődő anyag $\log(\text{IC}_{50})$ értékének a 17 β -ösztradiol $\log(\text{IC}_{50})$ értékéhez viszonyított arányaként kell meghatározni. A pozitív kontrollok és a nem kötődő kontroll eredményeit a vizsgálat e 2. függelék 45–50. pontjában ismertetett teljesítménymutatói alapján kell értékelni.
56. Az összes vizsgálati vegyi anyag adatait lépésenként kell elemezni, biztosítva ezáltal az adatok megfelelő elemzését és a kompetitív kötési görbék helyes osztályozását. Javasolt vizsgálati anyagoként minden vizsgálat megkezdésekor egy szabványosított adatelemzést végezni, amely megegyezik a referenciaösztrogén és a gyengén kötődő anyag kontrolljainál alkalmazott analízissel (lásd a fenti 55. pontot). Az adatelemzés végeztével technikailag ellenőrizni kell a görbeillesztési paramétereket, valamint vizuálisan is ellenőrizni kell, hogy az adatok mennyire illeszkednek az egyes vizsgálatmenetek kompetitív kötési görbéjéhez. Amennyiben a technikai ellenőrzés során megfigyelhető a specifikusan kötődő [^3H]-17 β -ösztradiol arányának koncentrációfüggő csökkenése, a vegyi anyagok egyes koncentrációit tartalmazó ismétlések közötti csekély eltérés és a három vizsgálatmenet görbeillesztési paramétereinek következetessége jó indikátorai annak, hogy a vizsgálatot és az adatelemzést megfelelően hajtották végre.

Az adatok értelmezése

57. Amennyiben valamennyi elfogadhatósági kritérium teljesül, a vizsgálati vegyi anyag humán ösztrogénreceptor α -hoz kötődő anyagnak minősül, ha az adatokra illeszthető kötési görbe, és a válaszgörbe legalsó pontja az adattartomány 50 %-a alatt helyezkedik el (1. ábra).
58. Amennyiben valamennyi elfogadhatósági kritérium teljesül, valamely vizsgálati vegyi anyag akkor tekinthető humán ösztrogénreceptor α -hoz nem kötődő anyagnak, ha:

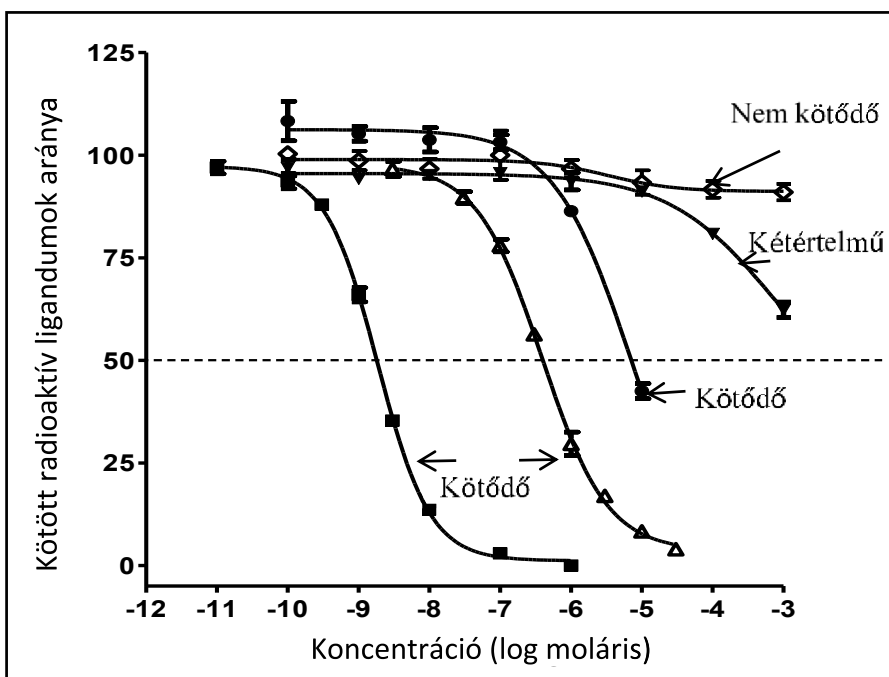
- az adataira illeszthető kötési görbe, és az adatokra illesztett válaszgörbe legalsó pontja az adattartomány 75 %-a felett helyezkedik el, vagy
- az adataira nem illeszthető kötési görbe, és az adatok koncentrációcsoportjai közül a legalsó simítatlan átlagos kötési arány 75 % felett helyezkedik el.

59. A vizsgálati vegyi anyag válasza akkor minősül kétértelműnek, ha a fenti feltételek egyike sem teljesül (vagyis az adatokra illesztett válaszgörbe legalsó pontja 76 és 51 % között helyezkedik el).

7. táblázat: A vizsgálati vegyi anyagok kompetitív kötési görbén alapuló osztályba sorolásának kritériumai

Besorolás	Kritériumok
Kötődő ^a	Az adatokra illeszthető kötési görbe. A válaszgörbe legalsó pontja az adattartomány 50 %-a alatt helyezkedik el.
Nem kötődő ^b	Ha az adatokra illeszthető kötési görbe, az adattartományra illesztett válaszgörbe legalsó pontja 75%-a felett helyezkedik el. Ha az adatokra nem illeszthető kötési görbe, az adatok koncentrációcsoportjai közül a legalsó simítatlan átlagos kötési arány 75 % felett helyezkedik el.
Kétértelmű ^c	Bármely vizsgálatmenet, amelynek eredménye sem a kötődő, sem a nem kötődő kategóriába nem sorolható (pl. az adatokra illesztett válaszgörbe legalsó pontja 76 és 51 % között helyezkedik el).

1. ábra: Példák a vizsgálati vegyi anyagok kompetitív kötési görbén alapuló osztályba sorolására.



60. A vizsgálati vegyi anyag egy laboratóriumon belül elvégzett több vizsgálatmenetének eredményét összesítik úgy, hogy egy számértéket társítanak minden vizsgálatmenetnek, majd meghatározzák a vizsgálatmenetek átlagát (lásd a 8. táblázatot). A laboratórium vizsgálatmeneteinek összesített eredményét azután összevetik az egyes vizsgálati vegyi anyagok várt besorolásával.

8. táblázat: Az egy laboratóriumon belül több vizsgálatmenetben vizsgálati vegyi anyagok osztályba sorolásának módszere

Számérték társítása az egyes vizsgálatmenetekhez:	
Besorolás	Számérték
Kötődő	2
Kétértelmű	1
Nem kötődő	0
Besorolás a vizsgálatmenetek átlagos számértéke alapján:	
Besorolás	Számérték
Kötődő	$\text{Átlag} \geq 1,5$
Kétértelmű	$0,5 \leq \text{Átlag} < 1,5$
Nem kötődő	$\text{Átlag} < 0,5$

VIZSGÁLATI JELENTÉS

61. Lásd a vizsgálati módszer „A humán ÖSZTROGÉNRECEPTOR-KÖTÉSI VIZSGÁLAT ÖSSZETEVŐI” részének 24. pontját.

2.1. függelék

SZAKKIFEJEZÉSEK LISTÁJA

[³H]E₂: radioaktív tríciummal jelölt 17β-ösztadiol.

DCC: dextránbevonatú aktívszén.

E₂: nem jelölt 17β-ösztadiol (semleges).

Vizsgálati puffer: 10 mM trisz, 10 mg/ml szarvasmarha szérum albumin, 2 mM DTT, 10 % glicerin, 0,2 mM leupeptin, pH-értéke 7,5.

hrERα: humán rekombináns ösztrogénreceptor alfa (ligandumkötő domén).

Ismétlés: egyike azon lyukaknak, amelyek azonos mintát tartalmaznak azonos koncentrációban, és vizsgálatuk egy adott vizsgálatmeneten belül, párhuzamosan zajlik. E protokoll keretén belül a vizsgálati vegyi anyagok minden koncentrációját három ismételtsben tesztelik; vagyis a vizsgálati vegyi anyagok minden koncentrációját egyidejűleg három ismételtsben vizsgálják.

Vizsgálatmenet: párhuzamosan vizsgált mikrotiterlemez minden mintája, amely minden szükséges információt biztosít a vizsgálati vegyi anyagok humán ösztrogénreceptor α-hoz való kötődésének jellemzéséhez (nevezetesen a vizsgálati lyukba adagolt összes [³H]-17β-ösztadiol, a [³H]-17β-ösztadiol maximális kötődése a hrERα-hoz, nem specifikus kötődés és a vizsgálati vegyi anyagok különböző koncentrációi által előidézett teljes kötődés). Egy vizsgálatmenet állhat koncentrációnként egyetlen vizsgálati lyukból is (vagyis egy ismételtsből), mivel azonban ez a protokoll három ismételtsben való tesztelést ír elő, egy vizsgálatmenet koncentrációnként három vizsgálati lyukat foglal magában. Emellett a protokoll meghatározza azt is, hogy vegyi anyagonként három független (azaz nem egyidejűleg lefolytatott) vizsgálatmenetre van szükség.

2.2. függelék

HÁROM ISMÉTLÉSES TIPIKUS [³H]-17β-ÖSZTRADIOL TELÍTÉSI VIZSGÁLAT

Három ismétléses tipikus [³ H]-17β-ösztadiol telítési vizsgálat												
Pozíció	Ismétlés	Lyuktípus kódja	Radioaktív E2 induló koncentrációja (nM)	Radioaktív E2 térfogata (μl)	Radioaktív E2 végső koncentrációja (nM)	Nem jelölt E2 induló koncentráció (μM)	Nem jelölt E2 térfogata (μl)	Nem jelölt E2 végső koncentrációja (μM)	Puffer térfogata (μl)	Receptor térfogata (μl)	A lyukak teljes térfogata	
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	

Három ismétléses tipikus [³H]-17β-ösztadiol telítési vizsgálat

Pozíció	Ismétlés	Lyuk típus kódja	Radioaktív E2 induló koncentrációja (nM)	Radioaktív E2 térfogata (μl)	Radioaktív E2 végső koncentrációja (nM)	Nem jelölt E2 induló koncentrációja (μM)	Nem jelölt E2 térfogata (μl)	Nem jelölt E2 végső koncentrációja (μM)	Puffer térfogata (μl)	Receptor térfogata (μl)	A lyukak teljes térfogata
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	Radioaktív	0,12	40	0,03	–	–	–	–	–	40
G2	2	Radioaktív	0,12	40	0,03	–	–	–	–	–	40
G3	3	Radioaktív	0,12	40	0,03	–	–	–	–	–	40
G4	1	Radioaktív	0,24	40	0,06	–	–	–	–	–	40
G5	2	Radioaktív	0,24	40	0,06	–	–	–	–	–	40
G6	3	Radioaktív	0,24	40	0,06	–	–	–	–	–	40
G7	1	Radioaktív	0,32	40	0,08	–	–	–	–	–	40
G8	2	Radioaktív	0,32	40	0,08	–	–	–	–	–	40
G9	3	Radioaktív	0,32	40	0,08	–	–	–	–	–	40
G10	1	Radioaktív	0,40	40	0,10	–	–	–	–	–	40
G11	2	Radioaktív	0,40	40	0,10	–	–	–	–	–	40
G12	3	Radioaktív	0,40	40	0,10	–	–	–	–	–	40
H1	1	Radioaktív	1,20	40	0,30	–	–	–	–	–	40
H2	2	Radioaktív	1,20	40	0,30	–	–	–	–	–	40
H3	3	Radioaktív	1,20	40	0,30	–	–	–	–	–	40
H4	1	Radioaktív	2,40	40	0,60	–	–	–	–	–	40
H5	2	Radioaktív	2,40	40	0,60	–	–	–	–	–	40
H6	3	Radioaktív	2,40	40	0,60	–	–	–	–	–	40
H7	1	Radioaktív	4,00	40	1,00	–	–	–	–	–	40
H8	2	Radioaktív	4,00	40	1,00	–	–	–	–	–	40
H9	3	Radioaktív	4,00	40	1,00	–	–	–	–	–	40
H10	1	Radioaktív	12,00	40	3,00	–	–	–	–	–	40
H11	2	Radioaktív	12,00	40	3,00	–	–	–	–	–	40
H12	3	Radioaktív	12,00	40	3,00	–	–	–	–	–	40

A „radioaktív” kifejezéssel jelölt lyukak az inkubálás alatt üresek. A 40 μl-t kizárólag a szcintillációs számlálás céljából adják hozzá a lyukakhoz.

2.3. függelék: Minták elrendezése a kompetitív kötési vizsgálathoz

Lemez	Pozíció	Ismétlés	Lyuk típusa	Lyuk kódja	Koncentráció kódja	Kompetitor induló koncentrációja (M)	hrER törzs (μl)	Puffer térfogata (μl)	Nyomjelző (radioaktív E2) térfogata (μl)	Hígítási lemezről adagolt térfogat (μL)	Végő térfogat (μl)	Kompetitor végő koncentrációja (M)
Sz	A1	1	teljes kötődés	TB	TB1	-	40		40	80	160	-
Sz	A2	2	teljes kötődés	TB	TB2	-	40		40	80	160	-
Sz	A3	3	teljes kötődés	TB	TB3	-	40		40	80	160	-
Sz	A4	1	teljes kötődés	TB	TB4	-	40		40	80	160	-
Sz	A5	2	teljes kötődés	TB	TB5	-	40		40	80	160	-
Sz	A6	3	teljes kötődés	TB	TB6	-	40		40	80	160	-
Sz	A7	1	nem jelölt E2	NSB	S0	2,00 E ⁻⁰⁶	40	-	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁶
Sz	A8	2	nem jelölt E2	NSB	S0	2,00 E ⁻⁰⁶	40	-	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁶
Sz	A9	3	nem jelölt E2	NSB	S0	2,00 E ⁻⁰⁶	40	-	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁶
Sz	A10	1	nem jelölt E2	NSB	S0	2,00 E ⁻⁰⁶	40	-	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁶
Sz	A11	2	nem jelölt E2	NSB	S0	2,00 E ⁻⁰⁶	40	-	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁶
Sz	A12	3	nem jelölt E2	NSB	S0	2,00 E ⁻⁰⁶	40	-	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁶
Sz	B1	1	nem jelölt E2	Sz	S1	2,00 E ⁻⁰⁷	40	-	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁷
Sz	B2	2	nem jelölt E2	Sz	S1	2,00 E ⁻⁰⁷	40	-	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁷
Sz	B3	3	nem jelölt E2	Sz	S1	2,00 E ⁻⁰⁷	40	-	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁷
Sz	B4	1	nem jelölt E2	Sz	S2	2,00 E ⁻⁰⁸	40	-	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁸
Sz	B5	2	nem jelölt E2	Sz	S2	2,00 E ⁻⁰⁸	40	-	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁸
Sz	B6	3	nem jelölt E2	Sz	S2	2,00 E ⁻⁰⁸	40	-	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁸
Sz	B7	1	nem jelölt E2	Sz	S3	6,00 E ⁻⁰⁹	40	-	40	80	160	3,0 E ⁻⁰⁹
Sz	B8	2	nem jelölt E2	Sz	S3	6,00 E ⁻⁰⁹	40	-	40	80	160	3,0 E ⁻⁰⁹
Sz	B9	3	nem jelölt E2	Sz	S3	6,00 E ⁻⁰⁹	40	-	40	80	160	3,0 E ⁻⁰⁹
Sz	B10	1	nem jelölt E2	Sz	S4	2,00 E ⁻⁰⁹	40	-	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁹
Sz	B11	2	nem jelölt E2	Sz	S4	2,00 E ⁻⁰⁹	40	-	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁹
Sz	B12	3	nem jelölt E2	Sz	S4	2,00 E ⁻⁰⁹	40	-	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁹
Sz	C1	1	nem jelölt E2	Sz	S5	6,00 E ⁻¹⁰	40	-	40	80	160	3,0 E ⁻¹⁰
Sz	C2	2	nem jelölt E2	Sz	S5	6,00 E ⁻¹⁰	40	-	40	80	160	3,0 E ⁻¹⁰
Sz	C3	3	nem jelölt E2	Sz	S5	6,00 E ⁻¹⁰	40	-	40	80	160	3,0 E ⁻¹⁰
Sz	C4	1	nem jelölt E2	Sz	S6	2,00 E ⁻¹⁰	40	-	40	80	160	1,0 E ⁻¹⁰
Sz	C5	2	nem jelölt E2	Sz	S6	2,00 E ⁻¹⁰	40	-	40	80	160	1,0 E ⁻¹⁰
Sz	C6	3	nem jelölt E2	Sz	S6	2,00 E ⁻¹⁰	40	-	40	80	160	1,0 E ⁻¹⁰
Sz	C7	1	nem jelölt E2	Sz	S7	2,00 E ⁻¹¹	40	-	40	80	160	1,0 E ⁻¹¹
Sz	C8	2	nem jelölt E2	Sz	S7	2,00 E ⁻¹¹	40	-	40	80	160	1,0 E ⁻¹¹
Sz	C9	3	nem jelölt E2	Sz	S7	2,00 E ⁻¹¹	40	-	40	80	160	1,0 E ⁻¹¹
Sz	C10	1	üres	üres	B1	-	-	160	-	-	160	-
Sz	C11	2	üres	üres	B2	-	-	160	-	-	160	-
Sz	C12	3	üres	üres	B3	-	-	160	-	-	160	-
Sz	D1	1	noretynodrel	NE	WP1	6,00 E ⁻⁰⁵	40	-	40	80	160	3,0 E ⁻⁰⁵
Sz	D2	1	noretynodrel	NE	WP1	6,00 E ⁻⁰⁵	40	-	40	80	160	3,0 E ⁻⁰⁵
Sz	D3	1	noretynodrel	NE	WP1	6,00 E ⁻⁰⁵	40	-	40	80	160	3,0 E ⁻⁰⁵
Sz	D4	1	noretynodrel	NE	WP2	2,00 E ⁻⁰⁵	40	-	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁵
Sz	D5	1	noretynodrel	NE	WP2	2,00 E ⁻⁰⁵	40	-	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁵
Sz	D6	1	noretynodrel	NE	WP2	2,00 E ⁻⁰⁵	40	-	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁵
Sz	D7	1	noretynodrel	NE	WP3	6,00 E ⁻⁰⁶	40	-	40	80	160	3,0 E ⁻⁰⁶
Sz	D8	1	noretynodrel	NE	WP3	6,00 E ⁻⁰⁶	40	-	40	80	160	3,0 E ⁻⁰⁶
Sz	D9	1	noretynodrel	NE	WP3	6,00 E ⁻⁰⁶	40	-	40	80	160	3,0 E ⁻⁰⁶
Sz	D10	1	noretynodrel	NE	WP4	2,00 E ⁻⁰⁶	40	-	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁶
Sz	D11	1	noretynodrel	NE	WP4	2,00 E ⁻⁰⁶	40	-	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁶
Sz	D12	1	noretynodrel	NE	WP4	2,00 E ⁻⁰⁶	40	-	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁶

Minták elrendezése a kompetitív kötési vizsgálathoz												
Lemez	Pozíció	Ismétlés	Lyuk típusa	Lyuk kódja	Koncentráció kódja	Kompetitor induló koncentrációja (M)	hr-ER törzs (μl)	Puffer térfogata (μl)	Nyomjező (radioaktív E2) térfogata (μl)	Hígítási lemeztől adagolt térfogat (μl)	Végő térfogat (μl)	Kompetitor végső koncentrációja (M)
Sz	E1	1	noretynodrel	NE	WP	6,00 E ⁻⁰⁷ –	40		40	80	160	3,0 E ⁻⁰⁷
Sz	E2	2	noretynodrel	NE	WP	6,00 E ⁻⁰⁷ –	40		40	80	160	3,0 E ⁻⁰⁷
Sz	E3	3	noretynodrel	NE	WP	6,00 E ⁻⁰⁷ –	40		40	80	160	3,0 E ⁻⁰⁷
Sz	E4	1	noretynodrel	NE	WP	2,00 E ⁻⁰⁷ –	40		40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁷
Sz	E5	2	noretynodrel	NE	WP	2,00 E ⁻⁰⁷ –	40		40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁷
Sz	E6	3	noretynodrel	NE	WP	2,00 E ⁻⁰⁷ –	40		40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁷
Sz	E7	1	noretynodrel	NE	WP	6,00 E ⁻⁰⁸ –	40	-	40	80	160	3,0 E ⁻⁰⁸
Sz	E8	2	noretynodrel	NE	WP	6,00 E ⁻⁰⁸ –	40	-	40	80	160	3,0 E ⁻⁰⁸
Sz	E9	3	noretynodrel	NE	WP	6,00 E ⁻⁰⁸ –	40	-	40	80	160	3,0 E ⁻⁰⁸
Sz	E10	1	noretynodrel	NE	WP	6,00 E ⁻⁰⁹ –	40	-	40	80	160	3,0 E ⁻⁰⁹
Sz	E11	2	noretynodrel	NE	WP	6,00 E ⁻⁰⁹ –	40	-	40	80	160	3,0 E ⁻⁰⁹
Sz	E12	3	noretynodrel	NE	WP	6,00 E ⁻⁰⁹ –	40	-	40	80	160	3,0 E ⁻⁰⁹
Sz	F1	1	OTES	N	OTES	2,00 E ⁻⁰³	40	-	40	80	160	1,0 E ⁻⁰³
Sz	F2	2	OTES	N	OTES	2,00 E ⁻⁰³	40	-	40	80	160	1,0 E ⁻⁰³
Sz	F3	3	OTES	N	OTES	2,00 E ⁻⁰³	40	-	40	80	160	1,0 E ⁻⁰³
Sz	F4	1	OTES	N	OTES	2,00 E ⁻⁰⁴	40	-	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁴
Sz	F5	2	OTES	N	OTES	2,00 E ⁻⁰⁴	40	-	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁴
Sz	F6	3	OTES	N	OTES	2,00 E ⁻⁰⁴	40	-	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁴
Sz	F7	1	OTES	N	OTES	2,00 E ⁻⁰⁵	40	-	40	80	160	3,0 E ⁻⁰⁵
Sz	F8	2	OTES	N	OTES	2,00 E ⁻⁰⁵	40	-	40	80	160	3,0 E ⁻⁰⁵
Sz	F9	3	OTES	N	OTES	2,00 E ⁻⁰⁵	40	-	40	80	160	3,0 E ⁻⁰⁵
Sz	F10	1	OTES	N	OTES	2,00 E ⁻⁰⁶	40	-	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁶
Sz	F11	2	OTES	N	OTES	2,00 E ⁻⁰⁶	40	-	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁶
Sz	F12	3	OTES	N	OTES	2,00 E ⁻⁰⁶	40	-	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁶
Sz	G1	1	OTES	N	OTES	2,00 E ⁻⁰⁷	40	-	40	80	160	3,0 E ⁻⁰⁷
Sz	G2	2	OTES	N	OTES	2,00 E ⁻⁰⁷	40	-	40	80	160	3,0 E ⁻⁰⁷
Sz	G3	3	OTES	N	OTES	2,00 E ⁻⁰⁷	40	-	40	80	160	3,0 E ⁻⁰⁷
Sz	G4	1	OTES	N	OTES	2,00 E ⁻⁰⁸	40	-	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁸
Sz	G5	2	OTES	N	OTES	2,00 E ⁻⁰⁸	40	-	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁸
Sz	G6	3	OTES	N	OTES	2,00 E ⁻⁰⁸	40	-	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁸
Sz	G7	1	OTES	N	OTES	2,00 E ⁻⁰⁹	40	-	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁹
Sz	G8	2	OTES	N	OTES	2,00 E ⁻⁰⁹	40	-	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁹
Sz	G9	3	OTES	N	OTES	2,00 E ⁻⁰⁹	40	-	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁹
Sz	G10	1	OTES	N	OTES	2,00 E ⁻¹⁰	40	-	40	-	160	1,0 E ⁻¹⁰
Sz	G11	2	OTES	N	OTES	2,00 E ⁻¹⁰	40	-	40	-	160	1,0 E ⁻¹⁰
Sz	G12	3	OTES	N	OTES	2,00 E ⁻¹⁰	40	-	40	-	160	1,0 E ⁻¹⁰
Sz	H1	1	radioaktív	H	H	-	-	-	40	-	40	-
Sz	H2	1	radioaktív	H	H	-	-	-	40	-	40	-
Sz	H3	1	radioaktív	H	H	-	-	-	40	-	40	-
Sz	H4	1	radioaktív	H	H	-	-	-	40	-	40	-
Sz	H5	1	radioaktív	H	H	-	-	-	40	-	40	-
Sz	H6	1	radioaktív	H	H	-	-	-	40	-	40	-
Sz	H7	1	puffer kontroll	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
Sz	H8	1	puffer kontroll	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
Sz	H9	1	puffer kontroll	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
Sz	H10	1	puffer kontroll	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
Sz	H11	1	puffer kontroll	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
Sz	H12	1	puffer kontroll	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-

A „radioaktív” kifejezéssel jelölt lyukak az inkubálás alatt üresek. A 40 μl-t kizárólag a szcintillációs számlálás céljából adják hozzá a lyukakhoz.

Minták elrendezése a kompetitív kötési vizsgálathoz												
Lemez	Pozíció	Ismétlés	Lyuk típusa	Lyuk kódja	Koncentráció kódja	Kompetítor induló koncentrációja (M)	hrER törzs (μL)	Puffer térfogata (μL)	Nyomjelző (radioaktív E2) térfogata (μL)	lemezről adagolt térfogat (μL)	Végő térfogat (μL)	Kompetítor végő koncentrációja (M)
P1	A1	1	teljes kötődés	TB	TBB1B1	-	40	-	40	80	160	-
P1	A2	2	teljes kötődés	TB	TB2	-	40	-	40	80	160	-
P1	A3	3	teljes kötődés	TB	TB3	-	40	-	40	80	160	-
P1	A4	1	teljes kötődés	TB	TB4	-	40	-	40	80	160	-
P1	A5	2	teljes kötődés	TB	TB5	-	40	-	40	80	160	-
P1	A6	3	teljes kötődés	TB	TB6	-	40	-	40	80	160	-
P1	A7	1	nem jelölt E2	NSB	S0	2,00 E ⁻⁰⁶	40	-	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁶
P1	A8	2	nem jelölt E2	NSB	S0	2,00 E ⁻⁰⁶	40	-	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁶
P1	A9	3	nem jelölt E2	NSB	S0	2,00 E ⁻⁰⁶	40	-	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁶
P1	A10	1	nem jelölt E2	NSB	S0	2,00 E ⁻⁰⁶	40	-	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁶
P1	A11	2	nem jelölt E2	NSB	S0	2,00 E ⁻⁰⁶	40	-	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁶
P1	A12	3	nem jelölt E2	NSB	S0	2,00 E ⁻⁰⁶	40	-	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁶
P1	B1	1	1. vizsgálati vegyi	TC1	1	2,00 E ⁻⁰³	40	0	40	80	160	1,0 E ⁻⁰³
P1	B2	2	1. vizsgálati vegyi	TC1	1	2,00 E ⁻⁰³	40	0	40	80	160	1,0 E ⁻⁰³
P1	B3	3	1. vizsgálati vegyi	TC1	1	2,00 E ⁻⁰³	40	0	40	80	160	1,0 E ⁻⁰³
P1	B4	1	1. vizsgálati vegyi	TC1	2	2,00 E ⁻⁰⁴	40	0	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁴
P1	B5	2	1. vizsgálati vegyi	TC1	2	2,00 E ⁻⁰⁴	40	0	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁴
P1	B6	3	1. vizsgálati vegyi	TC1	2	2,00 E ⁻⁰⁴	40	0	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁴
P1	B7	1	1. vizsgálati vegyi	TC1	3	2,00 E ⁻⁰⁵	40	0	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁵
P1	B8	2	1. vizsgálati vegyi	TC1	3	2,00 E ⁻⁰⁵	40	0	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁵
P1	B9	3	1. vizsgálati vegyi	TC1	3	2,00 E ⁻⁰⁵	40	0	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁵
P1	B10	1	1. vizsgálati vegyi	TC1	4	2,00 E ⁻⁰⁶	40	0	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁶
P1	B11	2	1. vizsgálati vegyi	TC1	4	2,00 E ⁻⁰⁶	40	0	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁶
P1	B12	3	1. vizsgálati vegyi	TC1	4	2,00 E ⁻⁰⁶	40	0	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁶
P1	C1	1	1. vizsgálati vegyi	TC1	5	2,00 E ⁻⁰⁷	40	0	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁷
P1	C2	2	1. vizsgálati vegyi	TC1	5	2,00 E ⁻⁰⁷	40	0	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁷
P1	C3	3	1. vizsgálati vegyi	TC1	5	2,00 E ⁻⁰⁷	40	0	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁷
P1	C4	1	1. vizsgálati vegyi	TC1	6	2,00 E ⁻⁰⁸	40	0	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁸
P1	C5	2	1. vizsgálati vegyi	TC1	6	2,00 E ⁻⁰⁸	40	0	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁸
P1	C6	3	1. vizsgálati vegyi	TC1	6	2,00 E ⁻⁰⁸	40	0	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁸
P1	C7	1	1. vizsgálati vegyi	TC1	7	2,00 E ⁻⁰⁹	40	0	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁹
P1	C8	2	1. vizsgálati vegyi	TC1	7	2,00 E ⁻⁰⁹	40	0	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁹
P1	C9	3	1. vizsgálati vegyi	TC1	7	2,00 E ⁻⁰⁹	40	0	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁹
P1	C10	1	1. vizsgálati vegyi	TC1	8	2,00 E ⁻¹⁰	40	0	40	80	160	1,0 E ⁻¹⁰
P1	C11	2	1. vizsgálati vegyi	TC1	8	2,00 E ⁻¹⁰	40	0	40	80	160	1,0 E ⁻¹⁰
P1	C12	3	1. vizsgálati vegyi	TC1	8	2,00 E ⁻¹⁰	40	0	40	80	160	1,0 E ⁻¹⁰
P1	D1	1	2. vizsgálati vegyi	TC2	1	2,00 E ⁻⁰³	40	0	40	80	160	1,0 E ⁻⁰³
P1	D2	2	2. vizsgálati vegyi	TC2	1	2,00 E ⁻⁰³	40	0	40	80	160	1,0 E ⁻⁰³
P1	D3	3	2. vizsgálati vegyi	TC2	1	2,00 E ⁻⁰³	40	0	40	80	160	1,0 E ⁻⁰³
P1	D4	1	2. vizsgálati vegyi	TC2	2	2,00 E ⁻⁰⁴	40	0	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁴
P1	D5	2	2. vizsgálati vegyi	TC2	2	2,00 E ⁻⁰⁴	40	0	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁴
P1	D6	3	2. vizsgálati vegyi	TC2	2	2,00 E ⁻⁰⁴	40	0	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁴
P1	D7	1	2. vizsgálati vegyi	TC2	3	2,00 E ⁻⁰⁵	40	0	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁵
P1	D8	2	2. vizsgálati vegyi	TC2	3	2,00 E ⁻⁰⁵	40	0	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁵
P1	D9	3	2. vizsgálati vegyi	TC2	3	2,00 E ⁻⁰⁵	40	0	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁵
P1	D10	1	2. vizsgálati vegyi	TC2	4	2,00 E ⁻⁰⁶	40	0	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁶
P1	D11	2	2. vizsgálati vegyi	TC2	4	2,00 E ⁻⁰⁶	40	0	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁶
P1	D12	3	2. vizsgálati vegyi	TC2	4	2,00 E ⁻⁰⁶	40	0	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁶
P1	E1	1	2. vizsgálati vegyi	TC2	5	2,00 E ⁻⁰⁷	40	0	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁷
P1	E2	2	2. vizsgálati vegyi	TC2	5	2,00 E ⁻⁰⁷	40	0	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁷
P1	E3	3	2. vizsgálati vegyi	TC2	5	2,00 E ⁻⁰⁷	40	0	40	80	160	1,0 E ⁻⁰⁷

Minták elrendezése a kompetitív kötési vizsgálathoz

Lemez	Poszció	Ismétlés	Lyuk típusa	Lyuk kódja	Koncentráció kódja	Kompetitor indukó koncentrációja (M)	hrER törzs (μL)	Puffer térfogata (μL)	Nyomjelző (radioaktív E2) térfogata (μL)	Hígítási lemezről adagolt térfogat (μL)	Végő térfogat (μL)	Kompetitor végő koncentrációja (M)
P1	E4	1	2. vizsgálati	TC2	6	-	40	0	40	80	160	$1,0 \cdot 10^{-8}$
P1	E5	2	2. vizsgálati	TC2	6	-	40	0	40	80	160	$1,0 \cdot 10^{-8}$
P1	E6	3	2. vizsgálati	TC2	6	-	40	0	40	80	160	$1,0 \cdot 10^{-8}$
P1	E7	1	2. vizsgálati	TC2	7	$2,00 \cdot 10^{-6}$	40	0	40	80	160	$1,0 \cdot 10^{-9}$
P1	E8	2	2. vizsgálati	TC2	7	$2,00 \cdot 10^{-6}$	40	0	40	80	160	$1,0 \cdot 10^{-9}$
P1	E9	3	2. vizsgálati	TC2	7	$2,00 \cdot 10^{-6}$	40	0	40	80	160	$1,0 \cdot 10^{-9}$
P1	E10	1	2. vizsgálati	TC2	8	$2,00 \cdot 10^{-6}$	40	0	40	80	160	$1,0 \cdot 10^{-10}$
P1	E11	2	2. vizsgálati	TC2	8	$2,00 \cdot 10^{-6}$	40	0	40	80	160	$1,0 \cdot 10^{-10}$
P1	E12	3	2. vizsgálati	TC2	8	$2,00 \cdot 10^{-6}$	40	0	40	80	160	$1,0 \cdot 10^{-10}$
P1	F1	1	3. vizsgálati	TC3	1	$2,00 \cdot 10^{-3}$	40	0	40	80	160	$1,0 \cdot 10^{-3}$
P1	F2	2	3. vizsgálati	TC3	1	$2,00 \cdot 10^{-3}$	40	0	40	80	160	$1,0 \cdot 10^{-3}$
P1	F3	3	3. vizsgálati	TC3	1	$2,00 \cdot 10^{-3}$	40	0	40	80	160	$1,0 \cdot 10^{-3}$
P1	F4	1	3. vizsgálati	TC3	2	$2,00 \cdot 10^{-4}$	40	0	40	80	160	$1,0 \cdot 10^{-4}$
P1	F5	2	3. vizsgálati	TC3	2	$2,00 \cdot 10^{-4}$	40	0	40	80	160	$1,0 \cdot 10^{-4}$
P1	F6	3	3. vizsgálati	TC3	2	$2,00 \cdot 10^{-4}$	40	0	40	80	160	$1,0 \cdot 10^{-4}$
P1	F7	1	3. vizsgálati	TC3	3	$2,00 \cdot 10^{-5}$	40	0	40	80	160	$1,0 \cdot 10^{-5}$
P1	F8	2	3. vizsgálati	TC3	3	$2,00 \cdot 10^{-5}$	40	0	40	80	160	$1,0 \cdot 10^{-5}$
P1	F9	3	3. vizsgálati	TC3	3	$2,00 \cdot 10^{-5}$	40	0	40	80	160	$1,0 \cdot 10^{-5}$
P1	F10	1	3. vizsgálati	TC3	4	$2,00 \cdot 10^{-6}$	40	0	40	80	160	$1,0 \cdot 10^{-6}$
P1	F11	2	3. vizsgálati	TC3	4	$2,00 \cdot 10^{-6}$	40	0	40	80	160	$1,0 \cdot 10^{-6}$
P1	F12	3	3. vizsgálati	TC3	4	$2,00 \cdot 10^{-6}$	40	0	40	80	160	$1,0 \cdot 10^{-6}$
P1	G1	1	3. vizsgálati	TC3	5	$2,00 \cdot 10^{-7}$	40	0	40	80	160	$1,0 \cdot 10^{-7}$
P1	G2	2	3. vizsgálati	TC3	5	$2,00 \cdot 10^{-7}$	40	0	40	80	160	$1,0 \cdot 10^{-7}$
P1	G3	3	3. vizsgálati	TC3	5	$2,00 \cdot 10^{-7}$	40	0	40	80	160	$1,0 \cdot 10^{-7}$
P1	G4	1	3. vizsgálati	TC3	6	$2,00 \cdot 10^{-8}$	40	0	40	80	160	$1,0 \cdot 10^{-8}$
P1	G5	2	3. vizsgálati	TC3	6	$2,00 \cdot 10^{-8}$	40	0	40	80	160	$1,0 \cdot 10^{-8}$
P1	G6	3	3. vizsgálati	TC3	6	$2,00 \cdot 10^{-8}$	40	0	40	80	160	$1,0 \cdot 10^{-8}$
P1	G7	1	3. vizsgálati	TC3	7	$2,00 \cdot 10^{-9}$	40	0	40	80	160	$1,0 \cdot 10^{-9}$
P1	G8	2	3. vizsgálati	TC3	7	$2,00 \cdot 10^{-9}$	40	0	40	80	160	$1,0 \cdot 10^{-9}$
P1	G9	3	3. vizsgálati	TC3	7	$2,00 \cdot 10^{-9}$	40	0	40	80	160	$1,0 \cdot 10^{-9}$
P1	G10	1	3. vizsgálati	TC3	8	$2,00 \cdot 10^{-10}$	40	0	40	80	160	$1,0 \cdot 10^{-10}$
P1	G11	2	3. vizsgálati	TC3	8	$2,00 \cdot 10^{-10}$	40	0	40	80	160	$1,0 \cdot 10^{-10}$
P1	G12	3	3. vizsgálati	TC3	8	$2,00 \cdot 10^{-10}$	40	0	40	80	160	$1,0 \cdot 10^{-10}$
P1	H1	1	noretynodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H2	2	noretynodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H3	3	noretynodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H4	1	noretynodrel	NE		$1,00 \cdot 10^{-4,5}$	40	0	40	80	160	
P1	H5	2	noretynodrel	NE		$1,00 \cdot 10^{-4,5}$	40	0	40	80	160	
P1	H6	3	noretynodrel	NE		$1,00 \cdot 10^{-4,5}$	40	0	40	80	160	
P1	H7	1	nem jelölt E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H8	2	nem jelölt E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H9	3	nem jelölt E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H10	1	nem jelölt E2 S			$1,00 \cdot 10^{-7}$	40	0	40	80	160	
P1	H11	2	nem jelölt E2 S			$1,00 \cdot 10^{-7}$	40	0	40	80	160	
P1	H12	3	nem jelölt E2 S			$1,00 \cdot 10^{-7}$	40	0	40	80	160	

3. függelék

A CERI INTÉZET (CHEMICAL EVALUATION AND RESEARCH INSTITUTE) HUMÁN REKOMBINÁNS LIGANDUMKÖTŐ DOMÉNNEL RENDELKEZŐ ERA FEHÉRJE HASZNÁLATÁN ALAPULÓ *IN VITRO* ÖSZTROGÉNRECEPTOR-KÖTÉSI VIZSGÁLATA

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK (LÁSD MÉG AZ ÁLTALÁNOS BEVEZETÉST)

1. Ez az *in vitro* ösztrogénreceptor (ER α) telítési és kompetitív kötési vizsgálat a humán ösztrogénreceptor α (hrER α) ligandumkötő doménjét alkalmazza. A japán CERI Intézet által előállított fehérjekonstrukció egy glutation-S-transzferáz (GST) fúziós fehérje, amelyet *E. coli*-ban termeltetnek. A CERI protokollt több laboratórium részvételével zajló, nemzetközi validálási tanulmánynak (2) vetették alá, amely bizonyította, hogy a vizsgálat tervezett felhasználása tekintetében releváns és megbízható.
2. A vizsgálat egy szűrési eljárás, amelynek révén azonosíthatók a humán ösztrogénreceptor α -hoz kötődni képes anyagok. A vizsgálatot annak meghatározására alkalmazzák, hogy egy adott vizsgálati vegyi anyag képes-e versenyezni a 17 β -ösztradiollal a humán ösztrogénreceptor α ligandumkötő doménjéhez való kötődésért. A vizsgálat kvantitatív eredményei magukban foglalhatják az IC₅₀ értéket (vagyis azt a koncentrációt, amelyre a vizsgálati vegyi anyagnak szüksége van ahhoz, hogy a [³H]-17 β -ösztradiol felét leszorítsa a humán ösztrogénreceptor α -ról), valamint a vizsgálati vegyi anyag humán ösztrogénreceptor α -hoz való relatív – a 17 β -ösztradiolhoz viszonyított – kötési affinitását. A vegyi anyagok szűrése céljából a vizsgálat elfogadható kvalitatív eredményei kiterjedhetnek a vizsgálati vegyi anyagok humán ösztrogénreceptor α -hoz kötődő, nem kötődő, illetve nem egyértelmű kategóriába sorolására, ezek meghatározására a kötési görbékre vonatkozó kritériumok alapján kerül sor.
3. A vizsgálat radioaktív ligandumot használ, ezért a laboratóriumnak rendelkeznie kell radioaktív anyagok használatára vonatkozó engedéllyel. A radioaktív izotópokkal és veszélyes vegyi anyagokkal végzett valamennyi folyamat során be kell tartani a nemzeti jogszabályok által előírt rendelkezéseket és eljárásokat.
4. E vizsgálat szabályozási célra való alkalmazása előtt el kell olvasni az „ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS” és „A humán ÖSZTROGÉNRECEPTOR-KÖTÉSI VIZSGÁLAT ÖSSZETEVŐI” részt. Az ebben a vizsgálati iránymutatásban használt fogalmak és rövidítések meghatározását az 1. függelék tartalmazza.

A VIZSGÁLATI ELVEK (LÁSD MÉG AZ ÁLTALÁNOS BEVEZETÉST)

5. A humán ösztrogénreceptor α -kötési vizsgálat azt méri, hogy milyen mértékben képes egy radioaktívan jelölt ligandum (a [³H]17 β -ösztradiol) az ösztrogénreceptorhoz kötődni egy adott vizsgálati vegyi anyag (a kompetítor) növekvő koncentrációjának jelenlétében. Az

ösztrogénreceptorok iránt nagy affinitást mutató vizsgálati vegyi anyagok alacsonyabb koncentrációban versenyeznek a radioaktívan jelölt ligandummal azokhoz a vegyi anyagokhoz képest, amelyek kisebb affinitást mutatnak a receptor iránt.

6. A vizsgálat két fő összetevőből áll: egy telítési kötési kísérletből, amelynek során meghatározzák a receptor és a ligandum közötti kölcsönhatás paramétereit, majd egy ezután végzett kompetitív kötési kísérletből, amelynek révén jellemzik a vizsgálati vegyi anyag és a radioaktívan jelölt ligandum ösztrogénreceptor-kötőhelyekért folytatott vetélkedését.
7. A telítési kötési kísérlet célja, hogy a kompetitív kötési kísérlet előkészítéseként meghatározzák a receptorok egy adott tételének kötési affinitását és a receptorok számát. A telítési kötési kísérlet egyensúlyi állapotban méri egy fix koncentrációjú ösztrogénreceptor természetes ligandumához való kötési affinitását (amelynek mutatója a disszociációs állandó, a K_d) és a receptor aktív kötőhelyeinek koncentrációját (B_{max}).
8. A kompetitív kötési kísérletben azt mérik, hogy egy adott anyag milyen mértékű affinitással rendelkezik arra, hogy versenyezzen a [^3H]17 β -ösztradiollal az ösztrogénreceptorral formált kötésért. Az affinitást a vizsgálati vegyi anyag azon koncentrációjával számszerűsítik, amely egyensúlyi állapotban meggátolja a [^3H]17 β -ösztradiol specifikus kötődésének 50 %-át (ez az úgynevezett „50 %-os gátlást kiváltó koncentráció” vagy IC_{50}). Az affinitás mérhető emellett a relatív kötési affinitással is (RBA, az ösztradiol ugyanazon vizsgálatmenetben, de külön mért IC_{50} értékéhez viszonyított affinitás). A kompetitív kötési kísérlet azt méri, hogy milyen mértékben kötődik egy fix koncentrációban alkalmazott [^3H]17 β -ösztradiol a vizsgálati vegyi anyag széles skálát (nyolc nagyságrendet) lefedő koncentrációja jelenlétében. Ezt követően – ahol lehetséges – az adatokat a Hill-egyenlet olyan formájára illesztik (Hill, 1910), amely meghatározza, hogy milyen mértékben szorítják le az egy kötőhelyet elfoglaló kompetitív kötődő anyagok a radioaktív ligandumot. A radioaktívan jelölt ösztradiol egyensúlyi állapotban történő leszorításának mértéke alapján jellemzik a vizsgálati vegyi anyagot kötődő, nem kötődő, vagy kétértelmű választ adó anyagnaként.

ELJÁRÁS

A humán ösztrogénreceptor α fehérje elfogadható teljesítményének igazolása

9. A telítési és a kompetitív kötési vizsgálatok rutinszerű alkalmazása előtt a humán ösztrogénreceptor α minden új tételéről bizonyítani kell, hogy megfelelő teljesítményt nyújt abban a laboratóriumban, ahol használni fogják. A megfelelő teljesítmény egy két lépésből álló eljárással bizonyítható. Ez a két lépés a következő:
 - A humán ösztrogénreceptor α -specifikusságának és -telítettségének igazolása érdekében végezzünk el egy telítési [^3H]-17 β -ösztradiol kötési vizsgálatot. Az adatok nem-lineáris regressziós analízise (pl. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995), majd azt követő Scatchard-plot ábrázolása egy adott hrER α -tételre vonatkozólag dokumentálja a [^3H]-17 β -

ösztradiol humán ösztrogénreceptor α -hoz való kötési affinitását (K_d) és a receptorok számát (B_{max}).

- Végezzünk el egy kompetitív kötési vizsgálatot a kontrollanyagok (a referenciaösztrogén (17β -ösztradiol), egy gyengén kötődő anyag (pl. noretynodrel vagy noretindron) és egy nem kötődő anyag (oktil-trietoxi-szilán, OTES)) használatával. Valamennyi laboratóriumnak létre kell hoznia egy adatbázist annak dokumentálására, hogy a referenciaösztrogén és a gyengén kötődő anyag IC_{50} értékét és releváns mutatóit következetesen határozta meg a különböző kísérletek és az eltérő humán ösztrogénreceptor α -típusok vizsgálata során. Emellett a kontrollanyagok kompetitív kötési görbáját alkotó paramétereknek a 95 %-os konfidenciaintervallumon belül kell lenniük (lásd az 1. táblázatot), amelynek értékeit a vizsgálat validálási tanulmányában részt vevő laboratóriumok adatai alapján határozták meg (2).

1. táblázat: A CERI humán ösztrogénreceptor-kötési vizsgálatban használt referenciaösztrogén és gyengén kötődő anyag teljesítményére vonatkozó kritériumok

Anyag	Paraméter	Átlag ^a	Standard deviáció (n)	95 %-os konfidenciaintervallumok ^b	
				Alsó határ	Felső határ
17β-ösztradiol	Görbe teteje	104,74	13,12 (70)	101,6	107,9
	Görbe alja	0,85	2,41 (70)	0,28	1,43
	Hill-merekség	-1,22	0,20 (70)	-1,27	-1,17
	LogIC ₅₀	-8,93	0,23 (70)	-8,98	-8,87
Noretynodrel	Görbe teteje	101,31	10,55 (68)	98,76	103,90
	Görbe alja	2,39	5,01 (68)	1,18	3,60
	Hill-merekség	-1,04	0,21 (68)	-1,09	-0,99
	LogIC ₅₀	-6,19	0,40 (68)	-6,29	-6,10
Noretindron^c	Görbe teteje	92,27	7,79 (23)	88,90	95,63
	Görbe alja	16,52	10,59 (23)	11,94	21,10
	Hill-merekség	-1,18	0,32 (23)	-1,31	-1,04
	LogIC ₅₀	-6,01	0,54 (23)	-6,25	-5,78

^a Az átlag $\pm$ standard deviáció (SD) értékét ((n) mintamérettel) becsült görbeillesztési paraméterek (négyparaméteres Hill-egyenlet) segítségével számolták ki a validálási tanulmány során négy laboratórium által kontroll céljából végzett vizsgálatmenetek során (lásd a 2. referencia N. függelékét).

^b A 95 %-os konfidencia útmutatóként szolgál az elfogadhatósági kritériumokhoz.

^c A validálási tanulmány során a 4. alfeladatban a noretindron vizsgálata opcionális volt (lásd a 2. referenciát és a 4. alfeladatot). Az átlag $\pm$ SD (n) értékét tehát becsült görbeillesztési paraméterek (négyparaméteres Hill-egyenlet) segítségével számolták ki két laboratórium által kontroll céljából végzett vizsgálatmenetek során.

Az IC₅₀ tartománya függ a receptor preparátum K_d értékétől és a radioaktívan jelölt ligandum egyes laboratóriumokban alkalmazott koncentrációjától. Megengedhető, hogy a vizsgálat lefolytatásának körülményei alapján az IC₅₀ tartományát megfelelő mértékben módosítsák.

A laboratórium jártasságának igazolása

10. Lásd a vizsgálati módszer „**A humán ÖSZTROGÉNRECEPTOR-KÖTÉSI VIZSGÁLAT ÖSSZETEVŐI**” részének 17. és 18. pontját, valamint 2. táblázatát. Minden (telítési és kompetitív kötési) vizsgálatnak három független (vagyis a receptor, a vegyi anyagok és a reagensek frissen készített oldataival végezett), különböző napokon lefolytatott vizsgálatmenetből kell állnia, az egyes vizsgálatmeneteknek pedig három ismétlést kell tartalmazniuk.

A receptor (hrER α) koncentrációjának meghatározása

11. Az aktív receptor koncentrációja tételenként és tárolási feltételek szerint kissé változó. Ebből adódóan a forgalmazótól való átvételkor meg kell határozni az aktív receptor koncentrációját. Így megállapítható az aktív receptor vizsgálatmenet során alkalmazandó megfelelő koncentrációja.

12. A kompetitív kötési vizsgálatnak megfelelő körülmények között (vagyis 0,5 nM [^3H]-ösztradiollal) a receptort 0,1, 0,2, 0,4 és 0,6 nM névleges koncentrációban inkubálni kell 1 μM nem jelölt ösztradiol jelenlétében (nem specifikus kötődés) és annak hiányában (teljes kötődés). A specifikus kötődést, amely a teljes és a nem specifikus kötődés különbségeként határozható meg, ábrázolni kell a receptor névleges koncentrációja függvényében. A receptort abban a névleges koncentrációban kell használni a telítési és a kompetitív kötési kísérletek során, amelynél a specifikus kötődési értékei megegyeznek a hozzáadott radioaktívan jelölt ösztradiol kötési értékeinek 40 %-ával. A humán ösztrogénreceptor 0,2 nM-es végső koncentrációja többnyire elegendő ennek a feltételnek.
13. Amennyiben a 40%-os feltétel több próbálkozás után sem teljesül, ellenőrizni kell, hogy nincsenek-e potenciális hibák a kísérlet elrendezésében. A 40%-os feltétel nem teljesülése jelezheti azt is, hogy a rekombináns tételben nagyon csekély az aktív receptorok száma, ilyen esetben fontolóra kell venni másik receptortétel alkalmazását.

Telítési vizsgálat

14. A [^3H]-17 β -ösztradiolt kell kiértékelni nyolc növekvő koncentrációban, három ismételtsben, az alábbi három kitéttel (lásd a 2. táblázatot):
- a. Nem jelölt 17 β -ösztradiol nélkül és ösztrogénreceptorral. Ez alapján határozható meg a teljes kötődés a csak [^3H]-17 β -ösztradiolt tartalmazó lyukakban mért radioaktivitás alapján.
 - b. A jelölt 17 β -ösztradiolhoz képest 2000-szeres koncentrációjú nem jelölt 17 β -ösztradiol jelenlétében és ösztrogénreceptorral. Ez az állapot arra szolgál, hogy az aktív kötőhelyek telítődjenek nem jelölt 17 β -ösztradiollal, így a lyukakban mért radioaktivitás alapján meghatározható a nem specifikus kötődés. A fennmaradó, receptorhoz kötődő radioaktív ösztrogének feltételezhetően nem specifikus helyre kötődnek, mivel a nem jelölt ösztrogének olyan magas koncentrációban vannak jelen, hogy elfoglalják a receptor valamennyi szabad specifikus kötőhelyét.
 - c. Nem jelölt 17 β -ösztradiol és ösztrogénreceptor nélkül (így meghatározható a teljes radioaktivitás).

A [^3H]-17 β -ösztradiol és a nem jelölt 17 β -ösztradiol oldatainak és a humán ösztrogénreceptor α -nak az elkészítése

15. A [^3H]-17 β -ösztradiolból 40 nM koncentrációjú oldatot kell készíteni 1 μM [^3H]-17 β -ösztradiol törzsoldatból DMSO-ban, úgy, hogy DMSO-t adunk hozzá (200 nM oldatot készítünk), majd szobahőmérsékleten a vizsgálati puffer hozzáadásával elkészítjük a 40 nM koncentrációjú oldatot. Ezzel a 40 nM koncentrációjú oldattal és a vizsgálati pufferrel szobahőmérsékleten el kell készíteni a [^3H]-17 β -ösztradiol 0,313 nM-től 40 nM-ig terjedő oldatsorozatot (a 2. táblázat 12. sávja alapján). A 0,0313 és 4,0 nM közötti végső vizsgálati koncentrációtartományt úgy kapjuk meg, hogy ezekből az oldatokból 10 μl mennyiséget

teszünk egy 96 lyukú mikrotiterlemez megfelelő vizsgálati lyukába (lásd a 2. és 3. táblázatot). A vizsgálati puffer elkészítését, a [³H]-17β-ösztadiol eredeti törzsoldatának az ösztadiol specifikus aktivitásán alapuló kiszámítását, az oldatok elkészítését, valamint a koncentrációértékek meghatározását részletesen ismerteti a CERI protokoll (2).

16. A nem jelölt 17β-ösztadiol oldatait a 17β-ösztadiol 1 nM koncentrációjú törzsoldatából kell elkészíteni vizsgálati puffer hozzáadásával, nyolc növekvő koncentrációból álló, 0,625 μM-tól 80 μM-ig terjedő induló koncentrációsorozatot készítve. A 0,0625 és 8 μM közötti végső vizsgálati koncentrációkat úgy kapjuk meg, hogy ezekből az oldatokból 10 μl mennyiséget elhelyezünk egy 96 lyukú mikrotiterlemez nem specifikus kötődés mérésére szolgáló vizsgálati lyukaiba (lásd a 2. és 3. táblázatot). A nem jelölt 17β-ösztadiol oldatainak elkészítését részletesen ismerteti a CERI protokoll (2).
17. A receptor azon koncentrációját kell alkalmazni, amelyik 40 %-os (± 10 %) specifikus kötődést mutat (lásd a 12–13. pontot). A humán ösztrogénreceptor α oldatot jéghideg vizsgálati pufferrel kell elkészíteni közvetlenül felhasználás előtt, vagyis azt követően, hogy előkészítettük a teljes kötődést és a nem specifikus kötődést mérő, valamint a csak a radioaktív ligandumot tartalmazó lyukakat.
18. A 96 lyukú mikrotiterlemezeket a 2. táblázatban foglaltak szerint készítik el, a [³H]-17β-ösztadiol egyes koncentrációértékeit 3 ismétlésben vizsgálva. A [³H]-17β-ösztadiol, a nem jelölt 17β-ösztadiol, a puffer és a receptor térfogatát a 3. táblázat ismerteti.

2. táblázat: Mikrotiterlemez elrendezése a telítési kötési vizsgálatához

	1.*	2.*	3.*	4.*	5.*	6.*	7.*	8.*	9.*	10	11.**	12.**
	A TB méréséhez			A NSB méréséhez			Csak a radioaktív ligandum meghatározásához				Nem jelölt E2 oldatai a lemez 4–6. oszlopához	[³ H]E2 oldatai a lemez 1–9. oszlopához
A	0,0313 nM [³ H] E ₂ + ER			0,0313 nM [³ H] E ₂ + 0,0625 μM E ₂ + ER			0,0313 nM				0,625 μM	0,313 nM
B	0,0625 nM [³ H] E ₂ + ER			0,0625 nM [³ H] E ₂ + 0,125 μM E ₂ + ER			0,0625 nM				1,25 μM	0,625 nM
C	30,125 nM [³ H] E ₂ + ER			0,125 nM [³ H] E ₂ + 0,25 μM E ₂ + ER			0,125 nM				2,5 μM	1,25 nM
D	0,250 nM [³ H] E ₂ + ER			0,250 nM [³ H] E ₂ + 0,5 μM E ₂ + ER			0,250 nM				5 μM	2,5 nM
E	0,50 nM [H] E ₂ + ER			0,50 nM [³ H] E ₂ + 1 μM E ₂ + ER			0,50 nM				10 μM	5 nM

F	1,00 nM [³ H] E ₂ + ER	1,00 nM [³ H] E ₂ + 2 μM E ₂ + ER	1,00 nM		20 μM	10 nM
G	2,00 nM [³ H] E ₂ + ER	2,00 nM [³ H] E ₂ + 4 μM E ₂ + ER	2,00 nM		40 μM	20 nM
H	4,00 nM [³ H] E ₂ + ER	4,00 nM [³ H] E ₂ + 8 μM E ₂ + ER	4,00 nM		80 μM	40 nM

TB: teljes kötődés

NSB: nem specifikus kötődés

[³H] E₂: [³H]17β-ösztadiol

E₂: nem jelölt 17β-ösztadiol

*A táblázatban feltüntetett koncentrációértékek az egyes lyukakba adagolt végső koncentrációkat jelzik.

**A nem jelölt E₂ és a [³H]E₂ oldatai külön lemezen is elkészíthetők.

3. táblázat: A reagens térfogatértékei a telítési mikrotiterlemezhez

Sáv száma		1	2	3	4	5	6	7.*	8.*	9.*
Előkészítési folyamat lépései		TB lyukak			NSB lyukak		Csak radioaktív			
A fenti reagens lyukak összetevőinek térfogata és hozzáadási sorrendje	Puffer	60 µl			50 µl		90 µl			
	nem jelölt E2 a 2. táblázat 11. sávjából	-			10 µl		-			
	[³ H]E2 a 2. táblázat 12. sávjából	10 µl			10 µl		10 µl			
	hrERα	30 µl			30 µl		-			
Reagens összes térfogata		100 µl			100 µl		100 µl			
Inkubáció		EZT KÖVETŐEN REAGENS KÉT ÓRÁS INKUBÁLÁSA						Radioaktivitás mérése közvetlenül az elkészítés után. Nincs inkubáció.		
Kezelés 0,4 % DCC-vel		Igen			Igen		Nem			
A 0,4 %-os DCC térfogata		100 µl			100 µl		-			
Szűrés		Igen			Igen		Nem			
PERCENKÉNTI BOMLÁS MÉRÉSE										
A szcintillációs folyadékhoz hozzáadott mérendő térfogat		100 µl**			100 µl**		50 µl			

* Amennyiben a percenkénti bomlást mikrolemezekhez való számláló berendezéssel (LSC) méri, akkor a csak a radioaktív ligandumot tartalmazó keverék nem készíthető el a TB és a NSB mérésére használt vizsgálati lemezen. A csak a radioaktív ligandumot tartalmazó keveréket külön lemezen kell elkészíteni.

** Ha a DCC-t centrifugálással különítik el, akkor a lyukak DCC-vel való átszennyezésének elkerülése érdekében az 50 μl felülúszót mikrolemezekhez való számláló berendezéssel kell mérni.

19. A teljes kötődés és a nem specifikus kötődés meghatározásához használt vizsgálati mikrotiterlemezeket két órán keresztül kell inkubálni, szobahőmérsékleten (22 °C és 28 °C között).

A humán ösztrogénreceptor α -hoz kötődött [^3H]-17 β -ösztradiol mérése

20. A két órás inkubációt követően a humán ösztrogénreceptor α -hoz kötődött [^3H]-17 β -ösztradiolt el kell különíteni a szabad [^3H]-17 β -ösztradioltól, ehhez adjunk hozzá 100 μl 0,4 %-os jéghideg DCC szuszpenziót a lyukakhoz. Ezután a lemezeket 10 percre jégre kell helyezni, majd a reakciókeverék és a DCC szuszpenzió mikrotiterlemez szűrőn való átszűrésével el kell távolítani a DCC-t. A leszűrt anyagból 100 μl mennyiséget az LSC számláló berendezés csöveibe töltött szcintillációs folyadékba tesznek, és a folyadék szcintillációs számlálóval csövenként meghatározzák a (dpms-ben mért) percenkénti bomlást.
21. Amennyiben nem áll rendelkezésre mikrolemez szűrő, a DCC eltávolítható centrifugálással is. A humán ösztrogénreceptor α -hoz kötődött [^3H]-17 β -ösztradiolt tartalmazó 50 μl felülúszót különös óvatossággal kell kivenni, nehogy a DCC-hez hozzáérve átszennyezzük a lyukakat, majd szcintillációs számlálást végzünk.
22. A radioaktív ligandumot önmagában használják a vizsgálati lyukakba adagolt [^3H]-17 β -ösztradiol percenkénti bomlásának (dpm) mérésére. A radioaktivitás mértékét közvetlenül az elkészítés után kell számszerűsíteni. Ezeket a lyukakat nem szabad inkubálni és DCC szuszpenzióval kezelni, tartalmukat közvetlenül a szcintillációs folyadékhoz kell adagolni. Ezek a mérőszámok azt jelzik, hogy mennyi dpms-ben kifejezett [^3H]-17 β -ösztradioltadtunk hozzá a teljes kötődést és a nem specifikus kötődést vizsgáló lyukakhoz.

Kompetitív kötési vizsgálat

23. A kompetitív kötési vizsgálat azt méri, hogy egy állandó koncentrációjú [^3H]-17 β -ösztradiol milyen mértékben képes kötődni az adott vizsgálati vegyi anyag növekvő koncentrációja mellett. Egy vizsgálatmeneten belül minden koncentrációt három párhuzamos ismétlésben kell vizsgálni. Emellett minden vizsgálati vegyi anyagot három nem egyidejűleg végzett vizsgálatmenetben kell tesztelni. A vizsgálatot egy vagy több 96 lyukú mikrotiterlemezen kell elvégezni.

Kontrollok

24. A vizsgálat végrehajtása során minden egyes kísérletben párhuzamosan vizsgálni kell az oldószert és a kontrollanyagokat (a referenciaösztrogént, valamint a gyengén kötődő és a nem kötődő anyagot). Minden vizsgálatmenetben ugyanazon a lemezen vizsgálni kell a referenciaösztrogén teljes koncentrációgörbét és a kontrollanyagokat (vagyis a gyengén kötődő és a nem kötődő anyagot). Az összes többi lemeznek tartalmaznia kell i. az E2 és a gyengén kötődő anyag magas (maximális leszorítást, vagyis a radioaktívan jelölt ligandum szinte teljes leszorítását eredményező) és közepes (körülbelül IC_{50} hatást kiváltó) koncentrációját, három ismétlésben; ii. az oldószeres kontrollt és a nem specifikus kötődés mérését, három-három ismétlésben. A vizsgálati puffer, a [^3H]-17 β -ösztradiol, a humán

ösztrogénreceptor α és a vizsgálati vegyi anyag oldatainak elkészítési eljárását részletesen ismerteti a CERI protokoll (2).

Oldószeres kontroll:

25. Az oldószeres kontroll igazolja, hogy az oldószer nem lép kölcsönhatásra a vizsgálati rendszerrel, emellett méri a teljes kötődést (TB). Az ajánlott oldószer a DMSO. Amennyiben a vizsgálati vegyi anyag legmagasabb koncentrációja nem oldható DMSO-ban, akkor alternatívaként etanol is használható. A végső vizsgálati lyukakba adagolt DMSO koncentrációja 2,05 % legyen, ez az érték legfeljebb 2,5 %-ra növelhető abban az esetben, ha a vizsgálati vegyi anyag az eredeti koncentrációban nem oldható. A DMSO 2,5 % fölötti koncentrációkban való használatát kerülni kell, mert az oldószer magasabb koncentrációi befolyásolhatják a vizsgálati eredményeket. A DMSO-ban nem, de etanolban oldódó vizsgálati vegyi anyagok esetében a vizsgálati eredmények befolyásolása nélkül az etanol legfeljebb 2 %-os koncentrációban alkalmazható.

Puffer kontroll:

26. A puffer kontroll (BC) nem tartalmazhatja sem az oldószert, sem a vizsgálati vegyi anyagot, csak a vizsgálat összes többi összetevőjét. A puffer kontroll eredményeit összevetik az oldószeres kontroll eredményeivel annak ellenőrzésére, hogy az alkalmazott oldószer nincs hatással a vizsgálati rendszerre.

Erősen kötődő anyag (referenciaösztrogén)

27. A 17β -ösztradiol (CAS-száma: 50-28-2) az endogén ligandum, és magas affinitással kötődik az ösztrogénreceptor alfa altípusához. Minden humán ösztrogénreceptor α kompetitív kötési vizsgálatához nem jelölt 17β -ösztradiollal el kell készíteni egy standard görbét, amely lehetővé teszi a variabilitás értékelését, ha a laboratóriumon belül egy későbbi időpontban ismét elvégzik a vizsgálatot. A nem jelölt 17β -ösztradiolból nyolc oldatot kell készíteni DMSO-ban és vizsgálati pufferben, a standard görbe létrehozásához a végső koncentrációkat a következő elosztásban kell a vizsgálati lyukakba helyezni: 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , $10^{-8.5}$, 10^{-9} , $10^{-9.5}$, 10^{-10} , 10^{-11} M. A nem jelölt 17β -ösztradiol legmagasabb koncentrációja ($1 \mu\text{M}$) egyben a nem specifikus kötődést is jelzi. Ezt a koncentrációt a 4. táblázatban az „NSB” rövidítés különbözteti meg, bár ez is részét képezi a standard görbének.

Gyengén kötődő anyag

28. A vizsgálatba bele kell foglalni egy gyengén kötődő anyagot (a noretynodrelt (CAS-száma: 68-23-5) vagy alternatívaként a noretindront (CAS-száma: 68-22-4)), hogy igazolja az egyes kísérletek érzékenységét, és lehetővé tegye a variabilitás értékelését, ha a vizsgálat egy későbbi időpontban megismétlik. A gyengén kötődő anyagból nyolc oldatot kell készíteni DMSO-ban és vizsgálati pufferben, az anyagot a vizsgálati lyukakba a következő végső koncentrációkban kell elhelyezni: $10^{-4.5}$, $10^{-5.5}$, 10^{-6} , $10^{-6.5}$, 10^{-7} , $10^{-7.5}$, 10^{-8} és 10^{-9} M.

Nem kötődő anyag

29. Negatív (nem kötődő) kontrollanyagként oktil-trietoxi-szilánt (OTES, CAS-száma: 2943-75-1) kell alkalmazni. Biztosítja azt, hogy a vizsgálat végrehajtása során detektálni lehessen a humán ösztrogénreceptor α -hoz nem kötődő vizsgálati vegyi anyagokat. A nem kötődő anyagból nyolc oldatot kell készíteni DMSO-ban és vizsgálati pufferben, az anyagot a vizsgálati lyukakba a következő végső koncentrációkban kell elhelyezni: 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} M. Alternatív nem kötődő anyagként di-n-butil-ftalát (DBP, CAS-száma: 84-72-2) használható, ezt az anyagot azonban csak 10^{-4} M koncentrációig tesztelték. A DBP-ről kimutatták, hogy a vizsgálat során a maximális oldható koncentrációja a 10^{-4} M.

A humán ösztrogénreceptor α koncentrációja

30. A receptort abban a mennyiségben kell alkalmazni, amelyik 40 %-os (± 10 %) specifikus kötődést vált ki (lásd a 3. függelék 12–13. pontját). A humán ösztrogénreceptor α oldatot közvetlenül használat előtt kell elkészíteni a funkcionális humán ösztrogénreceptor α jéghideg vizsgálati pufferben való hígításával.

[^{3} H]-17 β -ösztradiol

31. A [^{3} H]-17 β -ösztradiolt 0,5 nM végső koncentrációban kell a vizsgálati lyukakba helyezni.

Vizsgálati vegyi anyagok

32. Első lépésként oldhatósági vizsgálatot kell végezni az egyes vizsgálati vegyi anyagok oldhatósági határértékének meghatározására, valamint a vizsgálati protokoll végrehajtása során alkalmazandó megfelelő koncentrációtartomány megállapítására. A vizsgálati vegyi anyagok oldhatósági határértékét először oldószerben kell meghatározni, majd a vizsgálati körülmények mellett meg kell erősíteni. A vizsgálatban tesztelt végső koncentrációjuk nem haladhatja meg az 1 mM-t. A koncentrációtartomány-behatároló vizsgálat magában foglal egy oldószeres kontrollt és a legmagasabb elfogadható koncentrációtól (pl. 1 mM, illetve az oldhatósági határértéktől függően ennél alacsonyabb koncentrációtól) induló, legalább 8 koncentrációból álló logaritmikus hígítási sorozatot, az esetlegesen tapasztalt zavarosságot vagy kicsapódást fel kell jegyezni (lásd még a 3. függelék 35. pontját). Miután meghatározták a vizsgálat során alkalmazandó koncentrációtartományt, a vizsgálati vegyi anyagokat 8 logaritmikus koncentrációban kell tesztelni, a koncentrációtartomány behatárolására szolgáló előzetes vizsgálatban meghatározott eloszlás szerint. A második és a harmadik kísérlet koncentrációértékeit szükség esetén úgy kell kiigazítani, hogy egy jobb koncentráció-válasz görbét adjanak.
33. A vizsgálati vegyi anyag oldatait megfelelő oldószerben kell elkészíteni (lásd a 3. függelék 25. pontját). Amennyiben a vizsgálati vegyi anyag legmagasabb koncentrációja sem DMSO-ban, sem etanolban nem oldható, és a hozzáadott oldószer mennyiségének növelése miatt a végső vizsgálatához használt csőben az oldószer koncentrációja túllépné az elfogadható határértéket, a legmagasabb koncentráció az eggyel alacsonyabb koncentrációra csökkenthető. Ebben az esetben hozzá lehet adni egy további koncentrációértéket a koncentrációsorozat alacsonyabb értékeket tartalmazó végéhez. A sorozat többi koncentrációértékét változtatlanul kell hagyni.

34. A vizsgálati vegyi anyag mikrotiterlemezbe adagolt oldatait figyelemmel kell követni, mivel a vizsgálati vegyi anyag a vizsgálati lyukakba helyezést követően kicsapódhat. A kicsapódást tartalmazó vizsgálati lyukak adatait ki kell zárni a görbeillesztésből, és fel kell jegyezni az adatok kizárásának okát.
35. Amennyiben valamely vizsgálati vegyi anyag $\log(\text{IC}_{50})$ értékére vonatkozólag léteznek más forrásokból származó korábbi adatok, érdemes úgy beállítani a hígítást, hogy geometriailag közelebb (pl. 0,5 log egységnyire) helyezkedjenek el a $\log(\text{IC}_{50})$ várt értéke körül. A végső eredményeknek a $\log(\text{IC}_{50})$ mindkét oldalán kellő távolságban eloszló koncentrációkat kell mutatniuk, beleértve a görbe tetejét és alját, hogy a kötési görbét megfelelően lehessen jellemezni.

Vizsgálati lemez elrendezése

36. A mikrotiterlemezeken fel kell címkézni a hatszoros inkubálásnak alávetett oldószeres kontrollt, a referenciaösztrogén (E2) legmagasabb koncentrációját – amely egyben a nem specifikus kötődés (NSB) mutatója –, a puffer kontrollt, a nem kötődő kontrollanyag (oktil-trietoxi-szilán) nyolc koncentrációját, a referenciaösztrogén (E2) hét alacsonyabb koncentrációját, a gyengén kötődő anyag (noretynodrel vagy noretindron) nyolc koncentrációját és minden egyes vizsgálati vegyi anyag (TC) nyolc koncentrációját. Az alábbi 4. táblázat példát szolgáltat egy olyan lemezelrendezésre, amely biztosítja a referenciaösztrogén és a kontrollanyagok teljes koncentrációgörbéjét. A többi mikrotiterlemez a vizsgálati vegyi anyag mérésére szolgál, emellett tartalmazniuk kell a lemezen belüli ellenőrzésre szolgáló kontrollanyagokat, vagyis i. az E2 és a gyengén kötődő anyag magas (maximális leszorítást eredményező) és közepes (körülbelül IC_{50} hatást kiváltó) koncentrációját, három ismétlésben; ii. az oldószeres kontroll (ami a teljes kötődés mutatója) és a nem specifikus kötődés mérését, hat-hat ismétlésben (lásd az 5. táblázatot). A 3.3. függelék példát szolgáltat arra, hogy milyen lemezelrendezést lehet alkalmazni a kompetitív vizsgálatban három ismeretlen vizsgálati vegyi anyag teszteléséhez. A lemezelrendezési ábrán, valamint a 4. és az 5. táblázatban feltüntetett koncentrációértékek az egyes vizsgálati lyukakba adagolt végső koncentrációkat jelzik. Az E2 maximális koncentrációja 1×10^{-7} M legyen, a gyengén kötődő anyag legmagasabb koncentrációja pedig az 1. lemezen használt legmagasabb koncentráció legyen. Az IC_{50} koncentrációját a laboratóriumnak kell meghatároznia, a kontrollanyagok adatait tartalmazó adatbázisa alapján. Ennek az értéknek közelítenie kell a validálási tanulmányok során nyert értékhez (lásd az 1. táblázatot).

4. táblázat: A kompetitív kötési vizsgálatához használt mikrotiterlemez azon elrendezése^{1,2}, amely biztosítja a referenciaösztrogén és a kontrollanyagok teljes koncentrációgörbéjét (1. lemez)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Puffer kontroll és pozitív kontroll (E2)			Enyhén pozitív (Noretynodrel)			Negatív kontroll (OTES)			TB és NSB		

A	Üres*	1×10^{-9} M	1×10^{-10} M	TB (oldószeres kontroll) (2,05 % DMSO)
B	E2 (1×10^{-11} M)	1×10^{-8} M	1×10^{-9} M	
C	E2 (1×10^{-10} M)	$1 \times 10^{-7,5}$ M	1×10^{-8} M	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	Puffer kontroll
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	Üres (radioaktívhoz)**
H	E2 (1×10^{-7} M)	$1 \times 10^{-4,5}$ M	1×10^{-3} M	

¹ Elrendezési minta minden kísérlethez alkalmazandó mikrotiterlemez standardokhoz.

² Ez a mikrotiterlemez-elrendezés az előző részekben ismertetett standardokhoz alkalmazandó hígítási lemezen készített oldatok alapján készült.

Ebben a példában a gyengén kötődő anyag a noretynodrel (NE).

* ténylegesen üres, nem használt lyuk.

** a lyukat nem használják az inkubáció alatt, de használják a teljes hozzáadott radioaktivitás ellenőrzésére.

5. táblázat: A kompetitív kötési vizsgálathoz használt mikrotiterlemez elrendezése, a vizsgálati vegyi anyagokhoz (TC) és a lemezen belüli ellenőrzésre szolgáló kontrollanyagokhoz használt további lemezekhez

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	1. vizsgálati vegyi anyag (TC-1)			2. vizsgálati vegyi anyag (TC-2)			3. vizsgálati vegyi anyag (TC-3)			Kontrollok		
<i>A</i>	TC-1 (1×10 ⁻¹⁰ M)			TC-2 (1×10 ⁻¹⁰ M)			TC-3 (1×10 ⁻¹⁰ M)			E2 (1×10 ⁻⁷ M)		
<i>B</i>	TC-1 (1×10 ⁻⁹ M)			TC-2 (1×10 ⁻⁹ M)			TC-3 (1×10 ⁻⁹ M)			E ₂ (IC ₅₀)		
<i>C</i>	TC-1 (1×10 ⁻⁸ M)			TC-2 (1×10 ⁻⁸ M)			TC-3 (1×10 ⁻⁸ M)			NE (1×10 ^{-4,5} M)		
<i>D</i>	TC-1 (1×10 ⁻⁷ M)			TC-2 (1×10 ⁻⁷ M)			TC-3 (1×10 ⁻⁷ M)			NE (IC ₅₀)		
<i>E</i>	TC-1 (1×10 ⁻⁶ M)			TC-2 (1×10 ⁻⁶ M)			TC-3 (1×10 ⁻⁶ M)			NSB (10 ⁻⁶ M E2)		
<i>F</i>	TC-1 (1×10 ⁻⁵ M)			TC-2 (1×10 ⁻⁵ M)			TC-3 (1×10 ⁻⁵ M)					
<i>G</i>	TC-1 (1×10 ⁻⁴ M)			TC-2 (1×10 ⁻⁴ M)			TC-3 (1×10 ⁻⁴ M)			TB (Oldószeres kontroll)		
<i>H</i>	TC-1 (1×10 ⁻³ M)			TC-2 (1×10 ⁻³ M)			TC-3 (1×10 ⁻³ M)					

Ebben a példában a gyengén kötődő anyag a noretynodrel (NE).

A kompetitív kötési vizsgálat elvégzése

37. A 6. táblázatban szereplő teljes kötődést vizsgáló és üres (radioaktívhoz) lyukak kivételével minden lyukba 50 µl vizsgálati puffert kell adagolni, amelyet össze kell keverni 10 µl oldószerrel vagy referenciaösztrogénnel (E2), gyengén kötődő anyaggal, nem kötődő anyaggal, vizsgálati vegyi anyagokkal, majd 10 µl 5 nM koncentrációjú [³H]-17β-ösztradiol oldattal. Ezt követően minden egyes lemezhez 30 µl jéghideg receptoroldatot kell adni, és a keveréket óvatosan össze kell keverni. Utolsó reagensként a humán ösztrogénreceptor α oldatot kell hozzáadni. A vizsgálati mikrotiterlemezeket két órán keresztül kell inkubálni, szobahőmérsékleten (22 °C és 28 °C között).

6. táblázat: A humán ösztrogénreceptor kompetitív kötési vizsgálat mikrotiterlemezeire helyezett vizsgálati összetevők térfogata

<i>A sávok előkészítésének lépései</i>		Nem TB lyukak	TB lyukak	Üres (radioaktívhoz)
A fenti reagens lyukak összetevőinek térfogata és hozzáadási sorrendje	Szobahőmérsékletű vizsgálati puffer	50 µl	60 µl	90 µl
	Nem jelölt E2, gyengén kötődő anyag, nem kötődő anyag, oldószer és vizsgálati vegyi anyagok*	10 µl	-	-
	[³ H]-17β-ösztradiol a végső, 0.5 nM (vagyis 5 nM) koncentráció biztosításához	10 µl	10 µl	10 µl
	rERα a meghatározott koncentrációban (lásd a 12–13. pontot)	30 µl	30 µl	-
Teljes térfogat az egyes vizsgálati lyukakban		100 µl	100 µl	100 µl

*megfelelően előkészítve ahhoz, hogy az oldószer elfogadható koncentrációján belül elő lehessen állítani a végső koncentrációt.

38. Ezt követően a 3. függelék 21–23. pontjában a telítési kötési vizsgálatnál ismertetett módon minden lyukhoz hozzáadnak 100 µl jéghideg DCC szuszpenziót, hogy elkülönítsék a humán ösztrogénreceptor α-hoz kötődött [³H]-17β-ösztradiolt a szabad [³H]-17β-ösztradioltól, majd megméri a humán ösztrogénreceptor α-hoz kötődött [³H]-17β-ösztradiolok mennyiségét.

39. A G10–12 és H10–12 lyukakban (amelyeket a 4. táblázat üres (radioaktívhoz) címen jelöl) méri a 10 µl mennyiségű [³H] jelölt ösztradiol percenkénti bomlását. A 10 µl-nek megfelelő mennyiséget közvetlenül a szcintillációs folyadékhoz kell adni.

Elfogadhatósági kritériumok

Telítési kötési vizsgálat

40. A specifikus kötődési görbének a [³H]-17β-ösztradiol fokozódó koncentrációban való alkalmazása miatt egy platóban kell végződnie, ami jelzi a humán ösztrogénreceptor α ligandummal való telítettségét.

41. A [³H]-17β-ösztradiol 0,5 nM koncentrációjánál megfigyelt specifikus kötődésnek a minden vizsgálatmenetben hozzáadott teljes radioaktivitás mért átlagának 30–50 %-os elfogadhatósági tartományán belül kell maradnia. E tartománytól való esetenkénti kis

mértékű elérés még elfogadható, de ha a vizsgálatmenetek eredménye következetesen kívül esik ezen a tartományon, illetve ha egy adott vizsgálatmenet eredménye jelentősen eltér tőle, akkor ki kell igazítani a fehérjekoncentrációt és meg kell ismételni a telítési vizsgálatot.

42. Az adatoknak egy lineáris Scatchard-plotot kell alkotniuk.

43. A nem specifikus kötődés nem lehet túlzott mértékű. A nem specifikus kötődés értéke jellemzően nem érheti el a teljes kötődés 35 %-át. Ugyanakkor a nem specifikus kötődés aránya esetenként meghaladhatja ezt a határértéket, ha a radioaktívan jelölt 17 β -ösztradiol legalacsonyabb vizsgált koncentrációjánál nagyon alacsony percenkénti bomlást mérnek.

Kompetitív kötési vizsgálat

44. A nem jelölt 17 β -ösztradiol növekvő koncentrációban leszorítja a [^3H]-17 β -ösztradiolt a receptorról, és ez összhangban van az egy kötőhelyes kompetitív kötéssel.

45. A referenciaösztrógen (vagyis a 17 β -ösztradiol) IC₅₀ és K_d értékének nagyjából egyenlőnek kell lennie a [^3H]-17 β -ösztradiol moláris koncentrációjával; a disszociációs állandót a telítési kötési vizsgálatban határozzák meg.

46. A teljes specifikus kötődésnek rendre a 40 $\pm$ 10 %-os elfogadhatósági tartományon belül kell maradnia, ha a vizsgálatmenetekben az egyes lyukakhoz hozzáadott összes radioaktívan jelölt anyag átlagos mért koncentrációja 0,5 nM volt. E tartománytól való esetenkénti kis mértékű elérés még elfogadható, de ha a vizsgálatmenetek eredménye következetesen kívül esik ezen a tartományon, illetve ha egy adott vizsgálatmenet eredménye jelentősen eltér ettől, akkor ki kell igazítani a fehérjekoncentrációt.

47. Az oldószer nem módosíthatja a vizsgálat érzékenységet vagy megismételhetőségét. Az oldószeres kontroll (Tb-ként jelölve) eredményeit összevetik a puffer kontroll eredményeivel annak ellenőrzésére, hogy az alkalmazott oldószer nincs hatással a vizsgálati rendszerre. Amennyiben a TB kontroll és a puffer kontroll hasonló eredményre vezet, akkor az oldószer nem befolyásolja a vizsgálatot.

48. A nem kötődő anyag maximális 10⁻³ M (OTES) vagy 10⁻⁴ M (DBP) koncentrációnál legfeljebb 25 % [^3H]-17 β -ösztradiolt szoríthat le a humán ösztrogénreceptor α -ról.

49. A CERI humán ösztrogénreceptor-kötési vizsgálat validálási tanulmányából származó adatok alapján a referenciaösztrógenre és két gyengén kötődő anyagra (pl. noretynodrel, noretindron) vonatkozó teljesítménykritériumokat dolgoztak ki (2. referencia N. függeléke). A validálási tanulmányban részt vevő négy laboratórium 95 %-os konfidenciaintervallumot adott meg az átlag $\pm$ SD (n) értékéhez minden kontroll vizsgálatmenetben. 95 %-os konfidenciaintervallumot határoztak meg a görbeillesztési paraméterekre (vagyis a görbe tetejére, aljára, a Hill-meredekségre és a Log IC₅₀-re), a referenciaösztrógenre és a gyengén kötődő anyagokra, valamint a gyengén kötődő anyagok referenciaösztrógenhez viszonyított Log₁₀RBA értékére vonatkozólag. Az 1. táblázat

ismerteti a görbeillesztési paraméterek várt tartományait, amelyek használhatók teljesítménykritériumként. A gyakorlatban az IC_{50} tartománya a receptor preparátum kísérleti úton meghatározott K_d értékétől és a ligandum vizsgálatban használt koncentrációjától függően kissé változó lehet.

50. A potenciális vizsgálati vegyi anyagok széles skálája, valamint potenciális affinitásuk és az eredmények (pl. teljes görbe, részleges görbe, nem illeszthető görbe) változatossága miatt a vizsgálati vegyi anyagok görbeillesztési paramétereire nézve nem dolgoztak ki teljesítménykritériumokat. Egy adott vizsgálati vegyi anyag egyes vizsgálatmeneteiből származó eredmények értékelése során azonban szakmai megítélés alapján kell dönteni. A vizsgálati vegyi anyag megfelelő koncentrációtartományát kell használni ahhoz, hogy egyértelműen meg lehessen határozni a kompetitív görbe (pl. 90–100 %-os kötődést jelző) platóját. A vizsgálati vegyi anyag különböző koncentrációin történő ismétlések eltérései közötti és a három független vizsgálatmenet közötti variabilitásnak észszerű mértéken belül kell maradnia és tudományosan védhetőnek kell lennie. Egy adott vizsgálati vegyi anyag minden vizsgálatmenetében elvégzett kontrollok eredményeinek meg kell közelíteniük a CERi vizsgálat teljesítménymutatóit, és összhangban kell lenniük minden releváns laboratórium történeti kontrolladataival.

AZ ADATOK ELEMZÉSE

Telítési kötési vizsgálat

51. Mérti kell mind a teljes, mind a nem specifikus kötődést. Ezen értékek alapján számolható ki a $[^3H]$ -17 β -ösztadiol növekvő koncentrációin létrejött egyensúlyi állapotokban kiváltott specifikus kötődés úgy, hogy a teljes kötődésből kivonják a nem specifikus kötődést. A specifikus kötődés és a $[^3H]$ -17 β -ösztadiol koncentrációi közötti függvényt ábrázoló grafikonon a maximális specifikus kötődésre jellemző platóban végződik, amely azt az állapotot jelzi, amikor a humán ösztrogénreceptor α telítődött $[^3H]$ -17 β -ösztadiollal. Emellett az adatok elemzése dokumentálja, hogy a $[^3H]$ -17 β -ösztadiol egyetlen, nagy affinitású kötőhelyhez kapcsolódik. A nem specifikus, a teljes és a specifikus kötődést egy telítési kötési görbén kell ábrázolni. Az adatokat a továbbiakban nem-lineáris regressziós analízissel kell elemezni (pl. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995), végül pedig egy Scatchard-plot grafikonon ábrázolni.
52. Az adatelemzés során kizárólag a teljes kötődési adatok alapján meg kell határozni a B_{max} és a K_d értékét, feltételezve, hogy a nem specifikus kötődés lineáris, más módszer alkalmazását indokolni kell. A legjobban illeszkedő görbét pedig robusztus regresszióval kell meghatározni, az ettől való eltérést indokolni kell. A robusztus regresszió alkalmazásának módszerét meg kell adni. Abban az esetben, ha a B_{max} és a K_d értékét a telítési kötési adatok alapján határozzák meg, mindig korrigálni kell a ligandum koncentrációjának csökkenését (például a Swillens, 1995 által leírt módszerrel).

Kompetitív kötési vizsgálat

53. A kompetitív kötési görbe a [^3H]-17 β -ösztadiol specifikus kötődésének és a kompetitor ($\log_{10}$ egységekben feltüntetett) koncentrációjának összefüggését ábrázolja. A vizsgálati vegyi anyag azon koncentrációja, amely meggátolja a [^3H]-17 β -ösztadiol maximális specifikus kötődésének 50 %-át, az IC_{50} érték.
54. A pozitív kontrollanyagok (pl. a referenciaösztrogén és a gyengén kötődő anyag) becsült $\log(\text{IC}_{50})$ értékének meghatározásához egy megfelelő nem-lineáris görbeillesztő szoftvert kell használni, amely illeszteni tudja egy négyparaméteres Hill-egyenlet görbét (pl. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). A görbék illesztése során a görbe tetejét, alját, meredekségét jelző értékeket és a $\log(\text{IC}_{50})$ értékét általában szabadon ábrázolják. A legjobban illeszkedő görbét robusztus regresszióval kell meghatározni, az ettől való eltérést indokolni kell. A ligandum csökkenését nem kell korrigálni. A kezdeti analízist követően minden kötési görbét ellenőrizni kell, hogy megfelelően illeszkedik-e a modellre. A gyengén kötődő anyag relatív kötési affinitását a gyengén kötődő anyag $\log(\text{IC}_{50})$ értékének a 17 β -ösztadiol $\log(\text{IC}_{50})$ értékéhez viszonyított arányaként kell meghatározni. A pozitív kontrollok és a nem kötődő kontroll eredményeit a vizsgálat e 3. függelék 44–49. pontjában ismertetett teljesítménymutatói alapján kell értékelni.
55. Az összes vizsgálati vegyi anyag adatait lépésenként kell elemezni, biztosítva ezáltal az adatok megfelelő elemzését és a kompetitív kötési görbék helyes osztályozását. Javasolt vizsgálati anyagokként minden vizsgálat megkezdésekor egy szabványosított adatelemzést végezni, amely megegyezik a referenciaösztrogén és a gyengén kötődő anyag kontrolljainál alkalmazott analízissel (lásd e 3. függelék 54. pontját). Az adatelemzés végeztével technikailag ellenőrizni kell a görbeillesztési paramétereket, valamint vizuálisan is ellenőrizni kell, hogy az adatok mennyire illeszkednek az egyes vizsgálatmenetek kompetitív kötési görbéjéhez. Amennyiben a technikai ellenőrzés során megfigyelhető a specifikusan kötődő [^3H]-17 β -ösztadiol arányának koncentrációfüggő csökkenése, a vizsgálati vegyi anyagok egyes koncentrációit tartalmazó ismétlések közötti csekély eltérés és a három vizsgálatmenet görbeillesztési paramétereinek következetessége jó indikátorai annak, hogy a vizsgálatot és az adatelemzést megfelelően hajtották végre.

Az adatok értelmezése

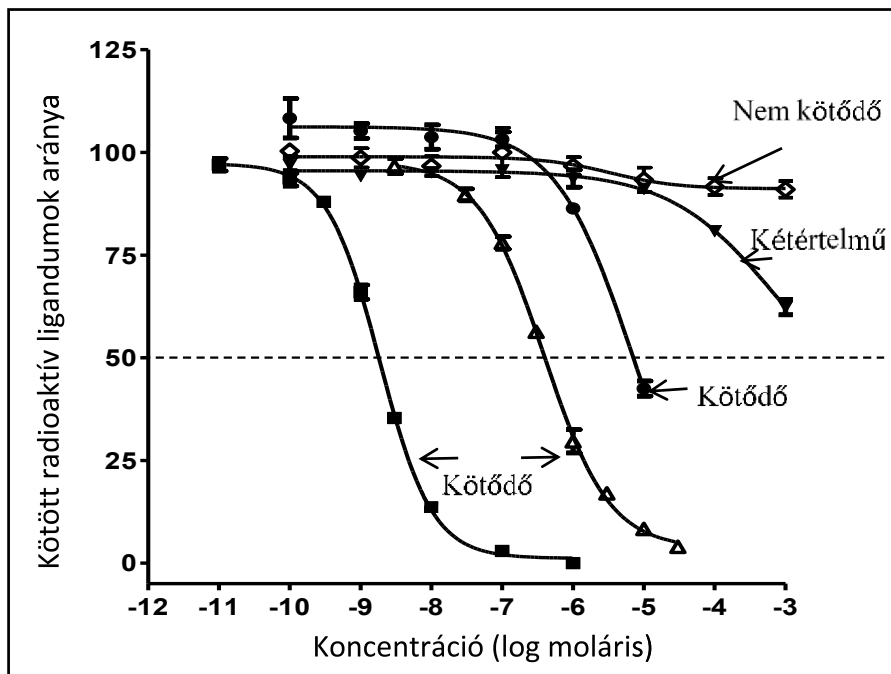
56. Amennyiben valamennyi elfogadhatósági kritérium teljesül, a vizsgálati vegyi anyag humán ösztrogénreceptor α -hoz kötődő anyagnak minősül, ha az adatokra illeszthető kötési görbe, és a válaszgörbe legalsó pontja az adattartomány 50 %-a alatt helyezkedik el (1. ábra).
57. Amennyiben valamennyi elfogadhatósági kritérium teljesül, valamely vizsgálati vegyi anyag akkor tekinthető humán ösztrogénreceptor α -hoz nem kötődő anyagnak, ha:
- az adataira illeszthető kötési görbe, és az adatokra illesztett válaszgörbe legalsó pontja az adattartomány 75 %-a felett helyezkedik el, vagy
 - az adataira nem illeszthető kötési görbe, és az adatok koncentrációcsoportjai közül a legalsó simítatlan átlagos kötési arány 75 % felett helyezkedik el.

58. A vizsgálati vegyi anyag válasza akkor minősül kétértelműnek, ha a fenti feltételek egyike sem teljesül (vagyis az adatokra illesztett válaszgörbe legalsó pontja 76 és 51 % között helyezkedik el).

7. táblázat: A vizsgálati vegyi anyagok kompetitív kötési görbén alapuló osztályba sorolásának kritériumai

Besorolás	Kritériumok
Kötődő ^a	Az adatokra illeszthető kötési görbe. • A válaszgörbe legalsó pontja az adattartomány 50 %-a alatt helyezkedik el.
Nem kötődő ^b	Ha az adatokra illeszthető kötési görbe, • az adattartományra illesztett válaszgörbe legalsó pontja 75%-a felett helyezkedik el. Ha az adatokra nem illeszthető kötési görbe, • az adatok koncentrációcsoportjai közül a legalsó simítatlan átlagos kötési arány 75 % felett helyezkedik el.
Kétértelmű ^c	Bármely vizsgálatmenet, amelynek eredménye sem a kötődő, sem a nem kötődő kategóriába nem sorolható (pl. az adatokra illesztett válaszgörbe legalsó pontja 76 és 51 % között helyezkedik el).

1. ábra: Példák a vizsgálati vegyi anyagok kompetitív kötési görbén alapuló osztályba sorolására.



59. A vizsgálati vegyi anyag egy laboratóriumon belül elvégzett több vizsgálatmenetének eredményét összesítik úgy, hogy egy számértéket társítanak minden vizsgálatmenethez,

majd meghatározzák a vizsgálatmenetek átlagát (lásd a 8. táblázatot). A laboratórium vizsgálatmeneteinek összesített eredményét azután összevetik az egyes vizsgálati vegyi anyagok várt besorolásával.

8. táblázat: Az egy laboratóriumon belül több vizsgálatmenetben vizsgálati vegyi anyagok osztályba sorolásának módszere

Számérték társítása az egyes vizsgálatmenetekhez:	
Besorolás	Számérték
Kötődő	2
Kétértelmű	1
Nem kötődő	0
Besorolás a vizsgálatmenetek átlagos számértéke alapján:	
Besorolás	Számérték
Kötődő	$\text{Átlag} \geq 1,5$
Kétértelmű	$0,5 \leq \text{Átlag} < 1,5$
Nem kötődő	$\text{Átlag} < 0,5$

VIZSGÁLATI JELENTÉS

60. Lásd a vizsgálati módszer „A humán ÖSZTROGÉNRECEPTOR-KÖTÉSI VIZSGÁLAT ÖSSZETEVŐI” részének 24. pontját.

3.1. függelék

SZAKKIFEJEZÉSEK LISTÁJA

[³H]E2: radioaktív tríciummal jelölt 17 β -ösztradiol.

DCC: dextránbevonatú aktívszén.

E2: nem jelölt 17 β -ösztradiol (semleges).

Vizsgálati puffer: 10 mM trisz-HCl (pH-értéke 7,4), amely a következőket tartalmazza: 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaVO₃, 10 % glicerin, 0,2 mM leupeptin, 1 mM ditiotritol és 10 mg/ml szarvasmarha szérum albumin.

hrER α : humán rekombináns ösztrogénreceptor alfa (ligandumkötő domén).

Ismétlés: egyike azon lyukaknak, amelyek azonos mintát tartalmaznak azonos koncentrációban, és vizsgálatuk egy adott vizsgálatmeneten belül, párhuzamosan zajlik. E protokoll keretén belül a vizsgálati vegyi anyagok minden koncentrációját három ismétlésben tesztelik; vagyis a vizsgálati vegyi anyagok minden koncentrációját egyidejűleg három ismétlésben vizsgálják.

Vizsgálatmenet: párhuzamosan vizsgált mikrotiterlemez minden mintája, amely minden szükséges információt biztosít a vizsgálati vegyi anyagok humán ösztrogénreceptor α -hoz való kötődésének jellemzéséhez (nevezetesen a vizsgálati lyukba adagolt összes [³H]-17 β -ösztradiol, a [³H]-17 β -ösztradiol maximális kötődése a hrER α -hoz, nem specifikus kötődés és a vizsgálati vegyi anyagok különböző koncentrációi által előidézett teljes kötődés). Egy vizsgálatmenet állhat koncentrációnként egyetlen vizsgálati lyukból is (vagyis egy ismétlésből), mivel azonban ez a protokoll három ismétlésben való tesztelést ír elő, egy vizsgálatmenet koncentrációnként három vizsgálati lyukat foglal magában. Emellett a protokoll meghatározza azt is, hogy vegyi anyagonként három független (azaz nem egyidejűleg lefolytatott) vizsgálatmenetre van szükség.

3.2. függelék

MINTÁK ELRENDEZÉSE A KOMPETITÍV KÖTÉSI VIZSGÁLATHOZ

Lemez	Pozíció	Ismétlés	Lyuk típusa	Lyuk kódja	Koncentráció kódja	Kompetitor indukáló koncentrációja (M)	hrER törzs (μl)	Puffer térfogata (μl)	Nyomjelző (radioaktív E2) térfogata (μL)	Hígítási lemezről adagolt térfogat (μL)	Végző térfogat (μl)	Kompetitor végző koncentrációja (M)
Sz	A1	1	Üres	BK	BK1	–	–	–	–	–	–	–
Sz	A2	2	Üres	BK	BK2	–	–	–	–	–	–	–
Sz	A3	3	Üres	BK	BK3	–	–	–	–	–	–	–
Sz	B1	1	nem jelölt E2	Sz	S1	1,00 E ⁻¹⁰	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻¹¹
Sz	B2	2	nem jelölt E2	Sz	S1	1,00 E ⁻¹⁰	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻¹¹
Sz	B3	3	nem jelölt E2	Sz	S1	1,00 E ⁻¹⁰	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻¹¹
Sz	C1	1	nem jelölt E2	Sz	S2	1,00 E ⁻⁰⁹	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻¹⁰
Sz	C2	2	nem jelölt E2	Sz	S2	1,00 E ⁻⁰⁹	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻¹⁰
Sz	C3	3	nem jelölt E2	Sz	S2	1,00 E ⁻⁰⁹	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻¹⁰
Sz	D1	1	nem jelölt E2	Sz	S3	3,16 E ⁻⁰⁹	30	50	10	10	100	3,2 E ⁻¹⁰
Sz	D2	2	nem jelölt E2	Sz	S3	3,16 E ⁻⁰⁹	30	50	10	10	100	3,2 E ⁻¹⁰
Sz	D3	3	nem jelölt E2	Sz	S3	3,16 E ⁻⁰⁹	30	50	10	10	100	3,2 E ⁻¹⁰
Sz	E1	1	nem jelölt E2	Sz	S4	1,00 E ⁻⁰⁸	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁹
Sz	E2	2	nem jelölt E2	Sz	S4	1,00 E ⁻⁰⁸	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁹
Sz	E3	3	nem jelölt E2	Sz	S4	1,00 E ⁻⁰⁸	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁹
Sz	F1	1	nem jelölt E2	Sz	S5	3,16 E ⁻⁰⁸	30	50	10	10	100	3,2 E ⁻⁰⁹
Sz	F2	2	nem jelölt E2	Sz	S5	3,16 E ⁻⁰⁸	30	50	10	10	100	3,2 E ⁻⁰⁹
Sz	F3	3	nem jelölt E2	Sz	S5	3,16 E ⁻⁰⁸	30	50	10	10	100	3,2 E ⁻⁰⁹
Sz	G1	1	nem jelölt E2	Sz	S6	1,00 E ⁻⁰⁷	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁸
Sz	G2	2	nem jelölt E2	Sz	S6	1,00 E ⁻⁰⁷	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁸
Sz	G3	3	nem jelölt E2	Sz	S6	1,00 E ⁻⁰⁷	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁸
Sz	H1	1	nem jelölt E2	Sz	S7	1,00 E ⁻⁰⁶	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁷
Sz	H2	2	nem jelölt E2	Sz	S7	1,00 E ⁻⁰⁶	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁷
Sz	H3	3	nem jelölt E2	Sz	S7	1,00 E ⁻⁰⁶	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁷
Sz	A4	1	noretynodrel	NE	WP1	1,00 E ⁻⁰⁸	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁹
Sz	A5	2	noretynodrel	NE	WP1	1,00 E ⁻⁰⁸	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁹
Sz	A6	3	noretynodrel	NE	WP1	1,00 E ⁻⁰⁸	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁹
Sz	B4	1	noretynodrel	NE	WP2	1,00 E ⁻⁰⁷	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁸
Sz	B5	2	noretynodrel	NE	WP2	1,00 E ⁻⁰⁷	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁸
Sz	B6	3	noretynodrel	NE	WP2	1,00 E ⁻⁰⁷	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁸
Sz	C4	1	noretynodrel	NE	WP3	3,16 E ⁻⁰⁷	30	50	10	10	100	3,2 E ⁻⁰⁸
Sz	C5	2	noretynodrel	NE	WP3	3,16 E ⁻⁰⁷	30	50	10	10	100	3,2 E ⁻⁰⁸
Sz	C6	3	noretynodrel	NE	WP3	3,16 E ⁻⁰⁷	30	50	10	10	100	3,2 E ⁻⁰⁸
Sz	D4	1	noretynodrel	NE	WP4	1,00 E ⁻⁰⁶	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁷
Sz	D5	2	noretynodrel	NE	WP4	1,00 E ⁻⁰⁶	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁷
Sz	D6	3	noretynodrel	NE	WP4	1,00 E ⁻⁰⁶	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁷
Sz	E4	1	noretynodrel	NE	WP5	3,16 E ⁻⁰⁶	30	50	10	10	100	3,2 E ⁻⁰⁷
Sz	E5	2	noretynodrel	NE	WP5	3,16 E ⁻⁰⁶	30	50	10	10	100	3,2 E ⁻⁰⁷
Sz	E6	3	noretynodrel	NE	WP5	3,16 E ⁻⁰⁶	30	50	10	10	100	3,2 E ⁻⁰⁷
Sz	F4	1	noretynodrel	NE	WP6	1,00 E ⁻⁰⁵	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁶
Sz	F5	2	noretynodrel	NE	WP6	1,00 E ⁻⁰⁵	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁶
Sz	F6	3	noretynodrel	NE	WP6	1,00 E ⁻⁰⁵	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁶
Sz	G4	1	noretynodrel	NE	WP7	3,16 E ⁻⁰⁵	30	50	10	10	100	3,2 E ⁻⁰⁶
Sz	G5	2	noretynodrel	NE	WP7	3,16 E ⁻⁰⁵	30	50	10	10	100	3,2 E ⁻⁰⁶
Sz	G6	3	noretynodrel	NE	WP7	3,16 E ⁻⁰⁵	30	50	10	10	100	3,2 E ⁻⁰⁶

Minták elrendezése a kompetitív kötési vizsgálathoz

Lemez	Pozíció	Ismétlés	Lyuk típusa	Lyuk kódja	Koncentráció kódja	Kompetitor induló koncentrációja (M)	hrER törzs (μl)	Puffer térfogata (μl)	Nyomjelző (radioaktív E2) térfogata (μL)	Hígítási lemezről adagolt térfogat (μL)	Végő térfogat (μl)	Kompetitor végő koncentrációja (M)
Sz	H4	1	noretynodrel	NE	WP8	3,16 E ⁻⁰⁴	30	50	10	10	100	3,2 E ⁻⁰⁵
Sz	H5	2	noretynodrel	NE	WP8	3,16 E ⁻⁰⁴	30	50	10	10	100	3,2 E ⁻⁰⁵
Sz	H6	3	noretynodrel	NE	WP8	3,16 E ⁻⁰⁴	30	50	10	10	100	3,2 E ⁻⁰⁵
Sz	A7	1	OTES	N	OTES1	1,00 E ⁻⁰⁹	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻¹⁰
Sz	A8	2	OTES	N	OTES1	1,00 E ⁻⁰⁹	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻¹⁰
Sz	A9	3	OTES	N	OTES1	1,00 E ⁻⁰⁹	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻¹⁰
Sz	B7	1	OTES	N	OTES2	1,00 E ⁻⁰⁸	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁹
Sz	B8	2	OTES	N	OTES2	1,00 E ⁻⁰⁸	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁹
Sz	B9	3	OTES	N	OTES2	1,00 E ⁻⁰⁸	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁹
Sz	C7	1	OTES	N	OTES3	1,00 E ⁻⁰⁷	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁸
Sz	C8	2	OTES	N	OTES3	1,00 E ⁻⁰⁷	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁸
Sz	C9	3	OTES	N	OTES3	1,00 E ⁻⁰⁷	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁸
Sz	D7	1	OTES	N	OTES4	1,00 E ⁻⁰⁶	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁷
Sz	D8	2	OTES	N	OTES4	1,00 E ⁻⁰⁶	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁷
Sz	D9	3	OTES	N	OTES4	1,00 E ⁻⁰⁶	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁷
Sz	E7	1	OTES	N	OTES5	1,00 E ⁻⁰⁵	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁶
Sz	E8	2	OTES	N	OTES5	1,00 E ⁻⁰⁵	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁶
Sz	E9	3	OTES	N	OTES5	1,00 E ⁻⁰⁵	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁶
Sz	F7	1	OTES	N	OTES6	1,00 E ⁻⁰⁴	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁵
Sz	F8	2	OTES	N	OTES6	1,00 E ⁻⁰⁴	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁵
Sz	F9	3	OTES	N	OTES6	1,00 E ⁻⁰⁴	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁵
Sz	G7	1	OTES	N	OTES7	1,00 E ⁻⁰³	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁴
Sz	G8	2	OTES	N	OTES7	1,00 E ⁻⁰³	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁴
Sz	G9	3	OTES	N	OTES7	1,00 E ⁻⁰³	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁴
Sz	H7	1	OTES	N	OTES8DBP7	1,00 E ⁻⁰²	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰³
Sz	H8	2	OTES	N	OTES88	1,00 E ⁻⁰²	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰³
Sz	H9	3	OTES	N	OTES8	1,00 E ⁻⁰²	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰³
Sz	A10	1	teljes kötődés	TB	TB1	-	30	60	10	-	100	-
Sz	A11	2	teljes kötődés	TB	TB2	-	30	60	10	-	100	-
Sz	A12	3	teljes kötődés	TB	TB3	-	30	60	10	-	100	-
Sz	B10	4	teljes kötődés	TB	TB4	-	30	60	10	-	100	-
Sz	B11	5	teljes kötődés	TB	TB5	-	30	60	10	-	100	-
Sz	B12	6	teljes kötődés	TB	TB6	-	30	60	10	-	100	-
Sz	C10	1	nem jelölt E2	NSB	S1	1,00 E ⁻⁰⁵	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁶
Sz	C11	2	nem jelölt E2	NSB	S2	1,00 E ⁻⁰⁵	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁶
Sz	C12	3	nem jelölt E2	NSB	S3	1,00 E ⁻⁰⁵	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁶
Sz	D10	4	nem jelölt E2	NSB	S4	1,00 E ⁻⁰⁵	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁶
Sz	D11	5	nem jelölt E2	NSB	S5	1,00 E ⁻⁰⁵	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁶
Sz	D12	6	nem jelölt E2	NSB	S6	1,00 E ⁻⁰⁵	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁶
Sz	E10	1	Puffer kontroll	BC	BC1	-	-	100	-	-	100	-
Sz	E11	2	Puffer kontroll	BC	BC2	-	-	100	-	-	100	-
Sz	E12	3	Puffer kontroll	BC	BC3	-	-	100	-	-	100	-
Sz	F10	4	Puffer kontroll	BC	BC4	-	-	100	-	-	100	-
Sz	F11	5	Puffer kontroll	BC	BC5	-	-	100	-	-	100	-
Sz	F12	6	Puffer kontroll	BC	BC6	-	-	100	-	-	100	-
Sz	G10*	1	Üres	Radioaktív	H1	-	90	-	10	-	100	-
Sz	G11*	2	Üres	Radioaktív	H2	-	90	-	10	-	100	-
Sz	G12*	3	Üres	Radioaktív	H3	-	90	-	10	-	100	-
Sz	H10*	4	Üres	Radioaktív	H4	-	90	-	10	-	100	-
Sz	H11*	5	Üres(radioaktívhoz)	Radioaktív	H5	-	90	-	10	-	100	-
Sz	H12	6	Üres(radioaktívhoz)	Radioaktív	H6	-	90	-	10	-	100	-

*: A „radioaktív” kifejezéssel jelölt lyukak az inkubálás alatt üresek. A 10 μl-t kizárólag a szcintillációs számlálás céljából adják hozzá a lyukakhoz.

Minták elrendezése a kompetitív kötési vizsgálathoz

Lemez	Pozíció	Ismétlés	Lyuk típusa	Lyuk kódja	Koncentráció kódja	Kompetitor induló koncentrációja (M)	hrER törzs (μl)	Puffer térfogata (μl)	Nyomjelző (radioaktív E2) térfogata (μL)	Hígítási lemezről adagolt térfogat (μL)	Végő térfogat (μl)	Kompetitor végső koncentrációja (M)
P1	A1	1	1. ismeretlen	U1	1	1,00 E ⁻⁰⁹	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻¹⁰
P1	A2	2	1. ismeretlen	U1	1	1,00 E ⁻⁰⁹	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻¹⁰
P1	A3	3	1. ismeretlen	U1	1	1,00 E ⁻⁰⁹	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻¹⁰
P1	B1	1	1. ismeretlen	U1	2	1,00 E ⁻⁰⁸	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁹
P1	B2	2	1. ismeretlen	U1	2	1,00 E ⁻⁰⁸	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁹
P1	B3	3	1. ismeretlen	U1	2	1,00 E ⁻⁰⁸	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁹
P1	C1	1	1. ismeretlen	U1	3	1,00 E ⁻⁰⁷	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁸
P1	C2	2	1. ismeretlen	U1	3	1,00 E ⁻⁰⁷	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁸
P1	C3	3	1. ismeretlen	U1	3	1,00 E ⁻⁰⁷	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁸
P1	D1	1	1. ismeretlen	U1	4	1,00 E ⁻⁰⁶	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁷
P1	D2	2	1. ismeretlen	U1	4	1,00 E ⁻⁰⁶	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁷
P1	D3	3	1. ismeretlen	U1	4	1,00 E ⁻⁰⁶	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁷
P1	E1	1	1. ismeretlen	U1	5	1,00 E ⁻⁰⁵	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁶
P1	E2	2	1. ismeretlen	U1	5	1,00 E ⁻⁰⁵	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁶
P1	E3	3	1. ismeretlen	U1	5	1,00 E ⁻⁰⁵	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁶
P1	F1	1	1. ismeretlen	U1	6	1,00 E ⁻⁰⁴	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁵
P1	F2	2	1. ismeretlen	U1	6	1,00 E ⁻⁰⁴	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁵
P1	F3	3	1. ismeretlen	U1	6	1,00 E ⁻⁰⁴	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁵
P1	G1	1	1. ismeretlen	U1	7	1,00 E ⁻⁰³	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁴
P1	G2	2	1. ismeretlen	U1	7	1,00 E ⁻⁰³	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁴
P1	G3	3	1. ismeretlen	U1	7	1,00 E ⁻⁰³	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁴
P1	H1	1	1. ismeretlen	U1	8	1,00 E ⁻⁰²	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰³
P1	H2	2	1. ismeretlen	U1	8	1,00 E ⁻⁰²	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰³
P1	H3	3	1. ismeretlen	U1	8	1,00 E ⁻⁰²	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰³
P1	A4	1	2. ismeretlen	U2	1	1,00 E ⁻⁰⁹	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻¹⁰
P1	A5	2	2. ismeretlen	U2	1	1,00 E ⁻⁰⁹	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻¹⁰
P1	A6	3	2. ismeretlen	U2	1	1,00 E ⁻⁰⁹	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻¹⁰
P1	B4	1	2. ismeretlen	U2	2	1,00 E ⁻⁰⁸	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁹
P1	B5	2	2. ismeretlen	U2	2	1,00 E ⁻⁰⁸	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁹
P1	B6	3	2. ismeretlen	U2	2	1,00 E ⁻⁰⁸	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁹
P1	C4	1	2. ismeretlen	U2	3	1,00 E ⁻⁰⁷	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁸
P1	C5	2	2. ismeretlen	U2	3	1,00 E ⁻⁰⁷	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁸
P1	C6	3	2. ismeretlen	U2	3	1,00 E ⁻⁰⁷	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁸
P1	D4	1	2. ismeretlen	U2	4	1,00 E ⁻⁰⁶	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁷
P1	D5	2	2. ismeretlen	U2	4	1,00 E ⁻⁰⁶	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁷
P1	D6	3	2. ismeretlen	U2	4	1,00 E ⁻⁰⁶	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁷
P1	E4	1	2. ismeretlen	U2	5	1,00 E ⁻⁰⁵	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁶
P1	E5	2	2. ismeretlen	U2	5	1,00 E ⁻⁰⁵	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁶
P1	E6	3	2. ismeretlen	U2	5	1,00 E ⁻⁰⁵	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁶
P1	F4	1	2. ismeretlen	U2	6	1,00 E ⁻⁰⁴	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁵
P1	F5	2	2. ismeretlen	U2	6	1,00 E ⁻⁰⁴	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁵
P1	F6	3	2. ismeretlen	U2	6	1,00 E ⁻⁰⁴	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁵
P1	G4	1	2. ismeretlen	U2	7	1,00 E ⁻⁰³	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁴
P1	G5	2	2. ismeretlen	U2	7	1,00 E ⁻⁰³	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁴
P1	G6	3	2. ismeretlen	U2	7	1,00 E ⁻⁰³	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁴
P1	H4	1	2. ismeretlen	U2	8	1,00 E ⁻⁰²	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰³
P1	H5	2	2. ismeretlen	U2	8	1,00 E ⁻⁰²	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰³
P1	H6	3	2. ismeretlen	U2	8	1,00 E ⁻⁰²	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰³

Minták elrendezése a kompetitív kötési vizsgálathoz

Lemez	Pozíció	Ismétlés	Lyuk típusa	Lyuk kódja	Koncentráció kódja	Kompetitor induló koncentrációja (M)	hrER törzs (μl)	Puffer térfogata (μl)	Nyomjelző (radioaktív E2) térfogata (μL)	Hígítási lemezről adagolt térfogat (μL)	Végző térfogat (μl)	Kompetitor végső koncentrációja (M)
P1	A7	1	3. ismeretlen	U3	1	1,00 E ⁻⁰⁹	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻¹⁰
P1	A8	2	3. ismeretlen	U3	1	1,00 E ⁻⁰⁹	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻¹⁰
P1	A9	3	3. ismeretlen	U3	1	1,00 E ⁻⁰⁹	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻¹⁰
P1	B7	1	3. ismeretlen	U3	2	1,00 E ⁻⁰⁸	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁹
P1	B8	2	3. ismeretlen	U3	2	1,00 E ⁻⁰⁸	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁹
P1	B9	3	3. ismeretlen	U3	2	1,00 E ⁻⁰⁸	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁹
P1	C7	1	3. ismeretlen	U3	3	1,00 E ⁻⁰⁷	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁸
P1	C8	2	3. ismeretlen	U3	3	1,00 E ⁻⁰⁷	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁸
P1	C9	3	3. ismeretlen	U3	3	1,00 E ⁻⁰⁷	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁸
P1	D7	1	3. ismeretlen	U3	4	1,00 E ⁻⁰⁶	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁷
P1	D8	2	3. ismeretlen	U3	4	1,00 E ⁻⁰⁶	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁷
P1	D9	3	3. ismeretlen	U3	4	1,00 E ⁻⁰⁶	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁷
P1	E7	1	3. ismeretlen	U3	5	1,00 E ⁻⁰⁵	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁶
P1	E8	2	3. ismeretlen	U3	5	1,00 E ⁻⁰⁵	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁶
P1	E9	3	3. ismeretlen	U3	5	1,00 E ⁻⁰⁵	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁶
P1	F7	1	3. ismeretlen	U3	6	1,00 E ⁻⁰⁴	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁵
P1	F8	2	3. ismeretlen	U3	6	1,00 E ⁻⁰⁴	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁵
P1	F9	3	3. ismeretlen	U3	6	1,00 E ⁻⁰⁴	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁵
P1	G7	1	3. ismeretlen	U3	7	1,00 E ⁻⁰³	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁴
P1	G8	2	3. ismeretlen	U3	7	1,00 E ⁻⁰³	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁴
P1	G9	3	3. ismeretlen	U3	7	1,00 E ⁻⁰³	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁴
P1	H7	1	3. ismeretlen	U3	8	1,00 E ⁻⁰²	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰³
P1	H8	2	3. ismeretlen	U3	8	1,00 E ⁻⁰²	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰³
P1	H9	3	3. ismeretlen	U3	8	1,00 E ⁻⁰²	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰³
P1	A10	1	E2 kontroll (max)	Sz	E2max1	1,00 E ⁻⁰⁶	30	50	10	10	100	1,00 E ⁻⁰⁷
P1	A11	2	E2 kontroll (max)	Sz	E2max2	1,00 E ⁻⁰⁶	30	50	10	10	100	1,00 E ⁻⁰⁷
P1	A12	3	E2 kontroll (max)	Sz	E2max3	1,00 E ⁻⁰⁶	30	50	10	10	100	1,00 E ⁻⁰⁷
P1	B10	1	E2 kontroll (IC ₅₀)	Sz	E2IC501	E2IC50x10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	B11	2	E2 kontroll (IC ₅₀)	Sz	E2IC502	E2IC50x10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	B12	3	E2 kontroll (IC ₅₀)	Sz	E2IC503	E2IC50x10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	C10	1	NE kontroll (max)	Sz	Nemax1	1,00 E ^{-3,5}	30	50	10	10	100	1,00 E ^{-4,5}
P1	C11	2	NE kontroll (max)	Sz	Nemax2	1,00 E ^{-3,5}	30	50	10	10	100	1,00 E ^{-4,5}
P1	C12	3	NE kontroll (max)	Sz	Nemax3	1,00 E ^{-3,5}	30	50	10	10	100	1,00 E ^{-4,5}
P1	D10	1	NE kontroll (IC ₅₀)	Sz	NEIC501	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	D11	2	NE kontroll (IC ₅₀)	Sz	NEIC502	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	D12	3	NE kontroll (IC ₅₀)	Sz	NEIC503	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	E10	1	nem jelölt E2	NSB	S1	1,00 E ⁻⁰⁵	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁶
P1	E11	2	nem jelölt E2	NSB	S2	1,00 E ⁻⁰⁵	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁶
P1	E12	3	nem jelölt E2	NSB	S3	1,00 E ⁻⁰⁵	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁶
P1	F10	4	nem jelölt E2	NSB	S4	1,00 E ⁻⁰⁵	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁶
P1	F11	5	nem jelölt E2	NSB	S5	1,00 E ⁻⁰⁵	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁶
P1	F12	6	nem jelölt E2	NSB	S6	1,00 E ⁻⁰⁵	30	50	10	10	100	1,0 E ⁻⁰⁶
P1	G10	1	teljes kötődés	TB	TB1	-	30	60	10	-	100	-
P1	G11	2	teljes kötődés	TB	TB2	-	30	60	10	-	100	-
P1	G12	3	teljes kötődés	TB	TB3	-	30	60	10	-	100	-
P1	H10	4	teljes kötődés	TB	TB4	-	30	60	10	-	100	-
P1	H11	5	teljes kötődés	TB	TB5	-	30	60	10	-	100	-
P1	H12	6	teljes kötődés	TB	TB6	-	30	60	10	-	100	-

4. függelék

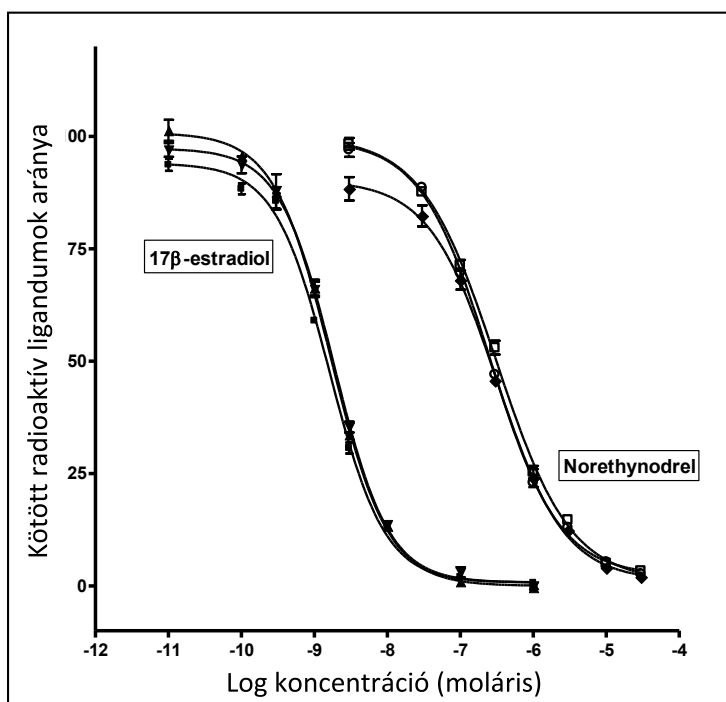
A HUMÁN ÖSZTROGÉNRECEPTOR KOMPETITÍV KÖTÉSI VIZSGÁLATBÓL NYERT ADATOK ELEMZÉSÉNEK SZEMPONTJAI

1. A humán ösztrogénreceptor α kompetitív kötési vizsgálat azt méri, hogy milyen mértékben képes egy állandó koncentrációban alkalmazott [^3H]-17 β -ösztradiol kötődni egy adott vizsgálati vegyi anyag növekvő koncentrációjának jelenlétében. A kompetitív kötési görbe a [^3H]-17 β -ösztradiol specifikus kötődésének és a kompetitor ($\log_{10}$ egységekben feltüntetett) koncentrációjának összefüggését ábrázolja. A vizsgálati vegyi anyag azon koncentrációja, amely meggátolja a [^3H]-17 β -ösztradiol maximális specifikus kötődésének 50 %-át, az IC_{50} .

A referenciaösztrogén és a gyengén kötődő anyag adatainak elemzése (1)

2. A kontroll vizsgálatmenetekből nyert adatokat (vagyis a [^3H]-17 β -ösztradiol specifikus kötődésének arányát és a kontrollanyag logaritmikus koncentrációit) a további elemzés céljára transzformálják. A pozitív kontrollanyagok (pl. a referenciaösztrogén és a gyengén kötődő anyag) becsült $\log(\text{IC}_{50})$ értékének meghatározásához egy megfelelő nem-lineáris görbeillesztő szoftvert kell használni, amely meg tudja rajzolni a négyparaméteres Hill-egyenlet görbét (pl. BioSoft; GraphPad Prism) (2). A görbe illesztése során a görbe tetejét, alját, meredekségét jelző értékeket és a $\log(\text{IC}_{50})$ értékét általában szabadon ábrázolják. A legjobban illeszkedő görbét robusztus regresszióval kell meghatározni, az ettől való eltérést indokolni kell. A robusztus regresszió alkalmazásának módszerét meg kell adni. A Freyberger–Wilson és a CERI humán ösztrogénreceptor vizsgálata során nem kellett korrigálni a ligandum csökkenését, de ha szükséges, fontolóra vehető a korrekció alkalmazása. A kezdeti analízist követően minden kötési görbét ellenőrizni kell, hogy megfelelően illeszkedik-e a modellre. A gyengén kötődő anyag relatív kötési affinitását a gyengén kötődő anyag $\log(\text{IC}_{50})$ értékének a 17 β -ösztradiol $\log(\text{IC}_{50})$ értékéhez viszonyított arányaként lehet meghatározni. A pozitív kontroll és a nem kötődő kontroll eredményeit a vizsgálati módszerben meghatározott vizsgálati teljesítménymutatók és elfogadhatósági kritériumok szerint kell értékelni (20. pont, a 2. függelék (Freyberger–Wilson vizsgálat) 41–51. pontja és a 3. függelék (CERI vizsgálat) 41–51. pontja). A referenciaösztrogén és gyengén kötődő anyag 3 vizsgálatmenetére vonatkozólag az 1. ábra hoz példákat.

1. ábra Példák a referenciaösztrogén és a gyengén kötődő anyag kompetitív kötési görbéire.

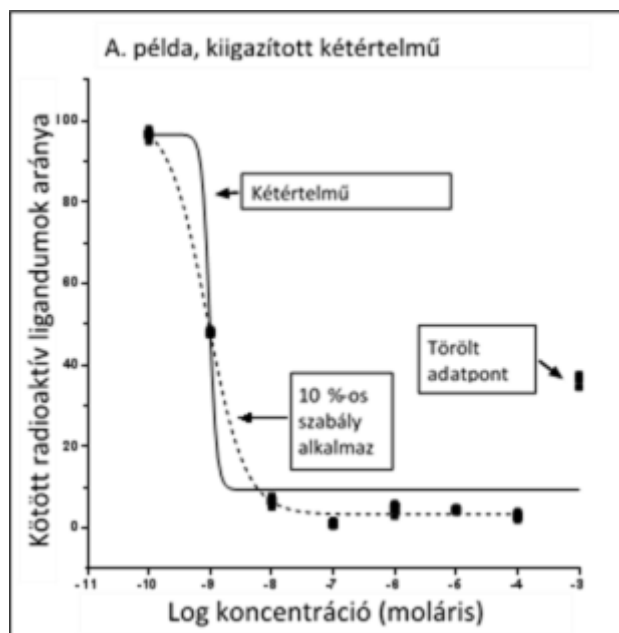


A vizsgálati vegyi anyagok adatainak elemzése

3. Az összes vizsgálati vegyi anyag adatait lépésenként kell elemezni, biztosítva ezáltal az adatok megfelelő elemzését és a kompetitív kötési görbék helyes osztályozását. Vizsgálati vegyi anyagokként minden vizsgálatmenet megkezdésekor egy szabványosított adatelemzést kell végezni, amely megegyezik a referenciaösztrogén és a gyengén kötődő anyag kontrolljainál alkalmazott analízissel. Az adatelemzés végeztével technikailag ellenőrizni kell a görbeillesztési paramétereket, valamint vizuálisan is ellenőrizni kell, hogy az adatok mennyire illeszkednek az egyes vizsgálatmenetek kompetitív kötési görbéjéhez. Amennyiben a technikai ellenőrzés során megfigyelhető a specifikusan kötődő [^3H]-17 β -ösztadiol arányának koncentrációfüggő csökkenése, a vegyi anyagok egyes koncentrációit tartalmazó ismétlések közötti csekély eltérés és a három vizsgálatmenet görbeillesztési paramétereinek következetessége jó indikátorai annak, hogy a vizsgálatot és az adatelemzést megfelelően hajtották végre. Egy adott vizsgálati vegyi anyag egyes vizsgálatmeneteiből származó eredmények értelmezése során szakmai megítélés alapján kell dönteni, és a vizsgálati vegyi anyagok kötődő vagy nem kötődő kategóriába sorolásához használt adatoknak tudományosan védhetőnek kell lenniük.
4. Időnként előfordulhatnak olyan adatok, amelyekre fokozottabb figyelmet kell fordítani ahhoz, hogy a humán ösztrogénreceptor-kötési adatokat megfelelően lehessen elemezni és értelmezni. Az előző tanulmányok során előálltak olyan helyzetek, amikor a kompetitív receptor kötési adatok elemzését és értelmezését megnehezítette a legmagasabb

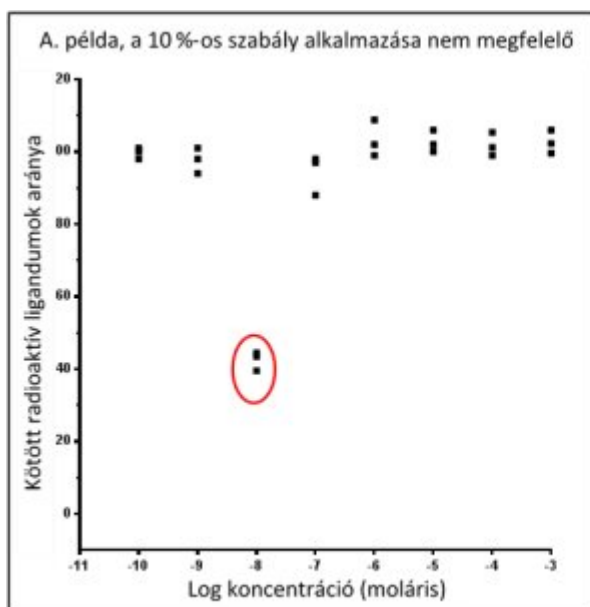
koncentrációban vizsgálati vegyi anyagok specifikus kötődési arányának megugrása (2. ábra). Ez egy jól ismert probléma, ami kompetitív receptor kötődési vizsgálatok protokolljának használatakor fordul elő (3). Ezekben az esetekben alacsonyabb koncentrációértékeknél koncentrációfüggő választ figyeltek meg, de amint a vizsgálati vegyi anyag koncentrációja megközelíti az oldhatósági határértéket, a $[^3\text{H}]$ -17 β -ösztradiol leszorítása már nem csökken. Ilyenkor a magasabb koncentrációk eredménye azt jelzi, hogy elérték a vizsgálat biológiai hatásának határát. Ez a jelenség gyakran kapcsolódik a vizsgálati vegyi anyag magas koncentrációknál megnyilvánuló oldhatatlanságához vagy kicsapódásához, ugyanakkor jelentheti azt is, hogy a vegyi anyag legmagasabb koncentrációinál a dextránbevonatú aktívszén az elkülönítési folyamat során már nem képes megkötni a szabad radioaktív jelölt ligandumokat. Ha ezek az adatpontok is részt vesznek a kompetitív kötési adatok szigmoid görbére illesztésében, az esetenként az adott vizsgálati vegyi anyag receptorkötési potenciáljának helytelen kategorizálásához vezethet (2. ábra). Ennek elkerülése érdekében a Freyberger–Wilson és a CERI ösztrogénreceptor-kötési vizsgálatának protokolljai biztosítják annak lehetőségét, hogy az elemzésből kizárják azokat az adatpontokat, amelyek esetében az ismétlések $[^3\text{H}]$ 17 β -ösztradiol specifikus kötődési arányának átlagértéke legalább 10 %-kal meghaladja a valamely alacsonyabb koncentrációnál megfigyelt átlagértéket (ez az úgynevezett 10 %-os szabály). Ezt a szabályt egy görbére egyszer lehet alkalmazni, és csak akkor, ha legalább 6 koncentráció adatai megmaradnak, hogy a görbe alapján megfelelő kategóriába lehessen sorolni a vizsgálati vegyi anyagot.

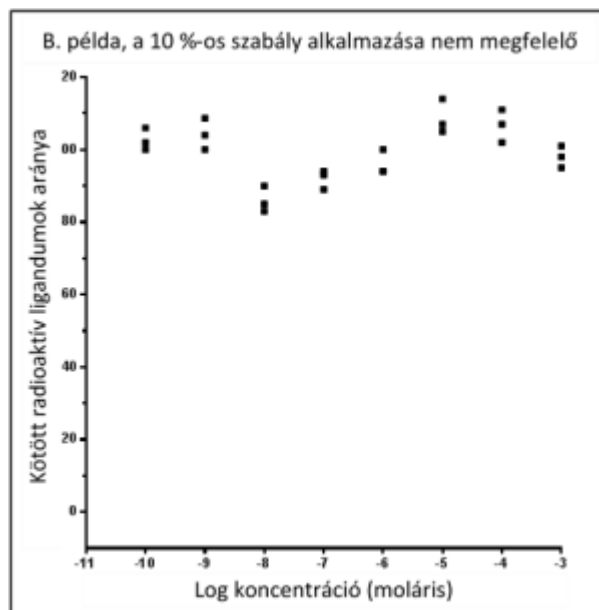
2. ábra: Példák a 10 %-os szabályt alkalmazó és nem alkalmazó kompetitív kötési görbékre



5. A görbék korrigálására szolgáló 10 %-os szabály használatát alaposan mérlegelni kell, és csak azokban az esetekben szabad alkalmazni, amikor minden jel arra utal, hogy a receptorhoz kötődő anyagról van szó. A Freyberger–Wilson humán ösztrogénreceptor-kötési vizsgálat validálási tanulmányának keretében végzett kísérletek során megfigyelték, hogy a 10 %-os szabály alkalmazása esetenként nem szándékolt és előre nem látható következményekhez vezetett. Azok a vegyi anyagok, amelyek nem lépnek kölcsönhatásba a receptorral (vagyis a valódi nem kötődő anyagok) a radioaktív ligandumok közel 100 %-os kötésénél gyakran mutattak 10 %-nál nagyobb variabilitást a vizsgált koncentrációtartományban. Ha a legalacsonyabb értéket alacsony koncentráció idézi elő, a 10 %-os szabály alkalmazásakor előfordulhat, hogy az összes magasabb koncentráció adatait törölik az elemzésből, pedig e koncentrációk adatai hasznosak lennének a vegyi anyag nem kötődőként való azonosításához. A 3. ábra olyan helyzetekre hoz példát, ahol a 10 %-os szabály alkalmazása nem megfelelő.

3. ábra: Példák olyan kompetitív kötési adatokra, amelyek esetében a 10 %-os szabály alkalmazása nem megfelelő.





Hivatkozások

- (1) OECD (2015). *Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα)*, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.
- (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, pp 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.