



Europos Sąjungos
Taryba

Briuselis, 2019 m. vasario 25 d.
(OR. en)

6800/19
ADD 1

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

PRIDEDAMAS PRANEŠIMAS

nuo:	Europos Komisijos
gavimo data:	2019 m. vasario 22 d.
kam:	Tarybos generaliniam sekretoriatui
Komisijos dok. Nr.:	Annex to D060575/02
Dalykas:	[data] KOMISIJOS REGLAMENTO (ES) .../..., kuriuo, derinant prie technikos pažangos, iš dalies keičiamas Reglamento (EB) Nr. 440/2008, nustatančio bandymų metodus pagal Europos Parlamento ir Tarybos reglamentą (EB) Nr. 1907/2006 dėl cheminių medžiagų registracijos, įvertinimo, autorizacijos ir apribojimų (REACH), priedas, PRIEDAS

Delegacijoms pridedamas dokumentas Annex to D060575/02.

Pridedama: Annex to D060575/02

LT

PRIEDAS

Reglamento (EB) Nr. 440/2008 priedas iš dalies keičiamas taip:

(1) B dalies B.4. skyrius pakeičiamas taip:

„B.4. ŪMUS ODOS DIRGINIMAS IR (ARBA) ĖSDINIMAS**ĮVADAS**

1. Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymo gaires (TG) 404 (2015). EBPO cheminėms medžiagoms bandyti skirtos gairės periodiškai peržiūrimos, siekiant, kad jose būtų atsižvelgta į geriausius turimus mokslinius duomenis. Peržiūrint EBPO TG 404 ypatingas dėmesys buvo kreipiamas į galimą gyvūnų gerovės pagerinimą ir į visos turimos informacijos apie bandomąją cheminę medžiagą įvertinimą, siekiant išvengti nebūtinų bandymų su laboratoriniais gyvūnais. Į atnaujintą EBPO TG 404 versiją (iš pradžių priimtą 1981 m., peržiūrėtą 1992 m., 2002 m. ir 2015 m.) įtraukta nuoroda į rekomendacinį dokumentą dėl odos dirginimo ar ėsdinimo integruotųjų bandymo ir vertinimo metodų (angl. IATA) (1), kuriame siūlomas modulinis odos dirginimo ir odos ėsdinimo bandymo metodas. IATA aprašomi keli moduliai, kuriuose grupuojami informacijos šaltiniai ir analizės priemonės bei pateikiami nurodymai, kaip (i) integruoti ir naudoti esamus bandymų ir ne bandymų duomenis, skirtus cheminių medžiagų odos dirginimo ir odos ėsdinimo potencialui įvertinti, ir (ii) siūlomas metodas, jei būtini papildomi bandymai (1). Be to, jei reikia atlikti pradinį *in vivo* bandymą, vietoj vienalaikio trijų bandomųjų tamponų uždėjimo gyvūnui šiose rekomendacijose juos siūloma dėti nuosekliai.
2. Odos dirginimo ir ėsdinimo apibrėžtys pateiktos šio bandymo metodo priedėlyje.

PRADINIAI ASPEKTAI

3. Siekiant gauti patikimų mokslinių duomenų ir kartu užtikrinti gyvūnų gerovę, *in vivo* bandymai neturėtų būti atliekami tol, kol visi turimi duomenys, susiję su galimu bandomosios cheminės medžiagos ėsdinamuoju ar dirginamuoju poveikiu odai, nėra įvertinti taikant įrodomosios vertės analizę (WoE), kaip nurodyta rekomendaciniame dokumente dėl odos ėsdinimo ir dirginimo kaip integruotųjų bandymo ir vertinimo metodų, t. y. trijose šių rekomendacijų dalyse ir jų atitinkamuose moduluose (1). Trumpai tariant, 1 dalyje esami duomenys pateikiami per septynis modulius, aprėpiančius žmogaus duomenis, *in vivo* duomenis, *in vitro* duomenis, fizikines ir chemines savybes (pvz., pH, visų pirma,

stiprų rūgštingumą ar šarmingumą) ir ne bandymo metodus. 2 dalyje atliekama įrodomosios vertės analizė. Jei ši įrodomosios vertės analizė vis dar neduoda aiškaus rezultato, reikėtų atlikti papildomus bandymus pagal 3 dalį, pradedant nuo *in vitro* metodų, ir *in vivo* bandymai atliekami kaip paskutinė išeitis. Todėl taikant šią analizę reikėtų mažiau ėsdinimo ir (arba) dirginimo *in vivo* bandymų, atliekamų su bandomosiomis cheminėmis medžiagomis, kurioms jau yra pakankamai kitais tyrimais gautų duomenų dėl šių dviejų vertinamųjų baigčių.

IN VIVO BANDYMO PRINCIPAS

4. Ant bandomo gyvūno odos dedama viena bandomosios cheminės medžiagos dozė; nepaveiktos gyvūno odos vietos naudojamos kontrolei. Nustatytais laiko tarpais nustatomas ir balais įvertinamas dirginimo ar ėsdinimo laipsnis, kuris papildomai aprašomas, siekiant išsamiai įvertinti poveikį. Tyrimo trukmė turi būti pakankama stebimo poveikio grįžtamumui arba negrįžtamumui įvertinti.
5. Gyvūnai, kuriems kurioje nors bandymo stadijoje pasireiškia nuolatiniai sunkių kančių ir (arba) skausmo požymiai, turi būti humaniškai numarinami, o bandomoji cheminė medžiaga atitinkamai įvertinama. Sprendimo dėl gaištančių ir stipriai kenčiančių gyvūnų humaniško numarinimo priėmimo kriterijai yra nagrinėjami atskirame rekomendaciniame dokumente (2).

IN VIVO BANDYMO PARENGIAMIEJI DARBAI

Gyvūnų rūšies parinkimas

6. Tinkamiausias laboratorinis gyvūnas – baltasis triušis; naudojami sveiki, jauni ir suaugę triušiai. Kitų rūšių naudojimas turi būti pagrįstas.

Gyvūnų paruošimas

7. Maždaug 24 h prieš bandymą nuo gyvūno reikia pašalinti kailį, jį trumpai nukerpant nugaros srityje. Reikėtų stengtis nenutrinti odos ir naudoti tik tuos gyvūnus, kurių oda yra sveika ir nepažeista.
8. Kai kurių veislių triušiai turi tankių plaukų vietas, kurios labiau matomos tam tikrais metų laikais. Tokios tankių plaukų vietos neturėtų būti naudojamos bandymui.

Laikymo ir šėrimo sąlygos

9. Gyvūnai turėtų būti laikomi atskirai. Bandymo gyvūnų patalpos temperatūra turėtų būti 20 °C (±3 °C). Nors santykinė oro drėgmė turėtų būti ne mažesnė kaip 30 % ir pageidautina, kad būtų ne didesnė kaip 70 %, išskyrus patalpos plovimo laiką, reikėtų stengtis, kad ji būtų 50–60 %. Apšvietimas turėtų būti dirbtinis, taikant 12 h šviesos ir 12 h

tamsos seką. Gyvūnams šerti tinka įprastas laboratorijoje naudojamas pašaras, neribojant geriamojo vandens kiekio.

BANDYMO PROCEDŪRA

Bandomosios cheminės medžiagos uždėjimas

10. Bandomoji cheminė medžiaga uždinama ant mažo odos ploto (maždaug 6 cm²) ir uždengiama marlės tamponu, kuris tvirtinamas nedirginančia lipnia juosta. Jei tiesiogiai uždėti neįmanoma (pvz., skysčiai arba kai kurios pastos), bandomąją cheminę medžiagą reikėtų dėti ant marlės tampono, o jį dėti ant odos. Visą ekspozicijos laikotarpį tamponas turėtų laisvai liesti odą, naudojant pusiau uždarytą tvarstį. Jei bandomoji cheminė medžiaga dedama ant tampono, jis turėtų būti uždedamas ant odos taip, kad bandomoji cheminė medžiaga gerai liestųsi su oda ir tolygiai pasiskirstytų ant jos. Gyvūnai neturėtų pasiekti tampono ir praryti arba įkvėpti bandomosios cheminės medžiagos.
11. Skystosios bandomosios cheminės medžiagos paprastai naudojamos nepraskiestos. Bandant kietąsias medžiagas (kurias galima purkšti, jei būtų manoma, kad tai daryti yra būtina), bandomąją cheminę medžiagą reikėtų suvilgyti kiek įmanoma mažesniu vandens kiekiu (arba prireikus kitu tinkamu nešikliu), kurio pakaktų geram sąlyčiui su oda užtikrinti. Kai nešiklis yra ne vanduo, galima nešiklio įtaka bandomosios cheminės medžiagos dirginamajam poveikiui turėtų būti kiek įmanoma mažesnė.
12. Pasibaigus ekspozicijos laikotarpiui, kurio trukmė paprastai yra 4 h, bandomosios cheminės medžiagos likutis turėtų būti nuplautas, jei įmanoma, vandeniu arba kitu tinkamu tirpikliu, nekeičiant esamo epidermio atsako vientisumo.

Dozės dydis

13. Ant bandymo vietos dedama 0,5 ml skysčio arba 0,5 g kietosios medžiagos arba pastos dozė.

Pradinis bandymas (*in vivo* odos dirginimo ar ėsdinimo bandymas su vienu gyvūnu)

14. Jei atsižvelgiant į įrodomosios vertės analizę arba į ankstesnius *in vitro* bandymus prieinama prie išvados, kad bandomoji cheminė medžiaga yra ėsdinanti, dirginanti arba neklasifikuojama, paprastai papildomų bandymų *in vivo* atlikti nereikia. Tačiau tais atvejais, kai manoma, kad turimų duomenų įrodymui nepakanka, atliekamas *in vivo* bandymas su vienu gyvūnu, taikant toliau pateikiamą metodą. Ant gyvūno nuosekliai dedami ne daugiau kaip trys tamponai. Pirmasis tamponas nuimamas po trijų minučių. Jei jokios rimtos odos reakcijos nėra, kitoje vietoje dedamas antrasis tamponas, kuris nuimamas po valandos. Jei šioje stadijoje stebėjimo rezultatai rodo, kad veikimą galima humaniškai pratęsti iki keturių valandų, dedamas trečiasis tamponas, kuris nuimamas po keturių valandų, ir odos reakcija įvertinama balais.

15. Jei ėsdinantis poveikis pastebimas po kurio nors iš trijų nuoseklių uždėjimų, bandymas nedelsiant baigiamas. Jei ėsdinančio poveikio nėra, nuėmus paskutinį tamponą, gyvūnas stebimas 14 parų, išskyrus atvejus, kai ėsdinimo požymiai atsiranda anksčiau.
16. Tai atvejais, kai nesitikima, kad bandomoji cheminė medžiaga sukels ėsdinantį poveikį, o tik dirginantį, vienam gyvūnui keturioms valandoms dedamas vienas tamponas.

Patvirtinamasis bandymas (*in vivo* odos dirginimo bandymas su papildomais gyvūnais)

17. Jei atliekant pradinį bandymą ėsdinančio poveikio nėra, dirginantis poveikis arba neigiama reakcija turėtų būti patvirtinti naudojant ne daugiau kaip du papildomus gyvūnus su vienu tamponu ir esant keturių valandų ekspozicijos trukmei. Jei dirginantis poveikis pastebimas atliekant pradinį bandymą, patvirtinamąjį bandymą galima daryti nuosekliau būdu arba veikiant du papildomus gyvūnus vienu metu. Išimtiniais atvejais, kai pradinis bandymas neatliekamas, dviem arba trimis gyvūnams gali būti dedamas vienas tamponas, kuris nuimamas po keturių valandų. Kai naudojami du gyvūnai ir abiejų odos reakcija vienoda, toliau bandyti nereikia. Kitu atveju dar atliekamas bandymas su trečiu gyvūnu. Abejotinus atsakus gali tekti įvertinti naudojant papildomą gyvūną.

Stebėjimo laikotarpis

18. Stebėjimo laikotarpio trukmės turi visiškai pakakti pastebėto poveikio grįžtamumui įvertinti. Tačiau bandymą reikėtų nutraukti bet kuriuo momentu, kai tik gyvūnui pasireiškia ilgalaikiai didelio skausmo arba kančios požymiai. Poveikio grįžtamumui nustatyti gyvūnai po tamponų nuėmimo stebimi iki 14 parų. Jei grįžtamumas pastebimas anksčiau kaip po 14 parų, bandymas nutraukiamas tuo momentu.

Klinikiniai stebėjimai ir odos reakcijos įvertinimas balais

19. Visi gyvūnai turėtų būti stebimi dėl eritemos ir edemos požymių, ir reakcija įvertinama balais po 60 minučių ir vėliau, nuėmus tamponą, po 24, 48 ir 72 valandų. Atliekant pradinį bandymą su vienu gyvūnu, bandymo vieta taip pat tiriama iškart po tampono nuėmimo. Odos reakcija įvertinama balais ir užrašoma pagal lentelėje pateiktą gradavimo skalę. Jei odai padarytas pažeidimas po 72 h negali būti identifikuotas kaip dirginimas arba ėsdinimas, poveikio grįžtamumui nustatyti stebėjimą gali tekti tęsti iki 14 parų. Be dirginamojo poveikio stebėjimo, reikėtų išsamiai apibūdinti ir užregistruoti visi vietiniai toksiškumo poveikiai, pvz., odos džiūvimas, ir visi sisteminiai neigiami poveikiai (pvz., poveikis klinikiniams toksiškumo ir kūno masės požymiams). Reikėtų pagalvoti apie histopatologinį tyrimą, kad būtų išaiškinti abejotini atsakai.
20. Odos reakcijos įvertinimas balais yra neišvengiamai subjektyvus. Siekiant labiau suderinti odos reakcijos įvertinimą balais, padėti bandymo laboratorijoms ir visiems, kurie vykdo ir aiškina stebėjimus, juos vykdančias personalas turi būti atitinkamai apmokytas taikyti

įvertinimo balais sistemą (žr. toliau pateiktą lentelę). Tam galėtų būti naudingas iliustruotas odos dirginimo ir kitų pažeidimų įvertinimo vadovas (3).

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

21. Tyrimo rezultatus reikėtų apibendrinti galutinėje bandymo ataskaitoje kaip lentelę, į kurią būtų įtraukti visi 24 pastraipos punktai.

Rezultatų įvertinimas

22. Odos dirginimo balai turi būti įvertinti pagal pažeidimų tipą ir sunkumą bei atsižvelgiant į grįžtamumą arba į jo nebuvimą. Atskiri balai nėra medžiagos dirginamųjų savybių absoliučiuoju įverčiu, nes dar įvertinamas kitas bandomosios medžiagos poveikis. Į šiuos atskirus balus reikėtų žiūrėti kaip į pamatines vertes, kurios turi būti įvertinamos kartu su visais kitais tyrimo rezultatais.
23. Vertinant dirginimą turėtų būti atsižvelgta į odos pažeidimų grįžtamumą. Jei reakcija, pvz., plikimas (ribotame plote), hiperkeratozė, hiperplazija ir pleiskanojimas, pasireiškia baigiantis 14 parų stebėjimo laikotarpiui, bandomoji cheminė medžiaga turėtų būti priskiriama dirginančioms.

Bandymo ataskaita

24. Į bandymo ataskaitą turi būti įtraukta ši informacija

in vivo bandymų pagrindimas:

- jau turimų bandymo duomenų įrodomosios galios analizė, įskaitant nuosekliųjų bandymų strategijos taikymo rezultatus;
- ankstesnių bandymų atitinkamų duomenų aprašymas;
- duomenys, gauti kiekvienoje bandymų procedūros stadijoje,
- atliktų *in vitro* bandymų aprašymas, įskaitant išsamią informaciją apie procedūras, rezultatus, gautus tiriant bandomąją ar etaloninę medžiagą,
- duomenų įrodomosios vertės analizė *in vivo* tyrimui atlikti.

Bandomoji cheminė medžiaga:

- Vienkomponentė medžiaga: cheminio identifikavimo duomenys, pvz., IUPAC ar CAS pavadinimas, CAS numeris, SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė, grynumas, cheminis priemaišų pavadinimas, jei tinka bei praktiškai įmanoma ir kt.;
- daugiakomponentė cheminė medžiaga, mišinys ir nežinomos ar kintamos sudėties medžiagos, sudėtingųjų reakcijų produktai ar biologinės medžiagos (UVCB): kuo

išsamesnis sudedamųjų dalių apibūdinimas, nurodant cheminį pavadinimą (žr. pirmiau), kiekybinį paplitimą ir būdingas fizikochemines savybes;

- fizinė išvaizda, tirpumas vandenyje ir papildomos būdingos fizikocheminės savybės;
- šaltinis, partijos numeris, jei yra;
- bandomosios ir (arba) kontrolinės cheminės medžiagos apdorojimas prieš bandymą, jei tai atliekama (pvz., šildymas, malimas);
- bandomosios cheminės medžiagos stabilumas, naudojimo pabaigos data arba pakartotinės analizės data, jei žinoma;
- laikymo sąlygos.

Nešiklis:

- identifikavimo duomenys, koncentracija (jei tinka), naudojamas tūris;
- nešiklio pasirinkimo pagrindimas.

Bandymo gyvūnas (-ai):

- naudota rūšis ar veislė, kitų nei baltieji triušiai gyvūno (-ų) naudojimo pagrindimas;
- kiekvienos lyties gyvūnų skaičius,
- atskiro gyvūno masė (-ės) bandymo pradžioje ir pabaigoje;
- amžius tyrimo pradžioje,
- gyvūno (-ų) šaltinis, laikymo sąlygos, šėrimo racionas ir kt.

Bandymo sąlygos:

- vietos tamponui uždėti ruošimo būdas,
- duomenys apie tampono medžiagas ir uždėjimo būdą,
- išsami informacija apie bandomosios cheminės medžiagos ruošimą, uždėjimą ir pašalinimą.

Rezultatai:

- kiekvieno gyvūno dirginimo ar ėsdinimo reakcijos balų, gautų visuose matavimo laiko taškuose, lentelių sudarymas,
- visų pastebėtų pažeidimų aprašymas,
- pastebėto dirginimo arba ėsdinimo tipo ir laipsnio pasakojamasis aprašymas ir visi histopatologiniai rezultatai,
- kito kartu su dirginimu arba ėsdinimu pasireiškiančio neigiamo vietinio (pvz., odos džiūvimo) ir sisteminio poveikio aprašymas.

Rezultatų aptarimas.

Išvados.

LITERATŪRA

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

LENTELĖ. ODOS REAKCIJOS VERTINIMO BALAIS SKALĖ**Eritemos ir šašu susidarymas**

Eritemos nėra	0
Labai nedidelė eritema (vos pastebima)	1
Aiškiai matoma eritema	2
Nuo vidutinės iki didelės eritemos	3
Didelė eritema (jautienos raudonumo) arba šašu susidarymas, trukdantis įvertinti eritemą	4
Didžiausias įmanomas balas: 4	

Edemos atsiradimas

Edemos nėra	0
Labai nedidelė edema (vos pastebima)	1
Nedidelė edema (plotelio kraštai aiškiai apibrėžti dėl iškilimo)	2
Vidutinė edema (iškilusi maždaug 1 mm)	3
Didelė edema (iškilusi daugiau kaip 1 mm ir išplitusi už ekspozicijos ploto ribų)	4
Didžiausias įmanomas balas: 4	

Galima atlikti histopatologinį tyrimą, kad būtų išaiškinti abejotini atsakai.

Priedėlis

APIBRĖŽTYS

Cheminė medžiaga – atskira cheminė medžiaga arba mišinys.

Odos dirginimas – grįžtamasis odos pažeidimas, bandomąja medžiaga veikiant ne ilgiau kaip 4 valandas.

Odos ėsdinimas – negrįžtamasis odos pažeidimas; būtent, matoma nekrozė per epidermį ir odos nekrozė po bandomosios cheminės medžiagos uždėjimo ne ilgiau kaip keturioms valandoms. Ėsdinimo reakcijai būdingos opos, kraujavimas, kraujuojantys šašai, o stebėjimo pabaigoje, praėjus 14 parų – odos spalvos pakitimas dėl blyškimo, ištisos nuplikimo sritys ir randai. Neaiškūs pažeidimai turėtų būti vertinami pasitelkiant histopatologinį tyrimą.

Bandomoji cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys, bandyti pagal šį bandymo metodą.“

2) B dalies B.17 skyrius pakeičiamas taip:

„B.17 ŽINDUOLIŲ LĄSTELIŲ GENŲ MUTACIJOS BANDYMAS *IN VITRO* NAUDOJANT HPRT IR XPRT GENUS

ĮVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymo gaires 476 (2016). Bandymų metodai periodiškai peržiūrimi, atsižvelgiant į mokslo pažangą, kintamus reglamentavimo poreikius ir gyvūnų gerovę. Šioje dabartinėje peržiūrėtoje B.17 bandymo metodo versijoje atsižvelgiama į beveik trisdešimties metų šio bandymo naudojimo patirtį ir kartu į ją įtrauktas naujas atskiras metodus, skirtas žinduolių ląstelių genų mutacijos *in vitro* bandymams, naudojant timidinkinazės geną. B.17 BM yra genetinės toksikologijos metodų serijos dalis. Yra parengtas EBPO dokumentas, kuriame glaustai pateikiama informacija apie genetinės toksikologijos bandymus ir naujausių genetinės toksikologijos bandymų EBPO gairių pakeitimų apžvalga (1).
2. Žinduolių ląstelių genų mutacijos *in vitro* bandymo tikslas – aptikti cheminių medžiagų sukeltas genų mutacijas. Šiuose tyrimuose naudojamomis ląstelių linijomis matuojamos tiesioginės reporterinių genų mutacijos, ypač endogeninio hipoksantino-guanino fosforiboziltransferazės geno (Hprt graužikų ląstelėse, HPRT žmogaus ląstelėse; šiame bandymo metode bendrai vadinamų Hprt genu ir HPRT testu) ir ksantino-guanino fosforiboziltransferazės transgeno (gpt) (vadinamas XPRT testu). HPRT ir XPRT mutacijos tyrimais aptinkami skirtingi genetinių įvykių spektrai. Be HPRT bandymu nustatomų mutacinių įvykių (pvz., bazių poros pakeitimų, genetinio kodo rėmelio poslinkių, mažų iškirtų ir įterpimų) pagal gpt transgeno autosominę padėtį galima aptikti dėl didelių iškirtų ir galbūt mitozinės rekombinacijos atsirandančias mutacijas, kurios neaptinkamos HPRT testu, nes Hprt genas yra X chromosomoje (2) (3) (4) (5) (6) (7). XPRT bandymas reglamentavimo tikslais šiuo metu naudojamas mažiau nei HPRT bandymas.
3. Vartojamos apibrėžtys pateiktos 1 priedėlyje.

PRADINIAI ASPEKTAI IR APRIBOJIMAI

4. Atliekant bandymus *in vitro*, paprastai reikia naudoti egzogeninį metabolinio aktyvinimo šaltinį. Egzogeninė metabolinio aktyvinimo sistema nevisiškai atkartoja *in vivo* sąlygas.
5. Reikėtų imtis priemonių, kad būtų išvengta sąlygų, kurioms esant būtų gauti klaidingai teigiami rezultatai (t. y. dėl galimos sąveikos su bandymo sistema), kuriuos sukelia ne tiesioginė sąveika tarp bandomųjų cheminių medžiagų ir ląstelės genetinės medžiagos; tokias sąlygas sudaro pH ar osmolialumo pokyčiai (8) (9) (10), sąveika su terpės komponentais (11) (12) ar per didelis citotoksiškumo lygis (13). Didesni nei

rekomenduojami citotoksiškumo lygiai, kaip apibrėžta 19 pastraipoje, laikomi per dideli atliekant HPRT bandymą.

6. Prieš taikant bandymų metodą mišiniui, kad būtų gauti numatomo reglamentavimo tikslui skirti duomenys, reikėtų panagrinėti, ar metodu galima pasiekti tą tikslą atitinkančius rezultatus ir, jei taip, dėl kokios priežasties. Tokie svarstymai nereikalingi, kai yra reglamentavimo reikalavimas bandyti mišinį.

BANDYMO PRINCIPAS

7. Mutantinės ląstelės, kurioms trūksta Hprt fermento aktyvumo, atliekant HPRT bandymą, arba xprt fermento aktyvumo, atliekant XPRT bandymą, yra atsparios purinų analogo 6-tioguanino (TG) citostatiniam poveikiui. Pakankamai Hprt (atliekant HPRT bandymą) arba gpt (atliekant XPRT bandymą) turinčios ląstelės yra jautrios TG, kuris blokuoja ląstelių metabolizmą ir stabdo tolimesnį jų dalijimąsi. Todėl mutantinės ląstelės gali daugintis esant TG, kai normalios ląstelės, turinčios Hprt (atliekant HPRT bandymą) arba gpt (atliekant XPRT bandymą) fermento, daugintis negali.
8. Ląstelių suspensija arba vienasluoksnė kultūra tinkamą laiko tarpą (3–6 valandas) veikiama bandomąja chemine medžiaga, esant egzogeniniam metabolinio aktyvinimo šaltiniui arba jam nesant (žr. 14 pastraipą), ir persėjamos, kad būtų nustatytas citotoksiškumas ir galėtų vykti fenotipo ekspresija prieš mutantų atranką (14) (15) (16) (17). Citotoksiškumas nustatomas pagal santykinį išgyvenamumą, t. y. klonavimo efektyvumą, išmatuotą iš karto po apdorojimo ir koreguojamą dėl ląstelių nuostolių apdorojimo metu, palyginti su neigiamu kontroliniu ėminiu (18 pastraipa ir 2 priedėlis). Apdorotos kultūros laikomos auginimo terpėje pakankamą laiko tarpą, būdingą kiekvienam ląstelių tipui, kad įvyktų beveik optimali sukeltų mutacijų fenotipo ekspresija (paprastai ne mažiau kaip 7–9 paros). Po fenotipo ekspresijos mutacijų dažnis nustatomas, sėjant žinomą ląstelių skaičių į terpę, turinčią atrankos medžiagą mutantinėms kolonijoms aptikti, ir į terpę be atrankos medžiagos klonavimo efektyvumui (gyvybingumui) nustatyti. Pasibaigus inkubavimo laikui, kolonijos suskaičiuojamos. Mutacijų dažnis apskaičiuojamas pagal mutantinių kolonijų skaičių, pakoreguotą dėl klonavimo efektyvumo mutantų atrankos metu.

METODO APRAŠYMAS

Parengiamieji darbai

Ląstelės

9. HPRT ir XPRT bandymams naudojamų tipų ląstelės turėtų turėti išreikštą jautrumą cheminiams mutagenams, didelį klonavimo efektyvumą, stabilų kariotipą ir stabilų spontaninių mutacijų dažnį. HPRT bandymui dažniausiai naudojamos ląstelės yra CHO, CHL ir V79 kuniškojo žiurkėno ląstelių linijos, pelių limfomos ląstelės L5178Y ir žmogaus

limfoblastų ląstelės TK6 (18) (19). Iš CHO gautos AS52 ląstelės, turinčios gpt transgeną (ir ištrintą Hprt geną) naudojamos XPRT bandymui (20) (21); HPRT bandymas negali būti atliekamas AS52 ląstelėse, nes hprt genas yra ištrintas. Kitų ląstelių linijų naudojimas turėtų būti pagrįstas ir patvirtintas.

10. Ląstelių linijos turėtų būti reguliariai tikrinamos, ar nesikeičia modalinis chromosomų skaičius ir nėra mikoplazmos užkrato (22) (23), o užkrėstos arba pakitusio modalinio chromosomų skaičiaus ląstelės neturėtų būti naudojamos. Turėtų būti nustatyta bandymo laboratorijoje normalaus ląstelių ciklo trukmė ir ji turėtų atitikti paskelbtas ląstelių charakteristikas. Taip pat turėtų būti tikrinamas pradinės ląstelių kultūros spontaninių mutacijų dažnis, ir pradinės ląstelių kultūros neturėtų būti naudojamos, jei mutacijų dažnis nėra priimtinas.
11. Prieš naudojant kultūrą šiame bandyme jas gali tekti ją išvalyti nuo iš anksčiau esančių mutantinių ląstelių, pvz., auginant HAT terpėje HPRT bandymui ir MPA terpėje XPRT bandymui (5) (24) (žr. 1 priedėlį). Išvalytos ląstelės gali būti užšaldytos ir atšildytos, kad galėtų būti naudojamos kaip darbinės kultūros. Naujai atšildytos darbinės kultūros gali būti naudojamos bandymui, kai pasiekama normali dvigubėjimo trukmė. Atliekant XPRT bandymą, įprastinės kultūros AS52 ląstelėms turėtų būti sudaromos sąlygos, kurios užtikrina gpt transgeno išsaugojimą (20).

Terpės ir kultūros sąlygos

12. Prižiūrimoms kultūroms reikėtų naudoti reikiamą kultūros terpę ir inkubavimo sąlygas (kultūros indus, drėkinamąją 5 % CO₂ atmosferą ir 37 °C inkubavimo temperatūrą). Ląstelių kultūros visada turėtų būti laikomos tokiomis sąlygomis, kurios užtikrintų, kad ląstelės auga eksponentinio augimo tarpsniu. Ypač svarbu, kad pasirinktos terpės ir auginimo sąlygos užtikrintų optimalų ląstelių augimą ekspresijos laikotarpiu ir optimalų mutantinių ir nemutantinių ląstelių klonavimo efektyvumą.

Kultūrų ruošimas

13. Ląstelių linijos dauginamos iš kamieninių kultūrų, sėjamų kultūros terpėje tokiu tankiu, kad ląstelės suspensijose ar monosluoksniuose visą apdorojimo ir ekspresijos laikotarpį augtų eksponentiškai (pvz., reikėtų vengti monosluoksniuose augančių ląstelių susilieimo).

Metabolinis aktyvinimas

14. Reikėtų naudoti egzogenines metabolinio aktyvinimo sistemas, kai naudojamos nepakankamos endogeninės metabolinės gebos ląstelės. Jei nebūtų pagrįsta kita sistema, dažniausiai kaip numatytoji rekomenduojama sistema yra kofaktoriais papildyta pomitochondrinė frakcija (S9), ruošama iš graužikų (paprastai žiurkių) kepenų, apdorotų fermentų aktyvumą skatinančiais agentais, pvz., Aroclor 1254 (25) (26) (27) (28) arba

fenobarbitalio ir β -naftoflavono derinys (29) (30) (31) (32). Pastarasis derinys neprieštarauja Stokholmo konvencijai dėl patvariųjų organinių teršalų (33) ir pasirodė esąs toks pat veiksmingas mišrių funkcijų oksidazėms skatinti kaip Aroclor 1254 (29) (31). S9 frakcija paprastai naudojama nuo 1 % iki 2 % (tūrio) koncentracijos, bet galutinio bandymo terpėje gali būti padidinta iki 10 % (tūrio). Naudojamos egzogeninės metabolinio aktyvinimo sistemos ar metabolizmo skatinimo priemonės tipo ir koncentracijos pasirinkimui įtakos gali turėti bandomų cheminių medžiagų klasė (34) (35) (36).

Bandomosios cheminės medžiagos ruošimas

15. Kietąsias bandomąsias chemines medžiagas reikėtų ištirpinti atitinkamuose tirpikliuose ir, jei reikia, praskiesti prieš ląstelių apdorojimą (žr. 16 pastraipą). Skystąsias bandomąsias chemines medžiagas galima dėti tiesiogiai į bandymo sistemą ir (arba) praskiesti prieš apdorojant bandymo sistemą. Dujos ar lakiosios bandomosios cheminės medžiagos turėtų būti bandomos atitinkamai pakeitus standartinius protokolus, pvz., apdorojimas sandariuose kultūros induose (37) (38). Bandomųjų cheminių medžiagų preparatus reikėtų ruošti prieš pat apdorojimą, išskyrus atvejus, kai stabilumo duomenys rodo, kad juos galima laikyti.

BANDYMO SĄLYGOS

Tirpikliai

16. Tirpiklį reikėtų pasirinkti taip, kad būtų optimizuotas bandomosios cheminės medžiagos tirpumas, bet nebūtų daroma neigiama įtaka bandymo eigai, pvz., kistų ląstelių augimas, būtų paveiktas bandomosios cheminės medžiagos vientisumas, vyktų reakcija su kultūros indais, būtų pakenkta metabolinio aktyvinimo sistemai. Rekomenduojama visuomet iš pradžių atsižvelgti į galimybę naudoti, jei įmanoma, vandeninį tirpiklį (ar kultūros terpę). Gera ištirti tirpikliai yra, pvz., vanduo ir dimetilsulfoksidas. Paprastai organinio tirpiklio koncentracija galutinėje apdorojimo terpėje neturėtų būti didesnė kaip 1 % (tūrio), o vandeninių tirpiklių (natrio chlorido tirpalo ar vandens) – 10 % (tūrio). Jei naudojami tinkamai neištirti tirpikliai (pvz., etanolis ar acetonas), jų naudojimas turėtų būti pagrįstas duomenimis, rodančiais, kad tirpiklis yra suderinamas su bandomosiomis cheminėmis medžiagomis bei bandymo sistema ir kad naudojama koncentracija nesukelia genetinio toksiškumo. Jei tokių patvirtinančių duomenų nebūtų, svarbu įtraukti neapdorotus kontrolinius ėminius (žr. 1 priedėlį), kurie įrodytų, kad pasirinktas tirpiklis nesukelia žalingo arba mutageninio poveikio.

Citotoksiškumo matavimas ir ekspozicijos koncentracijų pasirinkimas

17. Nustatant didžiausią bandymui naudojamą bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją reikėtų vengti koncentracijos, galinčios sukelti klaidingai teigiamus atsakus, pvz., per didelį citotoksiškumą (žr. 20 pastraipą), nuosėdas kultūros terpėje (žr. 21 pastraipą) ar žymius pH arba osmolialumo pokyčius (žr. 5 pastraipą). Jei bandomosios

cheminės medžiagos pridėjimo metu žymiai pakinta terpės pH vertė, ją būtų galima reguliuoti buferuojant galutinę apdorojimo terpę, kad būtų išvengta klaidingai teigiamų rezultatų ir būtų užtikrintos tinkamos kultūros sąlygos.

18. Koncentracijos pasirinkimas pagrįstas citotoksiškumu ir kitais aspektais (žr. 20–22 pastraipas). Nors citotoksiškumo įvertinimas atliekant pradinį bandymą gali būti naudingas pagrindinio bandymo koncentracijos vertėms geriau apibrėžti, pradinis bandymas nėra būtinas. Netgi atlikus pradinį citotoksiškumo vertinimą, vis tiek būtina matuoti citotoksiškumą kiekvienai kultūrai atliekant pagrindinį bandymą. Citotoksiškumas turėtų būti įvertinamas pagal santykinį išgyvenamumą, t. y. iš karto po apdorojimo sėjamų ląstelių klonavimo efektyvumą, koreguotą dėl ląstelių nuostolių apdorojimo metu, pagrįstą ląstelių skaičiumi palyginti su neigiamų kontrolinių ėminių koreguotu klonavimo efektyvumu (priskirtas 100 % išgyvenamumas) (formulė pateikta 2 priedėlyje).
19. Reikėtų įvertinti ne mažiau kaip keturias bandymo koncentracijos vertes (neįskaitant tirpiklio ir teigiamų kontrolinių ėminių), kurios atitinka priimtino kriterijus (reikiamas citotoksiškumas, ląstelių skaičius ir kt.). Nors patartina naudoti du kartotinius kultūros ėminius, galima naudoti kiekvienos bandymo koncentracijos kartotinius ar pavienius apdorotų kultūrų ėminius. Nepriklausomoms kartotinėms kultūroms gauti tam tikros koncentracijos rezultatai turėtų būti pateikti ataskaitoje atskirai, bet gali būti subendrinti duomenų analizei (17). Jei bandomoji cheminė medžiaga rodo mažą citotoksiškumą arba jo visai nėra, paprastai tiktų maždaug nuo 2 iki 3 kartų skirtingos koncentracijos intervalai. Jei citotoksiškumas nustatomas, pasirinktos koncentracijos vertės turėtų aprėpti intervalą nuo koncentracijos, kuriai esant citotoksiškumas pasireiškia, įtraukiant koncentracijos vertes, kurioms esant gaunamas vidutinis citotoksiškumas arba jo visai nėra. Daugelio bandomųjų cheminių medžiagų koncentracijos atsako kreivės kyla staigiai, todėl norint aprėpti visą citotoksiškumo intervalą arba išsamiai ištirti dozės ir atsako santykį, gali tekti naudoti arčiau išdėstytas ir daugiau kaip keturias koncentracijos vertes, ypač toms aplinkybėms, kai reikia atlikti kartotinį bandymą (žr. 43 pastraipą). Daugiau kaip 4 koncentracijų naudojimas gali būti ypač svarbus, kai naudojamos pavienės kultūros.
20. Jei didžiausioji koncentracija pagrįsta citotoksiškumu, reikėtų siekti, kad santykinis išgyvenamumas esant didžiausiai koncentracijai būtų nuo 20 iki 10 %. Reikėtų atsargiai aiškinti teigiamus tik 10 % ar mažesnio santykinio išgyvenamumo rezultatus (43 pastraipa).
21. Jei mažai tirpios bandomosios cheminės medžiagos nėra citotoksinės, kai koncentracija yra mažesnė nei mažiausia netirpumo koncentracija, veikimo bandomąja chemine medžiaga pabaigoje, esant didžiausiai analizuojamai koncentracijai, turėtų atsirasti drumstumas arba nuosėdos, matomos plika akimi arba per inversinį mikroskopą. Netgi jei citotoksiškumas pasireiškia, kai koncentracija yra didesnė nei mažiausia netirpumo koncentracija, patartina bandyti tik esant vienai drumstumą ar matomas nuosėdas sukeliančiai koncentracijai, nes

dėl nuosėdų gali būti gauti klaidingi rezultatai. Esant koncentracijai, kurioje susidaro nuosėdos, reikėtų imtis priemonių užtikrinti, kad nuosėdos netrukdytų atlikti bandymą. Gali padėti tirpumo nustatymas kultūros terpėje prieš atliekant bandymą.

22. Jei nuosėdų ar ribinio citotoksiškumo nestebima, didžiausia bandymo koncentracija turėtų atitikti 10 mmol/l, 2 mg/ml ar 2 µl/ml, pasirenkant mažiausią (39) (40). Jei bandomoji cheminė medžiaga yra neapibrėžtos sudėties, pvz., nežinomos ar kintamos sudėties medžiaga, sudėtingųjų reakcijų produktai ar biologinės medžiagos (t. y. nežinomos ar kintamos sudėties cheminės medžiagos, UVCB) (41), aplinkos ėminių ekstraktai ir kt., nesant pakankamam citotoksiškumui, gali prireikti didesnės didžiausios koncentracijos (pvz., 5 mg/ml), kad būtų didesnė kiekvieno iš komponentų koncentracija. Reikėtų pažymėti, kad žmonėms skirtiems vaistiniams preparatams šie reikalavimai gali būti skirtingi (42).

Kontroliniai ėminiai

23. Kiekvienai bandymo sąlygai reikėtų įtraukti vienalaikius neigiamus kontrolinius ėminius (žr. 16 pastraipą), sudarytus vien tik iš tirpiklio apdorojimo terpėje ir tvarkomus taip pat, kaip apdorojamos kultūros.
24. Vienalaikiai teigiami kontroliniai ėminiai yra būtini siekiant įrodyti laboratorijos gebėjimą naudojamo bandymų protokolo sąlygomis identifikuoti mutagenus ir egzogeninės metabolinio aktyvinimo sistemos efektyvumą, jei tinka. Teigiamų kontrolinių ėminių pavyzdžiai pateikiami toliau 1 lentelėje. Galima naudoti alternatyvias teigiamas kontrolines chemines medžiagas, jei tai būtų pagrįsta. Kadangi genetinio toksiškumo žinduolių ląstelėms bandymai *in vitro* yra pakankamai standartizuoti, bandymai, naudojant metabolinio aktyvinimo apdorojimą ar be jo, gali būti atliekami naudojant tik teigiamą kontrolinį ėminį, kuriam būtinas metabolinis aktyvinimas. Šiuo atveju vieno teigiamo kontrolinio ėminio atsakas įrodys metabolinio aktyvinimo sistemos aktyvumą ir bandymo sistemos jautrį. Kiekvienas teigiamas kontrolinis ėminys turėtų būti naudojamas vienos arba kelių koncentracijos verčių, kurioms esant būtų galima tikėtis gauti atkuriamą ir aptinkamą didesnę nei fonas atsaką, kad būtų galima įrodyti bandymo sistemos jautrį, ir atsako neturėtų sutrikdyti citotoksiškumas, kuris viršytų šiam bandymo metodui nustatytas ribas (žr. 20 pastraipą).

1 lentelė. Etaloninės medžiagos, rekomenduojamos laboratorijos kvalifikacijai vertinti ir teigiamiems kontroliniams ėminiams pasirinkti.

Metabolinio aktyvinimo sąlygos	Lokusas	Cheminė medžiaga ir jos CAS Nr.
Egzogeninio metabolinio aktyvinimo nėra	<i>Hprt</i>	Etilmetansulfonatas [CAS Nr. 62-50-0] Etilnitrozokarbamidas [CAS Nr. 759-73-9] 4-nitrochinolino 1-oksidas [CAS Nr. 56-57-5]

	<i>xprt</i>	Streptonigrinas [CAS Nr. 3930-19-6] Mitomicinas C [CAS Nr. 50-07-7]
Egzogeninis metabolinis aktyvinimas yra	<i>Hprt</i>	3-metilcholantrenas [CAS Nr. 56-49-5] 7,12-dimetilbenzantracenas [CAS Nr. 57-97-6] Benz[a]pirenas (CAS Nr. 50-32-8)
	<i>xprt</i>	Benz[a]pirenas (CAS Nr. 50-32-8)

PROCEDŪRA

Apdorojimas bandomąja chemine medžiaga

25. Proliferuojančios ląstelės veikiamos bandomąja chemine medžiaga esant metabolinio aktyvinimo sistemai arba jos nesant. Ekspozicija turėtų trukti tinkamą laiką (paprastai pakanka nuo 3 iki 6 valandų).
26. Mažiausias kiekvienos bandymo kultūros (kontrolinės ir apdorotos) ląstelių skaičius kiekvienoje bandymo stadijoje turėtų būti pagrįstas spontaninių mutacijų dažniu. Apskritai patariama apdoroti ir pasėti tokį pakankamą ląstelių skaičių, kuris kiekvienoje kultūroje kiekvienu bandymo tarpsniu užtikrintų 10 spontaninių mutacijų skaičių (17). Spontaninių mutacijų dažnis paprastai yra nuo 5 iki 20×10^{-6} . Jei spontaninių mutacijų dažnis 5×10^{-6} , siekiant užtikrinti pakankamą spontaninių mutantų skaičių (10 arba daugiau) netgi kultūroms, apdorotoms esant koncentracijai, kuri apdorojimo metu sukelia 90 % citotoksiškumą (10 % santykinį išgyvenamumą), prireiktų apdoroti ne mažiau kaip 20×10^6 ląstelių. Be to, ekspresijos laikotarpiu turi būti auginamas pakankamas ląstelių skaičius (tačiau niekuomet ne mažiau kaip 2 milijonai) ir sėjamas mutantų atrankai (17).

Fenotipo ekspresijos trukmė ir mutacijų dažnio matavimas

27. Pasibaigus apdorojimo laikotarpiui, ląstelės auginamos, kad galėtų įvykti mutantinių ląstelių fenotipo ekspresija. Paprastai pakanka nuo 7 iki 9 parų, kad įvyktų beveik optimali naujai indukuotų *Hprt* ir *xprt* mutantų fenotipo ekspresija (43) (44). Šiuo laikotarpiu ląstelės yra reguliariai persėjamos, kad būtų užtikrintas jų eksponentinis augimas. Po fenotipo ekspresijos ląstelės sėjamos į terpę su atrankos medžiaga (6-tioguaninu) ir be jos, kad būtų nustatytas mutantų skaičius ir klonavimo efektyvumas atrankos metu. Galima pasėti naudojant lėkšteles vienasluoksnėms kultūroms arba mikrošulinėlių plokšteles ląstelėms suspensijoje. Mutantinių ląstelių atrankai jos turėtų būti sėjamos tokiu tankiu, kuris užtikrintų optimalų mutantinių ląstelių atgavimą (t. y. kad būtų išvengta metabolinės sąveikos) (17). Lėkštelės inkubuojamos pakankamam optimaliam kolonijų augimo laikotarpiui (pvz., 7–12 parų) ir kolonijos suskaičiuojamos. Mutacijų dažnis apskaičiuojamas pagal mutantinių kolonijų skaičių, pakoreguotą dėl klonavimo efektyvumo mutantų atrankos metu (formulės pateiktos 2 priedėlyje).

Laboratorijos kvalifikacija

28. Siekdama įgyti pakankamos bandymo atlikimo patirties prieš jį taikydama įprastiniams bandymams, laboratorija turėtų būti atlikusi etaloninių teigiamų cheminių medžiagų bandymų seriją, joms veikiant pagal skirtingus mechanizmus (bent vieną aktyviąją medžiagą su metaboliniu aktyvinimu, vieną – be jo, medžiagas pasirenkant iš 1 lentelės sąrašo) su įvairiais neigiamais kontroliniais ėminiais (naudojant įvairius tirpiklius ir (arba) nešiklius). Šių teigiamų ir neigiamų kontrolinių ėminių atsakas turėtų atitikti literatūros duomenis. Tai netaikoma patirties turinčioms laboratorijoms, t. y. kurios turi istorinių duomenų bazę, prieinamą kaip apibrėžta nuo 30 iki 33 pastraipose.
29. Pasirinktas teigiamas kontrolines chemines medžiagas (žr. 25 pastraipos 1 lentelę) reikėtų tirti tiek nesant metabolinio aktyvinimo, tiek jam esant, kad būtų galima įrodyti mutageninių cheminių medžiagų aptikimo kvalifikaciją, nustatyti metabolinio aktyvinimo sistemos efektyvumą ir įrodyti ląstelių augimo sąlygų apdorojimo, fenotipo ekspresijos ir mutantinių ląstelių atrankos bei skaičiavimo procedūrų tinkamumą. Pasirinktų cheminių medžiagų koncentracijos verčių intervalas turėtų būti pasirinktas taip, kad, siekiant įrodyti bandymo sistemos jautrį ir dinaminį intervalą, būtų gautas atkuriamas ir su koncentracija susijęs padidėjimas palyginti su fonu.

Istorinių kontrolinių ėminių duomenys

30. Laboratorija turėtų nustatyti:
- istorinių teigiamų kontrolinių ėminių intervalą ir pasiskirstymą,
 - istorinių neigiamų kontrolinių ėminių (neapdorotų, tirpiklio) intervalą ir pasiskirstymą.
31. Pirmą kartą gaunant duomenis, skirtus istorinių neigiamų kontrolinių ėminių pasiskirstymui, viena laikiai neigiami kontroliniai ėminiai turėtų atitikti paskelbtus kontrolinių ėminių duomenis (22). Kontrolinių ėminių pasiskirstymą papildant vis didesniu bandymų duomenų kiekiu, būtų gerai, kad viena laikiai neigiami kontroliniai ėminiai patektų į to skirstinio 95 % kontrolines ribas (17) (45) (46).
32. Laboratorijos istorinių neigiamų kontrolinių ėminių duomenų bazę iš pradžių turėtų sudaryti ne mažiau kaip 10 bandymų, bet būtų geriau, jei tokių palyginamosiomis bandymų sąlygomis atliktų bandymų skaičius būtų ne mažesnis kaip 20. Laboratorijos turėtų taikyti kokybės kontrolės metodus, tokius kaip kontrolinės diagramos (pvz., C tipo ar X juostinės diagramos (47)), kad galėtų nustatyti savo teigiamų ir neigiamų kontrolinių ėminių duomenų kintamumą ir įrodyti metodikos „valdomumą“ savo laboratorijoje (46). Papildomas rekomendacijas dėl istorinių duomenų kūrimo ir naudojimo (t. y. duomenų įtraukimo ir pašalinimo iš istorinių duomenų kriterijus ir tam tikro bandymo priimtino kriterijus) galima rasti literatūroje (45).
33. Neigiamų kontrolinių ėminių duomenis turėtų sudaryti pavienės kultūros arba, geriau, kartotinės kultūros mutacijų dažniai, kaip aprašyta 23 pastraipoje. Būtų gerai, jei

vienalaikiai neigiami kontroliniai ėminiai patektų į laboratorijos istorinių neigiamų kontrolinių ėminių duomenų bazės skirstinio 95 % kontrolines ribas (17) (45) (46). Jei vienalaikių neigiamų kontrolinių ėminių duomenys nepatenka į 95 % kontrolines ribas, jie gali būti tinkami įtraukti į istorinių kontrolinių ėminių pasiskirstymą, jei jie nėra kraštiniai riktai ir yra įrodymų, kad bandymo sistema yra „valdoma“ (žr. pirmiau) ir nėra techninių ar žmogaus klaidų.

34. Į visus bandymų protokolo pakeitimus reikėtų žiūrėti atsižvelgiant į jų suderinamumą su esamomis laboratorijos istorinių kontrolinių ėminių duomenų bazėmis. Esant didesnėms neatitiktims, turėtų būti kuriama nauja istorinių kontrolinių ėminių duomenų bazė.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Rezultatų pateikimas

35. Į pateikiamus rezultatus turėtų būti įtraukti visi duomenys, kurių reikia citotoksiškumui (išreikštam kaip santykinis išgyvenamumas) apskaičiuoti. Į duomenis apie apdorotas ir kontrolines kultūras turėtų būti įtrauktas ląstelių skaičius apdorojimo pabaigoje, iš karto po apdorojimo pasėtų ląstelių skaičius ir kolonijų skaičius (arba šulinėlių be kolonijų skaičius taikant mikrošulinėlių metodą). Kiekvienos kultūros santykinis išgyvenamumas turėtų būti išreikštas kaip procentinė dalis vienalaikio tirpiklio kontrolinio ėminio atžvilgiu (apibrėžtys pateiktos 1 priedėlyje).
36. Pateikti rezultatai taip pat turėtų aprėpti visus duomenis, kurių reikia mutacijų dažniui apskaičiuoti. Apdorotų ir kontrolinių kultūrų duomenis turėtų sudaryti: 1) ląstelių, pasėtų su atrankos medžiaga ir be jos, skaičius (kai ląstelės yra sėjamos mutantinių ląstelių atrankai), 2) lėkštelėse su atrankos medžiaga ir be jos suskaičiuotų kolonijų skaičius (arba kolonijų neturinčių šulinėlių skaičius taikant mikrošulinėlių metodą). Mutacijų dažnis apskaičiuojamas pagal mutantinių kolonijų skaičių (lėkštelėse su atrankos medžiaga), pakoreguotą dėl klonavimo efektyvumo (lėkštelėse be atrankos medžiagos). Mutacijų dažnį reikėtų išreikšti mutantinių ląstelių skaičiumi milijonui gyvybingų ląstelių (apibrėžtys pateiktos 1 priedėlyje).
37. Turėtų būti pateikti atskiri kiekvienos kultūros duomenys. Be to, visi duomenys turėtų būti įrašyti į lenteles.

Priimtino kriterijai

38. Bandymo priimtumas pagrįstas šiais kriterijais:

- vienalaikis neigiamas kontrolinis ėminys laikomas tinkamu įtraukti į laboratorijos istorinių neigiamų kontrolinių ėminių duomenų bazę, kaip aprašyta 33 pastraipoje;

- viena laikiai teigiami kontroliniai ėminiai (žr. 24 pastraipą) turėtų sukelti atsakus, kurie yra suderinami su sukurtais istorinių teigiamų kontrolinių ėminių duomenų bazėje, ir duoti statistiškai reikšmingą padidėjimą palyginti su viena laikiu neigiamu kontroliniu ėminiu;
- buvo bandoma esant dviem bandymo sąlygoms (t. y. su metaboliniu aktyvinimu ir be jo), jei teigiami rezultatai negaunami vienai iš jų (žr. 25 pastraipą).
- analizuojamas pakankamas ląstelių ir koncentracijos verčių skaičius (25, 26 ir 19 pastraipos).
- didžiausios koncentracijos pasirinkimo kriterijai atitinka aprašytus 20, 21 ir 22 pastraipose.

Rezultatų įvertinimas ir aiškinimas

39. Jei įvykdomi visi priimtumo kriterijai, bandomoji cheminė medžiaga laikoma aiškiai teigiama, jei, esant kuriai nors ištirtai bandymo sąlygai:

- bent vienai bandymo koncentracijai gaunamas statistiškai reikšmingas padidėjimas palyginti su viena laikiu neigiamu kontroliniu ėminiu,
- padidėjimas yra susijęs su koncentracija, kai įvertinama pagal atitinkamą tendencijos kriterijų;
- visi rezultatai yra už istorinių neigiamų kontrolinių ėminių duomenų skirstinio ribų (pvz., Puasono skirstinio 95 % kontrolinių ribų, žr. 33 pastraipą).

Atitinkant visus šiuos kriterijus, laikoma, kad bandomoji cheminė medžiaga gali sukelti šioje bandymų sistemoje auginamos žinduolių ląstelių kultūros genų mutacijas. Rekomendacijų dėl tinkamiausių statistinių metodų galima rasti literatūroje (46) (48).

40. Jei įvykdomi visi priimtumo kriterijai, bandomoji cheminė medžiaga laikoma aiškiai neigiama, jei visomis ištirtomis bandymo sąlygomis:

- jokiai bandymo koncentracijai negaunamas statistiškai reikšmingas padidėjimas palyginti su viena laikiu neigiamu kontroliniu ėminiu,
- nėra su koncentracija susijusio padidėjimo, kai įvertinama pagal atitinkamą tendencijos kriterijų,
- visi rezultatai patenka tarp istorinių neigiamų kontrolinių ėminių duomenų skirstinio ribų (pvz., Puasono skirstinio 95 % kontrolinių ribų; žr. 33 pastraipą).

Tada laikoma, kad bandomoji cheminė medžiaga negali sukelti šioje bandymų sistemoje auginamos žinduolių ląstelių kultūros genų mutacijų.

41. Nėra reikalavimo patikrinti aiškų teigiamą ar neigiamą atsaką.

42. Tais atvejais, kai atsakas nėra aiškiai neigiamas ar aiškiai teigiamas, kaip apibūdinta pirmiau, arba siekiant padėti nustatyti rezultato biologinę svarbą, duomenys turėtų būti

įvertinti pateikiant ekspertų nuomonę ir (arba) atliekant papildomus tyrimus. Galėtų būti naudinga atlikti kartotinį bandymą, galbūt pakeistomis bandymo sąlygomis (pvz., esant kitiems tarpams tarp koncentracijos verčių, kitoms metabolinio aktyvinimo sąlygoms (t. y. S9 koncentracijai ar S9 kilmei)).

43. Retais atvejais, netgi atlikus papildomus tyrimus, gautų duomenų rinkinio nepakaks padaryti išvadą, ar rezultatai yra teigiami ar neigiami. Todėl būtų daroma išvada, kad bandomosios cheminės medžiagos atsakas yra abejotinas (aiškinama, kad jis gali būti vienodai teigiamas ar neigiamas).

Bandymo ataskaita

44. Į bandymo ataskaitą turėtų būti įtraukta ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga:

- šaltinis, partijos numeris, naudojimo pabaigos data, jei yra;
- pačios bandomosios cheminės medžiagos stabilumas, jei žinomas;
- bandomosios cheminės medžiagos tirpumas tirpiklyje ir stabilumas, jei žinomas;
- pH, osmolialumo ir nuosėdų matavimas kultūros terpėje, į kurią bandomoji cheminė medžiaga buvo pridėta, jei reikia.

Vienkomponentė medžiaga:

- fizinė išvaizda, tirpumas vandenyje ir papildomos būdingos fizikinės ir cheminės savybės;
- cheminio identifikavimo duomenys, pvz., IUPAC ar CAS pavadinimas, CAS numeris, SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė, grynumas, cheminis priemaišų pavadinimas, jei tinka bei praktiškai įmanoma ir kt.;

Daugiakomponentė medžiaga, UVCB ir mišiniai:

- kuo išsamesnis sudedamųjų dalių apibūdinimas, nurodant cheminį pavadinimą (žr. pirmiau), kiekybinį paplitimą ir būdingas fizikines ir chemines savybes.

Tirpiklis:

- tirpiklio pasirinkimo pagrindimas;
- tirpiklio galutinėje kultūros terpėje procentinė dalis.

Ląstelės:

laboratorijos pagrindinių kultūrų:

- ląstelių linijų tipas ir šaltinis;
- sėjimų laboratorijoje skaičius, jei yra, ir istorija;

- kariotipo ypatybės ir (arba) modalinis chromosomų skaičius;
- ląstelių kultūros priežiūros metodai;
- ar nėra užkrėstos mikoplazmomis;
- ląstelių dvigubėjimo trukmė.

Bandymo sąlygos:

- koncentracijos verčių ir kultūrų skaičiaus pasirinkimo pagrindimas, įskaitant, pvz., citotoksiškumo duomenis ir tirpumo apribojimus;
- terpių sudėtis, CO₂ koncentracija, drėgmės lygis;
- bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, išreikšta kaip galutinė koncentracija kultūros terpėje (pvz., µg ar mg/ml arba mmol/l kultūros terpės).
- tirpiklio ir bandomosios cheminės medžiagos, pridėtos į kultūros terpę, koncentracija (ir (arba) tūris);
- inkubavimo temperatūra;
- inkubavimo trukmė;
- apdorojimo trukmė;
- ląstelių tankis apdorojimo metu,
- metabolinio aktyvinimo sistemos tipas ir sudėtis (S9 šaltinis, S9 mišinio paruošimo metodas, S9 mišinio ir S9 galutinėje kultūros terpėje koncentracija ar tūris, S9 kokybės kontrolės ėminiai);
- teigiamos ir neigiamos kontrolinės cheminės medžiagos, galutinės koncentracijos vertės kiekvienai apdorojimo sąlygai;
- ekspresijos laikotarpio trukmė (įskaitant pasėtų ląstelių skaičių, persėjimo ir maitinimo tvarkaraščiai, jei reikia),
- atrankos medžiagos identifikavimo duomenys ir jos koncentracija;
- bandymų priimtinumą kriterijai;
- gyvybingų ir mutantinių ląstelių skaičiaus nustatymo metodai,
- citotoksiškumo matavimo metodai,
- visa papildoma informacija, susijusi su citotoksiškumu ir taikomu metodu;
- inkubavimo po sėjimo trukmė;
- tyrimų vertinimo kaip teigiamų, neigiamų ar abejotinių kriterijai;
- pH, osmolialumo ir nuosėdų nustatymo metodai.

Rezultatai:

- kiekvienos kultūros apdorotų ląstelių skaičius ir persėjamų ląstelių skaičius;
- citotoksiškumo matavimai ir kiti stebėjimų rezultatai, jei yra;
- nuosėdų požymiai ir nustatymo laikas;
- į atrankiąją ir neatrankiąją terpę pasėtų ląstelių skaičius;
- kolonijų skaičius neatrankiojoje terpėje ir atsparių kolonijų skaičius atrankiojoje terpėje, ir susijęs mutacijų dažnis;
- koncentracijos ir atsako priklausomybė, jei įmanoma,
- vienalaikio neigiamo (tirpiklio) ir teigiamo kontrolinio ėminio duomenys (koncentracijos vertės ir tirpikliai);
- istorinių neigiamų (tirpiklio) ir teigiamų kontrolinių ėminių duomenys, intervalai, vidurkiai ir standartiniai nuokrypiai bei pasiklioavimo intervalas (pvz., 95 %), taip pat duomenų skaičius;
- statistinės analizės rezultatai (atskirų kultūrų ir sujungtų kartotinių ėminių, jei reikia), ir p vertės, jei yra.

*Rezultatų aptarimas.**Išvada*

LITERATŪRA

- (1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Paris.
- (2) Moore M.M., DeMarini D.M., DeSerres F.J. 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.
- (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. (Manuscript in preparation).
- (23) Coecke S., Balls M., Bowe G., Davis J., Gstraunthaler G., Hartung T., Hay R., Merten O.W., Price A., Schechtman L., Stacey G. and Stokes W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, *ATLA*, 33, 261-287.
- (24) Rosen M.P., San R.H.C. and Stich H.F. (1980). Mutagenic Activity of Ascorbate in Mammalian Cell Cultures, *Can. Lett.* 8, 299-305.
- (25) Natarajan A.T., Tates A.D, Van Buul P.P.W., Meijers M. and de Vogel N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. *Mutation Res.*, 37, 83-90.
- (26) Abbondandolo A., Bonatti S., Corti G., Fiorio R., Loprieno N. and Mazzaccaro A. (1977). Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine. *Mutation Res.*, 46, 365-373.
- (27) Ames B.N., McCann J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 31, 347-364.
- (28) Maron D.M. and Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 113, 173, 215.
- (29) Elliott B.M., Combes R.D., Elcombe C.R., Gatehouse D.G., Gibson G.G., Mackay J.M. and Wolf R.C. (1992) Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. *Mutagen.* 7, 175-177.
- (30) Matsushima T., Sawamura M., Hara K. and Sugimura T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres F.J., Fouts J.R., Bend J.R. and Philpot R.M. (Eds), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

- (31) Ong T.-m., Mukhtar M., Wolf C.R. and Zeiger E. (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, 4, 55-65.
- (32) Johnson T.E., Umbenhauer D.R. and Galloway S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, *Environ. Mol. Mutagen.*, 28, 51-59.
- (33) JTAP (2001). Stokholmo konvencija dėl patvariųjų organinių teršalų, Jungtinių Tautų aplinkos programa (JTAP). Pateikta [<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, pp. 91-103.
- (38) Zamora P.O., Benson J.M., Li A.P. and Brooks A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. *Environ. Mutagen.*, 5, 795-801.
- (39) OECD (2014). Document Supporting the WNT Decision to Implement Revised Criteria for the Selection of the Top Concentration in the *In Vitro* Mammalian Cell Assays on Genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487). Galima gauti iš Ekonominio bendradarbiavimo ir plėtros organizacijos.
- (40) Brookmire L., Chen J.J. and Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay, *Environ. Mol. Mutation*, 54, 36-43.

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

1 priedėlis

APIBRĖŽTYS

Bazių porų pakaitas sukeliantys mutagenai – cheminės medžiagos, sukeliančios DNR molekulės bazių porų pakaitą.

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

Klonavimo efektyvumas – mažu tankiu pasėtų ląstelių, galinčių išaugti į suskaičiuojamą ląstelių koloniją, procentinė dalis.

Koncentracijos vertės – bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos kultūros terpėje galutinės vertės.

Citotoksiškumas – pagal šio metodo bandymus citotoksiškumas identifikuojamas kaip apdorotų ląstelių santykinio išgyvenamumo sumažėjimas, palyginti su neigiamu kontroliniu ėminiu (žr. konkrečią pastraipą).

Tiesioginė mutacija – tėvinio tipo geno mutacija į mutantinę formą, dėl ko pakinta ar išnyksta koduojamo baltymo fermentinis aktyvumas arba funkcija.

Mutagenai, sukeliantys skaitymo rėmelio poslinkį – cheminės medžiagos, sukeliančios vienos ar kelių DNR molekulės bazių porų intarpus ar iškritas.

Genotoksinis – bendrasis terminas, kuriuo išreiškiamas visų tipų DNR arba chromosomų pažeidimas, įskaitant DNR trūkius, aduktus, pergrupavimus, mutacijas, chromosomų aberacijas ir aneuploidiją. Ne visų tipų genotoksiniai poveikiai sukelia mutacijas ar pastovų chromosomų pažeidimą.

HAT terpė – terpė, turinti hipoksantino, aminopterino ir timidino, naudojama Hp^rt mutantams valyti.

Mitozinė rekombinacija – rekombinacija tarp homologinių chromatidžių mitozės metu, kuri gali sukelti DNR dviejų grandinių trūkius arba heterozigotiškumo praradimą.

MPA terpė – terpė, turinti ksantino, adenino, timidino, aminopterino ir mikofenolio rūgšties, naudojama Xp^rt mutantams valyti.

Mutageninis – sukeliantis paveldimą DNR bazinės poros sekos (-ų) pokytį genuose arba chromosomų struktūroje (chromosomų aberacijas).

Mutacijų dažnis – stebimų mutantinių ląstelių kolonijų skaičius, padalytas iš į atrankiąją terpę pasėtų ląstelių skaičiaus, pakoreguoto dėl klonavimo efektyvumo (arba gyvybingumo) atrankos metu.

Fenotipo ekspresijos trukmė – laikas po apdorojimo, per kurį nustatomas genomo genetinis

pokytis ir visi anksčiau buvusio geno produktai pašalinami tiek, kad pakinta fenotipinis požymis.

Santykinis išgyvenamumas – santykinis išgyvenamumas naudojamas kaip su apdorojimu susijusio citotoksiškumo matas. Santykinis išgyvenamumas yra iš karto po apdorojimo sėjamų ląstelių klonavimo efektyvumas, koreguotas dėl ląstelių nuostolių apdorojimo metu, palyginti su neigiamų kontrolinių ėminių klonavimo efektyvumu (priskirtas 100 % išgyvenamumas).

S9 kepenų frakcijos – skystis virš kepenų homogenato, gautas po centrifugavimo esant 9000 g, t. y. žalių kepenų ekstraktas.

S9 mišinys – S9 kepenų frakcijos ir fermentų metaboliniam aktyvumui būtinų kofaktorių mišinys.

Tirpiklio kontrolinis ėminys – bendrasis terminas, apibūdinantis kontrolines kultūras, į kurias dedama vien tik tirpiklio, naudoto bandomajai cheminei medžiagai ištirpinti.

Bandomoji cheminė medžiaga – taikant šį metodą bandoma medžiaga arba mišinys.

Neapdorotas kontrolinis ėminys – kultūros, kurios neapdorojamos (t. y. į jas nededama bandomosios cheminės medžiagos ar tirpiklio), bet su jomis vienu metu atliekami veiksmai kaip su kultūromis, į kurias dedama bandomoji cheminė medžiaga.

UVCB – nežinomos ar kintamos sudėties medžiagos, sudėtingųjų reakcijų produktai ir biologinės medžiagos.

2 priedėlis**CITOTOKSIŠKUMO IR MUTACIJŲ DAŽNIO VERTINIMO FORMULĖS**

Citotoksiškumas įvertinamas pagal santykinį išgyvenamumą, t. y. iš karto po apdorojimo sėjamų ląstelių klonavimo efektyvumą (CE), koreguotą dėl ląstelių nuostolių apdorojimo metu, palyginti su neigiamų kontrolinių ėminių koreguotu klonavimo efektyvumu (priskirtas 100 % išgyvenamumas) (santykinio išgyvenamumo formulė pateikta toliau).

Bandomąja chemine medžiaga apdorotos kultūros koreguotas CE skaičiuojamas taip:

$$\text{Koreguotas CE} = \frac{\text{ląstelių skaičius po apdorojimo}}{\text{ląstelių skaičius prieš apdorojimą}}$$

Bandomąja chemine medžiaga apdorotos kultūros santykinis išgyvenamumas skaičiuojamas taip:

$$\text{Santykinis išgyvenamumas} = \frac{\text{koreguotas CE apdorotoje kultūroje}}{\text{koreguotas CE tirpiklio kultūroje}} \times 100$$

Mutacijų dažnis yra mutantinių kolonijų atrankiojoje terpėje klonavimo efektyvumas, padalytas iš klonavimo efektyvumo neatrankiojoje terpėje, išmatuoto tai pačiai kultūrai atrankos metu.

$$\text{Mutacijų dažnis} = \frac{\text{mutavusių kolonijų klonavimo efektyvumas atrankiojoje terpėje}}{\text{klonavimo efektyvumas neatrankiojoje terpėje}}$$

Jei klonavimo efektyvumui nustatyti naudojamos lėkštelės:

CE = kolonijų skaičius/pasėtų ląstelių skaičius.

Jei klonavimo efektyvumui nustatyti naudojamos mikrošulinėlių plokštelės:

Kolonijų skaičius vienam mikrošulinėlių plokštelės šulinėliui atitinka Puasono pasiskirstymą.

Klonavimo efektyvumas = $-\ln P(0)$ /viename šulinėlyje pasėtų ląstelių skaičius.

Čia: $-\ln P(0)$ yra tikėtino tuščių šulinėlių skaičiaus ir visų pasėtų šulinėlių skaičiaus santykio natūrinis logaritmas, kuris išreiškimas tokia formule:

$\ln P(0) = -\ln (\text{tuščių šulinėlių skaičius/pasėtų šulinėlių skaičius}).$

3) B dalies B.22 skyrius pakeičiamas taip:

„B.22 GRAUŽIKŲ DOMINANTINIO LETALUMO BANDYMAS

IVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymo gaires 478 (2016). Bandymų metodai periodiškai peržiūrimi, atsižvelgiant į mokslo pažangą, kintamus reglamentavimo poreikius ir gyvūnų gerovės aspektus. Ši modifikuota bandymo metodo versija rodo beveik trisdešimt metų šio bandymo naudojimo patirtį ir galimybę jį integruoti arba derinti su kitais toksiškumo bandymais, pvz., toksiškumo vystymuisi, reprodukcijai, arba su genotoksiškumo tyrimais; tačiau dėl ribotumo ir daugelio gyvūnų naudojimo šis bandymas nėra numatytas taikyti kaip pagrindinis metodas, bet kaip papildomas bandymo metodas, kuris gali būti taikomas tik tais atvejais, kai reglamentavimo tikslais nėra kitos alternatyvos. Toksiškumo bandymų derinimas sudaro galimybę apsaugoti daugelį gyvūnų nuo naudojimo toksiškumo bandymams. Yra parengtas EBPO dokumentas, kuriame glaustai pateikiama informacija apie genetinės toksikologijos bandymus ir naujausių genetinės toksikologijos bandymų EBPO gairių pakeitimų apžvalga (1).
2. Dominantinio letalumo bandymo tikslas – ištirti, ar cheminės medžiagos sukelia mutacijas dėl embrioninių ląstelių chromosomų aberacijų. Be to, dominantinio letalumo (DL) bandymas tinka genotoksiškumui vertinti, nes, nors skirtingų gyvūnų rūšims metabolizmo *in vivo* veiksniai, farmakokinetika ir DNR atkūrimo procesai gali skirtis, jie yra aktyvūs ir prisideda prie atsako. Bandomosios cheminės medžiagos sukelta DL mutacija rodo, kad cheminė medžiaga paveikė bandymo gyvūno embrionų audinius.
3. DL mutacijos yra embriono ar vaisiaus žūties priežastis. Bandomosios cheminės medžiagos sukelta DL mutacija rodo, kad cheminė medžiaga paveikė bandymo gyvūno embrionų ląsteles.
4. DL bandymas yra naudingas, kai reikia patvirtinti teigiamus rezultatus, gautus atliekant bandymus, kuriuose naudojamos somatinės *in vivo* vertinamosios baigtys, ir yra tinkama vertinamoji baigtis prognozuojant pavojų žmogui ir per embrionines ląsteles perduodamų genetinių ligų riziką. Tačiau šiam bandymui reikia labai didelio gyvūnų skaičiaus ir didelių darbo sąnaudų; dėl šios priežasties jis yra labai brangus ir reikalauja daug laiko. Kadangi spontaninių dominantinių letalių mutacijų dažnis yra gana didelis, bandymo jautris aptinkant nedidelius mutacijų dažnio pokyčius dažniausiai yra ribotas.
5. Pagrindinių terminų apibrėžtys pateiktos 1 priedėlyje.

PRADINIAI ASPEKTAI

6. Dažniausiai bandymas atliekamas su pelėmis (2) (3) (4), tačiau kai kuriais atvejais gali tikt kitos rūšys, pvz., žiurkės (5) (6) (7) (8), jei tai moksliskai pagrįsta. DL paprastai yra didelių chromosominių aberacijų rezultatas (struktūrinių ir skaičiaus nukrypimų) (9) (10) (11), bet genų mutacijos negalima atmesti. DL mutacija yra embriono ląstelėje *per se* vykstanti mutacija arba po apvaisinimo ankstyvosios stadijos embrione fiksuojama mutacija, kuri nesukelia lytinės ląstelės disfunkcijos, bet yra mirtina apvaisintai kiaušialąstei arba besivystančiam embrionui.
7. Atskiri patinai atitinkamais intervalais nuosekliai poruojami su neapvaisintomis patelėmis. Poravimų skaičius po apdorojimo priklauso nuo galutinio DL tyrimo tikslo (23 pastraipa) ir turėtų užtikrinti, kad visi patinų lytinių ląstelių brendimo tarpsniai yra įvertinti dėl DL (12).
8. Jei yra duomenų, kad bandomoji cheminė medžiaga ar jos metabolitas (-ai) nepasiekia sėklidės, jai tirti šis bandymas netinka.

BANDYMO PRINCIPAS

9. Paprastai vyriškos lyties gyvūnai yra veikiami bandomąja chemine medžiaga taikant tinkamą ekspozicijos būdą ir poruojami su neapvaisintomis patelėmis. Gali būti bandomi skirtingi lytinių ląstelių tipai, taikant nuoseklaus poravimosi intervalus. Po poravimosi patelės po tam tikro laikotarpio numarinamos ir tiriamos jų gimdos, siekiant nustatyti implantų, gyvų ir negyvų embrionų skaičių. Bandomosios cheminės medžiagos dominuojantis letalumas nustatomas lyginant apdorojamos grupės vienos patelės gyvus implantus su nešiklio arba tirpiklio kontrolinės grupės vienos patelės gyvais implantais. Didesnis apdorotos grupės vienos patelės negyvų implantų skaičius, palyginti su kontrolinės grupės vienos patelės implantų skaičiumi, rodo bandomosios cheminės medžiagos sukeltus nuostolius po implantavimosi. Nuostoliai po implantavimosi skaičiuojami lyginant apdorotos grupės negyvų ir visų implantų santykį su kontrolinės grupės negyvų ir visų implantų santykiu. Nuostoliai prieš implantavimąsi gali būti įvertinami lyginant geltonkūnių ir visų implantų skaičiaus skirtumą arba apdorotos ir kontrolinės grupės vienos patelės visus implantus.

LABORATORIJOS KVALIFIKACIJOS TIKRINIMAS

10. Kompetencija atlikti šį bandymą turėtų būti nustatyta įrodant gebėjimą atkurti paskelbtus dominantinio letalumo dažnio duomenis, gautus 1 lentelėje nurodytoms teigiamoms kontrolinėms medžiagoms (įskaitant silpnus atsakus) (pvz., (13) (14) (15) (16) (17) (18)) ir nešiklio kontroliniams ėminiams, ir neigiamiems kontroliniams ėminiams gaunant dažnius, kurie yra suderinami su priimtinių duomenų intervalu (žr. aukščiau pateiktas nuorodas) arba su laboratorijos istoriniu kontrolinių ėminių pasiskirstymu, jei yra.

METODO APRAŠYMAS

Parengiamieji darbai

Gyvūnų rūšies parinkimas

11. Reikėtų naudoti dažniausiai naudojamas sveikų lytiškai subrendusių gyvūnų laboratorines veisles. Paprastai naudojamos pelės, nors taip pat gali tikti žiurkės. Galima naudoti kitas tinkamas žinduolių rūšis, jei ataskaitoje tai būtų moksliskai pagrįsta.

Gyvūnų laikymo ir šėrimo sąlygos

12. Jei naudojami graužikai, temperatūra gyvūnų patalpoje turėtų būti 22 °C (± 3 °C). Nors geriausia būtų užtikrinti 50–60 % drėgmę, ji neturėtų būti mažesnė kaip 40 % ir būtų gerai, jei ji nebūtų didesnė kaip 70 %, išskyrus patalpos valymo laiką. Apšvietimas turėtų būti dirbtinis, taikant 12 h šviesos ir 12 h tamsos seką. Gyvūnams šerti tinka įprastas laboratorijose naudojamas pašaras, neribojant geriamojo vandens kiekio. Pašaro pasirinkimui gali turėti įtakos būtinybė užtikrinti tinkamą bandomosios cheminės medžiagos sumaišymą su pašaru, kai ji duodama tokiu būdu. Jei nesitikima agresyvaus elgesio, prieš apdorojimą ar poravimą graužikus reikėtų laikyti nedidelėmis tos pačios lyties grupėmis (ne daugiau kaip po penkis), pageidautina kietuose narveliuose ir esant atitinkamai pagerintai aplinkai. Moksliskai pagrįstais atvejais gyvūnus galima laikyti atskirai.

Gyvūnų paruošimas

13. Sveiki ir lytiškai subrendę patinai atsitiktinės atrankos būdu suskirstomi į kontrolines ir apdorojamas grupes. Atskiri gyvūnai unikaliai ženklinami minimaliai invaziniu humanišku būdu (pvz., žieduojami, naudojama etiketė, mikrolustas ar biometrinis identifikavimas, bet ne ausų ar pėdos pirštų spaustukai) ir aklimatizuojami laboratorinėmis sąlygomis ne trumpiau kaip 5 paras. Narvelius reikėtų išdėstyti taip, kad narvelio vietos poveikis būtų kiek įmanoma mažesnis. Reikėtų vengti kryžminio užteršimo teigiamu kontroliniu ėminiu ir bandomąja chemine medžiaga. Tyrimo pradžioje gyvūnų masės skirtumas turėtų būti kuo mažesnis ir būti ne didesnis kaip ± 20 % kiekvienos lyties gyvūno vidutinės masės.

Dozių ruošimas

14. Kietosios bandomosios cheminės medžiagos prieš dozuoiant jas gyvūnams turėtų būti ištirpinamos atitinkamuose tirpikliuose ar nešikliuose arba gaunama jų suspensija, arba įmaišomos į pašarą ar geriamąjį vandenį. Skystąsias bandomąsias chemines medžiagas galima dozuoti tiesiogiai arba prieš dozavimą praskiesti. Jei bandomosios cheminės medžiagos patenka per kvėpavimo takus, jas galima duoti dujų, garų arba kietosios ar skystosios medžiagos aerozolio pavidalu, atsižvelgiant į jų fizikines ir chemines savybes. Reikėtų naudoti tik ką paruoštus bandomosios cheminės medžiagos preparatus, nebent stabilumo duomenys rodo, kad jas galima laikyti, ir šiuo atveju nurodomos tinkamos laikymo sąlygos.

Bandymų sąlygos

Tirpiklis ir (arba) nešiklis

15. Naudojamos tirpiklio ar nešiklio dozės neturėtų kelti jokio toksinio poveikio ir neturėtų kilti įtarimų, kad jis gali chemiškai reaguoti su bandomąja chemine medžiaga. Jei naudojami kiti nei gerai žinomi tirpikliai ar nešikliai, juos galima įtraukti, pateikus suderinamumą rodančius nuorodų duomenis. Rekomenduojama visuomet iš pradžių atsižvelgti į galimybę naudoti, jei įmanoma, vandeninį tirpiklį arba nešiklį. Dažniausiai naudojamų suderinamų tirpiklių ar nešiklių pavyzdžiai yra vanduo, fiziologinis tirpalas, metilceliuliozės tirpalas, karboksimetilceliuliozės natrio druskos tirpalas, alyvuogių ir kukurūzų aliejus.

Teigiami kontroliniai ėminiai

16. Visuomet reikėtų naudoti vienašakius teigiamų kontrolinių ėminių gyvūnus, išskyrus atvejus, kai laboratorija įrodė kompetenciją atliekant bandymą ir jį reguliariai naudojo netolimoje praeityje (pvz., per pastaruosius 5 metus). Tačiau teigiamai kontrolei naudojamus gyvūnus nebūtina apdoroti tokiu pat būdu, kaip bandomąją cheminę medžiagą gaunančius gyvūnus, arba imti visų poravimosi intervalų ėminius. Teigiamos kontrolinės cheminės medžiagos turėtų būti žinomos kaip sukeliančios DL atliekant bandymą naudojamomis sąlygomis. Išskyrus apdorojimą, su kontrolinių grupių gyvūnais turėtų būti elgiamasi taip pat, kaip su apdorojimo grupių gyvūnais.
17. Teigiamų kontrolinių cheminių medžiagų dozės turėtų būti parinktos taip, kad būtų gaunamas silpnas ar vidutinio stiprumo poveikis, pagal kurį būtų galima kritiškai vertinti bandymo rezultatyvumą ir jautrumą, tačiau jos turi nuolat sukelti teigiamą dominantinio letalumo poveikį. Teigiamų kontrolinių cheminių medžiagų ir atitinkamų dozių pavyzdžiai pateikti 1 lentelėje.

1 lentelė. Teigiamų kontrolinių cheminių medžiagų pavyzdžiai

Cheminė medžiaga [CAS Nr.] (nuorodos Nr.)	Efektyviosios dozės intervalas (mg/kg) (graužikų rūšis)	Davimo trukmė (paros)
Trietilenmelaminas [51-18-3] (15)	0,25 (pelės)	1
Ciklofosfamidą [50-18-0] (19)	50–150 (pelės)	5
Ciklofosfamidą [50-18-0] (5)	25–100 (žiurkės)	1
Etilmetansulfonatas [62-50-0] (13)	100–300 (pelės)	5
Monomerinis akrilamidas [79-06-1] (17)	50 (pelės)	5
Chlorambucilas [305-03-3] (14)	25 (pelės)	1

Neigiami kontroliniai ėminiai

18. Kiekvieną kartą imant ėminius reikėtų įtraukti neigiamos kontrolinės grupės gyvūnus, kuriems buvo duodamas tik tirpiklis arba tik nešiklis ir kitais atžvilgiais su jais buvo elgiamasi kaip su apdorojamomis grupėmis (20). Jei nėra istorinių arba paskelbtų kontrolinių duomenų, kurie rodytų, kad pasirinktas tirpiklis arba nešiklis nesukelia DL arba kitokio žalingo poveikio, neapdoroti kontroliniai gyvūnai taip pat turėtų būti įtraukti kiekvieną kartą imant ėminius nešiklio kontrolinio ėminio priimtinumui nustatyti.

PROCEDŪRA**Gyvūnų skaičius**

19. Atskiri patinai atitinkamais intervalais (pvz., kas savaitę, 21 ir 23 pastraipos) nuosekliai poruojami, pageidautina su viena neapvaisinta patele. Patinų skaičius grupėje turėtų būti nustatytas iš anksto ir jo turi pakakti (derinant su poruojamų patelių skaičiumi kiekvienam poravimosi intervalui) tam, kad būtų užtikrinta statistinė galia, kuri yra būtina bent DL dažnio padvigubėjimui aptikti (44 pastraipa).
20. Poruojamų patelių skaičius kiekvienam poravimosi intervalui turėtų būti nustatytas iš anksto atliekant statistinės galios skaičiavimus, kad būtų galima aptikti bent DL dažnio padvigubėjimą (t. y. vaikingos patelės bendrai turėtų duoti ne mažiau kaip 400 implantų) (20) (21) (22) (23) ir tikimasi gauti bent vieną negyvą implantą analizės vienetui (t. y. vienos dozės poravimo grupei) (24).

Dozių davimo laikotarpis ir poravimosi intervalai

21. Poravimosi po apdorojimo intervalų skaičius priklauso nuo apdorojimo tvarkaraščio ir turėtų būti užtikrinta, kad visi patinų lytinių ląstelių brendimo tarpsniai būtų įvertinami dėl sukkelto DL (12) (25). Vienkartiniam apdorojimui duodant iki penkių dozių per parą turėtų būti 8 (pelių) arba 10 (žiurkių) poravimųsi, atliekamų kas savaitę po paskutinio apdorojimo. Duodant kartotinę dozę, poravimosi intervalų skaičius gali būti sumažintas proporcingai padidėjusiai davimo laikotarpio trukmei, tačiau užtikrinant tikslą įvertinti visus spermatogenezės tarpsnius (pvz., po 28 parų trukusios ekspozicijos pakanka tik 4 poravimųsi kas savaitę, kad būtų įvertinti visi pelių spermatogenezės tarpsniai). Visi apdorojimo ir poravimosi tvarkaraščiai turėtų būti moksliškai pagrįsti.
22. Patelės turėtų būti paliekamos su patiniais bent ne trumpiau kaip vieno rujos ciklo trukmei (pvz., pelių ir žiurkių vieno rujos ciklo trukmė viena savaitė). Patelės, kurios nesusiporavo vienos savaitės laikotarpiu, gali būti naudojamos paskesniajam poravimosi intervalui. Kitu atveju gyvūnai laikomi, kol susiporuoja – tai nustatoma pagal spermos buvimą makštyje arba pagal poravimosi kamščio buvimą.

23. Naudojami ekspozicijos ir poravimosi režimai priklauso nuo galutinio DL tyrimo tikslo. Jei tikslas yra nustatyti, ar duotoji cheminė medžiaga sukelia DL mutacijas *per se*, priimtinas metodas būtų ekspozicija per visą spermatogenezės ciklą (pvz., 7 savaites pelėms, 5–7 dozės per savaitę) ir vienas poravimasis pabaigoje. Tačiau, jei tikslas yra identifikuoti DL mutacijai jautrių lytinių ląstelių tipą, tada pirmenybė teikiama vienkartiniai arba 5 parų ekspozicijai ir poravimuisi savaitę.

Dozių dydžiai

24. Jei atliekamas parengiamasis intervalo nustatymo tyrimas, nes nėra tinkamų duomenų, kurie padėtų pasirinkti dozę, jį reikėtų atlikti toje pačioje laboratorijoje, naudojant pagrindiniam tyrimui naudoti numatytą rūšį, veislę, lytį ir apdorojimo schemą (26). Tyrimo tikslas – nustatyti didžiausią toleruojamą dozę (DTD), apibrėžiamą kaip didžiausia dozė, kuri būtų toleruojama nesant tyrimą ribojančio toksiškumo požymių, susijusių su tyrimo laikotarpio trukme (pvz., nenormalus elgesys ar reakcija, kūno masės sumažėjimas arba hematopoetinės sistemos citotoksiškumas), bet nesukeltų žūties ar skausmo, kančių ar išsekimo požymių, dėl kurių gyvūną reikėtų humaniškai numarinti (27).
25. DTD taip pat turi nedaryti poveikio poravimosi sėkmei (21).
26. Cheminėms medžiagoms, kurios pasižymi specifiniu biologiniu aktyvumu, esant mažoms netoksinėms dozėms (pavyzdžiui, hormonams ir mitogenams), ir cheminėms medžiagoms, kurioms būdinga toksikokinetinių savybių soties riba, gali būti taikomos išimtys dozių nustatymo kriterijams ir šias chemines medžiagas reikėtų įvertinti kiekvienu atveju atskirai.
27. Siekiant gauti informacijos apie dozės ir atsako priklausomybę, į išsamų tyrimą reikėtų įtraukti neigiamo kontrolinio ėminio grupę ir ne mažiau kaip tris dozes, kurių dydžio skirtumo faktorius būtų 2, bet ne didesnis kaip 4. Jei bandomoji cheminė medžiaga nerodo toksiškumo atliekant intervalo nustatymo tyrimą arba atsižvelgiant į turimus duomenis, didžiausia vienkartinio davimo dozė turėtų būti 2000 mg/kg kūno masės. Tačiau, jei bandomoji cheminė medžiaga yra toksiška, didžiausia duodama dozė turėtų būti DTD, o naudojami dozių dydžiai turėtų aprėpti intervalą nuo didžiausios dozės iki mažo toksiškumo arba visiškai jo nesukeliančios dozės. Jei cheminės medžiagos netoksiškos, ribinė dozė 14 parų ar ilgesniu dozių davimo laikotarpiu yra 1000 mg/kg kūno masės per parą, o trumpesniu kaip 14 parų dozių davimo laikotarpiu ribinė dozė yra 2000 mg/kg kūno masės per parą.

Dozių davimas

28. Rengiant bandymo schemą, reikėtų atsižvelgti į numatomą žmogaus ekspozicijos būdą. Todėl kaip pagrįstus galima pasirinkti tokius ekspozicijos būdus, pvz., duoti su pašaru ar geriamuoju vandeniu, atlikti vietinę poodinę ar intraveninę injekciją, duoti įkvėpti, per burną (per zondą) ar implantuoti. Visais atvejais turėtų būti pasirinktas būdas, kuris

užtikrintų reikiamą tikslinio (-ių) audinio (-ių) veikimą. Injekcija į pilvo ertmę paprastai nerekomenduojama, nes tai nėra numatytas žmogaus ekspozicijos būdas ir jį reikėtų naudoti, tik jei būtų specialiai moksliskai pagrįstas. Jei bandomoji cheminė medžiaga įmaišoma į pašarą ar į geriamąjį vandenį, ypač vienkartinio dozavimo atveju, reikėtų imtis priemonių, kad laiko tarpas nuo maisto bei vandens vartojimo iki poravimosi būtų pakankamas poveikiui aptikti (31 pastraipa). Skysčio, kurį galima duoti per zondą arba įšvirkšti per vieną kartą, didžiausiasis tūris priklauso nuo bandomo gyvūno dydžio. Tūris paprastai neturėtų būti didesnis kaip 1 ml/100 g kūno masės, išskyrus vandeninius tirpalus, kurių galima duoti ne daugiau kaip po 2 ml/100 g. Didesnio nei šis tūrio naudojimą (jei leidžiama pagal gyvūnų gerovės teisės aktus) reikėtų pagrįsti. Bandymo skysčio tūrio kintamumas turėtų būti kuo labiau sumažinamas reguliuojant koncentraciją, kad esant visoms dozėms būtų užtikrintas pastovus tūris kūno masės atžvilgiu.

Stebėjimų rezultatai

29. Reikėtų atlikti bendruosius bandymo gyvūnų klinikinius stebėjimus ir bent kartą per dieną registruoti klinikinius požymius, pageidautina kartą ar kelis kartus kasdien tuo pačiu laiku, atsižvelgiant į didžiausio numatomo poveikio laiką po dozės davimo. Mažiausiai du kartus per dieną, siekiant nustatyti liguistumo ir gaištamumo požymius, dozavimo laikotarpiu visus gyvūnus reikėtų apžiūrėti. Visi gyvūnai turėtų būti sveriami tyrimo pradžioje ir bent kartą per savaitę kartotinės dozės tyrimų metu ir numarinant. Suvartojamo pašaro kiekį reikėtų matuoti bent kas savaitę. Jei bandomoji cheminė medžiaga duodama su geriamuoju vandeniu, suvartoto vandens kiekį reikėtų išmatuoti kaskart, kai vanduo keičiamas, ir bent kartą per savaitę. Gyvūnus, kuriems pasireiškia per didelio, bet ne mirtino toksiškumo požymiai, reikėtų numarinti iki bandymo laikotarpio pabaigos (27).

Audinių surinkimas ir apdorojimas

30. Pelių patelės numarinamos antroje vaikingumo pusėje 13 gestacijos parą, žiurkės – 14–15 parą. Gimdos tiriamos dėl dominantinio letalumo poveikio, kad būtų nustatytas implantų, gyvų ir negyvų embrionų bei geltonkūnių skaičius.
31. Gimdos ragai ir kiaušidės atveriamos geltonkūniams suskaičiuoti, vaisiai pašalinami, suskaičiuojami ir pasveriami. Reikėtų imtis priemonių, kad būtų ištirti rezorbcijos, paslėptos po gyvais vaisiais, atvejai, ir užtikrinti, kad visi rezorbcijos atvejai būtų suskaičiuoti. Registruojamas vaisių gaištamumas. Taip pat registruojamas sėkmingai apvaisintų patelių skaičius ir bendras implantų skaičius, nuostoliai prieš implantavimąsi ir gaištamumas po implantavimosi (įskaitant ankstyvąją ir vėlyvąją rezorbciją). Be to, matomi vaisiai gali būti konservuojami Bouino fiksatoriuje bent 2 savaitėms ir tiriami pagrindiniai išoriniai išsigimimai (28), kad būtų gauta papildomos informacijos apie bandomosios cheminės medžiagos poveikį reprodukcijai ir vystymuisi.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Rezultatų apdorojimas

32. Duomenys turėtų būti pateikiami lentelėse, nurodant patinų ir vaikingų bei nevaikingų patelių skaičių. Reikėtų atskirai registruoti kiekvieno suporavimo rezultatus, nurodant kiekvieno patino ir patelės tapatybę. Turėtų būti registruojamas poravimosi intervalas, apdorotų patinų dozės dydžiai, kiekvienos patelės gyvų ir negyvų implantų skaičius.
33. Nuostoliai po implantavimosi apskaičiuojami lyginant nustatytą apdorotų grupių negyvų ir visų implantų santykį su nešiklio ar tirpiklio grupės negyvų ir visų implantų santykiu.
34. Nuostoliai prieš implantavimąsi apskaičiuojami kaip geltonkūnių ir implantų skirtumas arba kaip vienos patelės implantų vidutinio skaičiaus sumažėjimas palyginti su kontroliniais poravimais. Jei nuostoliai prieš implantavimąsi įvertinami, jie turėtų būti pateikti ataskaitoje.
35. Dominantinio letalumo faktorius įvertinamas kaip: $(\text{negyvi implantai} / \text{visi implantai vienai patelei}) \times 100$.
36. Ataskaitoje reikėtų pateikti toksiškumo duomenis ir klinikinius požymius (nurodytus 29 pastraipoje).

Priimtino kriterijai

37. Apie bandymo priimtumą sprendžiama pagal šiuos kriterijus:

- vienalaikis neigiamas kontrolinis ėminys atitinka paskelbtas istorinių neigiamų kontrolinių ėminių duomenų normas ir laboratorijos istorinių kontrolinių ėminių duomenis, jei yra (žr. 10 ir 18 pastraipas).
- vienalaikiai teigiami kontroliniai ėminiai sukelia atsakus, kurie yra suderinami su paskelbtomis istorinių teigiamų kontrolinių ėminių normomis arba su laboratorijos istorinių teigiamų kontrolinių ėminių bazės duomenimis, jei yra, duoda statistiškai reikšmingą padidėjimą palyginti su neigiamu kontroliniu ėminiu (žr. 17 ir 18 pastraipas);
- analizuotas pakankamas visų implantų ir dozių verčių skaičius (20 pastraipa).
- didžiausios dozės pasirinkimo kriterijai atitinka aprašytus 24 ir 27 pastraipose.

Rezultatų įvertinimas ir aiškinimas

38. Norint gauti pakankamai duomenų dozės ir atsako tarpusavio priklausomybei įvertinti, reikėtų analizuoti ne mažiau kaip tris dozę gavusias grupes.
39. Jei įvykdomi visi priimtino kriterijai, bandomoji cheminė medžiaga laikoma aiškiai teigiama, jei:

- bent vienai bandymo dozei gaunamas statistiškai reikšmingas padidėjimas palyginti su vienalaikiu neigiamu kontroliniu ėminių;
- padidėjimas yra susijęs su doze mažiausiai vienai bandymo sąlygai (pvz., savaitės poravimosi intervalui), kai įvertinamas atitinkamu bandymu; ir
- visi rezultatai yra už priimtino neigiamų kontrolinių ėminių duomenų intervalo ribų arba už laboratorijos istorinių kontrolinių ėminių duomenų, jei yra, skirstinio ribų (pvz., Puasono skirstinio 95 % kontrolinių ribų).

Tada laikoma, kad bandomoji cheminė medžiaga gali sukelti bandymo gyvūnų lytinių ląstelių dominantines letalias mutacijas. Rekomendacijos dėl tinkamiausių statistinių metodų aprašytos 44 pastraipoje. kitus rekomenduojamus statistinius metodus taip pat galima rasti literatūroje (20) (21) (22) (24) (29). Pagal taikomus statistinius testus bandymo vienetu turėtų būti laikomas gyvūnas.

40. Jei įvykdomi visi priimtumo kriterijai, bandomoji cheminė medžiaga laikoma aiškiai neigiama, jei:

- jokiai bandymo dozei negaunamas statistiškai reikšmingas padidėjimas palyginti su vienalaikiu neigiamu kontroliniu ėminių,
- nėra su doze susijusio padidėjimo jokiai bandymo sąlygai; ir
- visi rezultatai patenka į priimtina neigiamų kontrolinių ėminių duomenų intervalą arba į laboratorijos istorinių neigiamų kontrolinių ėminių duomenų, jei yra, intervalą (pvz., į Puasono skirstinio 95 % kontrolines ribas).

Tada laikoma, kad bandomoji cheminė medžiaga negali sukelti bandymo gyvūnų lytinių ląstelių dominantinių letalių mutacijų.

41. Nėra reikalavimo tikrinti aiškų teigiamą ar aiškų neigiamą atsaką.

42. Jei atsakas nėra aiškiai neigiamas ar teigiamas, ir siekiant padėti nustatyti rezultato biologinę svarbą (pvz., mažas ar ribinis padidėjimas), duomenys turėtų būti įvertinti pateikiant ekspertų nuomonę ir (arba) turėtų būti atliekami papildomi tyrimai, naudojant esamus bandymų duomenis, pvz., įvertinti, ar teigiamas rezultatas nepatenka į priimtina neigiamų kontrolinių ėminių duomenų arba į laboratorijos istorinių neigiamų kontrolinių ėminių duomenų intervalą (30).

43. Retais atvejais, netgi atlikus papildomus tyrimus, gautų duomenų rinkinio nepakaks padaryti išvadą, ar rezultatai teigiami ar neigiami, todėl bus priimtas sprendimas, kad atsakas yra abejotinas.

44. Pagal taikomus statistinius testus bandymo vienetu turėtų būti laikomas patinas. Nors yra galimybė, kad skaičiavimo duomenys (pvz., implantų skaičius vienai patelei) gali pasiskirstyti pagal Puasono skirstinį ir (arba) dalys (pvz., negyvų implantų dalis) gali būti

pasiskirsčiusios pagal binominį skirstinį, dažnai taip atsitinka dėl per didelės tokių duomenų sklaidos (31). Todėl atliekant statistinę analizę iš pradžių reikėtų taikyti apatinės dispersijos ar perviršinės dispersijos kriterijus, naudojant dispersijos kriterijus, pvz., Cochrano binominio pasiskirstymo kriterijų (32) arba Tarone $C(\alpha)$ binominės perviršinės dispersijos kriterijų (31) (33). Jei neaptinkama nukrypimo nuo binominio pasiskirstymo, galima tikrinti visiems dozių dydžiams gautų dalių tendencijas, taikant Cochran-Armitage tendencijos kriterijų (34) ir porinių duomenų palyginimą su kontroline grupe, taikant tikslųjį Fisherio kriterijų (35). Ir panašiai, jei neaptinkama nukrypimo nuo Puasono pasiskirstymo, skaičiavimų tendencijos gali būti tikrinamos taikant Puasono regresijos modelį (36) ir, atsižvelgiant į Puasono modelį, galima tikrinti porinių duomenų palyginimą su kontroline grupe, naudojant porinius kontrastus (36). Jei aptinkama reikšminga apatinė dispersija ar perviršinė dispersija, rekomenduojami neparametriniai metodai (23) (31). Juos sudaro ranginiai kriterijai, pvz., Jonckheere-Terpstra tendencijos kriterijus (37) ir Mann-Whitney kriterijus (38) porinių duomenų palyginimus su kontroline nešiklio ar tirpiklio grupe, taip pat randomizacijos, kartotinės imties ar savirankos tendencijos kriterijus ir porinių duomenų palyginimus su kontroline grupe (31) (39).

45. Teigiamas DL bandymas pateikia bandomosios cheminės medžiagos genotoksiškumo bandymo rūšių apdorotų patinų lytinėms ląstelėms įrodymus.
46. Analizė, ar stebimos vertės patenka ar nepatenka į istorinių kontrolinių ėminių duomenų intervalą, gali padėti įvertinti atsako biologinį reikšmingumą (40).

Bandymo ataskaita

47. Į bandymo ataskaitą turėtų būti įtraukta ši informacija:

Santrauka

Bandomoji cheminė medžiaga:

- šaltinis, partijos numeris, naudojimo pabaigos data, jei yra;
- pačios bandomosios cheminės medžiagos stabilumas, jei žinomas;
- bandomosios cheminės medžiagos tirpumas tirpiklyje ir stabilumas, jei žinomas;
- pH, osmolialumo ir nuosėdų matavimas kultūros terpėje, į kurią bandomoji cheminė medžiaga buvo pridėta, jei reikia.

Vienkomponentė medžiaga:

- fizinė išvaizda, tirpumas vandenyje ir papildomos būdingos fizikinės ir cheminės savybės;
- cheminio identifikavimo duomenys, pvz., IUPAC ar CAS pavadinimas, CAS numeris, SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė, grynumas, cheminis priemaišų pavadinimas, jei tinka bei praktiškai įmanoma ir kt.;

Daugiakomponentė medžiaga, UVCB ir mišiniai:

- kuo išsamesnis sudedamųjų dalių apibūdinimas, nurodant cheminį pavadinimą (žr. pirmiau), kiekybinį paplitimą ir būdingas fizikines ir chemines savybes.

Bandomosios cheminės medžiagos ruošimas:

- nešiklio pasirinkimo pagrindimas;
- bandomosios cheminės medžiagos tirpumas tirpiklyje ar nešiklyje ir stabilumas, jei yra žinomas;
- preparatų su pašarais, geriamuoju vandeniu arba inhaliacinių preparatų ruošimas;
- preparatų analizinis nustatymas (pvz., stabilumo, vienalytiškumo, nominalių koncentracijos verčių), kai atliekamas.

Bandymo gyvūnai:

- naudota rūšis ir (arba) veislė ir pasirinkimo pagrindimas;
- gyvūnų skaičius, amžius ir lytis,
- šaltinis, laikymo sąlygos, pašaras ir kt.,
- gyvūnų unikalaus identifikavimo būdas;
- trumpalaikių tyrimų: atskirų patinų kūno masė bandymo pradžioje ir pabaigoje; atliekant ilgesnius nei savaitės trukmės tyrimus: atskirų kūnų masės tyrimo metu ir pašaro suvartojimas. Reikėtų įtraukti kiekvienos grupės kūno masės intervalą, vidurkį ir standartinį nuokrypį.

Bandymo sąlygos:

- teigiamų ir neigiamų kontrolinių ėminių (tirpiklio ir (arba) nešiklio) duomenys;
- intervalo nustatymo tyrimo duomenys;
- dozės dydžio pasirinkimo pagrindimas;
- duomenys apie bandomosios medžiagos ruošimą;
- išsami informacija apie bandomosios cheminės medžiagos davimo būdą;
- davimo būdo pasirinkimo pagrindimas;
- toksiškumo gyvūnams matavimo metodai, įskaitant, jei galima, histopatologinę arba hematologinę analizę, tai, kaip dažnai gyvūnai buvo stebimi ir buvo matuojama jų kūno masė;
- metodai, kuriais patikrinama, ar bandomoji cheminė medžiaga pateko į tikslinį audinį arba į kraujotakos sistemą, jei gauti neigiami rezultatai;

- faktinė dozė (mg/kg kūno masės per parą), apskaičiuota pagal bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją pašaruose ir (arba) geriamajame vandenyje (ppm) ir suvartojimą, jei tinka;
- išsami informacija apie pašaro ir vandens kokybę.
- duomenys apie narvelio aplinkos pagerinimą;
- išsamus apdorojimo ir ėminių ėmimo tvarkaraščių aprašymas, pasirinkimo pagrindimas;
- nuskausminimo metodas;
- numarinimo metodas;
- audinių atskyrimo ir konservavimo procedūros;
- visų rinkinių ir reagentų (jei naudojami) šaltinis, partijos numeris;
- DL skaičiavimo metodai;
- poravimo tvarkaraščiai;
- poravimo įvykio nustatymo metodai;
- numarinimo laikas;
- DL reiškinių skaičiavimo kriterijai, įskaitant geltonkūnius, implantus, rezorbcijos atvejus, nuostolius prieš implantavimąsi, gyvus implantus, negyvus implantus.

Rezultatai:

- gyvūnų būklė prieš bandymą ir visą bandymo laikotarpį, įskaitant toksiškumo požymius;
- patinų kūno masė apdorojimo ir poravimosi laikotarpių metu;
- suporuotų patelių skaičius;
- dozės ir atsako priklausomybė, jei įmanoma nustatyti;
- vienašalių ir istorinių neigiamų kontrolinių ėminių duomenys, nurodant intervalus, vidurkius ir standartinius nuokrypius;
- vienašalių teigiamų kontrolinių ėminių duomenys;
- kiekvienos patelės į lentelę įrašyti duomenys, įskaitant: geltonkūnių vienai patelei skaičių; implantacijų vienai patelei skaičių; rezorbcijos atvejų ir nuostolių prieš implantavimąsi skaičių vienai patelei; gyvų implantų skaičių vienai patelei; negyvų implantų skaičių vienai patelei; vaisiaus mases;
- pirmiau pateikti duomenys, apibendrinti kiekvienam poravimosi laikotarpiui ir dozei, ir dominantinio letalumo dažniai;
- statistinės analizės duomenys ir taikyti metodai.

Rezultatų aptarimas.

Išvada.

LITERATŪRA

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

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

- (23) Haseman J.K. and Soares E.R. (1976). The Distribution of Fetal Death in Control Mice and its Implications on Statistical Tests for Dominant Lethal Effects. *Mutation. Res.*, 41: 277-288.
- (24) Whorton E.B. Jr. (1981). Parametric Statistical Methods and Sample Size Considerations for Dominant Lethal Experiments. The Use of Clustering to Achieve Approximate Normality, *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.*, 1:353 – 360.
- (25) Anderson D., Anderson, D., Hodge, M.C.E., Palmer, S., and Purchase, I.F.H. (1981). Comparison of Dominant Lethal and Heritable Translocation Methodologies. *Mutation. Res.*, 85:417-429.
- (26) Fielder R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. *Mutagen.*, 7:313-319.
- (27) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No.19.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (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.
- (33) Tarone R.E. (1979). Testing the Goodness of Fit of the Binomial Distribution. *Biometrika*, 66: 585-590.
- (34) Margolin B.H. (1988). Test for Trend in Proportions. In *Encyclopedia of Statistical Sciences*, Volume 9, Kotz S. and Johnson N. L. (Eds.), pp. 334-336. John Wiley and Sons, New York.

- (35) Cox D.R., Analysis of Binary Data. Chapman and Hall, London (1970).
- (36) Neter J.M., Kutner, H.C., Nachtsheim, J. and Wasserman, W. (1996). Applied Linear Statistical Models, Fourth Edition, 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 priedėlis

APIBRĖŽTYS

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

Geltonkūnis (*Corpora luteum*) – hormonų sekrecijos struktūra, susidariusi ant kiaušidės kiaušialąstę išleidusio folikulo vietoje. Kiaušidėse esančių geltonkūnių skaičius atitinka iš kiaušidės išėjusių kiaušialąsčių skaičių.

Dominantinė letali mutacija – lytinėje ląstelėje įvykusi arba po apvaisinimo nustatyta mutacija, kuri sukelia embriono ar vaisiaus žūtį.

Apvaisinimo rodiklis – suporuotų vaikingų patelių ir visų suporuotų patelių skaičiaus santykis.

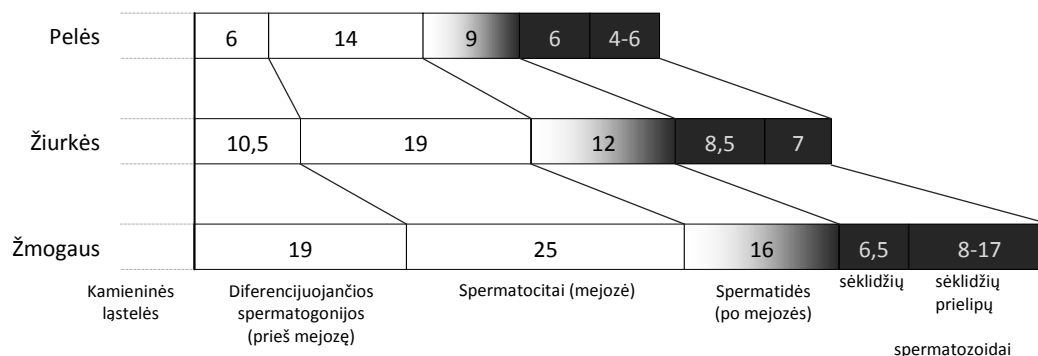
Poravimosi intervalas – laikas nuo ekspozicijos pabaigos iki apdorotų patinų poravimosi. Reguluojant šį intervalą, galima vertinti cheminių medžiagų poveikį skirtingiems lytinių ląstelių tipams. Poruojant peles 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ir 8 savaitę po ekspozicijos pabaigos matuojamas poveikis spermai, kondensuotoms spermatidėms, apvaliosioms spermatidėms, pirminiams spermatocitams, ankstyviems spermatocitams, diferencijavusioms spermatogonijoms, diferencijuojančios spermatogonijoms ir kamieninių ląstelių spermatogonijoms.

Nuostoliai prieš implantavimąsi – implantų ir geltonkūnių skaičiaus skirtumas. Juos taip pat galima įvertinti lyginant visus apdorotos grupės ir kontrolinės grupės vienos patelės implantus.

Nuostoliai po implantavimosi – apdorotos grupės negyvų ir visų implantų santykis palyginti su nešiklio ar tirpiklio grupės negyvų ir visų implantų santykiu.

Bandomoji cheminė medžiaga – taikant šį metodą bandoma medžiaga arba mišinys.

UVCB – nežinomos ar kintamos sudėties medžiagos, sudėtingųjų reakcijų produktai ir biologinės medžiagos.

2 priedėlis**ŽINDUOLIŲ SPERMATOGENEZĖS TRUKMĖS NUSTATYMAS**

1 paveikslas. Pelių bei žiurkių patinų ir vyrų lytinės ląstelės vystymosi trukmės (paros) palyginimas. DNR atkūrimas nevyksta tamsiai pažymėtais laikotarpiais.

Pelės, žiurkės ir žmogaus spermatogenezės schema pavaizduota pirmiau (paimta iš Adler, 1996). Nediferencijuotas spermatogonijas sudaro: A pavienės; A porinės; ir A išlygintos spermatogonijos (Hess ir de Franca, 2008). A pavienės laikomos tikrosiomis kamieninėmis ląstelėmis; todėl norint vertinti poveikį kamieninėms ląstelėms turi praeiti ne mažiau kaip 49 paros (pelėms) nuo paskutinės bandomosios cheminės medžiagos injekcijos iki poravimosi.

Nuorodos

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) B dalies B.23 skyrius pakeičiamas taip:

„B.23 ŽINDUOLIŲ SPERMATOGONIJŲ CHROMOSOMŲ ABERACIJOS TYRIMAS

IVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymo gaires 483 (2016). Bandymų metodai periodiškai peržiūrimi, atsižvelgiant į mokslo pažangą, kintamus reglamentavimo poreikius ir gyvūnų gerovės aspektus. Ši modifikuota bandymo metodo versija rodo daugelio metų šio bandymo naudojimo patirtį ir galimybę ją integruoti arba derinti su kitais toksiškumo bandymais arba su genotoksiškumo bandymais. Toksiškumo tyrimų derinimas sudaro galimybę mažinti toksiškumo bandymams naudojamų gyvūnų skaičių. Šis bandymų metodas yra genetinės toksikologijos metodų serijos dalis. Yra parengtas EBPO dokumentas, kuriame glaustai pateikiama informacija apie genetinės toksikologijos bandymus ir naujausių genetinės toksikologijos bandymų EBPO gairių pakeitimų apžvalga (1).
2. Žinduolių spermatogonių chromosomų aberacijos tyrimo *in vivo* tikslas – identifikuoti tas chemines medžiagas, kurios sukelia žinduolių spermatogonių chromosomų struktūrines aberacijas (2) (3) (4). Be to, šis bandymas tinka genotoksiškumui vertinti, nes, nors skirtingų gyvūnų rūšims metabolizmo *in vivo* veiksniai, farmakokinetika ir DNR atkūrimo procesai gali skirtis, jie yra aktyvūs ir prisideda prie atsako. Šis bandymo metodas nėra skirtas skaičiaus nukrypimams matuoti; bandymas paprastai nėra naudojamas šiam tikslui.
3. Taikant šį bandymo metodą matuojamos struktūrinės chromosomų aberacijos (chromosominio ir chromatidinio tipo), dalijantis spermatogeninėms lytinėms ląstelėms, todėl manoma, kad juo galima prognozuoti, ar bus sukeliamos šių lytinių ląstelių paveldimos mutacijos.
4. Pagrindinių terminų apibrėžtys pateiktos priedėlyje.

PRADINIAI ASPEKTAI

5. Šiam bandymui paprastai naudojami graužikai, bet kai kuriais atvejais gali tikti kitos rūšys, jei jų naudojimas būtų moksliai pagrįstas. Standartiniai graužikų sėklidžių citogenetiniai preparatai duoda mitozines (spermatogonių) ir meiotines (spermatocitų) metafazes. Mitozinės ir meiotinės metafazės identifikuojamos pagal chromosomų morfologiją (4). Taikant šį *in vivo* citogenetinį bandymą nustatomos chromosomų aberacijos, atsirandančios spermatogonių mitozinėse chromosomose. Kitoms ląstelėms šis bandymo metodas netaikomas.
6. Siekiant aptikti spermatogonių ląstelių chromatidinio tipo aberacijas, reikėtų tirti pirmąjį mitozinių ląstelių dalijimąsi po apdorojimo prieš tai, kai šios aberacijos virsta į chromosominio tipo aberacijas toliau dalijantis ląstelėms. Papildomos informacijos iš apdorotų spermatocitų galima gauti atliekant mejozinių chromosomų analizę dėl chromosomų struktūrinių aberacijų diakinezės I metafazės ir II metafazės stadijoje.

7. Sėklidėse yra daugelio kartų spermatogonijų (5), ir šios skirtingų tipų lytinės ląstelės gali pasižymėti nevienodu jautriu cheminiam apdorojimui. Todėl aptiktos aberacijos atitinka bendrąjį apdorotų spermatogonijų ląstelių populiacijų atsaką. Dauguma sėklidžių preparatų mitozinių ląstelių yra B spermatogonijos, kurių ląstelės ciklas maždaug 26 valandos (3).
8. Jei yra duomenų, kad bandomoji cheminė medžiaga ar jos metabolitas (-ai) nepasieks sėklidės, jai tirti šis bandymas netinka.

BANDYMO METODO PRINCIPAS

9. Paprastai gyvūnai veikiami bandomąja chemine medžiaga taikant tinkamą ekspozicijos būdą ir reikiamais momentais po apdorojimo humaniškai numarinami. Prieš numarinant gyvūnai apdorojami metafazę stabdančiomis priemonėmis (pvz., kolchicinu ar Colcemid®). Iš lytinių ląstelių ruošiami chromosomų preparatai, jie dažomi ir metafazės ląstelės tiriamos dėl chromosomų aberacijos.

LABORATORIJOS KVALIFIKACIJOS TIKRINIMAS

10. Kompetencija atliekant šį bandymą turėtų būti nustatyta, įrodant gebėjimą atkurti numanomus spermatogonijų struktūrinių chromosomų aberacijų dažnių rezultatus, gautus 1 lentelėje nurodytoms teigiamoms kontrolinėms medžiagoms (įskaitant silpnus atsakus), ir neigiamiems kontroliniams ėminiams gaunant dažnius, kurie yra suderinami su literatūroje paskelbtų priimtinių kontrolinių ėminių duomenų intervalu (pvz., (2) (3) (6) (7) (8) (9) (10)) arba su laboratorijos istoriniu kontrolinių ėminių pasiskirstymu, jei yra.

METODO APRAŠYMAS

Parengiamieji darbai

Gyvūnų rūšies parinkimas

11. Reikėtų tirti dažniausiai naudojamas sveikų jaunų suaugusių gyvūnų laboratorines veisles. Paprastai naudojami pelių patinai; tačiau gali būti naudojami kitų tinkamų žinduolių rūšių patinai, jei tai būtų moksliškai pagrįsta ir šį bandymą būtų galima atlikti kartu su kitu bandymo metodu. Kitų nei graužikai rūšių naudojimas turėtų būti moksliškai pagrįstas ataskaitoje.

Gyvūnų laikymo ir šėrimo sąlygos

12. Jei naudojami graužikai, temperatūra gyvūnų patalpoje turėtų būti 22 °C (±3 °C). Nors geriausia būtų užtikrinti 50–60 % drėgmę, ji neturėtų būti mažesnė kaip 40 % ir būtų gerai, jei ji nebūtų didesnė kaip 70 %, išskyrus patalpos valymo laiką. Apšvietimas turėtų būti dirbtinis, taikant 12 h šviesos ir 12 h tamsos seką. Gyvūnams šerti tinka įprastas laboratorijose naudojamas pašaras, neribojant geriamojo vandens kiekio. Pašaro pasirinkimui gali turėti įtakos būtinybė užtikrinti tinkamą bandomosios cheminės medžiagos sumaišymą su pašaru, kai ji duodama tokiu būdu. Jei nesitikima agresyvaus elgesio, graužikus reikėtų laikyti nedidelėmis grupėmis

(ne daugiau kaip po penkis viename narvelyje), pageidautina narveliuose su kietomis grindimis ir esant atitinkamai pagerintai aplinkai. Moksliškai pagrįstais atvejais gyvūnus galima laikyti atskirai.

Gyvūnų paruošimas

13. Paprastai naudojami sveiki jauni suaugę patinai (kurių amžius apdorojimo pradžioje 8–12 savaičių), atsitiktine tvarka priskiriami į kontrolinę ir apdorojimo dozes gaunančią grupes. Atskiri gyvūnai unikaliai paženklinami humanišku minimaliai invaziniu būdu (pvz., žieduojant, kabinant etiketę, naudojant mikrolustą ar biometrinį identifikavimą, bet ne ausų ar pėdų spausukus) ir aklimatizuojami laboratorinėmis sąlygomis ne trumpiau kaip 5 paras. Narvelius reikėtų išdėstyti taip, kad narvelio vietos poveikis būtų kiek įmanoma mažesnis. Reikėtų vengti kryžminio užteršimo teigiamu kontroliniu ėminiu ir bandomąja chemine medžiaga. Tyrimo pradžioje atskirų gyvūnų masės skirtumas turėtų būti kuo mažesnis ir būti ne didesnis kaip $\pm 20 \%$.

Dozių ruošimas

14. Kietosios bandomosios cheminės medžiagos prieš duodant gyvūnams turėtų būti ištirpinamos atitinkamuose tirpikliuose ar nešikliuose arba turėtų būti paruošta jų suspensija, prireikus jos įmaišomos į pašarą arba geriamąjį vandenį. Skystąsias bandomąsias chemines medžiagas galima dozuoti tiesiogiai arba prieš dozavimą praskiesti. Jei bandomosios cheminės medžiagos patenka per kvėpavimo takus, jas galima duoti dujų, garų arba kietosios ar skystosios medžiagos aerozolio pavidalu, atsižvelgiant į jų fizikines ir chemines savybes. Reikėtų naudoti tik ką paruoštus bandomosios cheminės medžiagos preparatus, nebent stabilumo duomenys rodo, kad jas galima laikyti, ir šiuo atveju nurodomos tinkamos laikymo sąlygos.

Bandymo sąlygos. Tirpiklis ir (arba) nešiklis

15. Turėtų nebūti tirpiklio ar nešiklio toksinio poveikio, esant naudojamiems dozių dydžiams, ir jų cheminė reakcija su bandomosiomis cheminėmis medžiagomis turėtų būti negalima. Jei naudojami kiti nei gerai žinomi tirpikliai ar nešikliai, juos galima įtraukti, pateikus suderinamumą rodančius nuorodų duomenis. Rekomenduojama visuomet iš pradžių atsižvelgti į galimybę naudoti, jei įmanoma, vandeninį tirpiklį arba nešiklį. Dažniausiai naudojamų suderinamų tirpiklių ar nešiklių pavyzdžiai yra vanduo, fiziologinis tirpalas, metilceliuliozės tirpalas, karboksimetilceliuliozės natrio druskos tirpalas, alyvuogių ir kukurūzų aliejus. Jei nėra istorinių arba paskelbtų kontrolinių duomenų, kurie rodytų, kad pasirinktas tirpiklis arba nešiklis nesukelia struktūrinių chromosomų aberacijų ir kitokio žalingo poveikio, reikėtų atlikti pradinį tyrimą tirpiklio ar nešiklio kontrolinio ėminio priimtinumui nustatyti.

Teigiami kontroliniai ėminiai

16. Visuomet reikėtų naudoti vienalaikių teigiamų kontrolinių ėminių gyvūnus, išskyrus atvejus, kai laboratorija įrodė kompetenciją atliekant bandymą ir jį reguliariai naudojo netolimoje praeityje (pvz., per pastaruosius 5 metus). Jei vienalaikių teigiamų kontrolinių ėminių grupė neįtraukiama, į kiekvieną bandymą reikėtų įtraukti vertinimo kontrolinius ėminius (fiksotus ir

nedažytus objektinius stiklelius). Juos galima gauti į tyrimo vertinimą įtraukiant atitinkamus etaloninius ėminius, kurie būtų gauti bandymų laboratorijoje periodiškai (pvz., kas 6–18 mėnesių) atliekant atskirą teigiamo kontrolinio ėminio bandymą; pvz., kvalifikacijos tyrimo metu ir reguliariai vėliau, jei būtina, ir tuos ėminius laikyti.

17. Teigiamos kontrolinės cheminės medžiagos turėtų patikimai sukelti ląstelių su struktūrinėmis chromosomų aberacijomis aptinkamą dažnumų padidėjimą, palyginti su savaiminiais lygiais. Reikėtų pasirinkti tokias teigiamų kontrolinių ėminių dozes, kad poveikis būtų ryškus, bet skaičiuotojui ne iškarto atsiskleistų užkoduotų ėminių tapatybė. Teigiamų kontrolinių cheminių medžiagų pavyzdžiai pateikti 1 lentelėje.

1 lentelė. Teigiamų kontrolinių cheminių medžiagų pavyzdžiai

Cheminės medžiagos [CAS Nr.] (nuorodos Nr.)
Ciklofosfamid (monohidratas) [CAS Nr. 50-18-0 (CAS Nr. 6055-19-2)] (9)
Cikloheksilaminas [CAS Nr. 108-91-8] (7)
Mitomicinas C [CAS Nr. 50-07-7] (6)
Monomerinis akrilamidas [CAS Nr. 79-06-1] (10)
Trietilenmelaminas [CAS Nr. 51-18-3] (8)

Neigiami kontroliniai ėminiai

18. Kiekvieną kartą imant ėminius reikėtų įtraukti neigiamos kontrolinės grupės gyvūnus, kuriems buvo duodamas tik tirpiklis arba tik nešiklis ir kitais atžvilgiais su jais buvo elgiamasi kaip su apdorojamomis grupėmis. Jei nėra istorinių arba paskelbtų kontrolinių duomenų, kurie rodytų, kad pasirinktas tirpiklis arba nešiklis nesukelia chromosomų aberacijų arba kitokio žalingo poveikio, neapdoroti kontroliniai gyvūnai taip pat turėtų būti įtraukti kiekvieną kartą imant ėminius nešiklio kontrolinio ėminio priimtinumui nustatyti.

PROCEDŪRA

Gyvūnų skaičius

19. Tyrimo pradžioje reikėtų nustatyti grupių dydį siekiant, kad vieną grupę sudarytų ne mažiau kaip 5 vyriškos lyties gyvūnai. Laikoma, kad tiek gyvūnų vienoje grupėje pakanka reikiamai statistinei galiai užtikrinti (t. y. apskritai galima su 80 % tikimybe aptikti bent chromosomų aberacijų dažnio padvigubėjimą, kai neigiamo kontrolinio ėminio lygis yra 1,0 % arba didesnis, esant reikšmingumo lygiui 0,05) (3) (11). Atliekant tyrimą, kai trijų dozių grupių ir viena laiko neigiamo kontrolinio ėminio grupės ėminiai imami du kartus, taip pat yra teigiamo kontrolinio ėminio grupė (kurių kiekvieną sudaro penki gyvūnai), rekomenduojamas tipinis didžiausias gyvūnų skaičius – 45.

Apdorojimo tvarkaraštis

20. Bandomosios cheminės medžiagos paprastai duodamos vieną kartą (t. y. vienkartinis apdorojimas); galima taikyti kitus dozavimo režimus, jei jie būtų moksliškai pagrįsti.
21. Didžiausios dozės gyvūnų grupės ėminiai po apdorojimo imami du kartus. Kadangi bandomosios (-ųjų) cheminės (-ių) medžiagos (-ų) sugerties ir metabolizmo trukmė, taip pat medžiagos (-ų) įtaka ląstelių ciklo kinetikai gali turėti įtakos optimaliam chromosomų aberacijos aptikimo laikui, imami ankstyvieji ir vėlyvieji ėminiai maždaug 24 ir 48 valandą po apdorojimo. Kitų nei didžiausioji dozė dozių ėminių reikėtų imti ankstesniu laiku – 24 valandų po apdorojimo (mažesniu arba lygiu B spermatogonijų ląstelių ciklo trukmei, tokiu būdu optimizuojant pirmųjų po apdorojimo metafazių įvertinimą), nebent būtų žinoma, kad kitas ėminių ėmimo laikas yra tinkamesnis ir pagrįstas.
22. Galima naudoti kitą ėminių ėmimo laiką. Pavyzdžiui, jei pasireiškia nuo S fazės nepriklausantis cheminių medžiagų poveikis, gali tikti ankstyvesnis ėminių ėmimo laikas (t. y. mažiau kaip 24 h).
23. Galima naudoti kartotinės dozės režimą, pvz., kartu atliekant kitos vertinamosios baigties bandymą, kuriam naudojamas 28 parų apdorojimo laikotarpis (pvz., B.58 bandymo metodas); Tačiau prireiktų papildomų gyvūnų grupių, kad būtų galima prisiderinti prie skirtingų ėminių ėmimo laikų. Todėl tokio tvarkaraščio tinkamumas turėtų būti moksliškai pagrįstas kiekvienu atveju atskirai.
24. Prieš numarinimą gyvūnams į pilvo ertmę suleidžiama metafazę stabdančios priemonės (pvz., „Colcemid“[®] ar kolchicino). Praėjus reikiamam laikotarpiui imami gyvūnų ėminiai. Pelėms ir žiurkėms tas laikotarpis yra maždaug 3–5 valandos.

Dozių dydžiai

25. Jei atliekamas parengiamasis intervalo nustatymo tyrimas, nes nėra kitų tinkamų duomenų, kurie padėtų pasirinkti dozę, jį reikėtų atlikti toje pačioje laboratorijoje, naudojant pagrindiniam tyrimui naudoti numatytą rūšį, veislę ir apdorojimo schemą pagal dozės intervalo nustatymo tyrimų rekomendacijas (12). Tyrimo tikslas – nustatyti didžiausią toleruojamą dozę (MTD), apibrėžiamą kaip dozė, sukelianti nedidelį toksinį poveikį, susijusį su tyrimo laikotarpio trukme (pvz., nenormalus elgesys ar reakcija, kūno masės sumažėjimas arba hematopoetinės sistemos citotoksiškumas), bet ne žūtį ar skausmo, kančių ar išsekimo požymius, dėl kurių gyvūnus reikėtų numarinti (13).
26. Didžiausią dozę dar galima apibrėžti, kaip dozę, kuriai esant spermatogonijoms pasireiškia kai kurie toksiškumo požymiai (pvz., I ir II mejozinių metafazių spermatogonijų mitozijų santykio sumažėjimas; Šis sumažėjimas neturėtų būti didesnis kaip 50 %).
27. Cheminėms medžiagoms, kurios pasižymi specifiniu biologiniu aktyvumu, esant mažoms netoksiškoms dozėms (pavyzdžiui, hormonams ir mitogenams), ir cheminėms medžiagoms,

kurioms būdinga toksikokinetinių savybių soties riba, gali būti taikomos išimtys dozių nustatymo kriterijams ir jas reikėtų įvertinti kiekvienu atveju atskirai.

28. Siekiant gauti informacijos apie dozės ir atsako priklausomybę, į išsamų tyrimą reikėtų įtraukti neigiamo kontrolinio ėminio grupę (18 pastraipa) ir ne mažiau kaip tris dozes, kurių dydžio skirtumo faktorius paprastai būtų 2, bet ne didesnis kaip 4. Jei bandomoji cheminė medžiaga nerodo toksiškumo atliekant intervalo nustatymo tyrimą arba atsižvelgiant į turimus duomenis, didžiausia vienkartinio davimo dozė turėtų būti 2000 mg/kg kūno masės. Tačiau, jei bandomoji cheminė medžiaga yra toksiška, didžiausia duodama dozė turėtų būti MTD, o naudojami dozių dydžiai turėtų aprėpti intervalą nuo didžiausios dozės iki mažo toksiškumo arba visiškai jo nesukeliančios dozės. Kai toksiškumas tiksliniam audiniui (t. y. sėklidėms) stebimas visoms bandomoms dozėms, patariama toliau tirti netoksines dozes. Tyrimams, kurių tikslas būtų išsamiau apibūdinti kiekybinę dozės ir atsako priklausomybės informaciją, gali prireikti papildomų dozių grupių. Tam tikrų tipų bandomųjų cheminių medžiagų (pvz., vaistų žmonėms), kurioms taikomi specifiniai reikalavimai, šios ribos gali skirtis. Jei bandomoji cheminė medžiaga sukelia toksiškumą, reikėtų pasirinkti ribinę dozę ir dvi mažesnes dozes (kaip aprašyta pirmiau). Ribinė dozė 14 parų ar ilgesniu dozių davimo laikotarpiu yra 1000 mg/kg kūno masės per parą, ir trumpesniu kaip 14 parų dozių davimo laikotarpiu ribinė dozė yra 2000 mg/kg kūno masės per parą.

Dozių davimas

29. Rengiant bandymo schemą, reikėtų atsižvelgti į numatomą žmogaus ekspozicijos būdą. Todėl galima pasirinkti pagrįstus ekspozicijos būdus, pvz., duoti su pašaru, geriamuoju vandeniu, atlikti vietinę poodinę arba intraveninę injekciją, duoti per burną (per zondą), duoti įkvėpti ar implantuoti. Visais atvejais turėtų būti pasirinktas būdas, kuris užtikrintų reikiamą tikslinio (-ių) audinio (-ių) ekspoziciją. Injekcija į pilvo ertmę paprastai nerekomenduojama, jei tai nėra moksliskai pagrįsta, nes paprastai tai nėra fiziologiškai būdingas žmogaus ekspozicijos būdas. Jei bandomoji cheminė medžiaga įmaišoma į pašarą ar į geriamąjį vandenį, ypač vienkartinio dozavimo atveju reikėtų imtis priemonių, kad laiko tarpas nuo maisto bei vandens vartojimo iki ėminių ėmimo būtų pakankamas poveikiui aptikti (žr. 33 pastraipą). Skysčio, kurį galima duoti per zondą arba įšvirkšti per vieną kartą, didžiausiasis tūris priklauso nuo bandymo gyvūno dydžio. Tūris paprastai neturėtų būti didesnis kaip 1 ml/100 g kūno masės, išskyrus vandeninius tirpalus, kurių galima duoti ne daugiau kaip po 2 ml/100 g kūno masės. Didesnio nei šis tūrio naudojimą (jei leidžiama pagal gyvūnų gerovės teisės aktus) reikėtų pagrįsti. Bandymo tūrio kintamumas turėtų būti kuo mažesnis, reguliuojant koncentraciją, kad būtų užtikrintas pastovus tūris kūno masės atžvilgiu, esant visoms dozėms.

Stebėjimų rezultatai

30. Reikėtų atlikti bendruosius bandymo gyvūnų klinikinius stebėjimus ir bent kartą per dieną registruoti klinikinius požymius, pageidautina kartą ar kelis kartus kasdien tuo pačiu laiku, atsižvelgiant į didžiausio numatomo poveikio laiką po dozės davimo. Mažiausiai du kartus per parą, siekiant nustatyti liguistumo ir gaištamumo požymius, visus gyvūnus reikėtų apžiūrėti.

Visi gyvūnai turėtų būti sveriami tyrimo pradžioje, bent kartą per savaitę kartotinės dozės tyrimų metu ir numarinant. Jei tyrimai atliekami ne trumpiau kaip vieną savaitę, bent kartą per savaitę reikėtų matuoti pašaro suvartojimą. Jei bandomoji cheminė medžiaga duodama su geriamuoju vandeniu, suvartoto vandens kiekį reikėtų išmatuoti kaskart, kai vanduo keičiamas, ir bent kartą per savaitę. Gyvūnus, kuriems pasireiškia per didelio, bet ne mirtino toksiškumo požymiai, reikėtų numarinti iki bandymo laikotarpio pabaigos (13).

Chromosomų paruošimas

31. Iš karto po numarinimo gaunamos vienos arba abiejų sėklidžių lytinių ląstelių suspensijos, veikiamos hipotoniniu tirpalu ir fiksuojamos pagal nustatytus protokolus (pvz., (2) (14) (15). Ląstelės paskleidžiamos ant objektinių stiklelių ir nudažomos (16) (17). Visus objektinius stiklelius reikėtų koduoti, kad skaičiuotojas neturėtų jų identifikavimo duomenų.

Analizė

32. Kiekvienam gyvūnui turėtų būti suskaičiuota ne mažiau kaip 200 aiškiai matomų pasklidusių metafazių (3) (11). Jei istorinių neigiamų kontrolinių ėminių dažnis yra $< 1 \%$, turėtų būti suskaičiuota daugiau kaip 200 ląstelių/gyvūnui, kad būtų didesnė statistinė galia (3). Reikėtų taikyti tokius dažymo metodus, kurie leistų identifikuoti centromeras.
33. Chromosominio ir chromatidinio tipo aberacijos turėtų būti registruojamos atskirai ir klasifikuojamos pagal potipius (trūkius, mainus). Plyšius reikėtų registruoti, bet į juos nereikėtų atsižvelgti, kai nustatoma, ar cheminė medžiaga sukelia reikšmingą ląstelių su chromosomų aberacijomis dažnumo padidėjimą. Laboratorijoje taikomos procedūros turėtų užtikrinti, kad chromosomų aberacijų analizę atlieka tinkamai apmokyti skaičiuotojai. Atsižvelgiant į tai, kad objektinių stiklelių ruošimo procedūrų dažnas rezultatas dėl gautų chromosomų nuostolių pakeičia metafazės ląstelių dalį, skaičiuojamų ląstelių centromerų skaičius turėtų būti ne mažesnis kaip $2n \pm 2$, kai n yra tos rūšies haploidinis chromosomų skaičius.
34. Nors tyrimo tikslas yra aptikti struktūrinės chromosomų aberacijas, svarbu registruoti poliploidinių ląstelių ir ląstelių, turinčių endoreduplikuotas chromosomas, dažnumą, kai tie įvykiai yra matomi (žr. 44 pastraipą).

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Rezultatų apdorojimas

35. Kiekvienam gyvūnui gauti rezultatai turėtų būti pateikiami lentelėse. Turi būti nustatytas kiekvieno gyvūno ląstelių, turinčių struktūrinę (-es) chromosomų aberaciją (-as), skaičius ir chromosomų aberacijų vienai ląstelei skaičius. Bandymo ir kontrolinių ėminių grupių chromatidinio ir chromosominio tipo aberacijos, klasifikuojamos pagal potipius (trūkius, mainus), turėtų būti registruojamos atskirai, nurodant jų skaičių ir dažnumą. Plyšiai registruojami atskirai. Plyšių dažnumas pateikiamas ataskaitoje, bet paprastai neįtraukiamas į suminio struktūrinių chromosomų aberacijų dažnumo analizę. Ataskaitoje pateikiama

poliploidinių ląstelių ir (arba) ląstelių su endoreduplikuotomis chromosomomis, kai matomos, procentinė dalis.

36. Ataskaitoje reikėtų pateikti toksiškumo duomenis ir klinikinius požymius (kaip nurodyta 30 pastraipoje).

Priimtino kriterijai

37. Apie bandymo priimtumą sprendžiama pagal šiuos kriterijus:

- vienalaikis neigiamas kontrolinis ėminys atitinka paskelbtas istorinių neigiamų kontrolinių ėminių duomenų normas, kurios, kaip manoma, turėtų būti $> 0 \%$ ir $\leq 1,5 \%$ ląstelių su chromosomų aberacijomis, ir laboratorijos istorinių kontrolinių ėminių duomenis, jei yra (žr. 10 ir 18 pastraipas).
- vienalaikiai teigiami kontroliniai ėminiai sukelia atsakus, kurie dera su paskelbtomis istorinių teigiamų kontrolinių ėminių normomis arba su laboratorijos istorinių teigiamų kontrolinių ėminių bazės duomenimis, jei yra, duoda statistiškai reikšmingą padidėjimą palyginti su neigiamu kontroliniu ėminiu (žr. 17 ir 18 pastraipas);
- analizuojamas pakankamas ląstelių ir dozių skaičius (žr. 28 ir 32 pastraipas).
- didžiausios dozės pasirinkimo kriterijai atitinka aprašytus 25 ir 26 pastraipose.

38. Jei stebima mitozė ir mejozė, kaip citotoksiškumo matas turėtų būti nustatytas pirmosios ir antrosios mejozės metafazių spermatogonių mitozė santykis visų apdorotų ir neigiamų kontrolinių ėminių gyvūnų visame 100 besidalinančių ląstelių vienam gyvūnui ėminyje. Jei stebima tik mitozė, mitozinis indeksas kiekvienam gyvūnui turėtų būti nustatytas ne mažiau kaip 1000 ląstelių.

Rezultatų įvertinimas ir aiškinimas

39. Norint gauti pakankamai duomenų dozės ir atsako tarpusavio priklausomybei įvertinti, reikėtų analizuoti ne mažiau kaip tris dozę gavusias grupes.

40. Jei įvykdomi visi priimtino kriterijai, bandomoji cheminė medžiaga laikoma aiškiai teigiama, jei:

- bent vienai bandymo dozei gaunamas statistiškai reikšmingas padidėjimas palyginti su vienalaikiu neigiamu kontroliniu ėminiu;
- padidėjimas yra susijęs su doze mažiausiai vieną ėminių ėmimo kartą; ir
- visi rezultatai yra už priimtino neigiamų kontrolinių ėminių duomenų intervalo ribų arba už laboratorijos istorinių kontrolinių ėminių duomenų, jei yra, skirstinio ribų (pvz., Puasono skirstinio 95 % kontrolinių ribų).

Tada laikoma, kad bandomoji cheminė medžiaga gali sukelti bandymo gyvūnų spermatogonijų chromosomų aberacijas. Rekomendacijų dėl tinkamiausių statistinių metodų taip pat galima rasti literatūroje (11) (18). Pagal taikomus statistinius testus eksperimentiniu vienetu turėtų būti laikomas gyvūnas.

41. Jei įvykdomi visi priimtino kriterijai, bandomoji cheminė medžiaga laikoma aiškiai neigiama, jei:

- jokiai bandymo dozei negaunamas statistiškai reikšmingas padidėjimas palyginti su vienalaikiu neigiamu kontroliniu ėminiu,
- nėra su doze susijusio padidėjimo jokiai bandymo sąlygai; ir
- visi rezultatai patenka į priimtina neigiamų kontrolinių ėminių duomenų intervalą arba į laboratorijos istorinių neigiamų kontrolinių ėminių duomenų, jei yra, intervalą (pvz., į Puasono skirstinio 95 % kontrolines ribas).

Laikoma, kad bandomoji cheminė medžiaga negali sukelti bandymo gyvūnų spermatogonijų chromosomų aberacijų. Rekomendacijų dėl tinkamiausių statistinių metodų taip pat galima rasti literatūroje (11) (18). Neigiamas rezultatas dar nereiškia, kad cheminė medžiaga negali sukelti chromosomų aberacijų ar genų mutacijų netirtais vėlesniais vystymosi tarpsniais.

42. Nėra reikalavimo tikrinti aiškų teigiamą ar neigiamą atsaką.

43. Jei atsakas nėra aiškiai neigiamas ar teigiamas, ir siekiant padėti nustatyti rezultato biologinę svarbą (pvz., mažas ar ribinis padidėjimas), duomenys turėtų būti įvertinti pateikiant ekspertų nuomonę ir (arba) turėtų būti atliekami papildomi tyrimai, naudojant esamus bandymų duomenis, pvz., įvertinti, ar teigiamas rezultatas nepatenka į priimtina neigiamų kontrolinių ėminių duomenų intervalą arba į laboratorijos istorinių neigiamų kontrolinių ėminių duomenų intervalą (19).

44. Retais atvejais, netgi atlikus papildomus tyrimus, gautų duomenų rinkinio nepakaks padaryti išvadą, ar rezultatai teigiami ar neigiami, todėl bus priimtas sprendimas, kad atsakas yra abejotinas.

45. Poliploidinių ląstelių skaičiaus padidėjimas gali rodyti, kad bandomoji cheminė medžiaga gali slopinti mitozinius procesus ir sukelti kiekybines chromosomų aberacijas (20). Ląstelių su endoreduplikuotomis chromosomomis skaičiaus padidėjimas gali rodyti, kad bandomoji cheminė medžiaga gali slopinti ląstelių ciklo eigą (21) (22), ir šis kiekybinius chromosomų pokyčius sukeliantis mechanizmas skiriasi nuo mitozinių procesų slopinimo (žr. 2 pastraipą). Todėl poliploidinių ląstelių ir ląstelių su endoreduplikuotomis chromosomomis dažnumas turėtų būti registruojamas atskirai.

Bandymo ataskaita

46. Į bandymo ataskaitą turėtų būti įtraukta ši informacija:

*Santrauka**Bandomoji cheminė medžiaga:*

- šaltinis, partijos numeris, naudojimo pabaigos data, jei yra;
- pačios bandomosios cheminės medžiagos stabilumas, jei žinomas;
- bandomosios cheminės medžiagos tirpumas tirpiklyje ir stabilumas, jei žinomas;
- pH, osmolialumo ir nuosėdų matavimas kultūros terpėje, į kurią bandomoji cheminė medžiaga buvo pridėta, jei reikia.

Vienkomponentė medžiaga:

- fizinė išvaizda, tirpumas vandenyje ir papildomos būdingos fizikinės ir cheminės savybės;
- cheminio identifikavimo duomenys, pvz., IUPAC ar CAS pavadinimas, CAS numeris, SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė, grynumas, cheminis priemaišų pavadinimas, jei tinka bei praktiškai įmanoma ir kt.;

Daugiakomponentė medžiaga, UVCB ir mišiniai:

- kuo išsamesnis sudedamųjų dalių apibūdinimas, nurodant cheminį pavadinimą (žr. pirmiau), kiekybinį paplitimą ir būdingas fizikines ir chemines savybes.

Bandomosios cheminės medžiagos ruošimas:

- nešiklio pasirinkimo pagrindimas;
- bandomosios cheminės medžiagos tirpumas ir stabilumas tirpiklyje arba nešiklyje;
- preparatų su pašarais, geriamuoju vandeniu arba inhaliacinių preparatų ruošimas;
- preparatų analizinis nustatymas (pvz., stabilumo, vienalytiškumo, nominalių koncentracijos verčių).
- kai atliekamas.

Bandymo gyvūnai:

- naudota rūšis ir (arba) veislė ir naudojimo pagrindimas;
- gyvūnų skaičius ir amžius;
- šaltinis, laikymo sąlygos, pašaras ir kt.;
- gyvūnų unikalaus identifikavimo būdas;
- trumpalaikių tyrimų: kiekvieno gyvūno masė bandymo pradžioje ir pabaigoje; atliekant ilgesnius nei savaitės trukmės tyrimus: atskirų kūnų masės tyrimo metu ir pašaro suvartojimas. Reikėtų įtraukti kiekvienos grupės kūno masės intervalą, vidurkį ir standartinį nuokrypį.

Bandymo sąlygos:

- teigiamų ir neigiamų kontrolinių ėminių (tirpiklio ir (arba) nešiklio) duomenys;
- intervalo nustatymo tyrimo, jei atliekamas, duomenys;
- dozės dydžio pasirinkimo pagrindimas;
- davimo būdo pasirinkimo pagrindimas;
- duomenys apie bandomosios medžiagos ruošimą;
- išsami informacija apie bandomosios cheminės medžiagos davimo būdą;
- numarinimo laiko pagrindimas;
- toksiškumo gyvūnams matavimo metodai, įskaitant, jei galima, histopatologinę arba hematologinę analizę, tai, kaip dažnai gyvūnai buvo stebimi ir buvo matuojama jų kūno masė;
- metodai, kuriais patikrinama, ar bandomoji cheminė medžiaga pateko į tikslinį audinį arba į kraujotakos sistemą, jei gauti neigiami rezultatai;
- faktinė dozė (mg/kg kūno masės per parą), apskaičiuota pagal bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją pašaruose ir (arba) geriamajame vandenyje (ppm) ir suvartojimą, jei tinka;
- išsami informacija apie pašaro ir vandens kokybę.
- išsamus apdorojimo ir ėminių ėmimo tvarkaraščių aprašymas, pasirinkimo pagrindimas;
- numarinimo metodas;
- nuskausminimo metodas (jei taikomas);
- audinių atskyrimo procedūros;
- metafazę stabdančios cheminės medžiagos identifikavimo duomenys, jos koncentracija ir apdorojimo ja trukmė;
- objektinių stiklelių paruošimo metodai;
- aberacijų įvertinimo kriterijai;
- vienam gyvūnui analizuotų ląstelių skaičius;
- tyrimų vertinimo kaip teigiamų, neigiamų ar abejotinių kriterijai.

Rezultatai:

- gyvūnų būklė prieš bandymą ir visą bandymo laikotarpį, įskaitant toksiškumo požymius;
- kūno ir organų masė numarinimo metu (jei atliekamas kartotinis apdorojimas, kūno masė, gauta kiekvieno apdorojimo režimo metu);
- toksiškumo požymiai;
- mitozinis indeksas;

- pirmosios ir antrosios mejozės metafazių spermatogonijų mitozų santykis, arba kiti tikslinio organo ekspozicijos įrodymai;
- aberacijų tipas ir skaičius, nurodytas atskirai kiekvienam gyvūnui;
- kiekvienos grupės suminis aberacijų skaičius, vidurkiai ir standartiniai nuokrypiai;
- vienos grupės ląstelių su aberacijomis skaičius, vidurkiai ir standartiniai nuokrypiai;
- dozės ir atsako priklausomybė, jei įmanoma nustatyti;
- statistinės analizės duomenys ir taikyti metodai;
- vienašalių neigiamų kontrolinių ėminių duomenys;
- istorinių neigiamų kontrolinių ėminių duomenys, jų intervalai, vidurkiai, standartiniai nuokrypiai ir 95 % pasiklovimo intervalas (jei yra) arba paskelbti neigiamų kontrolinių ėminių duomenys, naudojami bandymo rezultatų priimtinumui;
- vienašalių teigiamų kontrolinių ėminių duomenys;
- ploidiškumo pokyčiai, jei matomi, įskaitant poliploidinių ląstelių ir (arba) endoreduplikuotų ląstelių dažnumus.

Rezultatų aptarimas

Išvada

LITERATŪRA

- (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.
- (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.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (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.

Priedėlis

APIBRĖŽTYS

Aneuploidija – vienos arba daugiau kaip vienos chromosomų, bet ne viso (-ų) jų rinkinio (-ų) (poliploidija) nukrypimas nuo normalaus diploidinio (arba haploidinio) chromosomų skaičiaus.

Centromera – chromosomos regionas, su kuriuo ląstelės dalijimosi metu asocijuojasi verpstės siūlai ir dėl to dukterinės chromosomos tvarkingai išsidėsto dukterinių ląstelių poliuose.

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

Chromosomų įvairovė – chromosomų formų (pvz., metacentrinės, akrocentrinės ir kt.) ir dydžių įvairovė.

Chromatidinė aberacija – struktūrinis chromosomos pažeidimas, pasireiškiantis kaip vienos iš chromatidžių trūkis arba kaip chromatidžių trūkis ir susijungimas.

Chromosominė aberacija – struktūrinis chromosomos pažeidimas, pasireiškiantis kaip abiejų chromatidžių trūkis arba kaip trūkis ir susijungimas toje pačioje vietoje.

Klastogenas – cheminė medžiaga ar procesas, sukeliantys struktūrines chromosomų aberacijas ląstelių populiacijose ar organizmuose.

Plyšys – mažesnė nei vienos chromatidės plotis achromatinė spraga, kurioje yra mažiausias skaičius klaidingai suporuotų bazių.

Genotoksinis – bendrasis terminas, kuriuo išreiškiamas visų tipų DNR arba chromosomų pažeidimas, įskaitant trūkius, iškritas, aduktus, nukleotidų modifikacijas ir ryšius, pergrupavimus, mutacijas, chromosomų aberacijas ir aneuploidiją. Ne visų tipų genotoksiniai poveikiai sukelia mutacijas ar pastovų chromosomų pažeidimą.

Mitozinis indeksas (MI) – metafazės ląstelių skaičiaus ir ląstelių populiacijos stebimų ląstelių suminio skaičiaus dalmuo, kuris rodo tos ląstelių populiacijos proliferacijos laipsnį.

Mitozė – ląstelės branduolio dalijimasis, paprastai į profazę, prometafazę, metafazę, anafazę ir telofazę.

Mutageninis – sukeliantis paveldimą DNR bazinės poros sekos (-ų) pokytį genuose arba chromosomų struktūroje (chromosomų aberacijas).

Skaitinis nukrypimas – chromosomų skaičiaus pokytis palyginti su naudojamiems gyvūnams būdingu normaliu chromosomų skaičiumi.

Poliploidiškumas – haploidinio chromosomų skaičiaus (n), išskyrus diploidinį skaičių (t. y. $3n$, $4n$ ir t. t.) kartotinis.

Struktūrinė aberacija – chromosomos struktūros pokytis, kurį galima nustatyti metafazės stadijos ląstelių dalijimąsi tiriant mikroskopu; jis pasireiškia kaip iškritos ir fragmentai, mainai.

Bandomoji cheminė medžiaga – taikant šį metodą bandoma medžiaga arba mišinys.

UVCB – nežinomos ar kintamos sudėties medžiagos, sudėtingųjų reakcijų produktai ir biologinės medžiagos.“

5) B dalies B.40 skyrius pakeičiamas taip:

„B.40 ODOS ĖSDINIMAS *IN VITRO*. ODOS SLUOKSNIO ELEKTRINĖS VARŽOS (OSEV) BANDYMO METODAS

IVADAS

1. Šis bandymų metodas atitinka EBPO bandymo gaires (TG) 430 (2015). Odos ėsdinimu vadinamas negrįžtamasis odos pažeidimas, kuris pasireiškia kaip matoma nekrozė per epidermį į dermį, po bandomosios cheminės medžiagos uždėjimo (kaip apibrėžta Jungtinių Tautų (JT) visuotinai suderintoje cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklavimo sistemoje (GHS) (1) ir Europos Sąjungos (ES) Reglamente Nr. 1272/2008 dėl cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo, ženklavimo ir pakavimo (CLP))¹). Šiam atnaujintam B.40 bandymo metodui pateikta *in vitro* procedūra, kurią taikant galima identifikuoti neėsdinančias ir ėsdinančias medžiagas ir mišinius pagal JT GHS (1) ir CLP.
2. Odos ėsdinimo vertinimas paprastai yra susijęs su laboratorinių gyvūnų naudojimu (B.4 bandymo metodas, atitinkantis EBPO TG 404, pirmą kartą priimtas 1981 m., peržiūrėtas 1992 m., 2002 m. ir 2015 m.) (2). Be čia pateikiamo B.40 bandymo metodo, kiti cheminių medžiagų odos ėsdinimo potencialo tyrimo *in vitro* metodai yra patvirtinti ir priimti kaip B.40bis bandymo metodas (atitinka EBPO TG 431) (3) ir B.65 bandymo metodas (atitinka EBPO TG 435) (4), kuriuos taikant taip pat galima nustatyti ėsdinančių cheminių medžiagų pakategorės. Keli patvirtinti *in vitro* bandymo metodai, priimti kaip B.46 bandymo metodas (atitinka EBPO TG 439) (5), kurie būtų taikomi odos dirginimui bandyti. EBPO rekomendaciniame dokumente dėl odos dirginimo ar ėsdinimo integruotųjų bandymo ir vertinimo metodų (IATA) aprašomi keli moduliai, kuriuose grupuojami įvairūs informacijos šaltiniai ir analizės priemonės bei pateikiami nurodymai, kaip (i) integruoti ir naudoti esamus bandymų ir ne bandymų duomenis, skirtus cheminių medžiagų odos dirginimo ir odos ėsdinimo potencialui įvertinti, ir (ii) siūlomas metodas, jei būtini papildomi bandymai (6).
3. Šis bandymo metodas skirtas tirti odos ėsdinimą kaip žmogaus sveikatos vertinamąją baigtį. Jis pagrįstas odos sluoksnio elektrinės varžos (OSEV) bandymo metodu, naudojant odos diskus ėsdinančioms medžiagoms identifikuoti pagal jų gebėjimą sumažinti normalųjį *stratum corneum* vientisumą ir apsauginę funkciją. Atitinkamos EBPO bandymo gairės buvo pirmą

¹ 2008 m. gruodžio 16 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentas (EB) Nr. 1272/2008 dėl cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo, ženklavimo ir pakavimo, iš dalies keičiantis ir panaikinantis direktyvas 67/548/EEB bei 1999/45/EB ir iš dalies keičiantis Reglamentą (EB) Nr. 1907/2006, OL L 353, 2008 12 31.

kartą priimtos 2004 m. ir atnaujintos 2015 m., pateikiant nuorodą į IATA rekomendacinį dokumentą.

4. Siekiant įvertinti *in vitro* odos ėsdinimo bandymus reglamentavimo tikslais, buvo atlikti žiurkių odos OSEV bandymo metodo parengiamieji patvirtinimo tyrimai (7) ir vėliau formaliojo patvirtinimo tyrimas odos ėsdinimui vertinti (8) (9) (10) (11). Kaip šių tyrimų rezultatas pateikta rekomendacija, kad OSEV bandymo metodas (vadinamas patvirtintu pamatiniu metodu (PPM), angl. *Validated Reference Method*) galėtų būti taikomas reglamentavimo tikslais *in vivo* odos ėsdinimui vertinti (12) (13) (14).
5. Prieš taip kaip reglamentavimo tikslais būtų galima taikyti kitą nei PPM, bet į jį panašų arba modifikuotą *in vitro* OSEV bandymo metodą, reikėtų nustatyti jo patikimumą, tinkamumą (tikslumą) ir siūlomo naudojimo apribojimus, kad būtų užtikrintas jo panašumas į PPM pagal naudojimo charakteristikų standartų reikalavimus (15). EBPO abipusis duomenų pripažinimas (angl. *Mutual Acceptance of Data*) būtų užtikrintas tik po to, kai pagal naudojimo charakteristikų standartus pasiūlytas naujas arba atnaujintas bandymo metodas būtų peržiūrėtas ir įtrauktas į atitinkamas EBPO bandymo gaires.

APIBRĖŽTYS

6. Vartojamos apibrėžtys pateiktos priedėlyje.

PRADINIAI ASPEKTAI

7. Tinkamumo patvirtinimo tyrimo (10) ir kitų paskelbtų tyrimų (16) (17) ataskaitose teigiama, kad, taikant žiurkių odos OSEV bandymo metodą, galima patikimai atskirti duomenų bazės, kurią sudaro 122 cheminės medžiagos, žinomas odą ėsdinančias ir neėsdinančias chemines medžiagas, kai bendrasis jautris yra 94 % (51/54), specifiškumas – 71 % (48/68).
8. Šis bandymo metodas skirtas odos ėsdinimui *in vitro* tirti. Jį taikant galima identifikuoti neėsdinančias ir ėsdinančias bandomąsias chemines medžiagas pagal JT GHS ir CLP. Kaip rodo patvirtinimo tyrimai (8) (9) (10) (11), šio bandymo metodo ribotumas yra tai, kad ėsdinančių medžiagų ir mišinių neįmanoma suskirstyti į JT GHS ir CLP pakategorės. Kaip bus naudojamas bandymo metodas, priklausys nuo taikomos reglamentavimo sistemos. Nors taikant šį bandymo metodą negaunama tinkamos informacijos apie odos dirginimą, reikėtų pažymėti, kad B.46 bandymo metodas konkrečiai skirtas odos dirginimui *in vitro* tirti (5). Norint išsamiai įvertinti vietinį poveikį odai po vienkartinės odos ekspozicijos, reikėtų ieškoti informacijos EBPO rekomendaciniame dokumente dėl IATA (6).
9. Atliekant šio bandymų metodo patvirtinimą, buvo išbandytos labai įvairios cheminės medžiagos (daugiausia pavienės), ir patvirtinimo tyrimo empirinę duomenų bazę sudarė 60 cheminių medžiagų, priskiriamų pačioms įvairiausioms cheminių medžiagų klasėms (8) (9). Atsižvelgiant į visus turimus duomenis, bandymo metodas tinka didelei cheminių medžiagų

klasių grupei ir agregatinėms būsenoms, įskaitant skysčius, pusiau kietas medžiagas, kietąsias medžiagas ir vaškus, tirti. Tačiau, kadangi nėra lengva rasti specifinių agregatinių būsenų bandinių, aprašytų tinkamais etaloniniais duomenimis, reikėtų pažymėti, kad atliekant patvirtinimą buvo vertinamas palyginti mažas vaškų ir ėsdinančių kietųjų medžiagų skaičius. Skysčiai gali būti vandeniniai arba nevandeniniai; kietosios medžiagos gali būti tirpios arba netirpios vandenyje. Tais atvejais, kai galima pateikti įrodymų dėl bandymų metodo netinkamumo specifinių kategorijų medžiagoms, bandymų metodo nereikėtų taikyti tos specifinės kategorijos medžiagai tirti. Be to, daroma prielaida, kad šis bandymo metodas tinka ne tik medžiagoms, bet ir mišiniams. Tačiau atsižvelgiant į tą faktą, kad mišiniai gali būti įvairių kategorijų ir sudėčių ir šiuo metu informacijos apie mišinių bandymus yra labai nedaug, tais atvejais, kai galima įrodyti, kad bandymo metodas specifinei mišinių kategorijai netinka (pvz., taikant Eskes *et al.*, 2012, pasiūlytą strategiją) (18), tai specifinei mišinių kategorijai bandymo metodas neturėtų būti taikomas. Prieš bandymo metodą taikant mišiniui, kad būtų gauti numatomo reglamentavimo tikslui skirti duomenys, reikėtų panagrinėti, ar metodu galima gauti tam tikslui tinkamus rezultatus ir, jei taip, kodėl. Tokie svarstymai nereikalingi, kai yra reglamentavimo reikalavimas bandyti mišinį. Atliekant patvirtinimo tyrimus, dujos ir aerozoliai kol kas nebuvo vertinami (8) (9). Nors, kaip atrodo, dujas ir aerozolius būtų galima bandyti taikant OSEV procedūrą, dabartinis metodas jų bandymams nėra pritaikytas.

BANDYMO PRINCIPAS

10. Bandomoji cheminė medžiaga ne ilgiau kaip 24 h uždedama ant odos diskų epidermio paviršiaus, naudojant dviejų kamerų bandymo sistemą, kurioje odos diskai yra šių kamerų skiriamoji riba. Imami humaniškai numarintų 28–30 parų amžiaus žiurkių odos diskai. Ėsdinančios cheminės medžiagos identifikuojamos pagal jų sugebėjimą sumažinti normalųjį *stratum corneum* vientisumą ir apsauginę funkciją, matuojamą kaip OSEV sumažėjimas iki mažesnės nei slenkstinė vertė (16) (žr. 32 pastraipą). Kaip žiurkių OSEV buvo pasirinkta ribinė 5 kΩ vertė, pagrįsta plataus cheminių medžiagų spektro dideliu kiekiu duomenų, pagal kuriuos didžioji dauguma verčių buvo aiškiai didesnės (dažnai > 10 kΩ) arba gerokai mažesnės (dažnai < 3 kΩ) už šią vertę (16). Paprastai bandomosios cheminės medžiagos, kurios gyvūnams nėra ėsdinančios, bet yra dirginančios arba nedirginančios, nesumažina OSEV iki vertės, mažesnės už šią ribinę vertę. Be to, naudojant kitus odos preparatus arba kitą įrangą, ribinė vertė gali pasikeisti, todėl būtinas papildomas patvirtinimas.
11. Bandymo procedūros dalį sudaro dažiklio prijungimo pakopa, atliekant patvirtinamąjį OSEV teigiamų rezultatų bandymą, įskaitant vertes apie 5 kΩ. Dažiklio prijungimo pakopoje nustatoma, ar jonų pralaidumas padidėja dėl fizinio *stratum corneum* suardymo. Įrodyta, kad naudojant žiurkių odą OSEV metodu galima prognozuoti *in vivo* triušių odos ėsdinimą, įvertinamą pagal B.4 bandymo metodą (2).

KVALIFIKACIJOS ĮRODYMAS

12. Prieš pradėdamos savo praktikoje taikyti šį bandymo metodą atitinkantį žiurkių odos OSEV bandymo metodą, laboratorijos turėtų įrodyti savo techninę kvalifikaciją – teisingai suklasifikuoti dvylika kvalifikacijai įrodyti skirtų cheminių medžiagų, rekomenduojamų 1 lentelėje. Tais atvejais, kai sąrašė nurodytos medžiagos nėra arba, jei pagrįsta, gali būti naudojama kita medžiaga, kuriai turimi tinkami *in vivo* ir *in vitro* etaloniniai duomenys (pvz., iš etaloninių cheminių medžiagų sąrašo (16)), su sąlyga, kad taikomi tie patys atrankos kriterijai, kaip aprašyta 1 lentelėje.

1 lentelė. Kvalifikacijai įrodyti skirtų medžiagų sąrašas¹

Medžiaga	CASRN	Cheminės medžiagos klasė ²	JT GHS ir CLP Kat. pagal <i>in vivo</i> rezultatus ³	PPM Kat. pagal <i>in vitro</i> rezultatus	Agregatinė būseną	pH ⁴
<i>In vivo</i> ėsdinančios						
N,N'-dimetildipropilentriaminas	10563-29-8	organinė bazė	1A	6 x Ė	L	8,3
1,2-diaminpropanas	78-90-0	organinė bazė	1A	6 x Ė	L	8,3
Sulfato rūgštis (10 %)	7664-93-9	neorganinė rūgštis	(1A)/1B/1C	5 x Ė 1x NĖ	L	1,2
kalio hidroksidas (10 % vand.)	1310-58-3	neorganinė bazė	(1A)/1B/1C	6 x Ė	L	13,2
Oktano (kaprilo) rūgštis	124-07-2	organinė rūgštis	1B/1C	4 x Ė 2 x NĖ	L	3,6
2- <i>tret</i> -butilfenolis	88-18-6	fenolis	1B/1C	4 x Ė 2 x NĖ	L	3,9
<i>In vivo</i> neėsdinančios						
Izostearino rūgštis	2724-58-5	organinė rūgštis	NĖ	6 x NĖ	L	3,6
4-amino-1,2,4-triazolas	584-13-4	organinė bazė	NĖ	6 x NĖ	S	5,5
Fenetilbromidas	103-63-9	elektrofilas	NĖ	6 x NĖ	L	3,6
4-(metiltio)-benzaldehydas	3446-89-7	elektrofilas	NĖ	6 x NĖ	L	6,8
1,9-dekadienas	1647-16-1	neutralusis organinis	NĖ	6 x NĖ	L	3,9
Tetrachloretilenas	127-18-4	neutralusis organinis	NĖ	6 x NĖ	L	4,5

Santrumpos: aq – vandeninis; CASRN – Cheminių medžiagų santrumpų tarnybos registro numeris; PPM – patvirtintas pamatinis metodas; ND – nenustatyta.

¹ Kvalifikacijai įrodyti skirtos medžiagos, iš pradžių surūšiuotos į ėsdinančias ir neėsdinančias, toliau pagal ėsdinimo pakategorę ir galiausiai pagal cheminių medžiagų klases, buvo pasirinktos iš medžiagų, kurios buvo naudojamos ECVAM atliekant žiurkių odos OSEV bandymo metodo patvirtinimo tyrimą (8) (9). Jei nenurodyta kitaip, medžiagos buvo bandomos tokio grynumo, koks buvo jas įsigijus (8). Į rinkinį įtrauktos, kiek tai buvo įmanoma, medžiagos, kurios: i) atitinka atsaką į ėsdinimą (pvz., neėsdinančios; nuo silpnai iki stipriai ėsdinančių) intervalą, kurį galima išmatuoti arba numatyti taikant PPM; ii) atitinka cheminių medžiagų klases, naudotas atliekant patvirtinimo tyrimą;

iii) atspindi PPM naudojimo charakteristikas; iv) turi aiškiai apibrėžtą cheminę sandarą; v) duoda aiškius rezultatus taikant *in vivo* pamatinį bandymo metodą; vi) yra prekyboje ir vii) nėra susijusios su labai didelėmis šalinimo išlaidomis.

² Cheminių medžiagų klasė, priskirta Barratt *et al.* (8).

³ Atitinkamos JT pakuotės grupės I, II ir III atitinka JT GHS ir CLP kategorijas 1A, 1B ir 1C.

⁴ pH vertės buvo paimtos iš Fentem *et al.* (9) ir Barratt *et al.* (8).

PROCEDŪRA

13. Yra žiurkių odos OSEV ėsdinimo bandymo metodo standartinės veiklos procedūros (SVP) (angl. Standard Operating Procedures, SOP) (19). Į šį metodą įtraukti žiurkių odos OSEV bandymo metodai turėtų atitikti šias sąlygas:

Gyvūnai

14. Reikėtų naudoti žiurkes, nes jų odos jautrumas cheminėms medžiagoms šiuo bandymu buvo įrodytas anksčiau (12) ir tai yra vienintelis odos šaltinis, kuris yra oficialiai patvirtintas (8) (9). Amžius (kai imama oda) ir žiurkių veislė yra ypač svarbi užtikrinant, kad plaukų folikulai būtų ramybės būsenoje prieš suaugusių plaukų augimo pradžią.
15. Jaunų, maždaug 22 parų amžiaus patinų arba patelių (Wistar arba panašios veislės žiurkių) nugaros ir šonų plaukai atsargiai nukerpami žirkutėmis. Gyvūnai plaunami atsargiai trinant nukirptą plotą panardintą į antibiotikų tirpalą (pvz., streptomicino, penicilino, chloramfenikolio ir amfotericino, kurių koncentracijos pakaktų bakterijų augimui efektyviai slopinti). Trečią arba ketvirtą dieną po pirmojo plovimo gyvūnai dar kartą plaunami antibiotikais ir panaudojami per 3 dienas po antrojo plovimo, kai *stratum corneum* atsigavo po plaukų kirpimo.

Odos diskų ruošimas

16. Gyvūnai humaniškai numarinami, kai jie yra 28–30 parų amžiaus; šis amžius yra ribinis. Nudiriama kiekvieno gyvūno oda nuo nugaros ir šonų ir pašalinami pertekliniai poodiniai riebalai, juos atsargiai nuskutant nuo odos. Išpjunami odos diskai, kurių kiekvieno skersmuo maždaug 20 mm. Odą diskų gamybai galima panaudoti vėliau, jei įrodoma, kad teigiamų ir neigiamų kontrolinių ėminių duomenys atitinka duomenis, gautus su ką tik paruošta oda.
17. Kiekvienas odos diskas dedamas ant vieno PTFE (politetrafluoretileno) vamzdžio galo, žiūrint, kad su vamzdžiu liestųsi epidermio paviršius. Ant vamzdžio galo užspaudžiamas guminis žiedinis tarpiklis, kad oda negalėtų judėti, audinio perteklius nukerpamas. Guminis žiedinis tarpiklis ir PTFE vamzdžio galas kruopščiai sandarinami vazelinu. Spyruokliniu spaustuku vamzdis tvirtinamas rinktuvo kameroje su MgSO₄ tirpalu (154 mmol/l) (1 paveikslas). Odos diskas turėtų būti visiškai panardintas į MgSO₄ tirpalą. Iš vienos žiurkės odos galima pagaminti 10–15 odos diskų. Vamzdžio ir žiedinio tarpiklio matmenys pateikti 2 paveiksle.

18. Prieš pradedant bandymą matuojama dviejų odos diskų elektrinė varža, kaip kiekvieno gyvūno odos kokybės kontrolės procedūros dalis. Abiejų diskų elektrinė varža turėtų būti didesnė kaip 10 k Ω , kad likusius diskus būtų galima naudoti bandymui. Jei varžos vertė yra mažesnė kaip 10 k Ω , kitus iš tos odos pagamintus diskus reikėtų išmesti.

Bandomosios cheminės medžiagos ir kontrolinių cheminių medžiagų uždėjimas

19. Siekiant užtikrinti tinkamas bandymo modelio charakteristikas, kiekvienam atskiram bandymui reikėtų naudoti vienalaikius teigiamus ir neigiamus kontrolinius ėminius. Kiekvienam atskiram bandymui (eksperimentui) reikėtų naudoti vieno gyvūno odos diskus. Rekomenduojamos teigiamo ir neigiamo kontrolinių ėminių bandomosios cheminės medžiagos yra 10 mol/l vandenilio chlorido rūgštis ir distiliuotas vanduo.
20. Skystosiomis bandomosiomis cheminėmis medžiagomis (150 μ l) tolygiai padengiamas epidermio sluoksnis vamzdžio viduje. Jei bandomos kietosios medžiagos, ant disko tolygiai uždedamas pakankamas kietos medžiagos kiekis, kad būtų padengtas visas epidermio paviršius. Ant kietosios medžiagos viršaus užpilama dejonizuoto vandens (150 μ l) ir vamzdis nestipriai purtomas. Siekiant užtikrinti didžiausią įmanomą sąlytį su oda, kietąsias medžiagas gali tekti pašildyti iki 30 °C, kad bandomoji cheminė medžiaga išsilydytų arba suminkštėtų, arba sumalti į granules arba miltelius.
21. Kiekvienai bandomajai ir kontrolinei cheminei medžiagai naudojami trys odos diskai kiekvienam atskiram bandymui. Bandomosios cheminės medžiagos uždedamos 24 valandoms 20–23 °C temperatūroje. Bandomoji cheminė medžiaga pašalinama plaunant kambario temperatūros vandentiekio vandens srove tol, kol daugiau medžiagos nebeįmanoma pašalinti.

OSEV matavimai

22. Odos pilnutinė varža matuojama kaip OSEV, naudojant žemos įtampos, kintamosios srovės Vitstono tiltelį (18). Bendrosios tiltelio specifikacijos: 1–3 V darbinė įtampa, sinusinė arba stačiakampio formos kintamoji 50–1000 Hz srovė ir bent 0,1–30 k Ω matavimo intervalas. Patvirtinimo tyrime naudojamas tiltelis matuoja induktyvumą, talpą ir varžą iki 2000 H, 2000 μ F ir 2 M Ω , esant 100 Hz arba 1 kHz dažniui, ir naudojant nuoseklaus arba lygiagreto jungimo vertes. Atliekant ėsdinimo savybių bandymo OSEV matavimus, registruojama varža, esant 100 Hz dažniui ir naudojant nuoseklaus jungimo vertes. Prieš matuojant elektrinę varžą odos paviršiaus įtemptis sumažinama įpilant epidermiui padengti pakankamą tūrį 70 % etanolio. Po kelių sekundžių etanolis iš vamzdžio išpilamas ir audinys drėkinamas įpilant 3 ml MgSO₄ tirpalo (154 mmol/l). Tiltelio elektrodai dedami iš abiejų odos disko pusių jo varžai k Ω /diskui išmatuoti (1 paveikslas). Elektrodų matmenys ir elektrodų ilgiai žemiau dantytųjų spaustukų pateikti 2 paveiksle. Prie vidinio elektrodo prijungtas spaustukas matuojant varžą guli ant PTFE vamzdžio viršaus, siekiant užtikrinti, kad į MgSO₄ tirpalą būtų panardinta reikiama elektrodo dalis. Išorinis elektrodas įstatomas į rinktuvo kamerą taip, kad jis remtųsi į kameros dugną. Užtikrinamas nekintamas atstumas tarp spyruoklinio spaustuko ir PTFE vamzdžio dugno (2 paveikslas), kadangi šis atstumas turi įtakos gautai varžos vertei. Dėl tos pačios priežasties

atstumas tarp vidinio elektrodo ir odos disko turėtų būti pastovus ir kiek įmanoma mažesnis (1–2 mm).

23. Jei išmatuota varžos vertė yra didesnė kaip 20 k Ω , tai gali būti dėl bandomosios cheminės medžiagos likučių, dengiančių odos disko epidermio paviršių. Galima mėginti dar kartą pašalinti šią dangą, pvz., užkimšti PTFE vamzdžio angą pirštinėtu nykščiu ir purtyti maždaug 10 s; MgSO₄ tirpalas išpilamas ir varža dar kartą matuojama, įpylus naujo MgSO₄ tirpalo.
24. Bandymo aparato savybės bei matmenys ir taikoma matavimo procedūra gali turėti įtakos gautoms OSEV vertėms. 5 k Ω esdinimo slenkstinė vertė buvo nustatyta pagal duomenis, gautus naudojant šiame metode aprašytą konkretų aparatą ir procedūrą. Gali būti taikomos kitos slenkstinės ir kontrolinės vertės, jei pakinta bandymo sąlygos arba naudojamas kitas aparatas. Taigi procedūrą ir varžos slenkstines vertes būtina kalibruoti, bandant kelias kvalifikacijai įrodyti skirtas chemines medžiagas, pasirinktas iš patvirtinimo tyrime naudotų cheminių medžiagų (8) (9), arba iš į tiriamas medžiagas panašių cheminių medžiagų klasių medžiagų. Kvalifikacijai įrodyti skirtų cheminių medžiagų rinkinys nurodytas 1 lentelėje.

Dažiklio prijungimo metodai

25. Veikiant tam tikroms neesdinančioms medžiagoms varža gali sumažėti iki mažesnės nei ribinė 5 k Ω vertė, todėl jona galėtų skverbtis per *stratum corneum* ir dėl to sumažėtų elektrinė varža (9). Pavyzdžiui, neutraliosios organinės medžiagos ir paviršinio aktyvumo savybių turinčios medžiagos (įskaitant ploviklius, emulsiklius ir kitas paviršinio aktyvumo medžiagas) gali pašalinti odos riebalus, todėl užtvaras tampa pralaidesnis jonams. Taigi, jei nesant akimi matomų odos pažeidimų tokioms cheminėms medžiagoms gautos OSEV vertės yra mažesnės kaip 5 k Ω arba arti šios vertės, reikėtų įvertinti kontrolinių ir apdorotų audinių dažiklio prasiskverbimą, kad būtų galima nustatyti, ar gautos OSEV vertės buvo padidėjusio odos pralaidumo, ar odos esdinimo rezultatas (7) (9). Pastaruoju atveju, jei įtrūksta *stratum corneum*, ant odos paviršiaus uždėtas sulforodamino B dažiklis greitai prasiskverbia ir nudažo apačioje esantį audinį. Šis specialusis dažiklis yra atsparus daugeliui įvairių cheminių medžiagų, ir jam įtakos nedaro toliau aprašyta ekstrahavimo procedūra.

Sulforodamino B dažiklio uždėjimas ir pašalinimas

26. Po OSEV įvertinimo magnio sulfatas išpilamas iš vamzdžio ir oda kruopščiai apžiūrima, ieškant akivaizdžių jos pažeidimų. Jei nėra akivaizdžių didesnių pažeidimų (pvz., pradūrimo), sulforodamino B dažiklio (rūgščiojo raudonojo 52; C.I. 45100; CAS numeris 3520-42-1) 150 μ l 10 % (m/V) tirpalo distiliuotame vandenyje užpilama ant kiekvieno disko epidermio paviršiaus 2 valandoms. Vėliau šie odos diskai maždaug 10 s plaunami kambario temperatūros vandentiekio vandeniu dažiklio pertekliui ar nesurištam dažikliui pašalinti. Kiekvienas odos diskas atsargiai nuimamas nuo PTFE vamzdžio ir įdedamas į buteliuką (pvz., į 20 ml scintiliacinį buteliuką) su dejonizuotu vandeniu (8 ml). Buteliukai nestipriai purtomi 5 min, kad pasišalintų perteklinis nesurištas dažiklis. Plovimo procedūra kartojama, odos diskai išimami ir

įdedami į buteliukus su 5 ml 30 % (m/V) natrio dodecilsulfato tirpalo distiliuotame vandenyje ir inkubuojami per naktį 60 °C temperatūroje.

27. Po inkubavimo kiekvienas diskas išimamas ir išmetamas, o likęs tirpalas centrifuguojamas (esant ~175 g pagreičiui) 8 min 21 °C temperatūroje. 1 ml tirpalo virš nuosėdų ėminys skiedžiamas santykiu 1:5 (V/V) (t. y. 1 ml + 4 ml) 30 % (m/V) natrio dodecilsulfato tirpalu distiliuotame vandenyje. Tirpalo optinis tankis matuojamas esant 565 nm bangos ilgiui.

Dažiklio kiekio skaičiavimas

28. Sulforodamino B dažiklio kiekis vienam diskui apskaičiuojamas pagal optinio tankio vertes (9) (sulforodamino B dažiklio molinis ekstinkcijos koeficientas = $8,7 \times 10^4$, esant 565 nm; molekulinė masė = 580). Dažiklio kiekis ant kiekvieno disko nustatomas, naudojant atitinkamą kalibravimo kreivę, ir apskaičiuojamas kartotinių ėminių vidutinis dažiklio kiekis.

Priimtumo kriterijai

29. Vidutiniai OSEV rezultatai yra priimtini, jei vienalaikiams teigiamiems ir neigiamiems kontroliniams ėminiams gautos vertės patenka į bandymo laboratorijos metodui priimtinus intervalus. Priimtini varžos intervalai, taikant pirmiau aprašytą metodą ir aparatūrą, pateikti šioje lentelėje:

Kontrolinis ėminys	Medžiaga	Varžos intervalas (kΩ)
Teigiamas	10 mol/l vandenilio chlorido rūgštis	0,5–1,0
Neigiamas	Distiliuotas vanduo	10–25

30. Vidutiniai dažiklio prijungimo rezultatai yra priimtini, jei vienalaikių kontrolinių ėminių vertės patenka į metodui priimtinus intervalus. Rekomenduojami kontrolinėms medžiagoms priimtini dažiklio kiekio intervalai, taikant pirmiau aprašytą metodą ir aparatūrą, pateikti šioje lentelėje:

Kontrolinis ėminys	Medžiaga	Dažiklio kiekio intervalas (µg/diskui)
Teigiamas	10 mol/l vandenilio chlorido rūgštis	40–100
Neigiamas	Distiliuotas vanduo	15–35

Rezultatų aiškinimas

31. Ribinė OSEV vertė, skirianti ėsdinančias ir neėsdinančias bandomąsias chemines medžiagas, buvo nustatyta atliekant metodo optimizavimą, bandyta parengiamojo patvirtinimo etape ir patvirtinta atliekant formaliojo patvirtinimo tyrimą.
32. Toliau pateikiamas žiurkių odos OSEV ėsdinimo bandymo metodo prognozavimo modelis (9) (19), susijęs su JT GHS ir CLP klasifikavimo sistema:

Laikoma, kad bandomoji cheminė medžiaga neėsdina odos:

- i) jei bandomosios cheminės medžiagos OSEV vidutinė vertė yra didesnė kaip ($>$) 5 k Ω , arba
- ii) jei bandomosios cheminės medžiagos OSEV vidutinė vertė yra mažesnė kaip arba lygi ($\leq$) 5 k Ω ir
- nesimato akivaizdaus odos diskų pažeidimo (pvz., pradūrimo), ir
- vidutinis dažiklio ant disko kiekis yra mažesnis ($<$) nei vidutinis dažiklio ant disko kiekis, gautas 10 mol/l HCl vienalaikiam kontroliniam ėminiui (teigiamų kontrolinių ėminių vertės nurodytos 30 pastraipoje).

Laikoma, kad bandomoji medžiaga ėsdina odą:

- i) jei bandomosios cheminės medžiagos OSEV vidutinė vertė yra mažesnė arba lygi ($\leq$) 5 k Ω ir yra akivaizdus odos diskų pažeidimas (pvz., pradūrimas), arba
 - ii) jei bandomosios cheminės medžiagos OSEV vidutinė vertė yra mažesnė kaip arba lygi ($\leq$) 5 k Ω ir
 - nesimato akivaizdaus odos diskų pažeidimo (pvz., pradūrimo), bet
 - vidutinis dažiklio ant disko kiekis yra didesnis arba lygus ($\geq$) vidutiniam dažiklio ant disko kiekiui, gautam vienalaikiam teigiamam kontroliniam 10 mol/l HCl ėminiui (teigiamų kontrolinių ėminių vertės pateiktos 30 pastraipoje).
33. Jei dėl klasifikavimo neabejojama, bandomajai cheminei medžiagai turėtų pakakti vieno atskiro ne mažiau kaip trijų kartotinių odos diskų bandinių bandymo. Tačiau, jei rezultatai ribiniai, pvz., kartotinių ėminių matavimų rezultatai nesutampa ir (arba) vidutinė OSEV vertė lygi $5 \pm 0,5$ k Ω , reikėtų spręsti dėl antrojo nepriklausomo bandymo, taip pat dėl trečiojo, jei pirmųjų dviejų atskirų bandymų rezultatai išsiskirtų.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Duomenys

34. Bandomajai cheminei medžiagai, be to, teigiamiems ir neigiamiems kontroliniams ėminiams gautas varžos vertės (k Ω) ir dažiklio kiekio vertės (μ g/diskui), jei tinka, reikėtų pateikti lentelėse, įskaitant kiekvieno bandymo kiekvieno kartotinio disko bandinio duomenis, ir vidutinę vertę $\pm$ standartinę nuokrypį). Ataskaitoje turėtų būti pateikti visi kartotiniai bandymai. Ataskaitoje turėtų būti pateikti pastebėti odos diskų pažeidimai, susiję su kiekviena bandomąja chemine medžiaga.

Bandymo ataskaita

35. Į bandymo ataskaitą turėtų būti įtraukta ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga ir kontrolinės cheminės medžiagos

- Vienkomponentė medžiaga: cheminio identifikavimo duomenys, pvz., IUPAC ar CAS pavadinimas, CAS numeris, SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė, grynumas, cheminis priemaišų pavadinimas, jei tinka bei praktiškai įmanoma ir kt.;
- daugiakomponentė medžiaga, UVCB ir mišinys: kuo išsamesnis sudedamųjų dalių apibūdinimas, nurodant cheminį pavadinimą (žr. pirmiau), kiekybinį paplitimą ir būdingas fizikines ir chemines savybes;
- fizinė išvaizda, tirpumas vandenyje ir papildomos būdingos fizikinės ir cheminės savybės;
- šaltinis, partijos numeris, jei yra;
- bandomosios ir (arba) kontrolinės cheminės medžiagos apdorojimas prieš bandymą, jei tai atliekama (pvz., šildymas, malimas);
- bandomosios cheminės medžiagos stabilumas, naudojimo pabaigos data arba pakartotinės analizės data, jei žinoma;
- laikymo sąlygos.

Bandymo gyvūnai:

- naudota rūšis ir lytis;
- gyvūnų amžius, kai naudojami odos donorais;
- šaltinis, laikymo sąlygos, pašaras ir kt.;
- išsami informacija apie odos ruošimą.

Bandymo sąlygos

- bandymo aparato kalibravimo kreivės;
- kalibravimo kreivės dažiklio prijungimo bandymui atlikti, optinio tankio verčių matavimo praleidimo dažnių juosta, matavimo prietaiso optinio tankio tiesiškumo intervalas (pvz., spektrofotometro), jei tinka;
- OSEV matavimams naudojamos bandymo procedūros išsamūs duomenys;
- dažiklio prijungimo įvertinimui naudojamos bandymo procedūros išsamūs duomenys; jei reikia;
- naudotos bandymo dozės, ekspozicijos laikotarpio (-ų) trukmė ir ekspozicijos temperatūra (-os);
- informacija apie plovimą pasibaigus ekspozicijos laikotarpiui;
- vienai bandomajai cheminei medžiagai ir kontroliniams ėminiams (teigiamiems ir neigiamiems kontroliniams ėminiams) naudotų kartotinių odos diskų bandinių skaičius;
- visų bandymo procedūros pakeitimų aprašymas;
- nuoroda į modelio istorinius duomenis. Turėtų būti įtraukti šie ir kiti duomenys:

- i) teigiamų ir neigiamų kontrolinių ėminių OSEV verčių ($k\Omega$) priimtinumą, atsižvelgiant į teigiamų ir neigiamų kontrolinių ėminių atsparumo intervalą,
 - ii) teigiamų ir neigiamų kontrolinių ėminių dažiklio kiekio verčių ($\mu\text{g}/\text{diskui}$) priimtinumą, atsižvelgiant į teigiamų ir neigiamų kontrolinių ėminių dažiklio kiekio intervalus,
 - iii) bandymo rezultatų priimtinumą, atsižvelgiant į istorinį odos disko kartotinių bandinių kintamumą;
- taikomų sprendimo priėmimo ir (arba) prognozavimo kriterijų aprašymas.

Rezultatai:

- lentelėse pateikti kiekvieno bandymo rinkinio atskirų bandomųjų cheminių medžiagų ir kontrolinių ėminių OSEV bei dažiklio prijungimo bandymų (jei tinka) duomenys, kiekvieno kartotinio odos disko bandinio (atskirų gyvūnų ir atskirų odos ėminių) duomenys, vidurkiai, standartiniai nuokrypiai ir variacijos koeficientai (VK);
- visų pastebėtų reiškinių aprašymas;
- gautas klasifikavimas su nuoroda į naudotą prognozavimo modelį ir (arba) į taikytus sprendimo priėmimo kriterijus.

Rezultatų aptarimas

Išvados

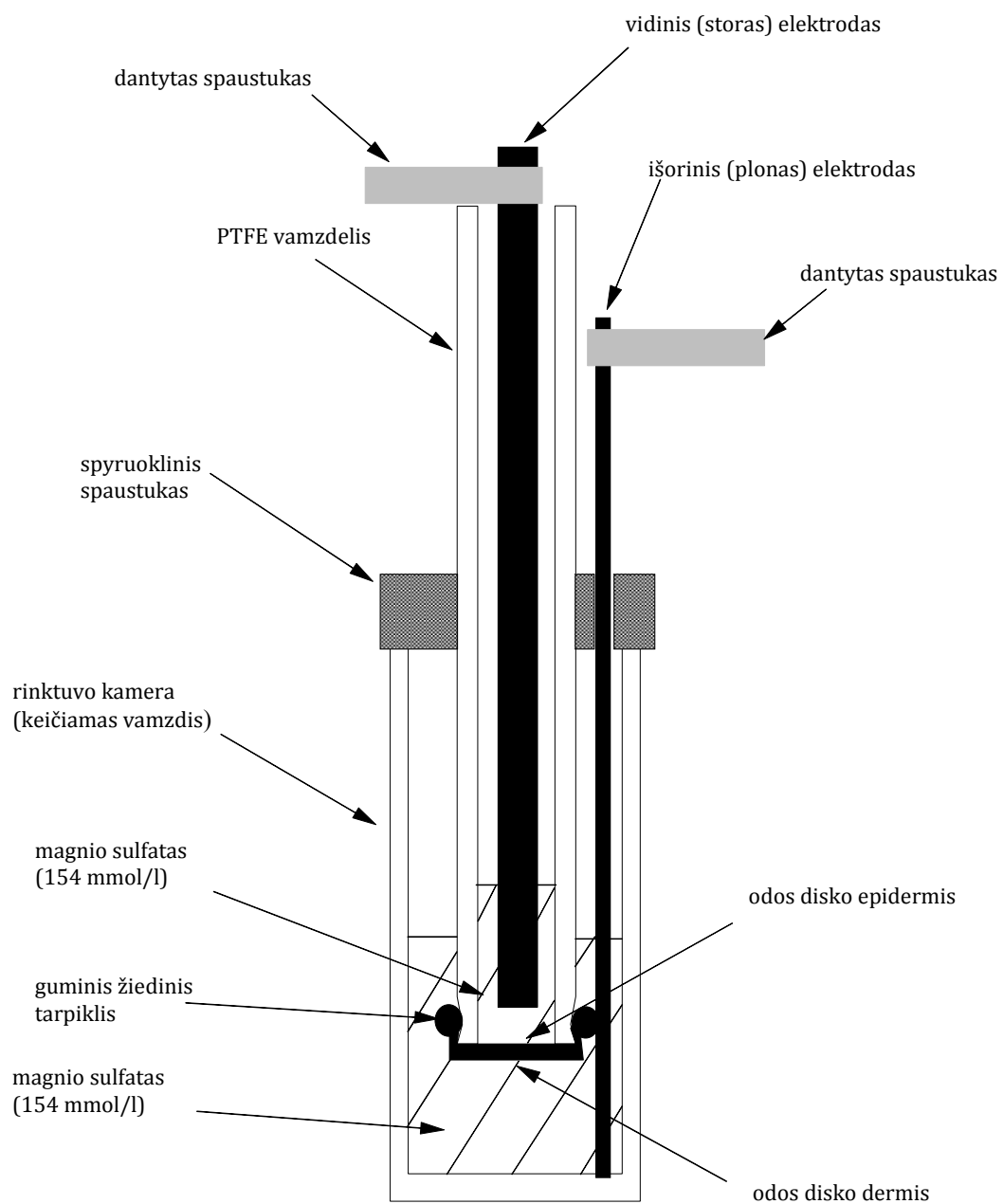
LITERATŪRA

- (1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Pateikta [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html].
- (2) Šio priedo B.4 skyrius. Ūmus odos dirginimas, ėsdinimas.
- (3) Šio priedo B.40bis skyrius. *In Vitro* odos modelis.
- (4) Šio priedo B.65 skyrius. *In Vitro* odos ėsdinimo naudojant membranine pertvarą metodus.
- (5) Šio priedo B.46 skyrius. *In Vitro* odos dirginimas. Rekonstruoto žmogaus epidermio bandymo metodus.
- (6) OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (7) Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile D.J., Gardner J.R., Gordon V.C., Hildebrand B., Lewis R.W., Liebsch M., Logemann P., Osborne R., Ponc M., Regnier J.F., Steiling W., Walker A.P., and Balls M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 6. *ATLA* 23, 219-255.
- (8) Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., and Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and Distribution of the Test Chemicals. *Toxic.In Vitro* 12, 471-482.
- (9) Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Holzhütter H.-G., and Liebsch M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests For Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxic.In Vitro* 12, 483- 524.
- (10) Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., Bruner L., Combes R.D., Ekwall B., Fielder R.J., Guillouzo A., Lewis R.W., Lovell D.P., Reinhardt C.A., Repetto G., Sladowski D., Spielmann H., and Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops. *ATLA* 23, 129-147.
- (11) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of

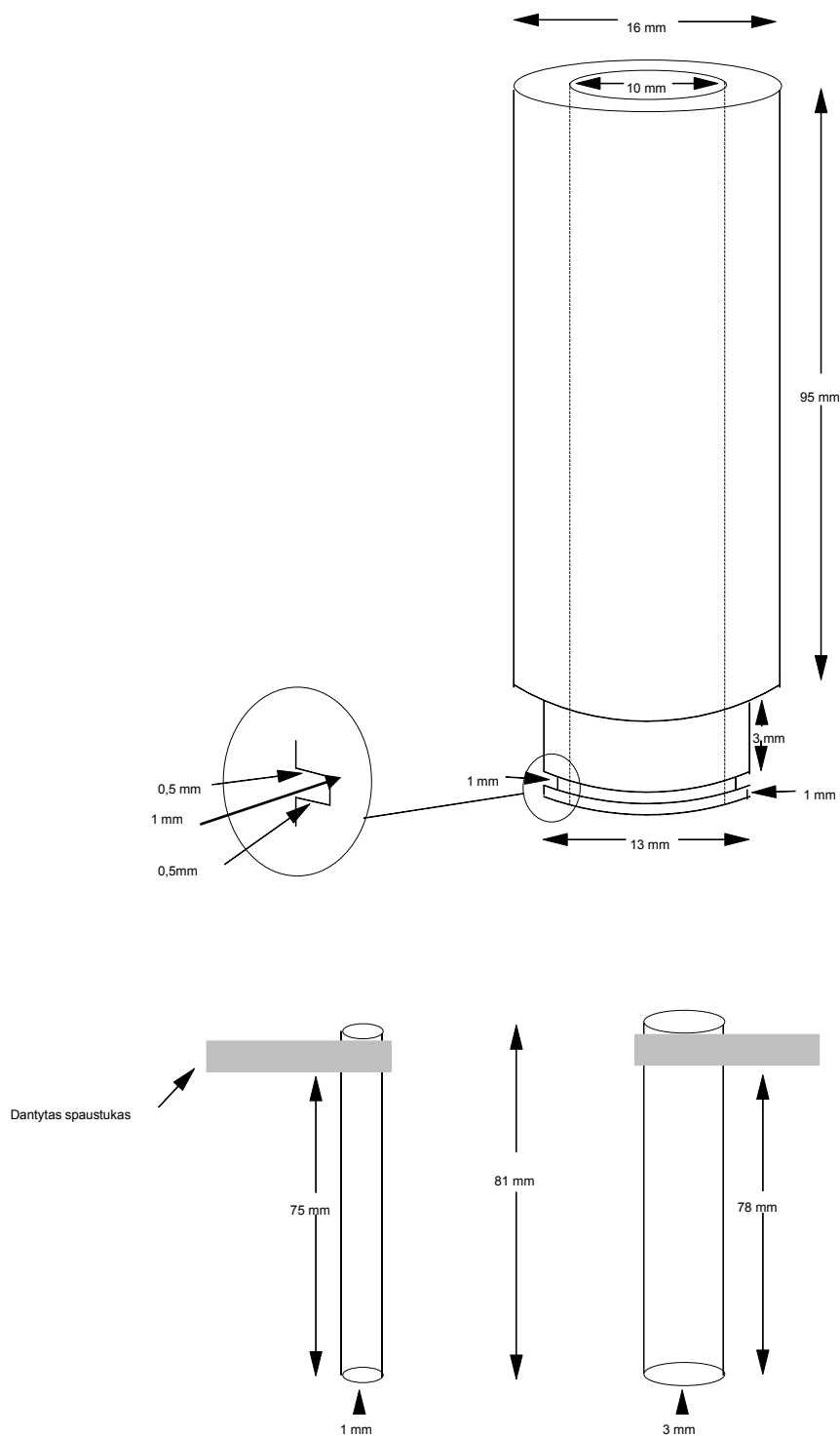
- Toxicological Test Methods. NIH Publication No 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.
- (12) EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), 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), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

1 PAVEIKSLAS. ŽIURKIŲ ODOS OSEV BANDYMO APARATAS



2 PAVEIKSLAS. POLITETRAFLUORETILENO (PTFE) IR RINKTUVO VAMZDŽIŲ BEI NAUDOJAMŲ ELEKTRODŲ MATMENYS



Viršuje pavaizduoto aparato svarbiausi parametrai:

- PTFE vamzdžio vidinis skersmuo,

- elektrodų ilgis PTFE bei rinktuvo vamzdžių atžvilgiu, kuris turėtų būti toks, kad elektrodai neliestų odos disko ir standartinio ilgio elektrodo atkarpa būtų panardinta į MgSO_4 tirpalą,
- MgSO_4 tirpalo tūris rinktuvo vamzdyje turėtų užtikrinti 1 paveiksle parodytą skysčio gylį atžvilgiu jo lygio PTFE vamzdyje, kaip pavaizduota 1 paveiksle,
- odos diskas turėtų būti gana gerai pritvirtintas prie PTFE vamzdžio, kad elektrinė varža būtų tikrasis odos savybių matas.

Priedėlis

APIBRĖŽTYS

Tikslumas – bandymo metodo rezultatų ir patvirtintų pamatinių verčių sutapimo artumas. Tikslumas yra bandymo metodo taikymo charakteristikų matas ir vienas iš tinkamumo aspektų. Terminas dažnai vartojamas kaip lygiavertis terminui „sutapimas“ ir reiškia tinkamų bandymo metodo rezultatų dalį (20).

Ė – ėsdinanti.

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

Sutapimas – bandymo metodo, kuriuo gaunamas su kategorija susijęs rezultatas, taikymo charakteristikų matas ir vienas iš tinkamumo aspektų. Terminas kartais vartojamas kaip lygiavertis terminui „tikslumas“ ir apibrėžiamas kaip dalis visų bandytų cheminių medžiagų, kurios tiksliai klasifikuojamos kaip teigiamos arba neigiamos. Sutapimas labai priklauso nuo tiriamos bandomosios cheminės medžiagos tipui gautų teigiamų rezultatų dalies (20).

GHS (Visuotinai suderinta cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklinimo sistema (JT)) – sistema, kurioje pateikiamas cheminių medžiagų (medžiagų ir mišinių) klasifikavimas pagal standartizuotus fizikinių pavojų, pavojų sveikatai bei aplinkai tipus ir nagrinėjami atitinkami informaciniai elementai, pvz., piktogramos, signaliniai žodžiai, pavojingumo frazės, atsargumo frazės ir saugos duomenų lapai, kad būtų galima informuoti apie medžiagų neigiamą poveikį, siekiant apsaugoti žmones (įskaitant darbuotojus, darbininkus, vežėjus, vartotojus ir avarijų likvidatorius) ir aplinką (1).

IATA – integruotasis bandymo ir vertinimo metodas.

Mišinys – dviejų ar daugiau cheminių medžiagų mišinys ar tirpalas.

Vienkomponentė medžiaga – medžiaga, kurią apibrėžia jos kiekybinė sudėtis, kai vienas pagrindinis komponentas sudaro ne mažiau kaip 80 % (masės).

Daugiakomponentė medžiaga – medžiaga, kurią apibrėžia jos kiekybinė sudėtis, kai daugiau kaip vieno pagrindinio komponento koncentracija $\geq 10\%$ (masės) ir $< 80\%$ (masės). Daugiakomponentė medžiaga yra gamybos proceso rezultatas. Skirtumas tarp mišinio ir daugiakomponentės medžiagos yra tas, kad mišinys gaunamas sumaišant dvi medžiagas arba daugiau nevykstant cheminei reakcijai. Daugiakomponentė medžiaga yra cheminės reakcijos rezultatas.

NĖ– neėsdinanti.

OT – optinis tankis.

Teigiamas kontrolinis (PC) ėminys – kartotinis ėminys, turintis visus bandymo sistemos komponentus ir apdorotas chemine medžiaga, kuri yra žinoma kaip sukelianti teigiamą atsaką. Siekiant užtikrinti galimybę vertinti teigiamo kontrolinio ėminio atsako kintamumą per tam tikrą laiką, teigiamas atsakas neturėtų būti per stiprus.

Naudojimo charakteristikų standartai (angl. PS) – patvirtintu bandymo metodu pagrįsti standartai, kurie yra pagrindas įvertinti mechanizmo ir funkcinio požiūriu panašaus siūlomo bandymo metodo palyginamumą. Įtraukti: i) esminiai bandymo metodo komponentai; ii) etaloninių cheminių medžiagų, parinktų iš cheminių medžiagų, naudojamų patvirtinto bandymo metodo priimtinioms naudojimo charakteristikoms įrodyti, būtinasis sąrašas; ir iii) panašūs tikslumo bei patikimumo lygiai, pagrįsti gautais patvirtintam bandymo metodui, kuriuos siūlomas bandymo metodas turėtų rodyti, kai yra įvertinamas naudojant būtinąjį etaloninių cheminių medžiagų sąrašą.

Tinkamumas – santykio tarp bandymo metodo ir tiriamo poveikio apibūdinimas bei bandymo reikšmingumo ir naudingumo siekiant tam tikro tikslo nustatymas. Tai yra bandymo metodo, taikomo tiriamam biologiniam poveikiui matuoti ar prognozuoti, tikslumo laipsnis. Tinkamumas aprėpia bandymo metodo tikslumo (atitikties) aspektą (20).

Patikimumas – pagal tą patį protokolą atliekamo bandymų metodo, ilgą laiką taikomo laboratorijose ir tarp laboratorijų, atkuriamumo laipsnio matas. Jis vertinamas skaičiuojant atkuriamumą laboratorijoje ir tarp laboratorijų (20).

Jautris – visų teigiamų ir (arba) veiklių cheminių medžiagų, kurios yra tinkamai klasifikuotos taikant bandymo metodą, dalis. Jis yra bandymo metodo, kuriuo gaunami su kategorija susiję rezultatai, tikslumo matas ir svarbus aspektas vertinant bandymo metodo tinkamumą (20).

Odos ėsdinimas *in vivo* – negrįžtamas odos pažeidimas; būtent, matoma dermio nekrozė per epidermį, praėjus ne daugiau kaip keturioms valandoms po bandomosios cheminės medžiagos uždėjimo. Atsakas į ėsdinimą yra opos, kraujavimas, kruvini šašai ir, pasibaigus 14 parų stebėjimo laikotarpiui, odos blukimas dėl jos šutimo, visiškai nuplikusios vietos ir randai. Neaiškūs pažeidimai turėtų būti vertinami pasitelkiant histopatologinį tyrimą.

Specifiškumas – visų neigiamų ar neveikliųjų cheminių medžiagų, kurios yra tinkamai klasifikuotos taikant bandymo metodą, dalis. Jis yra bandymo metodo, kuriuo gaunami su kategorija susiję rezultatai, tikslumo matas ir svarbus aspektas vertinant bandymo metodo tinkamumą (20).

Medžiaga – natūralus arba gamybos proceso metu gautas cheminis elementas ir cheminių elementų junginys, įskaitant priedus, reikalingus jo stabilumui išlaikyti, ir priemaišas, atsirandančias gaminant, išskyrus tirpiklius, kurie gali būti atskirti nedarant poveikio cheminės medžiagos stabilumui ar nepakeičiant jos sudėties;

(Bandymo) rinkinys – viena bandomoji cheminė medžiaga vienu metu bandyta su ne mažiau kaip trimis kartotiniaisia odos diskų bandiniais.

Bandomoji cheminė medžiaga – taikant šį metodą bandoma medžiaga arba mišinys.

Odos sluoksnio elektrinė varža (OSEV) – odos pilnutinės elektrinės varžos matas, išreikštas varžos verte kiloomais. Paprastas ir patikimas apsauginės funkcijos vertinimo metodas, registruojant jonų judėjimą per odos sluoksnį Vitstono tiltelio prietaisu.

UVCB – nežinomos ar kintamos sudėties medžiagos, sudėtingųjų reakcijų produktai ar biologinės medžiagos.“

6) B dalies B.40bis skyrius pakeičiamas taip:

„B.40bis. *IN VITRO* ODOS ĖSDINIMAS. REKONSTRUOTO ŽMOGAUS EPIDERMIO (RhE) BANDYMO METODAS

IVADAS

1. Šis bandymų metodas atitinka EBPO bandymo gaires (TG) 431 (2016). Odos ėsdinimu vadinamas negrįžtamasis odos pažeidimas, kuris pasireiškia kaip matoma nekrozė per *epidermį* į *dermį*, po bandomosios cheminės medžiagos uždėjimo (kaip apibrėžta Jungtinių Tautų (JT) visuotinai suderintoje cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklavimo sistemoje (GHS) (1) ir Europos Sąjungos (ES) Reglamente Nr. 1272/2008 dėl cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo, ženklavimo ir pakavimo (CLP))¹). Šiam atnaujintam B.40bis bandymo metodui pateikta *in vitro* procedūra, kurią taikant galima identifikuoti neėsdinančias ir ėsdinančias medžiagas ir mišinius pagal JT GHS ir CLP. Ją taikant taip pat kažkiek galima skirstyti ėsdinančias medžiagas į pakategores.
2. Odos ėsdinimo potencialo vertinimas paprastai yra susijęs su laboratorinių gyvūnų naudojimu (B.4 bandymo metodas, atitinkantis EBPO TG 404, pirmą kartą priimtas 1981 m., peržiūrėtas 1992 m., 2002 m. ir 2015 m.) (2). Be šio B.40bis bandymo metodo, yra patvirtinti ir priimti du kiti cheminių medžiagų odos ėsdinimo potencialo bandymo *in vitro* metodai, kaip B.40 bandymo metodas (atitinka EBPO TG 430) (3) ir B.65 bandymo metodas (atitinka EBPO TG 435) (4). Be to, odos dirginimo potencialui bandyti yra priimtas B.46 *in vitro* bandymo metodas (atitinka EBPO TG 439) (5). EBPO rekomendaciniame dokumente dėl odos dirginimo ar ėsdinimo integruotųjų bandymo ir vertinimo metodų (IATA) aprašomi keli moduliai, kuriuose grupuojami informacijos šaltiniai ir analizės priemonės bei pateikiami nurodymai, kaip (i) integruoti ir naudoti esamus bandymų ir ne bandymų duomenis, skirtus cheminių medžiagų odos dirginimo ir odos ėsdinimo potencialui įvertinti, ir (ii) siūlomas metodas, jei būtini papildomi bandymai (6).
3. Šis bandymo metodas skirtas tirti odos ėsdinimą kaip žmogaus sveikatos vertinamąją baigtį. Atliekant bandymą naudojamas rekonstruotas žmogaus *epidermis* (angl. *Reconstructed human Epidermis*, santrumpa RhE) (gautas iš žmogaus odos netransformuotų epidermio keratinocitų), kuris labai tiksliai atkartoja histologines, morfologines, biochemines ir fiziologines viršutinių žmogaus odos dalių, t. y. *epidermio* savybes. Atitinkamos EBPO bandymo gairės buvo pirmą

¹ 2008 m. gruodžio 16 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentas (EB) Nr. 1272/2008 dėl cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo, ženklavimo ir pakavimo, iš dalies keičiantis ir panaikinantis direktyvas 67/548/EEB bei 1999/45/EB ir iš dalies keičiantis Reglamentą (EB) Nr. 1907/2006, OL L 353, 2008 12 31.

kartą priimtą 2004 m. ir atnaujintą 2013 m., įtraukiant papildomus, RhE modelį naudojančius bandymo metodus ir galimybę taikyti metodus, kurie pagrįstų ėsdinančių cheminių medžiagų skirstymą į pakategorės, ir dar kartą atnaujintą 2015 m., pateikiant nuorodą į IATA rekomendacinį dokumentą bei įtraukiant alternatyviąją gyvybingumo matavimo procedūrą.

4. Į šį bandymo metodą įtraukti keturi patvirtinti prekyboje esantys RhE modeliai. Buvo atlikti šių dviejų prekyboje esančių bandymo modelių, *EpiSkin™ Standard Model (SM)* ir *EpiDerm™ Skin Corrosivity Test (SCT)* (EPI-200) parengiamieji patvirtinimo tyrimai (7), ir vėliau atliktas formaliojo patvirtinimo tyrimas odos ėsdinimui vertinti (8) (9) (10) (11) (12) (nurodyti toliau tekste kaip patvirtinti pamatiniai metodai, PPM). Atsižvelgiant į šių tyrimų rezultatus pateikiama rekomendacija, kad du pirmiau nurodyti PPM gali būti naudojami reglamentavimo tikslais ėsdinančioms medžiagoms (Ė) atskirti nuo neėsdinančių (NĖ) medžiagų ir, be to, *EpiSkin™* galėtų būti naudojamas ėsdinančių medžiagų skirstymui į pakategorės pagrįsti (13) (14) (15). Du kiti prekyboje esantys *in vitro* odos ėsdinimo RhE bandymo modeliai parodė panašius į *EpiDerm™* PPM gautus rezultatus pagal naudojimo charakteristikų standartais pagrįstą patvirtinimą (16) (17) (18). Tai yra *SkinEthic™ RHE*¹ ir *epiCS®* (ankstesnis pavadinimas EST-1000), kurie taip pat gali būti naudojami reglamentavimo tikslais ėsdinančioms ir neėsdinančioms medžiagoms atskirti (19) (20). Tyrimai po patvirtinimo, kuriuos nuo 2012 m. iki 2014 m. atliko RhE modelio gamintojai, naudodami patikslintą protokolą, taikantį pataisą dėl trukdžių, susijusių su nespecifine MTT redukcija bandomosiomis cheminėmis medžiagomis, pagerino ėsdinančių atskyrimo nuo neėsdinančių ir ėsdinančių medžiagų skirstymo į pakategorės pagrindimo charakteristikas (21) (22). Buvo atlikta po patvirtinimo su *EpiDerm™ SCT*, *SkinEthic™ RHE* ir *EpiCS®* gautų duomenų papildoma statistinė analizė, kad būtų galima identifikuoti alternatyvius prognozavimo modelius, kurie pagerino skirstymo į pakategorės prognozavimo gebą (23).
5. Prieš tai, kaip reglamentavimo tikslais būtų galima taikyti kitą nei PPM, bet į jį panašų arba modifikuotą *in vitro* odos ėsdinimo RhE bandymo metodą, reikėtų nustatyti jo patikimumą, tinkamumą (tikslumą) ir siūlomo naudojimo apribojimus, kad būtų užtikrintas jo panašumas į PPM pagal naudojimo charakteristikų standartų reikalavimus (24), nustatytus atsižvelgiant į EBPO rekomendacinio dokumento Nr. 34 principus (25). Abipusis duomenų pripažinimas būtų užtikrintas tik po to, kai pagal PS pasiūlytas naujas arba atnaujintas bandymo metodas būtų peržiūrėtas ir įtrauktas į atitinkamas bandymo gaires. Į tas bandymo gaires įtraukti bandymo modeliai gali būti naudojami sprendžiant klausimus, susijusius su šalies reikalavimais *in vitro*

¹ Santrumpa RhE (rekonstruotas žmogaus epidermis, angl. *Reconstructed human Epidermis*) naudojama visiems modeliams, pagrįstiems RhE technologija. Santrumpa RHE, naudojama su *SkinEthic™* modeliu, reiškia tą patį, bet kaip šio specifinio bandymo metodo prekinio pavadinimo dalis rašoma visomis didžiosiomis raidėmis.

odos ėsdinimo bandymo metodo bandymo rezultatams, ir turėti naudos iš abipusio duomenų pripažinimo.

APIBRĖŽTYS

6. Vartojamos apibrėžtys pateiktos 1 priedėlyje.

PRADINIAI ASPEKTAI

7. Taikant šį bandymo metodą galima identifikuoti neėsdinančias ir ėsdinančias medžiagas bei mišinius pagal JT GHS ir CLP. Šiuo bandymo metodu galima papildomai skirstyti ėsdinančias medžiagas ir mišinius į pagal JT GHS (1) neprivalomą pakategorę 1A, taip pat į pakategorių 1B ir 1C derinį (21) (22) (23). Šio bandymo metodo ribotumas – jį taikant negalima atskirti odos ėsdinimo pakategorių 1B ir 1C pagal JT GHS ir CLP dėl riboto gerai žinomų *in vivo* 1C pakategorės ėsdinančių cheminių medžiagų rinkinio. Taikant EpiSkin™, EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE ir epiCS® bandymo modelius, galima skirstyti į pakategores (t. y. 1A *versus* 1B ir 1C *versus* NĖ).
8. Atliekant į šį bandymo metodą įtrauktų bandymo modelių, kai jie naudojami neėsdinančioms ir ėsdinančioms medžiagoms identifikuoti, patvirtinimo tyrimą, bandyta didelė cheminių medžiagų grupė, kurią daugiausia sudarė atskiros cheminės medžiagos; empirinę duomenų bazę sudarė 60 cheminių medžiagų, aprėpiančių didelę cheminių medžiagų klasių grupę (8) (9) (10). Bandymo metodo kūrėjai atliko bandymus, kurie įrodo skirstymo į pakategores jautrį, specifiškumą, tikslumą ir vidinį laboratorijos atkuriamumą, ir rezultatus peržiūrėjo EBPO (21) (22) (23). Atsižvelgiant į visus turimus duomenis, bandymo metodas taikomas didelei cheminių medžiagų klasių grupei ir agregatinėms būsenoms, įskaitant skysčius, pusiau kietas medžiagas, kietąsias medžiagas ir vaškus. Skysčiai gali būti vandeniniai arba nevandeniniai; kietosios medžiagos gali būti tirpios arba netirpios vandenyje. Jei įmanoma, kietąsias medžiagas prieš bandymą reikėtų sumalti; jokio kito ėminio parengiamojo apdorojimo atlikti nereikia. Jei galima pateikti įrodymų dėl į šį bandymo metodą įtrauktų bandymo modelių netinkamumo specifinei cheminių medžiagų kategorijai, jų nereikėtų naudoti tai specifinei bandomųjų cheminių medžiagų kategorijai. Be to, daroma prielaida, kad šis bandymo metodas tinka ne tik medžiagoms, bet ir mišiniams. Tačiau atsižvelgiant į tą faktą, kad mišiniai aprėpia daug kategorijų ir sudėčių ir šiuo metu yra labai nedaug informacijos apie mišinių bandymus tais atvejais, kai galima įrodyti bandymo metodo netinkamumą specifinei mišinių kategorijai (pvz., taikant (26) pasiūlytą strategiją), bandymo metodas neturėtų būti taikomas tai specifinei mišinių kategorijai. Prieš taikant bandymų metodą mišiniui, kad būtų gauti numatomo reglamentavimo tikslui skirti duomenys, reikėtų panagrinėti, ar metodu galima pasiekti tą tikslą atitinkančius rezultatus ir, jei taip, dėl kokios priežasties. Tokie svarstymai nereikalingi, kai yra reglamentavimo reikalavimas bandyti mišinį. Atliekant patvirtinimo tyrimus, dujos ir aerozoliai kol kas nebuvo vertinami (8) (9) (10). Nors, kaip atrodo, dujas ir aerozolius būtų galima bandyti taikant RhE procedūrą, dabartinis metodas jų bandymams nėra pritaikytas.

9. Bandomosios cheminės medžiagos, kurių šviesos absorbcijos sritis sutampa su MTT formazano, ir bandomosios cheminės medžiagos, kurios gali tiesiogiai redukuoti gyvųjų audinių dažiklį MTT (į MTT formazaną), gali trukdyti matuoti audinių gyvybingumą, todėl pataisoms daryti turi būti naudojami pritaikyti kontroliniai ėminiai. Pritaikytų kontrolinių ėminių, kurių gali prireikti, tipas skirsis priklausomai nuo cheminės medžiagos sukeliamų trukdžių ir nuo MTT formazano matavimo procedūros (žr. 25–31 pastraipas).
10. Nors taikant šį bandymo metodą negaunama reikiamos informacijos apie odos dirginimą, reikėtų pažymėti, kad B.46 bandymo metodas konkrečiai tiria odos dirginimo *in vitro* poveikį sveikatai ir yra pagrįstas ta pačia RhE bandymo sistema, bet naudojamas kitas protokolas (5). Siekiant išsamiai įvertinti vietinį poveikį odai po vienkartinės odos ekspozicijos, informacijos reikėtų ieškoti EBPO rekomendaciniame dokumente dėl integruotųjų bandymo ir vertinimo metodų (6). Šį IATA metodą sudaro *in vitro* odos ėsdinimo bandymai (aprašyti šiame bandymo metode) ir odos dirginimo bandymai prieš sprendžiant klausimą dėl bandymų su gyvais gyvūnais. Pripažįstama, kad žmogaus odos bandymams taikomi nacionaliniai ir tarptautiniai etikos principai bei sąlygos.

BANDYMO PRINCIPAS

11. Bandomoji cheminė medžiaga uždedama ant trimačio RhE modelio, sudaryto iš netransformuotų žmogaus odos keratinocitų, kurie buvo auginami, kad galėtų būti gautas daugiasluoksnis labai diferencijuotas žmogaus *epidermio* modelis. Jį sudaro suformuoti pamatinis, dygliuotasis ir grūdėtasis sluoksniai ir daugiasluoksnis *stratum corneum*, turintis tarpląstelinį žvynelių pavidalo lipidų sluoksnį, reprezentuojančių pagrindines lipidų klases, analogiškas randamoms *in vivo*.
12. RhE bandymo metodas pagrįstas prielaida, kad ėsdinančios cheminės medžiagos gali įsiskverbti į *stratum corneum* difuzijos arba erozijos būdu ir yra citotoksiškos apatinių sluoksnių ląstelėms. Ląstelių gyvybingumas matuojamas pagal gyvųjų audinių dažiklio MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromido, tiazolilo mėlynojo, tetrazolinio bromido, CAS Nr. 298-93-1), fermentinį virsmą į mėlynos spalvos formazano druską, kiekybiškai nustatomą po ekstrakcijos iš audinių (27). Ėsdinančios cheminės medžiagos identifikuojamos pagal jų gebėjimą sumažinti ląstelių gyvybingumą iki mažesnių nei nustatyti slenkstinių lygių (žr. 35 ir 36 pastraipas). Įrodyta, kad taikant RhE pagrįstą odos ėsdinimo bandymo metodą galima prognozuoti *in vivo* triušių odos ėsdinimą, įvertinamą pagal B.4 bandymo metodą (2).

KVALIFIKACIJOS ĮRODYMAS

13. Prieš pradėdamos naudoti šį bandymo metodą atitinkančius keturis patvirtintus RhE modelius įprastiniu būdu, laboratorijos turėtų įrodyti savo techninę kvalifikaciją, teisingai klasifikuodamos dvylika kvalifikacijai įrodyti skirtų cheminių medžiagų, išvardytų 1 lentelėje. Jei metodas taikomas klasifikavimui į pakategores, taip pat reikėtų įrodyti gebėjimą teisingai

skirstyti į pakategores. Tais atvejais, kai sąrašė nurodytos medžiagos nėra arba, jei būtų pagrįsta, gali būti naudojama kita medžiaga, kuriai turimi tinkami *in vivo* ir *in vitro* etaloniniai duomenys (pvz., iš etaloninių cheminių medžiagų sąrašo (24)), jei taikomi tie patys atrankos kriterijai, kaip aprašyta 1 lentelėje.

1 lentelė. Kvalifikacijai įrodyti skirtų cheminių medžiagų sąrašas¹

Medžiaga	CASRN	Cheminės medžiagos klasė ²	JT GHS ir CLP Kat., pagrįsta <i>in vivo</i> rezultatais ³	PPM Kat., pagrįsta <i>in vitro</i> rezultatais ⁴	MTT reduktorius ⁵	Agregatinė būseną
Pakategorės 1A <i>in vivo</i> esdinančios medžiagos						
Bromacto rūgštis	79-08-3	Organinė rūgštis	1A	(3) 1A	--	S
Boro trifluorido dihidratas	13319-75-0	Neorganinė rūgštis	1A	(3) 1A	--	L
Fenolis	108-95-2	Fenolis	1A	(3) 1A	--	S
Dichloroacetilchloridas	79-36-7	Elektrofilinė medžiaga	1A	(3) 1A	--	L
Pakategorių 1B ir 1C derinio <i>in vivo</i> esdinančios medžiagos						
Glioksilo rūgšties monohidratas	563-96-2	Organinė rūgštis	1B ir 1C	(3) 1B ir 1C	--	S
Pieno rūgštis	598-82-3	Organinė rūgštis	1B ir 1C	(3) 1B ir 1C	--	L
Etanolaminas	141-43-5	Organinė bazė	1B	(3) 1B ir 1C	Y	Klampi
Vandenilio chlorido rūgštis (14,4 %)	7647-01-0	Neorganinė rūgštis	1B ir 1C	(3) 1B ir 1C	--	L
<i>In vivo</i> neesdinančios medžiagos						
Fenetilbromidas	103-63-9	Elektrofilinė medžiaga	NĖ	(3) NĖ	Y	L
4-amino-1,2,4-triazolas	584-13-4	Organinė bazė	NĖ	(3) NĖ	--	S
4-(metiltio)-benzaldehydas	3446-89-7	Elektrofilinė medžiaga	NĖ	(3) NĖ	Y	L
Lauro rūgštis	143-07-7	Organinė rūgštis	NĖ	(3) NĖ	--	S

Santrumpos: CASRN – Cheminių medžiagų santrumpų tarnybos registro numeris. PPM – patvirtintas pamatinis metodas; NĖ – neesdinanti.

¹ Kvalifikacijai įrodyti skirtos medžiagos, iš pradžių skirstomos į esdinančias ir neesdinančias, toliau pagal esdinimo pakategorę ir galiausiai pagal cheminių medžiagų klasę, buvo pasirinktos iš medžiagų, kurios buvo naudojamos ECVAM atliekant EpiSkin™ ir EpiDerm™ (8) (9) (10) patvirtinimo tyrimą ir tyrimus po patvirtinimo, pagrįstus EpiSkin™ (22), EpiDerm™, SkinEthic™ ir epiCS® kūrėjų pateiktais duomenimis (23). Jei nenurodyta kitaip, medžiagos buvo bandomos tokio grynumo, koks buvo jas įsigijus (8) (10). Į rinkinį įtrauktos, kiek tai buvo įmanoma, medžiagos, kurios: i) atitinka atsakų į esdinimą (pvz., neesdinančios; nuo silpnai iki stipriai esdinančių) intervalą, kurį taikant PPM galima išmatuoti arba numatyti; ii) atitinka cheminių medžiagų klases, naudojamas atliekant patvirtinimo tyrimą; iii) turi tinkamai apibūdintą cheminę sandarą; iv) duoda atkuriamus rezultatus taikant PPM; v) duoda nustatytus rezultatus taikant *in vivo* pamatinį bandymo metodą; vi) yra prekyboje; ir vii) nėra susijusios su labai didelėmis šalinimo išlaidomis.

² Cheminių medžiagų klasė, priskirta Barratt *et al.* (8).

³ Atitinkamos JT pakuotės grupės I, II ir III atitinka JT GHS ir CLP pakategores 1A, 1B ir 1C.

⁴ Šioje lentelėje pateiktos PPM *in vitro* prognozuojamos vertės buvo gautos naudojant EpiSkin™ ir EpiDerm™ bandymo

modelius (PPM) bandymo metodo kūrėjams atliekant bandymus po patvirtinimo.

⁵ Gyvybingumo vertėms, gautoms atliekant ECVAM odos ėsdinimo patvirtinimo tyrimus, nebuvo daroma pataisa dėl tiesioginės MTT redukcijos (atliekant patvirtinimo tyrimus negyvų audinių ėminiai nebuvo bandomi). Tačiau šioje lentelėje pateikti metodo kūrėjų po patvirtinimo sukurti duomenys buvo gauti naudojant pritaikytus kontrolinius ėminius (23).

14. Rekomenduojama, kad atlikdamas kvalifikacijos tikrinimo pratimus, naudotojas patikrintų gautų audinių apsaugines savybes, nurodytas RhE modelio gamintojo. Tai ypač svarbu, jei audiniai gabenami dideliais atstumais ir (arba) ilgą laiką. Kai bandymo metodas sėkmingai sukurtas ir jo taikymo kvalifikacija įrodyta, vėliau tokio tikrinimo reguliariai daryti nebūtina. Tačiau, jei bandymo metodas taikomas nuolat, apsaugines savybes rekomenduojama ir toliau vertinti reguliariais laiko tarpais.

PROCEDŪRA

15. Toliau pateikiamas odos ėsdinimo vertinimo pagal šį bandymo metodą RhE bandymo modelių komponentų ir procedūrų bendrasis aprašymas. RhE modelius, patvirtintus kaip moksliskai pagrįstus juos taikant šiam bandymo metodui, t. y. EpiSkin™ (SM), EpiDerm™ (EPI-200), SkinEthic™ RHE ir epiCS® modeliai (16) (17) (19) (28) (29) (30) (31) (32) (33), galima nusipirkti. Yra šių keturių RhE modelių standartinės veiklos procedūros (34) (35) (36) (37) ir jų pagrindiniai bandymo metodo komponentai apibendrinti 2 priedėlyje. Rekomenduojama atsižvelgti į atitinkamas standartinės veiklos procedūras, kai laboratorijoje įdiegiamas ir naudojamas vienas šių modelių. Bandymai naudojant keturis šio bandymo metodo RhE bandymo modelius turėtų atitikti šiuos dalykus:

RHE BANDYMO METODO KOMPONENTAI

Bendrosios sąlygos

16. Epiteliui rekonstruoti turėtų būti naudojami netransformuoti žmogaus odos keratinocitai. Po funkcinio *stratum corneum* turėtų būti keli gyvybingų epitelio ląstelių sluoksniai (pamatinis sluoksnis, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*). *Stratum corneum* turėtų būti daugiasluoksnis ir turėti pagrindinių lipidų profilį, kad būtų gautas patvarus veiksmingas barjeras, kuris būtų atsparus citotoksinių palyginamųjų cheminių medžiagų, pvz., natrio dodecilsulfato (SDS) arba Triton X-100, greitam prasiskverbimui. Apsauginė funkcija turėtų būti įrodyta ir gali būti įvertinta nustatant koncentraciją, kuriai esant palyginamoji cheminė medžiaga per tam tikrą ekspozicijos laiką sumažina audinių gyvybingumą 50 % (IC₅₀), arba nustatant tam tikros pastovios koncentracijos palyginamosios cheminės medžiagos ekspozicijos trukmę, kuriai esant ląstelių gyvybingumas sumažėja 50 % (ET₅₀) (žr. 18 pastraipą). RhE modelio sulaikymo savybės turėtų apsaugoti nuo medžiagos patekimo prie gyvojo audinio apeinant *stratum corneum*, nes taip būtų blogai modeliuojama odos ekspozicija. RhE modelis neturėtų būti užkrėstas bakterijomis, virusais, mikoplazmomis ar grybeliais.

Veikimo sąlygos

Gyvybingumas

17. Kiekybinio audinių gyvybingumo nustatymo bandymas yra MTT bandymas (27). Gyvybingos RhE audinio darinio ląstelės redukuoja gyvųjų audinių dažiklį MTT į mėlynos spalvos MTT formazano nuosėdas, kurios ekstrahuojamos iš audinio izopropanoliu (arba panašiu tirpikliu). Paties ekstrakcijai naudojamo tirpiklio OT turėtų būti pakankamai mažas, t. y. $OT < 0,1$. Ekstrahuotas MTT formazanas gali būti kiekybiškai nustatytas atliekant standartinį optinio tankio (OT) matavimą arba HPLC ar UPLC ir spektrofotometrijos procedūrą (38). RhE modelio naudotojai turėtų užtikrinti, kad kiekviena naudoto RhE modelio partija atitiktų neigiamiems kontroliniams ėminiams nustatytus kriterijus. Neigiamų kontrolinių ėminių OT verčių priimtino intervalą (viršutinę ir apatinę ribas) turėtų nustatyti RhE modelio kūrėjas arba tiekėjas. Į šį bandymo metodą įtrauktų patvirtintų RhE bandymo modelių neigiamų kontrolinių ėminių OT verčių priimtino intervalai pateikti 2 lentelėje. Taikantys HPLC arba UPLC ir spektrofotometrijos metodą, turėtų naudoti 2 lentelėje pateiktų neigiamų kontrolinių ėminių OT intervalus kaip neigiamo kontrolinio ėminio priimtino kriterijų. Reikėtų dokumentuoti, kad neigiamu kontroliniu ėminiu apdorotų audinių kultūra yra stabili (gaunami panašūs optinio tankio matavimo rezultatai) visą ekspozicijos laikotarpį.

2 lentelė. Neigiamų kontrolinių ėminių OT verčių priimtino intervalai partijos kokybei kontroliuoti

	Apatinė priimtino riba	Viršutinė priimtino riba
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

Apsauginė funkcija

18. *Stratum corneum* ir jo lipidų sudėtis turėtų būti pakankama, kad atitinkamos citotoksinės etaloninės medžiagos neprasiskverbtų pernelyg greitai (pvz., SDS arba Triton X-100) prasiskverbimo, įvertinamo pagal IC_{50} arba ET_{50} (3 lentelė). Kiekvienos naudojamo RhE modelio partijos barjero funkciją turėtų įrodyti RhE modelio kūrėjas arba pardavėjas, kai audiniai pristatomi galutiniam naudotojui (žr. 21 pastraipą).

Morfologija

19. Reikėtų atlikti RhE modelio histologinį tyrimą, kuris įrodytų į žmogaus *epidermį* panašią daugiasluoksnią struktūrą, turinčią *stratum basale*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum* ir *stratum corneum* ir lipidų profilį, panašų į žmogaus epidermio lipidų profilį. Kiekvienos naudojamo RhE modelio partijos histologinį tyrimą, įrodantį reikiamą audinių morfologiją, turėtų atlikti RhE modelio kūrėjas arba pardavėjas, kai audiniai tiekiami galutiniam naudotojui (žr. 21 pastraipą).

Atkuriamumas

20. Bandymo metodo naudotojai turėtų įrodyti bandymo metodų atkuriamumą per ilgą laiką, naudodami teigiamus ir neigiamus kontrolinius ėminius. Be to, bandymo metodas turėtų būti taikomas tik tokiu atveju, jei RhE modelio kūrėjas arba pardavėjas pateikia duomenų, įrodančių atkuriamumą per ilgą laiką ėsdinančioms ir neėsdinančioms cheminėms medžiagoms, pvz., iš kvalifikacijai įrodyti skirtų medžiagų sąrašo (1 lentelė). Jei bandymo metodas taikomas klasifikavimui į pakategorės, taip pat reikėtų įrodyti skirstymo į pakategorės atkuriamumą.

Kokybės kontrolė

21. RhE modelis turėtų būti naudojamas tik tokiu atveju, jei kūrėjas arba tiekėjas įrodo, kad kiekviena naudojamo RhE modelio partija atitinka nustatytus gaminių išleidimo kriterijus, iš kurių svarbiausi yra *gyvybingumo* (17 pastraipa), *apsauginės funkcijos* (18 pastraipa) ir *morfologijos* (19 pastraipa) kriterijai. Šie duomenys pateikiami taikantiems metodą, kad jie galėtų įtraukti šią informaciją į bandymo ataskaitą. Tik kokybės kontrolę praėję audinių partijų rezultatai yra priimtini patikimam ėsdinančių medžiagų prognozavimui. IC₅₀ arba ET₅₀ verčių priimtino intervalo (viršutinę ir apatinę ribas) nustato RhE modelio kūrėjas arba tiekėjas. Keturių patvirtintų RhE bandymo modelių priimtino intervalo pateikti 3 lentelėje.

3 lentelė.Partijos išleidimo kokybės kontrolės kriterijai

	Apatinė priimtino riba	Viršutinė priimtino riba
EpiSkin™ (SM) (18 h trukmės apdorojimas SDS) (33)	IC ₅₀ = 1,0 mg/ml	IC ₅₀ = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SCT (EPI-200) (1 % Triton X-100) (34)	ET ₅₀ = 4,0 h	ET ₅₀ = 8,7 h
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (35)	ET ₅₀ = 4,0 h	ET ₅₀ = 10,0 h
epiCS® (1 % Triton X-100) (36)	ET ₅₀ = 2,0 h	ET ₅₀ = 7,0 h

Bandomosios cheminės medžiagos ir kontrolinių cheminių medžiagų uždėjimas

22. Kiekvienu ekspozicijos laikotarpiu reikėtų naudoti ne mažiau kaip du kartotinius audinio bandinius kiekvienai bandomajai cheminei medžiagai ir kontrolinėms cheminėms medžiagoms. Tiriant skystąsias ir kietąsias chemines medžiagas, reikėtų uždėti bandomosios cheminės medžiagos kiekį, kurio pakaktų epidermio paviršiui tolygiai padengti, bet vengiant neribotos dozės, t. y. reikėtų naudoti ne mažiau kaip 70 µl/cm² arba 30 mg/cm². Jei bandomos kietosios medžiagos, prieš jų uždėjimą epidermio paviršių reikia suvilgyti dejonizuotu arba distiliuotu vandeniu, priklausomai nuo modelio, kad būtų geresnis bandomosios cheminės medžiagos sąlytis su epidermio paviršiumi (34) (35) (36) (37). Jei įmanoma, kietąsias medžiagas reikėtų

bandyti smulkių miltelių pavidalu. Uždėjimo metodas turėtų būti tinkamas bandomajai cheminei medžiagai tirti (žr., pvz., 34–37 nuorodas). Pasibaigus ekspozicijos laikotarpiui, bandomoji cheminė medžiaga turėtų būti kruopščiai nuplauta nuo *epidermio* paviršiaus vandeniniu buferiniu tirpalu arba 0,9 % NaCl. Priklausomai nuo to, kuris iš keturių patvirtintų RhE bandymo modelių naudojamas, bandomajai cheminei medžiagai naudojami du arba trys ekspozicijos laikotarpiai (visiems keturiems patvirtintiems RhE modeliams: 3 min ir 1 h; EpiSkinTM – papildomas 4 h ekspozicijos laikotarpis). Priklausomai nuo naudojamo RhE bandymo modelio ir nuo vertinamo ekspozicijos laikotarpio, inkubavimo temperatūra ekspozicijos metu gali būti nuo kambario temperatūros iki 37 °C.

23. Atliekant kiekvieną atskirą bandymą, reikėtų naudoti vienalaikius neigiamus ir teigiamus kontrolinius ėminius, siekiant įrodyti, kad audinių gyvybingumas (naudojant neigiamus kontrolinius ėminius), apsauginė funkcija ir gaunamas audinių jautris (naudojant teigiamus kontrolinius ėminius) atitinka nustatytą istorinį priimtino interвалą. Priklausomai nuo naudojamo RhE bandymo modelio, rekomenduojamos teigiamos kontrolinės (PC) medžiagos yra ledinė acto rūgštis arba 8 mol/l KOH. Reikėtų pažymėti, kad 8 mol/l KOH yra tiesioginis MTT reduktorius, kuriam gali prireikti pritaikytų kontrolinių medžiagų, kaip aprašyta 25 ir 26 pastraipose. Rekomenduojamos neigiamos kontrolinės medžiagos yra 0,9 % (m/V) NaCl arba vanduo.

Ląstelių gyvybingumo matavimai

24. Ląstelių gyvybingumui pagal šį bandymo metodą matuoti reikėtų naudoti MTT bandymą, kuris yra kiekybinis bandymas. Audinio bandinys 3 h laikomas reikiamos koncentracijos MTT tirpale (0,3 arba 1 mg/ml). Į nuosėdas iškritęs mėlynos spalvos formazano reakcijos produktas ekstrahuojamas iš audinio tirpikliu (pvz., izopropanoliu, parūgštintu izopropanoliu), ir formazano koncentracija matuojama nustatant optinį tankį, kai bangos ilgis – 570 nm, filtro juostos plotis – ne didesnis kaip ± 30 nm, arba taikant HPLC ar UPLC ir spektrofotometrijos procedūrą (žr. 30 ir 31 pastraipas) (38).
25. Bandomosios cheminės medžiagos gali trukdyti atlikti MTT bandymą, tiesiogiai redukuodamos MTT į mėlynos spalvos formazaną, ir (arba) dėl spalvos trukdžių, jei bandomoji cheminė medžiaga natūraliai arba dėl apdorojimo procedūrų absorbuoja šviesą formazano optinio tankio nustatymo (570 ± 30) nm srityje, dažniausiai mėlynos ir violetinės spalvos cheminės medžiagos). Reikėtų naudoti papildomus kontrolinius ėminius, kad būtų galima aptikti galimus šių bandomųjų cheminių medžiagų trukdžius ir juos koreguoti, pvz., nespecifinės MTT redukcijos (NSMTT) kontrolinį ėminį ir nespecifinės spalvos (NSS) kontrolinį ėminį (žr. 26–30 pastraipas). Tai ypač svarbu, kai konkreti bandomoji cheminė medžiaga ne visiškai pašalinama iš audinio skalaujant arba kai ji prasiskverbia į *epidermį*, todėl yra audiniuose atliekant MTT gyvybingumo bandymą. Tiesioginės MTT redukcijos ir spalvotų medžiagų trukdžių koregavimo išsamus aprašymas pateiktas bandymo modelių SVP (34) (35) (36) (37).

26. Kiekvieną bandomąją cheminę medžiagą reikėtų įdėti į tik ką paruoštą MTT terpę, kad būtų galima identifikuoti tiesioginius MTT reduktorius (34) (35) (36) (37). Jei MTT mišinys, kuriame yra bandomoji cheminė medžiaga, nusidažo mėlyna arba violetine spalva, daroma prielaida, kad bandomoji cheminė medžiaga tiesiogiai redukuoja MTT ir reikėtų atlikti papildomą veikimo tikrinimą su negyvu epidermiu, nepriklausomai nuo to, ar naudojama standartinė optinio tankio (OT) matavimo, ar HPLC arba UPLC ir spektrofotometrijos procedūra. Šiam papildomam veikimo tikrinimui naudojami negyvi audiniai, kurie turi tik liekamąjį metabolinį aktyvumą, bet absorbuoja panašų bandomosios cheminės medžiagos kiekį kaip gyvieji audiniai. Kiekviena MTT redukuojanti cheminė medžiaga dedama ant ne mažiau kaip dviejų vienai ekspozicijos trukmei negyvo audinio kartotinių bandinių, su kuriais atliekamas visas odos ėsdinimo bandymas. Tikrasis audinio gyvybingumas apskaičiuojamas kaip audinių gyvybingumo procentinė vertė, gauta MTT reduktoriaus veikiamiems gyviesiems audiniams, minus nespecifinės MTT redukcijos procentinė vertė, gauta to paties MTT reduktoriaus veikiamiems negyviems audiniams ir apskaičiuota vienu metu su koreguojamu bandymu bandomo neigiamo kontrolinio ėminio atžvilgiu (% NSMTT).
27. Siekiant nustatyti galimus trukdžius, kuriuos kelia spalvotos bandomosios cheminės medžiagos arba tapusios spalvotomis dėl sąlyčio su vandeniu arba izopropanoliu, ir nuspręsti, ar būtini papildomi kontroliniai ėminiai, reikėtų atlikti bandomosios cheminės medžiagos tirpalo vandenyje (aplinkoje ekspozicijos metu) ir (arba) izopropanolyje (ekstrahavimo tirpale) spektrinę analizę. Jei vandenyje ir (arba) izopropanolyje ištirpinta bandomoji cheminė medžiaga absorbuoja šviesą 570 ± 30 nm srityje, reikėtų atlikti papildomus spalvotų kontrolinių ėminių bandymus arba naudoti HPLC ar UPLC ir spektrofotometrijos procedūrą, ir tokiu atveju šių kontrolinių ėminių nereikia (žr. 30 ir 31 pastraipas). Kai atliekamas standartinis optinio tankio matavimas, kiekviena trukdžius kelianti spalvota bandomoji cheminė medžiaga vienu ekspozicijos laikotarpiu dedama ant ne mažiau kaip dviejų gyvųjų audinių kartotinių bandinių, su kuriais atliekamas visas odos ėsdinimo bandymas, bet MTT inkubavimo pakopoje vietoj MTT tirpalo jie inkubuojami terpėje, kad būtų gautas nespecifinės spalvos (NSS_{gyv}) kontrolinis ėminys. Vienalaikis NSS_{gyv} kontrolinis bandymas turi būti atliekamas kiekvienai ekspozicijos trukmei ir (atskiro bandymo) spalvotai bandomajai cheminei medžiagai dėl gyviesiems audiniams būdingos biologinės įvairovės. Tikrasis audinio gyvybingumas apskaičiuojamas kaip audinių gyvybingumo procentinė vertė, gauta trukdančios bandomosios cheminės medžiagos veikiamiems gyviesiems audiniams, inkubuotiems MTT tirpale, minus nespecifinės spalvos procentinė vertė, gauta trukdančios bandomosios cheminės medžiagos veikiamiems gyviesiems audiniams, inkubuotiems terpėje be MTT, ir bandomiems vienu metu su koreguojamu bandymu (% NSS_{gyv}).
28. Bandomosioms cheminėms medžiagoms, kurios identifikuojamos kaip tiesioginiai MTT reduktoriai (žr. 26 pastraipą) ir kelia spalvos trukdžius (žr. 27 pastraipą) be NSMTT ir NSS_{gyv} kontrolinių ėminių, aprašytų pirmiau pateiktose pastraipose, reikės trečiojo kontrolinių ėminių rinkinio, kai atliekamas standartinis optinio tankio matavimas. Paprastai atlikti MTT bandymą trukdo tamsios spalvos (pvz., mėlynos, violetinės, juodos) bandomosios cheminės medžiagos,

nes jų pačių spalva trukdo įvertinti jų gebėjimą tiesiogiai redukuoti MTT, kaip aprašyta 26 pastraipoje. Šios bandomosios cheminės medžiagos gali jungtis prie gyvųjų ir negyvų audinių, todėl naudojant NSMTT kontrolinį ėminį gali būti koreguojama ne tik galima tiesioginė MTT redukcija, bet ir spalvos trukdžiai dėl bandomosios cheminės medžiagos prisijungimo prie negyvų audinių. Todėl gali būti dvigubas spalvos trukdžių koregavimas, nes NSS_{gyv} kontrolinis ėminys jau koreguoja spalvos trukdžius dėl bandomosios cheminės medžiagos prisijungimo prie gyvųjų audinių. Siekiant išvengti galimo dvigubo spalvos trukdžių koregavimo, reikia atlikti trečiąjį negyvų audinių nespecifinės spalvos (NSS_{negyv}) kontrolinį bandymą. Naudojant šį papildomą kontrolinį ėminį, bandomoji cheminė medžiaga dedama ant ne mažiau kaip dviejų vienai ekspozicijos trukmei negyvo audinio kartotinių bandinių, su kuriais atliekama visa bandymo procedūra, bet MTT inkubavimo pakopoje vietoje MTT tirpalo jie inkubuojami terpėje. Pakanka vieno NSS_{negyv} kontrolinio bandymo vienai bandomajai cheminei medžiagai, neatsižvelgiant į atliekamų nepriklausomų bandymų ir (arba) atskirų bandymų skaičių, bet jis turėtų būti atliekamas vienu metu su NSMTT kontroliniu bandymu ir, jei įmanoma, su ta pačia audinio partija. Tikrasis audinio gyvybingumas apskaičiuojamas kaip audinių gyvybingumo procentinė vertė, gauta bandomosios cheminės medžiagos veikiamiems gyviesiems audiniams, minus % NSS_{gyv} , plus nespecifinės spalvos procentinė vertė, gauta trukdančios bandomosios cheminės medžiagos veikiamiems negyviems audiniams, inkubuotiems terpėje be MTT, ir apskaičiuota vienu metu su koreguojamu bandymu bandomo neigiamo kontrolinio ėminio atžvilgiu (% NSS_{negyv}).

29. Svarbu pažymėti, kad dėl nespecifinės MTT redukcijos ir nespecifinės spalvos trukdžių audinio ekstraktui gauti rodmenys gali būti didesni nei spektrofotometro tiesiškumo intervalas. Atsižvelgdama į tai, kiekviena laboratorija prieš pradėdama bandyti bandomąsias chemines medžiagas reglamentavimo tikslais, turėtų nustatyti savo spektrofotometro tiesiškumo intervalą, naudodama prekyboje esantį MTT formazaną (CAS Nr. 57360-69-7). Visų pirma, atliekant standartinį optinio tankio (OT) matavimą spektrofotometru, galima įvertinti tiesioginius MTT reduktorių ir spalvos trukdžius sukeliančias bandomąsias chemines medžiagas, jei audinių ekstraktų OT, gauti bandomajai cheminei medžiagai be koregavimo dėl tiesioginės MTT redukcijos ir (arba) spalvos trukdžių, yra spektrofotometro tiesiškumo intervale arba jei nekoreguota gyvybingumo procentinė dalis yra gauta bandomajai cheminei medžiagai, kuri jau yra nustatyta kaip ėsdinanti (žr. 35 ir 36 pastraipas). Vis dėlto, į bandomosioms cheminėms medžiagoms gautus neigiamų kontrolinių ėminių % NSMTT ir (arba) % $NSS_{gyv} > 50\%$ rezultatus reikėtų žiūrėti atsargiai.
30. Spalvotoms bandomosioms cheminėms medžiagoms, kurios nesuderinamos su standartiniu optinio tankio matavimu dėl per didelių trukdžių MTT bandymui, galima naudoti alternatyvią HPLC arba UPLC ir spektrofotometrijos procedūrą MTT formazanui nustatyti (žr. 31 pastraipą) (37). Naudojant HPLC arba UPLC ir spektrofotometrijos sistemą, MTT formazaną galima atskirti nuo bandomosios cheminės medžiagos prieš jo kiekybinį nustatymą (38). Dėl šios priežasties NSS_{gyv} arba NSS_{negyv} kontrolinių ėminių niekuomet nereikia, kai naudojama HPLC/UPLC ir spektrofotometrija, nepriklausomai nuo bandomos cheminės medžiagos. Vis

dėlto NSMTT kontrolinius ėminius reikėtų naudoti, jei įtariama, kad bandomoji cheminė medžiaga tiesiogiai redukuoja MTT arba jos spalva trukdo vertinti jos gebėjimą tiesiogiai redukuoti MTT (kaip aprašyta 26 pastraipoje). Jei MTT formazanui matuoti naudojama HPLC arba UPLC ir spektrofotometrija, audinio gyvybingumo procentinė dalis skaičiuojama kaip MTT formazano smailės ploto, gauto bandomąja chemine medžiaga veikiamiems gyviesiems audiniams, ir MTT formazano smailės ploto, gauto vienalaikiam neigiamam kontroliniam ėminiui, procentais išreikštas santykis. Jei bandomosios cheminės medžiagos gali tiesiogiai redukuoti MTT, tikrasis audinio gyvybingumas apskaičiuojamas kaip audinių gyvybingumo procentinė vertė, gauta bandomosios cheminės medžiagos veikiamiems gyviesiems audiniams, minus % NSMTT. Pagaliau reikėtų pažymėti, kad negalima vertinti tiesioginių MTT reduktorių, kurie taip pat gali kelti spalvos trukdžius ir kurie po apdorojimo lieka audiniuose ir taip stipriai redukuoja MTT, kad gauti bandomų audinių ekstraktų OT (atliekant standartinį OT matavimą) arba smailių plotai (naudojant UPLC arba HPLC ir spektrofotometriją) nepatenka į spektrofotometro tiesiškumo intervalą, nors tikimasi, kad tai būtų tik labai retas reiškinys.

31. HPLC arba UPLC ir spektrofotometriją MTT formazano matavimams taip pat galima naudoti visų tipų bandomosioms cheminėms medžiagoms (spalvotoms, nespalvotoms, MTT reduktoriams ir ne reduktoriams) (38). Dėl HPLC arba UPLC ir spektrofotometrijos sistemų įvairovės HPLC arba UPLC ir spektrofotometrijos sistemos tinkamumą reikėtų įrodyti prieš pradedant sistemą naudoti audinių ekstraktų MTT formazano kiekybiniam nustatymui, ir ji turi atitikti standartinių tinkamumo parametrų rinkinio priimtumo kriterijus, pagrįstus aprašytais JAV maisto ir vaistų administracijos rekomendacijose pramonei dėl biologinės analizės metodo patvirtinimo (38) (39). Šie pagrindiniai parametrai ir priimtumo kriterijai patekti 4 priedėlyje. Jei HPLC arba UPLC ir spektrofotometrijos sistema atitinka 4 priedėlyje nustatytus priimtumo kriterijus, ji laikoma tinkama ir paruošta MTT formazanui matuoti šiame bandymo metode aprašytomis bandymo sąlygomis.

Priimtumo kriterijai

32. Taikant kiekvieną patvirtintus RhE modelius naudojančią bandymo metodą, neigiamu kontroliniu ėminiu apdorotiems ėminiams turėtų būti gautos audinių kokybę rodančios OT vertės, kaip aprašyta 2 lentelėje, ir jos neturėtų būti mažesnės nei istoriškai nustatytos ribos. PC medžiaga, t. y. ledine acto rūgštimi arba 8 mol/l KOH, apdoroti audiniai turėtų rodyti audinių gebėjimą reaguoti į ėsdinančią cheminę medžiagą bandymo modelio sąlygomis (žr. 2 priedėlį). Kintamumas tarp audinio kartotinių bandinių, gautas bandomajai cheminei medžiagai ir (arba) kontrolinėms cheminėms medžiagoms, turėtų atitikti priimtas ribas pagal kiekvieno patvirtinto RhE modelio reikalavimus (žr. 2 priedėlį) (pvz., dviejų kartotinių audinio bandinių gyvybingumo skirtumas neturėtų būti didesnis kaip 30 %). Jei į atskirą bandymą įtrauktas neigiamas ar teigiamas kontrolinis ėminys nepatenka į priimtus intervalus, atskiras bandymas laikomas nepavykusiu ir turėtų būti pakartotas. Jei bandomosios cheminės medžiagos kintamumas neatitinka nustatyto intervalo, jos bandymas turėtų būti pakartotas.

Rezultatų aiškinimas ir prognozavimo modelis

33. Kiekvienai bandomajai cheminei medžiagai gautos OT vertės turėtų būti naudojamos gyvybingumo procentinei daliai apskaičiuoti neigiamo kontrolinio ėminio atžvilgiu, kurio gyvybingumas prilygintas 100 %. Jei naudojama HPLC arba UPLC ir spektrofotometrija, audinio gyvybingumo procentinė dalis skaičiuojama kaip MTT formazano smailės ploto, gauto bandomąja chemine medžiaga veikiams gyviesiems audiniams, ir MTT formazano smailės ploto, gauto vienalaikiam neigiamam kontroliniam ėminiui, procentais išreikštas santykis. Į šį bandymo metodą įtraukto kiekvieno bandymo modelio ribinės ląstelių gyvybingumo procentinės vertės, pagal kurias ėsdinanti bandomoji cheminė medžiaga atskiriama nuo neėsdinančios (arba ėsdinančios medžiagos skirstomos į pakategorės), nurodytos toliau 35 ir 36 pastraipose ir jas reikėtų naudoti aiškinant rezultatus.
34. Jei dėl klasifikavimo neabejojama, bandomajai cheminei medžiagai turėtų pakakti vieno ne mažiau kaip dviejų kartotinių audinio bandinių atskiro bandymo. Tačiau, jei rezultatai ribiniai, pvz., kartotinių ėminių matavimų rezultatai nesutampa, reikėtų spręsti dėl antrojo atskiro bandymo, taip pat trečiojo, jei pirmųjų dviejų atskirų bandymų rezultatai išsiskirtų.
35. EpiSkin™ odos ėsdinimo bandymo metodo prognozavimo modelis (9) (34) (22), susijęs su JT GHS ir CLP klasifikavimo sistema, pateiktas 4 lentelėje.

4 lentelė. EpiSkin™ prognozavimo modelis

Gyvybingumas, išmatuotas ekspozicijos trukmės taškuose (t = 3, 60 ir 240 min)	Prognozė, į kurią turi būti atsižvelgta
< 35 % po 3 min ekspozicijos	Ėsdinanti: • neprivaloma pakategorė 1A*
≥ 35 % po 3 min ekspozicijos IR < 35 % po 60 min ekspozicijos ARBA ≥ 35 % po 60 min ekspozicijos IR < 35 % po 240 min ekspozicijos	Ėsdinanti: • neprivalomų pakategorių 1B ir 1C derinys
≥ 35 % po 240 min ekspozicijos	Neėsdinanti

*) Atsižvelgiant į duomenis, gautus vertinant pakategorėms patvirtinti skirtų RhE bandymo modelių naudingumą, buvo parodyta, kad maždaug 22 % EpiSkin™ bandymo modelio 1A pakategorės rezultatų iš tikrųjų gali būti 1B ar 1C pakategorės medžiagos ir (arba) mišiniai (t. y. priskirta per didelė pakategorė) (žr. 3 priedėlį).

36. EpiDerm™ SCT (10) (23) (35), SkinEthic™ RHE (17) (18) (23) (36) ir epiCS® (16) (23) (37) odos ėsdinimo bandymo metodo prognozavimo modeliai, susiję su JT GHS ir CLP klasifikavimo sistema, pateikti 5 lentelėje.

5 lentelė. EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE ir epiCS®

Gyvybingumas, išmatuotas ekspozicijos trukmės taškuose (t = 3 ir 60 min)	Prognozė, į kurią turi būti atsižvelgta

EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE ir epiCS® 1 PAKOPA	
< 50 % po 3 min ekspozicijos	Ėsdinanti
≥ 50 % po 3 min ekspozicijos IR < 15 % po 60 min ekspozicijos	Ėsdinanti
≥ 50 % po 3 min ekspozicijos IR ≥ 15 % po 60 min ekspozicijos	Neėsdinanti
EpiDerm™ SCT 2 PAKOPA, medžiagų ir (arba) mišinių, pagal 1 pakopą identifikuotų kaip ėsdinantys	
< 25 % po 3 min ekspozicijos	Neprivaloma pakategorė 1A*
≥ 25 % po 3 min ekspozicijos	Neprivalomų pakategorių 1B ir 1C derinys
SkinEthic™ RHE 2 PAKOPA, medžiagų ir (arba) mišinių, pagal 1 pakopą identifikuotų kaip ėsdinantys	
< 18 % po 3 min ekspozicijos	Neprivaloma pakategorė 1A*
≥ 18 % po 3 min ekspozicijos	Neprivalomų pakategorių 1B ir 1C derinys
epiCS® 2 PAKOPA, medžiagų ir (arba) mišinių, pagal 1 pakopą identifikuotų kaip ėsdinantys	
< 15 % po 3 min ekspozicijos	Neprivaloma pakategorė 1A*
≥ 15 % po 3 min ekspozicijos	Neprivalomų pakategorių 1B ir 1C derinys

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Duomenys

37. Lentelėse turėtų būti pateikti kiekvieno atskirų audinio kartotinių bandinių bandymo duomenys (pvz., OT vertės ir apskaičiuotų ląstelių gyvybingumo procentinių verčių duomenys kiekvienai bandomajai cheminei medžiagai, įskaitant klasifikavimą), įtraukiant kartotinių bandymų duomenis, jei reikia. Be to, ataskaitoje turėtų būti pateikti kiekvieno bandymo gyvybingumo vidurkiai bei intervalai ir audinio kartotinių bandinių variacijos koeficientai (VK). Ataskaitoje reikėtų nurodyti kiekvienai bandomajai cheminei medžiagai stebimas tiesioginių MTT reduktorių arba spalvotų bandomųjų cheminių medžiagų sąveikas su MTT reagentu.

Bandymo ataskaita

38. Į bandymo ataskaitą turėtų būti įtraukta ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga ir kontrolinės cheminės medžiagos

- Vienkomponentė medžiaga: cheminio identifikavimo duomenys, pvz., IUPAC ar CAS pavadinimas, CAS numeris, SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė, grynumas, cheminis priemaišų pavadinimas, jei tinka bei praktiškai įmanoma ir kt.;
- daugiakomponentė medžiaga, UVCB ir mišinys: kuo išsamesnis sudedamųjų dalių apibūdinimas, nurodant cheminį pavadinimą (žr. pirmiau), kiekybinį paplitimą ir būdingas fizikines ir chemines savybes.
- fizinė išvaizda, tirpumas vandenyje ir papildomos būdingos fizikinės ir cheminės savybės;
- šaltinis, partijos numeris, jei yra;
- bandomosios ir (arba) kontrolinės cheminės medžiagos apdorojimas prieš bandymą, jei tai atliekama (pvz., šildymas, malimas);
- bandomosios cheminės medžiagos stabilumas, naudojimo pabaigos data arba pakartotinės analizės data, jei žinoma;
- laikymo sąlygos.

naudotas RhE modelis ir protokolas bei jo pagrindimas (jei tinka)

Bandymo sąlygos

- naudotas RhE modelis (įskaitant partijos numerį);
- informacija apie matavimo prietaiso (pvz., spektrofotometro) kalibravimą, bangos ilgį ir dažnių juostos plotį (jei tinka), naudojamą MTT formazano kiekybiniam nustatymui, ir matavimo prietaiso tiesiškumo intervalą;
- MTT formazano kiekybinio nustatymo metodo aprašymas;
- HPLC arba UPLC ir spektrofotometrijos sistemos tinkamumo įvertinimo aprašymas, jei tinka;
- visa su konkrečiu RhE modeliu susijusi pagalbinė informacija, įskaitant jo naudojimo charakteristikas. Turėtų būti įtraukti šie ir kiti duomenys:
 - i) gyvybingumas;
 - ii) apsauginė funkcija;
 - iii) morfologija;
 - iv) atkuriamumas ir prognozavimo geba;
 - v) modelio kokybės kontrolei naudojamos medžiagos;
- nuoroda į modelio istorinius duomenis. Turėtų būti įtraukti šie ir kiti duomenys:
- kokybės kontrolės duomenų priimtumas, atsižvelgiant į istorinius partijos duomenis;
- bandymo metodo taikymo kvalifikacijos įrodymas prieš pradedant jį taikyti įprastiniu būdu, bandant kvalifikacijai įrodyti skirtas medžiagas.

Bandymo procedūra:

- naudojamos bandymo procedūros išsamūs duomenys (įskaitant plovimo procedūras, atliekamas pasibaigus ekspozicijos laikotarpiui);
- bandomosios cheminės medžiagos ir naudojamų kontrolinių cheminių medžiagų dozės;
- ekspozicijos laikotarpio (-ų) trukmė ir ekspozicijos temperatūra (-os);
- su tiesioginiais MTT reduktoriais ir (arba) spalvotomis bandomosiomis cheminėmis medžiagomis naudojamų kontrolinių medžiagų nuoroda,
- audinių kartotinių bandinių, naudojamų bandomajai cheminei medžiagai ir kontroliniams ėminiams (teigiamam, neigiamam kontroliniams ėminiams, NSMTT, NSS_{gyv} ir NSS_{negyv}, jei tinka), skaičius vienai ekspozicijos trukmei;
- taikomų sprendimo priėmimo ir (arba) prognozavimo kriterijų, pagrįstų RhE modeliu, aprašymas;
- visų bandymo procedūros pakeitimų aprašymas (įskaitant plovimo procedūras).

Atskiro bandymo ir bandymo priimtimumo kriterijai:

- Teigiamų ir neigiamų kontrolinių ėminių vidutinės vertės bei priimtimumo intervalai, pagrįsti istoriniais duomenimis;
- priimtinas kintamumas tarp audinio kartotinių bandinių, gautas teigiamiems ir neigiamiems kontroliniams ėminiams;
- priimtinas kintamumas tarp audinio kartotinių bandinių, gautas bandomajai cheminei medžiagai.

Rezultatai:

- lentelėse pateikti atskirų bandomųjų cheminių medžiagų ir kontrolinių ėminių kiekvieno ekspozicijos laikotarpio, kiekvieno atskiro bandymo ir kiekvieno kartotinio bandinio matavimų duomenys, įskaitant MTT formazano OT arba smailės plotą, audinio gyvybingumo procentinę dalį, vidutinę audinio gyvybingumo procentinę dalį, skirtumus tarp kartotinių bandinių, standartinius nuokrypius ir (arba) VK, jei tinka;
- jei tinka, kontrolinių ėminių, naudotų tiesioginiams MTT reduktoriams ir (arba) spalvotoms bandomosioms cheminėms medžiagoms, rezultatai, įskaitant MTT formazano OT arba smailės plotą, % NSMTT, % NSS_{gyv}, % NSS_{negyv}, skirtumus tarp audinio kartotinių bandinių, SN ir (arba) VK (jei tinka) ir galutinę tikslią audinio gyvybingumo procentinę dalį;
- rezultatai gauti bandomajai (-ioms) cheminei (-ėms) medžiagai (-oms) ir kontrolinėms cheminėms medžiagoms, atsižvelgiant į nustatytus atskiro bandymo ir bandymo priimtimumo kriterijus;
- kitų pastebėtų reiškinių aprašymas;

- gautas klasifikavimas su nuoroda į naudotą prognozavimo modelį ir (arba) į taikytus sprendimo priėmimo kriterijus.

Rezultatų aptarimas

Išvados

LITERATŪRA

- (1) UN (2013). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth Revised Edition, UN New York and Geneva. Pateikta http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html
- (2) Šio priedo B.4 skyrius. Ūmus odos dirginimas, ėsdinimas.
- (3) Šio priedo B.40 skyrius. Odos suardymas *in vitro*.
- (4) Šio priedo B.65 skyrius. *In Vitro* odos ėsdinimo naudojant membraninę pertvarą metodus.
- (5) Šio priedo B.46 skyrius, *In Vitro* odos dirginimas. Rekonstruoto žmogaus epidermio bandymo metodus.
- (6) OECD (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (7) Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile D.J., Gardner J.R., Gordon V.C., Hildebrand B., Lewis R.W., Liebsch M., Logemann P., Osborne R., Ponc M., Regnier J.F., Steiling W., Walker A.P., 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., Holzhtter 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 Holzhtter H. G. (2000). The ECVAM Prevalidation Study on the Use of EpiDerm for Skin Corrosivity Testing, *ATLA* 28: 371-401.
- (11) Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., Bruner L., Combes R.D., Ekwall B., Fielder R.J., Guillouzo A., Lewis R.W., Lovell D.P., Reinhardt C.A., Repetto G., Sladowski D., Spielmann H. et Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops, *ATLA* 23:129-147.

- (12) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, 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.
- (17) Kandárová H., Liebsch M., Spielmann, H., Genschow E., Schmidt E., Traue D., Guest R., Whittingham A., Warren N., Gamer A.O., Remmele M., Kaufmann T., Wittmer E., De Wever B., and Rosdy M. (2006). Assessment of the Human Epidermis Model SkinEthic RHE for *In Vitro* Skin Corrosion Testing of Chemicals According to New OECD TG 431. *Toxicol. In Vitro* 20: 547-559.
- (18) Tornier C., Roquet M. and Fraissinette A.B. (2010). Adaptation of the Validated SkinEthic™ Reconstructed Human Epidermis (RHE) Skin Corrosion Test Method to 0.5 cm² Tissue Sample. *Toxicol. In Vitro* 24: 1379-1385.
- (19) EC-ECVAM (2006). Statement on the Application of the SkinEthic™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, 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), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (26) Eskes C. *et al.* (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul.Toxicol.Pharmacol.* 62:393-403.
- (27) Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65:55-63.
- (28) Tinois E., *et al.* (1994). The Episkin Model: Successful Reconstruction of Human *Epidermis In Vitro*. In: *In Vitro Skin Toxicology*. Rougier A., Goldberg A.M and Maibach H.I. (Eds): 133-140.
- (29) Cannon C. L., Neal P.J., Southee J.A., Kubilus J. and Klausner M. (1994), New Epidermal Model for Dermal Irritancy Testing. *Toxicol.in Vitro* 8:889 - 891.
- (30) 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.
- (39) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. (May 2001).
Pateikta
[\[http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf\]](http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf).

1 priedėlis

APIBRĖŽTYS

Tikslumas – bandymo metodo rezultatų ir patvirtintų pamatinių verčių sutapimo artumas. Tikslumas yra bandymo metodo taikymo charakteristikų matas ir vienas iš tinkamumo aspektų. Terminas dažnai vartojamas kaip lygiavertis terminui „sutapimas“ ir reiškia tinkamų bandymo metodo rezultatų dalį (25).

Ląstelių gyvybingumas – bendrojo ląstelių populiacijos aktyvumo, pvz., ląstelių mitochondrinių dehidrogenazių gebėjimo redukuoti gyvųjų audinių dažiklį MTT ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolinio bromidą, tiazolilo mėlyną]), matavimo parametras, kuris, atsižvelgiant į matuojamą vertinamąją baigtį ir taikomą bandymo schemą, yra susijęs su suminių gyvųjų ląstelių kiekiu ir (arba) jų gyvybingumu.

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

Sutapimas – bandymo metodo, kuriuo gaunamas su kategorija susijęs rezultatas, taikymo charakteristikų matas ir vienas iš tinkamumo aspektų. Terminas kartais vartojamas kaip lygiavertis terminui „tikslumas“ ir apibrėžiamas kaip dalis visų bandytų cheminių medžiagų, kurios tiksliai klasifikuojamos kaip teigiamos arba neigiamos. Sutapimas labai priklauso nuo tiriamos bandomosios cheminės medžiagos tipui gautų teigiamų rezultatų dalies (25).

ET₅₀ – gali būti įvertinta kaip ekspozicijos trukmė, per kurią ląstelių gyvybingumas sumažėja 50 % jas veikiant tam tikros pastovios koncentracijos palyginamąja chemine medžiaga, taip pat žr. IC₅₀.

GHS (Visuotinai suderinta cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklinimo sistema) – sistema, kurioje pateikiama cheminių medžiagų (medžiagų ir mišinių) klasifikacija pagal standartizuotus fizikinių pavojų, pavojų sveikatai bei aplinkai tipus ir nagrinėjami atitinkami informaciniai elementai, pvz., piktogramos, signaliniai žodžiai, pavojingumo frazės, atsargumo frazės ir saugos duomenų lapai, kad būtų galima informuoti apie medžiagų neigiamą poveikį, siekiant apsaugoti žmones (įskaitant darbuotojus, darbininkus, vežėjus, vartotojus ir avarijų likvidatorius) ir aplinką (1).

HPLC – efektyvioji skysčių chromatografija.

IATA – integruotasis bandymo ir vertinimo metodas.

IC₅₀ – gali būti įvertinta nustatant palyginamosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant audinių gyvybingumas sumažėja 50 % (IC₅₀) po tam tikros ekspozicijos trukmės, taip pat žr. ET₅₀.

Neribota dozė – ant *epidermio* dedamas bandomosios cheminės medžiagos kiekis, didesnis už kiekį, kurio reikia visiškai ir tolygiai padengti *epidermio* paviršių. **Mišinys** – dviejų arba daugiau

medžiagų mišinys arba tirpalas, kuriuose jos nereaguoja.

Vienkomponentė medžiaga – medžiaga, kurią apibrėžia jos kiekybinė sudėtis, kai vienas pagrindinis komponentas sudaro ne mažiau kaip 80 % (masės).

MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolinio bromidas; tiazolilo mėlynasis, tetrazolinio bromidas.

Daugiakomponentė medžiaga – medžiaga, kurią apibrėžia jos kiekybinė sudėtis, kai daugiau kaip vieno pagrindinio komponento koncentracija $\geq 10\%$ (masės) ir $< 80\%$ (masės). Daugiakomponentė medžiaga yra gamybos proceso rezultatas. Skirtumas tarp mišinio ir daugiakomponentės medžiagos yra tas, kad mišinys gaunamas sumaišant dvi medžiagas arba daugiau nevykstant cheminei reakcijai. Daugiakomponentė medžiaga yra cheminės reakcijos rezultatas.

NĖ – neėsdinanti.

NSS_{negyv} kontrolinis ėminys – nespecifinės negyvų audinių spalvos kontrolinis ėminys.

NSS_{gyv} kontrolinis ėminys – nespecifinės gyvųjų audinių spalvos kontrolinis ėminys.

NSMTT – nespecifinė MTT redukcija.

OT – optinis tankis.

Teigiamas kontrolinis (PC) ėminys – kartotinis ėminys, turintis visus bandymo sistemos komponentus ir apdorotas chemine medžiaga, kuri yra žinoma kaip sukelianti teigiamą atsaką. Siekiant užtikrinti galimybę vertinti teigiamo kontrolinio ėminio atsako kintamumą per tam tikrą laiką, teigiamas atsakas neturėtų būti per stiprus.

Naudojimo charakteristikų standartai (angl. Performance Standards (PS)) – patvirtintu bandymo metodu pagrįsti standartai, kurie yra pagrindas įvertinti mechanizmo ir funkcinių požįūriu panašaus siūlomo bandymo metodo palyginamumą. Įtraukti: i) esminiai bandymo metodo komponentai; ii) etaloninių cheminių medžiagų, parinktų iš cheminių medžiagų, naudojamų patvirtinto bandymo metodo priimtinioms naudojimo charakteristikoms įrodyti, būtinasis sąrašas; ir iii) panašūs tikslumo bei patikimumo lygiai, pagrįsti gautais patvirtintam bandymo metodui, kuriuos siūlomas bandymo metodas turėtų rodyti, kai yra įvertinamas naudojant būtinąjį etaloninių cheminių medžiagų sąrašą (25).

Tinkamumas – santykio tarp bandymo metodo ir tiriamo poveikio apibūdinimas bei bandymo reikšmingumo ir naudingumo siekiant tam tikro tikslo nustatymas. Tai yra bandymo metodo, taikomo tiriamam biologiniam poveikiui matuoti ar prognozuoti, tikslumo laipsnis. Tinkamumas aprėpia bandymo metodo tikslumo (atitikties) aspektą (25).

Patikimumas – pagal tą patį protokolą atliekamo bandymų metodo, ilgą laiką taikomo laboratorijose ir tarp laboratorijų, atkuriamumo laipsnio matas. Jis vertinamas skaičiuojant

atkuriamumą laboratorijoje ir tarp laboratorijų (25).

Atskiras bandymas – vienos arba daugiau bandomųjų cheminių medžiagų bandymas vienu metu su neigiamu kontroliniu ėminiu ir teigiamu kontroliniu ėminiu.

Jautris – visų teigiamų ir (arba) veiklių cheminių medžiagų, kurios yra tinkamai klasifikuotos taikant bandymo metodą, dalis. Jis yra bandymo metodo, kuriuo gaunami su kategorija susiję rezultatai, tikslumo matas ir svarbus aspektas vertinant bandymo metodo tinkamumą (25).

Odos ėsdinimas *in vivo* – negrįžtamas odos pažeidimas; būtent, matoma dermio nekrozė per *epidermį*, praėjus ne daugiau kaip keturioms valandoms po bandomosios cheminės medžiagos uždėjimo. Atsakas į ėsdinimą yra opos, kraujavimas, kruvini šašai ir, pasibaigus 14 parų stebėjimo laikotarpiui, odos blukimas dėl jos šutimo, visiškai nuplikusios vietos ir randai. Neaiškūs pažeidimai turėtų būti vertinami pasitelkiant histopatologinį tyrimą.

Specifiškumas – visų neigiamų ar neveikliųjų cheminių medžiagų, kurios yra tinkamai klasifikuotos taikant bandymo metodą, dalis. Jis yra bandymo metodo, kuriuo gaunami su kategorija susiję rezultatai, tikslumo matas ir svarbus aspektas vertinant bandymo metodo tinkamumą (25).

Medžiaga – natūralus arba gamybos proceso metu gautas cheminis elementas ir cheminių elementų junginys, įskaitant priedus, reikalingus jo stabilumui išlaikyti, ir priemaišas, atsirandančias gaminant, išskyrus tirpiklius, kurie gali būti atskirti nedarant poveikio cheminės medžiagos stabilumui ar nepakeičiant jos sudėties. **Bandomoji cheminė medžiaga** – taikant šį metodą bandoma medžiaga arba mišinys.

UPLC – ypač efektyvi skysčių chromatografija.

UVCB – nežinomos ar kintamos sudėties medžiagos, sudėtingųjų reakcijų produktai ar biologinės medžiagos.

2 priedėlis

ODOS ĖSDINIMO BANDYMU PATVIRTINTŲ RHE BANDYMO MODELIŲ PAGRINDINIAI KOMPONENTAI

Bandymo modelio komponentai	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Modelio paviršiaus plotas	0,38 cm ²	0,63 cm ²	0,5 cm ²	0,6 cm ²
Audinio kartotinių bandinių skaičius	Ne mažiau kaip 2 vienai ekspozicijos trukmei	2–3 vienai ekspozicijos trukmei	Ne mažiau kaip 2 vienai ekspozicijos trukmei	Ne mažiau kaip 2 vienai ekspozicijos trukmei

Bandymo modelio komponentai	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Apdorojimo dozės ir uždėjimo būdas	<u>Skysčiai ir klampios medžiagos</u>: 50 µl ± 3 µl (131,6 µl/cm²) <u>Kietosios medžiagos</u>: 20 ± 2 mg (52,6 mg/cm²) + 100 µl ± 5 µl NaCl tirpalo (9 g/l) <u>Vaškina/lipni</u>: 50 ± 2 mg (131,6 mg/cm²) su nailono tinkleliu	<u>Skysčiai</u>: 50 µl (79,4 µl/cm²) su nailono tinkleliu ar be jo <i>Bandomosios cheminės medžiagos suderinamumo su nailono tinkleliu tikrinimas prieš bandymą</i> <u>Pusiau kietos</u>: 50 µl (79,4 µl/cm²) <u>Kietosios medžiagos</u>: 25 µl H₂O (arba daugiau, jei būtina) + 25 mg (39,7 mg/cm²) <u>Vaškai</u>: plokščias disko formos daiktas maždaug 8 mm skersmens, dedamas ant 15 µl H₂O suvilgyto audinio viršaus.	<u>Skysčiai ir klampios medžiagos</u>: 40 µl ± 3 µl (80 µl/cm²) naudojant nailono tinklelį <i>Bandomosios cheminės medžiagos suderinamumo su nailono tinkleliu tikrinimas prieš bandymą</i> <u>Kietosios medžiagos</u>: 20 µl ± 2 µl H₂O + 20 ± 3 mg (40 mg/cm²) <u>Vaškina/lipni</u>: 20 ± 3 mg (40 mg/cm²) naudojant nailono tinklelį	<u>Skysčiai</u>: 50 µl (83,3 µl/cm²) naudojant nailono tinklelį <i>Bandomosios cheminės medžiagos suderinamumo su nailono tinkleliu tikrinimas prieš bandymą</i> <u>Pusiau kietos</u>: 50 µl (83,3 µl/cm²) <u>Kietosios medžiagos</u>: 25 mg (41,7 mg/cm²) + 25 µl H₂O (arba daugiau, jei būtina) <u>Vaškai</u>: plokščias sausainio formos daiktas maždaug 8 mm skersmens, dedamas ant 15 µl H₂O suvilgyto audinio viršaus.

Bandymo modelio komponentai	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Pradinis tikrinimas dėl tiesioginės MTT redukcijos	50 µl (skysčio) arba 20 mg (kietosios medžiagos) + 2 ml MTT 0,3 mg/ml tirpalo, 180 ±5 min esant 37 °C, 5 % CO₂, 95 % RH → jei tirpalo spalva pasikeičia į mėlyną ar violetinę, reikėtų atlikti vandenyje žuvusio audinio pritaiktų kontrolinių ėminių bandymą	50 µl (skysčio) arba 25 mg (kietosios medžiagos) + 1 ml MTT 1 mg/ml tirpalo, 60 min esant 37 °C, 5 % CO₂, 95 % RH → jei tirpalo spalva pasikeičia į mėlyną ar violetinę, reikėtų atlikti šaltyje žuvusio audinio pritaiktų kontrolinių ėminių bandymą	40 µl (skysčio) arba 20 mg (kietosios medžiagos) + 1 ml MTT 1 mg/ml tirpalo, 180± 15 min esant 37 °C, 5 % CO₂, 95 % RH → jei tirpalo spalva pasikeičia į mėlyną ar violetinę, reikėtų atlikti šaltyje žuvusio audinio pritaiktų kontrolinių ėminių bandymą	50 µl (skysčio) arba 25 mg (kietosios medžiagos) + 1 ml MTT 1 mg/ml tirpalo, 60 min esant 37 °C, 5 % CO₂, 95 % RH → jei tirpalo spalva pasikeičia į mėlyną ar violetinę, reikėtų atlikti šaltyje žuvusio audinio pritaiktų kontrolinių ėminių bandymą
Pradinis tikrinimas dėl spalvos trukdžių	10 µl (skysčio) arba 10 mg (kietosios medžiagos) + 90 µl H₂O, maišoma 15 min kambario temperatūroje → jei tirpalas įgyja spalvą, reikėtų atlikti gyvojo audinio pritaiktų kontrolinių ėminių bandymą	50 µl (skysčio) arba 25 mg (kietosios medžiagos) + 300 µl H₂O 60 min, esant 37 °C, 5 % CO₂, 95 % RH → jei tirpalas įgyja spalvą, reikėtų atlikti gyvojo audinio pritaiktų kontrolinių ėminių bandymą	40 µl (skysčio) arba 20 mg (kietosios medžiagos) + 300 µl H₂O, maišoma 60 min kambario temperatūroje → jei bandomoji cheminė medžiaga yra spalvota, reikėtų atlikti gyvojo audinio pritaiktų kontrolinių ėminių bandymą	50 µl (skysčio) arba 25 mg (kietosios medžiagos) + 300 µl H₂O 60 min, esant 37 °C, 5 % CO₂, 95 % RH → jei tirpalas įgyja spalvą, reikėtų atlikti gyvojo audinio pritaiktų kontrolinių ėminių bandymą
Ekspozicijos trukmė ir temperatūra	3 min, 60 min (± 5 min) ir 240 min (± 10 min) Vėdinamoje kameroje Kambario temperatūra (KT, 18–28 °C)	3 min, esant KT ir 60 min, esant 37 °C, 5 % CO₂, 95 % RH	3 min, esant KT ir 60 min, esant 37 °C, 5 % CO₂, 95 % RH	3 min, esant KT ir 60 min, esant 37 °C, 5 % CO₂, 95 % RH

Bandymo modelio komponentai	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Skalavimas	25 ml 1x PBS (2 ml/kartui)	20 kartų pastovia nestipria 1x PBS srove	20 kartų pastovia nestipria srove	20 kartų pastovia nestipria 1x PBS srove
Neigiamas kontrolinis ėminys	50 µl NaCl tirpalo (9 g/l) Bandoma kiekvienai ekspozicijos trukmei	50 µl H ₂ O Bandoma kiekvienai ekspozicijos trukmei	40 µl H ₂ O Bandoma kiekvienai ekspozicijos trukmei	50 µl H ₂ O Bandoma kiekvienai ekspozicijos trukmei
Teigiamas kontrolinis ėminys	50 µl ledinės acto rūgšties Bandoma tik 4 h ekspozicijai	50 µl 8N KOH Bandoma kiekvienai ekspozicijos trukmei	40 µl 8N KOH Bandoma tik 1 h ekspozicijai	50 µl 8N KOH Bandoma kiekvienai ekspozicijos trukmei
MTT tirpalas	2 ml, 0,3 mg/ml	300 µl, 1 mg/ml	300 µl, 1 mg/ml	300 µl, 1 mg/ml
MTT inkubavimo trukmė ir temperatūra	180 min (± 15 min), esant 37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % RH	180 min, esant 37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % RH	180 min (± 15 min), esant 37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % RH	180 min, esant 37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % RH
Ekstrahavimo tirpiklis	500 µl parūgštinto izopropanolio (0,04 mol/l HCl izopropanolyje) (atskirtas audinys visiškai įmerkta)	2 ml izopropanolio (ekstrahavimas nuo įdėklo viršaus ir apačios)	1,5 ml izopropanolio (ekstrahavimas nuo įdėklo viršaus ir apačios)	2 ml izopropanolio (ekstrahavimas nuo įdėklo viršaus ir apačios)
Ekstrahavimo trukmė ir temperatūra	Per naktį, esant KT, apsaugotas nuo šviesos	Per naktį kambario temperatūroje, jei nepurtoma, arba 120 min purtant (~120 aps/min) kambario temperatūroje	Per naktį kambario temperatūroje, jei nepurtoma, arba 120 min purtant (~120 aps/min) kambario temperatūroje	Per naktį kambario temperatūroje, jei nepurtoma, arba 120 min purtant (~120 aps/min) kambario temperatūroje

Bandymo modelio komponentai	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
OT rodmenys	570 nm (545–595 nm) be palyginamojo filtro	570 nm (arba 540 nm) be palyginamojo filtro	570 nm (540–600 nm) be palyginamojo filtro	540–570 nm be palyginamojo filtro
Audinių kokybės kontrolė	18 h apdorojimas SDS 1,0 mg/ml $\leq$ IC ₅₀ $\leq$ 3,0 mg/ml	Apdorojimas 1 % Triton X-100 4,08 h $\leq$ ET ₅₀ $\leq$ 8,7 h	Apdorojimas 1 % Triton X-100 4,0 h $\leq$ ET ₅₀ $\leq$ 10,0 h	Apdorojimas 1 % Triton X-100 2,0 h $\leq$ ET ₅₀ $\leq$ 7,0 h
Priimtumo kriterijai	1. Audinių kartotinių bandinių, apdorotų neigiamu kontroliniu ėminiu (NaCl), vidutinis OT turėtų būti $\geq$ 0,6 ir $\leq$ 1,5 kiekvienai ekspozicijos trukmei 2. Audinio kartotinių bandinių, 4 h veikiamų teigiamu kontroliniu ėminiu (ledinė acto rūgštis), vidutinis gyvybingumas, išreikštas % neigiamo kontrolinio ėminio atžvilgiu, turėtų būti $\leq$ 20 % 3. 20–100 % gyvybingumo intervalui ir OT $\geq$ 0,3, dviejų kartotinių audinio bandinių gyvybingumo skirtumas neturėtų būti didesnis kaip 30 %.	1. Audinių kartotinių bandinių, apdorotų neigiamu kontroliniu ėminiu (H₂O), vidutinis OT turėtų būti $\geq$ 0,8 ir $\leq$ 2,8 kiekvienai ekspozicijos trukmei 2. Audinio kartotinių bandinių, 1 h veikiamų teigiamu kontroliniu ėminiu (8 mol/l KOH), vidutinis gyvybingumas, išreikštas % neigiamo kontrolinio ėminio atžvilgiu, turėtų būti $<$ 15 % 3. 20–100 % gyvybingumo intervalui kartotinių audinio bandinių variacijos koeficientas (VK) turėtų būti $\leq$ 30 %	1. Audinių kartotinių bandinių, apdorotų neigiamu kontroliniu ėminiu (H₂O), vidutinis OT turėtų būti $\geq$ 0,8 ir $\leq$ 3,0 kiekvienai ekspozicijos trukmei 2. Audinio kartotinių bandinių, 1 h (ir 4 h, jei tinka) veikiamų teigiamu kontroliniu ėminiu (8 mol/l KOH), vidutinis gyvybingumas, išreikštas % neigiamo kontrolinio ėminio atžvilgiu, turėtų būti $<$ 15 % 3. 20–100 % gyvybingumo intervalui ir OT $\geq$ 0,3, dviejų kartotinių audinio bandinių gyvybingumo skirtumas neturėtų būti didesnis kaip 30 %.	1. Audinių kartotinių bandinių, apdorotų neigiamu kontroliniu ėminiu (H₂O), vidutinis OT turėtų būti $\geq$ 0,8 ir $\leq$ 2,8 kiekvienai ekspozicijos trukmei 2. Audinio kartotinių bandinių, 1 h veikiamų teigiamu kontroliniu ėminiu (8 mol/l KOH), vidutinis gyvybingumas, išreikštas % neigiamo kontrolinio ėminio atžvilgiu, turėtų būti $<$ 20 % 3. 20–100 % gyvybingumo intervalui ir OT $\geq$ 0,3, dviejų kartotinių audinio bandinių gyvybingumo skirtumas neturėtų būti didesnis kaip 30 %

3 priedėlis

KLASIFIKAVIMO Į PAKATEGORES NAUDOJANT BANDYMO MODELIUS CHARAKTERISTIKOS

Toliau pateiktoje lentelėje nurodytos keturių bandymo modelių naudojimo charakteristikos, pagrįstos keturių bandymų kūrėjų 80 cheminių medžiagų rinkinio bandymu. Skaičiavimus atliko EBPO sekretoriatas, juos peržiūrėjo ir pritarė ekspertų pogrupis (21) (23).

Taikant EpiSkin™, EpiDerm™, SkinEthic™ ir epiCS® bandymo modelius, galima skirstyti į pakategorės (t. y. 1A *versus* 1B ir 1C *versus* NĖ).

Keturių bandymo modelių naudojimo charakteristikos, priskyrimo aukštesnei kategorijai procentinė dalis, priskyrimo žemesnei kategorijai procentinė dalis ir tikslumas (prognozavimo geba), pagrįstas 80 cheminių medžiagų rinkiniu, kai visos medžiagos buvo bandomos atliekant 2 ar 3 atskirus bandymus kiekvienam bandymo modeliui.

PROGNOZAVIMO STATISTINIAI DUOMENYS, GAUTI VISAM CHEMINIŲ MEDŽIAGŲ RINKINIUI				
(n = 80 cheminių medžiagų, bandytų atliekant 2 nepriklausomus bandymus, naudojant epiCS®, arba 3 nepriklausomus bandymus, naudojant EpiDerm™ SCT, EpiSkin™ ir SkinEthic™ RHE, t. y. 159* arba 240 klasifikavimo rezultatų).				
*Viena cheminė medžiaga buvo bandoma epiCS® tik vieną kartą, nes jos daugiau nebuvo (23)				
	EpiSkin™	EpiDerm™	SkinEthic™	epiCS®
Priskyrimas aukštesnei kategorijai:				
1B ir 1C priskirta aukštesnė 1A kategorija	21,50 %	29,0 %	31,2 %	32,8 %
NĖ priskirta aukštesnė 1B ir 1C kategorija	20,7 %	23,4 %	27,0 %	28,4 %
NĖ priskirta aukštesnė 1A kategorija	0,00 %	2,7 %	0,0 %	0,00 %
Neteisingai priskirtos esdinančioms	20,7 %	26,1 %	27,0 %	28,4 %
Bendroji priskyrimo aukštesnei kategorijai	17,9 %	23,3 %	24,5 %	25,8 %
Priskyrimas žemesnei kategorijai:				
1A priskirta žemesnė 1B ir 1C	16,7 %	16,7 %	16,7 %	12,5 %
1A priskirta žemesnė NĖ	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
1B ir 1C priskirta žemesnė NĖ	2,2 %	0,00 %	7,5 %	6,6 %
Bendroji priskyrimo žemesnei kategorijai procentinė dalis (visų kategorijų)	3,3 %	2,5 %	5,4 %	4,4 %
Teisingas klasifikavimas:				

Teisingai priskirta 1A	83,3 %	83,3 %	83,3 %	87,5 %
Teisingai priskirta 1B ir 1C	76,3 %	71,0 %	61,3 %	60,7 %
Teisingai priskirta NĖ	79,3 %	73,9 %	73,0 %	71,62 %
Bendrasis tikslumas	78,8 %	74,2 %	70 %	69,8 %

NĖ – neįsodinanti.

4 priedėlis

HPLC arba UPLC ir spektrofotometrijos sistemos, skirtos iš RhE audinio ekstrahuotam MTT formazanui matuoti, tinkamumo įvertinimo pagrindiniai parametrai ir priimtumo kriterijai

Parametras	Protokolas, parengtas pagal FDA rekomendacijas (37) (38)	Priimtumo kriterijai
Atrankumas	Izopropanolio, gyvųjų audinių tuščiojo ėminio (neapdorotų gyvųjų audinių izopropanolio ekstrakto), negyvų audinių tuščiojo ėminio (neapdorotų negyvų audinių izopropanolio ekstrakto) analizė	$\text{Plotas}_{\text{trukdžių}} \leq 20 \%$ $\text{Plotas}_{\text{LLOQ}}^1$
Preciziškumas	Kokybės kontrolės ėminiai (t. y. MTT formazano 1,6 µg/ml, 16 µg/ml ir 160 µg/ml tirpalas) izopropanolyje (n = 5)	$\text{VK} \leq 15 \% \text{ arba } \leq 20 \% \text{ dėl LLOQ}$
Tikslumas	Kokybės kontrolės ėminiai izopropanolyje (n = 5)	$\% \text{ Nuokr.} \leq 15 \% \text{ arba } \leq 20 \% \text{ dėl LLOQ}$
Matricos efektas	Kokybės kontrolės medžiagos gyvųjų audinių tuščiajame ėminyje (n = 5)	$85 \% \leq \text{matricos efektas} \leq 115 \%$
Pernaša	Izopropanolio analizė po ULOQ ² etaloninio tirpalo	$\text{Plotas}_{\text{trukdžių}} \leq 20 \%$ $\text{Plotas}_{\text{LLOQ}}$
Atkuriamumas (vienos dienos)	3 nepriklausomos kalibravimo kreivės (gautos nuosekliai skiedžiant 6 kartus MTT formazaną izopropanolyje santykiu 1/3, pradedant ULOQ, t. y. 200 µg/ml); Kokybės kontrolės ėminiai izopropanolyje (n = 5)	Kalibravimo kreivės: $\% \text{ Nuokr.} \leq 15 \% \text{ arba } \leq 20 \% \text{ dėl LLOQ}$ Kokybės kontrolės ėminiai: $\% \text{ Nuokr.} \leq 15 \% \text{ ir } \text{VK} \leq 15 \%$
Atkuriamumas (tarp dienų)	1 diena: 1 kalibravimo kreivė ir kokybės kontrolės ėminiai izopropanolyje (n = 3) 2 diena: 1 kalibravimo kreivė ir kokybės kontrolės ėminiai izopropanolyje (n = 3) 3 diena: 1 kalibravimo kreivė ir kokybės kontrolės ėminiai izopropanolyje (n = 3)	
MTT formazano RhE audinio ekstrakto trumpalaikis stabilumas	Kokybės kontrolės medžiagos gyvųjų audinių tuščiajame ėminyje (n = 3), analizuojamos paruošimo dieną ir po 24 h laikymo kambario temperatūroje	
MTT formazano RhE audinio ekstrakto ilgalaikis stabilumas, jei reikia	Kokybės kontrolės medžiagos gyvųjų audinių tuščiajame ėminyje (n = 3), analizuojamos paruošimo dieną ir po kelių laikymo tam tikroje temperatūroje (pvz., 4 °C, –20 °C, –80 °C) dienų	$\% \text{ Nuokr.} \leq 15 \%$

¹LLOQ – apatinė kiekybinio nustatymo riba, nurodoma kaip sudaranti 1–2 % audinio gyvybingumo, t. y. 0,8 µg/ml.

²ULOQ – viršutinė kiekybinio nustatymo riba, nurodoma kaip koncentracija, ne mažiau kaip du kartus didesnė nei didžiausia tikėtina MTT formazano koncentracija neigiamų kontrolinių ėminių izopropanolio ekstraktuose, t. y. 200 µg/ml.“

7) B dalies B.46 skyrius pakeičiamas taip:

„B. 46 ODOS DIRGINIMAS *IN VITRO*. REKONSTRUOTO ŽMOGAUS EPIDERMIO BANDYMO METODAS

IVADAS

1. Šis bandymų metodas atitinka EBPO bandymo gaires (TG) 439 (2015). Odos dirginimu vadinamas grįžtamasis odos pažeidimas po bandomosios cheminės medžiagos uždėjimo ne ilgiau kaip 4 h (kaip apibrėžta Jungtinių Tautų (JT) visuotinai suderintoje cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklavimo sistemoje (GHS) (1) ir Europos Sąjungos (ES) Reglamente Nr. 1272/2008 dėl cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo, ženklavimo ir pakavimo (CLP))¹. Šiame bandymo metode pateikiama *in vitro* procedūra, kurią galima naudoti 2 kategorijos dirginančiųjų cheminių medžiagų (medžiagų ir mišinių) pagal JT GHS ir CLP pavojui identifikuoti (2). Regionuose, kuriuose netaikoma neprivaloma JT GHS 3-ioji kategorija (švelnūs dirgikliai), šis bandymo metodas taip pat gali būti taikomas neklasifikuojamoms cheminėms medžiagoms identifikuoti. Todėl priklausomai nuo galiojančios reglamentavimo sistemos ir klasifikavimo sistemos šis bandymo metodas gali būti taikomas cheminių medžiagų sukeliamam odos dirginamumui nustatyti kaip atskiras pakaitinis bandymas *in vivo* odos dirginimui bandyti arba kaip nuosekliųjų bandymų strategijos dalinis pakaitinis bandymas (3).
2. Odos dirginimo vertinimas paprastai yra susijęs su laboratorinių gyvūnų naudojimu (B.4 bandymo metodas, atitinkantis EBPO TG 404, pirmą kartą priimtas 1981 m., peržiūrėtas 1992 m., 2002 m. ir 2015 m.) (4). Ėsdinimui bandyti buvo priimti trys patvirtinti *in vitro* bandymo metodai, EBPO B.40 bandymo metodas (atitinka EBPO TG 430), B.40bis bandymo metodas (atitinka EBPO TG 431) ir B.65 bandymo metodas (atitinka EBPO TG 435) (5) (6) (7). EBPO rekomendaciniame dokumente dėl odos dirginimo ar ėsdinimo integruotųjų bandymo ir vertinimo metodų (IATA) aprašomi keli moduliai, kuriuose grupuojami informacijos šaltiniai ir analizės priemonės bei pateikiami nurodymai, kaip (i) integruoti ir naudoti esamus bandymų ir ne bandymų duomenis, skirtus cheminių medžiagų odos dirginimo ir odos ėsdinimo potencialui įvertinti, ir (ii) siūlomas metodas, jei būtini papildomi bandymai (3).

¹ 2008 m. gruodžio 16 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentas (EB) Nr. 1272/2008 dėl cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo, ženklavimo ir pakavimo, iš dalies keičiantis ir panaikinantis direktyvas 67/548/EEB bei 1999/45/EB ir iš dalies keičiantis Reglamentą (EB) Nr. 1907/2006, OL L 353, 2008 12 31.

3. Šis bandymo metodas skirtas tirti odos dirginimą kaip žmogaus sveikatos vertinamąją baigtį. Jis pagrįstas rekonstruoto žmogaus *epidermio* (RhE), kuris labai tiksliai atkartoja biochemines ir fiziologines viršutinių žmogaus odos dalių, t. y. *epidermio*, savybes, *in vitro* bandymo sistema. Kaip ląstelių šaltinį epidermio modeliui su reprezentatyvia histologija ir ląstelių architektūra rekonstruoti RhE bandymo sistema naudoja žmogaus odos keratinocitus. Yra naudojimo charakteristikų standartai, kurie padėtų atlikti panašių ir modifikuotų RhE pagrįstų bandymo metodų patvirtinimą ir vertinimą, atsižvelgiant į EBPO rekomendacinio dokumento Nr. 34 principus (8) (9). Atitinkamos bandymo gairės buvo pirmą kartą priimtos 2010 m. ir atnaujintos 2013 m., įtraukiant papildomus RhE modelius, ir dar kartą atnaujintos 2015 m., pateikiant nuorodą į IATA rekomendacinį dokumentą bei įtraukiant alternatyviąją gyvybingumo matavimo procedūrą.
4. Atlikti keturių prekyboje esančių *in vitro* bandymo modelių (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28), pagrįstų RhE bandymo sistema (jautris – 80 %, specifiškumas – 70 % ir tikslumas 75 %) parengiamojo patvirtinimo, optimizavimo ir patvirtinimo tyrimai. Šie keturi bandymo modeliai yra įtraukti į šias bandymo gaires ir išvardyti 2 priedėlyje, kurioje taip pat pateikiama informacija apie patvirtinimo tyrimo tipą, naudotą atitinkamiems bandymo metodams patvirtinti. Kaip pažymėta 2 priedėlyje, patvirtintas pamatinis metodas (PPM) buvo taikomas šiam bandymo metodui ir naudojimo charakteristikų standartams sukurti (8).
5. EBPO abipusis duomenų pripažinimas būtų užtikrintas tik bandymo modeliams, patvirtintiems pagal naudojimo charakteristikų standartus (8), jei šiuos bandymo modelius peržiūrėjo ir priėmė EBPO. Į šį bandymo metodą ir atitinkamas EBPO bandymo gaires įtraukti bandymo modeliai gali būti naudojami sprendžiant be skirtumo klausimus, susijusius su šalies reikalavimais odos dirginimo *in vitro* bandymo metodų rezultatams, ir turėti naudos iš abipusio duomenų pripažinimo.
6. Šiame dokumente vartojamų terminų apibrėžtys pateiktos 1 priedėlyje.

PRADINIAI ASPEKTAI IR APRIBOJIMAI

7. Bandymo metodo ribotumas, kaip rodo išsamus perspektyvusis patvirtinimo tyrimas vertinant ir apibūdinant RhE bandymo metodus (16), yra tai, jį taikant cheminių medžiagų neįmanoma priskirti neprivalomai JT GHS 3-iajai kategorijai (švelnūs dirgikliai) (1). Todėl valstybių narių reglamentavimo sistema turės priimti sprendimą, kaip reikėtų taikyti šį bandymo metodą. Į ES CLP 3-ioji kategorija nėra įtraukta. Siekiant išsamiai įvertinti vietinį poveikį odai po vienkartinės odos ekspozicijos, informacijos reikėtų ieškoti EBPO rekomendaciniame dokumente dėl integruotųjų bandymo ir vertinimo metodų (3). Pripažįstama, kad žmogaus odos bandymams taikomi nacionaliniai ir tarptautiniai etikos principai bei sąlygos.

8. Šis bandymo metodas skirtas tirti odos dirginimą kaip žmogaus sveikatos vertinamąją baigtį. Nors taikant šį bandymo metodą negaunama reikiamos informacijos apie odos ėsdinimą, reikėtų pažymėti, kad odos ėsdinimui skirtas B.40bis (atitinka EBPO TG 431) yra pagrįstas ta pačia RhE bandymo sistema, bet naudojamas kitas protokolas (6). Šis bandymo metodas pagrįstas RhE modeliais, kuriems naudojami žmogaus keratinocitai, kurie *in vitro* reprezentuoja tiriamos rūšies tikslinį organą. Be to, jis tiesiogiai aprėpia uždegiminių procesų ir (arba) veikimo mechanizmo pakopų pradinę pakopą (ląstelių ir audinio pažeidimą, gaunant vietinę traumą), kuri vyksta *in vivo* dirginimo metu. Atliekant šio bandymo metodo patvirtinimą buvo bandoma didelė cheminių medžiagų grupė ir į patvirtinimo tyrimo duomenų bazę iš viso įtrauktos 58 cheminės medžiagos (16) (18) (23). Bandymo metodas taikomas kietosioms medžiagoms, skysčiams, pusiau kietoms medžiagoms ir vaškams. Skysčiai gali būti vandeniniai arba nevandeniniai; kietosios medžiagos gali būti tirpios arba netirpios vandenyje. Jei įmanoma, kietąsias medžiagas prieš bandymą reikėtų sumalti; jokio kito ėminio parengiamojo apdorojimo atlikti nereikia. Atliekant patvirtinimo tyrimą, dujos ir aerozoliai kol kas nebuvo vertinami (29). Nors, kaip atrodo, dujas ir aerozolius būtų galima bandyti taikant RhE procedūrą, dabartinis metodas jų bandymams nėra pritaikytas.
9. Prieš taikant bandymų metodą mišiniui, kad būtų gauti numatomo reglamentavimo tikslui skirti duomenys, reikėtų panagrinėti, ar metodu galima pasiekti tą tikslą atitinkančius rezultatus ir, jei taip, dėl kokios priežasties. Tokie svarstymai nereikalingi, kai yra reglamentavimo reikalavimas bandyti mišinį. Tačiau atsižvelgiant į tą faktą, kad mišiniai aprėpia daug kategorijų ir sudėčių ir šiuo metu yra labai nedaug informacijos apie mišinių bandymus tais atvejais, kai galima įrodyti bandymo metodo netinkamumą specifinei mišinių kategorijai (pvz., taikant Eskes *et al.* 2012, pasiūlytą strategiją (30)), bandymo metodas neturėtų būti taikomas tai specifinei mišinių kategorijai. Panašiai reikėtų elgtis atsargiai, jei būtų nustatyta, kad tam tikroms cheminių medžiagų klasėms ar fizikocheminėms savybėms šis bandymo metodas netinka.
10. Bandomosios cheminės medžiagos, kurių šviesos absorbcijos sritis sutampa su MTT formazano, ir bandomosios cheminės medžiagos, kurios gali tiesiogiai redukuoti gyvųjų audinių dažiklį MTT (į MTT formazaną), gali trukdyti matuoti ląstelių gyvybingumą, todėl pataisoms daryti turi būti naudojami pritaikyti kontroliniai ėminiai (žr. 28–34 pastraipas).
11. Jei dėl klasifikavimo neabejojama, bandomajai cheminei medžiagai turėtų pakakti vieno ne mažiau kaip trijų kartotinių audinio bandinių atskiro bandymo. Tačiau, jei rezultatai ribiniai, pvz., kartotinių ėminių matavimų rezultatai nesutampa ir (arba) vidutinė procentinė gyvybingumo vertė lygi $50 \pm 5 \%$, reikėtų spręsti dėl antrojo nepriklausomo atskiro bandymo, taip pat dėl trečiojo, jei pirmųjų dviejų atskirų bandymų rezultatai išsiskirtų.

BANDYMO PRINCIPAS

12. Bandomoji cheminė medžiaga uždedama ant trimačio RhE modelio, sudaryto iš netransformuotų žmogaus odos keratinocitų, kurie buvo auginami, kad galėtų būti gautas daugiasluoksnis labai diferencijuotas žmogaus *epidermio* modelis. Jį sudaro suformuoti pamatinis, dygliuotasis ir grūdėtasis sluoksniai ir daugiasluoksnis *stratum corneum*, turintis tarpląstelių žvynelių pavidalo lipidų sluoksnių, reprezentuojančių pagrindines lipidų klases, analogiškas randamoms *in vivo*.
13. Cheminių medžiagų sukeltas odos dirginimas, daugiausia pasireiškiantis kaip eritema ir edema, yra įvykių sekos, prasidedančios cheminių medžiagų prasiskverbimu pro *stratum corneum*, kai jos gali pažeisti po juo esančius keratinocitų sluoksnius ir kitas odos ląsteles, rezultatas. Pažeistos ląstelės gali išskirti uždegiminius mediatorius arba sukelti uždegiminių procesų seką, veikiančią *dermio* ląsteles, pirmiausia kraujagyslių stromos ir endotelio ląsteles. Matomą eritemą ir edemą sukelia endotelio ląstelių išsiplėtimas ir padidėjęs pralaidumas (29). Būtent, jei *in vitro* bandymo sistemoje nėra vaskuliarizacijos, RhE pagrįstais bandymo metodais matuojami pradiniai sekos įvykiai, pvz., ląstelių ir (arba) audinio pažeidimas (16) (17), kaip rodmenį naudojant ląstelių gyvybingumą.
14. Ląstelių gyvybingumas naudojant RhE modelius matuojamas pagal gyvųjų audinių dažiklio MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromido, tiazolilo mėlynojo, CAS Nr. 298-93-1), fermentinį virsmą į mėlynos spalvos formazano druską, kiekybiškai nustatomą po ekstrakcijos iš audinių (31). Dirginančios cheminės medžiagos identifikuojamos pagal jų gebėjimą sumažinti ląstelių gyvybingumą iki mažesnių nei nustatyti slenkstinių lygių (t. y. $\leq 50\%$ JT GHS ir CLP 2-ajai kategorijai). Priklausomai nuo reglamentavimo sistemos ir šio bandymo metodo tinkamumo, bandomosios cheminės medžiagos, kurioms gaunamas ląstelių gyvybingumas yra didesnis nei nustatytas slenkstinis lygis, gali būti laikomos nedirginančiomis (t. y. $> 50\%$, be kategorijos).

KVALIFIKACIJOS ĮRODYMAS

15. Prieš pradėdamos naudoti šį bandymo metodą atitinkančius keturis patvirtintus RhE modelius (2 priedėlis) įprastiniu būdu, laboratorijos turėtų įrodyti savo techninę kvalifikaciją, naudodamos dešimt kvalifikacijai įrodyti skirtų cheminių medžiagų, išvardytų 1 lentelėje. Tais atvejais, kai, pvz., sąraše nurodytos medžiagos nėra, gali būti naudojama kita medžiaga, kuriai turimi tinkami *in vivo* ir *in vitro* etaloniniai duomenys (pvz., iš etaloninių cheminių medžiagų sąrašo (8)), jei taikomi tie patys atrankos kriterijai, kaip aprašyta 1 lentelėje. Jei naudojama kita kvalifikacijai įrodyti skirta medžiaga, naudojimą reikėtų pagrįsti.
16. Atliekant kvalifikacijos įrodymo bandymus, naudotojams taip pat rekomenduojama patikrinti po audinių gavimo jų apsaugines savybes, nurodytas RhE modelio gamintojo. Tai ypač svarbu, jei audiniai gabenami dideliais atstumais ir (arba) ilgą laiką. Kai bandymo metodas sėkmingai sukurtas ir jo taikymo kvalifikacija yra įgyta ir įrodyta, vėliau tokio

tikrinimo reguliariai daryti nebūtina. Tačiau, jei bandymo metodas taikomas nuolat, apsaugines savybes rekomenduojama ir toliau vertinti reguliariais laiko tarpais.

1 lentelė. Kvalifikacijai įrodyti skirtos medžiagos¹

Medžiaga	CAS NR	<i>In vivo</i> balas ²	Agregatinė būsena	JT GHS kategorija
NEKLASIFIKUOTOS MEDŽIAGOS (JT GHS be kategorijos)				
naftalenacto rūgštis	86-87-3	0	Kietoji medžiaga	Be kategorijos
izopropanolis	67-63-0	0,3	Skystis	Be kategorijos
metilstearatas	112-61-8	1	Kietoji medžiaga	Be kategorijos
heptilbutiratas	5870-93-9	1,7	Skystis	Be kategorijos (neprivaloma 3-ioji kat.) ³
heksilsalicilatas	6259-76-3	2	Skystis	Be kategorijos (neprivaloma 3-ioji kat.) ³
KLASIFIKUOTOS MEDŽIAGOS (JT GHS 2-oji kategorija)				
ciklamenaldehidai	103-95-7	2,3	Skystis	2 kategorija
1-bromheksanas	111-25-1	2,7	Skystis	2 kategorija
kalio hidroksidas (5 % vand.)	1310-58-3	3	Skystis	2 kategorija
1-metil-3-fenil-1-piperazinas	5271-27-2	3,3	Kietoji medžiaga	2 kategorija
heptanalis	111-71-7	3,4	Skystis	2 kategorija

¹ Kvalifikacijai įrodyti skirtos medžiagos sudaro patvirtinimo tyrime naudojamų medžiagų rinkinio dalį ir jų atranka pagrįsta šiais kriterijais: i) cheminės medžiagos yra prekyboje; ii) jos reprezentuoja visą Draize dirginimo balų intervalą (nuo nedirginančių iki stipriai dirginančių); iii) jos turi tinkamai nustatytą cheminę struktūrą; iv) jos reprezentuoja patvirtinimo procese naudotų cheminių medžiagų funkcines grupes; v) joms gautas *in vitro* rezultatų atkuriamumas, dideliame laboratorijų skaičiui atliekant kartotinius bandymus; vi) buvo tinkamai numatytos *in vitro* ir vii) jos nėra susijusios su didelio toksiškumo parametrais (pvz., kancerogeniškumu arba toksiškumu reprodukcijos sistemai) ir nėra susijusios su labai didelėmis šalinimo išlaidomis.

² *In vivo* balas pagal B.4 bandymo metodą (4).

Pagal šį bandymo metodą, neprivaloma JT GHS 3-ioji kategorija (švelnūs dirgikliai) (1) laikoma *be kategorijos*.

PROCEDŪRA

17. Toliau pateikiamas odos dirginimo vertinimo RhE bandymo modelių komponentų ir procedūrų bendrasis aprašymas (apie parametrus, susijusius su kiekvienu bandymo modeliu, taip pat žr. 3 priedėlį). Yra šį bandymo metodą atitinkančių keturių modelių standartinės veiklos procedūros (32) (33) (34) (35).

RHE BANDYMO METODO KOMPONENTAI

Bendrosios sąlygos

18. Epiteliui rekonstruoti turėtų būti naudojami netransformuoti žmogaus odos keratinocitai. Po funkcinio *stratum corneum* turėtų būti keli gyvybingų epitelio ląstelių sluoksniai (pamatinis sluoksnis, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*). *Stratum corneum* turėtų būti daugiasluoksnis ir turėti pagrindinių lipidų profilį, kad būtų gautas patvarus veiksmingas barjeras, kuris būtų atsparus citotoksinių palyginamųjų cheminių medžiagų, pvz., natrio dodecilsulfato (SDS) arba Triton X-100, greitam prasiskverbimui. Apsauginė funkcija turėtų būti įrodyta ir gali būti įvertinta nustatant koncentraciją, kuriai esant palyginamoji cheminė medžiaga per tam tikrą ekspozicijos laiką sumažina audinių gyvybingumą 50 % (IC_{50}), arba nustatant tam tikros pastovios koncentracijos palyginamosios cheminės medžiagos ekspozicijos trukmę, kuriai esant ląstelių gyvybingumas sumažėja 50 % (ET_{50}). RhE modelio sulaikymo savybės turėtų apsaugoti nuo medžiagos patekimo prie gyvojo audinio apeinant *stratum corneum*, nes taip būtų blogai modeliuojama odos ekspozicija. RhE modelis neturėtų būti užkrėstas bakterijomis, virusais, mikoplazmomis ar grybeliais.

Veikimo sąlygos

Gyvybingumas

19. Kiekybinio gyvybingumo nustatymo bandymas yra MTT bandymas (31). Gyvybingos RhE audinio darinio ląstelės redukuoja gyvųjų audinių dažiklį MTT į mėlynos spalvos MTT formazano nuosėdas, kurios ekstrahuojamos iš audinio izopropanoliu (arba panašiu tirpikliu). Paties ekstrahavimo tirpiklio optinis tankis (OT) turėtų būti pakankamai mažas, t. y. $OT < 0,1$. Ekstrahuotas MTT formazanas gali būti kiekybiškai nustatytas atliekant standartinį optinio tankio matavimą arba HPLC ar UPLC ir spektrofotometrijos procedūrą (36). RhE modelio naudotojai turėtų užtikrinti, kad kiekviena naudoto RhE modelio partija atitiktų neigiamiems kontroliniams ėminiams nustatytus kriterijus. Neigiamų kontrolinių ėminių OT verčių priimtino intervalo (viršutinę ir apatinę ribas) (odos dirginimo bandymo metodo sąlygomis) nustato RhE modelio kūrėjas arba tiekėjas. Į šį bandymo metodą įtrauktų keturių patvirtintų RhE bandymo modelių priimtino intervalai pateikti 2 lentelėje. Taikantys HPLC arba UPLC ir spektrofotometrijos metodą, turėtų naudoti 2 lentelėje pateiktų neigiamų kontrolinių ėminių OT intervalus kaip neigiamo kontrolinio ėminio priimtino kriterijų. Reikėtų dokumentuoti, kad neigiama kontrole medžiaga apdorotų audinių kultūra yra stabili (gaunami panašūs gyvybingumo matavimo rezultatai) visą ekspozicijos laikotarpį.

2 lentelė. Į šį bandymo metodą įtrauktų bandymo modelių neigiamų kontrolinių ėminių OT verčių priimtino intervalai

	Apatinė priimtino riba	Viršutinė priimtino riba
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	$\geq 0,7$	$\leq 2,5$

Apsauginė funkcija

20. *Stratum corneum* ir jo lipidų sudėtis turėtų būti pakankama, kad būtų suteikta apsauga nuo greito tam tikrų citotoksinių palyginamųjų cheminių medžiagų, pvz., SDS arba Triton X-100, prasiskverbimo, įvertinamo pagal IC₅₀ arba ET₅₀ (3 lentelė).

Morfologija

21. Turėtų būti atliktas RhE modelio histologinis tyrimas, įrodantis į žmogaus *epidermį* panašią struktūrą (įskaitant daugiasluoksnį *stratum corneum*).

Atkuriamumas

22. Teigiamų ir neigiamų kontrolinių ėminių rezultatai taikant bandymo metodą turėtų įrodyti atkuriamumą per ilgą laiką.

Kokybės kontrolė

23. RhE modelis turėtų būti naudojamas tik tokiu atveju, jei kūrėjas arba tiekėjas įrodo, kad kiekviena naudojamo RhE modelio partija atitinka nustatytus gaminių išleidimo kriterijus, iš kurių svarbiausi yra *gyvybingumo* (19 pastraipa), *apsauginės funkcijos* (20 pastraipa) ir *morfologijos* (21 pastraipa) kriterijai. Šie duomenys turėtų būti pateikti taikantiesiems bandymo metodą, kad jie galėtų įtraukti šią informaciją į bandymo ataskaitą. IC₅₀ arba ET₅₀ verčių priimtino intervalą (viršutinę ir apatinę ribas) turėtų nustatyti RhE modelio kūrėjas arba tiekėjas. Tik su kokybiškais audiniais gauti rezultatai gali būti laikomi patikimais prognozuojant dirginimo klasifikaciją. Į šias bandymo gaires įtrauktų keturių bandymo modelių priimtino intervalai pateikti 3 lentelėje.

3 lentelė. Į šį bandymo metodą įtrauktų modelių partijos išleidimo kokybės kontrolės kriterijai

	Apatinė priimtino riba	Viršutinė priimtino riba
EpiSkin™ (SM) (18 h trukmės apdorojimas SDS) (32)	IC ₅₀ = 1,0 mg/ml	IC ₅₀ = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1 % Triton X-100) (33)	ET ₅₀ = 4,0 h	ET ₅₀ = 8,7 h
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (34)	ET ₅₀ = 4,0 h	ET ₅₀ = 10,0 h
LabCyte EPI-MODEL24 SIT (18 h trukmės apdorojimas SDS) (35)	IC ₅₀ = 1,4 mg/ml	IC ₅₀ = 4,0 mg/ml

Bandomosios cheminės medžiagos ir kontrolinių cheminių medžiagų uždėjimas

24. Atliekant kiekvieną atskirą bandymą, kiekvienai bandomajai cheminei medžiagai ir kontrolinėms medžiagoms reikėtų naudoti ne mažiau kaip tris kartotinius bandinius. Tiriant skystąsias ir kietąsias chemines medžiagas, reikėtų uždėti bandomosios cheminės medžiagos kiekį, kurio pakaktų epidermio paviršiui tolygiai padengti, bet vengiant neribotos dozės, t. y. nuo 26 iki 83 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ arba mg/cm^2 (žr. 3 priedėlį). Jei bandomos kietosios medžiagos, prieš jų uždėjimą *epidermio* paviršių reikėtų suvilgyti dejonizuotu arba distiliuotu vandeniu, kad būtų geresnis bandomosios cheminės medžiagos sąlytis su *epidermio* paviršiumi. Jei įmanoma, kietąsias medžiagas reikėtų bandyti smulkių miltelių pavidalu. Kaip paskleidimo priemonė kartais gali būti naudojamas nailono tinklelis (žr. 3 priedėlį). Pasibaigus ekspozicijos laikotarpiui, bandomoji medžiaga turėtų būti kruopščiai nuplauta nuo *epidermio* vandeniniu buferiniu tirpalu arba 0,9 % NaCl. Priklausomai nuo naudojamo RhE bandymo modelio ekspozicijos laikotarpio trukmė yra nuo 15 min iki 60 min ir inkubavimo temperatūra – nuo 20 °C iki 37 °C. Šių ekspozicijos laikotarpių trukmė ir temperatūra optimizuojami kiekvienam atskiram RhE bandymo metodui ir rodo skirtingas savąsias bandymo modelių savybes (pvz., apsauginę funkciją) (žr. 3 priedėlį).
25. Atliekant kiekvieną atskirą bandymą, reikėtų naudoti vienalaikius neigiamus kontrolinius (NC) ir teigiamus kontrolinius (PC) ėminius, siekiant įrodyti, kad audinių gyvybingumas (naudojant NC), apsauginė funkcija ir gaunamas audinių jautris (naudojant PC) atitinka nustatytą istorinį priimtino intervalo. Siūlomas PC yra 5 % vandeninis SDS. Siūlomi NC yra vanduo arba fiziologinis tirpalas fosfatiname buferiniame tirpale.

Ląstelių gyvybingumo matavimai

26. Pagal bandymo procedūrą yra svarbu, kad gyvybingumas nebūtų matuojamas iš karto po ekspozicijos bandomajai cheminei medžiagai, bet praėjus pakankamai ilgam išplauto audinio inkubavimo po ekspozicijos laikotarpiui, jį laikant naujoje terpėje. Per šį laikotarpį sudaromos sąlygos atsigauti po nestipraus citotoksinio poveikio ir atsirasti aiškiam citotoksiniam poveikiui. Atliekant pagal šį bandymo metodą naudojamų RhE pagrįstų bandymo modelių optimizavimo bandymą, buvo nustatyta, kad optimalus inkubavimo po ekspozicijos laikotarpis yra 42 h (11) (12) (13) (14) (15).
27. MTT bandymas yra standartizuotas kiekybinis metodas, kuris turėtų būti taikomas ląstelių gyvybingumui matuoti pagal šį bandymo metodą. Jis yra suderinamas su trimačiu audinio modeliu. Audinio bandinys 3 h laikomas reikiamos koncentracijos MTT tirpale (pvz., 0,3–1 mg/ml). Veikiamas gyvybingų ląstelių, MTT virsta mėlynos spalvos formazanu. Į nuosėdas iškritęs mėlynos spalvos formazano reakcijos produktas ekstrahuojamas iš audinio tirpikliu (pvz., izopropanoliu, parūgštintu izopropanoliu), ir formazano koncentracija matuojama nustatant optinį tankį, kai bangos ilgis – 570 nm, filtro juostos plotis – ne didesnis kaip ± 30 nm, arba taikant HPLC ar UPLC ir spektrofotometrijos procedūrą (žr. 34 pastraipą) (36).

28. Bandomosios cheminės medžiagos optinės savybės arba jos cheminė sąveika su MTT (pvz., cheminės medžiagos gali slopinti arba pakeisti spalvos atsiradimą, taip pat ją sukelti) gali trukdyti atlikti bandymą, gaunant klaidingą gyvybingumo įvertį. Tai gali įvykti, kai tam tikra bandomoji medžiaga nevysiškai pašalinama iš audinio skalaujant arba kai ji prasiskverbia į *epidermį*. Jei bandomoji cheminė medžiaga tiesiogiai veikia MTT (pvz., yra MTT reduktorius), yra natūraliai spalvota arba virsta spalvota apdorojant audinį, reikėtų naudoti papildomus kontrolinius ėminius, kad būtų galima aptikti ir koreguoti bandomosios cheminės medžiagos trukdžius taikomam gyvybingumo matavimo metodui (žr. 29 ir 33 pastraipas). Tiesioginės MTT redukcijos ir spalvotų medžiagų trukdžių koregavimo išsamus aprašymas pateiktas į šį bandymo metodą įtrauktų keturių patvirtintų modelių SVP (32) (33) (34) (35).
29. Kiekvieną bandomąją cheminę medžiagą reikėtų įdėti į tik ką paruoštą MTT tirpalą, kad būtų galima identifikuoti tiesioginius MTT reduktorius. Jei MTT mišinys, kuriame yra bandomoji cheminė medžiaga, nusidažo mėlyna arba violetine spalva, daroma prielaida, kad bandomoji cheminė medžiaga tiesiogiai redukuoja MTT ir reikėtų atlikti papildomą veikimo tikrinimą su negyvais RhE audiniais, nepriklausomai nuo to, ar naudojama standartinė optinio tankio matavimo, ar HPLC arba UPLC ir spektrofotometrijos procedūra. Šiam papildomam veikimo tikrinimui naudojami negyvi audiniai, kurie turi tik liekamąjį metabolinį aktyvumą, bet absorbuoja bandomąją cheminę medžiagą panašiai kaip gyvieji audiniai. Kiekviena MTT redukuojanti bandomoji cheminė medžiaga dedama ant ne mažiau kaip dviejų negyvų ląstelių kartotinių bandinių, kuriems atliekama visa bandymo procedūra, kad būtų gauta nespecifinė MTT redukcija (NSMTT) (32) (33) (34) (35). Pakanka vieno NSMTT kontrolinio bandymo vienai bandomajai cheminei medžiagai, neatsižvelgiant į atliekamų nepriklausomų bandymų ir (arba) atskirų bandymų skaičių. Tikrasis audinio gyvybingumas apskaičiuojamas kaip audinių gyvybingumo procentinė vertė, gauta MTT reduktoriaus veikiamiems gyviesiems audiniams, minus nespecifinės MTT redukcijos procentinė vertė, gauta to paties MTT reduktoriaus veikiamiems negyviems audiniams ir apskaičiuota vienu metu su koreguojamu bandymu bandomo neigiamo kontrolinio ėminio atžvilgiu (% NSMTT).
30. Siekiant nustatyti galimus trukdžius, kuriuos kelia spalvotos bandomosios cheminės medžiagos arba tapusios spalvotomis dėl sąlyčio su vandeniu arba izopropanoliu, ir nuspręsti, ar būtini papildomi kontroliniai ėminiai, reikėtų atlikti bandomosios cheminės medžiagos tirpalo vandenyje (aplinkoje ekspozicijos metu) ir (arba) izopropanolyje (ekstrahavimo tirpale) spektrinę analizę. Jei vandenyje ir (arba) izopropanolyje ištirpinta bandomoji cheminė medžiaga absorbuoja šviesą 570 ± 30 nm srityje, reikėtų atlikti papildomus spalvotų kontrolinių ėminių bandymus arba naudoti HPLC ar UPLC ir spektrofotometrijos procedūrą, ir tokiu atveju šių kontrolinių ėminių nereikia (žr. 33 ir 34 pastraipas). Kai atliekamas standartinis optinio tankio (OT) matavimas, kiekviena trukdžius kelianti spalvota bandomoji cheminė medžiaga dedama ant ne mažiau kaip

dviejų gyvųjų audinių kartotinių bandinių, su kuriais atliekama visa bandymo procedūra, bet MTT inkubavimo pakopoje vietoj MTT tirpalo jie inkubuojami terpėje, kad būtų gautas nespecifinės spalvos (NSS_{gyv}) kontrolinis ėminys. Jei bandoma spalvota bandomoji cheminė medžiaga, turi būti atliekamas vienalaidis NSS_{gyv} kontrolinis bandymas ir kartotinių bandymų atveju atliekant kiekvieną bandymą (kiekvieną atskirą bandymą) turi būti atliekamas nepriklausomas NSS_{gyv} kontrolinis bandymas dėl gyviesiems audiniams būdingos biologinės įvairovės. Tikrasis audinio gyvybingumas apskaičiuojamas kaip audinių gyvybingumo procentinė vertė, gauta trukdančios bandomosios cheminės medžiagos veikiamiems gyviesiems audiniams, inkubuotiems MTT tirpale, minus nespecifinės spalvos procentinė vertė, gauta trukdančios bandomosios cheminės medžiagos veikiamiems gyviesiems audiniams, inkubuotiems terpėje be MTT, ir bandomiems vienu metu su koreguojamu bandymu ($\% NSS_{gyv}$).

31. Bandomosioms cheminėms medžiagoms, kurios identifikuojamos kaip tiesioginiai MTT reduktoriai (žr. 29 pastraipą) ir kelia spalvos trukdžius (žr. 30 pastraipą) be NSMTT ir NSS_{gyv} kontrolinių ėminių, aprašytų pirmiau pateiktose pastraipose, reikės trečiojo kontrolinių ėminių rinkinio, kai atliekamas standartinis optinio tankio (OT) matavimas. Paprastai atlikti MTT bandymą trukdo tamsios spalvos (pvz., mėlynos, violetinės, juodos) bandomosios cheminės medžiagos, nes jų pačių spalva trukdo įvertinti jų gebėjimą tiesiogiai redukuoti MTT, kaip aprašyta 29 pastraipoje. Šios bandomosios cheminės medžiagos gali jungtis prie gyvųjų ir negyvų audinių, todėl naudojant NSMTT kontrolinį ėminį gali būti koreguojama ne tik galima tiesioginė MTT redukcija, bet ir spalvos trukdžiai dėl bandomosios cheminės medžiagos prisijungimo prie negyvų audinių. Todėl galėtų būti dvigubas spalvos trukdžių koregavimas, nes atliekant NSS_{gyv} kontrolinį bandymą jau koreguojami spalvos trukdžiai dėl bandomosios cheminės medžiagos prijungimo gyvaisiais audiniais. Siekiant išvengti galimo dvigubo spalvos trukdžių koregavimo, reikia atlikti trečiąjį negyvų audinių nespecifinės spalvos (NSS_{negyv}) kontrolinį bandymą. Naudojant šį papildomą kontrolinį ėminį, bandomoji cheminė medžiaga dedama ant ne mažiau kaip dviejų negyvo audinio kartotinių bandinių, su kuriais atliekama visa bandymo procedūra, bet MTT inkubavimo pakopoje vietoje MTT tirpalo jie inkubuojami terpėje. Pakanka vieno NSS_{negyv} kontrolinio bandymo vienai bandomajai cheminei medžiagai, neatsižvelgiant į atliekamų nepriklausomų bandymų ir (arba) atskirų bandymų skaičių, bet jis turėtų būti atliekamas vienu metu su NSMTT kontroliniu bandymu ir, jei įmanoma, su ta pačia audinio partija. Tikrasis audinio gyvybingumas apskaičiuojamas kaip audinių gyvybingumo procentinė vertė, gauta bandomosios cheminės medžiagos veikiamiems gyviesiems audiniams, minus $\% NSS_{gyv}$, plus nespecifinės spalvos procentinė vertė, gauta trukdančios bandomosios cheminės medžiagos veikiamiems negyviems audiniams, inkubuotiems terpėje be MTT, ir apskaičiuota vienu metu su koreguojamu bandymu bandomo neigiamo kontrolinio ėminio atžvilgiu ($\% NSS_{negyv}$).

32. Svarbu pažymėti, kad audinio ekstraktui gauti rodmenys dėl nespecifinės MTT redukcijos ir nespecifinės spalvos trukdžių gali būti didesni nei spektrofotometro tiesiškumo intervalas. Atsižvelgdama į tai, kiekviena laboratorija prieš pradėdama bandyti bandomąsias chemines medžiagas reglamentavimo tikslais, turėtų nustatyti savo spektrofotometro tiesiškumo intervalą, naudodama prekyboje esantį MTT formazaną (CAS Nr. 57360-69-7). Atliekant standartinį optinio tankio (OT) matavimą spektrofotometru, galima įvertinti tiesioginius MTT reduktorius ir spalvos trukdžius sukeliančias bandomąsias chemines medžiagas, jei audinių ekstraktų OT, gauti bandomajai cheminei medžiagai be koregavimo dėl tiesioginės MTT redukcijos ir (arba) spalvos trukdžių, yra spektrofotometro tiesiškumo intervale arba jei bandomajai cheminei medžiagai gauta nekoreguota gyvybingumo procentinė dalis jau yra $\leq 50\%$. Vis dėlto, į bandomosioms cheminėms medžiagoms gautus neigiamų kontrolinių ėminių % NSMTT ir (arba) % $NSS_{gyv} \geq 50\%$ rezultatus reikėtų žiūrėti atsargiai, nes tai yra ribinės vertės, pagal kurias atskiriamos klasifikuojamos ir neklasifikuojamo cheminės medžiagos (žr. 36 pastraipą).
33. Spalvotoms bandomosioms cheminėms medžiagoms, kurios nesuderinamos su standartiniu optinio tankio (OT) matavimu dėl per didelių trukdžių MTT bandymui, galima naudoti alternatyvią HPLC arba UPLC ir spektrofotometrijos procedūrą MTT formazanui nustatyti (žr. 34 pastraipą) (36). Naudojant HPLC arba UPLC ir spektrofotometrijos sistemą, MTT formazaną galima atskirti nuo bandomosios cheminės medžiagos prieš jo kiekybinį nustatymą (36). Dėl šios priežasties NSS_{gyv} arba NSS_{negyv} kontrolinių ėminių niekuomet nereikia, kai naudojama HPLC/UPLC ir spektrofotometrija, nepriklausomai nuo bandomos cheminės medžiagos. Vis dėlto NSMTT kontrolinius ėminius reikėtų naudoti, jei įtariama, kad bandomoji cheminė medžiaga tiesiogiai redukuoja MTT arba jos spalva trukdo vertinti jos gebėjimą tiesiogiai redukuoti MTT (kaip aprašyta 29 pastraipoje). Jei MTT formazanui matuoti naudojama HPLC arba UPLC ir spektrofotometrija, audinio gyvybingumo procentinė dalis skaičiuojama kaip MTT formazano smailės ploto, gauto bandomąja chemine medžiaga veikiams gyviesiems audiniams, ir MTT formazano smailės ploto, gauto vienalaikiam neigiamam kontroliniam ėminiui, procentais išreikštas santykis. Jei bandomosios cheminės medžiagos gali tiesiogiai redukuoti MTT, tikrasis audinio gyvybingumas apskaičiuojamas kaip audinių gyvybingumo procentinė vertė, gauta bandomosios cheminės medžiagos veikiams gyviesiems audiniams, minus % NSMTT. Pagaliau reikėtų pažymėti, kad negalima vertinti tiesioginių MTT reduktorių, kurie taip pat gali kelti spalvos trukdžius ir kurie po apdorojimo lieka audiniuose ir taip stipriai redukuoja MTT, kad gauti bandomų audinių ekstraktų OT (atliekant standartinį OT matavimą) arba smailių plotai (naudojant UPLC arba HPLC ir spektrofotometriją) nepatenka į spektrofotometro tiesiškumo intervalą, nors tikimasi, kad tai būtų tik labai retas reiškinys.
34. HPLC arba UPLC ir spektrofotometriją MTT formazano matavimams taip pat galima naudoti visų tipų bandomosioms cheminėms medžiagoms (spalvotoms, nespalvotoms,

MTT reduktoriams ir ne reduktoriams) (36). Dėl HPLC arba UPLC ir spektrofotometrijos sistemų įvairovės HPLC arba UPLC ir spektrofotometrijos sistemos tinkamumą reikėtų įrodyti prieš pradedant sistemą naudoti audinių ekstraktų MTT formazano kiekybiniam nustatymui, ir ji turi atitikti standartinių tinkamumo parametrų rinkinio priimtumo kriterijus, pagrįstus aprašytais JAV maisto ir vaistų administracijos rekomendacijose pramonei dėl biologinės analizės metodo patvirtinimo (36) (37). Šie pagrindiniai parametrai ir priimtumo kriterijai patekti 4 priedėlyje. Jei HPLC arba UPLC ir spektrofotometrijos sistema atitinka 4 priedėlyje nustatytus priimtumo kriterijus, ji laikoma tinkama ir paruošta MTT formazanui matuoti šiame bandymo metode aprašytomis bandymo sąlygomis.

Priimtumo kriterijai

35. Taikant kiekvieną patvirtintus RhE modelius naudojančią bandymo metodą (žr. 23 pastraipą), neigiama kontroline medžiaga apdorotiems ėminiams turėtų būti gautos OT vertės, rodančios audinių kokybę po jų gabenimo, priėmimo veiksmų ir visų protokolo procesų. Kontrolinių ėminių OT vertės neturėtų būti mažesnės nei istoriškai nustatytos ribos. PC medžiaga, t. y. 5 % vandeniniu SDS tirpalu, apdoroti audiniai turėtų rodyti gebėjimą reaguoti į dirginančią cheminę medžiagą bandymo metodo sąlygomis (žr. 3 priedėlį ir papildomai informacijai gauti – į šias bandymų gaires įtrauktų keturių modelių SVP (32) (33) (34) (35)). Susiję ir tinkami kintamumo tarp audinio kartotinių bandinių matai, t. y. standartiniai nuokrypiai (SN) turėtų atitikti naudotam bandymo modeliui nustatytas priimtumo ribas (žr. 3 priedėlį).

Rezultatų aiškinimas ir prognozavimo modelis

36. Gautos kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos OT vertės gali būti naudojamos gyvybingumo procentinei daliai skaičiuoti, palyginti su neigiamu kontroliniu ėminiu, kuriam gautas gyvybingumas prilyginamas 100 %. Jei naudojama HPLC arba UPLC ir spektrofotometrija, audinio gyvybingumo procentinė dalis skaičiuojama kaip MTT formazano smailės ploto, gauto bandomąja chemine medžiaga veikiams gyviesiems audiniams, ir MTT formazano smailės ploto, gauto vienalaikiam neigiamam kontroliniam ėminiui, procentais išreikštas santykis. Ribinė ląstelių gyvybingumo procentinės dalies vertė, skirianti dirginančias bandomąsias chemines medžiagas nuo neklasifikuojamų, ir statistinė (-ės) procedūra (-os), taikyta (-os) rezultatams įvertinti ir dirginančioms cheminėms medžiagoms identifikuoti, turėtų būti aiškiai nustatytos, dokumentuotos ir įrodytos kaip tinkamos (informacija pateikta bandymo modelių SVP). Toliau pateiktos dirginimui prognozuoti naudojamos ribinės vertės:
- Bandomoji cheminė medžiaga identifikuojama kaip medžiaga, kurią reikia klasifikuoti ir ženklinti pagal JT GHS ir CLP (1 arba 2 kategorijos), jei vidutinė audinio gyvybingumo procentinė dalis po ekspozicijos ir inkubavimo po apdorojimo yra mažesnė kaip arba lygi ($\leq$) 50 %. Kadangi taikant į šį bandymo metodą įtrauktus RhE bandymo modelius

negalima atskirti JT GHS ir CLP 1 ir 2 kategorijų, reikia turėti papildomos informacijos apie odos ėsdinimą, kad būtų galima spręsti dėl jos galutinio klasifikavimo (taip pat žr. EBPO rekomendacinį dokumentą dėl IATA (3)). Jei nustatoma, kad bandomoji cheminė medžiaga nėra ėsdinanti (pvz., pagal B.40, B.40bis arba B.65 bandymo metodus), ir audinio gyvybingumas po ekspozicijos bei inkubavimo po apdorojimo yra mažesnis arba lygus ($\leq$) 50 %, bandomoji cheminė medžiaga laikoma dirginančia odą pagal JT GHS ir CLP 2-ąją kategoriją.

- Priklausomai nuo valstybių narių reglamentavimo sistemos, bandomoji cheminė medžiaga gali būti laikoma odos nedirginančia pagal JT GHS ir CLP *be kategorijos*, jei audinio gyvybingumas po ekspozicijos ir inkubavimo po apdorojimo yra didesnis kaip ($>$) 50 %.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Duomenys

37. Lentelėse turėtų būti pateikti kiekvieno atskirų audinio kartotinių bandinių atskiro bandymo duomenys (pvz., OT vertės ir apskaičiuotų ląstelių gyvybingumo procentinių verčių duomenys kiekvienai bandomajai cheminei medžiagai, įskaitant klasifikavimą), įtraukiant kartotinių bandymų duomenis, jei reikia. Be to, ataskaitoje reikėtų pateikti kiekvieno atskiro bandymo vidutinę vertę $\pm$ SN. Ataskaitoje reikėtų nurodyti kiekvienai bandomajai cheminei medžiagai stebimas spalvotų bandomųjų cheminių medžiagų sąveikas su MTT reagentu.

Bandymo ataskaita

38. Į bandymo ataskaitą turėtų būti įtraukta ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga ir kontrolinės cheminės medžiagos

- Vienkomponentė medžiaga: cheminio identifikavimo duomenys, pvz., IUPAC ar CAS pavadinimas, CAS numeris, SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė, grynumas, cheminis priemaišų pavadinimas, jei tinka bei praktiškai įmanoma ir kt.;
- daugiakomponentė medžiaga, UVCB ir mišinys: kuo išsamesnis sudedamųjų dalių apibūdinimas, nurodant cheminį pavadinimą (žr. pirmiau), kiekybinį paplitimą ir būdingas fizikines ir chemines savybes.
- fizinė išvaizda, tirpumas vandenyje ir papildomos būdingos fizikinės ir cheminės savybės;
- šaltinis, partijos numeris, jei yra;
- bandomosios ir (arba) kontrolinių cheminių medžiagų apdorojimas prieš bandymą, jei tai atliekama (pvz., šildymas, malimas);
- bandomosios cheminės medžiagos stabilumas, naudojimo pabaigos data arba pakartotinės analizės data, jei žinoma;

- laikymo sąlygos.

naudotas RhE modelis ir protokolai (ir pasirinkimo pagrindimas, jei tinka)

Bandyto sąlygos

- naudotas RhE modelis (įskaitant partijos numerį);
- informacija apie matavimo prietaisą (pvz., spektrofotometro) kalibravimą, bangos ilgį ir dažnių juostos plotį (jei tinka), naudojamą MTT formazano kiekybiniam nustatymui, ir matavimo prietaiso tiesiškumo intervalą; MTT formazano kiekybinio nustatymo metodo aprašymas;
- HPLC arba UPLC ir spektrofotometrijos sistemos tinkamumo įvertinimo aprašymas, jei tinka; visa su konkrečiu RhE modeliu susijusi pagalbinė informacija, įskaitant jo naudojimo charakteristikas. Ją turi sudaryti šie ir kiti duomenys:
 - i) gyvybingumas;
 - ii) apsauginė funkcija;
 - iii) morfologija;
 - iv) atkuriamumas ir prognozuojamumas;
 - v) modelio kokybės kontrolei naudojamos medžiagos;
- nuoroda į modelio istorinius duomenis. Turėtų būti įtraukti šie ir kiti duomenys: - kokybės kontrolės duomenų priimtinumai atsižvelgiant į anksčiau sukauptus partijos duomenis;
- bandymo metodo taikymo kvalifikacijos įrodymas prieš pradėdant jį taikyti įprastiniu būdu, bandant kvalifikacijai įrodyti skirtas medžiagas.

Bandyto procedūra:

- naudojamos bandymo procedūros išsamūs duomenys (įskaitant plovimo procedūras, atliekamas pasibaigus ekspozicijos laikotarpiui); bandomosios cheminės medžiagos ir naudojamų kontrolinių cheminių medžiagų dozės;
- ekspozicijos laikotarpio ir poekspozicinio inkubavimo laikotarpio trukmė ir temperatūra;
- su tiesioginiais MTT reduktoriais ir (arba) spalvotomis bandomosiomis cheminėmis medžiagomis naudojamų kontrolinių medžiagų nuoroda,
- audinių kartotinių bandinių, naudojamų bandomajai cheminei medžiagai ir kontroliniams ėminiams (teigiamam, neigiamam kontroliniams ėminiams, NSMTT, NSS_{gyv} ir NSS_{negyv}, jei tinka);
- taikomų sprendimo priėmimo ir (arba) prognozavimo kriterijų, pagrįstų RhE modeliu, aprašymas;

- visų bandymo procedūros pakeitimų aprašymas (įskaitant plovimo procedūras).

Atskiro bandymo ir bandymo priimtino kriterijai:

- Teigiamų ir neigiamų kontrolinių ėminių vidutinės vertės bei priimtino intervalai, pagrįsti istoriniais duomenimis; priimtinas kintamumas tarp audinio kartotinių bandinių, gautas teigiamiems ir neigiamiems kontroliniams ėminiams;
- priimtinas kintamumas tarp audinio kartotinių bandinių, gautas bandomajai cheminei medžiagai.

Rezultatai:

- lentelėse pateikti atskiros bandomosios cheminės medžiagos kiekvieno atskiro bandymo ir kiekvieno kartotinio bandinio matavimų duomenys, įskaitant MTT formazano OT arba smailės plotą, audinio gyvybingumo procentinę dalį, vidutinę audinio gyvybingumo procentinę dalį ir standartinę nuokrypį;
- jei tinka, kontrolinių ėminių, naudotų tiesioginiams MTT reduktoriams ir (arba) spalvotoms bandomosioms cheminėms medžiagoms, rezultatai, įskaitant MTT formazano OT arba smailės plotą, % NSMTT, % NSS_{gyv}, % NSS_{negyv}, SN ir galutinę tikslią audinio gyvybingumo procentinę dalį;
- rezultatai gauti bandomajai (-ioms) cheminei (-ėms) medžiagai (-oms) ir kontrolinėms cheminėms medžiagoms, atsižvelgiant į nustatytus atskiro bandymo ir bandymo priimtino kriterijus;
- kitų pastebėtų reiškinių aprašymas;
- gautas klasifikavimas su nuoroda į naudotą prognozavimo modelį ir (arba) į taikytus sprendimo priėmimo kriterijus.

Rezultatų aptarimas

Išvados

LITERATŪRA

- (1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Pateikta 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. Pateikta https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication/ESAC31_skin-irritation-statement_20090922.pdf
- (3) OECD (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 203), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (4) Šio priedo B.4 skyrius. Ūmus odos dirginimas, ėsdinimas.
- (5) Šio priedo B.40 skyrius. Odos suardymas *in vitro*. Odos sluoksnio elektrinės varžos (OSEV) bandymas.
- (6) Šio priedo B.40bis skyrius. Odos ėsdinimas *In Vitro*. Rekonstruoto žmogaus epidermio (RHE) bandymo metodas.
- (7) Šio priedo B.65 skyrius, *In Vitro* odos ėsdinimo naudojant membraninę pertvarą metodas.
- (8) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human *Epidermis* (RhE) Test Methods for Skin Irritation in Relation to TG 439. Environment, health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 220). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (9) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (10) Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J. M. 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. Pateikta https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC26_statement_SkinIrritation_20070525_C.pdf
- (21) EURL-ECVAM. (2007). Performance Standards for Applying Human Skin Models to *In Vitro* Skin Irritation Testing. *N. B. Tai pradiniai naudojimo charakteristikų standartai, naudoti dviem bandymo metodams patvirtinti. Šie naudojimo charakteristikų standartai nebeturėtų būtų naudojami, nes šiuo metu yra prieinama atnaujinta versija* (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), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (27) OECD (2011). Peer Review Report of Validation of the Skin Irritation Test Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 155), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (28) Kojima, H., Ando, Y., Idehara, K., Katoh, M., Kosaka, T., Miyaoka, E., Shinoda, S., Suzuki, T., Yamaguchi, Y., Yoshimura, I., Yuasa, A., Watanabe, Y. 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. May 2001. Pateikta [<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). *N. B. Tai dabartinė ECVAM naudojimo charakteristikų standartų versija, atnaujinta 2009 m. atsižvelgiant į JT GHS įgyvendinimą. Šie naudojimo charakteristikų standartai nebeturėtų būti naudojami, nes šiuo metu yra prieinama atnaujinta versija (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) Europos Komisija (2001). 2001 m. rugpjūčio 6 d. Komisijos direktyva 2001/59/EB, dvidešimt aštuntą kartą derinanti su technikos pažanga Tarybos direktyvą 67/548/EEB dėl įstatymų ir kitų teisės aktų, reglamentuojančių pavojingų medžiagų klasifikavimą, pakavimą ir ženklinimą etiketėmis, suderinimo, *Europos Sąjungos oficialusis leidinys* L 225, 1–333.

1 priedėlis

APIBRĖŽTYS

Tikslumas – bandymo metodo rezultatų ir patvirtintų pamatinių verčių sutapimo artumas. Tikslumas yra bandymo metodo taikymo charakteristikų matas ir vienas iš tinkamumo aspektų. Terminas dažnai vartojamas kaip lygiavertis terminui „sutapimas“ ir reiškia tinkamų bandymo metodo rezultatų dalį (9).

Ląstelių gyvybingumas – bendrojo ląstelių populiacijos aktyvumo, pvz., ląstelių mitochondrinių dehidrogenazių gebėjimo redukuoti gyvųjų audinių dažiklį MTT ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolinio bromidą, tiazolilo mėlyną]), matavimo parametras, kuris, atsižvelgiant į matuojamą vertinamąją baigtį ir taikomą bandymo schemą, yra susijęs su suminių gyvųjų ląstelių kiekiu ir (arba) jų gyvybingumu.

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

Sutapimas – bandymo modelių, kuriais gaunamas su kategorija susijęs rezultatas, naudojimo charakteristikų matas ir vienas iš tinkamumo aspektų. Terminas kartais vartojamas kaip lygiavertis terminui „tikslumas“ ir apibrėžiamas kaip dalis visų bandytų cheminių medžiagų, kurios tiksliai klasifikuojamos kaip teigiamos arba neigiamos. Sutapimas labai priklauso nuo tiriamos bandomosios cheminės medžiagos tipui gautų teigiamų rezultatų dalies (9).

ET₅₀ – gali būti įvertinta kaip ekspozicijos trukmė, per kurią ląstelių gyvybingumas sumažėja 50 % jas veikiant tam tikros pastovios koncentracijos palyginamąja chemine medžiaga, taip pat žr. IC₅₀.

GHS (Jungtinių Tautų (JT) visuotinai suderinta cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklinimo sistema) – sistema, kurioje pateikiamas cheminių medžiagų (medžiagų ir mišinių) klasifikavimas pagal standartizuotus fizikinių pavojų, pavojų sveikatai bei aplinkai tipus ir nagrinėjami atitinkami informaciniai elementai, pvz., piktogramos, signaliniai žodžiai, pavojingumo frazės, atsargumo frazės ir saugos duomenų lapai, kad būtų galima informuoti apie medžiagų neigiamą poveikį, siekiant apsaugoti žmones (įskaitant darbuotojus, darbininkus, vežėjus, vartotojus ir avarijų likvidatorius) ir aplinką (1).

HPLC – efektyvioji skysčių chromatografija.

IATA – integruotasis bandymo ir vertinimo metodas.

IC₅₀ – gali būti įvertinta nustatant palyginamosios cheminės medžiagos koncentraciją, kuriai esant audinių gyvybingumas sumažėja 50 % (IC₅₀) po tam tikros ekspozicijos trukmės, taip pat žr. ET₅₀.

Neribota dozė – ant *epidermio* dedamas bandomosios cheminės medžiagos kiekis, didesnis už kiekį, kurio reikia visiškai ir tolygiai padengti *epidermio* paviršių.

Mišinys – dviejų ar daugiau cheminių medžiagų mišinys ar tirpalas.

Vienkomponentė medžiaga – medžiaga, kurią apibrėžia jos kiekybinė sudėtis, kai vienas pagrindinis komponentas sudaro ne mažiau kaip 80 % (masės).

MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolinio bromidas; tiazolilo mėlynasis, tetrazolinio bromidas.

Daugiakomponentė medžiaga – medžiaga, kurią apibrėžia jos kiekybinė sudėtis, kai daugiau kaip vieno pagrindinio komponento koncentracija $\geq 10\%$ (masės) ir $< 80\%$ (masės). Daugiakomponentė medžiaga yra gamybos proceso rezultatas. Skirtumas tarp mišinio ir daugiakomponentės medžiagos yra tas, kad mišinys gaunamas sumaišant dvi medžiagas arba daugiau nevykstant cheminei reakcijai. Daugiakomponentė medžiaga yra cheminės reakcijos rezultatas.

NSS_{negyv} – negyvų audinių nespecifinė spalva.

NSS_{gyv} – gyvųjų audinių nespecifinė spalva.

NSMTT – nespecifinė MTT redukcija.

Naudojimo charakteristikų standartai (angl. PS) – patvirtintu bandymo metodu pagrįsti standartai, kurie yra pagrindas įvertinti mechanizmo ir funkciniu požiūriu panašaus siūlomo bandymo metodo palyginamumą. Įtraukti: i) esminiai bandymo metodo komponentai; ii) etaloninių cheminių medžiagų, parinktų iš cheminių medžiagų, naudojamų patvirtinto bandymo metodo priimtinioms naudojimo charakteristikoms įrodyti, būtinasis sąrašas; ir iii) palyginamieji tikslumo bei patikimumo lygiai, pagrįsti gautais patvirtintam bandymo metodui, kuriuos siūlomas bandymo metodas turėtų rodyti, kai yra įvertinamas naudojant būtinąjį etaloninių cheminių medžiagų sąrašą (9).

Teigiamas kontrolinis (PC) ėminys – kartotinis ėminys, turintis visus bandymo sistemos komponentus ir apdorotas chemine medžiaga, kuri yra žinoma kaip sukelianti teigiamą atsaką. Siekiant užtikrinti galimybę vertinti teigiamo kontrolinio ėminio atsako kintamumą per tam tikrą laiką, teigiamas atsakas neturėtų būti per stiprus.

Tinkamumas – santykio tarp bandymo ir tiriamo poveikio apibūdinimas bei bandymo reikšmingumo ir naudingumo siekiant tam tikro tikslo nustatymas. Tai yra atliekant bandymą tiriamo biologinio poveikio matavimo ar prognozavimo tikslumo laipsnis. Tinkamumas aprėpia bandymo metodo tikslumo (atitikties) aspektą (9).

Patikimumas – pagal tą patį protokolą atliekamo bandymų metodo, ilgą laiką taikomo laboratorijose ir tarp laboratorijų, atkuriamumo laipsnio matas. Jis vertinamas skaičiuojant atkuriamumą laboratorijoje ir tarp laboratorijų (9).

Pakaitinis bandymas – bandymas, kuris skirtas pakeisti bandymą, paprastai naudojamą ir pripažintą tinkamu pavojui identifikuoti ir (arba) rizikai vertinti, ir kuris nustatytas kaip užtikrinantis lygiavertę ar geresnę žmonių ar gyvūnų sveikatos arba aplinkos apsaugą, kaip tinka, palyginti su pripažintu bandymu esant visoms įmanomoms bandymo aplinkybėms ir

cheminėms medžiagoms (9).

Atskiras bandymas – vienos arba daugiau bandomųjų cheminių medžiagų bandymas vienu metu su neigiamu kontroliniu ėminiu ir teigiamu kontroliniu ėminiu.

Jautris – visų teigiamų ir (arba) veikliųjų cheminių medžiagų, kurios yra tinkamai klasifikuotos atliekant bandymą, dalis. Jis yra bandymo metodo, kuriuo gaunami su kategorija susiję rezultatai, tikslumo matas ir svarbus aspektas vertinant bandymo metodo tinkamumą (9).

Odos dirginimas *in vivo* – grįžtamasis odos pažeidimas po bandomosios cheminės medžiagos uždėjimo trumpiau kaip 4 valandoms. Odos dirginimas yra vietinis paveiktos odos audinio atsakas ir atsiranda greitai po stimuliavimo (38). Jo priežastis – vietinis uždegiminis atsakas, ištraukiant įgimtą (nespecifinę) odos audinio imuninei sistemai. Jo pagrindinė savybė – grįžtamasis procesas vykstant uždegiminiams atsakams ir esant su uždegiminiu procesu susijusiems būdingiems klinikiniams dirginimo požymiams (eritemai, edemai, niežėjimui ir skausmui).

Specifiškumas – visų neigiamų ar neveikliųjų cheminių medžiagų, kurios yra tinkamai klasifikuotos atliekant bandymą, dalis. Jis yra bandymo metodo, kuriuo gaunami su kategorija susiję rezultatai, tikslumo matas ir svarbus aspektas vertinant bandymo metodo tinkamumą (9).

Medžiaga – natūralus arba gamybos proceso metu gautas cheminis elementas ir cheminių elementų junginys, įskaitant priedus, reikalingus jo stabilumui išlaikyti, ir priemaišas, atsirandančias gaminant, išskyrus tirpiklius, kurie gali būti atskirti nedarant poveikio cheminės medžiagos stabilumui ar nepakeičiant jos sudėties;

Bandomoji cheminė medžiaga – taikant šį metodą bandoma medžiaga arba mišinys.

UPLC – ypač efektyvi skysčių chromatografija.

UVCB – nežinomos ar kintamos sudėties medžiagos, sudėtingųjų reakcijų produktai ar biologinės medžiagos.

2 priedėlis

BANDYMO MODELIAI, ĮTRAUKTI Į ŠĮ BANDYMO METODĄ

Nr.	Bandymo modelio pavadinimas	Patvirtinimo tyrimo tipas	Nuorodos
1	EpiSkin™	Išsamus perspektyvusis patvirtinimo tyrimas (2003–2007 m.). Šio modelio komponentai buvo naudojami pradinio ir atnaujinto ECVAM PS bandymo metodo komponentams nustatyti (39) (40) (21)*. Be to, metodo duomenys, susiję su neklasifikuojamų ir klasifikuojamų medžiagų identifikavimu, buvo pagrindiniai duomenys nustatant pradinio PS specifiškumo ir jautrio vertes*.	(2) (10) (11) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (23) (32) (39) (40)
2	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	EpiDerm™ (original): Iš pradžių buvo atliktas bandymo modelio išsamus perspektyvusis patvirtinimo tyrimas kartu su Nr. 1, tirtu 2003–2007 m. Šio modelio komponentai buvo naudojami pradinio ir atnaujinto ECVAM PS bandymo metodo komponentams nustatyti (39) (40) (21)*. EpiDerm™ SIT (EPI-200): Modifikuotas pradinis EpiDerm™ buvo patvirtintas naudojant pradinius ECVAM PS (21) 2008 m.*	(2) (10) (12) (13) (15) (16) (17) (18) (20) (21) (23) (33) (39) (40) (2) (21) (22) (23) (33)
3	SkinEthic™ RHE	Patvirtinimo tyrimas, pagrįstas pradiniais ECVAM naudojimo charakteristikų standartais (21) 2008 m.*	(2) (21) (22) (23) (31)
4	LabCyte EPI-MODEL24 SIT	Patvirtinimo tyrimas (2011–2012 m.), pagrįstas EBPO TG 439 naudojimo charakteristikų standartais (8), kurie yra pagrįsti atnaujintais ECVAM PS* (39) (40).	(24) (25) (26) (27) (28) (35) (39) (40) ir šių TG PS (8)*

*) Pradiniai ECVAM naudojimo charakteristikų standartai (PS) (21) buvo sukurti 2007 m. baigus perspektyvųjį patvirtinimo tyrimą (16), kuriame buvo vertinamas bandymo modelių Nr. 1 ir 2 veiksmingumas pagal klasifikavimo sistemą, aprašyta ES Pavojingų medžiagų direktyvos 28 keitinyje (41). 2008 m. įvedus JT GHS (1) ir ES CLP, klasifikuojamų ir neklasifikuojamų medžiagų atskyrimo ribinė vertė tuo pačiu buvo paslinkta nuo *in vivo* balo 2.0 iki 2.3. Siekiant prisitaikyti prie šio iš dalies pakeisto reglamentavimo reikalavimo, 2009 m. buvo atnaujintos ECVAM PS tikslumo vertės ir etaloninių cheminių medžiagų sąrašas (2) (39) (40). Pradinis ir atnaujintas PS buvo daugiausia pagrįsti modelių Nr. 1 ir 2 (16) duomenimis, bet papildomai naudoti duomenys apie etalonines chemines medžiagas iš modelio Nr. 3. Atnaujintas ECVAM PS buvo naudojamas 2010 m. nustatant su šiomis TG susijusį PS (8). Šiame bandymo metode PPM laikomas EpiSkin™ dėlto, kad jis buvo naudojamas kuriant visus PS kriterijus. Išsami informacija apie patvirtinimo tyrimus, duomenų rinkimą ir su JT GHS ir CLP įgyvendinimu susijusių būtinų PS pakeitimų pagrindimas yra pateikta atitinkamų EBPO TG 439 ECVAM/BfR aiškinamajame informaciniame dokumente (23).

SIT: odos dirginimo bandymas (angl. *Skin Irritation Test*);

RHE: rekonstruotas žmogaus epidermis (angl. *Reconstructed Human Epidermis*).

3 priedėlis

Į ŠĮ BANDYMO METODĄ ĮTRAUKTŲ BANDYMO MODELIŲ SPECIFINIAI PROTOKOLO PARAMETRAI

RhE modelių protokolai yra labai panašūs, visų pirma visi naudoja 42 h inkubavimo po apdorojimo laikotarpį (32) (33) (34) (35). Skiriasi iš esmės trys parametrai, susiję su bandymų modelių skirtingomis apsauginėmis funkcijomis, būtent: A) parengiamojo inkubavimo trukmė ir tūris, B) bandomųjų cheminių medžiagų uždėjimas ir C) tūris po inkubavimo.

	EpiSkin™ (SM)	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	SkinEthic RHE™	LabCyte EPI-MODEL24 SIT
A) Parengiamasis inkubavimas				
Inkubavimo trukmė	18–24 h	18–24 h	< 2 h	15–30 h
Vidutinis tūris	2 ml	0,9 ml	0,3 ml arba 1 ml	0,5 ml
B) Bandomosios cheminės medžiagos uždėjimas				
Skysčiai	10 µl (26 µl/cm²)	30 µl (47 µl/cm²)	16 µl (32 µl/cm²)	25 µl (83 µl/cm²)
Kietosios medžiagos	10 mg (26 mg/cm²) + DV (5 µl)	25 mg (39 mg/cm²) + DPBS (25 µl)	16 mg (32 mg/cm²) + DV (10 µl)	25 mg (83 mg/cm²) + DV (25 µl)
Nailono tinklelio naudojimas	Nenaudojamas	Jei būtina	Naudojamas	Nenaudojamas
Suminė uždėjimo trukmė	15 min	60 min	42 min	15 min
Uždėjimo temperatūra	T _{kamb}	a) T _{kamb} , 25 min b) 37 °C, 35 min	T _{kamb}	T _{kamb}
C) Tūris po inkubavimo				
Vidutinis tūris	2 ml	0,9 ml × 2	2 ml	1 ml
D) Didžiausias priimtinas kintamumas				
Audinio kartotinių bandinių standartinis nuokrypis	SN18	SN18	SN18	SN18

T_{kamb}: kambario temperatūra;

DV: distiliuotas vanduo;

DPBS: Dulbecco fiziologinis tirpalas fosfatiniame buferiniame tirpale.

4 priedėlis

HPLC ARBA UPLC IR SPEKTROFOTOMETRIJOS SISTEMOS, SKIRTOS IŠ RHE AUDINIO EKSTRAHUOTAM MTT FORMAZANUI MATUOTI, TINKAMUMO ĮVERTINIMO PAGRINDINIAI PARAMETRAI IR PRIIMTINUMO KRITERIJAI

Parametras	Protokolas, parengtas pagal FDA rekomendacijas (36) (37)	Priimtimumo kriterijai
Atrankumas	Izopropanolio, gyvųjų audinių tuščiojo ėminio (neapdorotų gyvųjų audinių izopropanolio ekstrakto), negyvų audinių tuščiojo ėminio (neapdorotų negyvų audinių izopropanolio ekstrakto) analizė	$\text{Plotas}_{\text{trukdžių}} \leq 20 \%$ $\text{Plotas}_{\text{LLOQ}}^1$
Preciziškumas	Kokybės kontrolės ėminiai (t. y. MTT formazano 1,6 µg/ml, 16 µg/ml ir 160 µg/ml tirpalas) izopropanolyje (n = 5)	$\text{VK} \leq 15 \%$ arba $\leq 20 \%$ dėl LLOQ
Tikslumas	Kokybės kontrolės ėminiai izopropanolyje (n = 5)	$\% \text{ Nuokr.} \leq 15 \%$ arba $\leq 20 \%$ dėl LLOQ
Matricos efektas	Kokybės kontrolės medžiagos gyvųjų audinių tuščiajame ėminyje (n = 5)	$85 \% \leq \text{matricos efektas} \% \leq 115 \%$
Pernaša	Izopropanolio analizė po ULOQ ² etaloninio tirpalo	$\text{Plotas}_{\text{trukdžių}} \leq 20 \%$ $\text{Plotas}_{\text{LLOQ}}$
Atkuriamumas (vienos dienos)	3 nepriklausomos kalibravimo kreivės (gautos nuosekliai skiedžiant 6 kartus MTT formazaną izopropanolyje santykiu 1/3, pradedant ULOQ, t. y. 200 µg/ml); Kokybės kontrolės ėminiai izopropanolyje (n = 5)	Kalibravimo kreivės: $\% \text{ Nuokr.} \leq 15 \%$ arba $\leq 20 \%$ dėl LLOQ
Atkuriamumas (tarp dienų)	1 diena: 1 kalibravimo kreivė ir kokybės kontrolės ėminiai izopropanolyje (n = 3) 2 diena: 1 kalibravimo kreivė ir kokybės kontrolės ėminiai izopropanolyje (n = 3) 3 diena: 1 kalibravimo kreivė ir kokybės kontrolės ėminiai izopropanolyje (n = 3)	
MTT formazano RhE audinio ekstrakto trumpalaikis stabilumas	Kokybės kontrolės medžiagos gyvųjų audinių tuščiajame ėminyje (n = 3), analizuojamos paruošimo dieną ir po 24 h laikymo kambario temperatūroje	$\% \text{ Nuokr.} \leq 15 \%$
MTT formazano RhE audinio ekstrakto ilgalaikis stabilumas, jei reikia	Kokybės kontrolės medžiagos gyvųjų audinių tuščiajame ėminyje (n = 3), analizuojamos paruošimo dieną ir po kelių laikymo tam tikroje temperatūroje (pvz., 4 °C, –20 °C, –80 °C) dienų	$\% \text{ Nuokr.} \leq 15 \%$

¹LLOQ: apatinė kiekybinio nustatymo riba, nurodoma kaip sudaranti 1–2 % audinio gyvybingumo, t. y. 0,8 µg/ml.

²ULOQ – viršutinė kiekybinio nustatymo riba, nurodoma kaip koncentracija, ne mažiau kaip du kartus didesnė nei didžiausia tikėtina MTT formazano koncentracija neigiamų kontrolinių ėminių izopropanolio ekstraktuose, t. y. 200 µg/ml.“

8) B dalis papildoma šiais skyriais:

„B.63 TOKSIŠKUMO REPRODUKCIJAI IR (ARBA) VYSTYMUISI ATRANKOS BANDYMAS

IVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymo gaires (TG) 421 (2016). EBPO cheminėms medžiagoms bandyti skirtos gairės periodiškai peržiūrimos, atsižvelgiant į mokslo pažangą. Pradinės atrankinio tyrimo bandymo gairės 421 buvo priimtos 1995 m. atsižvelgiant į „Parengiamojo toksiškumo reprodukcijai atrankos bandymo“ protokolą, aptartą dviejuose ekspertų pasitarimuose Londone 1990 m. (1) ir Tokijuje 1992 m. (2).
2. Šis bandymo metodas yra atnaujintas įtraukiant vertinamąsias baigtis, susijusias su endokrininę sistemą ardančiomis medžiagomis, ir jis yra tąsa 1998 m. EBPO iniciatyva pradėto didelės svarbos darbo, skirto peržiūrėti esamas gaires ir parengti naujas endokrininę sistemą galimai ardančių medžiagų atrankos ir bandymo gaires (3). Pavyzdžiui, EBPO TG 407 (28 dienų graužikų kartotinės dozės toksiškumas per virškinamąjį traktą, šio priedo B.7 skyrius) buvo išplėstos 2008 m., įtraukiant parametrus, tinkamus bandomųjų cheminių medžiagų endokrininiam aktyvumui aptikti. TG 421 atnaujinimo tikslas buvo įtraukti kai kurias vertinamąsias baigtis, susijusias su endokrininę sistemą ardančiomis medžiagomis, į atrankai skirtas bandymo gaires, kai ekspozicijos laikotarpiai aprėpia kai kuriuos jautrius vystymosi laikotarpius (prenatalinius ar ankstyvuosius postnatalinius laikotarpius).
3. Į TG 421 buvo įtrauktos pasirinktos papildomos vertinamosios baigtys, susijusios su endokrininę sistemą ardančiomis medžiagomis, taip pat TG 443 (Išplėstinis toksiškumo vienos kartos dauginimuisi bandymas, šio priedo B.56 skyrius) dalis, atsižvelgiant į galimybių studiją, susijusią su baigčių įtraukimo moksliniais ir techniniais klausimais, taip pat su jų įtraukimo į tyrimą bandymų schemas reikiama pakeitimais (4).
4. Šis bandymo metodas skirtas gauti ribotai informacijai apie bandomosios cheminės medžiagos poveikį patinų ir patelių reprodukcijos charakteristikoms, pvz., lytinių liaukų funkcijai, poravimosi elgesiui, apvaisinimui, vystymuisi ir palikuonių atsivedimui. Jis nėra esamų B.31, B.34, B.35 arba B.56 bandymo metodų alternatyva arba pakeitimas.

PRADINIAI ASPEKTAI

5. Šis atrankos bandymo metodas gali būti taikomas, jei reikia gauti pradinę informaciją apie galimą poveikį reprodukcijai ir (arba) vystymuisi pradiniam cheminių medžiagų toksikologinių savybių vertinimo etape arba apie susirūpinimą keliančias chemines medžiagas. Jis taip pat gali būti taikomas kaip esamų cheminių medžiagų, apie kurias yra labai mažai toksikologinės informacijos arba jos nėra, pradinių atrankos bandymų rinkinio

dalis, kaip dozės intervalo nustatymo tyrimas, atliekant išsamesnius reprodukcijos ir (arba) vystymosi tyrimus, arba jei laikoma, kad jis galėtų tikt. Atliekant tyrimą reikėtų vadovautis pagrindiniais principais ir aspektais, pateiktais EBPO rekomendaciniame dokumente Nr. 19 dėl saugos įvertinimui naudojamų bandymo gyvūnų klinikinių požymių, kaip humaniško poveikio vertinamųjų baigčių, atpažinimo, vertinimo ir naudojimo (5).

6. Taikant šį bandymo metodą negaunama išsamios informacijos apie visus reprodukcijos ir vystymosi aspektus. Visų pirma, jis suteikia tik ribotas prenatalinės ekspozicijos postnatalinių reiškinių arba postnatalinės ekspozicijos metu galimai sukulto poveikio aptikimo priemones. Dėl (be kitų priežasčių) palyginti nedidelio gyvūnų skaičiaus dozių grupėse, vertinamųjų baigčių atrankumo ir trumpos tyrimo trukmės šiuo metodu nebus gauta įrodymų, kad būtų galima tvirtai pareikšti apie poveikio nebuvimą. Be to, nesant kitų toksiškumo reprodukcijai ir (arba) vystymuisi bandymų duomenų, teigiami rezultatai yra naudingi pradiniam pavojingumo vertinimui ir padeda priimti sprendimus dėl papildomų bandymų būtinumo ir trukmės.
7. Rezultatus, gautus taikant su endokrinine sistema susijusius parametrus, reikėtų vertinti atsižvelgiant į EBPO konceptualią endokrininę sistemą ardančių cheminių medžiagų bandymo ir vertinimo sistemą (6). Patobulintos EBPO TG 421 pagal šią konceptualią sistemą yra 4 lygmens *in vivo* bandymas, kuriuo gaunami duomenys apie neigiamą poveikį su endokrinine sistema susijusioms vertinamosioms baigtims. Tačiau vien tik pats endokrininės sistemos signalas negali būti laikomas pakankamu įrodymu, kad bandomoji cheminė medžiaga yra endokrininę sistemą ardanti medžiaga.
8. Taikant šį bandymo metodą, bandomoji cheminė medžiaga duodama per burną. Gali prireikti pakeitimų, jei naudojami kiti ekspozicijos būdai.
9. Prieš taikant bandymų metodą mišiniui, kad būtų gauti numatomo reglamentavimo tikslui skirti duomenys, reikėtų panagrinėti, ar metodu galima pasiekti tą tikslą atitinkančius rezultatus ir, jei taip, dėl kokios priežasties. Tokie svarstymai nereikalingi, kai yra reglamentavimo reikalavimas bandyti mišinį.
10. Vartojamos apibrėžtys pateiktos 1 priedėlyje.

BANDYMO PRINCIPAS

11. Kelioms patinų ir patelių grupėms duodamos skirtingos bandomosios cheminės medžiagos dozės. Patinai turėtų gauti dozę ne trumpiau kaip keturias savaites, iki pat numarinimo, įskaitant dieną prieš numatytą numarinimą (tai sudaro ne mažiau kaip dvi savaitės iki poravimosi, poravimosi laikotarpis ir maždaug dvi savaitės po poravimosi). Atsižvelgiant į ribotą dozės davimo patinams laikotarpį, vaisingumas gali ir nebūti tam tikras jautrus toksiškumo sėklidėms rodiklis. Todėl svarbu atlikti išsamų histologinį sėklidžių tyrimą. Manoma, kad dviejų savaičių prieš poravimąsi dozės davimo laikotarpio ir vėlesnių

poravimosi ir (arba) vaisingumo stebėjimo rezultatų derinio, esant ne trumpesniam kaip keturių savaičių bendrajam dozės davimo laikotarpiui, ir toliau atlikto išsamaus patinų lytinių liaukų histopatologijos tyrimo pakanka, kad būtų galima aptikti daugumą patinų vaisingumui ir spermatogenezei įtaką darančių veiksnių.

12. Patelės turėtų gauti dozę visą tyrimo laikotarpį. Jį sudaro dvi savaitės iki poravimosi (turint tikslą aprėpti bent du pilnus rujos ciklus), skirtingas laikas iki apvaisinimo, vaikingumo trukmė ir mažiausiai tryliką dienų po atsivedimo, iki pat numarinimo, įskaitant dieną prieš numatytą numarinimą.
13. Tyrimo trukmė po aklimatizavimo ir rujos ciklo įvertinimo prieš dozės davimą, priklauso nuo patelių vaisingumo ir yra maždaug 63 dienos (mažiausiai 14 dienų prieš poravimąsi (iki) 14 dienų poravimasis, 22 dienų vaikingumas, 13 dienų žindymas).
14. Dozės davimo laikotarpiu gyvūnai atidžiai stebimi kiekvieną dieną toksiškumo požymiams nustatyti. Bandymo metu nugaišę arba numarinti gyvūnai skrodžiami, o baigus bandymą numarinami ir skrodžiami išgyvenę gyvūnai.

METODO APRAŠYMAS

Gyvūnų rūšies parinkimas

15. Taikant šį bandymo metodą numatyta naudoti žiurkes. Jei šiam bandymo metodui nurodyti parametrai tiriami naudojant kitą graužikų rūšį, turėtų būti pateiktas išsamus pagrindimas. Vykdam tarptautinę patvirtinimo programą endokrininę sistemą ardančioms medžiagoms aptikti pagal EBPO TG 407 (atitinka šio priedo B.7 skyrių), vienintelė naudota rūšis buvo žiurkės. Neturėtų būti naudojamos mažo vaisingumo veislės arba veislės, kurioms dažnai pasireiškia vystymosi defektai. Reikėtų naudoti sveikus neapvaisintus gyvūnus, kurie nebuvo naudojami anksčiau atliekant bandymo procedūras. Reikėtų apibūdinti bandymo gyvūnų rūšį, veislę, lytį, masę ir amžių. Tyrimo pradžioje naudojamų gyvūnų masės skirtumas turėtų būti kuo mažesnis ir ne didesnis kaip 20 % kiekvienos lyties gyvūno vidutinės masės. Jei tyrimas atliekamas kaip ilgalaikio ar visos kartos tyrimo parengiamasis tyrimas, būtų gerai abiem tyrimams naudoti tos pačios veislės ir šaltinio gyvūnus.

Laikymas ir šėrimas

16. Visos procedūros turėtų atitikti vietinius laboratorinės gyvūnų priežiūros reikalavimus. Bandymo gyvūnų patalpos temperatūra turėtų būti 22 °C ($\pm$ 3°). Nors santykinė oro drėgmė turėtų būti ne mažesnė kaip 30 % ir pageidautina, kad būtų ne didesnė kaip 70 %, išskyrus patalpos plovimo laiką, reikėtų stengtis, kad ji būtų 50–60 %. Apšvietimas turėtų būti dirbtinis, 12 h dienos šviesos ir 12 h tamsos. Gyvūnams šerti tinka įprastas laboratorijose naudojamas pašaras, neribojant geriamojo vandens kiekio. Pašaro

pasirinkimui gali turėti įtakos būtinybė tinkamai įmaišyti bandomąją cheminę medžiagą, duodamą pagal šį metodą.

17. Gyvūnai turėtų būti apgyvendinti nedidelėmis tos pačios lyties grupėmis; gyvūnus galima laikyti atskirai, jei tai būtų mokliškai pagrįsta. Laikant grupėmis, viename narvelyje turėtų būti ne daugiau kaip penki gyvūnai. Poravimo procedūros turėtų būti atliekamos šiam tikslui pritaikytuose narveliuose. Vaikingos patelės turėtų būti laikomos atskiruose narveliuose ir turėti gūžtai įsirengti būtinų medžiagų. Žindančios patelės laikomos atskiruose narveliuose su savo palikuoniais.
18. Pašarus reikėtų nuolat analizuoti dėl teršalų buvimo. Pašaro ėminys turėtų būti saugomas, kol bus parengta ataskaita.

Gyvūnų ruošimas

19. Sveiki jauni suaugę gyvūnai atsitiktinės atrankos būdu suskirstomi į kontrolines ir apdorojamas grupes. Narvelius reikėtų išdėstyti taip, kad narvelio vietos įtaka būtų kiek įmanoma mažesnė. Gyvūnai unikaliai identifikuojami ir ne mažiau kaip penkias paras iki tyrimo pradžios laikomi savo narveliuose, kad priprastų prie laboratorinių sąlygų.

Dozių ruošimas

20. Bandomąją cheminę medžiagą rekomenduojama duoti per burną, nebent būtų laikoma, kad labiau tinka kiti davimo būdai. Jei pasirenkamas davimo per burną būdas, bandomoji cheminė medžiaga paprastai duodama per zondą, tačiau bandomąsias chemines medžiagas galima duoti su pašaru arba geriamuoju vandeniu.
21. Jei būtina, bandomoji cheminė medžiaga ištirpinama tinkamame nešiklyje arba ruošama jos suspensija. Rekomenduojama pirmenybę teikti vandeniniam tirpalui arba suspensijai, jei įmanoma, vėliau svarstyti galimybę naudoti tirpalą arba emulsiją aliejuje (pvz., kukurūzų) ir tik tada naudoti tirpalus kituose nešikliuose. Jei nešiklis yra ne vanduo, turėtų būti žinomos jo toksiškumo charakteristikos. Reikėtų nustatyti bandomosios cheminės medžiagos stabilumą ir vienalytiškumą nešiklyje.

PROCEDŪRA

Gyvūnų skaičius ir lytis

22. Rekomenduojama kiekvienos grupės bandymą pradėti turint ne mažiau kaip 10 patinų ir 12–13 patelių. Prieš ekspozicijos pradžią įvertinamas patelių rujos cikliškumas, ir gyvūnai, kurių ciklas nėra 4–5 dienos, neįtraukiami į tyrimą, todėl rekomenduojama turėti papildomų patelių, kad kiekvienoje grupėje liktų 10 patelių. Manoma, kad, išskyrus aiškaus toksinio poveikio atvejį, kiekvienoje grupėje bus mažiausiai 8 vaikingos patelės, ir tai paprastai yra mažiausias priimtinas vaikingų patelių skaičius kiekvienoje grupėje. Tikslas yra gauti pakankamą vaikingų patelių ir palikuonių skaičių, kad būtų galima

pagrįstai įvertinti bandomosios cheminės medžiagos gebėjimą daryti poveikį vaisingumui, vaikingumui, patelės ir žindomo palikuonio elgesiui bei F₁ kartos palikuonių augimui ir vystymuisi nuo apvaisinimo iki 13 paros po atsivedimo.

Dozavimas

23. Paprastai turėtų būti ne mažiau kaip trys bandymo grupės ir viena kontrolinė grupė. Dozių dydžiai gali būti pagrįsti informacija, gauta atliekant ūmaus toksiškumo bandymus, arba kartotinės dozės tyrimų rezultatais. Išskyrus apdorojimą bandomąja chemine medžiaga, su kontrolinių grupių gyvūnais turėtų būti elgiamasi taip pat, kaip su apdorojimo grupių gyvūnais. Jeigu duodant bandomąją cheminę medžiagą naudojamas nešiklis, kontrolinė grupė turėtų gauti didžiausią naudotą nešiklio kiekį.
24. Dozių dydžiai turėtų būti pasirinkti atsižvelgiant į visus turimus toksiškumo ir (toksiko)kinetinius duomenis. Taip pat reikėtų atsižvelgti į tai, kad vaikingų ir neapvaisintų gyvūnų jautrumas gali skirtis. Didžiausiąją dozę reikėtų pasirinkti turint tikslą sukelti toksinį poveikį, bet ne gyvūno žūtį ar stiprias kančias. Toliau reikėtų pasirinkti mažėjančių dozės dydžių seką, siekiant parodyti su dozavimu susijusį atsaką ir nepastebėto neigiamo poveikio ribą (NOAEL), esant mažiausiai dozei. Mažėjančių dozių dydžiams nustatyti paprastai yra optimalūs dozių skirtumo intervalai nuo dviejų iki keturių kartų, ir dažnai vietoj didelių intervalų tarp dozavimų (pvz., daugiau kaip 10 kartų) geriau naudoti papildomą ketvirtą bandymo grupę.
25. Jei stebimas bendrasis toksiškumas (pvz., mažesnė kūno masė, poveikis kepenims, širdžiai, plaučiams arba inkstams ir kt.) arba kiti pakitimai, kurie gali nebūti toksiškumo atsakais (pvz., mažesnis pašaro vartojimas, kepenų padidėjimas), stebimas poveikis jautrioms endokrininės sistemos vertinamosioms baigtims turėtų būti aiškinamas atsargiai.

Ribinis bandymas

26. Jei atliekant per burną duodamos vieno dydžio dozės tyrimą pagal šiam tyrimui aprašytas procedūras, duodama ne mažesnė kaip 1000 mg/kg kūno masės per parą dozė arba, jei duodama su pašaru ar geriamuoju vandeniu, atitinkamą pašaro ar geriamo vandens procentinę dalį sudaranti dozė nesukelia pastebimo toksinio poveikio ir jei toksinio poveikio nesitikima, atsižvelgiant į giminingos struktūros medžiagoms gautus duomenis, visas bandymas naudojant kelių dydžių dozes gali būti nebūtinas. Ribinis bandymas atliekamas, išskyrus atvejus, kai žmonių ekspozicijos būdas rodo, kad per burną duodamos dozės turi būti didesnės. Jei duodama kitais būdais, pvz., įkvepiama arba dedama ant odos, didžiausią galimą koncentraciją dažnai gali lemti bandomųjų cheminių medžiagų fizikinės ir cheminės savybės.

Dozių davimas

27. Gyvūnai gauna bandomosios cheminės medžiagos dozę kasdien 7 dienas per savaitę. Jei bandomoji cheminė medžiaga duodama per zondą, gyvūnams turėtų būti duodama viena dozė per skrandžio zondą arba per tinkamą intubacinį vamzdelį. Didžiausias gyvūnui duodamas vienkartinis skysčio tūris priklauso nuo bandymo gyvūno dydžio. Tūris neturėtų būti didesnis kaip 1 ml/100 g kūno masės, išskyrus vandeninius tirpalus, kurių galima duoti po 2 ml/100 g kūno masės. Išskyrus dirginančias arba ėsdinančias bandomąsias chemines medžiagas, kurios, būdamos didesnės koncentracijos, paprastai sukelia sunkesnę poveikį, bandymo tūrio kintamumas turėtų būti kiek įmanoma mažesnis keičiant koncentraciją taip, kad visų dydžių dozių tūris būtų vienodas.
28. Jei bandomoji cheminė medžiaga duodama su pašaru ar geriamuoju vandeniu, svarbu užtikrinti, kad naudojami bandomosios cheminės medžiagos kiekiai nekeltų trukdžių normaliai mitybai arba vandens pusiausvyrai. Jei bandomoji cheminė medžiaga duodama su pašaru, galima naudoti pastovią koncentraciją pašaruose (ppm) arba pastovaus dydžio dozę pagal gyvūno kūno masę; pasirinktą variantą reikėtų nurodyti. Jei bandomoji cheminė medžiaga duodama per zondą, dozė turėtų būti duodama kiekvieną dieną panašiu laiku ir koreguojama mažiausiai kartą per savaitę pastoviam dozės ir gyvūno kūno masės santykiui užtikrinti.

Bandymo tvarkaraštis

29. Dozės reikėtų pradėti duoti abiejų lyčių gyvūnams ne vėliau kaip 2 savaites prieš poravimąsi, po to, kai jie buvo aklimatizuojami ne trumpiau kaip penkias dienas, ir patelės atrinktos pagal normalius rujos ciklus (2 savaitžių laikotarpiu prieš apdorojimą). Tyrimo tvarkaraštis turėtų būti sudarytas taip, kad rujos ciklo įvertinimas prasidėtų netrukus po to, kai gyvūnai pasiekia visišką lytinę brandą. Jos laikas gali šiek tiek skirtis skirtingoms žiurkių veislėms skirtingose laboratorijose, pvz., *Sprague Dawley* žiurkės subręsta 10 savaitžių amžiaus, *Wistar* žiurkės – maždaug 12 savaitžių amžiaus. Patelės su palikuoniais reikėtų numarinti 13 dieną po atsivedimo arba šiek tiek vėliau. Gimimo diena (t. y., kai baigiama atsivesti) nustatoma kaip 0 diena po atsivedimo. Patelės, kurios nerodo poravimosi požymių, numarinamos po 24–26 dienų nuo paskutinės poravimosi laikotarpio dienos. Dozės toliau duodamos abiejų lyčių gyvūnams visą poravimosi laikotarpį. Patinams reikėtų duoti dozę po poravimosi laikotarpio ne trumpiau kaip iki viso 28 dienų dozavimo laikotarpio pabaigos. Patinai numarinami arba, jei manoma, kad juos galima poruoti dar kartą, paliekami ir jiems toliau duodama dozė.
30. Dozės turėtų būti duodamos motininėms patelėms kasdien visą vaikingumo laikotarpį ir ne trumpiau kaip iki 13 dienos po atsivedimo, įskaitant ir tą dieną, arba likus dienai iki numarinimo. Jei tyrimai atliekami bandomąją cheminę medžiagą duodant įkvėpti arba ją dedant ant odos, dozė turėtų būti duodama ne trumpiau kaip iki 19 dienos nuo vaikingumo pradžios, įskaitant ją, ir davimą reikėtų atnaujinti kiek įmanoma greičiau, bet ne vėliau kaip 4 dieną po atsivedimo (PND).

31. Bandymo tvarkaraščio schema pateikta 2 priedėlyje.

Poravimo procedūra

32. Atliekant šį tyrimą paprastai reikėtų poruoti 1:1 (vienas patinas ir viena patelė). Išimčių gali būti dėl atsitiktinai žuvusių patinų. Patelė turėtų būti laikoma su tuo pačiu patinu tol, kol atsiranda poravimosi požymiai, arba praeina dvi savaitės. Kiekvieną rytą patelės turėtų būti tiriamos, ieškant spermos arba makšties kamščio. 0 vaikingumo diena apibrėžiama kaip diena, kurią patvirtinamas poravimosi faktas (randamas makšties kamštis arba spermos). Jei poravimas nesėkmingas, galima būtų spręsti dėl pakartotino patelių poravimo su patikrintais tos pačios grupės patiniais.

Vados dydis

33. 4 dieną po atsivedimo kiekvienos vados dydį galima koreguoti, šalinant perteklinius jauniklius atsitiktinės atrankos būdu, kad būtų gautas kiek įmanoma vienodesnis keturių ar penkių vienos lyties jauniklių vienai vadai skaičius, priklausomai nuo normalaus naudotos žiurkių veislės vados dydžio. Reikėtų paimti dviejų perteklinių jauniklių kraujo ėminius, juos sujungti ir naudoti serumo T4 koncentracijos nustatymui. Atrankusis jauniklių šalinimas, pvz., pagal kūno masę arba anogenitalinį atstumą (AGD), netinka. Jei neįmanoma vienoje vadoje turėti po keturis ar penkis kiekvienos lyties jauniklius, priimtinas dalinis jauniklių skaičiaus koregavimas (pvz., šeši patinai ir keturios patelės). Jaunikliai nešalinami, kai vados dydis yra mažesnis nei brokavimo tikslinė vertė (8 ar 10 jauniklių vienai vadai). Jei vadoje tik vienu jaunikliu daugiau nei brokavimo tikslinė vertė, jis šalinamas ir naudojamas kraujui paimti, kad būtų galima atlikti serumo T4 vertinimą.

34. Jei vados dydis nekoreguojamas, du jaunikliai vienai vadai numarinami 4 dieną po gimimo ir imami jų kraujo ėminiai serumo skydliaukės hormono koncentracijai matuoti. Jei įmanoma, šie du žiurkiukai vienai vadai turėtų būti patelės, kad žiurkiukus patinus būtų galima pasilikti spenelių išsaugojimo įvertinimui, išskyrus atvejus, kai pašalinus šias pateles jų nelieka vertinimui tyrimo pabaigoje. Jaunikliai nešalinami, jei vados dydis būtų mažesnis kaip 8 ar 10 jauniklių vienai vadai (priklausomai nuo normalaus naudotos žiurkių veislės vados dydžio). Jei vadoje tik vienu jaunikliu daugiau nei normalioje vadoje, jis šalinamas ir naudojamas kraujui paimti, kad būtų galima atlikti serumo T4 vertinimą.

Gyvų gyvūnų stebėjimo rezultatai

Klinikiniai stebėjimai

35. Visą bandymo laikotarpį reikėtų atlikti bendruosius klinikinius stebėjimus bent kartą per dieną ir dažniau, jei stebimi toksiskumo požymiai. Juos pageidautina atlikti kartą ar kelis kartus kasdien tuo pačiu laiku, atsižvelgiant į didžiausio numatomo poveikio laiką po dozės davimo. Reikėtų registruoti atitinkamus elgesio pokyčius, komplikuoto arba užsitęsusio atsivedimo požymius ir visus toksiskumo požymius, įskaitant gaištamumą. Į

šiuos registruojamus duomenis reikėtų įtraukti toksiškumo požymių pradžios laiką, laipsnį ir trukmę.

Kūno masė ir pašaro bei vandens suvartojimas

36. Patinus ir pateles reikėtų sverti pirmąją dozės davimo dieną, ne rečiau kaip kas savaitę vėliau ir tyrimo pabaigoje. Vaikingumo laikotarpiu pateles reikėtų sverti 0, 7, 14 ir 20 dieną ir per 24 valandas po atsivedimo (0 arba 1 diena po atsivedimo) ir bent 4 ir 13 dieną po atsivedimo. Šie rezultatai turėtų būti pateikiami ataskaitoje atskirai apie kiekvieną suaugusį gyvūną.
37. Pašaro suvartojimą prieš poravimąsi, vaikingumo ir žindymo metu reikėtų matuoti mažiausiai kartą per savaitę. Pašaro suvartojimo poravimosi metu matuoti nebūtina. Vandens suvartojimas šiais laikotarpiais taip pat turėtų būti matuojamas, kai bandomoji cheminė medžiaga yra duodama su geriamuoju vandeniu.

Rujos ciklai

38. Rujos ciklus reikėtų stebėti prieš apdorojimo pradžią, kad tyrimui būtų atrinktos patelės, turinčios reguliarių cikliškumą (žr. 22 pastraipą). Makšties tepinėlius taip pat reikėtų stebėti kasdien nuo apdorojimo laikotarpio pradžios iki poravimosi įrodymų gavimo. Jei yra susirūpinimas dėl ūminio streso poveikio, kuris galėtų pakeisti rujos ciklus pradėjus duoti dozes, laboratorijos gali veikti bandymo gyvūnus medžiaga 2 savaites, tada kasdien imti makšties tepinėlius, kad rujos ciklas būtų stebimas mažiausiai dvi savaites prieš poravimosi laikotarpį ir stebėjimas tęsiamas poravimosi laikotarpiu iki poravimosi įrodymų gavimo. Makšties ar gimdos kaklelio ląsteles reikėtų imti atsargiai, kad nebūtų pažeista gleivinė ir tokiu būdu nebūtų sukeltas netikras vaikingumas (7) (8).

Palikuonių parametrai

39. Gestacijos trukmė turėtų būti registruojama ir pradedama skaičiuoti nuo 0 vaikingumo dienos. Kiekviena vada turėtų būti apžiūrėta kiek įmanoma greičiau po atsivedimo siekiant nustatyti jauniklių skaičių ir lytį, gimusių negyvų ir gimusių gyvų jauniklių skaičių, silpnuosius jauniklius (jauniklius, kurie yra gerokai mažesni už atitinkamus kontrolinius jauniklius) ir dideles anomalijas.
40. Gyvi jaunikliai turėtų būti suskaičiuojami ir jų lytis nustatoma per 24 h nuo atsivedimo (0 dieną arba 1 dieną po atsivedimo) ir bent 4 ir 13 dieną po atsivedimo. Be 35 pastraipoje aprašytų stebėjimų, reikėtų registruoti visus jauniklių nenormalaus elgesio pasireiškimus.
41. Kiekvieno jauniklio anogenitalinis atstumas (AGD) turėtų būti matuojamas tą pačią dieną po gimimo tarp PND 0 ir PND 4. Jauniklio kūno masės duomenis reikėtų gauti tą pačią dieną, kurią matuojamas AGD, ir AGD turėtų būti norminamas pagal jauniklio dydį, ir būtų gerai, kad AGD būtų lygus kubinei šakniai iš kūno masės (9). Jauniklių patinų

spenelius ir (arba) areoles reikėtų suskaičiuoti PND 12 arba 13 dieną, kaip rekomenduojama EBPO GD 151 (10).

Klinikinė biochemija

42. Kraujo ėminiai iš nustatytos vietos imami pagal tokį tvarkaraštį:

- ne mažiau kaip dviejų jauniklių vienai vadai 4 dieną po gimimo, jei pakanka jauniklių skaičiaus (žr. 33–34 pastraipas)
- visų patelių, ne mažiau kaip dviejų jauniklių vienai vadai 13 dieną tyrimo pabaigoje, ir
- visų suaugusių patinų tyrimo pabaigoje.

Visi kraujo ėminiai laikomi tinkamomis sąlygomis. 13 dienų jauniklių ir suaugusių patinų kraujo ėminiai vertinami dėl skydliaukės hormonų (T4) koncentracijos serume. Papildomai nustatomas T4 kiekis patelių ir 4 dienų jauniklių kraujo ėminiuose, jei reikia. Be to, galima pasirinkti matuoti kitus hormonus, jei tinka. Vienos vados jauniklių kraujo ėminius galima sujungti atliekant skydliaukės hormonų analizę. Skydliaukės hormonus (T4 ir TSH) reikėtų matuoti kaip „suminį kiekį“.

43. Hormonų nustatymo rezultatų kintamumui ir absoliučiajai koncentracijai gali turėti įtakos šie veiksniai:

- numarinimo laikas – dėl hormonų koncentracijos kitimo paros metu;
- numarinimo būdas, siekiant išvengti per didelio streso, galinčio turėti įtakos hormonų koncentracijai,
- hormonų nustatymui skirti bandymo rinkiniai, kuriais gautos kalibravimo kreivės gali skirtis.

44. Hormonų nustatymui specialiai skirti plazmos ėminiai turėtų būti imami panašiu dienos metu. Naudojant įvairius prekyboje esančius bandymo rinkinius, skiriasi gautos analizuojamų hormonų koncentracijos skaitinės vertės.

Patologija

Bendroji nekroskopija

45. Reikėtų atlikti numarintų arba tyrimo metu nugaišusių suaugusiųjų gyvūnų makroskopinį tyrimą anomalijoms arba patologiniams pakitimams nustatyti. Ypatingas dėmesys turėtų būti skiriamas reprodukcijos sistemos organams. Reikėtų registruoti implantacijos vietų skaičių. Makšties tepinėliai turėtų būti tiriami skrodimo dienos ryte, kad būtų galima nustatyti rujos ciklo stadiją ir koreliaciją su kiaušidžių histopatologija.

46. Nuo visų suaugusiųjų patinų sėklidžių, sėklidžių prielipų, taip pat prostatos ir sėklinių pūslelių su koaguliatorių liaukomis, kaip visumos, reikėtų pašalinti visus priaugusius audinius, jei yra, ir po skrodimo kuo greičiau pasverti drėgnos būsenos, kad būtų išvengta

džiūvimo. Be to, papildomai galėtų būti nustatoma patinų išangės pakeliamojo ir stormeninio akytkūnio raumens, abiejų Kuperio liaukų ir varpos galvos masė, patelių – porinių kiaušidžių (drėgno organo masė) ir gimdos (įskaitant gimdos kaklelį) masė; jei šios masės įtraukiamos, jos turėtų būti nustatytos kuo greičiau po skrodimo.

47. Negyvi jaunikliai ir 13 dieną po atsivedimo arba šiek tiek vėliau numarinti jaunikliai turėtų būti bent kruopščiai apžiūrėti išoriškai dėl didelių anomalijų. Ypatingą dėmesį reikėtų atkreipti į išorinius lytinio dauginimosi organus, kuriuos reikėtų ištirti dėl pakitusio vystymosi požymių. 13 dieną reikėtų konservuoti iš 1 patino ir 1 patelės vienai jauniklių vadai paimtą skydliaukę.
48. Reikėtų konservuoti visų suaugusiųjų gyvūnų kiaušides, sėklides, papildomus lytinius organus (gimdą ir gimdos kaklelį, sėklidžių prielipus, prostatą ir sėklinės pūsleles, plius koaguliatorių liaukas), skydliaukę ir visus organus, turinčius makroskopinių pažeidimų. Atliekant įprastinį sėklidžių ir sėklidžių prielipų tyrimą, nerekomenduojama fiksuoti formaline. Šiems audiniams priimtinas fiksavimo metodas yra Bouino arba modifikuotojo Davidsono fiksatyvo naudojimas (11). Abu *tunica albuginea* galus galima atsargiai ir negiliai pradurti adata, kad fiksatyvas galėtų greitai prasiskverbti.

Histopatologija

49. Reikėtų atlikti didžiausiąją dozę gavusios ir kontrolinės grupės gyvūnų kiaušidžių, sėklidžių ir sėklidžių prielipų išsamų histologinį tyrimą (ypač kreipiant dėmesį į spermatogenezės stadijas ir sėklidžių intersticinių ląstelių struktūros histopatologiją). Jei būtina, galima tirti kitus konservuotus audinius, įskaitant jauniklių ir suaugusiųjų gyvūnų skydliaukę. Atlikus fiksavimą, galėtų būti nustatyta skydliaukės masė. Valyti (apipjaustyti) taip pat reikėtų labai atsargiai ir tik atlikus fiksavimą, kad nebūtų pažeistas audinys. Pažeidus audinį gali būti gauti netikslūs histopatologinės analizės rezultatai. Jei pakitimai nustatomi didžiausiąją dozę gavusioje grupėje, tyrimus reikėtų išplėsti kitų dozavimo grupių gyvūnams. Histopatologinių tyrimų gairėse (11) pateikta išsamios papildomos informacijos apie skrodimą, fiksavimą, pjaustymą ir endokrininių audinių histopatologiją.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Duomenys

50. Turėtų būti pateikiami atskirų gyvūnų duomenys. Be to, papildomai visus duomenis reikėtų suvesti į lenteles, kuriose kiekvienai bandymo grupei nurodomas gyvūnų skaičius bandymo pradžioje, darant bandymą nugaišusių arba dėl humaniško priežasčių numarintų gyvūnų skaičius, visų gyvūnų nugaišimo arba humaniško numaravimo laikas, vaisingų gyvūnų skaičius, vaikingų patelių skaičius, toksinio poveikio požymių turinčių gyvūnų skaičius, pastebėtų toksiškumo požymių aprašymas, įskaitant pradžios laiką, trukmę ir toksinio poveikio rimtumą, histopatologinių pakitimų tipai ir visi atitinkami vados

duomenys. Lentelės pavidalo suvestinės formatas, kuris pasirodė labai naudingas, kai reikia įvertinti poveikį reprodukcijai ir (arba) vystymuisi, pateiktas 3 priedėlyje.

51. Atsižvelgiant į nedidelę tyrimo apimtį, statistinės analizės kaip reikšmingumo kriterijų nustatymo vertė yra ribota daugeliui vertinamųjų baigčių, ypač reprodukcijos vertinamųjų baigčių. Jei statistiniai tyrimai atliekami, pasirinktas metodas turėtų atitikti tiriamo kintamojo pasiskirstymą ir metodą reikėtų pasirinkti prieš tyrimo pradžią. AGD ir spenelių išlikimo statistinė analizė turėtų būti pagrįsta atskirų jauniklių duomenimis, atsižvelgiant į vados veiksnius. Jei tinka, statistinės analizės vienetas yra vada. Jauniklių kūno masės statistinė analizė turėtų būti pagrįsta atskirų jauniklių duomenimis, atsižvelgiant į vados dydį. Dėl mažo grupės dydžio istorinių kontrolinių ėminių duomenų (pvz., vados dydžio), jei yra, naudojimas taip pat gali būti naudingas kaip pagalbinė priemonė aiškinant tyrimą.

Rezultatų įvertinimas

52. Šio toksiškumo tyrimo rezultatai turėtų būti vertinami atsižvelgiant į stebimą poveikį, nekroskopijos ir mikroskopinio tyrimo rezultatus. Įvertinimas aprėpia ryšį tarp bandomosios cheminės medžiagos dozės ir anomalijų buvimo ar nebuvimo, dažnumo ir sunkumo, įskaitant makroskopinius pažeidimus, nustatytus tikslinius organus, nevaisingumą, klinikinės anomalijas, paveiktą reprodukavimo gebą ir vados charakteristikas, kūno masės pokyčius, poveikį gaishtamumui ir visus kitus toksiškumo reiškinius.
53. Dėl trumpo patinų apdorojimo laikotarpio, vertinant poveikį patinų reprodukcijai, sėklidžių ir sėklidžių prielipų histopatologiją reikėtų nagrinėti kartu su vaisingumo duomenimis. Reprodukcijos ir (arba) vystymosi istorinių kontrolinių ėminių duomenų (pvz., vados dydis, AGD, spenelių išlikimas, T4 koncentracija serume), jei yra, naudojimas taip pat gali būti naudingas kaip pagalbinė priemonė aiškinant tyrimą.
54. Siekiant užtikrinti kokybės kontrolę, siūloma rinkti istorinių kontrolinių ėminių duomenis ir apskaičiuoti skaitinių duomenų variacijos koeficientus, ypač parametrų, susijusių su endokrininę sistemą ardančių medžiagų aptikimu. Šie duomenys gali būti naudojami palyginimo tikslais, kai vertinami atliekami tyrimai.

Bandymo ataskaita

55. Į bandymo ataskaitą turėtų būti įtraukta ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga:

- šaltinis, partijos numeris, naudojimo pabaigos data, jei yra;
- bandomosios cheminės medžiagos stabilumas, jei žinomas.

Vienkomponentė medžiaga:

- fizinė išvaizda, tirpumas vandenyje ir papildomos būdingos fizikinės ir cheminės savybės;
- cheminio identifikavimo duomenys, pvz., IUPAC ar CAS pavadinimas, CAS numeris, SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė, grynumas, cheminis priemaišų pavadinimas, jei tinka bei praktiškai įmanoma ir kt.;

Daugiakomponentė medžiaga, UVCB ir mišiniai:

- kuo išsamesnis sudedamųjų dalių apibūdinimas, nurodant cheminį pavadinimą (žr. pirmiau), kiekybinį paplitimą ir būdingas fizikines ir chemines savybes.

Nešiklis (jei naudojamas):

- nešiklio pasirinkimo pagrindimas, jei nešiklis ne vanduo.

Bandymo gyvūnai:

- naudota rūšis ir (arba) veislė,
- gyvūnų skaičius, amžius ir lytis,
- šaltinis, laikymo sąlygos, pašaras ir kt.,
- kiekvieno gyvūno masė bandymo pradžioje.
- rūšies, jei tai ne žiurkės, pasirinkimo pagrindimas.

Bandymo sąlygos:

- dozės dydžio pasirinkimo pagrindimas;
- duomenys apie bandomosios cheminės medžiagos preparato ruošimą ir (arba) jos dėjimą į pašarą, gautą preparato koncentraciją, stabilumą ir vienalytiškumą;
- išsami informacija apie bandomosios cheminės medžiagos davimo būdą;
- bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos (ppm) pašare arba geriamajame vandenyje perskaičiavimas į faktinę dozę (mg/kg kūno masės per parą), jei taikoma,
- išsami informacija apie pašaro ir vandens kokybę.
- išsamus randomizavimo procedūros brokuojamiems jaunikliams atrinkti procedūros aprašymas, jei brokuojami.

Rezultatai:

- kūno masė ir (arba) kūno masės pokyčiai,
- Pašaro ir vandens suvartojimo duomenys, jei yra;
- toksinio atsako duomenys pagal lytį ir dozę, įskaitant vaisingumą, nėštumą, ir kitus toksiškumo požymius;
- gestacijos trukmė;

- toksiškas arba kitoks poveikis reprodukcijai, palikuonims, postnataliniam augimui ir kt.;
- klinikinių požymių pobūdis, sunkumas ir trukmė (grįžtami ar negrįžtami);
- suaugusiųjų patelių, kurių rujanų ciklas yra normalus arba nenormalus, skaičius ir ciklo trukmė;
- gimusių gyvūnų jauniklių skaičius ir poimplantaciniai nuostoliai;
- jauniklio kūno masės duomenys;
- visų jauniklių AGD (ir kūno masę AGD matavimo dieną);
- spenelių išlikimas pas jauniklius patinus;
- 13 dienų jauniklių ir suaugusiųjų patinų skydliaukės hormonų koncentracija (ir patelių bei 4 dienos jauniklių, jei matuojama);
- jauniklių su aiškiai matomais išsigimimais skaičius, išorinių lyties organų bendrasis įvertinimas, silpniausių jauniklių skaičius;
- nugaišimo laikas tyrimo metu arba nurodymas, kad gyvūnas išgyveno iki pabaigos;
- implantacijų skaičius, vados dydis ir vados masę registravimo metu;
- tėvų kartos kūno masės numarinant ir organų masės duomenys;
- nekroskopijos duomenys;
- išsamus histopatologinių rezultatų aprašymas;
- absorbcijos duomenys (jei yra);
- statistinis rezultatų apdorojimas, jei reikia.

Rezultatų aptarimas.

Išvados.

Rezultatų aiškinimas

56. Atliekant tyrimą gaunami su kartotinėmis dozėmis susijusio toksiškumo reprodukcijai ir (arba) vystymuisi vertinimo rezultatai (žr. 5 ir 6 pastraipas). Jis galėtų parodyti, ar būtina atlikti tolesnius tyrimus, ir būti naudojamas kaip gairės rengiant jų schemas. Reikėtų ieškoti informacijos EBPO rekomendaciniame dokumente Nr. 43, kuri padėtų paaiškinti reprodukcijos ir vystymosi rezultatus (12). EBPO rekomendaciniame dokumente Nr. 106 dėl graužikų endokrininių ir reprodukcijos bandymų histologinio įvertinimo (11) pateikiama informacija apie (endokrininių) organų bei makšties tepinėlių paruošimą ir įvertinimą, kuri gali būti naudinga šiam bandymo metodui.

LITERATŪRA

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

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

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

1 priedėlis

APIBRĖŽTYS (TAIP PAT ŽR. EBPO REKOMENDACINĮ DOKUMENTĄ 150 (6))

Androgeniškumas – cheminės medžiagos geba veikti žinduolio organizme kaip natūralus androgeninis hormonas (pvz., testosteronas).

Antiandrogeniškumas – cheminės medžiagos geba slopinti natūralaus androgeninio hormono (pvz., testosterono) veikimą žinduolio organizme.

Antiestrogeniškumas – cheminės medžiagos geba slopinti natūralaus estrogeninio hormono (pvz., 17β -estradiolio) veikimą žinduolio organizme.

Antitiroidinis aktyvumas – cheminės medžiagos gebėjimas slopinti natūralaus skydliaukės hormono (pvz., T_3) veikimą žinduolio organizme.

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

Toksiškumas vystymuisi – toksiškumas reprodukcijai, kuris pasireiškia kaip palikuonių pre-, peri-, postnataliniai, struktūriniai ar funkciniai sutrikimai.

Dozavimas – bendrasis terminas, aprėpiantis dozės dydį, jos davimo dažnumą ir trukmę.

Dozė – duodamas bandomosios cheminės medžiagos kiekis. Dozė išreiškiama bandomosios cheminės medžiagos mase, per parą tenkančia viename bandomojo gyvūno kūno masės vienetui (pvz., mg/kg kūno masės per parą), arba pastovia koncentracija pašare.

Akivaizdus toksiškumas – bendrasis terminas, apibūdinantis aiškius toksiškumo požymius, pastebimus davus bandomosios cheminės medžiagos. Šių požymių turėtų pakakti pavojui įvertinti ir jie turėtų būti tokie, kad padidinus duodamą dozę būtų galima tikėtis sunkių toksiškumo požymių stiprėjimo ir galbūt gyvūnų gaišimo.

Vaisingumo sumažėjimas – rodo patelių ar patinų reprodukcijos funkcijų arba gebos sutrikimus.

Toksinis poveikis patelei – neigiamas poveikis vaikingoms patelėms, kuris pasireiškia būdingai (tiesioginis poveikis) arba nebūdingai (netiesioginis poveikis).

NOAEL – termino *nepastebėto neigiamo poveikio riba* santrumpa. Tai didžiausioji dozė, kurią duodant nepastebima su apdorojimu susijusių neigiamų rezultatų.

Estrogeniškumas – cheminės medžiagos gebėjimas veikti žinduolio organizme kaip natūralus estrogeninis hormonas (pvz., 17β -estradiolis).

Toksiškumas reprodukcijai – rodo neigiamą poveikį palikuoniams ir (arba) patelių ar patinų reprodukcijos funkcijų arba gebos sumažėjimą.

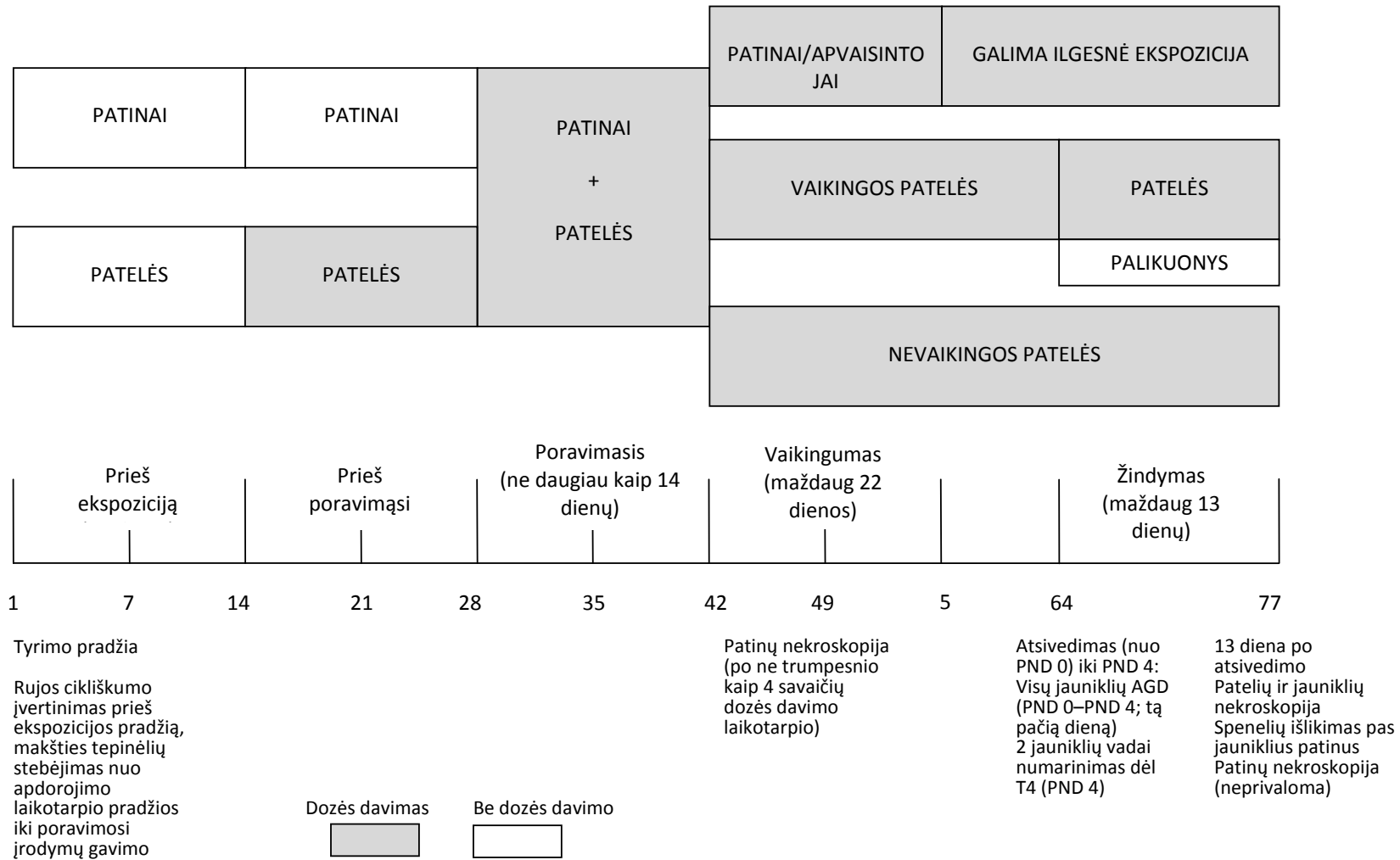
Bandomoji cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys, bandyti pagal šį bandymo metodą.

Tiroidinis aktyvumas – cheminės medžiagos gebėjimas veikti žinduolio organizme kaip natūralus skydliaukės hormonas (pvz., T_3).

Tinkamumo patvirtinimas – mokslinis procesas, skirtas apibūdinti bandymo metodo taikymo charakteristikoms keliamus reikalavimus ir apribojimus bei įrodyti jo patikimumą ir tinkamumą konkrečiam tikslui.

2 priedėlis

BANDYMO TVARKARAŠČIO SCHEMA, RODANTI DIDŽIAUSIĄJĄ TYRIMO TRUKMĘ, PAGRĮSTĄ VISU 14 DIENŲ PORAVIMOSI LAIKOTARPIU



3 priedėlis

POVEIKIO REPRODUKCIJAI IR (ARBA) VYSTYMUISI ĮVERTINIMO LENTELĖS FORMOS SUVESTINĖ ATASKAITA

STEBĖJIMŲ REZULTATAI	VERTĖS				
Dozavimas (vienetai)	0 (kontrolinis)	.. .	.. .	.. .	.. .
Porų skaičius pradžioje (skaičius)					
Rujos ciklas (bent vidutinė nereguliariųjų ciklų vidutinė trukmė ir dažnis)					
Patelės, rodančios poravimosi požymius (skaičius)					
Vaikingos patelės (skaičius)					
Apvaisinimo dienos 1–5 (skaičius)					
Apvaisinimo dienos 6–. . . ⁽¹⁾ (skaičius)					
Vaikingumas ≤ 21 diena (skaičius)					
Vaikingumas = 22 dienos (skaičius)					
Vaikingumas ≥ 23 dienos (skaičius)					
Patelės, turinčios gyvų jauniklių (skaičius)					
Patelės, turinčios gyvų jauniklių 4 dieną po atsivedimo (skaičius)					
Implantai/pateleį (vidurkis)					
Gyvi jaunikliai/pateleį po atsivedimo (vidurkis)					
Gyvi jaunikliai/pateleį 4 dieną po atsivedimo (vidurkis)					
Lyčių santykis (v/m) po atsivedimo (vidurkis)					
Lyčių santykis (v/m) 4 dieną po atsivedimo (vidurkis)					
Vados masė po atsivedimo (vidurkis)					

⁽¹⁾ Paskutinė poravimosi laikotarpio diena.

Vados masė 4 dieną po atsivedimo (vidurkis)					
Jauniklių masė po atsivedimo (vidurkis)					
Jauniklių masė AGD matavimo metu (vidutinė patinų, vidutinė patelių)					
Jauniklių AGD, matuotas tą pačią dieną – nuo atsivedimo dienos iki 4 dienos (vidutinis patinų, vidutinis patelių, pažymėti dieną po atsivedimo (PND))					
Jauniklių masė 4 dieną (vidurkis)					
Spenelių išlikimas pas jauniklius patinus 13 dieną (vidurkis)					
Jauniklių masė 13 dieną (vidurkis)					
JAUNIKLIAI SU ANOMALIJOMIS					
Patelių su 0					
Patelių su 1					
Patelių su ≥ 2					
PALIKUONIŲ NUOSTOLIAI					
Prenataliniai (implantacijos minus gyvų jauniklių skaičius)					
Patelių su 0					
Patelių su 1					
Patelių su 2					
Patelių su ≥ 3					
Postnataliniai (gyvų atsivedimo metu skaičius minus gyvų 13 dieną po atsivedimo skaičius)					
Patelių su 0					
Patelių su 1					
Patelių su 2					
Patelių su ≥ 3					

B.64 JUNGTTINIS KARTOTINĖS DOZĖS TOKSIŠKUMO BANDYMO IR TOKSIŠKUMO REPRODUKCIJAI IR (ARBA) VYSTYMUISI ATRANKOS BANDYMO TYRIMAS

IVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymo gaires (TG) 422 (2016). EBPO cheminėms medžiagoms bandyti skirtos gairės periodiškai peržiūrimos, atsižvelgiant į mokslo pažangą. Pradinės atrankinio tyrimo bandymo gairės 422 buvo priimtos 1996 m. atsižvelgiant į „Jungtinio kartotinės dozės ir reprodukcijos ir (arba) vystymosi atrankos bandymo“ protokolą, aptartą dviejuose ekspertų pasitarimuose Londone 1990 m. (1) ir Tokijuje 1992 m. (2).
2. Šiame bandymo metode sujungta toksiškumo reprodukcijai ir (arba) vystymuisi atrankos dalis, pagrįsta valstybių narių įgyta patirtimi, pradinį metodą taikant didelių gamybos apimčių cheminėms medžiagoms ir atliekant teigiamų kontrolinių medžiagų tiriamuosius darbus (3) (4), ir kartotinės dozės toksiškumo dalis pagal EBPO bandymo gaires 407 (28 dienų graužikų kartotinės dozės toksiškumas per virškinamąjį traktą, atitinka šio priedo B.7 skyrių).
3. Šis bandymo metodas yra atnaujintas įtraukiant vertinamąsias baigtis, susijusias su endokrininę sistemą ardančiomis medžiagomis, ir jis yra tąsa 1998 m. EBPO iniciatyva pradėto didelės svarbos darbo, skirto peržiūrėti esamas gaires ir parengti naujas endokrininę sistemą galimai ardančių medžiagų atrankos ir bandymo gaires (5). Atsižvelgiant į tai TG 407 (atitinka šio priedo B.7 skyrių) buvo išplėstos 2008 m., įtraukiant parametrus, tinkamus bandomųjų cheminių medžiagų endokrininiam aktyvumui aptikti. TG 422 atnaujinimo tikslas buvo įtraukti kai kurias vertinamąsias baigtis, susijusias su endokrininę sistemą ardančiomis medžiagomis, į atrankai skirtas bandymo gaires, kai ekspozicijos laikotarpiai aprėpia kai kuriuos jautres vystymosi laikotarpius (prenatalinius ar ankstyvuosius postnatalinius laikotarpius).
4. Į TG 422 buvo įtrauktos pasirinktos papildomos vertinamosios baigtys, susijusios su endokrininę sistemą ardančiomis medžiagomis, taip pat TG 443 dalis (Išplėstinis toksiškumo vienos kartos dauginimuisi bandymas, atitinkantis šio priedo B.56 skyrių), atsižvelgiant į galimybių studiją, susijusią su baigčių įtraukimo moksliniais ir techniniais klausimais, taip pat su jų įtraukimo į tyrimą bandymų schemas reikiama pakeitimais (6).
5. Šis bandymo metodas skirtas gauti ribotai informacijai apie bandomosios cheminės medžiagos poveikį patinų ir patelių reprodukcijos charakteristikoms, pvz., lytinių liaukų funkcijai, poravimosi elgesiui, apvaisinimui, vystymuisi ir palikuonių atsivedimui. Jis nėra esamų B.31, B.34, B.35 arba B.56 bandymo metodų alternatyva arba pakeitimas.

PRADINIAI ASPEKTAI

6. Vertinant ir nustatant bandomosios cheminės medžiagos toksiškumo charakteristikas, kartotinės dozės toksiškumas per virškinamąjį traktą gali būti nustatomas po to, kai ūmaus toksiškumo bandymais gaunama pradinė informacija. Atliekant šį tyrimą gaunama informacijos apie galimus pavojus sveikatai dėl kartotinės ekspozicijos per palyginti ribotos trukmės laikotarpį. Metodą sudaro pamatinis kartotinės dozės toksiškumo tyrimas, kuris gali būti taikomas cheminėms medžiagoms, kurioms nebūtinai 90 dienų tyrimas (pvz., kai gamybos apimtis neviršija tam tikrų ribų), arba kaip parengiamasis tyrimas prieš ilgalaikį tyrimą. Atliekant tyrimą reikėtų vadovautis pagrindiniais principais ir aspektais, pateiktais EBPO rekomendaciniame dokumente Nr. 19 dėl saugos įvertinimui naudojamų bandymo gyvūnų klinikinių požymių, kaip humaniško poveikio vertinamųjų baigčių, atpažinimo, vertinimo ir naudojimo (7).
7. Be to, jį sudaro toksiškumo reprodukcijai ir (arba) vaisingumui atrankos bandymas, todėl taip pat gali būti taikomas gauti pradinei informacijai apie galimą poveikį vyriškos ir moteriškos lyties reprodukcijos charakteristikoms, pvz., lytinių liaukų funkcijai, poravimosi elgesiui, apvaisinimui, vystymuisi ir palikuonių atsivedimui, arba kaip pradinė bandomųjų cheminių medžiagų toksikologinių savybių vertinimo pakopa, arba apie susirūpinimą keliančias chemines medžiagas. Taikant šį bandymo metodą negaunama išsamios informacijos apie visus reprodukcijos ir vystymosi aspektus. Visų pirma, jis suteikia tik ribotas prenatalinės ekspozicijos postnatalinių reiškinių arba postnatalinės ekspozicijos metu galimai sukulto poveikio aptikimo priemones. Dėl (be kitų priežasčių) vertinamųjų baigčių atrankumo ir trumpos tyrimo trukmės šiuo metodu nebus gauta įrodymų, kad būtų galima tvirtai pareikšti apie poveikio reprodukcijai ir (arba) vystymuisi nebuvimą. Be to, nesant kitų toksiškumo reprodukcijai ir (arba) vystymuisi bandymų duomenų, teigiami rezultatai yra naudingi pradiniam pavojaus vertinimui ir padeda priimti sprendimus dėl papildomų bandymų būtinumo ir trukmės.
8. Rezultatus, gautus taikant su endokrine sistema susijusius parametrus, reikėtų vertinti atsižvelgiant į EBPO konceptualią endokrinę sistemą ardančių cheminių medžiagų bandymo ir vertinimo sistemą (8). Patobulintos EBPO TG 422 pagal šią konceptualią sistemą yra 4 lygmens *in vivo* bandymas, kuriuo gaunami duomenys apie neigiamą poveikį su endokrine sistema susijusioms vertinamosioms baigtims. Tačiau vien tik pats endokrininės sistemos signalas negali būti laikomas pakankamu įrodymu, kad bandomoji cheminė medžiaga yra endokrinę sistemą ardanti medžiaga.
9. Taip pat šiame metode atskirai pažymimas neurologinis poveikis, kaip specifinė vertinamoji baigtis, ir būtinumas atlikti kruopščius gyvūnų klinikinius tyrimus, kad būtų galima gauti kiek įmanoma daugiau informacijos. Šiuo metodu turėtų būti įmanoma identifikuoti neurotoksinį potencialą turinčias chemines medžiagas, ir dėl to gali prireikti papildomai giliau tirti šį aspektą. Be to, metodas gali rodyti imunologinio poveikio pagrindinius požymius.

10. Nesant kitų sisteminio toksiškumo, toksiškumo reprodukcijai ir (arba) vystymuisi, neurotoksiškumo ir (arba) imunotoksiškumo tyrimų duomenų, teigiami rezultatai yra naudingi pradiniam pavojingumo vertinimui ir padeda priimti sprendimus dėl papildomų bandymų būtinumo ir trukmės. Bandymas gali būti ypač naudingas kaip EBPO Patikrinimo informacijos duomenų rinkinio (SIDS), skirto įvertinti esamas chemines medžiagas, apie kurias yra labai mažas toksikologinės informacijos kiekis arba jos nėra, dalis ir gali būti dviejų atskirų kartotinės dozės toksiškumo bandymo (EBPO TG 407, atitinka šio priedo B.7 skyrių) ir toksiškumo reprodukcijai ir (arba) vystymuisi bandymo (EBPO TG 421, atitinka šio priedo B.63 skyrių) atlikimo alternatyva. Jis taip pat gali būti taikomas kaip dozės intervalo nustatymo tyrimas, atliekant išsamesnius reprodukcijos ir (arba) vystymosi tyrimus, arba jei laikoma, kad jis galėtų tikt.
11. Paprastai daroma prielaida, kad skiriasi vaikingų ir neapvaisintų gyvūnų jautrumas. Todėl atliekant šį sudėtinį tyrimą, kuris tinka įvertinti bendrąjį sisteminį toksiškumą ir specifinį toksiškumą reprodukcijai ir (arba) vystymuisi, gali būti sudėtingiau nustatyti dozės lygius nei šiuos bandymus atliekant atskirai. Be to, bendrojo sisteminio toksiškumo bandymų rezultatų aiškinimas gali būti sunkesnis nei atliekant atskirą kartotinės dozės tyrimą, ypač tuo atveju, kai atliekant tyrimą serumo ir histopatologijos parametrai neįvertinami vienu metu. Dėl šių techninių sunkumų reikia turėti didelę toksiškumo bandymų atlikimo patirtį atliekant šį jungtinį atrankos bandymą. Kita vertus, be to, kad naudojama mažiau gyvūnų, sudėtinis bandymas gali būti geresnis būdas atskirti tiesioginį poveikį reprodukcijai ir (arba) vystymuisi nuo poveikių, kurie yra antriniai kitų (sisteminių) poveikių atžvilgiu.
12. Šiame bandyme dozavimo laikotarpis yra ilgesnis nei įprastinis 28 dienų kartotinės dozės tyrimo laikotarpis. Tačiau jį atliekant naudojama mažiau kiekvienos lyties vienos grupės gyvūnų palyginti su situacija, kai įprastinis 28 dienų kartotinės dozės tyrimas atliekamas papildant toksiškumo reprodukcijai ir (arba) vystymuisi atrankos bandymą.
13. Taikant šį bandymo metodą, bandomoji cheminė medžiaga duodama per burną. Gali prireikti pakeitimų, jei naudojami kiti ekspozicijos būdai.
14. Prieš taikant bandymų metodą mišiniui, kad būtų gauti numatomo reglamentavimo tikslui skirti duomenys, reikėtų panagrinėti, ar metodu galima pasiekti tą tikslą atitinkančius rezultatus ir, jei taip, dėl kokios priežasties. Tokie svarstymai nereikalingi, kai yra reglamentavimo reikalavimas bandyti mišinį.
15. Vartojamos apibrėžtys pateiktos 1 priedėlyje.

BANDYMO PRINCIPAS

16. Kelioms patinų ir patelių grupėms duodamos skirtingos bandomosios cheminės medžiagos dozės. Patinai turėtų gauti dozę ne trumpiau kaip keturias savaites, iki pat numarinimo, įskaitant dieną prieš numatytą numarinimą (tai sudaro ne mažiau kaip dvi savaitės iki

poravimosi, poravimosi laikotarpis ir maždaug dvi savaitės po poravimosi). Atsižvelgiant į ribotą dozės davimo patinams laikotarpį, vaisingumas gali ir nebūti tam tikras jautrus toksiškumo sėklidėms rodiklis. Todėl svarbu atlikti išsamų histologinį sėklidžių tyrimą. Manoma, kad dviejų savaitių prieš poravimąsi dozės davimo laikotarpio ir vėlesnių poravimosi ir (arba) vaisingumo stebėjimo rezultatų derinio, esant ne trumpesniam kaip keturių savaitių bendrajam dozės davimo laikotarpiui, ir toliau atlikto išsamaus patinų lytinių liaukų histopatologijos tyrimo pakanka, kad būtų galima aptikti daugumą patinų vaisingumui ir spermatogenezei įtaką darančių veiksnių.

17. Patelės turėtų gauti dozę visą tyrimo laikotarpį. Jį sudaro dvi savaitės iki poravimosi (turint tikslą aprėpti bent du pilnus rujos ciklus), skirtingas laikas iki apvaisinimo, vaikingumo trukmė ir mažiausiai trylika dienų po atsivedimo, iki pat numarinimo, įskaitant dieną prieš numatytą numarinimą.
18. Tyrimo trukmė po aklimatizavimo ir rujos ciklo įvertinimo prieš dozės davimą, priklauso nuo patelių vaisingumo ir yra maždaug 63 dienos (mažiausiai 14 dienų prieš poravimąsi (iki 14 dienų) poravimasis, 22 dienų vaikingumas, 13 dienų žindymas).
19. Dozės davimo laikotarpiu gyvūnai atidžiai stebimi kiekvieną dieną toksiškumo požymiams nustatyti. Bandymo metu nugaišę arba numarinti gyvūnai skrodžiami, o baigus bandymą numarinami ir skrodžiami išgyvenę gyvūnai.

METODO APRAŠYMAS

Gyvūnų rūšies parinkimas

20. Taikant šį bandymo metodą numatyta naudoti žiurkes. Jei TG 422 nurodyti parametrai tiriami naudojant kitą graužikų rūšį, turėtų būti pateiktas išsamus pagrindimas. Vykdamas tarptautinę patvirtinimo programą endokrininę sistemą ardančioms medžiagoms aptikti pagal TG 407, vienintelė naudota rūšis buvo žiurkės. Neturėtų būti naudojamos mažo vaisingumo veislės arba veislės, kurioms dažnai pasireiškia vystymosi defektai. Reikėtų naudoti sveikus neapvaisintus gyvūnus, kurie nebuvo naudojami anksčiau atliekant bandymo procedūras. Reikėtų apibūdinti bandymo gyvūnų rūšį, veislę, lytį, masę ir amžių. Tyrimo pradžioje naudojamų gyvūnų masės skirtumas turėtų būti kuo mažesnis ir būti ne didesnis kaip $\pm 20\%$ kiekvienos lyties gyvūno vidutinės masės. Jei tyrimas atliekamas kaip ilgalaikio ar visos kartos tyrimo parengiamasis tyrimas, būtų gerai abiems tyrimams naudoti tos pačios veislės ir šaltinio gyvūnus.

Laikymas ir šėrimas

21. Visos procedūros turėtų atitikti vietinius laboratorinės gyvūnų priežiūros reikalavimus. Bandymo gyvūnų patalpos temperatūra turėtų būti $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 3^{\circ}$). Santykinė oro drėgmė turėtų būti ne mažesnė kaip 30% ir pageidautina, kad būtų ne didesnė kaip 70% , išskyrus patalpos plovimo laiką. Apšvietimas turėtų būti dirbtinis, 12 h dienos šviesos ir 12 h

tamsos. Gyvūnams šerti tinka įprastas laboratorijose naudojamas pašaras, neribojant geriamojo vandens kiekio. Pašaro pasirinkimui gali turėti įtakos būtinybė tinkamai įmaišyti bandomąją cheminę medžiagą, duodamą pagal šį metodą.

22. Gyvūnai turėtų būti apgyvendinti nedidelėmis tos pačios lyties grupėmis; gyvūnus galima laikyti atskirai, jei tai būtų moksliskai pagrįsta. Laikant grupėmis, viename narvelyje turėtų būti ne daugiau kaip penki gyvūnai. Poravimo procedūros turėtų būti atliekamos šiam tikslui pritaikytuose narveliuose. Vaikingos patelės turėtų būti laikomos atskiruose narveliuose ir turėti gūžtai įsirengti būtinų medžiagų. Žindančios patelės laikomos atskiruose narveliuose su savo palikuoniais.
23. Pašarus reikėtų nuolat analizuoti dėl teršalų buvimo. Pašaro ėminys turėtų būti saugomas, kol bus parengta ataskaita.

Gyvūnų ruošimas

24. Sveiki jauni suaugę gyvūnai atsitiktinai paskirstomi ir priskiriami apdorojimo grupėms ir narveliams. Narvelius reikėtų išdėstyti taip, kad narvelio vietos įtaka būtų kiek įmanoma mažesnė. Gyvūnai unikaliai identifikuojami ir ne mažiau kaip penkias paras iki tyrimo pradžios laikomi savo narveliuose, kad priprastų prie laboratorinių sąlygų.

Dozių ruošimas

25. Bandomąją cheminę medžiagą rekomenduojama duoti per burną, nebent būtų laikoma, kad labiau tinka kiti davimo būdai. Jei pasirenkamas davimo per burną būdas, bandomoji cheminė medžiaga paprastai duodama per zondą, tačiau bandomąsias chemines medžiagas taip pat galima duoti su pašaru arba geriamuoju vandeniu.
26. Jei būtina, bandomoji cheminė medžiaga ištirpinama tinkamame nešiklyje arba ruošiamą jos suspensija. Rekomenduojama, jeigu įmanoma, pirmenybę teikti vandeniniam tirpalui arba suspensijai, tada svarstyti galimybę naudoti aliejaus (pvz., kukurūzų) tirpalą arba suspensiją ir tik po to – galimybę naudoti tirpalus kituose nešikliuose. Jei nešiklis yra ne vanduo, turėtų būti žinomos jo toksiškumo charakteristikos. Reikėtų nustatyti bandomosios cheminės medžiagos stabilumą ir vienalytiškumą nešiklyje.

PROCEDŪRA

Gyvūnų skaičius ir lytis

27. Rekomenduojama kiekvienos grupės bandymą pradėti turint ne mažiau kaip 10 patinų ir 12–13 patelių. Prieš ekspozicijos pradžią įvertinamas patelių rujos cikliškumas, ir gyvūnai, kurių ciklas nėra 4–5 dienos, neįtraukiami į tyrimą, todėl rekomenduojama turėti papildomų patelių, kad kiekvienoje grupėje liktų 10 patelių. Manoma, kad, išskyrus aiškaus toksinio poveikio atvejį, kiekvienoje grupėje bus mažiausiai 8 vaikingos patelės, ir tai paprastai yra mažiausias priimtinas vaikingų patelių skaičius kiekvienoje grupėje.

Tikslas yra gauti pakankamą vaikingų patelių ir palikuonių skaičių, kad būtų galima pagrįstai įvertinti bandomosios cheminės medžiagos gebėjimą daryti poveikį vaisingumui, vaikingumui, patelės ir žindomo palikuonio elgesiui bei F₁ kartos palikuonių augimui ir vystymuisi nuo apvaisinimo iki 13 paros po atsivedimo. Jei planuojami tarpiniai skrodimai, gyvūnų skaičius turėtų būti padidintas tiek, kiek numatyta numarinti gyvūnų iki tyrimo pabaigos. Turėtų būti apsvaistoma galimybė į kontrolinę grupę ir didžiausiajai dozei skirtą grupę įtraukti po vieną papildomą pagalbinę penkių kiekvienos lyties gyvūnų grupę, kad ne mažiau kaip 14 dienų po apdorojimo būtų galima stebėti sisteminio toksinio poveikio grįžtamumą, tvarumą arba vėlavimą. Pagalbinės grupės gyvūnai nebūtų poruojami, todėl nenaudojami vertinant toksiškumą reprodukcijai ir (arba) vystymuisi.

Dozavimas

28. Paprastai turėtų būti ne mažiau kaip trys bandymo grupės ir viena kontrolinė grupė. Jei nėra tinkamų bendrojo toksiškumo duomenų, gali būti atliktas intervalo nustatymo tyrimas (naudojant tos pačios veislės ir iš to paties šaltinio gautus gyvūnus), kuris padėtų nustatyti naudotinas dozes. Išskyrus apdorojimą bandomąja chemine medžiaga, su kontrolinių grupių gyvūnais turėtų būti elgiamasi taip pat, kaip su apdorojimo grupių gyvūnais. Jeigu duodant bandomąją cheminę medžiagą naudojamas nešiklis, kontrolinė grupė turėtų gauti didžiausią naudotą nešiklio kiekį.
29. Dozių dydžiai turėtų būti pasirinkti atsižvelgiant į visus turimus toksiškumo ir (toksiko)kinetinius duomenis. Taip pat reikėtų atsižvelgti į tai, kad vaikingų ir neapvaisintų gyvūnų jautrumas gali skirtis. Didžiausiąją dozę reikėtų pasirinkti turint tikslą sukelti toksinį poveikį, bet ne gyvūno žūtį ar akivaizdžias kančias. Toliau reikėtų pasirinkti mažėjančių dozės dydžių seką, siekiant parodyti su dozavimu susijusį atsaką ir nepastebėto neigiamo poveikio ribą (NOAEL), esant mažiausiai dozei. Paprastai optimalūs dozių skirtumo intervalai yra nuo dviejų iki keturių kartų, ir dažnai vietoj didelių intervalų tarp dozių (pvz., daugiau kaip 10 kartų) geriau naudoti papildomą ketvirtą bandymo grupę.
30. Jei stebimas bendrasis toksiškumas (pvz., mažesnė kūno masė, poveikis kepenims, širdžiai, plaučiams arba inkstams ir kt.) arba kiti pakitimai, kurie gali nebūti toksiškumo atsakais (pvz., mažesnis pašaro vartojimas, kepenų padidėjimas), stebimas poveikis jautrioms endokrininės sistemos vertinamosioms baigtims turėtų būti aiškinamas atsargiai.

Ribinis bandymas

31. Jei atliekant per burną duodamos vieno dydžio dozės tyrimą pagal šiam tyrimui aprašytas procedūras, duodama ne mažesnė kaip 1000 mg/kg kūno masės per parą dozė arba, jei duodama su pašaru, atitinkamą pašaro ar geriamo vandens procentinę dalį sudaranti dozė (pagal nustatytą kūno masę) nesukelia pastebimo toksinio poveikio ir jei toksinio poveikio nesitikima, atsižvelgiant į giminingos struktūros medžiagoms gautus duomenis, visas bandymas naudojant kelių dydžių dozes gali būti nebūtinas. Ribinis bandymas atliekamas,

išskyrus atvejus, kai žmonių ekspozicijos būdas rodo, kad duodamos dozės turi būti didesnės. Jei duodama kitais būdais, pvz., įkvepiama arba dedama ant odos, didžiausią galimą ekspozicijos koncentraciją dažnai gali lemti bandomųjų cheminių medžiagų fizikinės ir cheminės savybės.

Dozių davimas

32. Gyvūnai gauna bandomosios cheminės medžiagos dozę kasdien 7 dienas per savaitę. Jei bandomoji cheminė medžiaga duodama per zondą, gyvūnams turėtų būti duodama viena dozė per skrandžio zondą arba per tinkamą intubacinį vamzdelį. Didžiausias gyvūnui duodamas vienkartinis skysčio tūris priklauso nuo bandymo gyvūno dydžio. Tūris neturėtų būti didesnis kaip 1 ml/100 g kūno masės, išskyrus vandeninius tirpalus, kurių galima duoti po 2 ml/100 g kūno masės. Išskyrus dirginančias arba ėsdinančias bandomąsias chemines medžiagas, kurios, būdamos didesnės koncentracijos, paprastai sukelia sunkesnę poveikį, bandymo tūrio kintamumas turėtų būti kiek įmanoma mažesnis keičiant koncentraciją taip, kad visų dydžių dozių tūris būtų vienodas.
33. Jei bandomosios cheminės medžiagos duodamos su pašaru ar geriamuoju vandeniu, svarbu užtikrinti, kad naudojami bandomosios cheminės medžiagos kiekiai nekeltų trukdžių normaliai mitybai arba vandens pusiausvyrai. Jei bandomoji cheminė medžiaga duodama su pašaru, galima naudoti pastovią koncentraciją pašaruose (ppm) arba pastovaus dydžio dozę pagal gyvūno kūno masę; pasirinktą variantą reikėtų nurodyti. Jei bandomoji cheminė medžiaga duodama per zondą, dozė turėtų būti duodama kiekvieną dieną panašiu laiku ir koreguojama mažiausiai kartą per savaitę pastoviam dozės ir gyvūno kūno masės santykiui užtikrinti. Jei jungtinis tyrimas naudojamas kaip ilgalaikio ar išsamaus toksiškumo reprodukcijai tyrimo parengiamasis tyrimas, abiem tyrimams reikėtų naudoti panašų pašarą.

Bandymo tvarkaraštis

34. Dozės reikėtų pradėti duoti abiejų lyčių gyvūnams 2 savaites prieš poravimąsi, po to, kai jie buvo aklimatizuojami ne trumpiau kaip penkias dienas, ir patelės atrinktos pagal normalius rujos ciklus (2 savaitžių laikotarpį prieš apdorojimą). Tyrimo tvarkaraštis turėtų būti sudarytas taip, kad rujos ciklo įvertinimas prasidėtų netrukus po to, kai gyvūnai pasiekia visišką lytinę brandą. Jos laikas gali šiek tiek skirtis skirtingoms žiurkių veislėms skirtingose laboratorijose, pvz., *Sprague Dawley* žiurkės subręsta 10 savaitžių amžiaus, *Wistar* žiurkės – maždaug 12 savaitžių amžiaus. Patelės su palikuoniais reikėtų numarinti 13 dieną po atsivedimo arba šiek tiek vėliau. Jei patelės turėtų negauti pašaro per naktį prieš kraujo ėminių ėmimą (pasirinkus tokį variantą), patelės ir jų palikuoniai nebūtinai turi būti numarinami tą pačią dieną. Gimimo diena (t. y., kai baigiama atsivesti) nustatoma kaip 0 diena po atsivedimo. Patelės, kurios nerodo poravimosi požymių, numarinamos po 24–26 dienų nuo paskutinės poravimosi laikotarpio dienos. Dozės toliau duodamos abiejų lyčių gyvūnams visą poravimosi laikotarpį. Patinams reikėtų duoti dozę po poravimosi

laikotarpio ne trumpiau kaip iki viso 28 dienų dozavimo laikotarpio pabaigos. Patinai numarinami arba, jei manoma, kad juos galima poruoti dar kartą, paliekami ir jiems toliau duodama dozė.

35. Dozės turėtų būti duodamos motininėms patelėms kasdien visą vaikingumo laikotarpį ir ne trumpiau kaip iki 13 dienos po atsivedimo, įskaitant ir tą dieną, arba likus dienai iki numarinimo. Jei tyrimai atliekami bandomąją cheminę medžiagą duodant įkvėpti arba ją dedant ant odos, dozė turėtų būti duodama ne trumpiau kaip iki 19 dienos nuo vaikingumo pradžios, įskaitant ją, ir davimą reikėtų atnaujinti kiek įmanoma greičiau, bet ne vėliau kaip 4 dieną po atsivedimo (PND).
36. Jei įtraukta pagalbinė grupė, jos gyvūnai, numatyti vėlesniems stebėjimams, neporuojami. Jie turėtų būti laikomi be apdorojimo dar ne trumpiau kaip 14 dienų po pirmojo patelių numatyto numarinimo, kad būtų galima aptikti toksinio poveikio vėlavimą, tvarumą arba atsigavimą nuo jo.
37. Bandymo tvarkaraščio schema pateikta 2 priedėlyje.

Rujos ciklai

38. Rujos ciklus reikėtų stebėti prieš apdorojimo pradžią, kad tyrimui būtų atrinktos patelės, turinčios reguliarių cikliškumą (žr. 27 pastraipą). Makšties tepinėlius taip pat reikėtų stebėti kasdien nuo apdorojimo laikotarpio pradžios iki poravimosi įrodymų gavimo. Jei yra susirūpinimas dėl ūminio streso poveikio, kuris galėtų pakeisti rujos ciklus, pradėjus duoti dozes, laboratorijos gali veikti bandymo gyvūnus medžiaga 2 savaites, tada kasdien imti makšties tepinėlius, kad rujos ciklas būtų stebimas mažiausiai dvi savaites prieš poravimosi laikotarpį ir stebėjimas tęsiamas poravimosi laikotarpiu iki poravimosi įrodymų gavimo. Makšties ar gimdos kaklelio ląsteles reikėtų imti atsargiai, kad nebūtų pažeista gleivinė ir tokiu būdu nebūtų sukeltas netikras vaikingumas (8) (9).

Poravimo procedūra

39. Atliekant šį tyrimą paprastai reikėtų poruoti 1: 1 (vienas patinas ir viena patelė). Išimčių gali būti dėl atsitiktinai žuvusių patinų. Patelė turėtų būti laikoma su tuo pačiu patinu tol, kol atsiranda poravimosi požymiai, arba praeina dvi savaitės. Kiekvieną rytą patelės turėtų būti tiriamos, ieškant spermos arba makšties kamščio. 0 vaikingumo diena apibrėžiama kaip diena, kurią patvirtinamas poravimosi faktas (randamas makšties kamštis arba spermos). Jei poravimas buvo nesėkmingas, galima būtų spręsti dėl pakartotino patelių poravimo su patikrintais tos pačios grupės patiniais.

Vados dydis

40. 4 dieną po atsivedimo kiekvienos vados dydį galima koreguoti, šalinant perteklinius jauniklius atsitiktinės atrankos būdu, kad būtų gautas kiek įmanoma vienodesnis keturių ar penkių vienos lyties jauniklių vienai vada skaičius, priklausomai nuo normalaus naudotos

žiurkių veislės vados dydžio. Reikėtų paimti dviejų perteklinių jauniklių kraujo ėminius, juos sujungti ir naudoti serumo T4 koncentracijos nustatymui. Atrankusis jauniklių šalinimas, pvz., pagal kūno masę arba anogenitalinį atstumą (AGD), netinka. Jei neįmanoma vienoje vadoje turėti po keturis ar penkis kiekvienos lyties jauniklius, priimtinas dalinis jauniklių skaičiaus koregavimas (pvz., šeši patinai ir keturios patelės). Jaunikliai nešalinami, kai vados dydis yra mažesnis nei brokavimo tikslinė vertė (8 ar 10 jauniklių vienai vadai). Jei vadoje tik vienu jaunikliu daugiau nei brokavimo tikslinė vertė, jis šalinamas ir naudojamas kraujui paimti, kad būtų galima atlikti serumo T4 vertinimą.

41. Jei vados dydis nekoreguojamas, du jaunikliai vienai vadai numarinami 4 dieną po gimimo ir imami jų kraujo ėminiai serumo skydliaukės hormono koncentracijai matuoti. Jei įmanoma, šie du jaunikliai vienai vadai turėtų būti patelės, kad jauniklius patinus būtų galima pasilikti spenelių išlikimo įvertinimui, išskyrus atvejus, kai pašalinus šias pateles jų nelieka vertinimui tyrimo pabaigoje. Jaunikliai nešalinami, jei vados dydis būtų mažesnis kaip 8 ar 10 jauniklių vienai vadai (priklausomai nuo normalaus naudotos žiurkių veislės vados dydžio). Jei vadoje tik vienu jaunikliu daugiau nei normalioje vadoje, jis šalinamas ir naudojamas kraujui paimti, kad būtų galima atlikti serumo T4 vertinimą.

Stebėjimų rezultatai

42. Bendrus klinikinius stebėjimus reikia atlikti mažiausiai kartą per dieną, pageidautina kartą ar kelis kartus kasdien tuo pačiu laiku, atsižvelgiant į didžiausio numatomo poveikio laiką po dozės davimo. Gyvūnų sveikatos būklė turėtų būti registruojama. Bent du kartus per dieną visi gyvūnai turėtų būti patikrinami, ar jie sveiki ir nenugaišę.
43. Kartą prieš pirmosios ekspozicijos pradžią (kad būtų galima palyginti tą patį gyvūną) ir bent kartą per savaitę po dozės davimo turėtų būti atliekami išsamūs visų tėvų kartos gyvūnų klinikiniai stebėjimai. Kiekvieną dieną šiuos stebėjimus reikėtų atlikti tuo pačiu metu, perkėlus gyvūną iš narvo į tam skirtą vietą. Jų rezultatai turėtų būti kruopščiai registruojami, pageidautina naudojant įvertinimo balais sistemas, aiškiai apibrėžtas bandymų laboratorijos. Turėtų būti dedamos pastangos, kad bandymo sąlygų kaita būtų kuo mažesnė, ir pageidautina, kad šiuos stebėjimus atliktų stebėtojai, kurie nežinotų, ar buvo apdorojama. Registruojami požymiai turėtų aprėpti odos, kailio, akių, gleivinės pakitimus, išskyrų, išmatų, autonominio aktyvumo (pvz., ašarojimo, plaukų pašiaušimo, vyzdžio dydžio, neįprasto kvėpavimo) buvimą ir kitus dalykus. Taip pat turėtų būti registruojami eisenos, pozos, atsako į tvarkymo veiksmus pakitimai, traukulių arba toninių judesių atsiradimas, stereotipijos požymiai (pvz., besaikis valymasis, pasikartojantis sukimasis ratu), sunkus arba ilgalaikis atsivedimas arba keistas elgesys (pvz., savęs luošinimas, ėjimas atbulomis) (10).
44. Vieną kartą tyrimo metu reikėtų atlikti penkių patinų ir penkių patelių, atsitiktinai atrinktų iš kiekvienos grupės, jutiminės reakcijos į skirtingų rūšių dirgiklius (pvz., klausos, regos ir proprioceptorių dirgiklius) (8) (9) (11), sugriebimo stiprumo (12) ir judėjimo aktyvumo

(13) vertinimą. Išsamesnės informacijos apie procedūras, kurios galėtų būti taikomos, pateikta atitinkamuose literatūros šaltiniuose. Tačiau taip pat galėtų būti taikomos čia nurodytoms procedūroms alternatyvios procedūros. Šie funkciniai patinų stebėjimai turėtų būti atliekami baigiantis dozės davimo jiems laikotarpiui, prieš pat numatytą numarinimą, bet prieš hematologijai ar klinikinei chemijai skirtų kraujo ėminių ėmimą (žr. 53–56 pastraipas, įskaitant 1 išnašą). Šių funkcinių bandymų metu patelės turėti būti fiziologiškai panašios būsenos ir jų funkcinius bandymus reikėtų vieną kartą atlikti paskutinę žindymo savaitę (pvz., 6–13 žindymo dieną), netrukus prieš numatytą numarinimą. Kiek įmanoma reikėtų mažinti patelių ir jauniklių atskyrimo trukmę.

45. Vieną kartą prieš tyrimų pabaigą atliekami funkciniai stebėjimai nebūtini, kai tyrimas atliekamas kaip vėlesnio pusiau lėtinio (90 dienų) arba ilgalaikio toksiškumo tyrimo parengiamasis tyrimas. Tokiu atveju funkciniai stebėjimai turėtų būti įtraukiami į šį tolesnį tyrimą. Kita vertus, tokie funkciniai stebėjimai atliekant kartotinės dozės tyrimą suteikia didesnę galimybę geriau parinkti dozių dydžius tolesniam pusiau lėtinio arba ilgalaikio toksiškumo tyrimui.
46. Išimtiniais atvejais funkcinių stebėjimų galima neatlikti ir su tomis grupėmis, kurių toksiškumo požymiai tokio laipsnio, kad jie labai trukdytų atlikti funkcinius bandymus.
47. Gestacijos trukmė turėtų būti registruojama ir pradedama skaičiuoti nuo 0 nėštumo dienos. Kiekviena vada turėtų būti apžiūrėta kiek įmanoma greičiau po atsivedimo siekiant nustatyti jauniklių skaičių ir lytį, gimusių negyvų ir gimusių gyvų jauniklių skaičių, silpnuosius jauniklius (jauniklius, kurie yra gerokai mažesni už atitinkamus kontrolinius jauniklius) ir dideles anomalijas.
48. Gyvi jaunikliai turėtų būti suskaičiuojami ir jų lytis nustatoma per 24 h nuo atsivedimo (0 dieną arba 1 dieną po atsivedimo) ir bent 4 ir 13 dieną po atsivedimo. Be tėvų kartos gyvūnų stebėjimų (žr. 43 ir 44 pastraipas), reikėtų registruoti visus jauniklių nenormalaus elgesio pasireiškimus.
49. Kiekvieno jauniklio anogenitalinis atstumas (AGD) turėtų būti matuojamas tą pačią dieną po gimimo tarp PND 0 ir PND 4. Jauniklio kūno masės duomenis reikėtų gauti tą pačią dieną, kurią matuojamas AGD, ir AGD turėtų būti norminamas pagal jauniklio dydį, ir būtų gerai, kad AGD būtų lygus kubinei šakniai iš kūno masės (14). Jauniklių patinų spenelius ir (arba) areoles reikėtų suskaičiuoti PND 12 arba 13 dieną, kaip rekomenduojama EBPO GD 151 (15).

Kūno masė ir pašaro bei vandens suvartojimas

50. Patinus ir pateles reikėtų sverti pirmąją dozės davimo dieną, ne rečiau kaip kas savaitę vėliau ir tyrimo pabaigoje. Vaikingumo laikotarpiu pateles reikėtų sverti 0, 7, 14 ir 20 dieną ir per 24 valandas po atsivedimo (0 arba 1 diena po atsivedimo) ir bent 4 ir 13 dieną

po atsivedimo. Šie rezultatai turėtų būti pateikiami ataskaitoje atskirai apie kiekvieną suaugusį gyvūną.

51. Pašaro suvartojimą prieš poravimąsi, vaikingumo ir žindymo metu reikėtų matuoti mažiausiai kartą per savaitę. Pašaro suvartojimą poravimosi metu matuoti nebūtina. Vandens suvartojimas šiais laikotarpiais taip pat turėtų būti matuojamas, kai bandomoji cheminė medžiaga yra duodama su šia terpe.

Hematologija

52. Vieną kartą tyrimo metu reikėtų atlikti tokius penkių patinų ir penkių patelių, atsitiktinai atrinktų iš kiekvienos grupės, hematologinius tyrimus: hematokrito, hemoglobino koncentracijos, eritrocitų kiekio, retikulocitų, bendrojo leukocitų kiekio ir leukocitų formulės, trombocitų kiekio ir kraujo krešėjimo trukmės ir aktyvumo. Jei įtariama, kad bandomoji cheminė medžiaga arba jos numanomi metabolitai turi oksidacinių savybių, turėtų būti nustatyti ir kiti rodikliai, įskaitant metemoglobino koncentraciją ir Heino kūnelius.
53. Kraujo ėminiai turėtų būti imami iš nurodytos vietos. Ėminių ėmimo metu patelės turėtų būti fiziologiškai panašios būsenos. Siekiant išvengti praktinių sunkumų, susijusių su gestacijos pradžios kintamumu, vietoj patelių kraujo ėminių ėmimo prieš pat gyvūnų numarinimą arba numarinimo procedūros metu, juos būtų galima imti baigiantis laikotarpiui prieš poravimąsi. Patinų kraujo ėminius geriausia būtų imti prieš pat gyvūnų numarinimą arba numarinimo procedūros metu. Arba patinų kraujo ėminius taip pat būtų galima imti baigiantis laikotarpiui prieš poravimąsi, jei šis laiko momentas laikomas tinkamiausiu patelėms.
54. Kraujo ėminius reikėtų laikyti tinkamomis sąlygomis.

Klinikinė biochemija

55. Klinikiniai biocheminiai nustatymai tiriant pagrindinius toksinius poveikius audiniams, ypač inkstams bei kepenims, turėtų būti atliekami imant kiekvienos grupės penkių patinų ir

penkių patelių kraują. Rekomenduojama prieš kraujo ėmimą gyvūnų per naktį nešerti¹. Atliekant plazmos arba serumo tyrimus turėtų būtų nustatomas: natriis, kalis, gliukozė, suminis cholesterolis, karbamidas, kreatininas, suminis baltymų kiekis ir albuminas, mažiausiai du fermentai, rodantys poveikį kepenų ląstelėms (pvz., alaninaminotransferazė, aspartataminotransferazė ir sorbitoldehidrogenazė) ir tulžies rūgštys. Tam tikromis aplinkybėmis naudingos informacijos gali suteikti papildomi fermentų (kepenų arba kitokios kilmės) ir bilirubino tyrimai.

56. Kraujo ėminiai iš nustatytos vietos imami pagal tokį tvarkaraštį:

- ne mažiau kaip dviejų jauniklių iš kiekvienos vados 4 dieną po gimimo, jei pakanka jauniklių skaičiaus (žr. 40–41 pastraipas)
- visų patelių, ne mažiau kaip dviejų jauniklių iš kiekvienos vados 13 dieną tyrimo pabaigoje, ir
- visų suaugusių patinų tyrimo pabaigoje.

Visi kraujo ėminiai laikomi tinkamomis sąlygomis. 13 dienų jauniklių ir suaugusių patinų kraujo ėminiai vertinami dėl skydliaukės hormonų (T4) koncentracijos serume. Papildomai nustatomas T4 kiekis patelių ir 4 dienų jauniklių kraujo ėminiuose, jei reikia. Be to, galima pasirinkti matuoti kitus hormonus, jei tinka. Vienos vados jauniklių kraujo ėminius galima sujungti atliekant skydliaukės hormonų analizę. Skydliaukės hormonus (T4 ir TSH) reikėtų matuoti kaip „suminį kiekį“.

57. Paskutinę tyrimo savaitę (neprivalomai) gali būti atliekami kiekvienos grupės penkių atsitiktinai atrinktų patinų šlapimo tyrimai, nustatytu laiku imant tam tikrą šlapimo tūrį ir tiriant: išvaizdą, kvapą, tūrį, osmolialumą arba savitąjį tankį, pH, baltymus, gliukozę ir kraują (kraujo kūnelius).

58. Be to, būtų galima numatyti tyrimus bendrų audinių pažeidimų serumo rodikliams nustatyti. Jei žinomos ar įtariamos bandomosios cheminės medžiagos savybės gali daryti

¹ Atliekant kai kuriuos serumo ir plazmos matavimus, ypač gliukozės, pageidautina, kad gyvūnai naktį prieš ėminių ėmimą negautų pašaro. Pagrindinė tokios pirmenybės teikimo priežastis yra padidėjęs kintamumas, kuris neišvengiamai būtų, jei gyvūnai būtų šeriami, galėtų slėpti sunkiau pastebimą poveikį ir būtų sunku aiškinti rezultatus. Tačiau, kita vertus, naktį nešeriant gyvūnų gali būti (vaikinių) gyvūnų bendrosios medžiagų apykaitos trukdžių, trikdoma laktacija ir žindymo elgesys, ir ypač atliekant šėrimo tyrimus, gali būti trikdomas kasdienio veikimo bandomąja chemine medžiaga būdas. Jei būtų nuspręsta nešerti gyvūnų per naktį, klinikiniai biocheminiai tyrimai turėtų būti atliekami atlikus patinų funkcinis stebėjimus 4 tyrimo savaitę. Pateles reikėtų palikti papildomai dienai po jauniklių atjunkymo (pvz., PND 13). Patelių reikėtų nešerti per naktį iš 13 į 14 žindymo dieną ir numarinimo metu paimtą kraują naudoti klinikinės chemijos parametrams nustatyti.

įtaką susijusiems medžiagų apykaitos eigai, galima atlikti kalcio, fosfato, trigliceridų ir gliukozės nešerus, specifinių hormonų, metemoglobino bei cholinesterazės analizę. Būtinumas tai atlikti turi būti nustatomas kiekvieną kartą atskirai.

59. Hormonų nustatymo rezultatų kintamumui ir absoliučiajai koncentracijai gali turėti įtakos šie veiksniai:

- numarinimo laikas – dėl hormonų koncentracijos kitimo paros metu;
- numarinimo būdas, siekiant išvengti per didelio streso, galinčio turėti įtakos hormonų koncentracijai,
- hormonų nustatymui skirti bandymo rinkiniai, kuriais gautos kalibravimo kreivės gali skirtis.

60. Hormonų nustatymui specialiai skirti plazmos ėminiai turėtų būti imami panašiu dienos metu. Naudojant įvairius prekyboje esančius bandymo rinkinius, skiriasi gautos analizuojamų hormonų koncentracijos skaitinės vertės.

61. Jei pamatinių istorinių duomenų nepakanka, turėtų būti apsvaistyta galimybė nustatyti hematologinius ir klinikinius biocheminius kintamuosius prieš pradėdant duoti dozes arba, tai geriau atlikti naudojant gyvūnų grupę, neįtrauktą į bandymo grupes. Patelių atvejų tyrimui imami žindančių gyvūnų duomenys.

PATOLOGIJA

Bendroji nekroskopija

62. Turėtų būti atliekamas išsamus visų bandomųjų gyvūnų bendrasis skrodimas, atidžiai ištiriant kūno paviršių ir visas jo angas, kaukolės, krūtinės ląstos, pilvo ertmės ir jų turinį. Ypatingas dėmesys turėtų būti skiriamas reprodukcijos sistemos organams. Reikėtų registruoti implantacijos vietų skaičių. Makšties tepinėliai turėtų būti tiriami skrodimo dienos ryte, kad būtų galima nustatyti rujan ciklo stadiją ir koreliaciją su patelės reprodukcijos organų histopatologija.

63. Nuo visų suaugusiųjų patinų sėklidžių, sėklidžių prielipų, taip pat prostatos ir sėklinių pūslelių su koaguliatorių liaukomis, kaip visumos, reikėtų pašalinti visus priaugusius audinius, jei yra, ir po skrodimo kuo greičiau pasverti drėgnos būsenos, kad būtų išvengta džiūvimo. Be to, papildomai galėtų būti nustatoma patinų išangės pakeliamojo ir stormeninio akytkūnio raumens, abiejų Kuperio liaukų ir varpos galvos masė, patelių – porinių kiaušidžių (drėgno organo masė) ir gimdos (įskaitant gimdos kaklelį) masė; jei šios masės įtraukiamos, jos turėtų būti nustatytos kuo greičiau po skrodimo. Reikėtų konservuoti visų suaugusiųjų gyvūnų kiaušides, sėklides, papildomus lytinius organus ir visus organus, turinčius makroskopinių pažeidimų.

64. Visų suaugusiųjų patinų ir patelių bei kiekvienos vados vieno 13 dienos jauniklio patino ir patelės skydliaukės turėtų būti konservuojamos tinkamiausioje fiksavimo terpėje, kad vėliau būtų galima atlikti numatytą histopatologinį tyrimą. Skydliaukės masę galima nustatyti atlikus fiksavimą. Valyti (apipjaustyti) taip pat reikėtų labai atsargiai ir tik atlikus fiksavimą, kad nebūtų pažeistas audinys. Pažeidus audinį gali būti gauti netikslūs histopatologinės analizės rezultatai. Kraujo ėminiai turėtų būti imami iš nurodytos vietos prieš pat gyvūnų numarinimą arba numarinimo procedūros metu ir saugomi tinkamomis sąlygomis (žr. 56 pastraipą).
65. Be to, atsitiktinai iš kiekvienos grupės atrinktų penkių suaugusiųjų patinų ir patelių (neskaitant gaištančių ir (arba) numarintų iki tyrimo pabaigos) kepenys, inkstai, antinksčiai, užkrūčio liauka, blužnis, smegenys ir širdis turėtų būti nuvalyti pašalinant priaugusius audinius, jei yra, ir kuo greičiau pasverti drėgnos būsenos, kad būtų išvengta džiūvimo. Naudojant audiniui ir vėlesniam histopatologiniam tyrimui tinkamiausią fiksavimo terpę, reikėtų konservuoti šiuos audinius: visus labai pažeistus audinius, smegenis (jų būdingiausias dalis – didžiąsias smegenis, smegenėles ir smegenų tiltą), nugaros smegenis, akis, skrandį, mažąsias ir didžiąsias žarnas (taip pat Peyerio plokšteles), kepenis, inkstus, antinksčius, blužnį, širdį, užkrūčio liauką, trachėją ir plaučius (įleidžiant fiksatyvo ir tada panardinant), lytines liaukas (sėklides ir kiaušides), papildomus lytinius organus (gimdą, gimdos kaklelį, sėklidžių prielipus, prostatą ir sėklinės pūsleles su koaguliatorių liaukomis), makštį, šlapimo pūslę, limfinius mazgus (be artimiausio drenažinio mazgo, remiantis geriausią laboratorine patirtimi paimamas dar vienas mazgas (16)), periferinį nervą (sėdimąjį arba blauzdikaulio), pageidautina, esantį arti raumens, skeleto raumenis ir kaulus su kaulų čiulpais (išpjovą arba šviežiai paruoštą kaulų čiulpų punkciją). Rekomenduojama atlikti sėklidžių fiksavimą jas panardinant į Bouino arba modifikuotą Davidsono fiksatyvą (16) (17) (18). Šių audinių nerekomenduojama fiksuoti formaline. Abu *tunica albuginea* galus galima atsargiai ir negiliai pradurti adata, kad fiksatyvas galėtų greitai prasiskverbti. Atsižvelgiant į gautus klinikinių tyrimų ir kitus rezultatus, gali tekti tirti papildomus audinius. Be to, atsižvelgiant į žinomas bandomosios cheminės medžiagos savybes, turėtų būti konservuojami visi numanomi tiksliniai organai.
66. Vertingos informacijos apie poveikį endokrininei sistemai galima gauti tiriant šiuos audinius: lytines liaukas (kiaušides ir sėklides), papildomus lytinius organus (gimdą ir gimdos kaklelį, sėklidžių prielipus, sėklinės pūsleles su koaguliatorių liaukomis, dorsolateralinę ir pilvinę prostatą), makštį, hipofizį, patinų pieno liauką ir antinksčių liauką. Patinų pieno liaukų pakitimai nėra pakankamai dokumentuoti, bet šis parametras gali būti labai jautrus estrogeniškai veikiančioms medžiagoms. Į 65 pastraipą neįtrauktų organų ir (arba) audinių stebėjimas nėra būtinas.
67. Negyvi jaunikliai ir 13 dieną po atsivedimo arba šiek tiek vėliau numarinti jaunikliai turėtų būti bent kruopščiai apžiūrėti išoriškai dėl didelių anomalijų. Ypatingą dėmesį reikėtų

atkreipti į išorinius lytinio dauginimosi organus, kuriuos reikėtų ištirti dėl pakitusio vystymosi požymių.

Histopatologija

68. Turėtų būti atliekami išsamūs histopatologiniai kontrolinių ir didelės dozės grupių pasirinktų gyvūnų užkonservuotų organų ir audinių tyrimai (ypač kreipiant dėmesį į patinų lytinių liaukų spermatogenezės stadijas ir sėklidžių intersticinių ląstelių struktūros histopatologiją). Jei būtina, galima ištirti jauniklių ir likusių suaugusiųjų gyvūnų skydliaukę. Jei su ekspozicija susijusių pakitimų nustatoma didžiausiąją dozę gavusioje grupėje, reikėtų išanalizuoti ir kitas dozes gavusių gyvūnų grupes. Histopatologinių tyrimų gairėse (10) pateikta išsamios papildomos informacijos apie skrodimą, fiksavimą, pjautymą ir endokrininių audinių histopatologiją.
69. Turėtų būti ištirti visi makroskopiniai pažeidimai. Siekiant padėti nustatyti NOAEL, reikėtų tirti kitų dozių grupių tikslinius organus, ypač tų grupių, kurios nurodomos kaip rodančios NOAEL.
70. Jei naudojama pagalbinė grupė, reikėtų atlikti audinių ir organų, poveikis kuriems buvo nustatytas tiriant apdorotas grupes, histopatologinį tyrimą.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Duomenys

71. Turėtų būti pateikiami atskirų gyvūnų duomenys. Be to, papildomai visus duomenis reikėtų suvesti į lenteles, kuriose kiekvienai bandymo grupei nurodomas gyvūnų skaičius bandymo pradžioje, darant bandymą nugaišusių arba dėl humaniško priežasčių numarintų gyvūnų skaičius, visų gyvūnų nugaišimo arba humaniško numarinimo laikas, vaisingų gyvūnų skaičius, vaikingų patelių skaičius, toksinio poveikio požymių turinčių gyvūnų skaičius, pastebėtų toksiškumo požymių aprašymas, įskaitant pradžios laiką, trukmę ir toksinio poveikio rimtumą, histopatologinių pakitimų tipai ir visi atitinkami vados duomenys. Lentelės pavidalo suvestinės formatas, kuris pasirodė labai naudingas, kai reikia įvertinti poveikį reprodukcijai ir (arba) vystymuisi, pateiktas 3 priedėlyje.
72. Jei įmanoma, kiekybiniai rezultatai turėtų būti įvertinti taikant tinkamą visuotinai pripažintą statistinį metodą. Lyginant poveikį pagal dozių intervalą turėtų būti vengiama taikyti įvairius t kriterijus. Statistiniai metodai turėtų būti parenkami rengiant tyrimo planą. AGD ir spenelių išlikimo statistinė analizė turėtų būti pagrįsta atskirų jauniklių duomenimis, atsižvelgiant į vados veiksnius. Jei tinka, statistinės analizės vienetas yra vada. Jauniklių kūno masės statistinė analizė turėtų būti pagrįsta atskirų jauniklių duomenimis, atsižvelgiant į vados dydį. Atsižvelgiant į nedidelę tyrimo apimtį, statistinės analizės kaip reikšmingumo kriterijų nustatymo vertė yra ribota daugeliui vertinamųjų baigčių, ypač reprodukcijos vertinamųjų baigčių. Kai kurie plačiausiai taikomi metodai,

ypač skirstinio vidutinės vertės mato parametriniai kriterijai, netinka. Jei statistiniai tyrimai atliekami, pasirinktas metodas turėtų atitikti tiriamo kintamojo pasiskirstymą ir metodą reikėtų pasirinkti prieš tyrimo pradžią.

Rezultatų įvertinimas

73. Šio toksiškumo tyrimo rezultatai turėtų būti vertinami atsižvelgiant į stebimą poveikį, nekroskopijos ir mikroskopinio tyrimo rezultatus. Įvertinimas aprėpia ryšį tarp bandomosios cheminės medžiagos dozės ir anomalijų buvimo ar nebuvimo, dažnumo ir sunkumo, įskaitant makroskopinius pažeidimus, nustatytus tikslinius organus, nevaisingumą, kliniines anomalijas, paveiktą reproduktivumą ir vados charakteristikas, kūno masės pokyčius, poveikį gaistamumui ir visus kitus toksiškumo reiškinius.
74. Dėl trumpo patinų apdorojimo laikotarpio, vertinant poveikį patinų reprodukcijai, sėklidžių ir sėklidžių prielipų histopatologiją reikėtų nagrinėti kartu su vaisingumo duomenimis. Reprodukcijos ir (arba) vystymosi istorinių kontrolinių ėminių duomenų (pvz., vados dydis, AGD, spenelių išlikimas, T4 koncentracija serume), jei yra, naudojimas taip pat gali būti naudingas kaip pagalbinė priemonė aiškinant tyrimą.
75. Siekiant užtikrinti kokybės kontrolę, siūloma rinkti istorinių kontrolinių ėminių duomenis ir apskaičiuoti skaitinių duomenų variacijos koeficientus, ypač parametrų, susijusių su endokrinine sistema ardančių medžiagų aptikimu. Šie duomenys gali būti naudojami palyginimo tikslais, kai vertinami atliekami tyrimai.

Bandymo ataskaita

76. Į bandymo ataskaitą turėtų būti įtraukta ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga:

- šaltinis, partijos numeris, naudojimo pabaigos data, jei yra;
- bandomosios cheminės medžiagos stabilumas, jei žinomas.

Vienkomponentė medžiaga:

- fizinė išvaizda, tirpumas vandenyje ir papildomos būdingos fizikinės ir cheminės savybės;
- cheminio identifikavimo duomenys, pvz., IUPAC ar CAS pavadinimas, CAS numeris, SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė, grynumas, cheminis priemaišų pavadinimas, jei tinka bei praktiškai įmanoma ir kt.;

Daugiakomponentė medžiaga, UVCB ir mišiniai:

- kuo išsamesnis sudedamųjų dalių apibūdinimas, nurodant cheminį pavadinimą (žr. pirmiau), kiekybinį paplitimą ir būdingas fizikines ir chemines savybes.

Nešiklis (jei naudojamas):

- nešiklio pasirinkimo pagrindimas, jei nešiklis ne vanduo.

Bandymo gyvūnai:

- naudota rūšis ir (arba) padermė,
- gyvūnų skaičius, amžius ir lytis,
- šaltinis, laikymo sąlygos, pašaras ir kt.,
- kiekvieno gyvūno masė bandymo pradžioje.
- rūšies, jei tai ne žiurkės, pasirinkimo pagrindimas.

Bandymo sąlygos:

- dozės dydžio pasirinkimo pagrindimas;
- duomenys apie bandomosios cheminės medžiagos preparato ruošimą ir (arba) jos dėjimą į pašarą, gautą preparato koncentraciją, stabilumą ir vienalytiškumą;
- išsami informacija apie bandomosios cheminės medžiagos davimo būdą;
- bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos (ppm) pašare arba geriamajame vandenyje perskaičiavimas į faktinę dozę (mg/kg kūno masės per parą), jei taikoma;
- išsami informacija apie pašaro ir vandens kokybę;
- išsamus randomizavimo procedūros brokuojamiems jaunikliams atrinkti procedūros aprašymas, jei brokuojami.

Rezultatai:

- kūno masė ir (arba) kūno masės pokyčiai;
- pašaro ir vandens suvartojimo duomenys, jei taikoma;
- toksinio atsako duomenys pagal lytį ir dozę, įskaitant vaisingumą, nėštumą, ir kitus toksiškumo požymius;
- gestacijos trukmė;
- toksiškas arba kitoks poveikis reprodukcijai, palikuonims, postnataliniam augimui ir kt.;
- klinikinių požymių pobūdis, sunkumas ir trukmė (grįžtami ar negrįžtami);
- jutimo organų aktyvumo, sugriebimo stiprumo ir judėjimo aktyvumo vertinimo duomenys;
- hematologiniai tyrimai, remiantis atitinkamomis pamatinėmis vertėmis;
- klinikiniai biocheminiai tyrimai, remiantis atitinkamomis pamatinėmis vertėmis;

- suaugusiųjų patelių, kurių rujos ciklas yra normalus arba nenormalus, skaičius ir ciklo trukmė;
- gimusių gyvų jauniklių skaičius ir poimplantaciniai nuostoliai;
- jauniklių su aiškiai matomais išsigimimais skaičius, išorinių lyties organų bendrasis įvertinimas, silpniausių jauniklių skaičius;
- nugaišimo laikas tyrimo metu arba nurodymas, kad gyvūnas išgyveno iki pabaigos;
- implantacijų skaičius, vados dydis ir vados masė registravimo metu;
- jauniklio kūno masės duomenys;
- visų jauniklių AGD (ir kūno masė AGD matavimo dieną);
- spenelių išlikimas pas jauniklius patinus;
- 13 dienų jauniklių ir suaugusiųjų patinų skydliaukės hormonų koncentracija (ir patelių bei 4 dienos jauniklių, jei matuojama);
- tėvų kartos kūno masės numarinant ir organų masės duomenys;
- nekroskopijos duomenys;
- išsamus histopatologinių rezultatų aprašymas;
- absorbcijos duomenys (jei yra);
- statistinis rezultatų apdorojimas, jei reikia.

Rezultatų aptarimas

Išvados.

Rezultatų aiškinimas

77. Tyrime būtų pateikiami su kartotinių dozių vartojimu susijusio toksiškumo reprodukcijai ir (arba) vystymuisi vertinimo rezultatai. Visų pirma, kadangi daugiausia dėmesio skiriama bendrojo toksiškumo ir toksiškumo reprodukcijai ir (arba) vystymuisi vertinamosioms baigtims, pagal tyrimo rezultatus bus galima atskirti poveikį reprodukcijai ir (arba) vystymuisi, kai bendrojo toksiškumo nėra, ir poveikį, kuris pasireiškia tik esant koncentracijoms, kurios taip pat sukelia toksiškumą tėvų kartos gyvūnams (žr. 7–11 pastraipas). Jis galėtų parodyti tolesnių tyrimų atlikimo būtinybę ir pateikti jų rengimo schemų rekomendacijas. Reikėtų ieškoti informacijos EBPO rekomendaciniame dokumente Nr. 43, kuri padėtų paaiškinti reprodukcijos ir vystymosi rezultatus (19). EBPO rekomendaciniame dokumente Nr. 106 dėl graužikų endokrininių ir reprodukcijos bandymų histologinio įvertinimo (16) pateikiama informacija apie (endokrininių) organų bei makšties tepinėlių paruošimą ir įvertinimą, kuri gali būti naudinga šiam bandymo metodui.

LITERATŪRA

- (1) OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Galima gauti iš Ekonominio bendradarbiavimo ir plėtros organizacijos Paryžiuje.
- (2) OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. . Galima gauti iš Ekonominio bendradarbiavimo ir plėtros organizacijos Paryžiuje.
- (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. Galima gauti iš Ekonominio bendradarbiavimo ir plėtros organizacijos Paryžiuje.
- (6) OECD (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 217), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (7) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 19), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (8) Goldman J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M. 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). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (16) OECD (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 106) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (17) Hess RA 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), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

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

1 priedėlis

APIBRĖŽTYS (TAIP PAT ŽR. EBPO REKOMENDACINĮ DOKUMENTĄ NR. 150 (20))

Androgeniškumas – cheminės medžiagos geba veikti žinduolio organizme kaip natūralus androgeninis hormonas (pvz., testosteronas).

Antiandrogeniškumas – cheminės medžiagos geba slopinti natūralaus androgeninio hormono (pvz., testosterono) veikimą žinduolio organizme.

Antiestrogeniškumas – cheminės medžiagos geba slopinti natūralaus estrogeninio hormono (pvz., 17 β -estradiolio) veikimą žinduolio organizme.

Antitiroidinis aktyvumas – cheminės medžiagos gebėjimas slopinti natūralaus skydliaukės hormono (pvz., T₃) veikimą žinduolio organizme.

Cheminė medžiaga – atskira cheminė medžiaga arba mišinys.

Toksiškumas vystymuisi – toksiškumas reprodukcijai, kuris pasireiškia kaip palikuonių pre-, peri-, postnataliniai, struktūriniai ar funkciniai sutrikimai.

Dozė – duodamas bandomosios cheminės medžiagos kiekis. Dozė išreiškiama bandomosios cheminės medžiagos mase, per parą tenkančia vienam bandomojo gyvūno kūno masės vienetui (pvz., mg/kg kūno masės per parą), arba pastovia koncentracija pašare.

Dozavimas – bendrasis terminas, aprėpiantis dozės dydį, jos davimo dažnumą ir trukmę.

Akivaizdus toksiškumas – bendrasis terminas, apibūdinantis aiškius toksiškumo požymius, pastebimus davus bandomosios cheminės medžiagos. Šių požymių turėtų pakakti pavojui įvertinti ir jie turėtų būti tokie, kad padidinus duodamą dozę būtų galima tikėtis sunkių toksiškumo požymių stiprėjimo ir galbūt gyvūnų gaišimo.

Vaisingumo sumažėjimas – rodo patelių ar patinų reprodukcijos funkcijų arba gebos sutrikimus.

Toksinis poveikis patelei – neigiamas poveikis vaikingoms patelėms, kuris pasireiškia būdingai (tiesioginis poveikis) arba nebūdingai (netiesioginis poveikis), ir yra susijęs su vaikingumo būseną.

NOAEL – termino *nepastebėto neigiamo poveikio riba* santrumpa. Tai didžiausioji dozė, kurią duodant nepastebima su apdorojimu susijusių neigiamų rezultatų.

Estrogeniškumas – cheminės medžiagos gebėjimas veikti žinduolio organizme kaip natūralus estrogeninis hormonas (pvz., 17 β -estradiolis).

Toksiškumas reprodukcijai – rodo neigiamą poveikį palikuoniams ir (arba) patelių ar patinų reprodukcijos funkcijų arba gebos sumažėjimą.

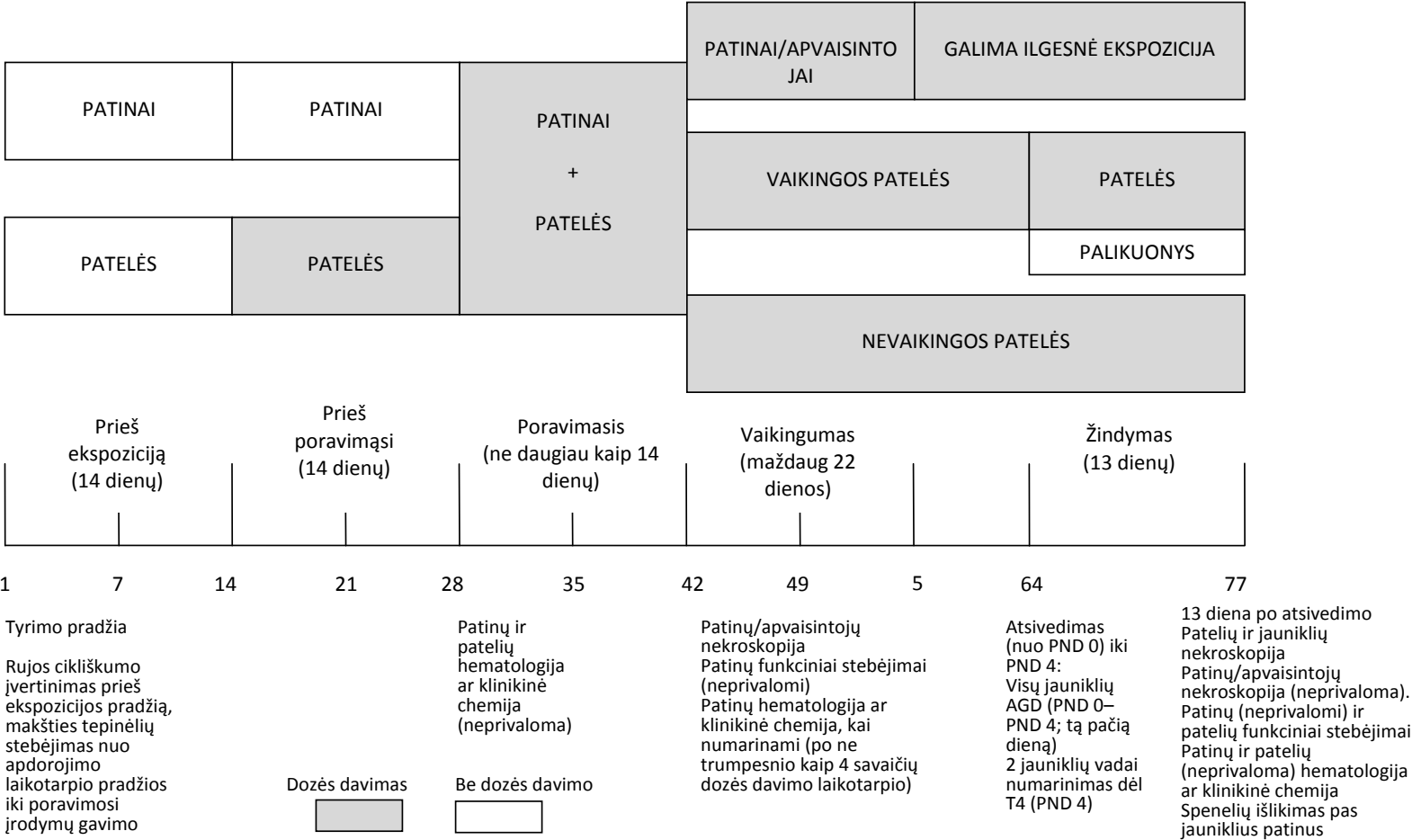
Bandomoji cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys, bandyti pagal šį bandymo metodą.

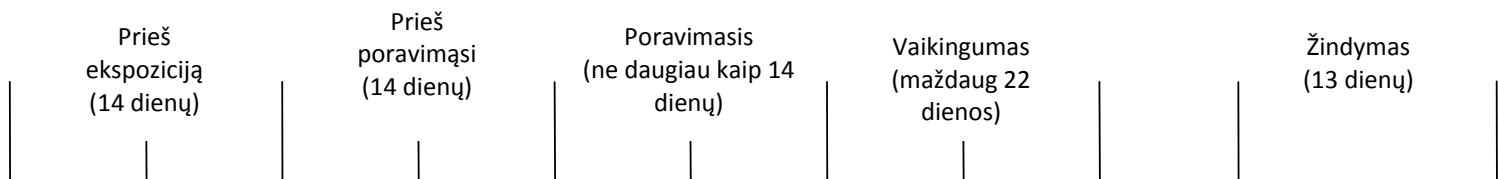
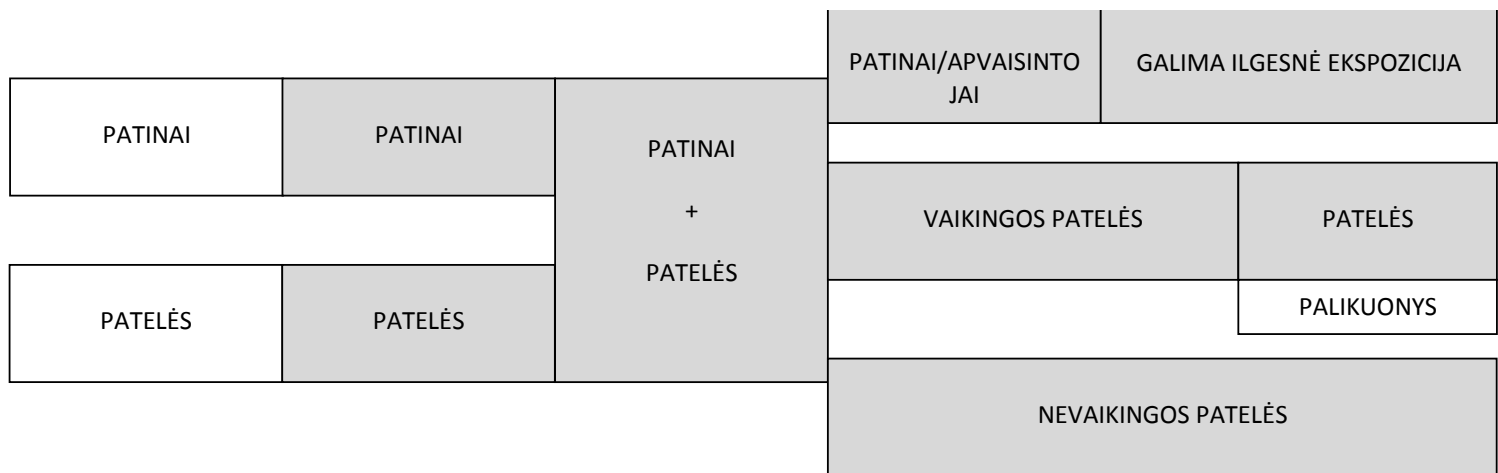
Tiroidinis aktyvumas – cheminės medžiagos gebėjimas veikti žinduolio organizme kaip natūralus skydliaukės hormonas (pvz., T₃).

Tinkamumo patvirtinimas – mokslinis procesas, skirtas apibūdinti bandymo metodo taikymo charakteristikoms keliamus reikalavimus ir apribojimus bei įrodyti jo patikimumą ir tinkamumą konkrečiam tikslui.

2 priedėlis

BANDYMO TVARKARAŠČIO SCHEMA, RODANTI DIDŽIAUSIĄJĄ TYRIMO TRUKMĘ, PAGRĮSTĄ VISU 14 DIENŲ PORAVIMOSI LAIKOTARPIU





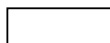
1 7 14 21 28 35 42 49 54 64 77

Tyrimo pradžia
Rujos cikliškumo įvertinimas prieš ekspozicijos pradžią, makšties tepinėlių stebėjimas nuo apdorojimo laikotarpio pradžios iki poravimosi įrodymų gavimo

Dozės davimas



Be dozės davimo



3 priedėlis

POVEIKIO REPRODUKCIJAI IR (ARBA) VYSTYMUISI ĮVERTINIMO LENTELĖS FORMOS SUVESTINĖ ATASKAITA

STEBĖJIMŲ REZULTATAI	VERTĖS				
Dozavimas (vienetai)	0 (kontrolinis)	...	...	...	...
Porų skaičius pradžioje (skaičius)					
Rujos ciklas (bent vidutinė nereguliariųjų ciklų vidutinė trukmė ir dažnis)					
Patelės, rodančios poravimosi požymius (skaičius)					
Vaikingos patelės (skaičius)					
Apvaisinimo dienos 1–5 (skaičius)					
Apvaisinimo dienos 6–. . . (skaičius) ⁽¹⁾ (skaičius)					
Vaikingumas ≤ 21 diena (skaičius)					
Vaikingumas = 22 dienos (skaičius)					
Vaikingumas ≥ 23 dienos (skaičius)					
Patelės, turinčios gyvų jauniklių (skaičius)					
Patelės, turinčios gyvų jauniklių 4 dieną po atsivedimo (skaičius)					
Implantai/pateleiai (vidurkis)					
Gyvi jaunikliai/pateleiai po atsivedimo (vidurkis)					
Gyvi jaunikliai/pateleiai 4 dieną po atsivedimo (vidurkis)					
Lyčių santykis (v/m) po atsivedimo (vidurkis)					
Lyčių santykis (v/m) 4 dieną po atsivedimo (vidurkis)					
Vados masė po atsivedimo (vidurkis)					
Vados masė 4 dieną po atsivedimo (vidurkis)					
Jauniklių masė po atsivedimo (vidurkis)					
Jauniklių masė AGD matavimo metu (vidutinė patinų, vidutinė patelių)					
Jauniklių AGD, matuotas tą pačią dieną – nuo atsivedimo dienos iki 4 dienos (vidutinis patinų, vidutinis patelių, pažymėti dieną po atsivedimo (PND))					
Jauniklių masė 4 dieną (vidurkis)					
Jauniklių masė 13 dieną (vidurkis)					

⁽¹⁾ Paskutinė poravimosi laikotarpio diena.

Spenelių išlikimas pas jauniklius patinus 13 dieną (vidurkis)					
JAUNIKLIAI SU ANOMALIJOMIS					
Patelių su 0					
Patelių su 1					
Patelių su ≥ 2					
PALIKUONIŲ NUOSTOLIAI					
Prenataliniai (implantacijos minus gyvų jauniklių skaičius)					
Patelių su 0					
Patelių su 1					
Patelių su 2					
Patelių su ≥ 3					
Postnataliniai (gyvų jauniklių skaičius atsivedimo metu minus gyvų jauniklių skaičius 13 dieną po atsivedimo)					
Patelių su 0					
Patelių su 1					
Patelių su 2					
Patelių su ≥ 3					

B.65 ODOS ĖSDINIMO *IN VITRO* NAUDOJANT MEMBRANINĘ PERTVARĄ METODAS

IVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymo gaires (TG) 435 (2015). Odos ėsdinimu vadinamas negrįžtamasis odos pažeidimas, kuris pasireiškia kaip matoma nekrozė per epidermį į dermį, po bandomosios cheminės medžiagos uždėjimo, kaip apibrėžta Jungtinių Tautų (JT) visuotinai suderintoje cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklinimo sistemoje (GHS) (1) ir Europos Sąjungos (ES) Reglamente Nr. 1272/2008 dėl cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo, ženklinimo ir pakavimo (CLP)¹). Šis bandymo metodas, atitinkantis atnaujintas EBPO bandymo gaires 435, yra *in vitro* membraninės pertvaros bandymo metodas, kuris gali būti taikomas ėsdinančioms cheminėms medžiagoms identifikuoti. Bandymo metode naudojama dirbtinė membrana, skirta rodyti atsaką ėsdinančioms cheminėms medžiagoms panašiai kaip gyvūnų oda *in situ*.
2. Įprastai odos ėsdinimas buvo vertinamas uždedant bandomąją cheminę medžiagą ant gyvo gyvūno odos ir vertinant audinio pažeidimo laipsnį po tam tikro nustatyto laiko tarpo (2). Be šio bandymo metodo, yra priimti keli kiti *in vitro* bandymo metodai kaip alternatyva (3) (4) standartinei *in vivo* triušio odos procedūrai (šio priedo B.4 skyrius, atitinka EBPO TG 404), naudojamai ėsdinančioms cheminėms medžiagoms identifikuoti (2). Pagal JT GHS odos ėsdinimo vertinimo ir klasifikavimo nuosekliųjų bandymų ir įvertinimo strategiją ir EBPO rekomendaciniame dokumente dėl odos dirginimo ar ėsdinimo integruotųjų bandymo ir vertinimo metodų (IATA) rekomenduojama taikyti patvirtintus ir priimtus *in vitro* 3 ir 4 modulių bandymo metodus (1) (5). IATA aprašomi keli moduliai, kuriuose grupuojami informacijos šaltiniai ir analizės priemonės bei pateikiami nurodymai, kaip (i) integruoti ir naudoti esamus bandymų ir ne bandymų duomenis, skirtus cheminių medžiagų odos dirginimo ir odos ėsdinimo potencialui įvertinti, ir (ii) siūlomas metodas, jei būtini papildomi bandymai, įskaitant, kai nustatomi neigiami rezultatai (5). Pagal šį modulinį metodą gauti teigiami *in vitro* bandymo metodų rezultatai gali būti naudojami cheminei medžiagai priskirti ėsdinančioms, neatliekant bandymų su gyvūnais, ir taip mažinti bei tikslinti gyvūnų naudojimą ir išvengti skausmo bei kančių, kurių galėtų būti, jei šiam tikslui būtų naudojami gyvūnai.

¹ 2008 m. gruodžio 16 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentas (EB) Nr. 1272/2008 dėl cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo, ženklinimo ir pakavimo, iš dalies keičiantis ir panaikinantis direktyvas 67/548/EEB bei 1999/45/EB ir iš dalies keičiantis Reglamentą (EB) Nr. 1907/2006, OL L 353, 2008 12 31.

3. Atlikti *in vitro* membraninės pertvaros modelio, parduodamo Corrositex® pavadinimu (6) (7) (8), patvirtinimo tyrimai, pagal kuriuos gautas bendrasis odos ėsdinimo prognozavimo tikslumas – 79 % (128/163), jautris – 85 % (76/89) ir specifiškumas – 70 % (52/74), kai duomenų bazę sudarė 163 medžiagos ir mišiniai (7). Atsižvelgiant į jo pripažintą tinkamumą, ši patvirtintą pamatinį metodą (PPM) rekomenduojama taikyti kaip nuosekliųjų bandymų strategijos dalį, vertinant cheminių medžiagų odos ėsdinimo pavojingumą (5) (7). Prieš *in vitro* odos ėsdinimo membraninės pertvaros modelį naudojant reglamentavimo tikslais, reikėtų nustatyti jo patikimumą, tinkamumą (tikslumą) ir siūlomo naudojimo apribojimus, kad būtų užtikrintas jo panašumas į PPM (9) pagal naudojimo charakteristikų standartų reikalavimus (10). EBPO abipusis duomenų pripažinimas būtų užtikrintas tik po to, kai pagal PS pasiūlytas naujas arba atnaujintas metodas būtų peržiūrėtas ir įtrauktas į atitinkamas EBPO bandymo gaires. Šiuo metu į EBPO bandymo gaires 435 yra įtrauktas tik vienas *in vitro* metodas, ir šis bandymo metodas – prekyboje esantis Corrositex® modelis.
4. Kiti odos ėsdinimo metodai yra pagrįsti rekonstruotos žmogaus odos (EBPO TG 431) (3) ir izoliuoto žiurkių odos (EBPO TG 430) (4) naudojimu. Šiose bandymo gairėse taip pat pateiktas ėsdinančių cheminių medžiagų skirstymas į tris JT GHS ėsdinančių medžiagų pakategorės ir tris JT krovinių pakuotės grupes dėl ėsdinimo pavojaus. Šios bandymo gairės buvo pirmą kartą priimtos 2006 m. ir atnaujintos 2015 m., pateikiant nuorodą į IATA rekomendacinį dokumentą bei atnaujinant kvalifikacijai įrodyti skirtų medžiagų sąrašą.

APIBRĖŽTYS

5. Vartojamos apibrėžtys pateiktos priedėlyje.

PRADINIAI ASPEKTAI IR APRIBOJIMAI

6. Atliekant šiame metode aprašytą bandymą galima identifikuoti ėsdinančias bandomąsias chemines medžiagas ir atlikti ėsdinančių bandomųjų cheminių medžiagų klasifikavimą į pakategorės pagal JT GHS ir CLP (1 lentelė). Be to, toks bandymo metodas gali būti atliekamas transporto sektoriaus tikslais siekiant priimti sprendimus dėl konkrečių klasių cheminių medžiagų ėsdinančių ar neėsdinančių savybių, pvz., organinių ir neorganinių rūgščių, rūgščių darinių¹ ir bazių (7) (11) (12). Šiame bandymo metode aprašyta bendroji

¹ „Rūgšties darinys“ yra nespecifinės klasės pavadinimas ir plačiąja prasme apibrėžiamas kaip iš rūgšties gauta cheminė medžiaga tiesiogiai arba rūgštį modifikavus arba iš atlikus dalinę pakaitų reakciją. Šią klasę sudaro anhidridai, halogenintos rūgštys, druskos ir kitų tipų cheminės medžiagos.

procedūra yra panaši į patvirtintą pamatinio bandymo metodo procedūrą (7). Nors taikant šį bandymo metodą negaunama reikiamos informacijos apie odos dirginimą, reikėtų pažymėti, kad B.46 (atitinka EBPO TG 439) bandymo metodu konkrečiai tiriamas odos dirginimo *in vitro* poveikį sveikatai (13). Siekiant išsamiai įvertinti vietinį poveikį odai po vienkartinės odos ekspozicijos, informacijos reikėtų ieškoti EBPO rekomendaciniame dokumente dėl integruotųjų bandymo ir vertinimo metodų (5).

1 lentelė. JT GHS odos ėsdinimo kategorijos ir pakategorės (1)

Ėsdinimo kategorija (1 kategorija) (institucijos, kurios nenaudoja pakategorių)	Galimos ėsdinimo pakategorės ¹ (institucijos, naudojančios pakategorės, įskaitant CLP reglamentą)	Ėsdinanti ≥ 1 iš 3 gyvūnų	
		Ekspozicijos trukmė	Stebėjimo trukmė
Ėsdinanti	Ėsdinanti 1A pakategorės	≤ 3 min	≤ 1 h
	Ėsdinanti 1B pakategorės	> 3 min/≤ 1 h	≤ 14 dienų
	Ėsdinanti 1C pakategorės	> 1 h/≤ 4 h	≤ 14 dienų

7. Patvirtinto pamatinio bandymo metodo (7) ribotumas yra tas, kad daug neėsdinančių cheminių medžiagų ir kai kurios ėsdinančios cheminės medžiagos gali netikti bandymui, atsižvelgiant į pradinį suderinamumo bandymą (žr. 13 pastraipą). Vandeniniai cheminių medžiagų tirpalai, kurių pH yra nuo 4,5 iki 8,5 intervale, dažnai netinka bandymui, tačiau 85 % šiame pH intervale bandytų cheminių medžiagų buvo neėsdinančios atliekant bandymus su gyvūnais (7). *In vitro* membraninės pertvaros metodas gali būti taikomas kietosioms medžiagoms (tirpioms ar netirpioms vandenyje), skysčiams (vandeniniams ar nevandeniniams) ir emulsijoms bandyti. Tačiau bandomosios cheminės medžiagos, kurios nesukelia aptinkamo pakitimo atliekant suderinamumo bandymą (t. y. patvirtinto pamatinio bandymo metodo cheminės medžiagos aptikimo sistemos (angl. *Chemical Detection System*, CDS) spalvos pakitimo) negali būti bandomos taikant membraninės pertvaros metodą ir jas reikėtų bandyti taikant kitus metodus.

BANDYMO PRINCIPAS

8. Bandymo sistemą sudaro du komponentai: sintetinė makromolekulinė biologinė pertvara ir cheminės medžiagos aptikimo sistema (CDS); naudojant CDS, šiuo bandymo metodu nustatomas membraninės pertvaros pažeidimas, sukeltas ėsdinančios bandomosios

¹ Pagal ES CLP reglamentą taikomos trys odos ėsdinimo pakategorės 1A, 1B ir 1C.

cheminės medžiagos, kai bandomoji cheminė medžiaga uždedama ant sintetinės makromolekulinės membrinės pertvaros (7) paviršiaus, greičiausiai veikiant vienodam (-iems) ėsdinimo mechanizmui (-ams), kuriuo veikiama gyvoji oda.

9. Prasiskverbimas (arba proveržis) per membrinę pertvarą gali būti matuojamas naudojant kelias procedūras arba CDS, įskaitant pH indikatorinio dažiklio spalvos arba kitos po pertvara esančio indikatoriaus tirpalo savybės pakitimą.
10. Turėtų būti nustatyta, ar membrinė pertvara yra tinkama, t. y., ar ji atitinka numatytą naudojimą ir yra patikima. Turi būti užtikrinta, kad skirtingi preparatai būtų suderinami pertvaros savybių atžvilgiu, pvz., neėsdinančios cheminės medžiagos negalėtų įveikti pertvaros, būtų galima skirstyti cheminių medžiagų ėsdinimo savybes pagal įvairias JT GHS ėsdinimo pakategores (1). Priskiriamas klasifikavimas yra pagrįstas cheminė medžiagos prasiskverbimo per membrinę pertvarą į indikatoriaus tirpalą trukme.

KVALIFIKACIJOS ĮRODYMAS

11. Prieš pradėdamos taikyti šį bandymo metodą atitinkantį *in vitro* membrinės pertvaros metodą, laboratorijos turėtų įrodyti savo techninę kvalifikaciją, teisingai klasifikuodamos dvylika kvalifikacijai įrodyti skirtų cheminių medžiagų, rekomenduojamų 2 lentelėje. Tais atvejais, kai sąraše nurodytos medžiagos nėra arba, jei būtų pagrįsta, gali būti naudojama kita medžiaga, kuriai turimi tinkami *in vivo* ir *in vitro* etaloniniai duomenys (pvz., iš etaloninių cheminių medžiagų sąrašo (10)), jei taikomi tie patys atrankos kriterijai, kaip aprašyta 1 lentelėje.

2 lentelė. Kvalifikacijai įrodyti skirtos medžiagos¹

Medžiaga ²	CASRN	Cheminė klasė	<i>In vivo</i> JT GHS pakategorė ³	<i>In vitro</i> JT GHS pakategorė ³
Boro trifluorido dihidratas	13319-75-0	Neorganinės rūgštys	1A	1A
Nitrato rūgštis	7697-37-2	Neorganinės rūgštys	1A	1A
Fosforo pentachloridas	10026-13-8	Neorganinių rūgščių pirmtakai	1A	1A
Valerilchloridas	638-29-9	Acilchloridai	1B	1B
Natrio hidroksidas	1310-73-2	Neorganinės bazės	1B	1B
1-(2-aminoetil)piperazinas	140-31-8	Alifatiniai aminai	1B	1B
Benzensulfonilchloridas	98-09-9	Acilchloridai	1C	1C

N,N-dimetilbenzilaminas	103-83-3	Anilinai	1C	1C
Tetraetilenpentaminas	112-57-2	Alifatiniai aminai	1C	1C
Eugenolis	97-53-0	Fenoliai	NĖ	NĖ
Nonilakrilatas	2664-55-3	Akrlatai/metilakrlatai	NĖ	NĖ
Natrio hidrokarbonatas	144-55-8	Neorganinės druskos	NĖ	NĖ

¹Dvylika pirmiau išvardytų medžiagų sudaro trys JT GHS ėsdinančių medžiagų kiekvienos pakategorės medžiagos ir trys neėsdinančios medžiagos, kurias nesunku įsigyti iš komercinių tiekėjų, ir JT GHS pakategorė yra pagrįsta aukštos kokybės *in vivo* bandymais. Šios medžiagos yra paimtos iš 40 etaloninių medžiagų sąrašo, įtrauktų į mažiausią sąrašą, kurį sudaro cheminės medžiagos, nurodytos naudoti įrodant bandymo metodų, struktūrą ir funkcinio požiūriu panašių į patvirtintą pamatinį bandymo metodą, tikslumą ir patikimumą, ir jos buvo pasirinktos iš 163 etaloninių cheminių medžiagų, iš pradžių naudotų pamatiniam bandymo metodui patvirtinti (Corrositex®) (7) (10) (14). Šios atrankos tikslas buvo įtraukti, kiek tai įmanoma, chemines medžiagas, kurios: atitiko atsakų į ėsdinimą (pvz., neėsdinančios; JT I, II ir III pakuotės grupių ėsdinančios) intervalą, kurį patvirtintu pamatiniu metodu galima išmatuoti arba numatyti; atitiko cheminių medžiagų klases, naudojamas atliekant patvirtinimo tyrimą; turi tinkamai apibūdintą cheminę struktūrą; davė atkuriamus rezultatus pagal patvirtintą pamatinį bandymo metodą; davė rezultatus, nustatytus atliekant *in vivo* pamatinį bandymą; buvo prekyboje; ir nebuvo susijusios su labai didelėmis šalinimo išlaidomis (14).

²Medžiagos bandomos grynos arba ≥ 90 % grynumo.

³Atitinkamos JT pakuotės grupės I, II ir III atitinka JT GHS ir CLP pakategorės 1A, 1B ir 1C. NĖ– neėsdinanti.

PROCEDŪRA

12. Toliau pateiktose pastraipose apibūdinami dirbtinės membraninės pertvaros ėsdinimo vertinimo bandymo metodo komponentai ir procedūros (7) (15), pagrįstos esamu PPM, t. y. prekyboje esančiu Corrositex®. Membraninė pertvara, suderinamumo ir (arba) indikatoriaus ir kategorijos priskyrimo tirpalai gali būti sukurti, paruošti arba nupirkti, pvz., PPM Corrositex® atveju. Yra patvirtinto pamatinio bandymo metodo ėminių bandymo metodo protokolas (7). Bandymai turėtų būti atliekami aplinkos temperatūroje (17–25 °C), ir komponentai turėtų atitikti šias sąlygas.

Bandomosios cheminės medžiagos suderinamumo bandymas

13. Prieš atliekant membraninės pertvaros bandymą, atliekamas suderinamumo bandymas, kad būtų galima nustatyti, ar bandomąją cheminę medžiagą yra aptinkama CDS. Jei CDS neaptinka bandomosios cheminės medžiagos, membraninės pertvaros bandymo metodas nėra tinkamas tos konkrečios bandomosios cheminės medžiagos ėsdinimo potencialui įvertinti, todėl turėtų būti taikomas kitas bandymo metodas. Atliekant suderinamumo bandymą naudojama CDS ir ekspozicijos sąlygos turėtų atitikti toliau atliekamo membraninės pertvaros metodo ekspozicijos sąlygas.

Trukmės kategorijos priskyrimo bandomajai cheminei medžiagai bandymas

14. Jei reikia taikant bandymo metodą, turėtų būti atliekamas trukmės kategorijos priskyrimo suderinamumo bandymo reikalavimus atitinkusiai bandomajai cheminei medžiagai bandymas, t. y. atrankos bandymas, kad būtų galima atskirti stipriąsias ir silpnąsias rūgštis ar bazines. Pavyzdžiui, taikant patvirtintą pamatinį bandymo metodą, trukmės kategorijos priskyrimo bandymas naudojamas, siekiant nustatyti, kurią iš dviejų trukmės verčių reikėtų imti, atsižvelgiant į tai, ar nustatyta reikšminga rūgšties ar šarmo atsarga. Nustatant išsivymimo savybes ir JT GHS odos išsivymimo pakategorijas, turėtų būti naudojamos dvi skirtingos proveržio trukmės vertės, pagrįstos bandomosios cheminės medžiagos rūgšties arba šarmo atsarga.

MEMBRANINĖS PERTVAROS BANDYMO METODO KOMPONENTAI

Membraninė pertvara

15. Membraninę pertvarą sudaro du komponentai: baltyminis makromolekulinis vandeningas gelis ir pralaidi laikančioji membrana. Baltyminis gelis turėtų būti nepralaidus skysčiams ir kietosioms medžiagoms, bet jis gali būti išsivimamas ir taip tapti pralaidus. Visiškai sukonstruota membraninė pertvara turėtų būti laikoma iš anksto nustatytais sąlygomis, įrodančiomis apsaugą nuo gelio savybių blogėjimo, pvz., džiovimo, mikrobų augimo, poslinkio, pleišėjimo, dėl ko blogėtų jos veiksmingumas. Turėtų būti nustatytas priimtinas laikymo laikotarpis ir membraninės pertvaros ruošiniai nebūtų naudojami jam pasibaigus.
16. Pralaidi laikančioji membrana yra mechaninis baltyminio gelio pagrindas jo susidarymo proceso metu ir ekspozicijos bandomajai cheminei medžiagai metu. Pralaidi laikančioji membrana turėtų apsaugoti nuo gelio persimetimo arba poslinkio ir lengvai praleisti visas bandomąsias chemines medžiagas.
17. Baltyminis gelis, sudarytas iš gelio matricą formuojančių baltymų, pvz., keratino, kolageno, arba jų mišinio, yra bandomosios cheminės medžiagos išsivimama medžiaga. Baltyminė medžiaga dedama ant laikančiosios membranos paviršiaus ir paliekama sustingti prieš dedant membraninę pertvarą virš indikatoriaus tirpalo. Baltyminis gelis turėtų būti vienodo storio ir tankio, be oro burbuliukų arba defektų, galinčių paveikti jo funkcinį vientisumą.

Cheminės medžiagos aptikimo sistema (CDS)

18. Indikatoriaus tirpalas, kuris yra atliekant suderinamumo bandymą naudotas tirpalas, turėtų aptikti bandomosios cheminės medžiagos buvimą. Reikėtų naudoti pH indikatorinį dažiklį arba dažiklių mišinį, pvz., krezolio raudonąjį ir metilo oranžinį, kuris keistų spalvą, reaguodamas į bandomosios cheminės medžiagos buvimą. Matavimo sistema gali būti regimoji arba elektroninė.

19. Aptikimo sistemos, sukurtos bandomosios cheminės medžiagos proveržiui per membraninę pertvarą aptikti, turėtų būti vertinamos dėl savo tinkamumo ir patikimumo, kad būtų galima parodyti aptinkamų cheminių medžiagų grupes ir kiekybinio aptikimo ribas.

BANDYMO EIGA

Bandymo metodo komponentų surinkimas

20. Membraninė pertvara dedama į buteliuką (arba mėgintuvėlį) su indikatoriaus tirpalu taip, kad laikančioji membrana visiškai liestų indikatoriaus tirpalą ir nebūtų oro burbuliukų. Reikėtų imtis priemonių pertvaros vientisumui užtikrinti.

Bandomosios cheminės medžiagos uždėjimas

21. Tinkamas bandomosios cheminės medžiagos kiekis, pvz., 500 µl skysčio arba 500 mg smulkių kietosios medžiagos miltelių (7), atsargiai dedamas ant viršutinio membraninės pertvaros paviršiaus ir tolygiai paskirstomas. Paruošiamas tinkamas kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos kartotinių ėminių ir jos kontrolinių ėminių skaičius, pvz., keturi (7) (žr. 23–25 pastraipas). Registruojamas bandomosios cheminės medžiagos uždėjimo ant membraninės pertvaros laikas. Siekiant užtikrinti, kad būtų tiksliai registruojamos trumpos ėsdinimo trukmės vertės, bandomosios cheminės medžiagos dėjimas į kartotinių ėminių buteliukus suskirstomas pagal laiką.

Prasiskverbimo per membraninę pertvarą matavimas

22. Kiekvienas buteliukas yra tinkamai stebimas ir registruojamas indikatoriaus tirpalo pirmojo spalvos pasikeitimo laikas, t. y. prasiskverbimas per pertvarą, ir nustatomas laikas nuo uždėjimo iki prasiskverbimo per membraninę pertvarą.

Kontroliniai ėminiai

23. Atliekant bandymus, susijusius su bandomosios cheminės medžiagos nešiklio ar tirpiklio naudojimu, nešiklis arba tirpiklis turėtų būti suderinami su membraninės pertvaros sistema, t. y. neturėtų pakeisti membraninės pertvaros vientisumo ar bandomosios cheminės medžiagos ėsdinimo savybių. Jei tinka, tirpiklio (arba nešiklio) kontroliniai ėminiai turėtų būti bandomi vienu metu su bandomąja chemine medžiaga, kad būtų įrodytas tirpiklio suderinamumas su membraninės pertvaros sistema.
24. Vienu metu su bandomąja chemine medžiaga turėtų būti bandoma tarpinių ėsdinimo savybių teigiama (ėsdinanti) kontrolinė medžiaga, pvz., 110 ± 15 mg natrio hidroksido (JT GHS ėsdinimo 1B pakategorė) (7), kad būtų galima įvertinti, ar bandymo sistema veikia priimtinu būdu. Antroji teigiama kontrolinė medžiaga, kuri būtų tos pačios cheminių medžiagų klasės kaip bandomoji cheminė medžiaga, gali būti naudinga vertinant ėsdinančios bandomosios cheminės medžiagos santykinį ėsdinimo potencialą. Turėtų būti parenkama (-os) tarpinių ėsdinimo savybių teigiama (-os) kontrolinė (-ės) medžiaga (-os)

(pvz., JT GHS pakategorės 1B), kad būtų galima nustatyti prasiskverbimo trukmės pokyčius, kurie gali būti nepriimtinais ilgesniais ar trumpesniais nei nustatyta pamatinė vertė ir taip rodyti netinkamą bandymo sistemos veikimą. Šiuo tikslu mažai duotų naudos stipriai išdinančios (JT GHS 1A pakategorės) arba neišdinančios cheminės medžiagos. Naudojant išdinančią JT GHS 1B pakategorės cheminę medžiagą, būtų galima aptikti per trumpą arba per ilgą proveržio trukmę. Silpnai išdinanti medžiaga (JT GHS 1C pakategorės) gali būti naudojama kaip teigiama kontrolinė medžiaga, kad būtų galima išmatuoti bandymo metodo gebėjimą nuolat atskirti silpnai išdinančias ir neišdinančias chemines medžiagas. Nepriklausomai nuo taikomo metodo, priimtinas teigiamos kontrolinės medžiagos atsako intervalas turėtų būti gautas pagal naudojamų teigiamos (-ų) kontrolinės (-ių) medžiagos (-ų) istorinių proveržio trukmių intervalą, pvz., vidurkis $\pm 2-3$ standartiniai nuokrypiai. Atliekant kiekvieną tyrimą, turėtų būti nustatyta teigiamos kontrolinės medžiagos proveržio trukmė, kad būtų galima aptikti į priimtina intervalą nepatenkančius nukrypimus.

25. Vienu metu su bandomąja chemine medžiaga turėtų būti bandoma neigiama (neišdinanti) kontrolinė medžiaga, pvz., 10 % citrinų rūgštis, 6 % propano rūgštis (7), kaip kita kokybės kontrolės priemonė, rodanti membraninės pertvaros funkcinių vientisumą.

Tyrimo priimtumo kriterijai

26. Pagal nustatytus kiekvienos JT GHS išdinimo pakategorės trukmės parametrus, bandomosios cheminės medžiagos išdinimas prognozuojamas, naudojant trukmę (minutėmis) nuo bandomosios cheminės medžiagos uždėjimo ant membraninės pertvaros iki prasiskverbimo per ją. Tyrimas būtų laikomas priimtiniu, jei atliekant vienalaikį teigiamos kontrolinės medžiagos bandymą būtų gauta tikėtina atsako trukmė (pvz., 8–16 min. natrio hidroksido proveržio trukmė, jei jis naudojamas kaip teigiama kontrolinė medžiaga), vienu metu bandoma neigiama kontrolinė medžiaga neturėtų būti išdinanti ir, jei įtrauktas, tirpiklio kontrolinis ėminys neturėtų būti išdinantis ar pakeisti bandomosios cheminės medžiagos išdinimo potencialą. Prieš pradėdamos taikyti šį bandymo metodą atitinkantį metodą įprastiniu būdu, laboratorijos turėtų įrodyti savo techninę kvalifikaciją, naudodamos dvyliką cheminių medžiagų, rekomenduojamų 2 lentelėje. Jei pagal šį bandymo metodą kuriami nauji analogiški metodai, kurie struktūra ir funkciniu požiūriu yra panašūs į patvirtintą pamatinį metodą (14), turėtų būti naudojami iš anksto nustatyti naudojimo charakteristikų standartai naujo metodo patikimumui ir tikslumui įrodyti prieš pradedant jį taikyti reglamentavimo bandymams (10).

Rezultatų aiškinimas ir bandomųjų cheminių medžiagų išdinimo savybių klasifikavimas

27. Bandomoji cheminė medžiaga klasifikuojama pagal JT GHS išdinimo pakategorės (1) ir, jei taikoma, jai priskiriama JT pakavimo grupė (16), atsižvelgiant į trukmę (minutėmis) nuo bandomosios cheminės medžiagos uždėjimo ant membraninės pertvaros iki prasiskverbimo per ją. Kiekvienam siūlomam bandymo metodui nustatomos trijų išdinimo pakategorių ribinės trukmės vertės. Priimant galutinį sprendimą dėl ribinių trukmės

verčių reikėtų atsižvelgti į būtinumą kiek įmanoma sumažinti ėsdinimo pavojaus priskyrimą žemesnei kategorijai (t. y. klaidingai neigiamų rezultatų). Šiose bandymo gairėse reikėtų naudoti 3 lentelėje nurodytas Corrositex® ribines trukmės vertes, nes jos atitinka vienintelį į bandymo gaires įtrauktą bandymo metodą (7).

3 lentelė. Corrositex® prognozavimo modelis

Vidutinė proveržio trukmė (min)		JT GHS prognozė ³
1 kategorijos bandomosios cheminės medžiagos ¹ (nustatytos pagal metodo kategorijos priskyrimo bandymą)	2 kategorijos bandomosios cheminės medžiagos ² (nustatytos pagal metodo kategorijos priskyrimo bandymą)	
0–3 min	0–3 min	Ėsdinanti, neprivaloma pakategorė 1A
nuo > 3 iki 60 min	nuo > 3 iki 30 min	Ėsdinanti, neprivaloma pakategorė 1B
nuo > 60 iki 240 min	nuo > 30 iki 60 min	Ėsdinanti, neprivaloma pakategorė 1C
> 240 min	> 60 min	Neėsdinanti

¹ Bandomosios cheminės medžiagos su didele rūgšties arba šarmo atsarga (6).

² Bandomosios cheminės medžiagos su maža rūgšties arba šarmo atsarga (6).

³ JT GHS 1A, 1B ir 1C pakategorės atitinka I, II ir III JT pakuotės grupes.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Duomenys

28. Trukmė (minutėmis) nuo bandomosios cheminės medžiagos ir teigiamos (-ų) kontrolinės (-ių) medžiagos (-ų) uždėjimo iki jų prasiskverbimo per pertvarą būti pateikiama lentelės forma, nurodant atskirus kartotinių bandymų duomenis, kiekvieno bandymo vidurkį $\pm$ standartinį nuokrypį.

Bandymo ataskaita

29. Į bandymo ataskaitą turėtų būti įtraukta ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga ir kontrolinės medžiagos

- Vienkomponentė medžiaga: cheminio identifikavimo duomenys, pvz., IUPAC ar CAS pavadinimas, CAS numeris, SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė, grynumas, cheminis priemaišų pavadinimas, jei tinka bei praktiškai įmanoma ir kt.;
- daugiakomponentė medžiaga, UVCB ir mišinys: kuo išsamesnis sudedamųjų dalių apibūdinimas, nurodant cheminį pavadinimą (žr. pirmiau), kiekybinį paplitimą ir būdingas fizikines ir chemines savybes.
- fizinė išvaizda, tirpumas vandenyje ir papildomos būdingos fizikinės ir cheminės savybės;
- šaltinis, partijos numeris, jei yra;
- bandomosios ir (arba) kontrolinės cheminės medžiagos apdorojimas prieš bandymą, jei tai atliekama (pvz., šildymas, malimas);
- bandomosios cheminės medžiagos stabilumas, naudojimo pabaigos data arba pakartotinės analizės data, jei žinoma;
- laikymo sąlygos.

Nešiklis:

- identifikavimo duomenys, koncentracija (jei tinka), naudojamas tūris;
- nešiklio pasirinkimo pagrindimas.

Naudotas in vitro membraninės pertvaros modelis ir protokolai, įskaitant įrodytą tikslumą ir patikimumą

Bandymo sąlygos

- naudotos aparatūros ir ruošimo procedūrų aprašymas;
- naudotos *in vitro* membraninės pertvaros šaltinis ir sudėtis;
- indikatoriaus tirpalo sudėtis ir savybės;
- aptikimo metodas;
- bandomosios cheminės medžiagos ir kontrolinių medžiagų kiekiai;
- kartotinių bandymų skaičius;
- trukmės kategorijos priskyrimo bandymo aprašymas ir pagrindimas;
- uždėjimo būdas;
- stebėjimo trukmės vertės;
- taikytų įvertinimo ir klasifikavimo kriterijų aprašymas;
- bandymo metodo taikymo kvalifikacijos įrodymas prieš pradedant jį taikyti įprastiniu būdu, bandant kvalifikacijai įrodyti skirtas chemines medžiagas.

Rezultatai:

- kiekvieno kartotinio bandymo atskirų bandomosios cheminės medžiagos ir kontrolinių ėminių rezultatų duomenys lentelėse;
- kitų pastebėtų reiškinių aprašymas;
- gautas klasifikavimas su nuoroda į naudotą prognozavimo modelį ir (arba) į taikytus sprendimo priėmimo kriterijus.

Rezultatų aptarimas

Išvados

LITERATŪRA

- (1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), First Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Pateikta http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.
- (2) Šio priedo B.4 skyrius. Ūmus odos dirginimas, ėsdinimas.
- (3) Šio priedo B.40bis skyrius. Odos ėsdinimas *in vitro*. rekonstruoto žmogaus epidermio (RŽE) bandymo metodas.
- (4) Šio priedo .40 skyrius. Odos suardymas *in vitro*. Odos sluoksnio elektrinės varžos (OSEV) bandymas.
- (5) OECD (2015). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.-G. 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. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Pateikta <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) Šio priedo B.46 skyrius, *In Vitro* odos dirginimas. Rekonstruoto žmogaus epidermio bandymo metodas. ICCVAM (2004). ICCVAM Recommended Performance Standards for *In Vitro* Test Methods for Skin Corrosion. NIEHS, NIH Publication No 04-4510. Pateikta http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/dermal_docs/ps/ps044510.pdf.
- (14) U.S. EPA (1996). Method 1120, Dermal Corrosion. Pateikta <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/1120.pdf>.
- (15) United Nations (UN) (2013). UN Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Model Regulations, 18th Revised Edition (Part, Chapter 2.8), UN, 2013. Pateikta http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/unrec/rev18/English/Rev18_Volume1_Part2.pdf.

Priedėlis

APIBRĖŽTYS

Tikslumas – bandymo metodo rezultatų ir patvirtintų pamatinių verčių sutapimo artumas. Tikslumas yra bandymo metodo taikymo charakteristikų matas ir vienas iš tinkamumo aspektų. Terminas dažnai vartojamas kaip lygiavertis terminui „sutapimas“ ir reiškia tinkamų bandymo metodo rezultatų dalį (9).

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

Cheminės medžiagos aptikimo sistema (CDS) – regimojo nustatymo arba elektroninė matavimo sistema su indikatoriniu tirpalu, reaguojanti į bandomosios cheminės medžiagos buvimą, pvz., esant bandomajai cheminei medžiagai, pasikeičia pH indikatorinio dažiklio arba dažiklių mišinio spalva arba vyksta kitų tipų cheminės ar elektrocheminės reakcijos.

Sutapimas – bandymo metodo, kuriuo gaunamas su kategorija susijęs rezultatas, taikymo charakteristikų matas ir vienas iš tinkamumo aspektų. Terminas kartais vartojamas kaip lygiavertis terminui „tikslumas“ ir apibrėžiamas kaip dalis visų bandytų cheminių medžiagų, kurios tiksliai klasifikuojamos kaip teigiamos arba neigiamos. Sutapimas labai priklauso nuo tiriamos bandomosios cheminės medžiagos tipui gautų teigiamų rezultatų dalies (9).

GHS (Visuotinai suderinta cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklavimo sistema) – sistema, kurioje pateikiamas cheminių medžiagų (medžiagų ir mišinių) klasifikavimas pagal standartizuotus fizikinių pavojų, pavojų sveikatai bei aplinkai tipus ir nagrinėjami atitinkami informaciniai elementai, pvz., piktogramos, signaliniai žodžiai, pavojingumo frazės, atsargumo frazės ir saugos duomenų lapai, kad būtų galima informuoti apie medžiagų neigiamą poveikį, siekiant apsaugoti žmones (įskaitant darbuotojus, darbininkus, vežėjus, vartotojus ir avarijų likvidatorius) ir aplinką (1).

IATA – integruotasis bandymo ir vertinimo metodas.

Mišinys – dviejų ar daugiau cheminių medžiagų mišinys ar tirpalas.

Vienkomponentė medžiaga – medžiaga, kurią apibrėžia jos kiekybinė sudėtis, kai vienas pagrindinis komponentas sudaro ne mažiau kaip 80 % (masės).

Daugiakomponentė medžiaga – medžiaga, kurią apibrėžia jos kiekybinė sudėtis, kai daugiau kaip vieno pagrindinio komponento koncentracija ≥ 10 % (masės) ir < 80 % (masės). Daugiakomponentė medžiaga yra gamybos proceso rezultatas. Skirtumas tarp mišinio ir daugiakomponentės medžiagos yra tas, kad mišinys gaunamas sumaišant dvi medžiagas arba daugiau nevykstant cheminei reakcijai. Daugiakomponentė medžiaga yra cheminės reakcijos rezultatas.

NĖ – neėsdinanti.

Naudojimo charakteristikų standartai – patvirtintu bandymo metodu pagrįsti standartai, kurie yra pagrindas įvertinti mechanizmo ir funkciniu požiūriu panašaus siūlomo bandymo

metodo palyginamumą. Įtraukti: i) esminiai bandymo metodo komponentai; ii) etaloninių cheminių medžiagų, parinktų iš cheminių medžiagų, naudojamų patvirtinto bandymo metodo priimtinioms naudojimo charakteristikoms įrodyti, būtinasis sąrašas; ir iii) panašūs tikslumo bei patikimumo lygiai, pagrįsti gautais patvirtintam bandymo metodui, kuriuos siūlomas bandymo metodas turėtų rodyti, kai yra įvertinamas naudojant būtinąjį etaloninių cheminių medžiagų sąrašą (9).

Tinkamumas – santykio tarp bandymo metodo ir tiriamo poveikio apibūdinimas bei bandymo reikšmingumo ir naudingumo siekiant tam tikro tikslo nustatymas. Tai yra bandymo metodo, taikomo tiriamam biologiniam poveikiui matuoti ar prognozuoti, tikslumo laipsnis. Tinkamumas aprėpia bandymo metodo tikslumo (atitikties) aspektą (9).

Patikimumas – pagal tą patį protokolą atliekamo bandymų metodo, ilgą laiką taikomo laboratorijose ir tarp laboratorijų, atkuriamumo laipsnio matas. Jis vertinamas skaičiuojant atkuriamumą laboratorijoje ir tarp laboratorijų (9).

Jautris – visų teigiamų ir (arba) veikliųjų cheminių medžiagų, kurios yra tinkamai klasifikuotos taikant bandymo metodą, dalis. Jis yra bandymo metodo, kuriuo gaunami su kategorija susiję rezultatai, tikslumo matas ir svarbus aspektas vertinant bandymo metodo tinkamumą (9).

Odos ėsdinimas *in vivo* – negrįžtamas odos pažeidimas; būtent, matoma dermio nekrozė per *epidermį*, praėjus ne daugiau kaip keturioms valandoms po bandomosios cheminės medžiagos uždėjimo. Atsakas į ėsdinimą yra opos, kraujavimas, kruvini šašai ir, pasibaigus 14 parų stebėjimo laikotarpiui, odos blukimas dėl jos šutimo, visiškai nuplikusios vietos ir randai. Neaiškūs pažeidimai turėtų būti vertinami pasitelkiant histopatologinį tyrimą.

Specifiškumas – visų neigiamų ar neveikliųjų cheminių medžiagų, kurios yra tinkamai klasifikuotos taikant bandymo metodą, dalis. Jis yra bandymo metodo, kuriuo gaunami su kategorija susiję rezultatai, tikslumo matas ir svarbus aspektas vertinant bandymo metodo tinkamumą (9).

Medžiaga – natūralus arba gamybos proceso metu gautas cheminis elementas ir cheminių elementų junginys, įskaitant priedus, reikalingus jo stabilumui išlaikyti, ir priemaišas, atsirandančias gaminant, išskyrus tirpiklius, kurie gali būti atskirti nedarant poveikio cheminės medžiagos stabilumui ar nepakeičiant jos sudėties.

Bandomoji cheminė medžiaga – taikant šį metodą bandoma medžiaga arba mišinys.

UVCB – nežinomos ar kintamos sudėties medžiagos, sudėtingųjų reakcijų produktai ar biologinės medžiagos.

B.66 STABILIAI TRANSFEKUOTOS TRANSAKTYVACIJOS *IN VITRO* BANDYMAI ESTROGENŲ RECEPTORIŲ AGONISTAMS IR ANTAGONISTAMS APTIKTI

BENDRASIS ĮVADAS

EBPO į rezultatus orientuotos bandymo gairės

1. Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymo gaires (TG) 455 (2016). TG 455 yra į rezultatus orientuotos bandymo gairės (PBTG), aprašančios stabiliai transfekuotos transaktyvacijos *in vitro* bandymo metodus, siekiant aptikti estrogenų receptorių agonistus ir antagonistus (ER TA bandymai). Jas sudaro keletas mechanizmo ir funkcinio požiūriu panašių bandymo metodų estrogenų receptorių (t. y. ER α ir (arba) ER β) agonistams ir antagonistams identifikuoti, ir jos turėtų palengvinti naujų panašių ar modifikuotų bandymų metodų kūrimą, atsižvelgiant į patvirtinimo principus, išdėstytus EBPO rekomendaciniame dokumente dėl naujų ar atnaujintų pavojaus vertinimo bandymo metodų patvirtinimo ir tarptautinio pripažinimo (1). Visiškai patvirtinti pamatiniai bandymo metodai (2 priedėlis ir 3 priedėlis), kurie sudaro šių į rezultatus orientuotų bandymo gairių pagrindą, yra:
 - stabiliai transfekuotos transaktyvacijos (STTA) bandymas (2) naudojant (h) ER α -HeLa-9903 ląstelių liniją; ir
 - VM7Luc ER TA bandymas (3), naudojant VM7Luc4E2 ląstelių liniją¹, kuri daugiausia ekspresuoja hER α ir kažkiek hER β (4) (5).

Yra naudojimo charakteristikų standartai (6) (7), kuriuos reikėtų naudoti vystant ir patvirtinant bandymus dėl tos pačios pavojaus vertinamosios baigties. Būtų galima laiku iš dalies pakeisti PBTG 455, kad nauji panašūs bandymai galėtų būti įtraukti į atnaujintas PBTG; tačiau panašūs bandymai bus įtraukti tik tada, kai tik EBPO atliks peržiūrą ir sutiks, kad jie atitinka naudojimo charakteristikų standartus. Į TG 455 įtraukti bandymai gali būti naudojami sprendžiant be skirtumo klausimus, susijusius su EBPO valstybės narės reikalavimais estrogenų receptorių transaktyvacijos bandymo rezultatams, ir turėti naudos iš abipusio duomenų pripažinimo.

¹ Iki 2016 m. birželio mėn. ši ląstelių linija buvo vadinama BG1Luc ląstelių linija. BG-1 ląsteles pirmi aprašė Geisinger *et al.* (1998) (35) ir vėliau apibūdino Nacionalinio aplinkos higienos mokslų instituto (NIEHS) tyrėjai (36). Palyginti neseniai buvo nustatyta, kad yra du skirtingi tyrėjų naudojamų BG-1 ląstelių variantai, BG-1 Fr ir BG-1 NIEHS. Šių dviejų BG-1 variantų ląstelių linijų gilesnė analizė, įskaitant DNR bandymus, atlikta Li ir bendradarbių (2014) (37), parodė, kad BG-1 Fr buvo unikali linija ir kad BG-1 NIEHS, t. y. bandymui tobulinti naudojama pradinė ląstelių linija buvo ne BG1 žmogaus kiaušidžių karcinomos ląstelių linija, bet MCF7 žmogaus krūtų vėžio ląstelių linijos variantas. Atliekant bandymą naudota ląstelių linija, pirmiau nurodoma kaip BG1Luc4E2 (38), dabar bus žymima VM7Luc4E2 („V“ – variantas; „M7“ – MCF7 ląstelės). Panašiai bandymas bus pažymėtas kaip VM7Luc ER TA. Nors dėl to pasikeičia ląstelių linijos, kuria yra pagrįstas bandymas, kilmė, tai neturi įtakos jau paskelbtiems patvirtinimo tyrimams ar šio bandymo naudingumui ir taikymui, atliekant estrogeninių arba antiestrogeninių cheminių medžiagų atranką.

I šį bandymo metodą įtrauktų bandymų pagrindimas ir principai

2. 1998 m. EBPO iniciatyva pradėta labai svarbi veikla, kurios tikslas – patikslinti esamas ir parengti naujas galimų endokrininę sistemą ardančių cheminių medžiagų atrankos ir bandymo gaires. Endokrininę sistemą ardančių cheminių medžiagų bandymo ir vertinimo EBPO konceptuali sistema (CF) buvo peržiūrėta 2012 m. Originalios ir peržiūrėtos CF yra įtrauktos kaip priedai į EBPO rekomendacinį dokumentą dėl endokrininę sistemą ardančių cheminių medžiagų vertinimo standartizuotų bandymo gairių (8). CF sudaro penki lygiai, kai kiekvienas lygis atitinka skirtingą biologinio sudėtingumo lygį. Šiame bandymo metode aprašyti ER transaktyvacijos (TA) bandymai yra 2 lygio ir juos sudaro *in vitro bandymai, kuriais gaunami duomenys apie pasirinktą (-us) endokrininį (-ius) mechanizmą (-us) ir (arba) kelią (-ius)*. Šis bandymo metodas taikomas *in vitro* transaktyvacijos (TA) bandymams, skirtiems identifikuoti estrogenų receptorių (ER) agonistus ir antagonistus.
3. Estrogenų sąveika su estrogenų receptoriais gali turėti įtakos estrogenų valdomų genų transkripcijai, kuri gali sukelti arba slopinti ląstelių procesus, įskaitant tuos, kurie yra būtini ląstelių proliferacijai, normaliam vaisiaus vystymuisi ir reprodukcijos funkcijai (9) (10) (11). Normalių estrogeninių sistemų sutrikimas gali sukelti neigiamą poveikį normaliam vystymuisi (ontogenezei), reprodukcinei sveikatai ir reprodukcijos sistemos vientisumui.
4. *In vitro* TA bandymai yra pagrįsti tiesiogine arba netiesiogine medžiagų sąveika su specifiniu receptoriumi, kuris reguliuoja reporterinio geno produkto transkripciją. Tokie bandymai yra plačiai naudojami, kai reikia įvertinti specifiniais branduolio receptoriais, pvz., estrogenų receptoriais, reguliuojamą genų ekspresiją (12) (13) (14) (15) (16). Jie yra pasiūlyti ER reguliuojamai estrogeninei transaktyvacijai aptikti (17) (18) (19). Yra mažiausiai du pagrindiniai branduolio ER potipiai, α ir β , kuriuos koduoja atskiri genai. Atitinkami baltymai turi skirtingas biologines funkcijas, taip pat skirtingą pasiskirstymą audiniuose ir ligandų prijungimo giminingumus (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26). Branduolio ER α tarpininkauja klasikiniam estrogeniniam atsakui (27) (28) (29) (30), todėl dauguma šiuo metu kuriamų ER aktyvinimo arba slopinimo matavimo modelių yra skirti ER α . Bandymai naudojami identifikuoti cheminėms medžiagoms, kurios aktyvina (arba slopina) ER po ligandų prijungimo, kai gautas receptoriaus ir ligando kompleksas prisijungia prie specifinių DNR atsako elementų ir transaktyvina reporterinį geną, dėl ko padidėja ląstelių baltymo žymeklio ekspresija. Atliekant šiuos bandymus galima naudoti skirtingus reporterio atsakus. Liuciferaze pagrįstose sistemose liuciferazės fermentas paverčia liuciferino substratą bioluminescenciniu produktu, kurį galima kiekybiškai išmatuoti liuminometru. Kiti įprastinių reporterių pavyzdžiai yra fluorescencinis baltymas ir *LacZ* genas, koduojantis β -galaktozidazę, fermentą, galintį paversti bespalvį substratą X-gal (5-brom-4-chlor-indolilgalaktopiranozidą) mėlynos spalvos produktu, kuri galima kiekybiškai

nustatyti spektrofotometru. Šie reporteriai gali būti įvertinti greitai ir nebrangiai prekyboje esančiais bandymo rinkiniais.

5. STTA ir VM7Luc TA bandymų patvirtinimo tyrimai įrodė jų tinkamumą ir patikimumą atsižvelgiant į numatytą tikslą (3) (4) (5) (30). Liuminescencija pagrįstų ER TA bandymų, naudojančių krutų ląsteles, naudojimo charakteristikų standartai yra įtraukti į ICCVAM bandymo metodo įvertinimo ataskaitą dėl LUMI-CELL[®] ER (VM7Luc ER TA) bandymo metodo: *In vitro* bandymas cheminių medžiagų, kaip žmogaus estrogenų receptorių agonistų ir antagonistų, aktyvumui identifikuoti (3). Šie naudojimo charakteristikų standartai yra modifikuoti, kad juos būtų galima naudoti STTA ir VM7Luc TA bandymams (2).
6. Šio bandymo metodo aprašyme vartojamos apibrėžtys ir santrumpos pateiktos 1 priedėlyje.

TA bandymų taikymo sritis ir su jais susiję apribojimai

7. Šie bandymai yra siūlomi atrankos ir pirmumo nustatymo tikslais, tačiau taip pat gali suteikti informacijos apie mechanizmą, kuri gali būti naudojama taikant įrodomosios vertės analizės metodą. Jie nagrinėja TA, sukeltą cheminių medžiagų prijungimo prie ER *in vitro* sistemoje. Todėl rezultatų nereikėtų tiesiogiai ekstrapoliuoti į nepalietos endokrininės sistemos *in vivo* sudėtingą signalizavimą ir reguliavimą.
8. ER tarpininkaujama TA laikoma vienu iš pagrindinių endokrininės sistemos ardymo mechanizmų, nors yra kitų endokrininės sistemos ardymo mechanizmų, įskaitant i) sąveikas su kitais receptoriais ir fermentų sistemomis endokrininės sistemos viduje, ii) hormonų sintezę, iii) hormonų metabolinį aktyvinimą ir (arba) inaktyvinimą, iv) hormonų pasiskirstymą tiksliniuose audiniuose ir v) hormonų pašalinimą iš kūno. Nei viename pagal šį bandymo metodą atliekamų bandymų šie veikimo būdai nenagrinėjami.
9. Taikant šį bandymo metodą tiriamas cheminių medžiagų gebėjimas aktyvinti (t. y. veikti kaip agonistai), taip pat slopinti (t. y. veikti kaip antagonistai) nuo ER priklausomą transkripciją. Priklausomai nuo ląstelių tipo, kai kurios cheminės medžiagos elgtis kaip atrankieji estrogenų receptorių modulatoriai (SERM) ir būti aktyvios kaip agonistai ir antagonistai. Cheminės medžiagos, kurios atliekant šiuos bandymus yra neigiamos, gali būti įvertintos prijungimo prie ER bandyme prieš darant išvadą, kad cheminė medžiaga nesijungia prie receptoriaus. Be to, bandymai gali tik su tam tikra tikimybe informuoti apie pradinės molekulės aktyvumą, turint omenyje ribotą *in vitro* ląstelių sistemų metabolinio aktyvinimo gebą. Atsižvelgiant į tai, kad atliekant patvirtinimą buvo naudotos tik atskiros medžiagos, tinkamumo mišiniams klausimas nebuvo sprendžiamas. Bandymų metodas vis dėlto teoriškai tinka daugiakomponentėms medžiagoms, UVCB ir mišiniams bandyti. Prieš taikant bandymų metodą daugiakomponentei medžiagai, UVCB ir mišiniui, kad būtų gauti numatomo reglamentavimo tikslui skirti duomenys, reikėtų panagrinėti, ar metodu

galima pasiekti tą tikslą atitinkančius rezultatus ir dėl kokios priežasties. Tokie svarstymai nereikalingi, kai yra reglamentavimo reikalavimas bandyti mišinį.

10. Informacijos tikslais 1 lentelėje pateikti agonistų bandymo rezultatai, gauti 34 medžiagoms, kurios buvo bandomos taikant abu šiame bandymo metode aprašytus visiškai patvirtintus pamatinius bandymo metodus. 26 iš šių medžiagų klasifikuojamos kaip visiškai nustatyti ER agonistai ir 8 kaip neigiamos, atsižvelgiant į paskelbtas ataskaitas, įskaitant *in vitro* prijungimo prie ER ir TA bandymus ir (arba) uterotrofinio poveikio bandymą (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34). 2 lentelėje pateikti antagonistų bandymo rezultatai, gauti 15 medžiagų, kurios buvo bandomos taikant abu šiame bandymo metode aprašytus visiškai patvirtintus pamatinius bandymo metodus. 4 iš šių medžiagų klasifikuojamos kaip visiškai nustatyti arba numanomi ER antagonistai ir 10 kaip neigiamos, atsižvelgiant į paskelbtas ataskaitas, įskaitant *in vitro* prijungimo prie ER ir TA bandymus (2) (3) (18) (31). Atsižvelgiant į 1 ir 2 lentelėse apibendrintus duomenis, buvo 100 % visų medžiagų klasifikavimo pagal abu pamatinius metodus sutapimas, išskyrus vieną antagonistų bandymo medžiagą (mifepristoną), ir kiekviena medžiaga buvo teisingai klasifikuota kaip ER agonistas arba antagonistas arba neigiama. Papildoma informacija apie šią cheminių medžiagų grupę, taip pat apie papildomas chemines medžiagas, kurios buvo bandomos atliekant STTA ir VM7Luc ER TA bandymų patvirtinimo tyrimus, pateikiama ER TA naudojimo charakteristikų standartuose (6) (7), 2 priedėlis (1, 2 ir 3 lentelės).

1 lentelė. STTA ir VM7Luc ER TA bandymų rezultatų, gautų medžiagoms, bandomoms atliekant abu agonistų bandymus, ir klasifikuojamoms kaip ER agonistai (TEIG) arba kaip neigiamos medžiagos (NEIG), apžvalga.

	Medžiaga	CASRN	STTA bandymas ¹			VM7Luc ER TA bandymas ²		Klasifikavimo duomenų šaltinis ⁴		
			ER TA aktyvumas	PC ₁₀ vertė (mol/l)	PC ₅₀ vertė ^b (mol/l)	ER TA aktyvumas	EC ₅₀ vertė ^{b, 3} (mol/l)	Kiti ER TA bandymai ^c	Jungimas prie ER	Uterotrofinis poveikis
1	17β-estradiolis ^a	50-28-2	TEIG	< 1,00 × 10 ⁻¹¹	< 1,00 × 10 ⁻¹¹	TEIG	5,63 × 10 ⁻¹²	TEIG (227/227)	TEIG	TEIG
2	17β-estradiolis ^a	57-91-0	TEIG	7,24 × 10 ⁻¹¹	6,44 × 10 ⁻¹⁰	TEIG	1,40 × 10 ⁻⁹	TEIG(11/11)	TEIG	TEIG
3	17α-etinilestradiolis ^a	57-63-6	TEIG	< 1,00 × 10 ⁻¹¹	< 1,00 × 10 ⁻¹¹	TEIG	7,31 × 10 ⁻¹²	TEIG(22/22)	TEIG	TEIG
4	17β-trenbolonas	10161-33-8	TEIG	1,78 × 10 ⁻⁸	2,73 × 10 ⁻⁷	TEIG	4,20 × 10 ⁻⁸	TEIG (2/2)	neb	neb
5	19-nortestosteronas ^a	434-22-0	TEIG	9,64 × 10 ⁻⁹	2,71 × 10 ⁻⁷	TEIG	1,80 × 10 ⁻⁶	TEIG(4/4)	TEIG	TEIG
6	4-kumilfenolis ^a	599-64-4	TEIG	1,49 × 10 ⁻⁷	1,60 × 10 ⁻⁶	TEIG	3,20 × 10 ⁻⁷	TEIG(5/5)	TEIG	neb
7	4- <i>tret</i> -oktilfenolis ^a	140-66-9	TEIG	1,85 × 10 ⁻⁹	7,37 × 10 ⁻⁸	TEIG	3,19 × 10 ⁻⁸	TEIG(21/24)	TEIG	TEIG
8	Apigeninas ^a	520-36-5	TEIG	1,31 × 10 ⁻⁷	5,71 × 10 ⁻⁷	TEIG	1,60 × 10 ⁻⁶	TEIG(26/26)	TEIG	neb
9	Atrazinas ^a	1912-24-9	NEIG	-	-	NEIG	-	NEIG (30/30)	NEIG	neb
10	Bisfenolis A ^a	80-05-7	TEIG	2,02 × 10 ⁻⁸	2,94 × 10 ⁻⁷	TEIG	5,33 × 10 ⁻⁷	TEIG(65/65)	TEIG	TEIG
11	Bisfenolis B ^a	77-40-7	TEIG	2,36 × 10 ⁻⁸	2,11 × 10 ⁻⁷	TEIG	1,95 × 10 ⁻⁷	TEIG(6/6)	TEIG	TEIG
12	Butilbenzilftalatas ^a	85-68-7	TEIG	1,14 × 10 ⁻⁶	4,11 × 10 ⁻⁶	TEIG	1,98 × 10 ⁻⁶	TEIG(12/14)	TEIG	NEIG
13	Kortikosteronas ^a	50-22-6	NEIG	-	-	NEIG	-	NEIG(6/6)	NEIG	neb
14	Kumestrolis ^a	479-13-0	TEIG	1,23 × 10 ⁻⁹	2,00 × 10 ⁻⁸	TEIG	1,32 × 10 ⁻⁷	TEIG(30/30)	TEIG	neb
15	Daidzeinas ^a	486-66-8	TEIG	1,76 × 10 ⁻⁸	1,51 × 10 ⁻⁷	TEIG	7,95 × 10 ⁻⁷	TEIG(39/39)	TEIG	TEIG
16	Dietilstilbestrolis ^a	56-53-1	TEIG	< 1,00 × 10 ⁻¹¹	2,04 × 10 ⁻¹¹	TEIG	3,34 × 10 ⁻¹¹	TEIG(42/42)	TEIG	neb
17	Di- <i>n</i> -butilftalatas	84-74-2	TEIG	4,09 × 10 ⁻⁶		TEIG	4,09 × 10 ⁻⁶	TEIG(6/11)	TEIG	NEIG
18	Etilparabenas	120-47-8	TEIG	5,00 × 10 ⁻⁶	(nėra PC ₅₀)	TEIG	2,48 × 10 ⁻⁵	TEIG		neb
19	Estronas ^a	53-16-7	TEIG	3,02 × 10 ⁻¹¹	5,88 × 10 ⁻¹⁰	TEIG	2,34 × 10 ⁻¹⁰	TEIG(26/28)	TEIG	TEIG
20	Genisteinas ^a	446-72-0	TEIG	2,24 × 10 ⁻⁹	2,45 × 10 ⁻⁸	TEIG	2,71 × 10 ⁻⁷	TEIG(100/102)	TEIG	TEIG
21	Haloperidolis	52-86-8	NEIG	-	-	NEIG	-	NEIG (2/2)	NEIG	neb
22	Kempferolis ^a	520-18-3	TEIG	1,36 × 10 ⁻⁷	1,21 × 10 ⁻⁶	TEIG	3,99 × 10 ⁻⁶	TEIG(23/23)	TEIG	neb
23	Keponas ^a	143-50-0	TEIG	7,11 × 10 ⁻⁷	7,68 × 10 ⁻⁶	TEIG	4,91 × 10 ⁻⁷	TEIG(14/18)	TEIG	neb
24	Ketokonazolas	65277-42-1	NEIG	-	-	NEIG	-	NEIG (2/2)	NEIG	neb

25	Linuronas ^a	330-55-2	NEIG	-	-	NEIG	-	NEIG (8/8)	NEIG	neb
26	Mezo-heksestrolis ^a	84-16-2	TEIG	$< 1,00 \times 10^{-11}$	$2,75 \times 10^{-11}$	TEIG	$1,65 \times 10^{-11}$	TEIG(4/4)	TEIG	neb
27	Metiltestosteronas ^a	58-18-4	TEIG	$1,73 \times 10^{-7}$	$4,11 \times 10^{-6}$	TEIG	$2,68 \times 10^{-6}$	TEIG(5/6)	TEIG	neb
28	Morinas	480-16-0	TEIG	$5,43 \times 10^{-7}$	$4,16 \times 10^{-6}$	TEIG	$2,37 \times 10^{-6}$	TEIG(2/2)	TEIG	neb
29	Noretinodrelis ^a	68-23-5	TEIG	$1,11 \times 10^{-11}$	$1,50 \times 10^{-9}$	TEIG	$9,39 \times 10^{-10}$	TEIG(5/5)	TEIG	neb
30	<i>p,p'</i> -metoksichloraNEIGs ^a	72-43-5	TEIG	$1,23 \times 10^{-6}$	(nėra PC ₅₀) ^b	TEIG	$1,92 \times 10^{-6}$	TEIG(24/27)	TEIG	TEIG
31	Fenobarbitalis ^a	57-30-7	NEIG	-	-	NEIG	-	NEIG(2/2)	NEIG	neb
32	Rezerpinas	50-55-5	NEIG	-	-	NEIG	-	NEIG(4/4)	NEIG	neb
33	Spironolaktonas ^a	52-01-7	NEIG	-	-	NEIG	-	NEIG(4/4)	NEIG	neb
34	Testosteronas	58-22-0	TEIG	$2,82 \times 10^{-8}$	$9,78 \times 10^{-6}$	TEIG	$1,75 \times 10^{-5}$	TEIG(5/10)	TEIG	neb

Santrumpos: CASRN – Cheminių medžiagų santrumpų tarnybos registro numeris; mol/l – molinė koncentracija; EC₅₀ – pusė didžiausios efektyviosios bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos; NEIG – neigiama medžiaga; TEIG – teigiama medžiaga; neb – nebandyta; PC₁₀ (ir PC₅₀) – bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant atsakas yra 10 % (arba 50 %, kai PC₅₀) teigiamos kontrolinės medžiagos (E2, 1 nmol/l) atsako kiekvienoje plokštelėje.

^a STTA ir VM7Luc ER TA bandymams naudotos gerai žinomos medžiagos, nurodytos kaip ER agonistai ar neigiamos medžiagos, kurios buvo naudojamos tikslumui įvertinti atliekant VM7Luc ER TA patvirtinimo tyrimą (ICCVAM VM7Luc ER TA įvertinimo ataskaita, 4-1 lentelė (3)).

^b Didžiausioji bandymo koncentracija, kai nėra apribojimų dėl citotoksiškumo arba netirpumo, buvo 1×10^{-5} mol/l (STTA bandymas) ir 1×10^{-3} mol/l (VM7Luc ER TA bandymas).

^c Skaičius skliaustuose rodo bandymo rezultatus, klasifikuojamus kaip teigiamus (TEIG) arba neigiamus (NEIG) visam skaičiui nurodytų tyrimų.

¹ Vertės, paskelbtos bandymo *Stabiliai transfektuotos transaktyvacijos (TA) bandymas estrogeniniam aktyvumui aptikti. Žmogaus estrogenų receptoriaus alfa tarpininkaujamas reporterinio geno bandymas, naudojant hER-HeLa-9903 ląstelių liniją* parengiamojo patvirtinimo ir tarplaboratorinio patvirtinimo ataskaitos projekte (2)

² ICCVAM bandymo metodo įvertinimo ataskaita dėl LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA) bandymo metodo: *In vitro* metodas ER agonistams ir antagonistams identifikuoti (3)

³ Vidutinės EC₅₀ vertės buvo apskaičiuotos pagal VM7Luc ER TA patvirtinimo tyrimą atlikusių laboratorijų (XDS, ECVAM ir Hiyoshi) paskelbtas vertes (3).

⁴ Klasifikavimas kaip ER agonisto ar neigiamos medžiagos buvo pagrįstas prijungimo prie ER ir TA bandymo metodų ICCVAM bendrųjų apžvalginių dokumentų (angl. *Background Review Documents*, BRD) (31) informacija, taip pat informacija, gauta iš leidinių, paskelbtų ir peržiūrėtų baigus rengti ICCVAM BRD (2) (3) (18) (31) (33) (34).

Pastabos. Kiekvienas bandymas pagal šį bandymo metodą neturi tų pačių matuojamų dydžių. Kai kuriomis aplinkybėmis EC₅₀ negali būti apskaičiuota, nes negaunama visa atsako priklausomybės nuo dozės kreivė. STTA bandymo pagrindinis matuojamas dydis yra PC₁₀ vertė, bet taip pat gali būti kitų pavyzdžių, kai naudingos informacijos galima gauti naudojant PC_x.

2 lentelė. STTA ir VM7Luc ER TA bandymų rezultatų, gautų abiejuose antagonistų bandymuose bandytoms ir kaip ER antagonistai (TEIG) arba kaip neigiamos klasifikuojamoms medžiagoms, palyginimas

	Medžiaga ^a	CASRN	ER STTA bandymas ¹		VM7Luc ER TA bandymas ²		ER STTA kandidatų poveikis ⁴	ICCVAM ⁵ sutartas klasifikavimas	MeSH ⁶ cheminė klasė	Produkto klasė ⁷
			ER TA aktyvumas	IC ₅₀ vertė ^b (mol/l)	ER TA aktyvumas	IC ₅₀ vertė ^{b, 3} (mol/l)				
1	4-hidroksitamoksifenas	68047-06-3	TEIG	$3,97 \times 10^{-9}$	TEIG	$2,08 \times 10^{-7}$	vidutinė TEIG	TEIG	Angliavandenilis (ciklinis)	Vaistai
2	Dibenzo[a,h]antracenas	53-70-3	TEIG	Nėra IC ₅₀	TEIG	Nėra IC ₅₀	TEIG	PT	Policiklinis junginys	Laboratorinė cheminė medžiaga, gamtinis produktas
3	Mifepristonas	84371-65-3	TEIG	$5,61 \times 10^{-6}$	NEIG	-	silpna TEIG	NEIG	Steroidas	Vaistai
4	Raloksifeno hidrochloridas	82640-04-8	TEIG	$7,86 \times 10^{-10}$	TEIG	$1,19 \times 10^{-9}$	vidutinė TEIG	TEIG	Angliavandenilis (ciklinis)	Vaistai
5	Tamoksifenas	10540-29-1	TEIG	$4,91 \times 10^{-7}$	TEIG	$8,17 \times 10^{-7}$	TEIG	TEIG	Angliavandenilis (ciklinis)	Vaistai
6	17β-estradiolis	50-28-2	NEIG	-	NEIG	-	PN	PN	Steroidas	Vaistai, veterinarijos priemonė
7	Apigeninas	520-36-5	NEIG	-	NEIG	-	NEIG	NEIG	Heterociklinis junginys	Dažiklis, gamtinis produktas, vaistų tarpinė medžiaga
8	Atrazinas	1912-24-9	NEIG	-	NEIG	-	NEIG	PN	Heterociklinis junginys	Herbicidas
9	Di- <i>n</i> -butilftalatas	84-74-2	NEIG	-	NEIG	-	NEIG	NEIG	Esteris, ftalio rūgšties	Kosmetikos ingredientas, pramoninė cheminė medžiaga, plastifikatorius
10	Fenarimolis	60168-88-9	NEIG	-	NEIG	-	neb	PN	Heterociklinis junginys, pirimidinas	Fungicidas
11	Flavonas	525-82-6	NEIG	-	NEIG	-	PN	PN	Flavonoidas, heterociklinis junginys	Gamtinis produktas, vaistai
12	Flutamidas	13311-84-7	NEIG	-	NEIG	-	NEIG	PN	Amidas	Vaistai, veterinarijos priemonė
13	Genisteinas	446-72-0	NEIG	-	NEIG	-	PN	NEIG	Flavonoidas, heterociklinis junginys	Gamtinis produktas, vaistai
14	<i>p-n</i> -nonilfenolis	104-40-5	NEIG	-	NEIG	-	nebandyta	NEIG	Fenolis	Tarpinis cheminis produktas
15	Resveratrolis	501-36-0	NEIG	-	NEIG	-	PN	NEIG	Angliavandenilis (ciklinis)	Gamtinis produktas

Santrumpos: CASRN – Cheminių medžiagų santrumpų tarnybos registro numeris; mol/l – molinė koncentracija; IC₅₀ – pusė didžiausiosios bandomosios cheminės medžiagos slopinamosios koncentracijos; NEIG – neigiama medžiaga; PN – prognozuojama neigiama medžiaga; TEIG – teigiama medžiaga; PT – prognozuojama teigiama medžiaga.

^a STTA ir VM7Luc ER TA bandymams naudotos gerai žinomos medžiagos, nurodytos kaip ER antagonistai ar neigiamos medžiagos, kurios buvo naudojamos tikslumui įvertinti atliekant VM7Luc ER TA patvirtinimo tyrimą (2) (3).

^b Didžiausioji bandymo koncentracija, kai nėra apribojimų dėl citotoksiškumo arba netirpumo, buvo 1×10^{-3} mol/l (STTA bandymas) ir 1×10^{-5} mol/l (VM7Luc ER TA bandymas).

¹ Stabiliai transfekuotos transkripcijos aktyvacijos bandymo ER tarpininkaujamam aktyvumui aptikti patvirtinimo tyrimas, B dalis (2)

² ICCVAM bandymo metodo įvertinimo ataskaita dėl LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA) bandymo metodo: *In vitro* metodas ER agonistams ir antagonistams identifikuoti (3).

³ Vidutinės IC₅₀ vertės buvo apskaičiuotos pagal VM7Luc ER TA patvirtinimo tyrimą atlikusių laboratorijų (XDS, ECVAM ir Hiyoshi) paskelbtas vertes (3).

⁴ Prielaida dėl ER STTA aktyvumo daroma, atsižvelgiant į praneštus poveikius, žinomus iš prijungimo prie ER receptorių CER1 bandymo istorinių duomenų, uterotrofinio bandymo duomenų ir iš atvirų šaltinių surinktos informacijos (2)

⁵ Klasifikavimas kaip ER antagonistas ar neigiamos medžiagos buvo pagrįstas prijungimo prie ER ir TA bandymų ICCVAM bendrųjų apžvalginių dokumentų (angl. *Background Review Documents*, BRD) (31) informacija, taip pat informacija, gauta iš leidinių, paskelbtų ir peržiūrėtų baigus rengti ICCVAM BRD (2) (3) (18) (31).

⁶ Cheminės medžiagos buvo priskirtos vienai ar kelioms cheminių medžiagų klasėms, naudojant JAV Nacionalinės medicinos bibliotekos Vaistų medicininių dalykines antraštes (MeSH), tarptautiniu mastu pripažintą standartizuotą klasifikavimo schemą (pateikta <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁷ Medžiagos buvo priskirtos vienai ar daugiau produktų klasių, naudojant JAV nacionalinės medicinos bibliotekos pavojingųjų medžiagų duomenų banką (pateikta <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).

ER TA BANDYMO KOMPONENTAI

Pagrindiniai bandymo komponentai

11. Šis bandymo metodas taikomas atliekant bandymus, naudojančius stabiliai transfektuotą arba endogeninį ER α receptorių ir stabiliai transfektuoto reporterinio geno darinį, kontroliuojamą vieno arba kelių estrogenų atsako elementų; tačiau gali būti kitų receptorių, pvz., ER β . Tai yra pagrindiniai bandymo komponentai.

Kontroliniai ėminiai

12. Turėtų būti aprašytas kiekvieno agonistų ir antagonistų bandymo siūlomų vienalaikių pamatinių etalonų pasirinkimo pagrindimas. Vienalaikiai kontroliniai ėminiai (neigiami, tirpiklio ir teigiami), jei tinka, naudojami kaip rodiklis, kad bandymas yra veiksmingas bandymo sąlygomis ir sudaro pagrindą bandymus lyginti tarpusavyje; paprastai jie yra tam tikro bandymo priimtumo kriterijai (1).

Standartinės kokybės kontrolės procedūros

13. Turėtų būti atliekamos kiekvienam bandymui aprašytos standartinės kokybės kontrolės procedūros, siekiant užtikrinti, kad ląstelių linija visą laiką būtų stabili atliekant kartotinius sėjimus, neturėtų mikoplazmų (t. y. nebūtų užkrėsta bakterijomis) ir ilgą laiką išsaugotų gebėjimą duoti tikėtinus ER tarpininkaujamus atsakus. Ląstelių linijos turėtų būti papildomai tikrinamos dėl jų tinkamo identiškumo, taip pat dėl kitų užkratų (pvz., grybelių, mielių grybelio ir virusų).

Laboratorijos kvalifikacijos įrodymas

14. Prieš nežinomų cheminių medžiagų bandymus pagal šį bandymo metodą, kiekviena laboratorija turėtų įrodyti kvalifikaciją taikant šį bandymo metodą. Šiuo tikslu kiekviena laboratoriją turėtų bandyti 3 lentelėje išvardytų 14 kvalifikacijai įrodyti skirtų agonistų bandymo medžiagų, ir 4 lentelėje – 10 kvalifikacijai įrodyti skirtų antagonistų bandymo medžiagų. Šis kvalifikacijos tikrinimas taip pat patvirtintų bandymo sistemos jautrį. Kvalifikacijai įrodyti skirtų medžiagų sąrašas sudaro ERTA bandymams skirtuose naudojimo charakteristikų standartuose pateiktų etaloninių medžiagų rinkinio dalį (6). Šių medžiagų yra prekyboje, jos reprezentuoja cheminių medžiagų klases, paprastai susijusias su ER agonistų ar antagonistų aktyvumu, rodo tinkamą ER agonistams ar antagonistams tikėtino veiksmingumo intervalą (t. y. nuo silpnų iki stiprių) ir jų tarpe yra neigiamų medžiagų. Kvalifikacijai įrodyti skirtų medžiagų bandymas turėtų būti kartojamas skirtingomis dienomis mažiausiai du kartus. Kvalifikacija įrodoma, jei teisingai klasifikuojama kiekviena kvalifikacijai įrodyti skirta medžiaga (teigiama ar neigiama). Kvalifikaciją turėtų pasitikrinti kiekvienas laborantas, kai mokosi atlikti bandymus. Priklausomai nuo ląstelių tipo, kai kurios kvalifikacijai tikrinti skirtos medžiagos gali elgtis kaip atrankieji estrogenų receptorių modulatoriai ir būti aktyvios kaip agonistai ir antagonistai. Tačiau kvalifikacijai įrodyti

skirtos medžiagos 3 ir 4 lentelėse klasifikuojamos pagal jų žinomą vyraujančią aktyvumą, į kurį reikėtų atsižvelgti įvertinant kvalifikaciją.

15. Kiekviena laboratorija, siekdama parodyti savo efektyvumą ir kokybės kontrolės tikslais, turėtų sudaryti agonistų ir antagonistų istorinių duomenų bazes, naudojant pamatinio etalono (pvz., 17β -estradiolio ir tamoksifeno), teigiamų ir neigiamų kontrolinių cheminių medžiagų bei tirpiklio kontrolinio ėminio (pvz., DMSO) duomenis. Pradžiai duomenų bazė turėtų būti sukurta pagal ne mažiau kaip 10 agonisto (pvz., 17β -estradiolio) ir 10 antagonisto (pvz., tamoksifeno) nepriklausomų atskirų bandymų rezultatus. Reikėtų įtraukti šių pamatinių etalonų ir tirpiklių kontrolinių ėminių busimų analizių rezultatus, siekiant išplėsti duomenų bazę, kad ilgą laiką būtų užtikrintas laboratorijos biologinio tyrimo atlikimo pastovumas ir efektyvumas.

3 lentelė. Kvalifikacijai įrodyti skirtų (14) agonistų bandymo medžiagų sąrašas⁸

Nr. ^{o7}	Medžiaga	CASRN	Numanomas atsakas ¹	STTA bandymas			VM7Luc ER TA bandymas		MeSH cheminė klasė ⁵	Produkto klasė ⁶
				PC ₁₀ vertė (mol/l) ²	PC ₅₀ vertė (mol/l) ²	Bandymo konc. intervalas (mol/l)	VM7Luc EC ₅₀ vertė (mol/l) ³	Didžiausioji intervalo nustatymo konc. (mol/l) ⁴		
14	Dietilstilbestrolis	56-53-1	TEIG	$< 1,00 \times 10^{-11}$	$2,04 \times 10^{-11}$	$10^{-14} - 10^{-8}$	$3,34 \times 10^{-11}$	$3,73 \times 10^{-4}$	Angliavandenilis (ciklinis)	Vaistai, veterinarijos priemonė
12	17 α -estradiolis	57-91-0	TEIG	$4,27 \times 10^{-11}$	$6,44 \times 10^{-10}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1,40 \times 10^{-9}$	$3,67 \times 10^{-3}$	Steroidas	Vaistai, veterinarijos priemonė
15	Mezo-heksestrolis	84-16-2	TEIG	$< 1,00 \times 10^{-11}$	$2,75 \times 10^{-11}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1,65 \times 10^{-11}$	$3,70 \times 10^{-3}$	Angliavandenilis (ciklinis), fenolis	Vaistai, veterinarijos priemonė
11	4-tret-oktilfenolis	140-66-9	TEIG	$1,85 \times 10^{-9}$	$7,37 \times 10^{-8}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$3,19 \times 10^{-8}$	$4,85 \times 10^{-3}$	Fenolis	Tarpinis cheminis produktas
9	Genisteinas	446-72-0	TEIG	$2,24 \times 10^{-9}$	$2,45 \times 10^{-8}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$2,71 \times 10^{-7}$	$3,70 \times 10^{-4}$	Flavonoidas, heterociklinis junginys	Gamtinis produktas, vaistai
6	Bisfenolis A	80-05-7	TEIG	$2,02 \times 10^{-8}$	$2,94 \times 10^{-7}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$5,33 \times 10^{-7}$	$4,38 \times 10^{-3}$	Fenolis	Tarpinis cheminis produktas
2	Kempferolis	520-18-3	TEIG	$1,36 \times 10^{-7}$	$1,21 \times 10^{-6}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$3,99 \times 10^{-6}$	$3,49 \times 10^{-3}$	Flavonoidas, heterociklinis junginys	Gamtinis produktas
3	Butilbenzilftalatas	85-68-7	TEIG	$1,14 \times 10^{-6}$	$4,11 \times 10^{-6}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1,98 \times 10^{-6}$	$3,20 \times 10^{-4}$	Karboksirūgšties esteris, ftalio rūgšties	Plastifikatorius, pramoninė cheminė medžiaga
4	p,p'-metoksichloras	72-43-5	TEIG	$1,23 \times 10^{-6}$	-	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1,92 \times 10^{-6}$	$2,89 \times 10^{-3}$	Angliavandenilis (halogenintas)	Pesticidas, veterinarijos priemonė
1	Etilparabenas	120-47-8	TEIG	$5,00 \times 10^{-6}$	-	$10^{-11} - 10^{-5}$	$2,48 \times 10^{-5}$	$6,02 \times 10^{-3}$	Karboksirūgštis, fenolis	Vaistai, konservantas
17	Atrazinas	1912-24-9	NEIG	-	-	$10^{-10} - 10^{-4}$	-	$4,64 \times 10^{-4}$	Heterociklinis junginys	Herbicidas
20	Spironolaktonas	52-01-7	NEIG	-	-	$10^{-11} - 10^{-5}$	-	$2,40 \times 10^{-3}$	Laktonas, steroidas	Vaistai
21	Ketokonazolas	65277-42-1	NEIG	-	-	$10^{-11} - 10^{-5}$	-	$9,41 \times 10^{-5}$	Heterociklinis junginys	Vaistai
22	Rezerpinas	50-55-5	NEIG	-	-	$10^{-11} - 10^{-5}$	-	$1,64 \times 10^{-3}$	Heterociklinis junginys, indolas	Vaistai, veterinarijos priemonė

Santrumpos: CASRN – Cheminių medžiagų santrumpų tarnybos registro numeris. EC₅₀ – pusė didžiausios efektyviosios bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos; NEIG – neigiama medžiaga; TEIG – teigiama medžiaga; PC₁₀ (ir PC₅₀) – bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant atsakas yra 10 % (arba 50 %, kai PC₅₀) teigiamos kontrolinės medžiagos (E2, 1 nmol/l) atsako kiekvienoje plokštelėje.

- ¹ Klasifikavimas kaip teigiamo ar neigiamo ER agonisto aktyvumo buvo pagrįstas prijungimo prie ER ir TA bandymų ICCVAM bendraisiais apžvalginiais dokumentais (angl. *Background Review Documents*, BRD) (31), taip pat empiriniais duomenimis ir kita informacija, gauta iš nuorodose pateiktų bandymų, paskelbtų ir peržiūrėtų baigus rengti ICCVAM BRD (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34).
- ² Vertės, paskelbtos bandymo *Stabiliai transfekuotos transaktyvacijos (TA) bandymas estrogeniniam aktyvumui aptikti. Žmogaus estrogenų receptoriaus alfa tarpininkaujamas reporterinio geno bandymas, naudojant hER-HeLa-9903 ląstelių liniją* parengiamojo patvirtinimo ir tarplaboratorinio patvirtinimo ataskaitos projekte (30) (30).
- ³ Vidutinės EC₅₀ vertės buvo apskaičiuotos pagal VM7Luc ER TA patvirtinimo tyrimą atlikusių laboratorijų (XDS, ECVAM ir Hiyoshi) paskelbtas vertes (3).
- ⁴ Praneštos koncentracijos buvo didžiausios bandymo koncentracijos (intervalo nustatymo), atliekant VM7Luc ER TA bandymo patvirtinimą. Jei laboratorijų naudojamos koncentracijos skiriasi, pranešama didžiausioji koncentracija. Žr. ICCVAM bandymo metodo įvertinimo ataskaitos 4-10 lentelę; LUMI-Cell®ER (VM7Luc ER TA) bandymo metodas: *In vitro* bandymas cheminių medžiagų, kaip žmogaus estrogenų receptorių agonistų ir antagonistų, aktyvumui identifikuoti (3).
- ⁵ Cheminės medžiagos buvo priskirtos vienai ar kelioms cheminių medžiagų klasėms, naudojant JAV Nacionalinės medicinos bibliotekos Vaistų medicininių dalykines antraštes (MeSH), tarptautiniu mastu pripažintą standartizuota klasifikavimo schemą (paskelbta <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).
- ⁶ Medžiagos buvo priskirtos vienai ar daugiau produktų klasių, naudojant JAV nacionalinės medicinos bibliotekos pavojingųjų medžiagų duomenų bazę (paskelbta <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).
- ⁷ Iš naudojimo charakteristikų standartų (6) 1 lentelės (ER agonistų tikslumo įvertinimo etaloninių cheminių medžiagų sąrašas (22)).
- ⁸ Jei kvalifikacijai įrodyti skirtų medžiagų nebėra prekyboje, gali būti naudojama tokios pačios klasės ir palyginamo veiksmingumo, veikimo būdo ir tos pačios cheminių medžiagų klasės medžiaga.

4 lentelė. Kvalifikacijai įrodyti skirtų (10) antagonistų bandymo medžiagų sąrašas

	Medžiaga ^a	CASRN	ER STTA bandymas ¹			VM7Luc ER TA bandymas ²			ER STTA ¹ kandidatų poveikis	ICCVAM ⁵ sutartas klasifikavimas	MeSH ⁶ Cheminė klasė	Produkto klasė ⁷
			ER TA aktyvumas	IC ₅₀ (mol/l)	Bandymo konc. intervalas (mol/l)	ER TA aktyvumas	IC ₅₀ ³ (mol/l)	Didžiausioji intervalo nustatymo konc. (mol/l) ⁴				
1	4- hidroksitamoksifenas	68047-06-3	TEIG	$3,97 \times 10^{-9}$	$10^{-12} - 10^{-7}$	TEIG	$2,08 \times 10^{-7}$	$2,58 \times 10^{-4}$	vidutinė TEIG	TEIG	Angliavandenilis (ciklinis)	Vaistai
2	Raloksifeno hidrochloridas	82640-04-8	TEIG	$7,86 \times 10^{-10}$	$10^{-12} - 10^{-7}$	TEIG	$1,19 \times 10^{-9}$	$1,96 \times 10^{-4}$	vidutinė TEIG	TEIG	Angliavandenilis (ciklinis)	Vaistai
3	Tamoksifenas	10540-29-1	TEIG	$4,91 \times 10^{-7}$	$10^{-10} - 10^{-5}$	TEIG	$8,17 \times 10^{-7}$	$2,69 \times 10^{-4}$	TEIG	TEIG	Angliavandenilis (ciklinis)	Vaistai
4	17β-estradiolis	50-28-2	NEIG	-	$10^{-9} - 10^{-4}$	NEIG	-	$3,67 \times 10^{-3}$	turėtų būti neigiama*	PN	Steroidas	Vaistai, veterinarijos priemonė
5	Apigeninas	520-36-5	NEIG	-	$10^{-9} - 10^{-4}$	NEIG	-	$3,70 \times 10^{-4}$	NEIG	NEIG	Heterociklinis junginys	Dažiklis, gamtinis produktas, vaistų tarpinė medžiaga
6	Di- <i>n</i> -butilftalatas	84-74-2	NEIG	-	$10^{-8} - 10^{-3}$	NEIG	-	$3,59 \times 10^{-3}$	NEIG	NEIG	Esteris, ftalio rūgšties	Kosmetikos ingredientas, pramoninė cheminė medžiaga, plastifikatorius
7	Flavonas	525-82-6	NEIG	-	$10^{-8} - 10^{-3}$	NEIG	-	$4,50 \times 10^{-4}$	turėtų būti neigiama*	PN	Flavonoidas, heterociklinis junginys	Gamtinis produktas, vaistai
8	Genisteinas	446-72-0	NEIG	-	$10^{-9} - 10^{-4}$	NEIG	-	$3,70 \times 10^{-4}$	turėtų būti neigiama*	NEIG	Flavonoidas, heterociklinis junginys	Gamtinis produktas, vaistai
9	<i>p-n</i> -nonilfenolis	104-40-5	NEIG	-	$10^{-9} - 10^{-4}$	NEIG	-	$4,54 \times 10^{-4}$	nebandyta	NEIG	Fenolis	Tarpinis cheminis produktas
10	Resveratrolis	501-36-0	NEIG	-	$10^{-8} - 10^{-3}$	NEIG	-	$4,38 \times 10^{-4}$	turėtų būti neigiama*	NEIG	Angliavandenilis (ciklinis)	Gamtinis produktas

Santrumpos: CASRN – Cheminių medžiagų santrumpų tarnybos registro numeris; mol/l – molinė koncentracija; IC₅₀ – pusė didžiausiosios bandomosios cheminės medžiagos slopinamosios koncentracijos; NEIG – neigiama medžiaga; PN – prognozuojama neigiama medžiaga; TEIG – teigiama medžiaga.

* Klasifikuojama kaip neigiama pagal literatūros apžvalgą (2).

^a STTA ir VM7Luc ER TA bandymams naudotos gerai žinomos medžiagos, nurodytos kaip ER antagonistai ar neigiamos medžiagos, kurios buvo naudojamos tikslumui įvertinti atliekant VM7Luc ER TA patvirtinimo tyrimą (2) (3).

¹ Stabiliai transfekuotos transkripcijos aktyvacijos bandymo ER tarpininkaujamam aktyvumui aptikti patvirtinimo tyrimas, B dalis (2)

² ICCVAM bandymo metodo įvertinimo ataskaita dėl LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA) bandymo metodo: *In vitro* metodas ER agonistams ir antagonistams identifikuoti (3).

³ Vidutinės IC₅₀ vertės buvo apskaičiuotos pagal VM7Luc ER TA patvirtinimo tyrimą atlikusių laboratorijų (XDS, ECVAM ir Hiyoshi) paskelbtas vertės (3).

⁴ Praneštos koncentracijos buvo didžiausios bandymo koncentracijos (intervalo nustatymo), atliekant VM7Luc ER TA bandymo patvirtinimą. Jei laboratorijų naudojamos koncentracijos skiriasi, pranešama didžiausioji koncentracija. Žr. ICCVAM bandymo metodo įvertinimo ataskaitos 4-11 lentelę; LUMI-Cell®ER (VM7Luc ER TA) bandymo metodas: *in vitro* bandymas cheminių medžiagų, kaip žmogaus estrogenų receptorių agonistų ir antagonistų, aktyvumui identifikuoti (3).

⁵ Klasifikavimas kaip ER antagonistas ar neigiamos medžiagos buvo pagrįstas prijungimo prie ER ir TA bandymo metodų ICCVAM bendrųjų apžvalginių dokumentų (angl. *Background Review Documents*, BRD) (31) informacija, taip pat informacija, gauta iš leidinių, paskelbtų ir peržiūrėtų baigus rengti ICCVAM BRD (2) (3) (18) (31).

⁶ Cheminės medžiagos buvo priskirtos vienai ar kelioms cheminių medžiagų klasėms, naudojant JAV Nacionalinės medicinos bibliotekos Vaistų medicininių dalykines antraštes (MeSH), tarptautiniu mastu pripažintą standartizuotą klasifikavimo schemą (pateikta <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁷ Medžiagos buvo priskirtos vienai ar daugiau produktų klasių, naudojant JAV nacionalinės medicinos bibliotekos pavojingųjų medžiagų duomenų banką (pateikta <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).

Atskiro bandymo priimtumo kriterijai

16. Atskiro bandymo priėmimas arba atmetimas grindžiamas kiekvieno bandymo pamatinių etalonų ir kontrolinių ėminių rezultatų įvertinimu. Pamatinių etalonų PC₅₀ (EC₅₀) arba IC₅₀ vertės turėtų atitikti priimtumo kriterijus, numatytus pasirinktam bandymui (STTA, žr. 2 priedėlį, VM7Luc ER TA, žr. 3 priedėlį), ir visos teigiamos ir (arba) neigiamos kontrolinės medžiagos turėtų būti tinkamai klasifikuojami atliekant kiekvieną priimtą bandymą. Gebėjimas nuosekliai atlikti bandymą turėtų būti įrodytas sukuriant ir tvarkant pamatinių etalonų ir kontrolinių medžiagų istorinių duomenų bazę (žr. 15 pastraipą). Kaip laboratorijos atkuriamumo matą galima naudoti kartotinių bandymų skaičiui gautų pamatinių etalonų kreivės priderinimo parametrų vidurkių standartinius nuokrypius (SN) arba variacijos koeficientus (VK). Be to, reikėtų atitikti šiuos priimtumo kriterijams taikomus principus:

- duomenų turėtų pakakti ER aktyvinimo (agonistų bandymo) arba slopinimo (antagonistų bandymo) (t. y. efektyvumo ir veiksmingumo) kiekybiniam vertinimui;
- siekiant užtikrinti reikiamą jautrį, etaloninės koncentracijos etaloninio estrogeno vidutinis reporterio aktyvumas bent turėtų būti lygus mažiausiam aktyvumui, nurodytam nešiklio (tirpiklio) kontrolinių ėminių bandymams. STTA ir VM7Luc ER TA bandymų atveju jis yra keturis kart didesnis nei vidutinio nešiklio kontrolinio ėminio kiekvienoje plokštelėje.
- bandymo koncentracijos turėtų atitikti bandomųjų cheminių medžiagų tirpumo intervalą ir neturėtų sukelti citotoksiškumo.

Duomenų analizė

17. Klasifikuojant kiekvieno bandymo teigiamą ir neigiamą atsaką turėtų būti naudojama nustatyta duomenų aiškinimo procedūra.

18. Atitiktis priimtumo kriterijams (16 pastraipa) rodo tinkamą bandymo atlikimą, bet tai neužtikrina, kad atliekant konkretų atskirą bandymą bus gauti tikslūs duomenys. Pirmojo atskiro bandymo rezultatų pakartojimas yra geriausias tikslų duomenų gavimo rodiklis. Jie dviejų atskirų bandymų rezultatai yra atkuriami (pvz., abiejų atskirų bandymų rezultatai rodo, kad cheminė medžiaga yra teigiama), trečiasis atskiras bandymas nėra būtinas.

19. Jei dviejų atskirų bandymų rezultatai nėra atkuriami (pvz., bandomoji cheminė medžiaga yra teigiama pagal vieną atskirą bandymą ir neigiama pagal kitą atskirą bandymą), arba jei reikia didesnio šio bandymo rezultatų tikrumo laipsnio, reikėtų atlikti ne mažiau kaip tris nepriklausomus bandymus. Šiuo atveju klasifikavimas nustatomas pagal du sutampančius bandymus iš trijų.

Bendrieji duomenų aiškinimo kriterijai

20. Šiuo metu nėra visuotinai sutarto ER TA duomenų aiškinimo metodo. Tačiau ER tarpininkaujamo aktyvumo kokybinius (pvz., teigiama ar neigiama) ir (arba) kiekybinius

(pvz., EC₅₀, PC₅₀, IC₅₀) vertinimo rezultatus reikėtų pagrįsti empiriniais duomenimis ir svariais moksliniais įrodymais. Jei įmanoma, teigiamus rezultatus reikėtų apibūdinti poveikio dydžiu palyginti su nešiklio (tirpiklio) kontroliniu ėminiui arba su etaloniniu estrogenu ir poveikio atsiradimo koncentracija (pvz., EC₅₀, PC₅₀, RPC_{Max}, IC₅₀ ir kt.).

Bandymo ataskaita

21. Į bandymo ataskaitą turėtų būti įtraukta ši informacija:

Bandymas:

- naudotas bandymas;
- kontrolinė medžiaga, pamatinis etalonas, bandomoji cheminė medžiaga;
- šaltinis, partijos numeris, naudojimo pabaigos data, jei yra;
- pačios bandomosios cheminės medžiagos stabilumas, jei žinomas;
- bandomosios cheminės medžiagos tirpumas tirpiklyje ir stabilumas, jei yra žinomas;
- pH, osmolialumo ir nuosėdų matavimas kultūros terpėje, į kurią bandomoji cheminė medžiaga buvo pridėta, jei reikia.

Vienkomponentė medžiaga:

- fizinė išvaizda, tirpumas vandenyje ir papildomos būdingos fizikinės ir cheminės savybės;
- cheminio identifikavimo duomenys, pvz., IUPAC ar CAS pavadinimas, CAS numeris, SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė, grynumas, cheminis priemaišų pavadinimas, jei tinka bei praktiškai įmanoma ir kt..

Daugiakomponentė medžiaga, UVCB ir mišiniai:

- kuo išsamesnis sudedamųjų dalių apibūdinimas, nurodant cheminį pavadinimą (žr. pirmiau), kiekybinį paplitimą ir būdingas fizikines ir chemines savybes.

Tirpiklis ir (arba) nešiklis

- apibūdinimas (tipas, tiekėjas ir partija);
- tirpiklio ir (arba) nešiklio pasirinkimo pagrindimas;
- bandomosios cheminės medžiagos tirpumas ir stabilumas tirpiklyje ar nešiklyje, jei yra žinomas.

Ląstelės:

- ląstelių tipas ir šaltinis:

- ar yra endogeninė ER ekspresija? Jei ne, kuris (-ie) receptoriai (-iai) buvo transfekuoti (-i)?
 - naudotas (-i) reporterio darinys (-iai) (įskaitant šaltinio rūšį);
 - transfekavimo metodas;
 - pasirinktas stabilus transfekavimo užtikrinimo metodas (jei tinka);
 - ar transfekavimo metodas tinka stabilioms linijoms?
- sėjimų skaičius (po atitirpinimo);
 - ląstelių sėjimo numeris po atitirpinimo;
 - ląstelių kultūros priežiūros metodai;

Bandymo sąlygos:

- tirpumo apribojimai;
- taikomų gyvybingumo vertinimo metodų aprašymas;
- terpių sudėtis, CO₂ koncentracija;
- bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos vertės;
- nešiklio ir pridėtos bandomosios cheminės medžiagos tūris;
- inkubavimo temperatūra ir drėgmė;
- apdorojimo trukmė;
- ląstelių tankis apdorojimo pradžioje ir jo metu;
- teigiamas ir neigiamas pamatinis etalonas;
- reporterio reagentai (produkto pavadinimas, tiekėjas ir partija);
- atskirų bandymų vertinimo kaip teigiamų, neigiamų ar abejotinų kriterijai.

Priimtumo tikrinimas:

- kiekvienai bandymo plokštei gautas indukcijos pokytis kartais ir jo atitiktis mažiausiam bandymui reikiamam padidėjimui, atsižvelgiant į istorinius kontrolinių ėminių duomenis;
- faktinės priimtumo kriterijų vertės, pvz., log₁₀EC₅₀, log₁₀PC₅₀, logIC₅₀ ir vienaikių teigiamų kontrolinių ėminių ir (arba) pamatinių etalonų Hillo krypties koeficiento vertės;

Rezultatai:

- neapdoroti ir normalizuotieji duomenys;
- didžiausias indukcijos pokyčio kartais lygis;

- citotoksiškumo duomenys;
- mažiausioji efektyvioji koncentracija (LEC), jei yra;
- RPC_{Max} , PC_{Max} , PC_{50} , IC_{50} ir (arba) EC_{50} vertės, jei tinka;
- koncentracijos ir atsako priklausomybė, jei įmanoma,
- statistinės analizės duomenys, jei yra, kartu su paklaidų ir pasiklivimo matu (pvz., vidurkio standartinė paklaida, SN, VK arba 95 % pasiklivimo intervalas) ir šių verčių gavimo būdo aprašymas;

Rezultatų aptarimas

Išvada

LITERATŪRA

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

- (9) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept. *Climacteric*, 5 Suppl 2: 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 priedėlis

APIBRĖŽTYS IR SANTRUMPOS

Priimtino kriterijai – minimalūs reikalavimai, keliami bandymo kontrolinių ėminių ir pamatinių etalonų bandymo rezultatams. Būtina atitikti visus priimtino kriterijus, kad bandymą būtų galima laikyti tinkamu.

Tikslumas (sutapimas) – bandymo rezultatų ir patvirtintų pamatinių verčių sutapimo artumas. Tikslumas yra bandymo naudojimo charakteristikų matas ir vienas iš „tinkamumo“ aspektų. Terminas dažnai vartojamas kaip lygiavertis terminui „sutapimas“ ir reiškia tinkamų bandymo rezultatų dalį (1).

Agonistas – medžiaga, kuri duoda atsaką, pvz., transkripciją, kai ji prijungiama prie specifinio receptoriaus.

Antagonistas – tam tikro tipo receptoriaus ligandas arba cheminė medžiaga, kuri prijungta prie receptoriaus pati nesukelia biologinio atsako, bet blokuoja arba slopina agonistų tarpininkaujamus atsakus.

Antiestrogeninis aktyvumas – cheminės medžiagos gebėjimas slopinti 17β -estradiolio veikimą per estrogenų receptorių, kaip tarpininkus.

Ląstelių morfologija – audinio kultūros plokštelės vieno šulinėlio monosluoksnyje auginamų ląstelių forma ir išvaizda. Žūstančios ląstelės dažnai yra nenormalios morfologijos.

CF – endokrininę sistemą ardančių cheminių medžiagų bandymo ir vertinimo EBPO konceptuali sistema.

Apdorojimas dekstranu dengtomis medžio anglimis – ląstelių kultūrai naudojamo serumo apdorojimas. Apdorojant dekstranu dengtomis medžio anglimis (apdorojimas dažnai vadinamas stripingu) pašalinami endogeniniai hormonai ir hormonus jungiantys baltymai.

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

Citotoksiškumas – ląstelių struktūrai ar funkcijai daromas kenksmingas poveikis, galintis sukelti ląstelių žūtį, ir jį gali rodyti mažesnis šulinėlyje esančių ląstelių skaičius ekspozicijos laikotarpio pabaigoje arba gebėjimo sumažėjimas matuojant ląstelių funkciją palyginti su viena laikiu nešiklio kontroliniu ėminiu.

VK – variacijos koeficientas.

DCC-FBS – galvijų vaisiaus kraujo serumas, apdorotas dekstranu dengtomis medžio anglimis.

DMEM – *Dulbecco* modifikuota *Eagle* terpė.

DMSO – dimetilsulfoksidas.

E2 – 17 β -estradiolis.

EC₅₀ – pusė didžiausiosios efektyviosios bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos.

ED – endokrininės sistemos ardymas.

hER α – žmogaus estrogenų receptoriaus alfa.

hER β – žmogaus estrogenų receptoriaus beta.

EFM – estrogenų neturinti terpė. *Dulbecco* modifikuota *Eagle* terpė (DMEM), papildyta 4,5 % dekstranu dengtų medžio anglių apdorotu FBS, 1,9 % L-glutamino ir 0,9 % penicilino bei streptomicino.

ER – estrogenų receptorius.

ERE – estrogenams jautrus elementas.

Estrogeninis aktyvumas – cheminės medžiagos gebėjimas rodyti panašias į 17 β -estradiolio jungimosi prie estrogenų receptorių ir jų aktyvinimo savybes. hER α tarpininkaujamas estrogeninis aktyvumas gali būti aptiktas šiuo bandymo metodu.

ERTA – estrogenų receptoriaus transaktyvacija.

FBS – galvijų vaisiaus kraujo serumas.

HeLa – imortalizuotų žmogaus gimdos kaklelio ląstelių linija.

HeLa9903 – HeLa ląstelės subklonas, į kurį yra stabiliai transfekuotas hER α ir liuciferazės reporterinis genas.

IC₅₀ – pusė didžiausiosios efektyviosios slopinančios bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos.

ICCVAM – alternatyvių metodų patvirtinimo tarpžinybinis koordinavimo komitetas.

Atkuriamumas tarp laboratorijų – laipsnio, kuriuo skirtingos kvalifikuotos laboratorijos, naudodamos tą patį protokolą ir bandančios tas pačias medžiagas, gali gauti kokybiškai ir kiekybiškai panašius rezultatus, matas. Atkuriamumas tarp laboratorijų nustatomas, atliekant parengiamąjį patvirtinimą ir tinkamumo patvirtinimą, ir rodo laipsnį, kuriuo bandymas gali būti sėkmingai perkeliamas tarp laboratorijų; taip pat vadinamas tarplaboratoriniu atkuriamumu (1).

Atkuriamumas laboratorijoje – laipsnio, kuriuo kvalifikuoti darbuotojai toje pačioje laboratorijoje gali sėkmingai atkartoti rezultatus, skirtingu metu naudodami tam tikrą protokolą, matas. Dar vadinamas laboratoriniu atkuriamumu (1).

LEC – mažiausioji efektyvioji koncentracija yra mažiausia bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant gaunamas atsakas (t. y. mažiausia bandomosios cheminės medžiagos

koncentracija, kuriai esant indukcijos pokytis kartais statistiškai skiriasi nuo viena laiko nešiklio kontrolinio ėminio).

„Aš irgi“ (angl. *me-too*) bandymas – šnekamosios kalbos pasakymas, kuriuo vadinamas bandymo metodas, struktūriniu ir funkciniu požiūriu panašus į patvirtinto tinkamumo ir pripažintą pamatinį bandymo metodą. Vartojamas kaip lygiavertis terminui „panašus bandymo metodas“.

MT – metalotioneinas.

MMTV – pelių pieno liaukų auglio virusas.

OHT – 4-hidroksitamoksifenas.

PBTG – į rezultatus orientuotos bandymo gairės.

PC (teigiama kontrolinė medžiaga) – didelio aktyvumo medžiaga, pageidautina 17β -estradiolis, įtraukiama į visus bandymus, kad būtų užtikrinta reikiama bandymo eiga.

PC₁₀ – bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant išmatuotas aktyvumas, gautas atliekant agonistų bandymą, yra 10 % didžiausio PC (E2 1 nmol/l, STTA bandymas) kiekvienoje plokštelėje sukkelto aktyvumo.

PC₅₀ – bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant išmatuotas aktyvumas, gautas atliekant agonistų bandymą, yra 50 % didžiausio PC (bandymo metode nurodytos E2 etaloninės koncentracijos) kiekvienoje plokštelėje sukkelto aktyvumo.

PC_{Max} – RPC_{Max} sukelianti bandomosios cheminės medžiagos koncentracija.

Naudojimo charakteristikų standartai – patvirtintu bandymo metodu pagrįsti standartai, kurie yra pagrindas įvertinti mechanizmo ir funkciniu požiūriu panašaus siūlomo bandymo metodo palyginamumą. Įtraukti: 1) esminiai bandymo metodo komponentai; 2) etaloninių cheminių medžiagų, parinktų iš cheminių medžiagų, naudojamų patvirtinto bandymo metodo priimtinioms naudojimo charakteristikoms įrodyti, būtinas sąrašas; ir 3) palyginamieji tikslumo bei patikimumo lygiai, pagrįsti gautais patvirtintam bandymo metodui, kuriuos siūlomas bandymo metodas turėtų rodyti, kai yra įvertinamas naudojant būtinąjį etaloninių cheminių medžiagų sąrašą (1).

Kvalifikacijai įrodyti skirtos medžiagos – į naudojimo charakteristikų standartus įtrauktų etaloninių medžiagų, kurias laboratorijos gali naudoti, norėdamos įrodyti standartizuoto bandymo metodo taikymo techninę kompetenciją, rinkinio dalis. Šių medžiagų atrankos kriterijus paprastai sudaro jų atitiktis atsakų intervalui, galimybė jų nusipirkti ir aukštos kokybės etaloninių duomenų buvimas.

Kvalifikacija – įrodytas gebėjimas tinkamai atlikti bandymą prieš bandant nežinomas medžiagas.

Etaloninis estrogenas (teigiama kontrolinė medžiaga, PC) – 17β -estradiolis (E2, CAS 50-28-

2).

Pamatinis etalonas – etaloninė medžiaga, naudojama bandymo tinkamumui įrodyti. 17 β -estradiolis yra pamatinis etalonas, atliekant STTA ir VM7Luc ER TA bandymus.

Pamatiniai bandymo metodai – bandymai, kuriais pagrįstos PBTG 455.

Tinkamumas – santykio tarp bandymo ir tiriamo poveikio apibūdinimas bei bandymo reikšmingumo ir naudingumo siekiant tam tikro tikslo nustatymas. Tai yra atliekant bandymą tiriamo biologinio poveikio matavimo ar prognozavimo tikslumo laipsnis. Tinkamumas aprėpia bandymo metodo tikslumo (atitikties) aspektą (1).

Patikimumas – pagal tą patį protokolą atliekamo bandymo, ilgą laiką taikomo laboratorijose ir tarp laboratorijų, atkuriamumo laipsnio matas. Patikimumas įvertinamas apskaičiuojant atkuriamumą laboratorijoje ir tarp laboratorijų.

RLU – santykiniai šviesos vienetai.

RNR – ribonukleino rūgštis.

RPC_{Max} – didžiausias bandomosios cheminės medžiagos sukulto atsako lygis, išreikštas kaip tos pačios plokštelės 1 nmol/l E2 tirpalo sukulto atsako procentinė dalis.

RPMI – RPMI 1640 terpė, papildyta 0,9 % penicilino ir streptomicino bei 8,0 % galvijų vaisiaus kraujo serumu (FBS)

Atskiras bandymas – pavienis bandymas, kuriuo įvertinama cheminės medžiagos įtaka bandymo biologiniam rezultatui. Kiekvienas atskiras bandymas yra visas bandymas, atliekamas su vienu metu iš vieno šaltinio pasėtų ląstelių kartotiniaus šulinėliais.

Nepriklausomas bandymas – atskiras nepriklausomas bandymas, kuriuo įvertinama cheminės medžiagos įtaka bandymo biologiniam rezultatui, naudojant skirtingo šaltinio ląsteles ir naujai atskiestas chemines medžiagas, ir kuris atliekamas skirtingomis dienomis arba tą pačią dieną, bet kito personalo.

SN – standartinis nuokrypis.

Jautris – visų teigiamų ir (arba) veikliųjų cheminių medžiagų, kurios yra tinkamai klasifikuotos atliekant bandymą, dalis. Jis yra bandymo, kuriuo gaunami su kategorija susiję rezultatai, tikslumo matas ir svarbus aspektas vertinant bandymo tinkamumą (1).

Specifiškumas – visų neigiamų ar neveikliųjų cheminių medžiagų, kurios yra tinkamai klasifikuotos atliekant bandymą, dalis. Jis yra bandymo, kuriuo gaunami su kategorija susiję rezultatai, tikslumo matas ir svarbus aspektas vertinant bandymo tinkamumą (1).

Stabilus transfekavimas – toks DNR transfekavimo į auginamas ląsteles būdas, kai DNR stabiliai integruojama į ląstelių genomą, gaunant stabilią transfekuočių genų ekspresiją. Stabiliai transfekuočių ląstelių klonai atrenkami stabiliais žymekliais (pvz., pagal atsparumą G418).

STTA bandymas – stabiliai transfektuotos transaktyvacijos bandymas, ER α transkripcijos aktyvacijos bandymas naudojant HeLa 9903 ląstelių liniją.

Tyrimas – visos apimties eksperimentinis darbas, skirtas atskirai konkrečiai medžiagai įvertinti, atliekant tam tikrą bandymą. Tyrimas aprėpia visus etapus, įskaitant bandomosios medžiagos skiedimo bandymo terpėje bandymus, parengiamuosius intervalo nustatymo atskirus bandymus, visus būtinus galutinius bandymus, duomenų analizę, kokybės užtikrinimą, citotoksiškumo vertinimą ir kt. Baigus tyrimą galima klasifikuoti bandomosios cheminės medžiagos aktyvumą kaip toksinės medžiagos (t. y. aktyvi, neaktyvi arba nėra rezultato), kuris yra įvertinamas atliekant bandymą, ir gauti veiksmingumo įvertį palyginti su teigiama etalonine chemine medžiaga.

Medžiaga – pagal REACH¹² cheminė medžiaga apibrėžiama kaip natūralus arba gamybos proceso metu gautas cheminis elementas ir cheminių elementų junginys, įskaitant priedus, reikalingus jo stabilumui išlaikyti, ir priemaišas, atsirandančias gaminant, išskyrus tirpiklius, kurie gali būti atskirti nedarant poveikio medžiagos stabilumui ar nepakeičiant jos sudėties; Labai panaši apibrėžtis naudojama JT GHS (1).

TA (transaktyvacija) – mRNR sintezės iniciacija kaip atsakas į specifinį cheminį signalą, pvz., estrogeno prijungimą prie estrogenų receptoriaus.

Bandymas – pagal šį bandymo metodą, bandymas yra viena iš procedūrų, kuri laikoma tinkama atsižvelgiant į nurodytus veiksmingumo kriterijus. Bandymo komponentai yra, pavyzdžiui, tam tikra ląstelių linija ir susijusios jų auginimo sąlygos, tam tikra bandymo atlikimo terpė, plokštelės schemos sąlygos, bandomųjų cheminių medžiagų išdėstymas ir skiedimo koncentracijos, taip pat visos kitos būtinos kokybės kontrolės priemonės ir susiję duomenų įvertinimo veiksmai.

Bandomoji cheminė medžiaga – taikant šį metodą bandoma medžiaga arba mišinys.

Transkripcija – mRNR sintezė.

UVCB – nežinomos ar kintamos sudėties medžiagos, sudėtingųjų reakcijų produktai ir biologinės medžiagos.

Patvirtinto tinkamumo bandymo metodas – bandymo metodas, kurio tinkamumo tam tikram tikslui pasiekti patvirtinimo tyrimai buvo atlikti, nustatant tinkamumą (įskaitant tikslumą) ir

¹² 2006 m. gruodžio 18 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentas (EB) Nr. 1907/2006 dėl cheminių medžiagų registracijos, įvertinimo, autorizacijos ir apribojimų (REACH), įsteigiantis Europos cheminių medžiagų agentūrą, iš dalies keičiantis Direktyvą 1999/45/EB bei panaikinantį Tarybos reglamentą (EEB) Nr. 793/93, Komisijos reglamentą (EB) Nr. 1488/94, Tarybos direktyvą 76/769/EEB ir Komisijos direktyvas 91/155/EEB, 93/67/EEB, 93/105/EB ir 2000/21/EB (OL L 304, 2007 11 22, p. 1).

patikimumą. Svarbu pažymėti, kad patvirtinto tinkamumo bandymo metodo tikslumo ir patikimumo charakteristikos gali būti nepakankamos, kad jį būtų galima laikyti priimtinu siūlomam tikslui pasiekti (1).

Tinkamumo patvirtinimas – tam tikro būdo, metodo, bandymo, proceso ar vertinimo patikimumo ir tinkamumo nurodytam tikslui nustatymo procesas (1).

VC (nešiklio kontrolinis ėminys) – bandomųjų ir kontrolinių cheminių medžiagų tirpiklis, bandomas tik kaip jų nešiklis be ištirpintos cheminės medžiagos.

VM7 – imortalizuota adenokarcinomos ląstelė, kuri endogeniškai ekspresuoja estrogenų receptorių.

VM7Luc4E2 – VM7Luc4E2 ląstelių linija buvo gauta iš VM7 imortalizuotų žmogaus adenokarcinomos ląstelių, kurios endogeniškai ekspresuoja abi estrogenų receptoriaus formas ($ER\alpha$ ir $ER\beta$), ir buvo stabiliai transfekuotos plazmide pGudLuc7.ERE. Šią plazmidę sudaro keturios sintetinio oligonukleotido kopijos, turinčios estrogenų atsako elementą prieš pelių pieno liaukų auglio viruso (MMTV) promotorių ir jonvabalių liuciferazės geną.

Silpno teigiamo poveikio kontrolinė medžiaga – iš etaloninių medžiagų sąrašo pasirinkta mažo aktyvumo medžiaga, įtraukiama į visus bandymus, kad būtų užtikrinta reikiama bandymo eiga.

2 priedėlis

STABILIAI TRANSFEKUOTO ŽMOGAUS ESTROGENŲ RECEPTORIAUS A TRANSAKTYVACIJOS BANDYMAS CHEMINIŲ MEDŽIAGŲ KAIP ESTROGENŲ AGONISTŲ IR ANTAGONISTŲ AKTYVUMUI APTIKTI, NAUDOJANT HERA-HELA-9903 LĄSTELIŲ LINIJĄ

PRADINIAI ASPEKTAI IR APRIBOJIMAI (TAIP PAT ŽR. *BENDRASIS ĮVADAS*)

1. Atliekant šį transaktyvacijos (TA) bandymą, naudojama hER α -HeLa-9903 ląstelių linija estrogeniniam agonistų aktyvumui aptikti, kaip tarpininką naudojant žmogaus estrogenų receptorių alfa (hER α). Stabiliai transfekuotos transaktyvacijos (STTA) bandymo patvirtinimo tyrimas, atliktas Japonijos cheminių medžiagų įvertinimo ir tyrimų institute (CERI), naudojant hER α -HeLa-9903 ląstelių liniją ir žmogaus estrogenų receptorių alfa (hER α) kaip tarpininką estrogeniniam agonistų ir antagonistų aktyvumui aptikti, įrodė bandymo tinkamumą ir patikimumą atsižvelgiant į numatytą tikslą (1).
2. Šis bandymas yra specialiai sukurtas hER α tarpininkaujamai TA aptikti, matuojant biologinę liuminescenciją kaip vertinamąją baigtį. Tačiau pranešama, kad esant didesnei kaip 1 $\mu\text{mol/l}$ fitoestrogenų koncentracijai atsiranda ne receptoriaus tarpininkaujamos liuminescencijos signalai dėl per didelės liuciferazės reporterinio geno aktyvacijos (2) (3). Nors dozės ir atsako kreivė rodo, kad tikra ER sistemos aktyvacija vyksta esant mažesnėms koncentracijoms, liuciferazės ekspresiją, gautą esant didelėms fitoestrogenų arba panašių junginių, įtariamų sukeliant per didelę fitoestrogenų tipo liuciferazės reporterinio geno aktyvaciją, koncentracijoms, reikia atidžiai ištirti stabiliai transfekuotos ER TA bandymo sistemose (1 priedėlis).
3. Prieš naudojant šį bandymą reglamentavimo tikslais, reikėtų perskaityti skirsnius *BENDRASIS ĮVADAS IR ER TA BANDYMO KOMPONENTAI*. Šiose bandymo gairėse vartojamos apibrėžtys ir santrumpos pateiktos 2.1 priedėlyje.

BANDYMO PRINCIPAS (TAIP PAT ŽR. *BENDRAJI ĮVADA*)

4. Bandymas naudojamas ligando prijungimui prie estrogenų receptoriaus patvirtinti. Po ligando prijungimo vyksta receptoriaus ir ligando komplekso translokacija į branduolį, kuriame jis prisijungia prie specifinių DNR atsako elementų ir transaktyvina jonvabalio liuciferazės reporterinį geną, dėl ko padidėja ląstelių liuciferazės fermento ekspresija. Liuciferinas yra substratas, liuciferazės fermento paverčiamas bioluminescenciniu produktu, kurį galima kiekybiškai išmatuoti liuminometru. Liuciferazės aktyvumas gali būti įvertintas greitai ir nebrangiai naudojant kelis prekyboje esančius bandymo rinkinius.

5. Bandymo sistema naudoja hER α -HeLa-9903 ląstelių liniją, gautą iš žmogaus gimdos kaklelio auglio su dviem stabiliai įterptais dariniais: i) hER α ekspresijos dariniu (koduojantis viso ilgio žmogaus receptorių) ir ii) jonvabalio liuciferazės reporteriniu dariniu, turinčio penkias vitelogenino estrogenams jautraus elemento (ERE) tandemines kartotines sekas, valdomas pelių metalotioneino (MT) promotoriaus TATA elementu. Buvo parodyta, kad geriausi rezultatai gaunami su pelių MT TATA geno dariniu, ir todėl jis yra dažniausiai naudojamas. Taigi naudojant šią hER α -HeLa-9903 ląstelių liniją galima išmatuoti bandomosios cheminės medžiagos gebėjimą sukelti hER α tarpininkaujamą liuciferazės geno ekspresijos transaktyvaciją.
6. ER agonistų bandymo atveju duomenų aiškinimas pagrįstas tuo, ar didžiausias bandomosios cheminės medžiagos sukeltas atsako lygis yra lygus ar didesnis nei agonisto atsakas, lygus 10 % didžiausiosios (1 nmol/l) teigiamo kontrolinio ėminio (PC) 17 β -estradiolio (E2) koncentracijos sukulto atsako (t. y. PC₁₀). ER antagonisto atveju duomenų aiškinimas pagrįstas tuo, ar atsakas rodo, ar nerodo ne mažesnę kaip 30 % aktyvumo sumažėjimą palyginti su sodrinimo kontroliniu ėminiu (25 pmol/l E2) sukeltu atsaku, kai nėra citotoksiškumo. Duomenų analizė ir aiškinimas išsamiai aptariami 34–48 pastraipose.

PROCEDŪRA

Ląstelių linijos

7. Atliekant bandymą turėtų būti naudojama stabiliai transfekuotų hER α -HeLa-9903 ląstelių linija. Ląstelių liniją galima gauti iš Japonijos tiriamųjų biologinių išteklių (JCRB) ląstelių banko¹³, pasirašius medžiagų perdavimo sutartį (MTA).
8. Atliekant bandymus reikėtų naudoti tik mikoplazmomis neužkrėstas ląsteles. RT-PCR (realiojo laiko polimerazės grandininė reakcija) pasirenkama kaip jautrus mikoplazmų užkrato aptikimo metodas (4) (5) (6).

Ląstelių linijos stabilumas

9. Siekiant stebėti ląstelių linijos stabilumą, kaip pamatinius etalonus agonistų bandymui reikėtų naudoti E2, 17 α -estradiolį, 17 α -metiltetosteroną, ir kiekvieną kartą atliekant bandymą mažiausiai vieną kartą reikėtų gauti visą atsako priklausomybės nuo koncentracijos kreivę 1 lentelėje nurodytame bandymo koncentracijos intervale, ir rezultatai turėtų atitikti 1 lentelėje pateiktus rezultatus.

¹³ JCRB ląstelių bankas: *National Institute of Biomedical Innovation*, 7-6-8 Asagi Saito, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Japonija, faksas: +81-72-641-9812.

10. Atliekant antagonistų bandymą, reikėtų gauti viso ilgio dviejų pamatinių etalonų, tamoksifeno ir flutamido, koncentracijos kreives vienu metu su kiekvienu atskiru bandymu. Reikėtų stebėti, ar abi cheminės medžiagos teisingai kokybiškai klasifikuojamos kaip teigiama ar neigiama medžiaga.

Ląstelių auginimo ir sėjimo sąlygos

11. Ląstelės turėtų būti auginamos *Eagle* minimalios mitybos terpėje (EMEM) be fenolio raudonojo, papildytoje 60 mg/l antibiotiko kanamicino ir 10 % galvijų vaisiaus kraujo serumu, apdorotu dekstranu dengtomis medžio anglimis (DCC-FBS), CO₂ inkubatoriuje (5 % CO₂), 37±1 °C temperatūroje. Ląstelėms pasiekus 75–90 % susilieimo laipsnį, jas galima persėti, 10 ml 0,4 × 10⁵ – 1 × 10⁵ ląstelių/ml sėjant į 100 mm ląstelių kultūros lėkštelę. Reikėtų paruošti ląstelių suspensiją 10 % FBS-EMEM (kuri yra tokia pati terpė, kaip EMEM su DCC-FBS) ir jas pasėti į mikroplokštelės šulinėlius esant tankiui 1 × 10⁴ ląstelių/(100 µl vienam šulinėliui). Prieš apdorojant chemine medžiaga ląsteles reikėtų inkubuoti 3 h 5 % CO₂ inkubatoriuje 37 °± °C temperatūroje. Plastikiniai indai neturėtų rodyti estrogeninio aktyvumo.
12. Siekiant užtikrinti atsako vientisumą, atitirpinto pradinio šaltinio ląsteles reikėtų auginti kondicionuotoje terpėje daugiau nei vieną sėjimą ir jos neturėtų būti persėjamos daugiau kaip 40 kartų. Jei tai hERα-HeLa-9903 ląstelių linija, šis laikas būtų trumpesnis kaip trys mėnesiai. Tačiau ląstelių naudojimo trukmė gali sumažėti, jei jos auginamos netinkamomis terpės sąlygomis.
13. DCC-FBS galima paruošti, kaip aprašyta 2.2 priedėlyje, arba pirkti.

Priimtino kriterijai

Teigiami ir neigiami ER agonistų bandymo pamatiniai etalonai

14. Prieš tyrimą ir jo metu reikėtų tikrinti bandymo sistemos jautrį, naudojant atitinkamų koncentracijų stiprų estrogeną E2, silpną estrogeną (17α-estradiolį), labai silpną agonistą (17α-metiltestosteroną) ir neigiamą medžiagą (kortikosteroną). Priimtinos intervalo vertės, gautos atliekant patvirtinimo tyrimą (1), pateiktos 1 lentelėje. Šie vienu metu naudojami 4 pamatiniai etalonai turėtų būti įtraukti į kiekvieną bandymą ir gauti rezultatai turėtų atitikti nurodytas priimtinas ribas. Jei taip nėra, reikėtų nustatyti neatitikties priimtino kriterijams priežastį (pvz., ląstelių auginimo sąlygos, serumo ir antibiotikų kokybė bei koncentracija), ir bandymą pakartoti. Jei priimtino kriterijai įvykdyti, svarbu pastoviu būdu naudoti ląstelių auginimo medžiagas, kad būtų užtikrintas mažiausias EC₅₀, PC₅₀ ir PC₁₀ verčių kintamumas. Keturi vienalaikiai pamatiniai etalonai, kurie turėtų būti įtraukti į kiekvieną bandymą (atliekamą vienodomis sąlygomis, įskaitant medžiagas, ląstelių sėjimo lygį ir laborantus), gali užtikrinti bandymo jautrumą, nes trijų teigiamų pamatinių etalonų PC₁₀ vertės turėtų atitikti priimtina intervalą, kaip ir PC₅₀ bei EC₅₀ vertės, jei jas galima apskaičiuoti (žr. 1 lentelę).

1 lentelė. ER agonistų bandymo keturių pamatinių etalonų priimtinos intervalo vertės

Pavadinimas	logPC ₅₀	logPC ₁₀	logEC ₅₀	Hillo krypties	Bandymo intervalas
17β-estradiolis (E2) CAS Nr. 50-28-2	-11,4~-10,1	<-11	-11,3~-10,1	0,7~1,5	10 ⁻¹⁴ ~10 ⁻⁸ mol/l
17α-estradiolis CAS Nr. 57-91-0	-9,6~-8,1	-10,7~-9,3	-9,6~-8,4	0,9~2,0	10 ⁻¹² ~10 ⁻⁶ mol/l
Kortikosteronas CAS Nr. 50-22-6	—	—	—	—	10 ⁻¹⁰ ~10 ⁻⁴ mol/l
17α-metiltestosteronas CAS Nr. 58-18-4	-6,0~-5,1	-8,0~-6,2	—	—	10 ⁻¹¹ ~10 ⁻⁵ mol/l

Teigiami ir neigiami ER agonistų bandymo pamatiniai etalonai

15. Prieš tyrimą ir jo metu reikėtų tikrinti bandymo sistemos jautrį, naudojant atitinkamos koncentracijos teigiamą medžiagą (tamoksifeną) ir neigiamą medžiagą (flutamidą). Priimtinos intervalo vertės, gautos atliekant patvirtinimo tyrimą (1), pateiktos 2 lentelėje. Šie vienu metu naudojami du pamatiniai etalonai turėtų būti įtraukti į kiekvieną bandymą ir gauti rezultatai turėtų būti tinkamai įvertinti atsižvelgiant į kriterijus. Jei taip nėra, reikėtų nustatyti neatitikties kriterijams priežastį (pvz., ląstelių auginimo sąlygos, serumo ir antibiotikų kokybė bei koncentracija), ir bandymą pakartoti. Be to, reikėtų apskaičiuoti teigiamos medžiagos (tamoksifeno) IC₅₀ vertes ir gauti rezultatai turėtų atitikti nurodytas priimtinas ribas. Jei priimtimumo kriterijai įvykdyti, svarbu pastoviu būdu naudoti ląstelių auginimo medžiagas, kad būtų užtikrintas mažiausias IC₅₀ verčių kintamumas. Du vienašaliai pamatiniai etalonai, kurie turėtų būti įtraukti į kiekvieną bandymą (atliekamą vienodomis sąlygomis, įskaitant medžiagas, ląstelių sėjimo lygį ir laborantus), gali užtikrinti bandymo jautrumą (žr. 2 lentelę).

2 lentelė. ER antagonistų bandymo dviejų pamatinių etalonų kriterijai ir priimtinos intervalo vertės

Pavadinimas	Kriterijai	LogIC ₅₀	Bandymo intervalas
Tamoksifenas CAS Nr. 10540-29-1	Teigiama medžiaga: IC ₅₀ turėtų būti apskaičiuota	-5,942~-7,596	10 ⁻¹⁰ ~10 ⁻⁵ mol/l
Flutamidas CAS Nr. 13311-84-7	Neigiama medžiaga: IC ₃₀ neturėtų būti apskaičiuota	-	10 ⁻¹⁰ ~10 ⁻⁵ mol/l

Teigiami ir nešiklio kontroliniai ėminiai

16. Kiekvienoje plokštelėje turėtų būti bandomas teigiamas kontrolinis ėminys (PC), ER agonistų bandymo (1 nmol/l E2) ir ER antagonistų bandymo (10 μmol/l TAM), imant ne mažiau kaip tris kartotinius ėminius. Bandomajai cheminei medžiagai tirpinti naudojamas nešiklis turėtų būti bandomas kiekvienoje plokštelėje kaip nešiklio kontrolinis ėminys (VC), imant ne mažiau kaip tris kartotinius ėminius. Jei PC ir bandomosios cheminės medžiagos nešikliai yra skirtingi, be šio VC toje pačioje plokštelėje kaip ir PC turėtų būti bandomi ne mažiau kaip trys kito VC kartotiniai ėminiai.

ER agonistų bandymo kokybės kriterijai

17. Vidutinis teigiamos kontrolinės medžiagos (1 nmol/l E2) liuciferazės aktyvumas kiekvienoje plokštelėje turėtų būti ne mažiau kaip 4 kartus didesnis nei vidutinis VC aktyvumas. Šis kriterijus nustatytas atsižvelgiant į patvirtinimo tyrimo vertinamųjų baigčių verčių patikimumą (istoriniai duomenys – nuo 4 iki 30 kartų).
18. Kalbant apie bandymo kokybės kontrolę, indukcijos pokytis kartais, atitinkantis vienalaikio PC (1 nmol/l E2) PC₁₀ vertę, turėtų būti didesnis kaip vienalaikio VC indukcijos pokyčio kartais vertės (=1) 1+2SN. Pirmumo nustatymo tikslais PC₁₀ vertė gali būti naudinga siekiant supaprastinti reikiamą duomenų analizę palyginti su statistine analize. Nors statistinė analizė pateikia informaciją apie reikšmingumą, tokia analizė nėra kiekybinis parametras atsižvelgiant į su koncentracija susijusį potencialą, todėl yra mažiau naudinga pirmumo nustatymo tikslais.

ER antagonistų bandymo kokybės kriterijai

19. Vidutinis sodrinimo kontrolinio ėminio (25 pmol/l E2) liuciferazės aktyvumas kiekvienoje plokštelėje turėtų būti ne mažiau kaip 4 kartus didesnis nei vidutinis VC aktyvumas. Šis kriterijus nustatytas atsižvelgiant į patvirtinimo tyrimo vertinamųjų baigčių verčių patikimumą.
20. Kalbant apie bandymo kokybės kontrolę, 1 nmol/l E2 santykinė transkripcijos aktyvacija (RTA) turėtų būti didesnė kaip 100 %, 1 μmol/l 4-hidroksitamoksifeno (OHT) RTA turėtų būti mažesnė kaip 40,6 % ir 100 μmol/l digitonino (Dig) RTA turėtų būti mažesnė kaip 0 %.

Laboratorijos kvalifikacijos įrodymas (žr. šio bandymo metodo *ER TA BANDYMO KOMPONENTAI* 14 pastraipą ir 3 bei 4 lenteles).

Nešiklis

21. Kaip vienalaikį VC reikėtų naudoti dimetilsulfoksidą (DMSO) arba reikiamą tirpiklį tokios pačios koncentracijos, kokios jis naudojamas skirtingiems teigiamiems bei neigiamiems kontroliniams ėminiams ir bandomosioms cheminėms medžiagoms. Bandomosios cheminės medžiagos turėtų būti tirpinamos tirpiklyje, kuris soliubilizuoja tą bandomąją cheminę medžiagą ir yra maišus su ląstelių terpe. Tinkami nešikliai yra vanduo, etanolis (nuo 95 % iki 100 % grynumo) ir DMSO. Jei naudojamas DMSO, jo koncentracija neturėtų būti didesnė kaip 0,1 % (V/V). Naudojant bet kurį nešiklį reikėtų įrodyti, kad naudojant didžiausią jo tūrį jis nėra citotoksiškas ir nėra bandymo atlikimo trukdžių.

Bandomųjų cheminių medžiagų ruošimas

22. Paprastai bandomąsias chemines medžiagas reikėtų ištirpinti DMSO ar kitame tinkamame tirpiklyje ir skiesti jas tuo pačiu tirpikliu bendruoju santykiu 1:10, kad būtų galima paruošti terpe skiedžiamus tirpalus.

Tirpumas ir citotoksiškumas. Intervalo nustatymo aspektai

23. Reikėtų atlikti parengiamąjį bandymą, kad būtų galima nustatyti tinkamą bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos intervalą ir įsitikinti, ar bandomoji cheminė medžiaga neturi tirpumo ir citotoksiškumo problemų. Iš pradžių cheminės medžiagos bandomos, būdamos didžiausiosios 1 $\mu\text{l/ml}$, 1 mg/ml arba 1 mmol/l koncentracijos, pasirenkant mažiausią. Atsižvelgiant į parengiamojo bandymo metu gautus citotoksiškumo laipsnio arba mažo tirpumo rezultatus, iš pradžių cheminę medžiagą reikėtų bandyti, esant logaritminės eilutės koncentracijos vertėms, pradedant didžiausia priimtina koncentracija (pvz., 1 mmol/l , 100 $\mu\text{mol/l}$, 10 $\mu\text{mol/l}$ ir kt.), ir pažymėti drumstumo arba nuosėdų ar citotoksiškumo buvimą. Antrojo ir, jei reikia, trečiojo atskiro bandymo koncentracijos turėtų būti tinkamai pakoreguotos, kad būtų gauta geriau išreikšta atsako priklausomybės nuo koncentracijos kreivė ir nebūtų naudojamos nustatytos didesnės nei medžiagos tirpumo arba per didelio citotoksiškumo koncentracijos.
24. ER agonistų ir antagonistų atveju dėl vis didesnio citotoksiškumo lygio gali reikšmingai pakisti arba išnykti tipinis sigmoidės formos atsakas ir į tai reikėtų atsižvelgti aiškinant rezultatus. Reikėtų taikyti citotoksiškumo bandymo metodus, kurie gali pateikti 80 % ląstelių gyvybingumo informaciją, atliekant laboratorijos patirtimi pagrįstą bandymą.
25. Jei citotoksiškumo bandymo rezultatai rodytų, kad dėl tokios bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos ląstelių skaičius sumažėjo 20 % arba daugiau, tokios koncentracijos medžiagą reikėtų laikyti citotoksiška, ir tokią arba didesnę koncentraciją neturėtų būti įvertinama.

Apdorojimas chemine medžiaga ir išdėstymo bandymo plokštelėje schema

26. Cheminių medžiagų atskiestų tirpalų gavimo (1 ir 2 žingsniai) ląstelių apdorojimo (3 žingsnis) procedūra gali būti atliekama taip:

1 žingsnis. Kiekviena bandomoji cheminė medžiaga turėtų būti vienu santykiu skiedžiama DMSO arba atitinkamu tirpikliu ir įpilama į mikrotitravimo plokštelės šulinėlius, kad būtų gautos galutinės vieno santykio koncentracijos, nustatytos atliekant parengiamąjį intervalo nustatymo bandymą (paprastai kaip geometrinė progresija, pavyzdžiui, 1 mmol/l , 100 $\mu\text{mol/l}$, 10 $\mu\text{mol/l}$, 1 $\mu\text{mol/l}$, 100 nmol/l , 10 nmol/l , 1 nmol/l , 100 pmol/l ir 10 pmol/l (10^{-3} – 10^{-11} mol/l)), ir atliekami trys kartotiniai bandymai.

2 žingsnis. Cheminės medžiagos skiedimas: iš pradžių 1,5 μl bandomosios cheminės medžiagos tirpiklyje skiedžiama iki reikiamos koncentracijos 500 μl terpės.

3 žingsnis. Ląstelių apdorojimas chemine medžiaga: 50 μl terpe skiesto tirpalo (paruošto pagal 2 žingsnį) įpilama į bandymo šulinėlį, kuriame yra 10^4 ląstelių/100 μl /šulinėliui.

Rekomenduojamas reikiamas galutinis kiekvieno šulinėlio terpių tūris yra 150 μl . Bandomieji ėminiai ir pamatiniai etalonai gali būti priskirti kaip pateikta 3 ir 4 lentelėje.

3 lentelė. Pamatinių etalonų koncentracijos priskyrimo bandymo plokštelėje pavyzdys, atliekant ER

agonistų bandymą

Eilutė	17 α -metiltestosteronas			Kortikosteronas			17 α -estradiolis			E2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10	→	→	100 μ mol/l	→	→	1 μ mol/l	→	→	10 nmol/l	→	→
B	konc. 2 (1 μ mol/l)	→	→	10 μ mol/l	→	→	100 nmol/l	→	→	1 nmol/l	→	→
C	konc. 3 (100	→	→	1 μ mol/l	→	→	10 nmol/l	→	→	100 pmol/l	→	→
D	konc. 4 (10	→	→	100 nmol/l	→	→	1 nmol/l	→	→	10 pmol/l	→	→
E	konc. 5 (1 nmol/l)	→	→	10 nmol/l	→	→	100 pmol/l	→	→	1 pmol/l	→	→
F	konc. 6 (100	→	→	1 nmol/l	→	→	10 pmol/l	→	→	0,1 pmol/l	→	→
G	konc. 7 (10	→	→	100 pmol/l	→	→	1 pmol/l	→	→	0,01 pmol/l	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC – nešiklio kontrolinis ėminys (0,1 % DMSO); PC – teigiamas kontrolinis ėminys (1 nmol/l E2).

27. Pamatiniai etalonai (E2, 17 α -estradiolis, 17 α -metiltestosteronas ir kortikosteronas) turėtų būti bandomi atliekant kiekvieną atskirą bandymą. Kiekvieno bandymo plokštelėje turėtų būti PC šulinėliai su 1 nmol/l E2, kuriuose galima gauti didžiausia E2 indukciją, ir VC šulinėliai, apdoroti vien tik DMSO (arba reikiamu tirpikliu) (4 lentelė). Jei atliekant tą patį bandymą naudojamos skirtingų šaltinių ląstelės (pvz., skirtingo sėjimo numerio, skirtingos partijos ir kt.), pamatiniai etalonai turėtų būti bandomi kiekvienam ląstelių šaltiniui.

4 lentelė. Bandomųjų cheminių medžiagų ir plokštelės kontrolinių cheminių medžiagų koncentracijos priskyrimo bandymo plokštelėje pavyzdys, atliekant ER agonistų bandymą

Eilutė	Bandomoji cheminė medžiaga 1			Bandomoji cheminė medžiaga 2			Bandomoji cheminė medžiaga 3			Bandomoji cheminė medžiaga 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10	→	→	1 nmol/l	→	→	1 μ mol/l	→	→	10 nmol/l	→	→
B	konc. 2 (1 μ mol/l)	→	→	100	→	→	100 nmol/l	→	→	1 nmol/l	→	→
C	konc. 3 (100	→	→	10 μ mol/l	→	→	10 nmol/l	→	→	100 pmol/l	→	→
D	konc. 4 (10 nmol/l)	→	→	1 μ mol/l	→	→	1 nmol/l	→	→	10 pmol/l	→	→
E	konc. 5 (1 nmol/l)	→	→	100	→	→	100 pmol/l	→	→	1 pmol/l	→	→
F	konc. 6 (100	→	→	10 nmol/l	→	→	10 pmol/l	→	→	0,1 pmol/l	→	→
G	konc. 7 (10 pmol/l)	→	→	1 nmol/l	→	→	1 pmol/l	→	→	0,01	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC – nešiklio kontrolinis ėminys (0,1 % DMSO); PC – teigiamas kontrolinis ėminys (1 nmol/l E2).

5 lentelė. Pamatinių etalonų koncentracijos priskyrimo bandymo plokštelėje pavyzdys, atliekant ER antagonistų bandymą

Eilutė	Tamoksifenas			Flutamidas			Bandomoji cheminė medžiaga 1			Bandomoji cheminė medžiaga 2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 μ mol/l)	→	→	10 μ mol/l	→	→	10 μ mol/l	→	→	10 μ mol/l	→	→
B	konc. 2 (1 μ mol/l)	→	→	1 μ mol/l	→	→	1 μ mol/l	→	→	1 μ mol/l	→	→
C	konc. 3 (100 nmol/l)	→	→	100 nmol/l	→	→	100 nmol/l	→	→	100 nmol/l	→	→
D	konc. 4 (10 nmol/l)	→	→	10 nmol/l	→	→	10 nmol/l	→	→	10 nmol/l	→	→
E	konc. 5 (1 nmol/l)	→	→	1 nmol/l	→	→	1 nmol/l	→	→	1 nmol/l	→	→

F	konc. 6 (100 pmol/l)	→	→	100 pmol/l	→	→	100 pmol/l	→	→	100 pmol/l	→	→
G	0,1 % DMSO	→	→	→	→	→	1 µmol/l OHT	→	→	100 µmol/l Dig	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC – nešiklio kontrolinis ėminys (0,1 % DMSO), PC – teigiamas kontrolinis ėminys (1 nmol/l E2), OHT – 4-hidroksitamoksifenas, Dig – digitoninas.

→ – sodrinta 25 pmol/l E2.

28. Siekiant įvertinti cheminių medžiagų antagonistinį aktyvumą, į bandymo šulinėlius, esančius nuo A iki G eilutėse, reikėtų pridėti 25 pmol/l E2. Pamatiniai etalonai (tamoksifenas ir flutamidas turėtų būti bandomi atliekant kiekvieną atskirą bandymą. Kiekvienoje bandymo plokštelėje turėtų būti 1 nmol/l E2 apdoroti PC šulinėliai, kurie gali būti naudojami hERα-HeLa-9903 ląstelių linijos kokybės kontrolei, VC šulinėliai, apdoroti DMSO (ar tinkamu tirpikliu), 0,1 % DMSO šulinėliai, apdoroti DMSO, atitinkančio E2 pridėto kiekio kontrolinį ėminį, šulinėliai, apdoroti galutinės 1 µmol/l koncentracijos OHT, ir šulinėliai, apdoroti 100 µmol/l Dig (5 lentelė). Paskesnės bandymo plokštelės schema turėtų atitikti pirmiau nurodytą be pamatinio etalono šulinėlių (6 lentelė). Jei atliekant tą patį bandymą naudojamos skirtingų šaltinių ląstelės (pvz., skirtingo sėjimo numerio, skirtingos partijos ir kt.), pamatiniai etalonai turėtų būti bandomi kiekvienam ląstelių šaltiniui.

6 lentelė. Bandomųjų cheminių medžiagų ir plokštelės kontrolinių cheminių medžiagų koncentracijos priskyrimo bandymo plokštelėje pavyzdys, atliekant ER antagonistų bandymą

Eilutė	Bandomoji cheminė medžiaga 1			Bandomoji cheminė medžiaga 2			Bandomoji cheminė medžiaga 3			Bandomoji cheminė medžiaga 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 µmol/l)	→	→	10 µmol/l	→	→	10 µmol/l	→	→	10 µmol/l	→	→
B	konc. 2 (1 µmol/l)	→	→	1 µmol/l	→	→	1 µmol/l	→	→	1 µmol/l	→	→
C	konc. 3 (100 nmol/l)	→	→	100 nmol/l	→	→	100 nmol/l	→	→	100 nmol/l	→	→
D	konc. 4 (10 nmol/l)	→	→	10 nmol/l	→	→	10 nmol/l	→	→	10 nmol/l	→	→
E	konc. 5 (1 nmol/l)	→	→	1 nmol/l	→	→	1 nmol/l	→	→	1 nmol/l	→	→
F	konc. 6 (100 pmol/l)	→	→	100 pmol/l	→	→	100 pmol/l	→	→	100 pmol/l	→	→
G	0,1 % DMSO	→	→	→	→	→	1 µmol/l OHT	→	→	100 µmol/l Dig	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC – nešiklio kontrolinis ėminys (0,1 % DMSO), PC – teigiamas kontrolinis ėminys (1 nmol/l E2), OHT – 4-hidroksitamoksifenas, Dig – digitoninas.

→ – sodrinta 25 pmol/l E2.

29. Reikėtų patvirtinti pakraščio reiškinių nebuvimą, jei tinka, ir, jei pakraščio reiškiniai įtariami, plokštelės schema turėtų būti pakeista, kad tokių reiškinių nebūtų. Pavyzdžiui, galima naudoti plokštelės schemą su tuščiais kraštiniais šulinėliais.
30. Bandymo plokštelės su įpiltomis cheminėmis medžiagomis turėtų būti inkubuojamos 20–24 h 5 % CO₂ inkubatorijoje 37±1 °C temperatūroje, kad atsirastų reporterinio geno produktai.
31. Reikėtų atkreipti ypatingą dėmesį į labai lakius junginius. Tokiais atvejais šalia esantiems šulinėliams gali būti gauti klaidingai teigiami rezultatai ir į tai reikėtų atsižvelgti, turint omenyje tikėtinas ir istorines kontrolinių ėminių vertes. Tais retais atvejais, kai lakumas gali būti pVCroblema, efektyviai atskirti atskirus šulinėlius bandymo metu galėtų „plokštelių sandarikliai“ ir todėl juos rekomenduojama naudoti tokiais atvejais.
32. Kartotiniai galutiniai tos pačios cheminės medžiagos bandymai turėtų būti atliekami skirtingomis dienomis, kad būtų užtikrinta jų nepriklausomybė.

Liuciferazės bandymas

33. Atliekant bandymą galima naudoti prekyboje esantį liuciferazės bandymo reagentą (pvz., Steady-Glo® Luciferase Assay System (Promega, E2510, arba lygiavertę)) arba standartinę liuciferazės bandymo sistemą (pvz., Promega, E1500, arba lygiavertę), jei reagentai atitinka priimtino kriterijus. Bandymo reagentai turėtų būti pasirenkami, atsižvelgiant į naudojamo liuminometro jautrį. Kai naudojama standartinė liuciferazės bandymo sistema, prieš dedant substrato reikėtų naudoti ląstelių lizės reagentą (pvz., Promega, E1531, arba lygiavertį). Liuciferazės reagentas turėtų būti naudojamas pagal gamintojo instrukcijas.

DUOMENŲ ANALIZĖ

ER agonistų bandymas

34. Jei atliekant ER agonistų bandymą reikia gauti santykinę transkripcijos aktyvumą PC (1 nmol/l E2) atžvilgiu, tos pačios plokštelės liuminescencijos signalai gali būti analizuojami atliekant šiuos žingsnius (taip pat yra priimtini kiti matematiniai procesai):

1 žingsnis. Apskaičiuojama vidutinė VC vertė.

2 žingsnis. Vidutinė VC vertė atimama iš kiekvieno šulinėlio vertės, kad būtų galima normalizuoti duomenis.

3 žingsnis. Apskaičiuojama vidutinė normalizuoto PC vertė.

4 žingsnis. Kiekvieno plokštelės šulinėlio normalizuota vertė dalijama iš vidutinės normalizuoto PC vertės (PC=100 %).

Kiekvienam šulinėliui gauta galutinė vertė yra to šulinėlio santykinis transkripcijos aktyvumas

palyginti su PC atsaku.

5 žingsnis. Apskaičiuojama bandomosios cheminės medžiagos kiekvienos koncentracijos grupės vidutinė santykinio transkripcijos aktyvumo vertė. Yra du atsako matmenys: vidutinis transkripcijos aktyvumas (atsakas) ir koncentracija, kuriai esant atsakas gaunamas (žr. tolesnį skirsnį).

EC₅₀, PC₅₀ ir PC₁₀ gavimo aspektai

35. Reikia turėti visą atsako priklausomybės nuo koncentracijos kreivę, kad būtų galima apskaičiuoti EC₅₀, bet ją ne visuomet galima ar įmanoma gauti dėl koncentracijos intervalo apribojimų (pavyzdžiui, dėl citotoksiškumo arba tirpumo problemų). Tačiau, kadangi EC₅₀ ir didžiausias indukcijos lygis (atitinkantis Hill lygties viršutinę vertę) yra informatyvūs parametrai, šie parametrai turėtų būti pateikti ataskaitoje, jei įmanoma. EC₅₀ ir didžiausiam indukcijos lygiui apskaičiuoti turėtų būti naudojama tinkama statistinės analizės programa (pvz., Graphpad Prism statistinės analizės programa). Jei atsako priklausomybės nuo koncentracijos duomenims tinka Hillo logistinė lygtis, EC₅₀ turėtų būti skaičiuojama pagal šią lygtį (7):

$$Y = \text{Apačia} + (\text{Viršus} - \text{Apačia}) / (1 + 10^{\exp((\log EC_{50} - X) \times \text{Hillo krypties koeficientas})})$$
 Čia:

X – koncentracijos logaritmas; ir

Y – atsakas, kuris prasideda *Apačioje* ir eina iki sigmoidės *Viršaus*. Hillo logistinėje lygtyje *Apačia* yra nustatyta lygi nuliui.

36. Reikėtų turėti kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos:

RPC_{Max} – didžiausiąjį bandomosios cheminės medžiagos sukulto atsako lygį, išreikštą kaip tos pačios plokštelės 1 nmol/l E2 tirpalo sukulto atsako procentinė dalis, taip pat PC_{Max} (koncentraciją, susijusią su RPC_{Max}); ir

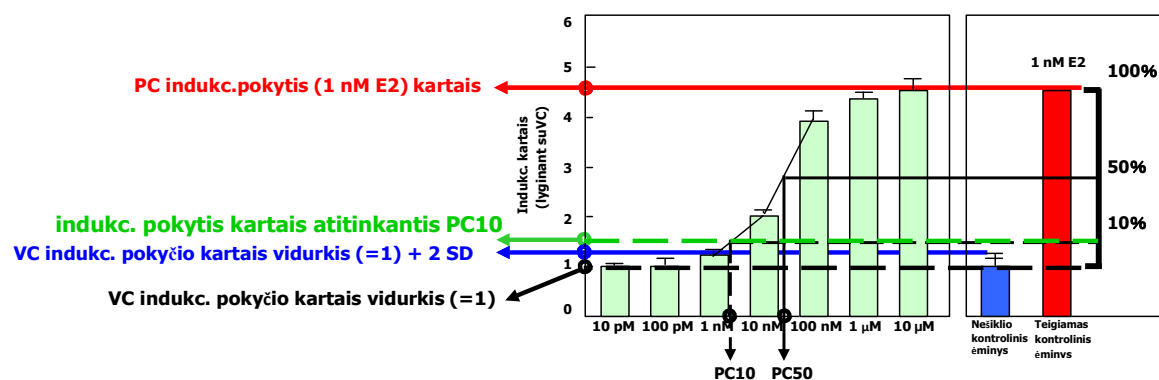
teigiamų cheminių medžiagų koncentraciją, kuriai gaunama PC₁₀ ir, jei tinka, PC₅₀.

37. PC_x vertė gali būti apskaičiuota atliekant interpoliaciją tarp X ir Y koordinačių 2 taškų, kurių vienas yra šiek tiek aukščiau, o kitas – žemiau PC_x vertės. Jei šiek tiek aukščiau ir žemiau PC_x vertės esančių duomenų taškų koordinatės yra (a, b) ir (c, d), PC_x vertė gali būti apskaičiuota pagal šią lygtį:

$$\log[PC_x] = \log[c] + (x - d) / (d - b)$$

38. PC verčių apibūdinimas pateiktas toliau 1 paveiksle.

1 paveikslas. PC verčių gavimo pavyzdys. PC (1 nmol/l E2) yra įtrauktas į kiekvieną badymo plokštelę



ER antagonistų bandymas

39. Jei atliekant ER antagonistų bandymą reikia gauti santykinį transkripcijos aktyvumą (RTA) sodrinimo kontrolinio ėminio (25 pmol/l E2) atžvilgiu, tos pačios plokštelės liuminescencijos signalai gali būti analizuojami atliekant šiuos žingsnius (taip pat yra priimtini kiti matematiniai procesai):

1 žingsnis. Apskaičiuojama vidutinė VC vertė.

2 žingsnis. Vidutinė VC vertė atimama iš kiekvieno šulinėlio vertės, kad būtų galima normalizuoti duomenis. 3 žingsnis. Apskaičiuojama vidutinė normalizuoto sodrinimo kontrolinio ėminio vertė.

4 žingsnis. Kiekvieno plokštelės šulinėlio normalizuota vertė dalijama iš vidutinės normalizuoto sodrinimo kontrolinio ėminio vertės (sodrinimo kontrolinio ėminio = 100 %).

Kiekvienam šulinėliui gauta galutinė vertė yra to šulinėlio santykinis transkripcijos aktyvumas palyginti su sodrinimo kontrolinio ėminio atsaku.

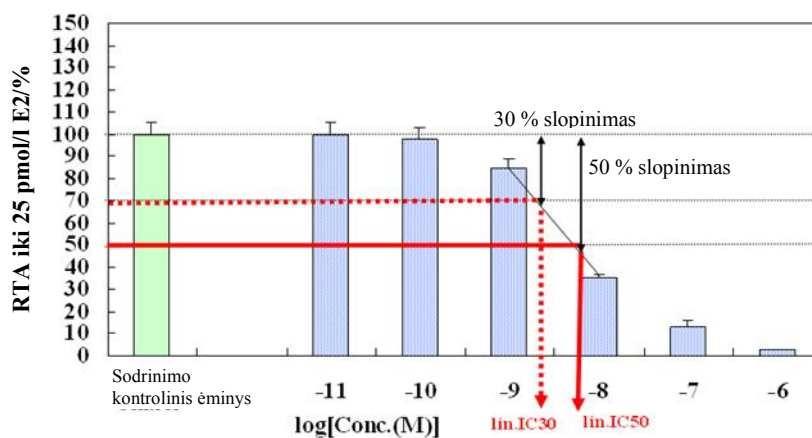
5 žingsnis. Apskaičiuojama kiekvieno apdoroto ėminio vidutinė santykinio transkripcijos aktyvumo vertė.

IC₃₀ ir IC₅₀ gavimo aspektai

40. Reikėtų gauti teigiamų kontrolinių medžiagų koncentracijos vertes, kurioms gaunama IC₃₀ ir, jei tinka, IC₅₀.
41. IC_x vertė gali būti apskaičiuota atliekant interpoliaciją tarp X ir Y koordinačių 2 taškų, kurių vienas yra vos aukščiau, o kitas vos žemiau IC_x vertės. Jei šiek tiek aukščiau ir žemiau IC_x vertės esančių duomenų taškų koordinatės yra (c, d) ir (a, b), IC_x vertė gali būti apskaičiuota pagal šią lygtį:

$$\ln IC_x = a - (b - (100 - x)) (a - c) / (b - d)$$

2 paveikslas. IC verčių gavimo pavyzdys. Sodrinimo kontrolinis ėminys (25 pmol/l E2) yra įtrauktas į kiekvieną badymo plokštelę



RTA – santykinis transkripcijos aktyvumas

42. Rezultatai turėtų būti gauti pagal du (arba tris) nepriklausomus bandymus. Jie dviejų atskirų bandymų rezultatai yra palyginami ir todėl atkuriami, trečiasis atskiras bandymas nėra būtinas. Rezultatai būtų priimtini, jei jie:

- atitinka priimtumo kriterijus (žr. *Priimtumo kriterijų* 14–20 pastraipas),
- yra atkuriami.

Duomenų aiškinimo kriterijai

7 lentelė. Teigiamo ir neigiamo sprendimo kriterijai atliekant ER agonistų bandymą

Teigiamas	Jei ne mažiau kaip dviejuose iš dviejų arba dviejuose iš trijų atskirų bandymų gaunama RPC_{Max} yra lygi 10 % teigiamo kontrolinio ėminio atsako arba didesnė.
Neigiamas	Jei ne mažiau kaip dviejuose iš dviejų arba dviejuose iš trijų atskirų bandymų negaunama RPC_{Max} , kuri būtų ne mažesnė kaip 10 % teigiamo

8 lentelė. Teigiamo ir neigiamo sprendimo kriterijai atliekant ER antagonistų bandymą

Teigiamas	Jei IC_{30} apskaičiuojama ne mažiau kaip dviejuose iš dviejų arba dviejuose iš trijų atskirų bandymų.
Neigiamas	Jei IC_{30} negalima apskaičiuoti dviejuose iš dviejų arba dviejuose iš trijų atskirų bandymų.

43. Duomenų aiškinimo kriterijai pateikti 7 ir 8 lentelėje. Teigiamus rezultatus apibūdina poveikio dydis ir koncentracija, kuriai esant šis poveikis pasireiškia. Abu šie tikslai įgyvendinami, jei rezultatai išreiškiami kaip koncentracija, kuriai gaunama 50 % (PC_{50}) arba 10 % (PC_{10}) PC vertės, atliekant agonistų bandymą, ir 50 % (IC_{50}) arba 30 % (IC_{30})

sodrinimo kontrolinio ėminio slopinimo vertės, atliekant antagonistų bandymą. Tačiau bandomoji cheminė medžiaga nustatoma kaip teigiama, jei dviejuose iš dviejų arba dviejuose iš trijų atskirų bandymų bandomosios cheminės medžiagos sukeltas didžiausias atsakas (RPC_{Max}) yra lygus 10 % PC atsako arba didesnis, ir bandomoji cheminė medžiaga laikoma neigiama, jei dviejuose iš dviejų arba dviejuose iš trijų atskirų bandymų negaunama RPC_{Max} , kuri būtų ne mažesnė kaip 10 % teigiamo kontrolinio ėminio atsako.

44. ER agonistų bandymo PC_{10} , PC_{50} ir PC_{Max} , ER antagonistų bandymo IC_{30} ir IC_{50} galima apskaičiuoti naudojant elektroninę lentelę, pateikta prie bandymo gairių EBPO viešojoje svetainėje¹.
45. PC_{10} arba PC_{50} ir IC_{30} arba IC_{50} vertės pakaktų gauti ne mažiau kaip du kartus. Tačiau, jei tam pačiam koncentracijos intervalui gautos duomenų atskaitos linijos kintamumo variacijos koeficientas (VK; %) yra nepriimtinais didelis, duomenys negali būti laikomi patikimais ir reikėtų identifikuoti didelio kintamumo šaltinį. PC_{10} apskaičiuoti naudojamų trijų kartotinių ėminių neapdorotų duomenų (t. y. luminescencijos intensyvumo duomenų) VK turėtų būti mažesnis kaip 20 %.
46. Atitiktis priimtino kriterijams rodo tinkamą bandymo sistemos veikimą, bet tai neužtikrina, kad atliekant konkretų atskirą bandymą bus gauti tikslūs duomenys. Pirmojo atskiro bandymo rezultatų pakartojimas yra geriausias būdas užtikrinti tikslių duomenų gavimą.
47. Jei apie teigiamas bandymo chemines medžiagas, ypač PC_{10} – PC_{49} chemines medžiagas, taip pat apie chemines medžiagas, įtariamąs per stipriai aktyvinančias liuciferazę, reikia daugiau informacijos nei šių bandymo gairių atrankos ir pirmumo nustatymo tikslams, ER agonistų bandymo atveju galima patvirtinti, kad stebimas liuciferazės aktyvumas yra tik $ER\alpha$ specifinis atsakas, naudojant $ER\alpha$ antagonistą (žr. 2.1 priedėlį).

BANDYMO ATASKAITA

48. Žr. *ER TA BANDYMO KOMPONENTAI* 20 pastraipą.

¹ <http://www.oecd.org/env/testguidelines>.

LITERATŪRA

- (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), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (2) Escande A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol.*, 71, 1459-1469.
- (3) Kuiper G.G., *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, *Endocrinol.*, 139, 4252-4263.
- (4) Spaepen M., *et al.* (1992). Detection of Bacterial and Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Polymerase Chain Reaction, *FEMS Microbiol. Lett.*, 78(1), 89-94.
- (5) Kobayashi H., *et al.* (1995). Rapid Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Enzymatic Detection of Polymerase Chain Reaction (PCR) Products, *J. Vet. Med. Sci.*, 57(4), 769- 71.
- (6) Dussurget O. 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 priedėlis

KLAIDINGAI TEIGIAMAI REZULTATAI. NE RECEPTORIAUS TARPININKAUJAMŲ LIUMINESCENCIJOS SIGNALŲ VERTINIMAS

1. ER agonistų bandymo klaidingai teigiami rezultatai gali būti gauti dėl ne ER tarpininkaujamo liuciferazės geno aktyvinimo arba dėl tiesioginio geno produkto aktyvinimo arba dėl nesusijusios fluorescencijos. Tokius reiškinius rodo gauta ne visa arba neįprasta atsako priklausomybės nuo dozės kreivė. Jei tokie reiškiniai įtariami, reikėtų ištirti ER antagonistą (pvz., 4-hidroksitamoksifeno (OHT), ne toksinės koncentracijos) įtaką atsakui. Grynas antagonistas ICI 182780 negali tiktai šiam tikslui, nes esant pakankamai ICI 182780 koncentracijai gali sumažėti VC vertė ir tai turėtų įtakos duomenų analizei.
2. Siekiant užtikrinti šio metodo tinkamumą, toje pačioje plokštelėje reikia bandyti:
 - nežinomos cheminės medžiagos kaip antagonistų aktyvumą su 10 $\mu\text{mol/l}$ OHT ir be jo;
 - VC (tris kartotinius ėminius);
 - OHT (tris kartotinius ėminius);
 - 1 nmol/l E2, kaip agonistų PC (tris kartotinius ėminius);
 - 1 nmol/l E2 + OHT (tris kartotinius ėminius).

Duomenų aiškinimo kriterijai

Pastaba. Visi šulinėliai turėtų būti apdoroti vienos koncentracijos nešikliu.

- Jei nežinomos cheminės medžiagos apdorojimas antagonistu NETURI įtakos jos kaip agonistų aktyvumui, ji klasifikuojama kaip „neigiamą“.
- Jei nežinomos cheminės medžiagos aktyvumas kaip agonistų yra visiškai slopinamas, taikomi sprendimo priėmimo kriterijai.
- Jei nežinomos cheminės medžiagos kaip agonistų aktyvumas, esant mažiausiai koncentracijai, yra lygus PC_{10} atsakui arba didesnis, ji slopinama esant PC_{10} lygiui arba didesniai atsakui. Skaiciuojamas skirtumas tarp ER antagonistų neapdorotų ir apdorotų šulinėlių ir šis skirtumas turėtų būti laikomas tikru atsaku ir jį reikėtų naudoti skaičiuojant atitinkamus parametrus, kad būtų galima priimti sprendimą dėl klasifikavimo.

Duomenų analizė

Tikrinamas naudojimo charakteristikų standartas.

Tikrinamas vienodomis sąlygomis apdorotų šulinėlių VK.

1. Skaičiuojamas VC vidurkis.
2. Vidutinė VC vertė atimama iš kiekvienos OHT **ne**apdoroto šulinėlio vertės.
3. Skaičiuojamas OHT vidurkis.
4. Vidutinė VC vertė atimama iš kiekvienos OHT apdoroto šulinėlio vertės.
5. Skaičiuojamas PC vidurkis.
6. Apskaičiuojamas visų su PC susijusių šulinėlių vidutinis transkripcijos aktyvumas.

2.2 priedėlis

DEKSTRANU DENGTO MIS MEDŽIO ANGLIMIS (DCC) APDOROTO SERUMO RUOŠIMAS

1. Serumo apdorojimas dekstranu dengtomis medžio anglimis (DCC) yra bendrasis estrogenų šalinimo iš į ląstelių terpę dedamo serumo, kad neatsirastų atsako sistemingoji paklaida, susijusi su estrogenų likučiais serume. Taikant šią procedūrą galima apdoroti 500 ml galvijų vaisiaus kraujo serumo (FBS).

Komponentai

2. Reikia turėti šias medžiagas ir įrangą:

Medžiagos

Aktyvintosios medžio anglis

Dekstranas

Magnio chlorido heksahidratas ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)

Sacharozė

1 mol/l HEPES buferinis tirpalas (pH 7,4)

Ypač grynas vanduo, gautas naudojant filtravimo sistemą

Įranga

Stiklinis autoklavuojamas indas (reikiamo tūrio); Bendrosios paskirties laboratorinė centrifuga (kurią būtų galima nustatyti 4 °C temperatūrai).

Procedūra

3. Nustatyta tokia procedūra naudojant 50 ml centrifugavimo mėgintuvėlius:

[1 diena] Ruošiama dekstranu dengtų medžio anglių suspensija 1 l ypač gryno vandens, turinčio 1,5 mmol/l MgCl_2 , 0,25 mol/l sacharozės, 2,5 g akmens anglių, 0,25 g dekstrano ir 5 mmol/l HEPES, ir maišoma ant purtyklės per naktį 4 °C temperatūroje.

[2 diena] Suspensija išpilstoma į 50 ml centrifugavimo mėgintuvėlius ir 10 min centrifuguojama 10000 aps/min greičiu 4 °C temperatūroje. Skystis virš nuosėdų pašalinamas ir pusė akmens anglių nuosėdų kiekio laikoma 4 °C temperatūroje, kad jas būtų galima naudoti 3 dieną. Iš kitos akmens anglių nuosėdų kiekio pusės ruošiama suspensija su FBS, kuris buvo lėtai atitirpintas, kad būtų išvengta nuosėdų susidarymo, 30 min inaktyvinamas šiluma 56 °C temperatūroje ir supilamas į autoklavuojamą stiklinį indą, pvz., kūginę kolbą. Ši suspensija nestipriai maišoma ant purtyklės per naktį 4 °C temperatūroje.

[3 diena] Suspensija su FBS išpilstoma į centrifugavimo mėgintuvėlius ir 10 min centrifuguojama 10000 aps/min greičiu 4 °C temperatūroje. FBS surenkamas ir supilamas į 2 dieną paruoštas ir laikomas naujas akmens anglių nuosėdas. Gaunama akmens anglių suspensija ir nestipriai maišoma ant purtyklės per naktį 4 °C temperatūroje autoklavuojamame stikliniame inde.

[4 diena] Suspensija išpilstoma į centrifugavimo mėgintuvėlius, 10 min centrifuguojama 10000 aps/min greičiu 4 °C temperatūroje ir skystis virš nuosėdų sterilizuojamas filtruojant per 0,2 µm sterilų filtrą. Ši DCC apdorotą FBS reikėtų laikyti –20 °C temperatūroje ir jį galima naudoti ne ilgiau kaip metus.

3 PRIEDĖLIS

VM7LUC ESTROGENŲ RECEPTORIAUS TRANSAKTYVACIJOS BANDYMAS ESTROGENŲ RECEPTORIAUS AGONISTAMS IR ANTAGONISTAMS IDENTIFIKUOTI

PRADINIAI ASPEKTAI IR APRIBOJIMAI (TAIP PAT ŽR. *BENDRASIS ĮVADAS*)

1. Šiam bandymui naudojama VM7Luc4E2 ląstelių linija¹. Ją patvirtino *Tarpžinybinis nacionalinės toksikologijos programos alternatyvių toksikologinių metodų įvertinimo centras* (NICEATM) ir *Alternatyvių metodų patvirtinimo tarpžinybinis koordinavimo komitetas* (ICCVAM) (1). VM7Luc ląstelių linijos daugiausia ekspresuoja endogeninį ER α ir nedidelį kiekį endogeninio ER β (2) (3) (4).
2. Šis bandymas tinka didelei grupei medžiagų, kurios tirpsta dimetilsulfoksido (DMSO; CASRN 67-68-5), nereaguojant su DMSO arba su ląstelių kultūros terpe ir nėra citotoksiškos esant bandymo koncentracijai. Jei DMSO naudojimas neįmanomas, galima naudoti kitą nešiklį, pvz., etanolį arba vandenį (žr. 12 pastraipą). Įrodytos VM7Luc ER TA (ant)agonistų bandymo charakteristikos leidžia daryti prielaidą, kad šio bandymo duomenys gali duoti informacijos apie ER tarpininkaujamus veikimo mechanizmus ir jie galėtų būti naudojami medžiagų pirmumui dėl tolesnių bandymų nustatyti.
3. Šis bandymas yra specialiai sukurtas hER α ir hER β tarpininkaujamai TA aptikti, matuojant chemiliuminescenciją kaip vertinamąją baigtį. Chemiliuminescencija plačiai naudojama atliekant biologinius tyrimus dėl didelio liuminescencijos signalo ir fono santykio (10). Tačiau jonvabalo liuciferazės aktyvumas atliekant bandymus su ląstelėmis gali būti iškreiptas medžiagų, kurios slopina liuciferazės fermentą, sukeldamos tariamąjį slopinimą arba padidėjusią liuminescenciją dėl baltymų stabilizavimo (10). Be to, pranešama, kad atliekant kai kuriuos liuciferaze pagrįstus ER reporterinio geno bandymus, kai fitoestrogenų koncentracija yra didesnė kaip 1 $\mu\text{mol/l}$, atsiranda ne receptoriaus tarpininkaujamos liuminescencijos signalai dėl per didelės liuciferazės reporterinio geno aktyvacijos (9) (11).

¹ Iki 2016 m. birželio mėn. ši ląstelių linija buvo vadinama BG1Luc ląstelių linija. BG-1 ląsteles pirmi aprašė Geisinger *et al.* (1998) (12) ir vėliau apibūdino Nacionalinio aplinkos higienos mokslų instituto (NIEHS) tyrėjai (13). Palyginti neseniai buvo nustatyta, kad yra du skirtingi tyrėjų naudojamų BG-1 ląstelių variantai, BG-1 Fr ir BG-1 NIEHS. Šių dviejų BG-1 variantų ląstelių linijų gilesnė analizė, įskaitant DNR bandymus, atlikta Li ir bendradarbių (2014) (14), parodė, kad BG-1 Fr buvo unikali linija ir kad BG-1 NIEHS, t. y. bandymui tobulinti naudojama pradinė ląstelių linija buvo ne BG1 žmogaus kiaušidžių karcinomos ląstelių linija, bet MCF7 žmogaus krūtų vėžio ląstelių linijos variantas. Atliekant bandymą naudota ląstelių linija, pirmiau nurodoma kaip BG1Luc4E2 (15), dabar bus žymima VM7Luc4E2 („V“ – variantas; „M7“ – MCF7 ląstelės). Panašiai bandymas bus pažymėtas VM7Luc ER TA. Nors dėl to pasikeičia ląstelių linijos, kuria yra pagrįstas bandymas, kilmė, tai neturi įtakos jau paskelbtiems patvirtinimo tyrimams ar šio bandymo naudingumui ir taikymui, atliekant estrogeninių arba antiestrogeninių cheminių medžiagų atranką.

Nors atsako priklausomybės nuo dozės kreivė rodo, kad faktinė ER sistemos aktyvacija vyksta esant mažesnėms koncentracijoms, liuciferazės ekspresiją, gautą esant didelėms fitoestrogenų arba panašių junginių, įtariamų sukeliant per didelę fitoestrogenų tipo liuciferazės reporterinio geno aktyvaciją, koncentracijoms, reikia atidžiai ištirti stabiliai transfekuotos ER TA bandymo sistemose (žr. 2 priedėlį) (see Appendix 2).

4. Prieš naudojant šį bandymą reglamentavimo tikslais, reikėtų perskaityti *BENDRASIS ĮVADAS* ir *ER TA BANDYMO KOMPONENTAI*. Šio bandymo metodo aprašyme vartojamos apibrėžtys ir santrumpos pateiktos 1 priedėlyje.

BANDYMO PRINCIPAS (TAIP PAT ŽR. *BENDRASIS ĮVADAS*)

5. Biologinis tyrimas naudojamas siekiant parodyti ligandų prijungimą prie ER, po kurio vyksta receptoriaus ir ligando komplekso translokacija į branduolį. Branduolyje receptoriaus ir ligando kompleksas prisijungia prie specifinių DNR atsako elementų ir atlieka jonvabalo liuciferazės reporterinio geno (*luc*) transkripcijos aktyvaciją, dėl ko gaminama liuciferazė ir skleidžiama šviesa, kurią galima kiekybiškai įvertinti liuminometru. Liuciferazės aktyvumas gali būti įvertintas greitai ir nebrangiai naudojant kelis prekyboje esančius rinkinius. VM7Luc ER TA naudojama atsaku ER pasižyminčia žmogaus krūtų karcinomos ląstelių linija VM7, kuri yra stabiliai transfekuota jonvabalo *luc* reporteriniu dariniu, valdomu keturiais estrogenų atsako elementais prieš pelių pieno liaukų auglio viruso (MMTV) promotorių, kad būtų aptiktos *in vitro* ER agonistų arba antagonistų aktyvumo medžiagos. Šis MMTV promotorius rodo tik nedidelį kryžminį reaktyvumą su kitais steroidiniais ir nesteroidiniais hormonais (8). Duomenų aiškinimo kriterijai išsamiai aprašyti 41 pastraipoje. Trumpai sakant, teigiamas atsakas identifikuojamas pagal atsako priklausomybės nuo koncentracijos kreivę, turinčią ne mažiau kaip tris taškus, kurių paklaidos brūkšneliai (vidurkis $\pm$ SN) nepersikloja, taip pat pagal amplitudės pokytį (normalizuoto santykinio šviesos vieneto (RLU) ne mažesnės kaip 20 % agonistų bandymo pamatinio etalono (17 β -estradiolio (E2; CASRN 50-28-2), antagonistų bandymo – raloksifeno HCl (Ral; CASRN 84449-90-1)/E2 didžiausiosios vertės).

PROCEDŪRA

Ląstelių linija

6. Atliekant bandymą turėtų būti naudojama stabiliai transfekuotų VM7Luc4E2 ląstelių linija. Šiuo metu ląstelių liniją galima gauti pagal techninio licencijų išdavimo sutartį tik iš

Kalifornijos Universiteto (Deivisas, Kalifornija, JAV)¹ ir iš *Xenobiotic Detection Systems Inc.* (Daramas, Šiaurės Karolina, JAV)².

Ląstelių linijos stabilumas

7. Siekiant užtikrinti ląstelių linijos stabilumą ir vientisumą, atitirpinto pradinio šaltinio ląsteles reikėtų auginti ląstelių kultūros terpėje daugiau nei vieną sėjimą (žr. 9 pastraipą). Ląstelės neturėtų būti persėjamos daugiau kaip 30 kartų. VM7Luc4E2 ląstelių linijos 30 persėjimų trukmė yra maždaug trys mėnesiai.

Ląstelių auginimo ir sėjimo sąlygos

8. Reikėtų laikytis procedūrų, nurodytų geros ląstelių auginimo praktikos rekomendacijose (5) (6), siekiant užtikrinti visų medžiagų ir metodų kokybę, kad būtų išsaugotas atliekamų darbų vientisumas, tinkamumas ir atkuriamumas.
9. VM7Luc4E2 ląstelės auginamos RPMI 1640 terpėje, papildytoje 0,9 % penicilino ir streptomicino bei 8,0 % galvijų vaisiaus kraujo serumu (FBS), specialiame audinių auginimo inkubatoriuje, esant $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, $90\% \pm 5\%$ drėgmei ir $5,0\% \pm 1\%$ CO₂ ore.
10. Pasiiekus ~ 80 % susiliejamą, VM7Luc4E2 ląstelės persėjamos į aplinką be estrogenų ir 48 h kondicionuojamos prieš jas sėjant į 96 šulinėlių plokšteles, kuriose ląsteles būtų galima apdoroti bandomosiomis cheminėmis medžiagomis ir analizuoti sukeltą nuo estrogenų priklausomą liuciferazės aktyvumą. Estrogenų neturinčią terpę (EFM) sudaro *Dulbecco* modifikuota *Eagle* terpė (DMEM) be fenolio raudonojo, papildyta 4,5 % dekstranu dengtomis medžio anglimis apdorotu FBS, 1,9 % L-glutamino bei 0,9 % penicilino ir streptomicino. Visi plastikiniai indai neturėtų rodyti estrogeninio aktyvumo (žr. išsamų protokolą (7)).

Priimtino kriterijai

11. Bandymo priėmimas arba atmetimas grindžiamas kiekvieno bandymo 96 šulinėlių plokštelėje pamatinio etalono ir kontrolinių ėminių rezultatų įvertinimu. Kiekvienas pamatinis etalonas bandomas kelių koncentracijų ir yra kartotiniai kiekvienos pamatinio etalono ir kontrolinių medžiagų koncentracijos ėminiai. Šių parametrų rezultatai lyginami su kokybės kontrolinių

¹ Michael S. Denison, Ph.D. Professor, Dept. of Environmental Toxicology, 4241 Meyer Hall, One Shields Ave, University of California, Davis, CA 95616, e. paštas msdenison@ucdavis.edu, (530) 754-8649.

² *Xenobiotic Detection Systems Inc.* 1601 East Geer Street, Suite S, Durham NC, 27704 JAV, e. paštas: info@dioxins.com, telefonas 919-688-4804, faksas 919-688-4404.

ėminių rezultatais, paimtais iš agonistų ir antagonistų istorinių duomenų bazių, kurias kiekviena laboratorija sukuria, atlikdama kvalifikacijos įrodymo bandymus. Istorinių duomenų bazės yra nuolat atnaujinamos pamatinių etalonų ir kontrolinių ėminių vertėmis. Dėl įrangos arba laboratorijos sąlygų pakeitimo gali prireikti sukurti atnaujintų istorinių duomenų bazes.

Agonistų bandymas

Intervalo nustatymo bandymas

- Indukcija: indukciją plokštelėje reikėtų matuoti dalijant vidutinę didžiausiąją E2 pamatinio etalono santykinio šviesos vieneto (RLU) vertę iš vidutinės DMSO kontrolinio ėminio RLU vertės. Paprastai gaunamas indukcijos pokytis penkis kartus, bet priimtino tikslu indukcija turėtų padidėti keturis kartus arba daugiau.
- DMSO kontrolinio ėminio rezultatai: tirpiklio kontrolinio ėminio RLU vertės turėtų būti istorinės tirpiklio kontrolinio ėminio vidutinės RLU vertės 2,5 standartinio nuokrypio intervale.
- Jei bandymas neatitinka kurio nors iš priimtino kriterijų, jis turėtų būti atmestas ir pakartotas.

Galutinis bandymas

Jį sudaro agonistų intervalo nustatymo bandymo priimtino kriterijai ir:

- Pamatinio etalono rezultatai: E2 pamatinio etalono atsako priklausomybės nuo koncentracijos kreivė turėtų būti sigmoidės formos ir ne mažiau kaip trys vertės turėtų būti tiesiojoje atsako priklausomybės nuo koncentracijos kreivės dalyje.
- Teigiamos kontrolinės medžiagos rezultatai: metoksichloro kontrolinės medžiagos RLU vertės turėtų būti didesnės nei DMSO vidurkio ir trijų DMSO vidurkio standartinių nuokrypių suma.
- Jei bandymas neatitinka kurio nors vieno iš priimtino kriterijų, jis turėtų būti atmestas ir pakartotas.

Antagonistų bandymas

Intervalo nustatymo bandymas

- Sumažėjimas: sumažėjimas plokštelėje matuojamas dalijant vidutinę didžiausiąją Ral/E2 pamatinio etalono RLU vertę iš vidutinės DMSO kontrolinio ėminio RLU vertės. Paprastai gaunamas sumažėjimas penkis kartus, bet priimtino tikslu sumažėjimas turėtų būti tris kartus arba didesnis.
- E2 kontrolinio ėminio rezultatai: E2 kontrolinio ėminio RLU vertės turėtų būti istorinės E2 kontrolinio ėminio vidutinės RLU vertės 2,5 standartinio nuokrypio intervale.
- DMSO kontrolinio ėminio rezultatai: tirpiklio kontrolinio ėminio RLU vertės turėtų būti istorinės tirpiklio kontrolinio ėminio vidutinės RLU vertės 2,5 standartinio nuokrypio intervale.

- Jei bandymas neatitinka kurio nors vieno iš priimtumo kriterijų, jis turėtų būti atmestas ir pakartotas.

Galutinis bandymas

Jį sudaro antagonistų intervalo nustatymo bandymo priimtumo kriterijai ir:

- Pamatinio etalono rezultatai: Ral/E2 pamatinio etalono atsako priklausomybės nuo koncentracijos kreivė turėtų būti sigmoidės formos ir ne mažiau kaip trys vertės turėtų būti tiesiojoje atsako priklausomybės nuo koncentracijos kreivės dalyje.
- Teigiamos kontrolinės medžiagos rezultatai: tamoksifeno/E2 kontrolinės medžiagos RLU vertės turėtų būti mažesnės nei E2 kontrolinio ėminio vidurkio ir trijų E2 kontrolinio ėminio vidurkio standartinių nuokrypių skirtumas.
- Jei bandymas neatitinka kurio nors vieno iš priimtumo kriterijų, jis turėtų būti atmestas ir pakartotas.

Pamatiniai etalonai, teigiamas ir nešiklio kontroliniai ėminiai

Nešiklio kontrolinis ėminys (agonistų ir antagonistų bandymai)

12. Bandomosioms cheminėms medžiagoms tirpinti naudojamas nešiklis turėtų būti bandomas kaip nešiklio kontrolinis ėminys. Kaip nešiklis atliekant VM7Luc ER TA bandymo patvirtinimą buvo naudojamas 1 % (V/V) dimetilsulfoksidas (DMSO, CASRN 67-68-5) (žr. 24 pastraipą). Jei naudojamas kitas nei DMSO nešiklis, visi pamatiniai etalonai, kontroliniai ėminiai ir bandomosios cheminės medžiagos turėtų būti bandomos naudojant tą patį nešiklį, jei tinka.

Pamatinis etalonas (agonistų intervalo nustatymas)

13. Pamatinis etalonas yra E2 (CASRN 50-28-2). Atliekant intervalo nustatymo bandymą, pamatinį etaloną sudaro vienu santykiu atskiestų keturių koncentracijos verčių E2 tirpalai ($1,84 \times 10^{-10}$, $4,59 \times 10^{-11}$, $1,15 \times 10^{-11}$ ir $2,87 \times 10^{-12}$ mol/l), kiekvienos koncentracijos tirpalą bandant dviejuose šulinėliuose.

Pamatinis etalonas (galutinis agonistų bandymas)

14. Atliekant galutinį E2 bandymą, jį sudaro 1:2 santykiu atskiestų vienuolikos koncentracijos verčių E2 tirpalai (nuo $3,67 \times 10^{-10}$ iki $3,59 \times 10^{-13}$ mol/l), bandant kiekvieną tirpalą dviejuose šulinėliuose.

Pamatinis etalonas (antagonistų intervalo nustatymas)

15. Pamatinis etalonas yra Ral (CASRN 84449-90-1) ir E2 (CASRN 50-28-2) derinys. Atliekant Ral/E2 intervalo nustatymo bandymą, jį sudaro vienu santykiu atskiestų trijų koncentracijos verčių Ral tirpalai ($3,06 \times 10^{-9}$, $7,67 \times 10^{-10}$, ir $1,92 \times 10^{-10}$ mol/l) ir vienos koncentracijos ($9,18 \times 10^{-11}$ mol/l) E2 tirpalas, bandant kiekvieną tirpalą dviejuose šulinėliuose.

Pamatinis etalonas (galutinis antagonistų bandymas)

16. Atliekant galutinį Ral/E2 bandymą, jį sudaro 1:2 santykiu atskiestų devynių koncentracijos verčių Ral tirpalai (nuo $2,45 \times 10^{-8}$ iki $9,57 \times 10^{-11}$ mol/l) ir vienos koncentracijos ($9,18 \times 10^{-11}$ mol/l) E2 tirpalas, bandant kiekvieną tirpalą dviejuose šulinėliuose.

Silpno teigiamo poveikio kontrolinė medžiaga (agonistas)

17. Silpno teigiamo poveikio kontrolinės medžiagos ėminys yra $9,06 \times 10^{-6}$ mol/l *p,p'*-metoksichloro (metoksichloras; CASRN 72-43-5) tirpalas EFM.

Silpno teigiamo poveikio kontrolinė medžiaga (antagonistas)

18. Silpno teigiamo poveikio kontrolinė medžiaga yra $3,36 \times 10^{-6}$ mol/l tamoksifeno (CASRN 10540-29-1) ir $9,18 \times 10^{-11}$ mol/l E2 tirpalas EFM.

E2 kontrolinis ėminys (tik antagonistų bandymas)

19. E2 kontrolinis ėminys yra $9,18 \times 10^{-11}$ mol/l E2 tirpalas EFM ir naudojamas kaip neigiamų kontrolinių ėminių atskaitos linija.

Indukcijos padidėjimas kartais (agonistas)

20. Pamatinio etalono (E2) liuciferazės aktyvumo indukcija matuojama dalijant vidutinę didžiausiąją E2 patatinio etalono RLU vertę iš vidutinės DMSO kontrolinio ėminio RLU vertės ir rezultatas turėtų būti didesnis nei keturi kartai.

Sumažėjimas kartais (antagonistas)

21. Vidutinis patatinio etalono (Ral/E2) liuciferazės aktyvumas matuojamas dalijant vidutinę didžiausiąją Ral/E2 patatinio etalono RLU vertę iš vidutinės DMSO kontrolinio ėminio RLU vertės ir jis turėtų būti didesnis nei trys kartai.

Laboratorijos kvalifikacijos įrodymas (žr. šio bandymo metodo ER TA BANDYMO KOMPONENTAI 14 pastraipą ir 3 bei 4 lenteles).

Nešiklis

22. Bandomosios cheminės medžiagos turėtų būti tirpinamos tirpiklyje, kuris soliubilizuoja bandomąją cheminę medžiagą ir yra maišus su ląstelių terpe. Tinkami nešikliai yra vanduo, etanolis (nuo 95 % iki 100 % grynumo) ir DMSO. Jei naudojamas DMSO, jo koncentracija neturėtų būti didesnė kaip 1 % (V/V). Naudojant bet kurį nešiklį reikėtų įrodyti, kad naudojant didžiausią jo turį jis nėra citotoksiškas ir nėra bandymo atlikimo trukdžių. Pamatiniai etalonai ir kontrolinės medžiagos tirpinamos 100 % tirpiklyje ir toliau skiedžiamos iki reikiamos koncentracijos EFM.

Bandomųjų cheminių medžiagų ruošimas

23. Bandomosios cheminės medžiagos tirpinamos 100 % DMSO (arba tinkamame tirpiklyje) ir toliau skiedžiamos iki reikiamos koncentracijos EFM. Reikėtų palaukti, kol visos

bandomosios cheminės medžiagos prieš jas tirpinant ir skiedžiant pasiekia kambario temperatūrą. Kiekvienam bandymui reikėtų ruošti naujus bandomųjų cheminių medžiagų tirpalus. Tirpaluose neturi būti pastebimų nuosėdų arba drumstumo. Galima ruošti didelius pamatinių etalonų ir kontrolinių medžiagų pradinių tirpalų tūrius; tačiau galutinius pamatinių etalonų, kontrolinių medžiagų ir bandomųjų cheminių medžiagų atskiestus tirpalus reikėtų ruošti iš naujo prieš kiekvieną bandymą ir panaudoti per 24 h nuo paruošimo.

Tirpumas ir citotoksiškumas. Intervalo nustatymo aspektai

24. Intervalo nustatymo bandymą sudaro septyni 1:10 santykiu atskiesti tirpalai, bandomi du kartus. Iš pradžių, atliekant agonistų bandymus, bandomosios cheminės medžiagos bandomos didžiausiosios 1 mg/ml (~1 mmol/l) koncentracijos, o atliekant antagonistų bandymus – 20 µg/ml (~10 µmol/l). Intervalo nustatymo bandymai atliekami, kad būtų galima nustatyti:
- pradines bandomosios cheminės medžiagos koncentracijas, kurias reikėtų naudoti atliekant galutinį bandymą;
 - atskiestų (1:2 arba 1:5) tirpalų koncentracijos vertes, kurias reikėtų naudoti atliekant galutinį bandymą.
25. Ląstelių gyvybingumo ir (arba) citotoksiškumo vertinimas yra įtrauktas į agonistų ir antagonistų bandymo protokolus (7) ir sudaro intervalo nustatymo bei galutinių bandymų dalį. Citotoksiškumo nustatymo metodas, taikytas ląstelių gyvybingumui vertinti atliekant VM7Luc ER TA patvirtinimą (1), buvo palyginamasis kokybinis vizualaus stebėjimo metodas; tačiau galima taikyti kiekybinį citotoksiškumo nustatymo metodą (žr. protokolą (7)). Negalima naudoti duomenų, gautų bandomosios cheminės medžiagos koncentracijai, kuriai esant gyvybingumas sumažėja daugiau kaip 20 %.

Apdorojimas bandomąja chemine medžiaga ir išdėstymo bandymo plokštelėje schema

26. Ląstelės skaičiuojamos ir sėjamos 96 šulinėlių audinių kultūros plokštelėse (2×10^5 ląstelių šulinėliui) EFM ir inkubuojamos 24 h, kad ląstelės galėtų prisitvirtinti prie plokštelės. EFM pašalinama, pakeičiama bandomosiomis ir etaloninėmis cheminėmis medžiagomis EFM ir plokštelės inkubuojamos 19–24 h. Reikėtų atkreipti ypatingą dėmesį į labai lakias medžiagas, nes šalia jų esantiems kontrolinių ėminių šulinėliams gali būti gauti klaidingai teigiami rezultatai. Efektyviai atskirti atskirus šulinėlius bandymo metu galėtų „plokštelių sandarikliai“ ir todėl juos rekomenduojama naudoti tokiais atvejais.

Intervalo nustatymo bandymai

27. Atliekant intervalo nustatymo bandymą naudojami visi 96 šulinėlių plokštelės šulinėliai, kad būtų galima bandyti iki šešių bandomųjų cheminių medžiagų kaip 1:10 santykiu atskiestų septynių tirpalų du kartotinius ėminius (žr. 1 ir 2 paveikslus).

- Atliekant *agonisto* intervalo nustatymo bandymą, naudojami E2, kaip pamatinio etalono, keturių koncentracijos verčių du kartotiniai ėminiai ir DMSO kontrolinio ėminio keturi kartotinių ėminių šulinėliai.
- Atliekant *antagonisto* intervalo nustatymo bandymą, naudojami trijų Ral/E2 koncentracijos verčių ir $9,18 \times 10^{-11}$ mol/l E2, kaip pamatinio etalono, du kartotiniai ėminiai ir po tris E2 bei DMSO kartotinius kontrolinius ėminius.

1 paveikslas. Agonistų intervalo nustatymo bandymo 96 šulinėlių plokštelės schema

	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

Santrumpos: nuo E2-1 iki E2-4 – E2 pamatinio etalono koncentracija (nuo didelės iki mažos); nuo TC1-1 iki TC1-7 – 1 bandomosios cheminės medžiagos (TC1) koncentracija (nuo didelės iki mažos); nuo TC2-1 iki TC2-7 – 2 bandomosios cheminės medžiagos (TC2) koncentracija (nuo didelės iki mažos); nuo TC3-1 iki TC3-7 – 3 bandomosios cheminės medžiagos (TC3) koncentracija (nuo didelės iki mažos); nuo TC4-1 iki TC4-7 – 4 bandomosios cheminės medžiagos (TC4) koncentracija (nuo didelės iki mažos); nuo TC5-1 iki TC5-7 – 5 bandomosios cheminės medžiagos (TC5) koncentracija (nuo didelės iki mažos); nuo TC6-1 iki TC6-7 – 6 bandomosios cheminės medžiagos (TC6) koncentracija (nuo didelės iki mažos); VC – nešiklio kontrolinis ėminys (DMSO 1 % V/V EFM).

2 paveikslas. Antagonistų intervalo nustatymo bandymo 96 šulinėlių plokštelės schema

	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

Santrumpos: E2 – E2 kontrolinis ėminys; nuo Ral-1 iki Ral-3 – raloksifeno/E2 pamatinio etalono koncentracija (nuo didelės iki mažos); nuo TC1-1 iki TC1-7 – 1 bandomosios cheminės medžiagos (TC1) koncentracija (nuo didelės iki mažos); nuo TC2-1 iki TC2-7 – 2 bandomosios cheminės medžiagos (TC2) koncentracija (nuo didelės iki mažos); nuo TC3-1 iki TC3-7 – 3 bandomosios cheminės medžiagos (TC3) koncentracija (nuo didelės iki mažos); nuo TC4-1 iki TC4-7 – 4 bandomosios cheminės medžiagos (TC4) koncentracija (nuo didelės iki mažos); nuo TC5-1 iki TC5-7 – 5 bandomosios cheminės medžiagos (TC5) koncentracija (nuo didelės iki mažos); nuo TC6-1 iki TC6-7 – 6 bandomosios cheminės medžiagos (TC6) koncentracija (nuo didelės iki mažos); VC – nešiklio kontrolinis ėminys (DMSO 1 % V/V EFM).

Pastaba. Visos bandomosios cheminės medžiagos bandomos esant $9,18 \times 10^{-11}$ mol/l E2.

28. Rekomenduojamas reikiamas galutinis kiekvieno šulinėlio terpių tūris yra 200 µl. Naudojamos tik tos bandymo plokštelės, kuriose visų šulinėlių ląstelių gyvybingumas yra 80 % ir didesnis.
29. Galutinio **agonistų** bandymo pradinių koncentracijų nustatymas nuodugniai aprašytas agonistų bandymo protokole (7). Trumpai tariant, naudojami tokie kriterijai:
- jei bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos kreivėje nėra taškų, kurių vertė yra didesnė nei vidurkio ir trijų DMSO kontrolinio ėminio standartinių nuokrypių suma, galutiniai bandymai būtų atliekami naudojant 1:2 santykiu atskiestų 11 tirpalų, pradedant didžiausiojo tirpumo koncentracija;
 - jei bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos kreivėje yra taškų, kurių vertė yra didesnė nei vidurkio ir trijų DMSO kontrolinio ėminio standartinių nuokrypių suma, pradinė koncentracija, kurią reikia naudoti 11 taškų skiedimo schemoje, atliekant galutinį bandymą, turėtų būti vienu logaritmo vienetu didesnė nei koncentracija, kuriai gaunama didžiausia pakoreguota RLU vertė, atliekant intervalo nustatymo bandymą. 11 taškų skiedimo schema būtų pagrįsta skiedimu santykiu 1:2 arba 1:5 atsižvelgiant į šiuos kriterijus:

turėtų būti naudojami visi 1:2 santykiu atskiesti 11 tirpalai, jei gautas koncentracijos intervalas aprėptų visą atsakų intervalą, atsižvelgiant į intervalo nustatymo bandyme gauta atsako priklausomybės nuo koncentracijos kreivę. Priešingu atveju skiedžiama santykiu 1:5;
 - jei atliekant intervalo nustatymo bandymą bandomajai cheminei medžiagai gaunama dviejų krypčių atsako priklausomybės nuo koncentracijos kreivė, reikėtų gauti atsakymą dėl abiejų kreivės dalių, atliekant galutinį bandymą.
30. Galutinio **antagonistų** bandymo pradinių koncentracijų nustatymas nuodugniai aprašytas antagonistų bandymo protokole (7). Trumpai tariant, naudojami tokie kriterijai:
- jei bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos kreivėje nėra taškų, kurių vertė yra mažesnė nei vidurkio ir trijų E2 kontrolinio ėminio standartinių nuokrypių skirtumas, galutiniai bandymai būtų atliekami naudojant 1:2 santykiu atskiestų 11 tirpalų, pradedant didžiausiojo tirpumo koncentracija;
 - jei bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos kreivėje yra taškų, kurių vertė yra mažesnė nei vidurkio ir trijų E2 kontrolinio ėminio standartinių nuokrypių skirtumas, pradinė koncentracija, naudojama 11 taškų skiedimo schemoje, atliekant galutinį bandymą, turėtų būti viena iš šių:
 - koncentracija, kuriai gaunama mažiausia pakoreguota RLU vertė, atliekant intervalo nustatymo bandymą;
 - didžiausioji tirpumo koncentracija (žr. antagonistų protokolo (7) 14-2 paveikslą)

- mažiausioji citotoksiškumo koncentracija (žr. antagonistų protokolo (7) 14-3 paveikslo atitinkamą pavyzdį);
- 11 taškų skiedimo schema būtų pagrįsta skiedimu santykiu 1:2 arba 1:5 atsižvelgiant į šiuos kriterijus:

turėtų būti naudojami visi 1:2 santykiu atskiesti 11 tirpalai, jei gautas koncentracijos intervalas aprėptų visą atsakų intervalą, atsižvelgiant į intervalo nustatymo bandyme gauta atsako priklausomybės nuo koncentracijos kreivę. Priešingu atveju reiktų skiesti santykiu 1:5.

Galutiniai bandymai

31. Galutiniai bandymai atliekami naudojant vienu santykiu atskiestų 11 tirpalų (1:2 arba 1:5 santykiu atskiestų tirpalų, atsižvelgiant į galutinių bandymų pradinės koncentracijos kriterijus), kai kiekviena koncentracija bandoma trijuose 96 šulinėlių plokštelės šulinėliuose (žr. 3 ir 4 paveikslus).
- Atliekant *agonistų* galutinį bandymą, kaip pamatinis etalonas naudojamas 11 koncentracijos verčių E2, imant po du kartotinius ėminius. Į kiekvieną plokštelę įtraukti keturi DMSO kontrolinio ėminio kartotiniai šulinėliai ir keturi metoksichloro kontrolinio ėminio ($9,06 \times 10^{-6}$ mol/l) kartotiniai šulinėliai.
- Atliekant *antagonistų* galutinį bandymą, kaip pamatinis etalonas naudojamas Ral/E2, devynių Ral koncentracijos verčių ir $9,18 \times 10^{-11}$ mol/l E2, imant po du kartotinius ėminius, keturi kartotiniai $9,18 \times 10^{-11}$ mol/l E2 kontrolinio ėminio šulinėliai, keturi kartotiniai DMSO kontrolinių ėminių šulinėliai ir keturi $3,36 \times 10^{-6}$ mol/l tamoksifeno kartotiniai šulinėliai.

3 paveikslas. Agonistų galutinio bandymo 96 šulinėlių plokštelės schema

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Meth
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Meth
G	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Meth
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Meth

Santrumpos: nuo TC11-1 iki TC1-11 – 1 bandomosios cheminės medžiagos koncentracija (nuo didelės iki mažos); nuo TC2-1 iki TC2-11 – 2 bandomosios cheminės medžiagos koncentracija (nuo didelės iki mažos); nuo E2-1 iki E2-11 – E2 pamatinio etalono koncentracija (nuo didelės iki mažos); Meth – p, p'-metoksichloras, silpno teigiamo poveikio kontrolinė medžiaga; VC – nešiklio kontrolinis ėminys (DMSO 1 % V/V EFM).

4 paveikslas. Antagonistų galutinio bandymo 96 šulinėlių plokštelės schema

	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

Santrumpos: E2 – E2 kontrolinis ėminys; nuo Ral-1 iki Ral-9 – raloksifeno/E2 pamatinio etalono koncentracija (nuo didelės iki mažos); Tam – tamoksifeno/E2 silpno teigiamo poveikio kontrolinė medžiaga; nuo TC1-1 iki TC1-11 – 1 bandomosios cheminės medžiagos (TC1) koncentracija (nuo didelės iki mažos); nuo TC2-1 iki TC2-11 – 2 bandomosios cheminės medžiagos (TC2) koncentracija (nuo didelės iki mažos); VC – nešiklio kontrolinis ėminys (DMSO 1 % V/V EFM).

Pastaba. Kaip pažymėta, visuose etaloninių medžiagų ir bandomųjų cheminių medžiagų šulinėliuose yra pastovi E2 koncentracija ($9,18 \times 10^{-11}$ mol/l).

32. Kartotiniai galutiniai tos pačios cheminės medžiagos bandymai turėtų būti atliekami skirtingomis dienomis, kad būtų užtikrinta jų nepriklausomybė. Reikėtų atlikti ne mažiau kaip du galutinius bandymus. Jei bandymų rezultatai prieštarauja vienas kitam (pvz., vieno bandymo rezultatas yra teigiamas, kito – neigiamas) arba vienas iš bandymų neatitiko reikalavimų, turėtų būti atliekamas trečiasis papildomas bandymas.

Liuminescencijos matavimas

33. Liuminescencija matuojama nuo 300 nm iki 650 nm srityje, naudojant puršiamąjį liuminometrą ir programinę įrangą, kuri reguliuoja įpuršiamą tūrį ir matavimo intervalą (7). Kiekvieno šulinėlio skleidžiama šviesa išreiškiama RLU vienam šulinėliui.

DUOMENŲ ANALIZĖ

EC₅₀ arba IC₅₀ nustatymas

34. EC₅₀ vertė (pusė didžiausiosios bandomosios cheminės medžiagos efektyviosios koncentracijos (agonistų)) ir IC₅₀ vertė (pusė didžiausiosios bandomosios cheminės medžiagos efektyviosios slopinamosios koncentracijos (antagonistų)) nustatoma pagal atsako priklausomybės nuo koncentracijos duomenis. Jei vienai arba kelioms bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos vertėms gaunamas teigiamas rezultatas, bandomosios cheminės medžiagos pusės didžiausiojo atsako koncentracija (IC₅₀ arba EC₅₀) skaičiuojama atliekant Hillo funkcijos analizę arba taikant tinkamą alternatyvų metodą. Hillo funkcija yra keturių parametrų logistinis matematinis modelis, kuris susieja bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją su atsaku (paprastai pagal sigmoide) pagal tokią lygtį:

$$Y = \text{apačia} + \frac{(\text{viršus} - \text{apačia})}{1 + 10^{(\lg EC_{50} - X) \text{Hillo krypties koef.}}}$$

Čia:

Y – atsakas (t. y. RLU);

X – koncentracijos logaritmas;

Apačia – mažiausias atsakas;

Viršus – didžiausias atsakas;

lg EC₅₀ (arba lg IC₅₀) – X, kaip atsako nuo viršaus iki apačios vidurio, logaritmas;

Hillo krypties koeficientas – kreivės statumas.

Taikant modelį skaičiuojama viršaus, apačios, Hillo krypties koeficiento geriausia atitiktis ir IC₅₀ bei EC₅₀ parametrai. EC₅₀ ir IC₅₀ vertėms apskaičiuoti turėtų būti naudojama tinkama statistinės analizės programa (pvz., Graphpad Prism^R statistinės analizės programa).

Riktų nustatymas

35. Tinkamas statistinis pagrindimas būtų lengvesnis, įtraukiant (bet juo neapsiribojant) Q kriterijų (žr. agonistų ir antagonistų protokolus (7) apie tai, kaip nustatyti „netinkamus“ šulinėlius, kurie būtų pašalinti iš duomenų analizės).
36. Jei tai E2 pamatinio etalono kartotiniai ėminiai (imtį sudaro du ėminiai), tam tikros E2 koncentracijos kartotinio ėminio pakoreguota RLU vertė laikoma raktu, jei ši vertė yra

daugiau kaip 20 % didesnė arba mažesnė nei tos pačios koncentracijos pakoreguota RLU vertė iš istorinių duomenų bazės.

Liuminometro duomenų rinkimas ir koregavimas atliekant intervalo nustatymo bandymą

37. Neapdorotus liuminometro duomenis reikėtų perkelti į bandymui sukurtą elektroninę lentelę. Reikėtų nustatyti, ar yra duomenų taškai kaip riktai, kuriuos reikia pašalinti. (Žr. bandymo priimtinumą kriterijai dėl analizės metu nustatomų parametrų). Reikėtų atlikti tokius skaičiavimus:

Agonistas

- 1 žingsnis. Apskaičiuojama vidutinė DMSO nešiklio kontrolinio ėminio (VC) vertė.
- 2 žingsnis. Vidutinė DMSO VC vertė atimama iš kiekvieno šulinėlio vertės, kad būtų galima normalizuoti duomenis
- 3 žingsnis. Apskaičiuojamas pamatinio etalono (E2) vidutinis indukcijos pokytis kartais.
- 4 žingsnis. Apskaičiuojama bandomųjų cheminių medžiagų vidutinė EC₅₀ vertė.

Antagonistas

- 1 žingsnis. Apskaičiuojama vidutinė DMSO VC vertė.
- 2 žingsnis. Vidutinė DMSO VC vertė atimama iš kiekvieno šulinėlio vertės, kad būtų galima normalizuoti duomenis
- 3 žingsnis. Apskaičiuojamas pamatinio etalono (Ral/E2) vidutinis sumažėjimas kartais.
- 4 žingsnis. Apskaičiuojama vidutinė pamatinio etalono E2 vertė.
- 5 žingsnis. Apskaičiuojama bandomųjų cheminių medžiagų vidutinė IC₅₀ vertė.

Liuminometro duomenų rinkimas ir koregavimas atliekant galutinį bandymą

38. Neapdorotus liuminometro duomenis reikėtų perkelti į bandymui sukurtą elektroninę lentelę. Reikėtų nustatyti, ar yra duomenų taškai kaip riktai, kuriuos reikia pašalinti. (Žr. bandymo priimtinumą kriterijai dėl analizės metu nustatomų parametrų). Atliekami tokie skaičiavimai:

Agonistas

- 1 žingsnis. Apskaičiuojama vidutinė DMSO VC vertė.
- 2 žingsnis. Vidutinė DMSO VC vertė atimama iš kiekvieno šulinėlio vertės, kad būtų galima normalizuoti duomenis
- 3 žingsnis. Apskaičiuojamas pamatinio etalono (E2) vidutinis indukcijos pokytis kartais.
- 4 žingsnis. Apskaičiuojama E2 ir bandomųjų cheminių medžiagų vidutinė EC₅₀ vertė.
- 5 žingsnis. Apskaičiuojama pakoreguota vidutinė metoksichloro RLU vertė.

Antagonistas

- 1 žingsnis. Apskaičiuojama vidutinė DMSO VC vertė.
- 2 žingsnis. Vidutinė DMSO VC vertė atimama iš kiekvieno šulinėlio vertės, kad būtų galima normalizuoti duomenis

- 3 žingsnis. Apskaičiuojamas pamatinio etalono (Ral/E2) vidutinis indukcijos pokytis kartais.
- 4 žingsnis. Apskaičiuojama Ral/E2 ir bandomųjų cheminių medžiagų vidutinė IC₅₀ vertė.
- 5 žingsnis. Apskaičiuojama pakoreguota vidutinė tamoksifeno RLU vertė.
- 6 žingsnis. Apskaičiuojama vidutinė pamatinio etalono E2 vertė.

Duomenų aiškinimo kriterijai

39. VM7Luc ER TA yra numatytas kaip įrodomosios vertės analizės metodo dalis, kad būtų lengviau nustatyti pirmumą dėl endokrininę sistemą ardančių medžiagų bandymo *in vivo*. Šios pirmumo nustatymo procedūros dalis bus bandomosios cheminės medžiagos klasifikavimas kaip teigiamos ar neigiamos, atsižvelgiant į ER agonisto ar antagonisto aktyvumą. Teigiamo ir neigiamo sprendimo kriterijai, taikyti atliekant VM7Luc ER TA patvirtinimo tyrimą, aprašyti 1 lentelėje.

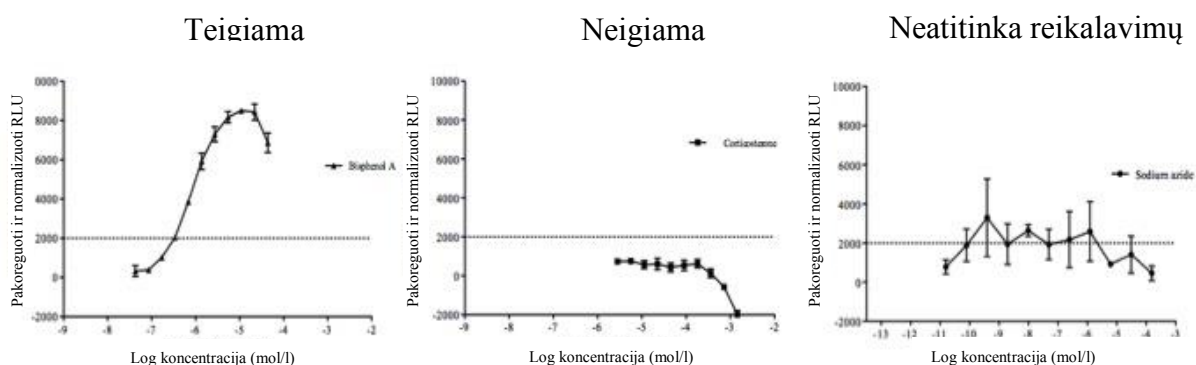
1 lentelė. Teigiamo ir neigiamo sprendimo kriterijai

AGONISTŲ AKTYVUMAS	
Teigiamas	- Visų bandomųjų cheminių medžiagų, klasifikuojamų kaip <i>teigiamos</i> dėl ER agonistų aktyvumo, atsako priklausomybės nuo koncentracijos kreivė turėtų būti sudaryta iš atskaitos linijos, teigiamo krypties koeficiento linijos ir baigtis gulste arba smaile. Kai kuriais atvejais galima apibrėžti tik dvi iš šių charakteristikų (atskaitos liniją – teigiamo krypties koeficiento liniją arba teigiamo krypties koeficiento liniją – smailę). - Teigiamo krypties koeficiento liniją turėtų būti gauta per ne mažiau kaip tris taškus su nepersiklojančiais paklaidos brūkšneliais (vidurkis ± SN). Atskaitos liniją sudarantys taškai pašalinami, bet į tiesinę kreivės dalį galima įtraukti smailę arba pirmąją gulstės tašką. - Teigiamam klasifikavimui reikia, kad atsako amplitudė, kaip skirtumas tarp atskaitos linijos ir smailės, būtų ne mažesnė kaip 20 % didžiausiosios pamatinio etalono E2 vertės (t. y. 2000 RLU arba daugiau, kai didžiausioji pamatinio etalono [E2] atsako vertė nustatoma 10 000 RLU). - Jei įmanoma, reikėtų apskaičiuoti kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos EC₅₀ vertę.
Neigiamas	Tam tikros koncentracijos vidutinis koreguotas RLU yra lygus DMSO kontrolinio ėminio vidutinės RLU vertės ir DMSO RLU trijų standartinių nuokrypių sumai arba mažesnis.
Neatitinka reikalavimų	Jei neįmanoma paaiškinti, ar duomenys tinka aktyvumo buvimui ar nebuvimui įrodyti dėl didelių kokybinių ar kiekybinių apribojimų, jie laikomi neatitinkančiais reikalavimų ir negali būti naudojami nustatant, ar bandomoji cheminė medžiaga yra teigiama ar neigiama. Chemines medžiagas reikėtų bandyti iš naujo.

ANTAGONISTŲ AKTYVUMAS	
Teigiamas	- Pagal bandomosios cheminės medžiagos duomenis gaunama atsako priklausomybės nuo koncentracijos kreivė, sudaryta iš atskaitos linijos ir neigiamo krypties koeficiento linijos. - Neigiamo krypties koeficiento liniją turėtų būti gauta per ne mažiau kaip tris taškus su nepersiklojančiais paklaidos brūkšneliais; atskaitos liniją sudarantys taškai pašalinami, bet į tiesinę kreivės dalį galima įtraukti pirmąjį gultės tašką. - Turėtų būti ne mažesnis kaip 20 % aktyvumo sumažėjimas palyginti su pamatinio etalono Ral/E2 didžiausiąja verte (t. y. 8000 RLU arba mažiau, kai didžiausioji pamatinio etalono [Ral/E2] atsako vertė nustatoma 10 000 RLU). - Didžiausioji citotoksiškumo nesukelianti bandomosios cheminės medžiagos koncentracija turėtų būti mažesnė arba lygi 1×10^{-5} mol/l. - Jei įmanoma, reikėtų apskaičiuoti kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos IC₅₀ vertę.
Neigiamas	Visi duomenų taškai yra virš ESA ₈₀ vertės (80 % E2 atsako arba 8000 RLU), kai koncentracija yra mažesnė kaip $1,0 \times 10^{-5}$ mol/l.
Neatitinka reikalavimų	Jei neįmanoma paaiškinti, ar duomenys tinka aktyvumo buvimui ar nebuvimui įrodyti dėl didelių kokybinių ar kiekybinių apribojimų, jie laikomi neatitinkančiais reikalavimų ir negali būti naudojami nustatant, ar bandomoji cheminė medžiaga yra teigiama ar neigiama. Cheminę medžiagą reikėtų bandyti iš naujo.

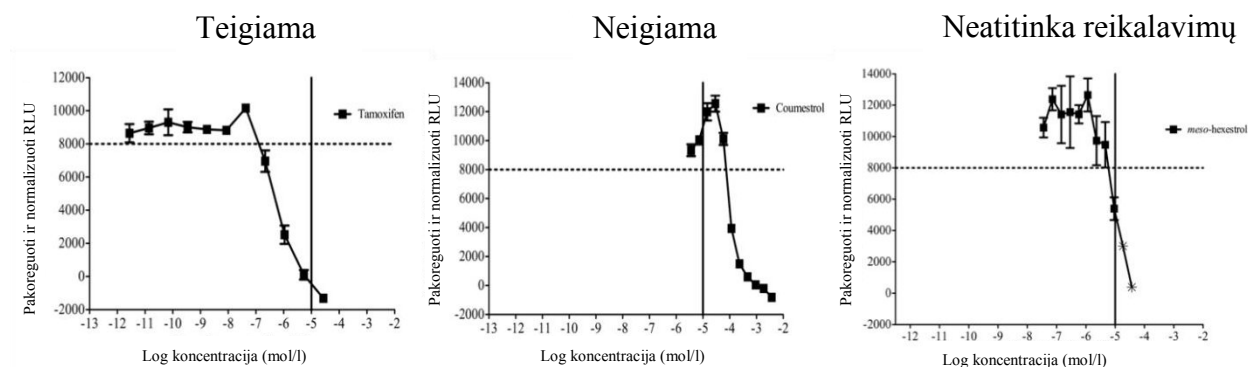
40. Teigiamus rezultatus apibūdina poveikio dydis ir koncentracija, kuriai esant šis poveikis pasireiškia, jei įmanoma. Teigiamų, neigiamų ir reikalavimų neatitinkančių duomenų pavyzdžiai pateikti 5 ir 6 paveiksluose.

5 paveikslas. Agonistų pavyzdžiai: teigiami, neigiami ir reikalavimų neatitinkantys duomenys



Brūkšninė linija rodo 20 % E2 atsako, 2000 pakoreguotų ir normalizuotų RLU.

6 paveikslas. Antagonistų pavyzdžiai: teigiami, neigiami ir reikalavimų neatitinkantys duomenys



Brūkšninė linija rodo 80 % Ral/E2 atsako, 8000 pakoreguotų ir normalizuotų RLU.

Ištinė linija rodo $1,00 \times 10^{-5}$ mol/l. Atsakas būtų laikomas teigiamu, jei jis būtų žemiau 8000 RLU linijos ir esant mažesnei kaip $1,00 \times 10^{-5}$ mol/l koncentracijai.

Žvaigždute pažymėtos mezo-heksestrolio grafiko koncentracijos vertės rodo 2 balų arba didesnę gyvybingumą.

Mezo-heksestrolio bandymo rezultatai laikomi reikalavimų neatitinkančiais duomenimis, nes vienintelis mažesnis kaip 8 000 RLU atsakas gaunamas esant $1,00 \times 10^{-5}$ mol/l koncentracijai.

41. EC_{50} ir IC_{50} galima apskaičiuoti naudojant keturių parametų Hillo funkciją (daugiau duomenų pateikta agonistų protokole ir antagonistų protokole (7)). Atitiktis priimtinumo kriterijams rodo tinkamą sistemos veikimą, bet tai neužtikrina, kad atliekant konkretų atskirą bandymą bus gauti tikslūs duomenys. Pirmojo atskiro bandymo rezultatų pakartojimas yra geriausias būdas užtikrinti tikslų duomenų gavimą (žr. *ER TA BANDYMO KOMPONENTAI* 19 pastraipą).

BANDYMO ATASKAITA

42. Žr. *ER TA BANDYMO KOMPONENTAI* 20 pastraipą.

LITERATŪRA

- (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) 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 PRIEDĖLIS

STABILIAI TRANSFEKUOTO ŽMOGAUS ESTROGENŲ RECEPTORIAUS A TRANSAKTYVACIJOS BANDYMAS CHEMINIŲ MEDŽIAGŲ KAIP ESTROGENŲ AGONISTŲ IR ANTAGONISTŲ AKTYVUMUI APTIKTI, NAUDOJANT ERA CALUX LĄSTELIŲ LINIJĄ

PRADINIAI ASPEKTAI IR APRIBOJIMAI (TAIP PAT ŽR. *BENDRASIS IVADAS*)

1. Atliekant ER α CALUX transaktyvacijos bandymą, naudojama žmogaus U2OS ląstelių linija, kad būtų galima aptikti estrogeninį agonistų ir antagonistų aktyvumą, kaip tarpininką naudojant žmogaus estrogenų receptorių alfa (hER α). *BioDetection Systems BV* (Amsterdamas, Nyderlandai) atliktas stabiliai transfekuotų ER α CALUX biologinio tyrimo patvirtinimo tyrimas įrodė bandymo tinkamumą ir patikimumą atsižvelgiant į numatytą tikslą (1). ER α CALUX ląstelių linija ekspresuoja tik stabiliai transfekuotą žmogaus ER α (2) (3).
2. Šis bandymas yra specialiai sukurtas hER α tarpininkaujamai transaktyvacijai aptikti, matuojant biologinę liuminescenciją kaip vertinamąją baigtį. Biologinė liuminescencija paprastai naudojama atliekant biologinius tyrimus dėl didelio signalo ir triukšmo santykio (4).
3. Pranešama, kad esant didesnei kaip 1 $\mu\text{mol/l}$ fitoestrogenų koncentracijai atsiranda ne receptoriaus tarpininkaujama liuminescencija dėl per didelio liuciferazės reporterinio geno aktyvinimo (5) (6) (7). Todėl fitoestrogenų ar kitų panašių junginių didesnės koncentracijos, galinčios per daug aktyvinti liuciferazės ekspresiją, turi būti kruopščiai ištirtos atliekant stabiliai transfekuotų ER transaktyvacijos bandymus (žr. 2 priedėlį).
4. Prieš naudojant šį bandymą reglamentavimo tikslais, reikėtų perskaityti *BENDRASIS IVADAS* IR *ER TA BANDYMO KOMPONENTAI*. Šio bandymo metodo aprašyme vartojamos apibrėžtys ir santrumpos pateiktos priedėlyje.

BANDYMO PRINCIPAS (TAIP PAT ŽR. *BENDRASIS IVADAS*)

5. Biologinis tyrimas naudojamas ligandų prijungimui prie ER ir paskesnei receptoriaus bei ligando komplekso translokacijai į branduolį vertinti. Branduolyje receptoriaus ir ligando kompleksas prisijungia prie specifinių DNR atsako elementų ir transaktyvina jonvablio liuciferazės reporterinį geną, dėl ko padidėja ląstelių liuciferazės fermento ekspresija. Pridėjus liuciferazės substrato liuciferino, pastarasis virsta bioluminescenciniu produktu. Gautą šviesą nesunku aptikti ir kiekybiškai įvertinti liuminometru.
6. Bandymo sistema naudoja stabiliai transfekuotas ER α CALUX ląstelės. ER α CALUX ląstelės gautos iš žmogaus osteoblastinės osteosarkomos U2OS ląstelių linijos. Žmogaus

U2OS ląstelės buvo stabiliai transfekuotos 3xHRE-TATA-Luc ir pSG5-neo-hER α , taikant nusodinimo kalcio fosfatu metodą. U2OS ląstelių linija buvo pasirinkta kaip geriausia atsako į estrogenus (ir kitus steroidinius hormonus) reporterinė ląstelių linija, atsižvelgiant į stebėjimo rezultatus, kad U2OS ląstelių linija rodo mažą endogeninių receptorių aktyvumą arba jo visai neturi. Endogeninių receptorių nebuvimas buvo vertinamas naudojant tik liuciferazės reporterines plazmides, nerodančias aktyvumo, kai pridedama receptorių ligandų. Be to, ši ląstelių linija palaikė stiprius hormonų tarpininkaujamus atsakus, kai laikinai buvo įvesti susiję receptoriai (2) (3) (8).

7. Cheminių medžiagų estrogeninio arba antiestrogeninio aktyvumo bandymus naudojant ER α CALUX ląstelių liniją sudaro parengiamasis atskiras bandymas ir galutiniai atskiri bandymai. Atliekant parengiamąjį atskirą bandymą, nustatomas bandomųjų cheminių medžiagų tirpumas, citotoksiškumas ir galutiniams bandymams patikslintas koncentracijos intervalas. Atliekant ER α CALUX biologinių tyrimų galutinius atskirus bandymus, bandomos patikslintų koncentracijos intervalų bandomosios cheminės medžiagos ir toliau atliekamas bandomųjų cheminių medžiagų klasifikavimas dėl agonizmo ar antagonizmo.
8. Duomenų aiškinimo kriterijai išsamiai aprašyti 59 pastraipoje. Trumpai, bandomoji cheminė medžiaga laikoma teigiama dėl agonizmo, jei ne mažiau kaip dviem bandomosios cheminės medžiagos koncentracijoms gaunamas atsakas, lygus 10 % pamatinio etalono 17 β -estradiolio didžiausio atsako (PC₁₀), arba didesnis. Bandomoji cheminė medžiaga laikoma teigiama dėl antagonizmo, jei ne mažiau kaip dviem bandomosios cheminės medžiagos koncentracijoms gaunamas atsakas, lygus 80 % pamatinio etalono tamoksifeno didžiausio atsako (PC₈₀), arba mažesnis.

PROCEDŪRA

Ląstelių linijos

9. Atliekant bandymą turėtų būti naudojama stabiliai transfekuotų U2OS ER α CALUX ląstelių linija. Ląstelių liniją galima gauti iš *BioDetection Systems BV*, Amsterdamas, Nyderlandai, pagal techninio licencijų išdavimo sutartį.
10. Reikėtų naudoti tik mikoplazmomis neužkrėstas ląstelių kultūras. Naudojamos ląstelių partijos turėtų būti sertifikuotos, kad nėra užkrėstos mikoplazmomis, arba prieš naudojant reikėtų atlikti bandymą dėl mikoplazmų nebuvimo. Reikėtų naudoti RT-PCR (realiojo laiko polimerazės grandininę reakciją), kaip jautrų mikoplazmų užkrato aptikimo metodą (9).

Ląstelių linijos stabilumas

11. Siekiant užtikrinti CALUX ląstelių stabilumą ir vientisumą, jas reikėtų laikyti skystajame azote (–80 °C). Po ląstelių atitirpinimo prieš pradedant auginti naują kultūrą jas reikėtų persėti ne mažiau kaip du kartus, kad ląstelės būtų tinkamos cheminių medžiagų agonistų ir

antagonistų estrogeniniam aktyvumui vertinti. Ląstelės neturėtų būti persėjamos daugiau kaip 30 kartų.

12. Ląstelių linijos stabilumui stebėti ilgą laiką tikrinamas agonistų ir antagonistų bandymo sistemos jautris, įvertinant pamatinio etalono EC₅₀ arba IC₅₀. Be to, reikėtų stebėti teigiamo kontrolinio ėminio (PC) ir neigiamo kontrolinio ėminio (NC) santykinę indukciją. Rezultatai turėtų atitikti agonistų (3C lentelė) arba antagonistų (4C lentelė) ERα CALUX biologinio tyrimo priimtino kriterijus. Agonistinio ir antagonistinio poveikio pamatiniai etalonai, teigiami ir neigiami kontroliniai ėminiai pateikti 1 ir 2 lentelėse.

Ląstelių auginimo ir sėjimo sąlygos

13. U2OS ląstelės turėtų būti auginamos kultūros terpėje (DMEM/F12 (1:1) terpėje su fenolio raudonoju kaip pH indikatoriumi, papildytoje galvijų vaisiaus kraujo serumu (7,5 %), pakeičiamosiomis amino rūgštimis (1 %), 10 vienetų/ml penicilino, streptomicino ir geneticino (G-418) kaip atrankos žymeklio). Ląstelės turėtų būti dedamos į CO₂ inkubatorių (5 % CO₂) 37 °C temperatūroje, esant 100 % drėgmei. Ląstelėms pasiekus 85–95 % susiliejo laipsnį, jos gali būti persėjamos arba ruošiamos pasėti į 96 šulinėlių mikrotitravimo plokšteles. Pastarųjų atveju reikėtų paruošti 1×10^5 ląstelių/ml suspensiją estrogenų neturinčioje bandymo terpėje (DMEM/F12 (1:1) terpėje be fenolio raudonojo, papildytoje galvijų vaisiaus kraujo serumu, apdorotu dekstranu dengtomis medžio anglimis (5 % V/V), pakeičiamosiomis amino rūgštimis (1 % V/V), 10 vienetų/ml penicilino ir streptomicino) ir ją pasėti į 96 šulinėlių mikrotitravimo plokštelių šulinėlius (100 µl homogenizuotos ląstelių suspensijos). Prieš apdorojant medžiaga ląstelės turėtų būti inkubuojamos 24 h CO₂ inkubatoriuje (5 % CO₂, 37 °C, 100 % drėgmė). Plastikiniai indai turėtų būti be estrogenų.

Priimtino kriterijai

14. Bandomosios (-ųjų) cheminės (-ų) medžiagos (ų) agonistinis ir antagonistinis aktyvumas bandomas atliekant bandymų serijas. Bandymų seriją sudaro ne daugiau kaip 6 mikrotitravimo plokštelės. Kiekvieną bandymų seriją sudaro mažiausiai viena visa pamatinio etalono praskiestų tirpalų serija, teigiamas kontrolinis ėminys, neigiamas kontrolinis ėminys ir tirpiklio kontroliniai ėminiai. 1 ir 2 paveiksluose pateikta agonistų ir antagonistų bandymų serijos plokštelės schema.
15. Pamatinių etalonų ir bandomųjų cheminių medžiagų kiekvienos koncentracijos tirpalas, visi tirpiklio kontroliniai ėminiai, teigiami ir neigiami kontroliniai ėminiai turėtų būti analizuojami imant tris kartotinius ėminius. Kiekviena iš trijų kartotinių analizių turėtų atitikti 3A ir 4A lentelėse pateiktus reikalavimus.
16. Atliekant kiekvieną bandymų seriją, pirmoje plokštelėje matuojama visa pamatinio etalono (17β-estradiolio – dėl agonizmo; tamoksifeno – dėl antagonizmo) praskiestų tirpalų serija.

Visose kitose 5 mikrotitravimo plokštelėse turėtų būti 3 kontroliniai ėminiai: tirpiklio kontrolinis ėminys, bandomo pamatinio etalono didžiausios koncentracijos ėminys ir pamatinio etalono apytikrės EC₅₀ (agonizmas) arba IC₅₀ (antagonizmas) ėminys, kad jų rezultatus būtų galima palyginti su pirmosios mikrotitravimo plokštelės rezultatais, kuriuos sudaro visa pamatinio etalono atsako priklausomybės nuo koncentracijos kreivė. Pirmosios plokštelės ir kitų 5 plokštelių kontrolinių ėminių vidurkio santykis turėtų atitikti reikalavimus, pateiktus 3C lentelėje (agonizmas) arba 4C lentelėje (antagonizmas).

17. Apskaičiuojamas bandymų serijos kiekvienos mikrotitravimo plokštelės z faktorius (10). z faktorių reikėtų apskaičiuoti pagal didžiausiai ir mažiausiai pamatinio etalono koncentracijai gautą atsaką. Mikrotitravimo plokštelė laikoma tinkama, jei ji atitinka reikalavimus, nurodytus 3C lentelėje (agonizmas) arba 4C lentelėje (antagonizmas).
18. Pamatinio etalono atsako priklausomybės nuo koncentracijos kreivė turėtų būti sigmoidė. Pagal pamatinio etalono atskiestų tirpalų serijos atsaką gauta EC₅₀ arba IC₅₀ turėtų atitikti reikalavimus, nurodytus 3C lentelėje (agonizmas) arba 4C lentelėje (antagonizmas).
19. Į kiekvieną bandymų seriją turėtų būti įtrauktas teigiamas kontrolinis ėminys ir neigiamas kontrolinis ėminys. Apskaičiuota teigiamo ir neigiamo kontrolinių ėminių santykinė indukcija turėtų atitikti reikalavimus, nurodytus 3C lentelėje (agonizmas) arba 4C lentelėje (antagonizmas).
20. Atliekant visus matavimus, didžiausios koncentracijos pamatinio etalono indukcijos faktorius turėtų būti matuojamas dalijant vidutinę didžiausiąją 17β-estradiolio pamatinio etalono standartinę santykinio šviesos vieneto (RLU) vertę iš vidutinės tirpiklio kontrolinio ėminio RLU vertės. Šis indukcijos faktorius turėtų atitikti indukcijos pokyčiui kartais keliamus mažiausius reikalavimus, nurodytus 3C lentelėje (agonizmas) arba 4C lentelėje (antagonizmas).
21. Tik tos mikrotitravimo plokštelės, kurios atitinka visus pirmiau minėtus priimtumo kriterijus, laikomos tinkamomis ir gali būti naudojamos bandomųjų cheminių medžiagų atsakui įvertinti.
22. Priimtumo kriterijai taikomi parengiamiesiems ir galutiniams atskiriems bandymams.

1 lentelė. Agonistų CALUX biologinio tyrimo pamatinio etalono, teigiamo kontrolinio ėminio (PC) ir neigiamo kontrolinio ėminio (NC) koncentracijos vertės

	Medžiaga	CASRN	Bandymo koncentracijos intervalas (mol/l)
Pamatinis etalonas	17-β-estradiolis	50-28-2	$1,0 \times 10^{-13} - 1,0 \times 10^{-10}$

Teigiamas kontrolinis ėminys (PC)	17 α -metiltestosteronas	58-18-4	$3,0 \times 10^{-06}$
Neigiamas kontrolinis ėminys (NC)	kortikosteronas	50-22-6	$1,0 \times 10^{-08}$

2 lentelė. Antagonistų CALUX biologinio tyrimo pamatinio etalono, teigiamo kontrolinio ėminio (PC) ir neigiamo kontrolinio ėminio (NC) koncentracijos vertės

	Medžiaga	CASRN	Bandymo koncentracijos intervalas (mol/l)
Pamatinis etalonas	tamoksifenas	10540-29-1	$3,0 \times 10^{-09} - 1,0 \times 10^{-05}$
Teigiamas kontrolinis ėminys (PC)	4-hidroksitamoksifenas	68047-06-3	$1,0 \times 10^{-09}$
Neigiamas kontrolinis ėminys (NC)	resveratrolis	501-36-0	$1,0 \times 10^{-05}$

3 lentelė. Agonistų ER α CALUX biologinio tyrimo priimtumo kriterijai

A – atskiri ėminiai plokštelėje		Kriterijus
1	Trijų kartotinių šulinėlių (NC, PC, kiekvieno bandomosios cheminės medžiagos ir pamatinio etalono praskiesto tirpalo, išskyrus C0)	< 15 %
2	Trijų kartotinių šulinėlių (pamatinio etalono ir bandomosios cheminės medžiagos tirpiklio kontrolinių ėminių (C0, SC)) didžiausias SN, %	< 30 %
3	Didžiausias LDH nuotėkis, kaip citotoksiškumo matas.	< 120 %
B – vienos mikrotitravimo plokštelės		
4	Pamatinio etalono tirpiklio kontrolinio ėminio (C0; 1 plokštelė) ir bandomosios cheminės medžiagos tirpiklio kontrolinio ėminio (SC; nuo 2 iki x plokštelės) santykis	nuo 0,5 iki 2,0
5	Apytikrės EC ₅₀ ir didžiausios pamatinio etalono koncentracijos 1 plokštelėje bei apytikrės EC ₅₀ ir didžiausių pamatinio etalono koncentracijų nuo 2 iki x plokštelėse (C4, C8) santykis	nuo 0,70 iki 1,30
6	Kiekvienos plokštelės z faktorius	> 0,6
C – vienos analizės serijos (visos vienos serijos plokštelės)		
7	Pamatinio etalono sigmoidė	Taip (17- β -estradiolis)

8	Pamatinio etalono 17 β -estradiolio EC ₅₀ intervalas	$4 \times 10^{-12} - 4 \times 10^{-11}$ mol/l
9	Didžiausiai 17 β -estradiolio koncentracijai gautas mažiausias indukcijos pokytis kartais palyginti su pamatinio standartinio tirpiklio kontroliniu ėminiu.	5
10	PC santykinė indukcija (%)	> 30 %
11	NC santykinė indukcija (%)	< 10 %

Apyt. – apytikris; PC – teigiamas kontrolinis ėminys; NC – neigiamas kontrolinis ėminys; SC – bandomosios cheminės medžiagos tirpiklio kontrolinis ėminys; C0 – pamatinio standartinio tirpiklio kontrolinis ėminys; SN – standartinis nuokrypis; LDH – laktato dehidrogenazė.

4 lentelė. Antagonistų ER α CALUX biologinio tyrimo priimtumo kriterijai

A – atskiri ėminiai plokštelėje		Kriterijus
1	Trijų kartotinių šulinėlių (NC, PC, kiekvieno bandomosios cheminės medžiagos ir pamatinio etalono praskiesto tirpalo, tirpiklio kontrolinio ėminio (C0)) didžiausias SN, %	< 15 %
2	Trijų kartotinių šulinėlių (nešiklio kontrolinio ėminio (VC) ir didžiausios pamatinio etalono koncentracijos (C8)) didžiausias SN, %	< 30 %
3	Didžiausias LDH nuotėkis, kaip citotoksiškumo matas.	< 120 %
B – vienos mikrotitravimo plokštelės		
4	Pamatinio etalono tirpiklio kontrolinio ėminio (C0; 1 plokštelė) ir bandomosios cheminės medžiagos tirpiklio kontrolinio ėminio (SC; nuo 2 iki x plokštelės) santykis	nuo 0,70 iki 1,30
5	Didžiausių pamatinio etalono koncentracijų 1 plokštelėje apytikrės EC ₅₀ ir didžiausių pamatinio etalono koncentracijų nuo 2 iki x plokštelėse (C4) apytikrės EC ₅₀ santykis	nuo 0,70 iki 1,30
6	Didžiausių pamatinio etalono koncentracijų 1 plokštelėje ir didžiausių pamatinio etalono koncentracijų nuo 2 iki x plokštelėse (C8) santykis	nuo 0,50 iki 2,0
7	Kiekvienos plokštelės z faktorius	> 0,6
C – vienos analizės serijos (visos vienos serijos plokštelės)		
8	Pamatinio etalono sigmoidė	Taip (tamoksifenas)
9	Pamatinio etalono (tamoksifeno) EC ₅₀ intervalas	$1 \times 10^{-8} - 1 \times 10^{-7}$ mol/l

10	Mažiausias pamatinio standartinio tirpiklio kontrolinio ėminio indukcijos pokytis kartais palyginti su didžiausios tamoksifeno koncentracijos ėminiu.	2,5
11	PC santykinė indukcija (%)	< 70 %
12	NC santykinė indukcija (%)	> 85 %

Apyt. – apytikris; PC – teigiamas kontrolinis ėminys; NC – neigiamas kontrolinis ėminys; VC – nešiklio kontrolinis ėminys (tirpiklio kontrolinis ėminys, nesant pastovios agonisto pamatinio etalono koncentracijos); SC – bandomosios cheminės medžiagos tirpiklio kontrolinis ėminys. C0 – pamatinio standartinio tirpiklio kontrolinis ėminys. SN – standartinis nuokrypis; LDH – laktato dehidrogenazė.

Tirpiklio ir (arba) nešiklio kontrolinis ėminys, pamatiniai etalonai, teigiami kontroliniai ėminiai, neigiami kontroliniai ėminiai

23. Atliekant parengiamąjį atskirą bandymą ir galutinius atskirus bandymus, reikėtų naudoti tą patį tirpiklio arba nešiklio kontrolinį ėminį, pamatinių etalonų ėminius, teigiamus kontrolinius ėminius ir neigiamus kontrolinius ėminius. Be to, pamatinių etalonų, teigiamų kontrolinių ėminių ir neigiamų kontrolinių ėminių koncentracija turėtų būti tokia pati.

Tirpiklio kontrolinis ėminys

24. Kaip tirpiklio kontrolinis ėminys turėtų būti bandomas bandomųjų cheminių medžiagų tirpiklis. Atliekant ER α CALUX biologinio tyrimo patvirtinimą kaip nešiklis buvo naudojamas dimetilsulfoksidas (DMSO, 1 % (V/V); CASRN 67-68-5). Jei naudojamas kitas nei DMSO tirpiklis, visi pamatiniai etalonai, kontroliniai ėminiai ir bandomosios cheminės medžiagos turėtų būti bandomos naudojant tą patį nešiklį. Atkreipiamas dėmesys į tai, kad antagonistams tirti skirtas tirpiklio kontrolinis ėminys turi pastovios koncentracijos agonisto pamatinio etalono 17 β -estradiolio (maždaug EC₅₀ koncentracijos). Reikėtų paruošti ir bandyti nešiklio kontrolinį ėminį, kad būtų galima bandyti antagonistų tyrimams naudojamą tirpiklį.

Nešiklio kontrolinis ėminys (antagonizmas)

25. Bandant antagonistus, bandymo terpė papildoma pastovios koncentracijos agonisto pamatiniu etalonu 17 β -estradioliu (maždaug EC₅₀ koncentracijos). Norint bandyti dėl antagonizmo bandomų cheminių medžiagų tirpiklį, reikėtų paruošti bandymo terpę be pastovios koncentracijos agonistų pamatinio etalono 17 β -estradiolio. Šis kontrolinis ėminys pažymimas kaip nešiklio kontrolinis ėminys. Atliekant ER α CALUX biologinio tyrimo patvirtinimą kaip nešiklis buvo naudojamas dimetilsulfoksidas (DMSO, 1 % (V/V); CASRN 67-68-5). Jei naudojamas kitas nei DMSO tirpiklis, visi pamatiniai etalonai, kontroliniai ėminiai ir bandomosios cheminės medžiagos turėtų būti bandomos naudojant tą patį nešiklį.

Pamatiniai etalonai

26. Agonisto pamatinis etalonas yra 17- β -estradiolis (1 lentelė). Pamatinius etalonus sudaro aštuonių koncentracijos verčių vienu santykiu atskiesti 17 β -estradiolio tirpalai ($1,0 \times 10^{-13}$, $3,0 \times 10^{-13}$, $1,0 \times 10^{-12}$, $3,0 \times 10^{-12}$, $6,0 \times 10^{-12}$, $1,0 \times 10^{-11}$, $3,0 \times 10^{-11}$, $1,0 \times 10^{-10}$ mol/l).
27. Agonisto pamatinis etalonas yra tamoksifenas (2 lentelė). Pamatinius etalonus sudaro aštuonių koncentracijos verčių vienu santykiu atskiesti tamoksifeno tirpalai ($3,0 \times 10^{-09}$, $1,0 \times 10^{-08}$, $3,0 \times 10^{-08}$, $1,0 \times 10^{-07}$, $3,0 \times 10^{-07}$, $1,0 \times 10^{-06}$, $3,0 \times 10^{-06}$, $1,0 \times 10^{-05}$ mol/l). Kiekvienos koncentracijos antagonistų pamatinis etalonas inkubuojamas kartu su pastovios koncentracijos agonistų pamatiniu etalonu 17 β -estradioliu ($3,0 \times 10^{-12}$ mol/l).

Teigiamas kontrolinis ėminys

28. Agonistų tyrimų teigiama kontrolinė medžiaga yra 17 α -metiltestosteronas (1 lentelė).

29. Antagonistų tyrimų teigiama kontrolinė medžiaga yra 4-hidroksitamoksifenas (2 lentelė). Antagonistų teigiamas kontrolinis ėminys inkubuojamas kartu su pastovios koncentracijos agonistų pamatiniu etalonu 17β -estradioliu ($3,0 \times 10^{-12}$ mol/l).

Neigiamas kontrolinis ėminys

30. Agonistų tyrimų neigiama kontrolinė medžiaga yra kortikosteronas (1 lentelė).
31. Antagonistų tyrimų neigiama kontrolinė medžiaga yra resveratrolis (2 lentelė). Antagonistų neigiamas kontrolinis ėminys inkubuojamas kartu su pastovios koncentracijos agonistų pamatiniu etalonu 17β -estradioliu ($3,0 \times 10^{-12}$ mol/l).

Laboratorijos kvalifikacijos įrodymas (žr. šio bandymo metodo *ER TA BANDYMO KOMPONENTAI* 14 pastraipą ir 3 bei 4 lenteles).

Nešiklis

32. Bandomųjų cheminių medžiagų tirpiklis turėtų visiškai soliubilizuoti bandomąją cheminę medžiagą ir būti maišus su ląstelių terpe. Tinkami tirpikliai yra DMSO, vanduo ir etanolis (nuo 95 % iki 100 % grynumo). Jei kaip tirpiklis naudojamas DMSO, jo didžiausia koncentracija inkubavimo metu neturėtų būti didesnė kaip 1 % (V/V). Prieš naudojimą tirpiklis turėtų būti patikrintas dėl citotoksiškumo ir trukdžių atliekant bandymus nebuvimo.

Pamatinių etalonų, teigiamų kontrolinių ėminių, neigiamų kontrolinių ėminių ir bandomųjų cheminių medžiagų ruošimas

33. Pamatiniai etalonai, teigiami kontroliniai ėminiai, neigiami kontroliniai ėminiai ir bandomosios cheminės medžiagos ištirpinamos 100 % DMSO (arba reikiamame tirpiklyje). Toliau ruošiami atitinkamų koncentracijų (vienu santykiu atskiesti) tirpalai tame pačiame tirpiklyje. Reikėtų palaukti, kol visos medžiagos prieš jas tirpinant pasiekia kambario temperatūrą. Tik ką paruoštuose pamatinių etalonų, teigiamų kontrolinių medžiagų, neigiamų kontrolinių medžiagų ir bandomųjų cheminių medžiagų tirpaluose neturėtų būti pastebimų nuosėdų arba drumstumo. Galima ruošti didelius pamatinių etalonų ir kontrolinių medžiagų pradinį tirpalų tūrį. Bandomųjų cheminių medžiagų pradiniai tirpalai turėtų būti ruošiami iš naujo prieš kiekvieną bandymą. Galutinius pamatinių etalonų, teigiamų kontrolinių medžiagų, neigiamų kontrolinių medžiagų ir bandomųjų cheminių medžiagų atskiestus tirpalus reikėtų ruošti iš naujo prieš kiekvieną bandymą ir panaudoti per 24 h nuo paruošimo.

Tirpumas, citotoksiškumas ir intervalo nustatymas

34. Atliekant parengiamąjį atskirą bandymą, nustatomas bandomųjų cheminių medžiagų tirpumas pasirinktame tirpiklyje. Ruošiamas didžiausios 0,1 mol/l koncentracijos pradinis tirpalas. Jei esant šiai koncentracijai kyla tirpumo problemų, reikėtų ruošti mažesnės koncentracijos tirpalą tol, kol bandomosios cheminės medžiagos yra visiškai soliubilizuotos. Atliekant parengiamąjį atskirą bandymą, bandomi vienu 1:10 santykiu atskiesti bandomosios

cheminės medžiagos tirpalai. Atliekant agonistų arba antagonistų bandymą didžiausia bandymo koncentracija yra 1 mol/l. Po parengiamojo bandymo gaunamas patikslintas reikiamas koncentracijos intervalas, kuris turėtų būti naudojamas atliekant galutinius atskirus bandymus. Galutiniams bandymams naudojami 1x, 3x, 10x, 30x, 100x, 300x, 1000x ir 3000x atskiesti tirpalai.

35. Citotoksiškumo bandymas įtraukiamas į agonistų ir antagonistų bandymo protokolą (11). Citotoksiškumo bandymas įtraukiamas į parengiamąjį atskirą bandymą ir į galutinius atskirus bandymus. Bandomosiomis cheminėmis medžiagomis apdorotų ląstelių citotoksiškumo vertinimo metodas atliekant ERα CALUX biologinio tyrimo patvirtinimą buvo laktato dehidrogenazės (LDH) nuotėkio bandymas kartu su kokybine ląstelių apžiūra (žr. 4.1 priedėlį). Tačiau citotoksiškumui nustatyti gali būti taikomi kiti kiekybiniai metodai (pvz., tetrazoliniu pagrįstas kolorimetrinis (MTT) bandymas arba CALUX citotoksiškumo biologinis tyrimas). Apskritai, bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant ląstelių gyvybingumas sumažėja daugiau kaip 20 %, laikoma citotoksiška ir todėl negali būti naudojama duomenims įvertinti. Atliekant LDH nuotėkio bandymą, bandomosios cheminės medžiagos koncentracija laikoma citotoksiška, kai LDH nuotėkio procentinė dalis yra didesnė kaip 120 %.

Apdorojimas bandomąja chemine medžiaga ir išdėstymo bandymo plokštelėje schema

36. Iš kolboje auginamų susiliejusių ląstelių po apdorojimo tripsinu ruošama nauja 1×10^5 ląstelių/ml suspensija estrogenų neturinčioje bandymo terpėje. Po 100 μl naujos suspensijos ląstelių sėjama į 96 šulinėlių mikrotitravimo plokštelės vidinius šulinėlius. Į išorinius šulinėlius įpilama 200 μl fiziologinio tirpalo fosfatiname buferiniame tirpale (PBS) (žr. 1 ir 2 paveikslus). Pasėtos ląstelės inkubuojamos 24 h CO₂ inkubatoriuje (5 % CO₂, 37 °C, 100 % drėgmė).
37. Po parengiamojo inkubavimo plokštelės apžiūros citotoksiškumui (žr. 4.1 priedėlį), užkrėtimui ir susiliejimui nustatyti. Bandymui naudojamos tik tos plokštelės, kuriose vizualiai nesimato toksiškumo, užkrėtimo ir kurių susiliejimas yra ne mažesnis kaip 85 %. Vidinių šulinėlių terpė kruopščiai pašalinama ir pakeičiama 200 μl estrogenų neturinčios bandymo terpės su reikiamos koncentracijos pamatinių etalonų, bandomųjų cheminių medžiagų, teigiamų kontrolinių ėminių, neigiamų kontrolinių ėminių ir tirpiklio kontrolinių ėminių atskiestais tirpalais (5 lentelė – agonistų tyrimų; 6 lentelė – antagonistų tyrimų). Visi pamatiniai etalonai, bandomosios cheminės medžiagos, teigiami kontroliniai ėminiai, neigiami kontroliniai ėminiai ir tirpiklio kontroliniai ėminiai bandomi imant tris kartotinius ėminius. 1 paveiksle pateikta agonistų bandymo plokštelės schema. 2 paveiksle pateikta antagonistų bandymo plokštelės schema. Parengiamojo bandymo ir galutinio bandymo plokštelės schema yra identiška. Bandant antagonistus, visi vidiniai šulinėliai, išskyrus nešiklio kontrolinio ėminio šulinėlius (VC), taip pat turi pastovios koncentracijos agonisto

pamatinio etalono 17β -estradiolio ($3,0 \times 10^{-12}$ mol/l). Atkreipiamas dėmesys į tai, kad pamatinius etalonus C8 ir C4 reikėtų dėti į kiekvieną TC plokštelę.

38. Po ląstelių apdorojimo visomis cheminėmis medžiagomis, 96 šulinėlių mikrotitravimo plokštes reikėtų inkubuoti dar 24 h CO₂ inkubatoriuje (5 % CO₂, 37 °C, 100 % drėgmė).

1 paveikslas.96 šulinėlių mikrotitravimo plokštelių schema atliekant parengiamąjį bandymą ir agonistų poveikio vertinimą

1 plokštelė

	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-	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
F		SC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
G		SC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
H												

Kitos plokštelės

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		SC	TC2-	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		SC	TC2-	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		SC	TCx-	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC ₅₀)	
F		SC	TCx-	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC ₅₀)	
G		SC	TCx-	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC ₅₀)	
H												

C0 – pamatinis standartinis tirpiklis;

C(1–8) – pamatinių standartinių tirpalų koncentracijos (1–8, nuo mažiausios iki didžiausios koncentracijos).

PC – teigiamas kontrolinis ėminys;

NC – neigiamas kontrolinis ėminys;

TCx-(1–8) – bandomosios cheminės medžiagos tirpalų koncentracijos (1–8, nuo mažiausios iki didžiausios koncentracijos), atliekant parengiamąjį atskirą bandymą ir vertinant bandomosios cheminės medžiagos x agonistinį poveikį.

SC – bandomosios cheminės medžiagos tirpiklio kontrolinis ėminys (optimaliai turėtų būti tas pats tirpiklis kaip C0, bet galbūt iš kitos partijos).

Pilkos spalvos langeliai – išoriniai šulinėliai, pripildyti 200 µl PBS.

2 paveikslas.96 šulinėlių mikrotitravimo plokštelių schema atliekant antagonistų parengiamąjį bandymą ir antagonistų poveikio vertinimą

1 plokštelė

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	

E	NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
F	NK	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
G	NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
H											

Kitos plokštelės

	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 – pamatinis standartinis tirpiklis;

C(1–8) – pamatinių standartinių tirpalų koncentracijos (1–8, nuo mažiausios iki didžiausios koncentracijos).

NC – neigiamas kontrolinis ėminys;

PC – teigiamas kontrolinis ėminys;

TCx-(1–8) – bandomosios cheminės medžiagos tirpalų koncentracijos (1–8, nuo mažiausios iki didžiausios koncentracijos), atliekant parengiamąjį atskirą bandymą ir vertinant bandomosios cheminės medžiagos x agonistinį poveikį.

SC – bandomosios cheminės medžiagos tirpiklio kontrolinis ėminys (optimaliai turėtų būti tas pats tirpiklis kaip C0, bet galbūt iš kitos partijos).

VC – nešiklio kontrolinis ėminys (tirpiklio kontrolinis ėminys, nesant pastovios agonisto pamatinio etalono, 17β-estradiolio koncentracijos);

Pilkos spalvos langeliai – išoriniai šulinėliai, pripildyti 200 μl PBS.

Pastaba. Visi vidiniai šulinėliai, išskyrus nešiklio kontrolinio ėminio šulinėlius (VC), taip pat turi pastovios koncentracijos agonisto pamatinio etalono 17β-estradiolio ($3,0 \times 10^{-12}$ mol/l).

Liuminescencijos matavimas

39. Liuminescencijos matavimas išsamiai aprašytas agonistų ir antagonistų bandymo protokole (10). Terpė iš šulinėlių turėtų būti pašalinta ir kitas inkubavimo 24 h atliekama ląstelių lizė, kad atsidadytų ląstelių membrana ir būtų galima matuoti liuciferazės aktyvumą.

40. Liuminescencijos matavimo procedūrai reikia turėti liuminometrą su 2 injektoriais. Liuciferazės reakcija prasideda įpurškiant liuciferino substrato. Reakcija sustabdoma pridedant 0,2 mol/l NaOH. Reakcija sustabdoma, kad būtų išvengta liuminescencijos pernešimo iš vieno šulinėlio į kitą.

41. Kiekvieno šulinėlio skleidžiama šviesa išreiškiama santykiniais šviesos vienetais (RLU) vienam šulinėliui.

Parengiamasis atskiras bandymas

42. Parengiamosios analizės rezultatai naudojami bandomųjų cheminių medžiagų patikslintam galutinių bandymų koncentracijos intervalui nustatyti. Parengiamosios analizės rezultatų

įvertinimas ir bandomųjų cheminių medžiagų patikslinto galutinių bandymų koncentracijos intervalo nustatymas nuodugniai aprašytas agonistų ir antagonistų bandymo protokole (10). Toliau pateikiama trumpa agonistų ir antagonistų bandymams naudojamų bandomųjų cheminių medžiagų koncentracijos intervalo nustatymo procedūrų santrauka. 5 ir 6 lentelėje pateikti nurodymai dėl skiedimo vienu santykiu schemas.

Koncentracijų parinkimas agonistų poveikiui vertinti

43. Atliekant parengiamąjį atskirą bandymą, bandomąsias chemines medžiagas reikėtų bandyti naudojant vienu santykiu atskiestus tirpalus, kaip nurodyta 5 lentelėje (agonizmas) ir 6 lentelėje (antagonizmas). Visos koncentracijos turėtų būti bandomos naudojant tris kartotinius šulinėlius pagal plokštelės schemą, kaip nurodyta 1 paveiksle (agonizmas) arba 2 paveiksle (antagonizmas).
44. Tik tie analizės rezultatai, kurie atitinka priimtino kriterijus (3 lentelė), laikomi tinkamais ir gali būti naudojami bandomųjų cheminių medžiagų atsakui įvertinti. Jei viena arba daugiau analizės serijos mikrotitravimo plokštelių neatitinka priimtino kriterijų, atitinkamas mikrotitravimo plokštelės reikėtų analizuoti iš naujo. Jei pirmoji plokštelė, kurią sudaro visa pamatinio etalono praskiestų tirpalų serija, neatitinka priimtino kriterijų, visa bandymų serija (6 plokštelės) reikia analizuoti iš naujo.
45. Reikėtų koreguoti pradinius bandomųjų cheminių medžiagų koncentracijos intervalus ir pakartoti parengiamąjį atskirą bandymą, jei:
 - stebimas citotoksiškumas. Parengiamojo bandymo procedūrą reikėtų pakartoti naudojant citotoksiškumo nesukeliantį bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją;
 - atliekant bandomosios cheminės medžiagos parengiamąjį bandymą, ne visuomet gaunama visa atsako priklausomybės nuo dozės kreivė, nes esant bandomai koncentracijai sukelia didžiausia indukcija. Parengiamąjį atskirą bandymą reikėtų pakartoti naudojant mažesnės koncentracijos bandomąją cheminę medžiagą.
46. Kai nustatoma tinkama atsako nuo dozės priklausomybė, reikėtų pasirinkti (mažiausią) citotoksiškumo nesukeliantį koncentraciją, kuriai stebima didžiausia indukcija. Didžiausia bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuri turi būti naudojama atliekant galutinius bandymus, turėtų būti 3 kartus didesnė nei pasirinkta koncentracija.
47. Visa patikslinta bandomosios cheminės medžiagos atskiestų tirpalų serija turėtų būti paruošta atliekant 5 lentelėje nurodytus skiedimo veiksmus, pradedant pirmiau nustatyta didžiausia koncentracija.
48. Jokio agonistinio poveikio nesukelianti bandomoji cheminė medžiaga turėtų būti bandoma atliekant galutinį bandymą, pradedant nuo citotoksiškumo nesukeliantios didžiausios koncentracijos, nustatytos atliekant parengiamąjį bandymą.

Koncentracijų parinkimas antagonistų poveikiui vertinti

49. Tik tie analizės rezultatai, kurie atitinka priimtino kriterijus (4 lentelė), laikomi tinkamais ir gali būti naudojami bandomųjų cheminių medžiagų atsakui įvertinti. Jei viena arba daugiau analizės serijos mikrotitravimo plokštelių neatitinka priimtino kriterijų, atitinkamas mikrotitravimo plokštes reikėtų analizuoti iš naujo. Jei pirmoji plokštelė, kurią sudaro visa pamatinio etalono praskiestų tirpalų serija, neatitinka priimtino kriterijų, visa bandymų seriją (6 plokštelės) reikia analizuoti iš naujo.
50. Reikėtų koreguoti pradinis bandomųjų cheminių medžiagų koncentracijos intervalus ir pakartoti parengiamąjį atskirą bandymą, jei:
- stebimas citotoksiškumas. Parengiamojo bandymo procedūrą reikėtų pakartoti naudojant citotoksiškumo nesukeliantį bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją;
 - atliekant bandomosios cheminės medžiagos parengiamąjį bandymą, ne visuomet gaunama visa atsako priklausomybės nuo dozės kreivė, nes esant bandomai koncentracijai sukeliamas didžiausias slopinimas. Parengiamąjį atskirą bandymą reikėtų pakartoti naudojant mažesnės koncentracijos bandomąją cheminę medžiagą.
51. Kai nustatoma tinkama atsako nuo dozės priklausomybė, reikėtų pasirinkti (mažiausią) citotoksiškumo nesukeliantį koncentraciją, kuriai stebimas didžiausias slopinimas. Didžiausia bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuri turi būti naudojama atliekant galutinius bandymus, turėtų būti 3 kartus didesnė nei pasirinkta koncentracija.
52. Visa patikslinta bandomosios cheminės medžiagos atskiestų tirpalų serija turėtų būti paruošta atliekant 6 lentelėje nurodytus skiedimo veiksmus, pradedant pirmiau nustatyta didžiausia koncentracija.
53. Jokio antagonistinio poveikio nesukelianti bandomoji cheminė medžiaga turėtų būti bandoma atliekant galutinį bandymą, pradedant nuo citotoksiškumo nesukeliantios didžiausios koncentracijos, nustatytos atliekant parengiamąjį bandymą.

Galutiniai atskiri bandymai

54. Po patikslintų koncentracijos intervalų nustatymo, reikėtų atlikti galutinį bandomųjų cheminių medžiagų bandymą, naudojant atskiestų tirpalų serijas, nurodytas 5 lentelėje (agonizmas) ir 6 lentelėje (antagonizmas). Visos koncentracijos turėtų būti bandomos naudojant tris kartotinius šulinėlius pagal plokštelės schemą, kaip parodyta 1 paveiksle (agonizmas) arba 2 paveiksle (antagonizmas).
55. Tik tie analizės rezultatai, kurie atitinka priimtino kriterijus (3 ir 4 lentelės), laikomi tinkamais ir gali būti naudojami bandomųjų cheminių medžiagų atsakui įvertinti. Jei viena arba daugiau analizės serijos mikrotitravimo plokštelių neatitinka priimtino kriterijų, atitinkamas mikrotitravimo plokštes reikėtų analizuoti iš naujo. Jei pirmoji plokštelė, kurią

sudaro visa pamatinio etalono praskiestų tirpalų serija, neatitinka priimtino kriterijų, visa bandymų seriją (6 plokštelės) reikia analizuoti iš naujo.

5 lentelė. Pamatinų etalonų, kontrolinių ėminių ir bandomųjų cheminių medžiagų, naudojamų atliekant agonistų bandymą, koncentracija ir skiedimas

Pamatinis etalonas – 17β-estradiolis konc. (mol/l)		TCx – parengiamasis atskiras bandymas skiedimas		TCx - galutinis atskiras bandymas skiedimas		Kontroliniai ėminiai konc. (mol/l)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	PC	$3,0 \times 10^{-06}$
C1	$1,0 \times 10^{-13}$	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	NC	$1,0 \times 10^{-08}$
C2	$3,0 \times 10^{-13}$	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	$1,0 \times 10^{-12}$	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	$3,0 \times 10^{-12}$	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x		
C5	$6,0 \times 10^{-12}$	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x		
C6	$1,0 \times 10^{-11}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x		
C7	$3,0 \times 10^{-11}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x		
C8	$1,0 \times 10^{-10}$						

TCx – bandomoji cheminė medžiaga x;

PC – teigiama kontrolinė medžiaga (17α-metiltestosteronas);

NC – neigiama kontrolinė medžiaga (kortikosteronas);

C0 – pamatinio standartinio tirpiklio kontrolinis ėminys;

SC – bandomosios cheminės medžiagos tirpiklio kontrolinis ėminys.

6 lentelė. Pamatinų etalonų, kontrolinių ėminių ir bandomųjų cheminių medžiagų, naudojamų atliekant antagonistų bandymą, koncentracija ir skiedimas

Pamatinis etalonas – tamoksifenas konc. (mol/l)		TCx – parengiamasis atskiras bandymas skiedimas		TCx - galutinis atskiras bandymas skiedimas		Kontroliniai ėminiai konc. (mol/l)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	PC	$1,0 \times 10^{-09}$
C1	$3,0 \times 10^{-09}$	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	NC	$1,0 \times 10^{-05}$
C2	$1,0 \times 10^{-08}$	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	$3,0 \times 10^{-08}$	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	$1,0 \times 10^{-07}$	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x		
C5	$3,0 \times 10^{-07}$	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x	Papildomai pridėtas agonistas konc. (mol/l)	
C6	$1,0 \times 10^{-06}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x		
C7	$3,0 \times 10^{-06}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x		
C8	$1,0 \times 10^{-05}$					17β- estradiolis	$3,0 \times 10^{-12}$

TCx – bandomoji cheminė medžiaga x;

PC – teigiamas kontrolinis ėminys (4-hidroksitamoksifenas);

NC – neigiamas kontrolinis ėminys (resveratrolis);

C0 – pamatinio standartinio tirpiklio kontrolinis ėminys;

SC – bandomosios cheminės medžiagos tirpiklio kontrolinis ėminys;

VC – nešiklio kontrolinis ėminys (neturi pastovios koncentracijos agonisto pamatinio etalono 17β -estradiolio ($3,0 \times 10^{-12}$ mol/l)).

Duomenų rinkimas ir duomenų analizė

56. Po parengiamojo ir galutinių atskirų bandymų turėtų būti nustatyta bandomosios cheminės medžiagos agonistinių bandymų EC_{10} , EC_{50} , PC_{10} , PC_{50} ir didžiausioji indukcija (TCx_{max}). Reikėtų apskaičiuoti agonistinių bandymų IC_{20} , IC_{50} , PC_{80} , PC_{50} ir mažiausiąją indukciją (TCx_{min}). Šių parametrų grafinis vaizdas pateiktas 3 paveiksle (agonizmas) ir 4 paveiksle (antagonizmas). Reikiami parametrai apskaičiuojami pagal kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos santykinę indukciją (pamatinio etalono didžiausios indukcijos atžvilgiu (=100 %)). Duomenis reikėtų įvertinti naudojant netiesinę regresiją (kintamas krypties koeficientas, 4 parametrai) pagal tokią lygtį:

$$Y = \text{apačia} + \frac{(\text{viršus} - \text{apačia})}{(1 + 10^{((\lg EC_{50} - X) * \text{Hillo krypties koef.}))}}$$

Čia:

X – dozės arba koncentracijos logaritmas;

Y – atsakas (santykinė indukcija (%));

Viršus – didžiausia indukcija (%);

Apačia – mažiausia indukcija (%);

LogEC_{50} – koncentracijos, kuriai stebima 50 % didžiausiojo atsako, logaritmas;

HillSlope – Hillo krypties koeficientas.

57. Neapdoroti liuminometro duomenys, išreikšti santykiniais šviesos vienetais (RLU), turėtų būti perkelti į parengiamojo ir galutinio atskirų bandymų duomenų analizės elektroninę lentelę. Neapdoroti duomenys turėtų atitikti priimtumo kriterijus, nurodytus 3A ir 3B lentelėse (agonizmas) arba 4A ir 4B lentelėse (antagonizmas). Jei neapdoroti duomenys atitinka priimtumo kriterijus, atliekami tokie veiksmai, kad būtų nustatyti reikiami parametrai:

Agonizmas

- Iš visų pamatinių etalonų neapdorotų analizės duomenų verčių atimama pamatinio standartinio tirpiklio kontrolinio ėminio vidutinė RLU vertė.
- Iš visų bandomųjų cheminių medžiagų neapdorotų analizės duomenų verčių atimama bandomosios cheminės medžiagos tirpiklio kontrolinio ėminio vidutinė RLU vertė.
- Apskaičiuojama kiekvienos pamatinio etalono koncentracijos santykinė indukcija. Didžiausios pamatinio etalono koncentracijos indukcija prilyginama 100 %.

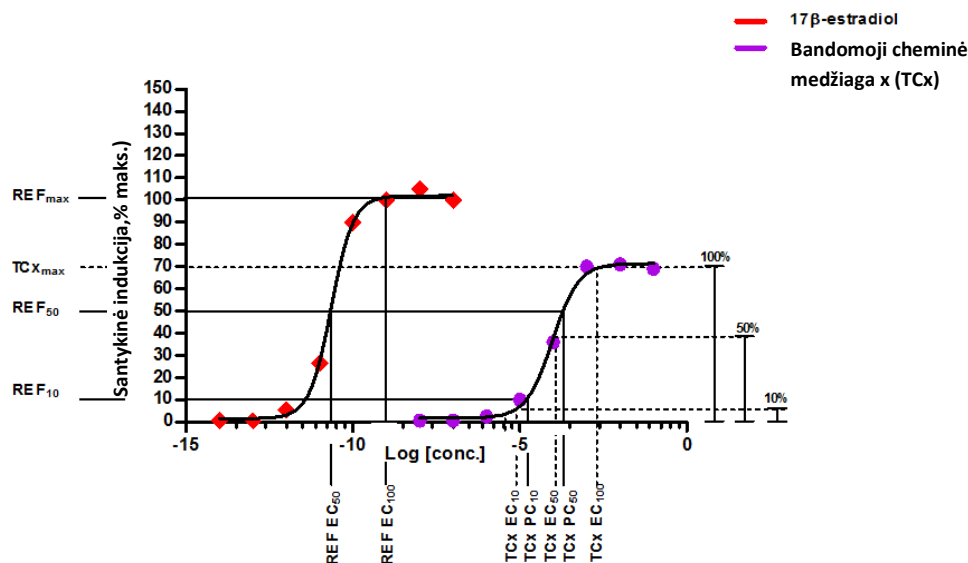
- Apskaičiuojama bandomosios cheminės medžiagos kiekvienos koncentracijos santykinė indukcija palyginti su didžiausios pamatinio etalono koncentracijos indukcija, lygia 100 %.
- Analizės rezultatai įvertinami atliekant netiesinę regresiją (kintamas krypties koeficientas, 4 parametrai).
- Nustatoma pamatinio etalono EC_{50} ir EC_{10} .
- Nustatoma bandomųjų cheminių medžiagų EC_{50} ir EC_{10} .
- Nustatoma didžiausia santykinė bandomosios cheminės medžiagos indukcija (TC_{max}).
- Nustatoma bandomųjų cheminių medžiagų PC_{10} ir PC_{50} .

Ne visuomet galima gauti visą bandomųjų cheminių medžiagų atsako priklausomybės nuo dozės kreivę, pvz., dėl citotoksiškumo arba tirpumo problemų. Taigi EC_{50} , EC_{10} ir PC_{50} negali būti nustatyti. Tokiu atveju galima nustatyti tik PC_{10} ir TC_{max} .

Antagonizmas

- Iš visų pamatinių etalonų neapdorotų analizės duomenų verčių atimama didžiausios pamatinio etalono koncentracijos vidutinė RLU vertė.
- Iš visų bandomųjų cheminių medžiagų neapdorotų analizės duomenų verčių atimama didžiausios pamatinio etalono koncentracijos vidutinė RLU vertė.
- Apskaičiuojama kiekvienos pamatinio etalono koncentracijos santykinė indukcija. Mažiausios pamatinio etalono koncentracijos indukcija prilyginama 100 %.
- Apskaičiuojama bandomosios cheminės medžiagos kiekvienos koncentracijos santykinė indukcija palyginti su mažiausios pamatinio etalono koncentracijos indukcija, lygia 100 %.
- Analizės rezultatai įvertinami atliekant netiesinę regresiją (kintamas krypties koeficientas, 4 parametrai).
- Nustatoma pamatinio etalono IC_{50} ir IC_{20} .
- Nustatoma bandomųjų cheminių medžiagų IC_{50} ir IC_{20} .
- Nustatoma mažiausia santykinė bandomosios cheminės medžiagos indukcija (TC_{min}).
- Nustatoma bandomųjų cheminių medžiagų PC_{80} ir PC_{50} .

3 paveikslas. Atliekant agonistų bandymą nustatytų parametrų apžvalga



EC₁₀ – medžiagos koncentracija, kuriai esant stebima 10 % jos didžiausio atsako;

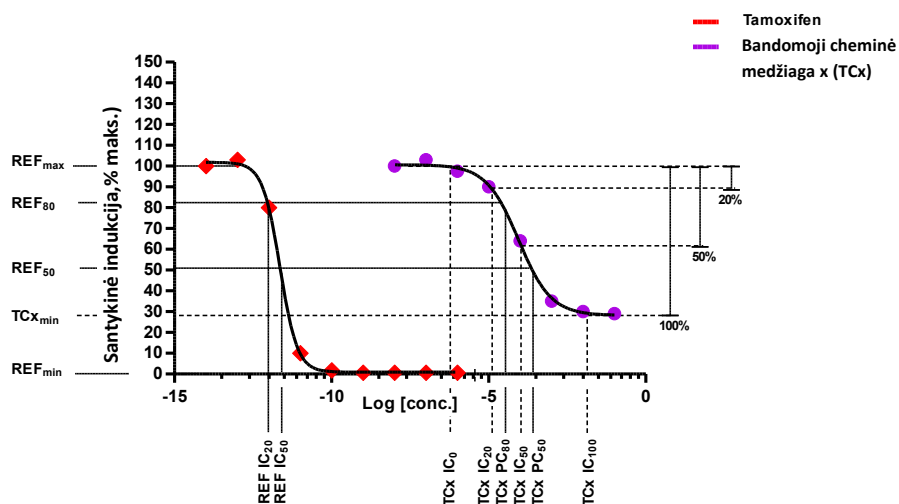
EC₅₀ – medžiagos koncentracija, kuriai esant stebima 50 % jos didžiausio atsako;

PC₁₀ – bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant jos atsakas yra lygus pamatinio etalono EC₁₀;

PC₅₀ – bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant jos atsakas yra lygus pamatinio etalono EC₅₀;

TCX_{max} – didžiausia santykinė bandomosios cheminės medžiagos indukcija.

4 paveikslas. Atliekant antagonistų bandymą nustatytų parametrų apžvalga



IC₂₀ – medžiagos koncentracija, kuriai esant stebima 80 % jos didžiausio atsako (20 % slopinimas);

IC₅₀ – medžiagos koncentracija, kuriai esant stebima 50 % jos didžiausio atsako (50 % slopinimas);

PC₈₀ – bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant jos atsakas yra lygus pamatinio

etalono IC_{20} ;

PC_{50} – bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant jos atsakas yra lygus pamatinio etalono IC_{50} ;

TC_{min} – mažiausia santykinė bandomosios cheminės medžiagos indukcija.

Ne visuomet galima gauti visą bandomųjų cheminių medžiagų atsako priklausomybės nuo dozės kreivę, pvz., dėl citotoksiškumo arba tirpumo problemų. Taigi IC_{50} , IC_{20} ir PC_{50} negali būti nustatytos. Tokiu atveju galima nustatyti tik PC_{20} ir TC_{min} .

58. Rezultatai turėtų būti gauti pagal du (arba tris) nepriklausomus atskirus bandymus. Jie dviejų atskirų bandymų rezultatai yra palyginami ir todėl atkuriami, trečiasis atskiras bandymas nėra būtinas. Rezultatai būtų priimtini, jei jie:

- atitiktų priimtino kriterijus (žr. *Priimtino kriterijų* 14–22 pastraipas),
- būtų atkuriami.

Duomenų aiškinimo kriterijai

59. Aiškinant duomenis ir priimant sprendimą, ar bandomąją cheminę medžiagą reikėtų laikyti teigiama ar neigiama, taikomi tokie kriterijai:

Agonizmas

Atliekant atskirą galutinį bandymą, bandomoji cheminė medžiaga laikoma **teigiama**, jei:

- 1 TC_{max} yra lygi arba didesnė kaip 10 % pamatinio etalono didžiausio atsako (REF_{10}).
- 2 Ne mažiau kaip 2 nuoseklos bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos yra lygios arba didesnės kaip REF_{10} .

Atliekant atskirą galutinį bandymą, bandomoji cheminė medžiaga laikoma **neigiama**, jei:

- 1 TC_{max} nėra didesnė kaip 10 % pamatinio etalono didžiausio atsako (REF_{10}).
- 2 Mažiau kaip 2 nuoseklos bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos yra lygios arba didesnės kaip REF_{10} .

Antagonizmas

Atliekant atskirą galutinį bandymą, bandomoji cheminė medžiaga laikoma **teigiama**, jei:

- 1 TC_{min} yra lygi arba mažesnė kaip 80 % pamatinio etalono didžiausio atsako ($REF_{80} = 20\%$ slopinimo).
- 2 Ne mažiau kaip 2 nuoseklos bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos yra lygios arba mažesnės kaip REF_{80} .

Atliekant atskirą galutinį bandymą, bandomoji cheminė medžiaga laikoma **neigiama**, jei:

- 1 TC_{min} yra didesnė kaip 80 % pamatinio etalono didžiausio atsako ($REF_{80} = 20 \%$ slopinimo).
 - 2 Mažiau kaip 2 nuoseklios bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos yra lygios arba mažesnės kaip REF_{80} .
60. Ataskaitoje reikėtų pateikti poveikio dydį (agonizmas: TC_{max} ; antagonizmas: TC_{min}) ir koncentraciją, kuriai esant šis poveikis pasireiškia (agonizmas: EC_{10} , EC_{50} , PC_{10} , PC_{50} ; antagonizmas: IC_{20} , IC_{50} , PC_{80} , PC_{50}), kad būtų galima apibūdinti bandomosios cheminės medžiagos teigiamo atsako veiksmingumą.

BANDYMO ATASKAITA

61. Žr. *ER TA BANDYMO KOMPONENTAI* 20 pastraipą.

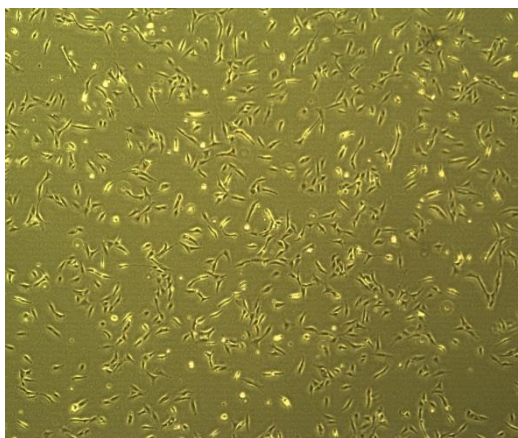
LITERATŪRA

- (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). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris
- (2) Sonneveld E, Jansen HJ, Riteco JA, Brouwer A, van der Burg B. (2005). Development of androgen- and estrogen-responsive bioassays, members of a panel of human cell line-based highly selective steroid-responsive bioassays. *Toxicol Sci.* 83(1), 136-148.
- (3) Quaedackers ME, van den Brink CE, Wissink S, Schreurs RHMM, Gustafsson JA, van der Saag PT, 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

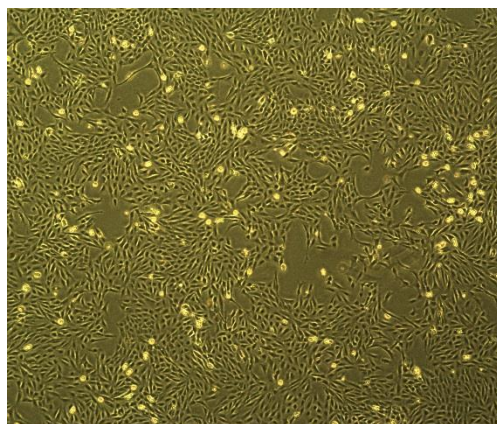
contamination in cell cultures by enzymatic detection of polymerase chain reaction (PCR) products. *J. Vet. Med. Sci.*, 57(4), 769-771.

- (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 priedėlis. Ląstelių gyvybingumo vizualus tikrinimas

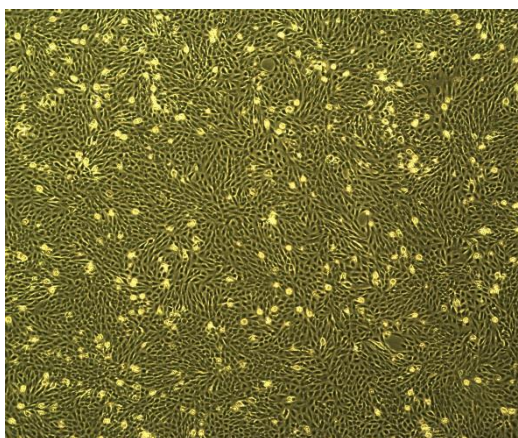


Susiliejimas < 5 %. Ląstelės tik ką pasėtos. Ląstelių gyvybingumas – 100 %.
Klasifikavimas: „citotoksiškumo nėra“.



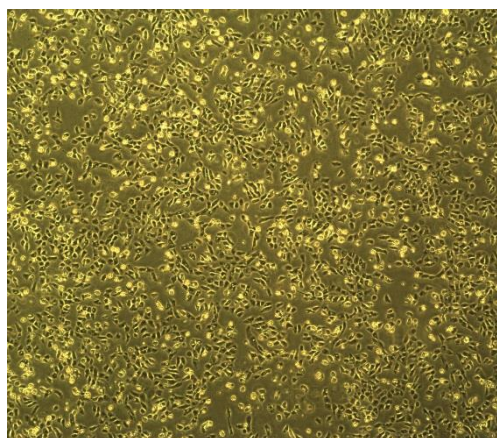
Susiliejimas > 85 %. Šioje pakopoje ląstelės veikiamos bandomosiomis cheminėmis medžiagomis. Ląstelių gyvybingumas – > 95 %.

Klasifikavimas: „citotoksiškumo nėra“

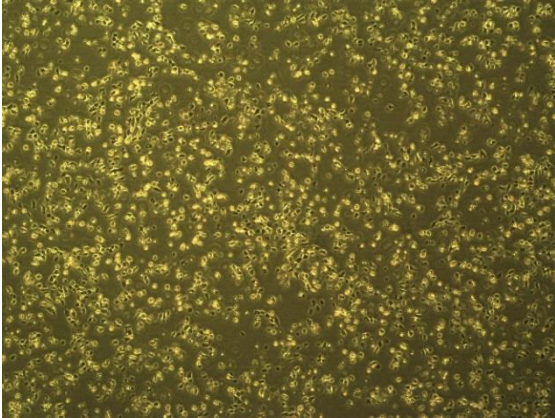


Susiliejimas > 95 %. Ląstelės yra tankiai suspaustos ir pradeda per greitai augti. Ląstelių gyvybingumas – > 95 %.

Klasifikavimas: „citotoksiškumo nėra“.



Ląstelių gyvybingumas – < 25 %. Ląstelės atsiskiria ir sąlytis tarp jų mažėja. Ląstelės suapvalėja. Klasifikavimas: „citotoksiškumas“.



Ląstelių gyvybingumas – $< 5\%$. Ląstelės yra visiškai atsiskyrusios ir sąlyčio tarp jų nėra. Ląstelės suapvalėjo. Medžiaga klasifikuojama kaip „citotoksiška“.

B.67 ŽINDUOLIŲ LĄSTELIŲ GENŲ MUTACIJOS BANDYMAI *IN VITRO* NAUDOJANT TIMIDINKINAZĖS GENĄ

IVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymo gaires 490 (2016). Bandymų metodai periodiškai peržiūrimi ir taisomi, atsižvelgiant į mokslo pažangą, kintamus reglamentavimo poreikius ir gyvūnų gerovę. Pelių limfomos bandymas (MLA) ir TK6 bandymas naudojant timidinkinazės (TK) lokusą iš pradžių buvo įtraukti į B.17 bandymo metodą. Vėliau tarptautinių genotoksiškumo bandymų seminarų (IWGT) MLA ekspertų darbo grupė parengė tarptautiniu lygiu suderintas rekomendacijas dėl MLA bandymo priėmimo kriterijų ir duomenų aiškinimo (1) (2) (3) (4) (5), ir šios rekomendacijos įtrauktos į šį naują B.67 bandymo metodą. Šis bandymo metodas parašytas kaip MLA bandymas ir kaip TK6 bandymas, nes taikant šį metodą taip pat naudojamas TK lokusas. MLA yra plačiai naudojamas reglamentavimo tikslais, o TK6 yra naudojamas gerokai rečiau. Reikėtų pažymėti, kad, nežiūrint į vertinamųjų baigčių panašumą, dvi ląstelių linijos nėra sukeičiamos ir reglamentavimo programos gali pagrįstai išreikšti vienos pranašumą prieš kitą konkrečiu naudojimo kaip reglamentavimo priemonės atveju. Pavyzdžiui, atliekant MLA patvirtinimą buvo įrodyta, kad jis tinka aptikti ne tik genų mutaciją, bet ir bandomosios cheminės medžiagos gebėjimą sukelti struktūrinį chromosomų pažeidimą. Šis bandymų metodas yra genetinės toksikologijos metodų serijos dalis. Yra parengtas EBPO dokumentas, kuriame glaustai pateikiama informacija apie genetinės toksikologijos bandymus ir naujausių genetinės toksikologijos bandymų EBPO gairių pakeitimų apžvalgą (6).
2. *In vitro* žinduolių ląstelių genų mutacijos bandymų tikslas – aptikti cheminių medžiagų sukeltas genų mutacijas. Šiuose bandymuose naudojamos ląstelių linijos skirtos matuoti tiesiogines reporterinių genų mutacijas, konkrečiai, endogeninės timidinkinazės geno (*TK* žmogaus ląstelių ir *Tk* graužikų ląstelių, šiame bandymo metode kartu nurodomų kaip *TK*). Taikant šį bandymo metodą numatyta naudoti dvi ląstelių linijas: L5178Y $TK^{+/-}$ -3.7.2C pelių limfomos ląstelių linija (paprastai vadinama L5178Y) ir TK6 žmogaus limfoblastų ląstelių linija (paprastai vadinama TK6). Nors dvi ląstelių linijos skiriasi dėl savo kilmės, ląstelių augimo, p53 būsenos ir kt., *TK* genų mutacijos bandymai gali būti atliekami panašiu būdu abiem ląstelių tipams, kaip aprašyta šiame bandymo metode.
3. Dėl autosominės ir heterozigotinės timidinkinazės geno prigimties galima aptikti gyvybingas kolonijas, kurių ląstelėms trūksta timidinkinazės fermento po mutacijos iš $TK^{+/-}$ į $TK^{-/-}$. Šio trūkumo priežastis gali būti *TK* geną veikiantys genetiniai įvykiai, įskaitant geno mutacijas (taškinės mutacijas, rėmelio poslinkio mutacijas, mažas iškritas ir kt.) ir su chromosomomis susijusius įvykius (dideles iškritas, chromosomų

pertvarkas ir mitozinę rekombinaciją). Pastarieji įvykiai pasireiškia kaip heterozigotiškumo praradimas, kuris yra įprastas auglių slopinimo genų genetinis pokytis žmogaus auglių genezėje. Teoriškai MLA galima aptikti visos *TK* geną turinčios chromosomos praradimą dėl verpstės struktūros ardymo ir (arba) neatsiskyrimo mitozės metu. Iš tikrųjų, citogenetinės ir molekulinės analizės derinys aiškiai rodo, kad kai kurie MLA *TK* mutantai yra neatsiskyrimo rezultatas. Tačiau įrodomoji vertė rodo, kad *TK* geno mutacijų bandymais negalima patikimai aptikti aneugenus, kai taikomi standartiniai citotoksiškumo kriterijai (kaip aprašyta šiame bandymo metode) ir todėl šie bandymai nėra tinkami aneugenams aptikti (7) (8) (9).

4. Atliekant *TK* geno mutacijos bandymus, gaunami dviejų skirtingų fenotipų klasių *TK* mutantai; normaliai augantys mutantai, kurie auga tokiu pačiu greičiu kaip *TK* heterozigotinės ląstelės, ir lėtai augantys mutantai, kurie auga esant ilgesnei dvigubėjimo trukmei. Normaliai augantys ir lėtai augantys mutantai atpažįstami kaip didelių kolonijų ir mažų kolonijų MLA mutantai ir kaip anksti pasirodančių ir vėlai pasirodančių kolonijų *TK* mutantai. Didelių ir mažų kolonijų MLA mutantų molekulinė ir citogenetinė prigimtis yra detaliai ištirta (8) (10) (11) (12) (13). Anksti pasirodančių ir vėlai pasirodančių *TK6* mutantų molekulinė ir citogenetinė prigimtis taip pat yra išsamiai ištirta (14) (15) (16) (17). Abiejų tipų ląstelių lėtai augantys mutantai patyrė genetinį pažeidimą, kuris yra susijęs su tariamu (-ais) augimą reguliuojančiu (-iais) genu (-ais) šalia *TK* lokuso, dėl ko padidėja dvigubėjimo trukmė ir susidaro vėlai pasirodančios arba mažos kolonijos (18). Lėtai augančių mutantų atsiradimas susijęs su cheminėmis medžiagomis, kurios sukelia didelius struktūros pokyčius chromosomų lygiu. Ląstelės, kurių pažeidimas nėra susijęs su tariamu (-ais) augimą reguliuojančiu (-iais) genu (-ais) šalia *TK* lokuso, augimo greitis yra panašus į motininių ląstelių ir jos tampa normaliai augančiais mutantais. Pradžioje normaliai augančių mutantų atsiradimas yra susijęs su cheminėmis medžiagomis, iš pradžių veikiančiomis kaip taškinės mutacijos medžiagos. Todėl yra svarbu suskaičiuoti lėtai augančius ir normaliai augančius mutantus, kad būtų galima atgauti visus mutantus ir šiek tiek suprasti bandomosios cheminės medžiagos (mutagenų ar klastogenų) sukkelto pažeidimo tipą (-us) (10) (12) (18) (19).
5. Bandymo gairių bandymo metodas sutvarkytas taip, kad būtų pateikta bendroji informacija, kuri tiktų MLA ir *TK6*, ir specialieji nurodymai dėl atskirų bandymų.
6. Vartojamos apibrėžtys pateiktos 1 priedėlyje.

PRADINIAI ASPEKTAI IR APRIBOJIMAI

7. Bandymus atliekant *in vitro* paprastai reikia naudoti egzogeninį metabolinio aktyvinimo šaltinį. Egzogeninė metabolinio aktyvinimo sistema nevysiškai atkartoja *in vivo* sąlygas.

8. Reikėtų imtis priemonių, kad būtų išvengta sąlygų, kurioms esant galėtų būti gauti klaidingai teigiami rezultatai (t. y. galima sąveika su bandymo sistema), gauti ne dėl tiesioginės sąveikos tarp bandomosios cheminės medžiagos ir ląstelės genetinės medžiagos; tokias sąlygas sudaro pH ar osmolialumo pokyčiai, sąveika su terpės komponentais (20) (21) ar per didelis citotoksiškumo lygis (22) (23) (24). Didesni nei rekomenduojami citotoksiškumo lygiai, kaip apibrėžta 28 pastraipoje, laikomi per dideli MLA ir TK6. Be to, reikėtų pažymėti, kad bandomosios cheminės medžiagos, kurios yra timidino analogai arba elgiasi kaip timidino analogai, gali padidinti mutacijų dažnį dėl atrankiojo spontaninių foninių mutantų augimo ląstelių apdorojimo metu ir tinkamam įvertinimui būtina taikyti kitus bandymo metodus (25).
9. Pramoninėms nanomedžiagoms gali prireikti tam tikrų šio bandymų metodo pakeitimų, kurie šiame bandymų metode neaprašyti.
10. Prieš taikant bandymų metodą mišiniui bandyti, kad būtų gauti numatomo reglamentavimo tikslui skirti duomenys, reikėtų panagrinėti, ar metodu galima pasiekti tą tikslą atitinkančius rezultatus ir, jei taip, dėl kokios priežasties. Tokie svarstymai nereikalingi, kai yra reglamentavimo reikalavimas bandyti mišinį.
11. Mutantinės ląstelės, kurioms trūksta timidinkinazės fermento aktyvumo dėl $TK^{+/-}$ mutacijos į $TK^{-/-}$, yra atsparios pirimidino analogo trifluortimidino (TFT) citostatiniam poveikiui. Ląstelės, kurioms TK netrūksta, yra jautrios TFT, kuris slopina ląstelių metabolizmą bei stabdo tolesnį jų dalijimąsi. Todėl mutantinės ląstelės gali daugintis, esant TFT, ir sudaryti matomas kolonijas, kai TK fermento turinčios ląstelės daugintis negali.

BANDYMO PRINCIPAS

12. Ląstelių suspensija tinkamą laiko tarpą (žr. 33 pastraipą) veikiama bandomąja chemine medžiaga, esant egzogeniniam metabolinio aktyvinimo šaltiniui arba jam nesant (žr. 19 pastraipą), ir ląstelės persėjamos, kad būtų nustatytas citotoksiškumas ir galėtų vykti fenotipo ekspresija prieš mutantų atranką. MLA citotoksiškumas nustatomas pagal santykinį bendrąjį augimą (RTG, žr. 25 pastraipą), TK6 – pagal santykinį išgyvenamumą (RS, žr. 26 pastraipą). Apdorotos kultūros laikomos auginimo terpėje pakankamą laiko tarpą, būdingą kiekvienam ląstelių tipui (žr. 37 pastraipą), kad įvyktų beveik optimali sukeltų mutacijų fenotipo ekspresija. Po fenotipo ekspresijos mutacijų dažnis nustatomas, sėjant žinomą ląstelių skaičių į terpę, turinčią atrankos medžiagą mutantinėms kolonijoms aptikti, ir į terpę be atrankos medžiagos klonavimo efektyvumui (gyvybingumui) nustatyti. Kolonijos suskaičiuojamos, pasibaigus reikiamos trukmės inkubavimui. Mutacijų dažnis apskaičiuojamas pagal mutantinių kolonijų skaičių, pakoreguotą dėl klonavimo efektyvumo mutantų atrankos metu.

METODO APRAŠYMAS

Parengiamieji darbai

Ląstelės

13. MLA: kadangi MLA buvo sukurtas ir apibūdintas naudojant L5178Y ląstelių $TK^{+/-}$ –3.7.2C subliniją, ši specialioji sublinija turi būti naudojama MLA. L5178Y ląstelių linija buvo gauta iš metilcholantreno sukeltos DBA-2 pelių užkrūčio liaukos limfomos (26). Clive ir bendradarbiai apdorojo L5178Y ląsteles (Clive pažymėtas $TK^{+/-}$ –3) etilmetansulfonatu ir išskyrė $TK^{-/-}$ (pažymėtą $TK^{-/-}$ –3.7) kloną, naudodami bromdeoksiuridiną kaip atrankos medžiagą. Iš $TK^{-/-}$ klonu buvo išskirtas ir apibūdintas dėl naudojimo MLA spontaninis $TK^{+/-}$ klonas (pažymėtas $TK^{+/-}$ –3.7.2) ir subklonas (pažymėtas $TK^{+/-}$ –3.7.2C) (27). Paskelbtas ląstelių linijos kariotipas (28) (29) (30) (31). Modalinis chromosomų skaičius yra 40. Yra viena metacentrinė chromosoma (t12; 13), kurią reikėtų skaičiuoti kaip vieną chromosomą. Pelės *TK* lokusas yra distaliniam 11 chromosomos gale. L5178Y $TK^{+/-}$ –3.7.2C ląstelių linija turi mutacijas abiejuose p53 aleliuose ir duoda mutantinį p53 baltymą (32) (33). $TK^{+/-}$ –3.7.2C ląstelių linijos p53 būsena greičiausiai atsako už gebėjimą atliekant bandymą aptikti didelio laipsnio pažeidimą (17).
14. TK6: TK6 yra žmogaus limfoblastų ląstelių linija. Motininių ląstelių linija yra Epstein-Barr virusu transformuota ląstelių linija WI-L2, kuri iš pradžių buvo gauta iš 5 metų amžiaus berniuko, turinčio paveldimąją sferocitozę. Pirmojo gauto klonu HH4 ICR191 indukuotos mutacijos būdu buvo gauta *TK* heterozigotinių ląstelių linija TK6 (34). TK6 ląstelės yra beveik visos diploidinės ir tipinis kariotipas yra 47, XY, 13+, t(14; 20), t(3; 21) (35). Žmogaus *TK* lokusas yra 17 chromosomos ilgajame petyje. TK6 yra p53 kompetentinė ląstelių linija, nes ji turi laukinio tipo p53 seką abiejuose aleliuose ir išreiškia tik laukinio tipo p53 baltymą (36).
15. Bandymų laboratorijai pirmą kartą gaunant ar papildant MLA ir TK6 pradinę kultūrą, patariama užtikrinti *mikoplazmų* užkrato nebuvimą, nustatyti ląstelių kariotipą arba nudažyti *TK* lokusą supančias chromosomas ir patikrinti populiacijos dvigubėjimo trukmę. Turėtų būti nustatyta bandymo laboratorijoje naudojamų ląstelių normali ląstelių ciklo trukmė ir ji turėtų atitikti paskelbtas ląstelių charakteristikas (16) (19) (37). Ši pradinė ląstelių kultūra visoms darbinėms ląstelių kultūroms ruošti turėtų būti laikoma –150 °C arba žemesnėje temperatūroje.
16. Prieš ruošiant didelį užšaldomų darbinių kultūrų skaičių arba prieš pat bandymo pradžią kultūras gali tekti išvalyti nuo iš anksčiau esančių mutantinių ląstelių (išskyrus atvejus, kai tirpiklio kontrolinių ėminių mutacijų dažnis jau atitinka priimtina intervalą, žr. 2 lentelę dėl MLA). Tai atliekama naudojant metotreksatą (aminopteriną) *TK* neturinčioms ląstelėms atskirti ir į kultūrą įdedant timidino, hipoksantino ir glicino (L5178Y) arba 2'-deoksicitidino (TK6), kad būtų užtikrintas

optimalus TK kompetentinių ląstelių (19) (38) (39) ir TK6 (40) augimas. Bendrieji ląstelių kultūrų priežiūros geros praktikos patarimai ir konkretus patarimas dėl L5178Y ir TK6 ląstelių yra pateikti (19) (31) (37) (39) (41). Jei laboratorijoms reikia pradinės ląstelių kultūros pradėti auginti MLA ar TK6 arba gauti naujas pradines ląstelių kultūras, yra tinkamai apibūdintų ląstelių saugykla (37).

Terpės ir kultūros auginimo sąlygos

17. Atliekant abu bandymus, prižiūrimoms kultūroms reikėtų naudoti reikiamą kultūros terpę ir inkubavimo sąlygas (pvz., kultūros indus, drėkinamąją 5 % CO₂ atmosferą, 37 °C inkubavimo temperatūrą). Ląstelių kultūros visada turėtų būti laikomos tokiomis sąlygomis, kurios užtikrintų, kad ląstelės auga eksponentinio augimo tarpsniu. Ypač svarbu, kad būtų pasirinktos terpės ir auginimo sąlygos, kurios užtikrintų optimalų ląstelių augimą ekspresijos laikotarpiu ir optimalų mutantinių ir nemutantinių ląstelių klonavimo efektyvumą. MLA ir TK6 taip pat yra svarbu, kad auginimo sąlygos užtikrintų didelių arba anksti pasirodančių ir mažų arba vėlai pasirodančių kolonijų TK mutantų augimą. Daugiau duomenų apie auginimą, įskaitant būtinumą tinkamai šiluma inaktyvinti arklių kraujo serumą, jei mutantų atrankai naudojama RPMI terpė, galima rasti (19) (31) (38) (39) (40) (42).

Kultūrų paruošimas

18. Ląstelių linijos dauginamos iš kamieninių kultūrų, sėjamų kultūros terpėje tokiu tankiu, kad ląstelės suspensijose ar monosluoksniuose visą apdorojimo ir ekspresijos laikotarpį augtų eksponentiškai.

Metabolinis aktyvinimas

19. Reikėtų naudoti egzogenines metabolinio aktyvinimo sistemas, kai naudojamos L5178Y ir TK6 ląstelės, nes jų endogeninė metabolinė geba yra nepakankama. Jei nebūtų pagrįsta kita sistema, dažniausiai kaip numatytoji rekomenduojama sistema yra kofaktoriaumi papildyta pomitochondrinė frakcija (S9), ruošiama iš graužikų (paprastai žiurkių) kepenų, apdorotų fermentų aktyvumą skatinančiais agentais, pvz., Aroclor 1254 (43) (44) (45) ar fenobarbitalio ir β-naftoflavono deriniu (46) (47) (48) (49) (50) (51). Pastarasis derinys neprieštarauja Stokholmo konvencijai dėl patvariųjų organinių teršalų (52) ir pasirodė esąs toks pat veiksmingas kaip Aroclor 1254 mišrių funkcijų oksidazėms skatinti (45) (46) (47) (49). S9 frakcija paprastai naudojama nuo 1 % iki 2 % koncentracijos, bet galutinio bandymo terpėje ji gali būti padidinta iki 10 % (V/V). Naudojamos egzogeninės metabolinio aktyvinimo sistemos ar metabolizmo skatinimo priemonės tipo ir koncentracijos pasirinkimui įtakos gali turėti bandomųjų cheminių medžiagų klasė.

Bandomosios cheminės medžiagos ruošimas

20. Kietąsias bandomąsias chemines medžiagas reikėtų ištirpinti atitinkamuose tirpikliuose ir, jei reikia, praskiesti prieš ląstelių apdorojimą (žr. 21 pastraipą). Skystąsias bandomąsias chemines medžiagas galima dėti tiesiogiai į bandymo sistemą ir (arba) praskiesti prieš apdorojant bandymo sistemą. Dujinės arba lakiosios bandomosios cheminės medžiagos turėtų būti bandomos atitinkamai pakeitus standartinius protokolus, pvz., apdorojimas sandariuose kultūros induose (53) (54) (55). Bandomųjų cheminių medžiagų preparatus reikėtų ruošti prieš pat apdorojimą, išskyrus atvejus, kai stabilumo duomenys rodo, kad juos galima laikyti.

BANDYMO SĄLYGOS

Tirpikliai

21. Tirpiklį reikėtų pasirinkti taip, kad būtų optimizuotas bandomosios cheminės medžiagos tirpumas, bet nebūtų daroma neigiama įtaka bandymo eigai, pvz., kistų ląstelių augimas, būtų paveiktas bandomosios cheminės medžiagos vientisumas, vyktų reakcija su kultūros indais, būtų pakenkta metabolinio aktyvinimo sistemai. Rekomenduojama visuomet iš pradžių atsižvelgti į galimybę naudoti, jei įmanoma, vandeninį tirpiklį (ar kultūros terpę). Gerai ištirti tirpikliai yra vanduo ar dimetilsulfoksidas. Paprastai organinio tirpiklio koncentracija galutinėje apdorojimo terpėje neturėtų būti didesnė kaip 1 % (tūrio), o vandeninių tirpiklių (natrio chlorido tirpalo ar vandens) – 10 % (tūrio). Jei naudojami kiti nei tinkamai ištirti tirpikliai (pvz., etanolis ar acetonas), jų naudojimas turėtų būti pagrįstas duomenimis, kurie rodytų tirpiklio suderinamumą su bandomosiomis cheminėmis medžiagomis bei bandymo sistema ir genetinio toksiškumo nebuvimą, esant naudojamai koncentracijai. Jei tokių patvirtinančių duomenų nebūtų, svarbu įtraukti neapdorotus kontrolinius ėminius (žr. 1 priedėlį, *Apibrėžtys*), kurie įrodytų, kad pasirinktas tirpiklis nesukelia žalingo arba mutageninio poveikio.

CITOTOKSIŠKUMO MATAVIMAS IR APDOROJIMO KONCENTRACIJOS VERČIŲ PARINKIMAS

22. Nustatant didžiausią bandymui naudojamą bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją reikėtų vengti koncentracijos, galinčios sukelti klaidingai teigiamus atsakus, pvz., per didelį citotoksiškumą (žr. 28 pastraipą), nuosėdas kultūros terpėje (žr. 29 pastraipą) ar žymius pH arba osmolialumo pokyčius (žr. 8 pastraipą). Jei bandomosios cheminės medžiagos pridėjimo metu žymiai pakinta terpės pH vertė, ją būtų galima reguliuoti buferuojant galutinę apdorojimo terpę, kad būtų išvengta klaidingai teigiamų rezultatų ir būtų užtikrintos tinkamos kultūros sąlygos.
23. Koncentracijos pasirinkimas pagrįstas citotoksiškumu ir kitais aspektais (žr. 27–30 pastraipas). Nors citotoksiškumo įvertinimas atliekant pradinį bandymą gali būti

naudingas pagrindinio bandymo koncentracijos vertėms geriau apibrėžti, pradinis bandymas nėra būtinas. Netgi atlikus pradinį citotoksiškumo vertinimą, atliekant pagrindinį bandymą vis tiek būtina matuoti citotoksiškumą kiekvienai kultūrai. Jei atliekamas intervalo nustatymo bandymas, jis turėtų aprėpti platų koncentracijos verčių intervalą ir gali būti baigtas praėjus 1 dienai po apdorojimo arba atliekamas per 2 ekspresijos dienas ir iki mutantų atrankos (jei pasirodytų, kad naudojamos koncentracijos vertės yra tinkamos).

24. Turėtų būti nustatomas kiekvienos atskiros bandymo kultūros ir kontrolinės kultūros citotoksiškumas: MLA (2) ir TK6 (15) metodai apibrėžti pagal sutartą tarptautinę praktiką.
25. Abiejų MLA agarų ir mikrošulinėlių variantų: citotoksiškumas turėtų būti įvertintas, naudojant santykinį bendrąjį augimą (RTG), kurį pirmieji apibrėžė Clive ir Spector 1975 m. (2). Šį matą sudaro santykinis suspensijos augimas (RSG: bandymo kultūros tirpiklio kontrolinio ėminio atžvilgiu) ląstelių apdorojimo metu, ekspresijos trukmė ir santykinis klonavimo efektyvumas (RCE: bandymo kultūros tirpiklio kontrolinio ėminio atžvilgiu) mutantų atrankos metu (2). Reikėtų pažymėti, kad į RSG įtraukti ląstelių nuostoliai, bandymo kultūros patiriami apdorojimo metu (formulės pateiktos 2 priedėlyje).
26. TK6: citotoksiškumas turėtų būti įvertinamas pagal santykinį išgyvenamumą, t. y. pagal iš karto po apdorojimo sėjamų ląstelių klonavimo efektyvumą, koreguotą dėl ląstelių nuostolių apdorojimo metu pagal ląstelių skaičių palyginti su neigiamu kontroliniu ėminiu (priskirtas 100 % išgyvenamumas) (formulės pateiktos 2 priedėlyje).
27. Reikėtų įvertinti ne mažiau kaip keturias bandymo koncentracijos vertes (neįskaitant tirpiklio ir teigiamų kontrolinių ėminių), kurios atitinka priimtino kriterijus (reikiamas citotoksiškumas, ląstelių skaičius ir kt.). Nors patartina naudoti du kartotinius kultūros ėminius, galima naudoti kiekvienos bandymo koncentracijos kartotinius ar pavienius apdorotų kultūrų ėminius. Tam tikros koncentracijos kartotinėms kultūroms gauti rezultatai ataskaitoje turėtų būti pateikti atskirai, bet atliekant duomenų analizę gali būti sujungti (55). Jei bandomoji cheminė medžiaga rodo mažą citotoksiškumą arba jo visai nėra, paprastai tiktų maždaug nuo 2 iki 3 kartų besiskiriančios koncentracijos intervalai. Jei citotoksiškumas nustatomas, pasirinktos koncentracijos vertės turėtų aprėpti citotoksiškumo intervalą nuo koncentracijos, kuriai esant citotoksiškumas pasireiškia, kaip aprašyta 28 pastraipoje, įtraukiant koncentracijos vertes, kurioms esant gaunamas vidutinis citotoksiškumas ar jo visai nėra. Daugelio bandomųjų cheminių medžiagų koncentracijos atsako kreivės kyla staigiai, todėl siekiant aprėpti visą citotoksiškumo intervalą arba išsamiai iširti koncentracijos atsaką, gali tekti naudoti arčiau išdėstytas ir daugiau kaip keturias

koncentracijos vertes, ypač tomis aplinkybėmis, kai reikia atlikti kartotinį bandymą (žr. 70 pastraipą). Daugiau kaip keturių koncentracijos verčių naudojimas gali būti ypač svarbus naudojant pavienes kultūras.

28. Jei didžiausioji koncentracija pagrįsta citotoksiškumu, reikėtų siekti, kad MLA RTG didžiausiajai koncentracijai būtų nuo 20 % iki 10 % ir TK6 RS būtų nuo 20 % iki 10 % RS (67 pastraipa).
29. Jei mažai tirpios bandomosios cheminės medžiagos nėra citotoksinės, kai koncentracija yra mažesnė nei mažiausia netirpumo koncentracija, veikimo bandomąja chemine medžiaga pabaigoje, esant didžiausiai analizuojamai koncentracijai, turėtų atsirasti drumstumas arba nuosėdos, matomos plika akimi arba per inversinį mikroskopą. Netgi jei citotoksiškumas pasireiškia, kai koncentracija yra didesnė nei mažiausia netirpumo koncentracija, patartina bandyti tik esant vienai drumstumą ar matomas nuosėdas sukeliančiai koncentracijai, nes nuosėdos gali daryti dirbtinį poveikį. Kadangi MLA ir TK6 naudoja kultūras kaip suspensiją, ypač reikia imtis priemonių užtikrinti, kad nuosėdos netrukdytų atlikti bandymą. Taip pat gali padėti tirpumo nustatymas kultūros terpėje prieš atliekant bandymą.
30. Jei nuosėdų susidarymo ar ribinio citotoksiškumo nestebima, didžiausioji bandymo koncentracija turėtų atitikti 10 mmol/l, 2 mg/ml ar 2 µl/ml, pasirenkant mažiausią (57) (58). Jei bandomoji cheminė medžiaga yra neapibrėžtos sudėties, pvz., nežinomos ar kintamos sudėties medžiaga, sudėtingųjų reakcijų produktai ar biologinės medžiagos (t. y. nežinomos ar kintamos sudėties cheminės medžiagos, UVCB), aplinkos ėminių ekstraktai ir kt., nesant pakankamam citotoksiškumui, gali prireikti didesnės didžiausios koncentracijos (pvz., 5 mg/ml), kad būtų didesnė kiekvieno iš komponentų koncentracija. Reikėtų pažymėti, kad žmonėms skirtiems vaistiniams preparatams šie reikalavimai gali būti skirtingi (59).

Kontroliniai ėminiai

31. Kiekvienai bandymo sąlygai reikėtų įtraukti vienalaikius neigiamus kontrolinius ėminius (žr. 21 pastraipą), sudarytus vien tik iš tirpiklio apdorojimo terpėje ir tvarkomus kaip apdorojamos kultūros.
32. Vienalaikiai teigiami kontroliniai ėminiai yra būtini, kad būtų galima įrodyti laboratorijos gebėjimą identifikuoti mutageną naudojamo protokolo sąlygomis, nustatyti egzogeninės metabolinio aktyvinimo sistemos efektyvumą (jei taikoma) ir įrodyti gebėjimą tinkamai aptikti mažus arba vėlai pasirodančius ir didelius arba anksti pasirodančius *TK* mutantus. Teigiamų kontrolinių ėminių pavyzdžiai pateikiami toliau 1 lentelėje. Galima naudoti alternatyvias teigiamas kontrolines medžiagas, jei tai būtų pagrįsta. Kadangi genetinio toksiškumo žinduolių ląstelėms bandymai *in vitro* yra pakankamai standartizuoti, esant trumpalaikiam apdorojimui

(3–4 h), atliekamam vienu metu su metaboliniu aktyvinimu ar be jo, naudojant vienodą apdorojimo trukmę, teigiamų kontrolinių ėminių naudojimas gali apsiriboti mutagenu, kuriam būtinas metabolinis aktyvinimas. Šiuo atveju vieno teigiamo kontrolinio ėminio atsakas įrodys metabolinio aktyvinimo sistemos aktyvumą ir bandymo sistemos jautrį. Tačiau atliekant ilgalaikį apdorojimą (t. y. 24 h be S9) reikėtų turėti savo teigiamą kontrolinį ėminį, nes apdorojimo trukmė skirsis nuo metabolinį aktyvinimą naudojančio bandymo trukmės. Kiekvienas teigiamas kontrolinis ėminys turėtų būti naudojamas vienos arba kelių koncentracijos verčių, kurioms esant būtų galima tikėtis gauti atkuriamą ir aptinkamą didesnę nei fonas atsaką, kad būtų galima įrodyti bandymo sistemos jautrį, ir atsakui neturėtų trukdyti citotoksiškumas, kuris viršytų šiam bandymo metodui nustatytas ribas (žr. 28 pastraipą).

1 lentelė. Etaloninės medžiagos, rekomenduojamos laboratorijos kvalifikacijai vertinti ir teigiamiems kontroliniams ėminiams pasirinkti.

Kategorija	Medžiaga	CASRN
1. Mutagenai, aktyvūs be metabolinio aktyvinimo		
Metilmetansulfonatas	66-27-3	
Mitomicinas C	50-07-7	
4-nitrochinolin-N-oksidas	56-57-5	
2. Mutagenai, kuriems reikia metabolinio aktyvinimo		
Benz(a)pirenas	50-32-8	
Ciklofosfamidą (monohidratas)	50-18-0 (6055-19-2)	
7,12-dimetilbenzantracenas	57-97-6	
3-metilcholantrenas	56-49-5	

PROCEDŪRA

Apdorojimas bandomąja chemine medžiaga

33. Proliferaujančios ląstelės veikiamos bandomąja chemine medžiaga esant metabolinio aktyvinimo sistemai arba jos nesant. Ekspozicija turėtų trukti tinkamą laiką (paprastai pakanka nuo 3 iki 4 h). Reikėtų pažymėti, kad žmonėms skirtiems vaistiniams preparatams šie reikalavimai gali būti skirtingi (59). Tais MLA atvejais, kai atliekant trumpalaikį apdorojimą gaunami neigiami rezultatai ir yra informacijos, kuri rodytų, kad būtina ilgiau apdoroti (pvz., nukleozidų analogai, mažai tirpios medžiagos (5) (59)), turėtų būti apsvarstyta galimybė atlikti didesnės apdorojimo trukmės bandymą, t. y. 24 h be S9.

34. Mažiausias kiekvienos bandymo kultūros (kontrolinės ir apdorotos) ląstelių skaičius kiekvienoje bandymo stadijoje turėtų būti pagrįstas spontaninių mutacijų dažniu. Bendroji rekomendacija dėl pakankamo ląstelių skaičiaus apdorojimo ir sėjimo į kiekvieną bandymo kultūrą yra ta, kad reikėtų visą laiką turėti 10, bet geriausia 100 spontaninių mutantų visais bandymo tarpsniais (apdorojimo, fenotipo ekspresijos ir mutantų atrankos) (56).
35. Rekomenduojamas priimtinas MLA spontaninių mutacijų dažnis yra $35-140 \times 10^{-6}$ (agaro versija) ir $50-170 \times 10^{-6}$ (mikrošulinėlių variantas) (žr. 2 lentelę). Siekiant visą laiką kiekvienai kultūrai turėti ne mažiau kaip 10, bet geriausia 100 apdorojimą išgyvenusių spontaninių mutantų, būtina apdoroti ne mažiau kaip 6×10^6 ląstelių. Apdorojant tokį ląstelių skaičių ir išsaugant pakankamai ląstelių ekspresijos ir klonavimo mutantų atrankos metu, visais bandymo tarpsniais gaunamas reikiamas spontaninių mutantų skaičius (10 arba daugiau), netgi jei kultūros apdorojamos esant koncentracijai, kuriai sukeliamas 90 % citotoksiškumas (išmatuotas pagal 10 % RTG) (19) (38) (39).
36. TK6 spontaninių mutacijų dažnis paprastai yra nuo 2 iki 10×10^{-6} . Siekiant kiekvienai kultūrai turėti ne mažiau kaip 10 apdorojimą išgyvenusių spontaninių mutantų, būtina apdoroti ne mažiau kaip 20×10^6 ląstelių. Apdorojant tokį ląstelių skaičių gaunamas reikiamas spontaninių mutantų skaičius (10 arba daugiau), netgi jei kultūros apdorojamos esant koncentracijai, kuriai sukeliamas 90 % citotoksiškumas (10 % RS). Be to, ekspresijos laikotarpiu turi būti auginamas pakankamas ląstelių skaičius ir sėjamas mutantų atrankai (60).

Fenotipo ekspresijos trukmė ir citotoksiškumo bei mutacijų dažnio matavimas

37. Po apdorojimo laikotarpio pabaigos ląstelės auginamos kiekvienai ląstelių linijai būdingą nustatytą laiką, kad įvyktų beveik optimali naujai sukeltų mutacijų fenotipo ekspresija. MLA atveju fenotipo ekspresijos trukmė yra 2 dienos. TK6 atveju fenotipo ekspresijos trukmė yra 3–4 dienos. Jei naudojamas 24 h apdorojimo laikotarpis, ekspresijos laikotarpis prasideda po apdorojimo pabaigos.
38. Fenotipo ekspresijos laikotarpiu ląstelės skaičiuojamos kasdien. MLA atveju kasdienis ląstelių skaičiavimas naudojamas vienos dienos suspensijos augimui (SG) skaičiuoti. Po 2 dienų ekspresijos laikotarpio gaunama ląstelių suspensija terpėje su atrankos medžiaga ir be jos, kad būtų nustatytas mutantų skaičius (atrankos plokštelės) ir klonavimo efektyvumas (gyvybingumo plokštelės). MLA atveju yra du vienodai priimtini mutantų atrankos klonavimo metodai; vienam naudojamas minkštasis agaras, kitam – skystoji terpė 96 šulinėlių plokštelėse (19) (38) (39). TK6 atveju klonavimas atliekamas naudojant skystąją terpę ir 96 šulinėlių plokšteles (16).

39. Triflurimidinas (TFT) yra vienintelė rekomenduota *TK* mutantų atrankos medžiaga (61).
40. MLA agarą lėkštelėse ir mikrošulinėlių plokštelėse skaičiuojama po 10–12 inkubavimo dienų. Anksti pasirodančios *TK6* mutantų kolonijos mikrošulinėlių plokštelėse skaičiuojamos po 10–14 dienų. Siekiant atgauti lėtai augančius (vėlai pasirodančius) *TK6* mutantus, būtina papildyti ląstelių auginimo terpę ir TFT, suskaičiavus anksti pasirodžiusius mutantus, ir inkubuoti plokšteles dar 7–10 dienų (62). Žr. 42 ir 44 pastraipas dėl lėtai ir normaliai augančių *TK* mutantų skaičiavimo būdų aptarimo.
41. Reikiami skaičiavimai pagal du MLA bandymus, įskaitant du metodus (agarą ir mikrošulinėlių), pateikti 2 priedėlyje. MLA taikant agarą metodą, suskaičiuojamos kolonijos ir mutantinių kolonijų skaičius koreguojamas pagal klonavimo efektyvumą, kad būtų apskaičiuotas mutacijų dažnis. MLA ir *TK6* naudojant mikrošulinėlių variantą, klonavimo efektyvumas atrankos ir klonavimo efektyvumo plokštelėse nustatomas pagal Puasono skirstinį (63). Mutacijų dažnis skaičiuojamas pagal šiuos du efektyvumus.

Mutantinių kolonijų apibūdinimas

42. Jei pagal MLA bandomoji cheminė medžiaga yra teigiama (žr. 62–63 pastraipas), reikėtų atlikti mažiausiai vienos bandymo kultūros (paprastai didžiausios priimtinos teigiamos koncentracijos) ir neigiamų bei teigiamų kontrolinių ėminių kolonijų apibūdinimą pagal kolonijų dydį arba augimą. Jei bandomoji cheminė medžiaga yra neigiama (žr. 64 pastraipą), turėtų būti atliekamas neigiamų ir teigiamų kontrolinių ėminių mutantinių kolonijų apibūdinimas. Taikant MLA mikrošulinėlių metodą, mažos mutantų kolonijos apibrėžiamos kaip kolonijos, dengiančios mažiau kaip 25 % šulinėlio skersmens, didelės mutantų kolonijos – daugiau kaip 25 % šulinėlio skersmens. Taikant agarą metodą, naudojamas automatinis kolonijų skaitiklis mutantinėms kolonijoms suskaičiuoti ir kolonijų dydžiui nustatyti. Kolonijų dydžio nustatymo metodai išsamiai aprašyti literatūroje (19) (38) (40). Neigiamų ir teigiamų kontrolinių ėminių kolonijų apibūdinimas būtinas siekiant įrodyti, kad tyrimai atliekami tinkamai.
43. Bandomoji cheminė medžiaga negali būti nustatyta kaip neigiama, jei nėra tinkamai aptiktos teigiamo kontrolinio ėminio mažos ir didelės mutantų kolonijos. Kolonijų apibūdinimą galima naudoti, siekiant gauti bendrąją informaciją apie bandomosios cheminės medžiagos gebėjimą sukelti taškinės mutacijas ir (arba) ir su chromosomomis susijusius įvykius (4 pastraipa).
44. *TK6*: normaliai augantys ir lėtai augantys mutantai atskiriami pagal inkubavimo trukmės skirtumą (žr. 40 pastraipą). *TK6* atveju paprastai skaičiuojami visų kultūrų

anksti ir vėlai pasirodantys mutantai, įskaitant neigiamus ir teigiamus kontrolinius ėminius. Neigiamų ir teigiamų kontrolinių ėminių kolonijų apibūdinimas būtinas siekiant įrodyti, kad tyrimai atliekami tinkamai. Bandomoji cheminė medžiaga negali būti nustatyta kaip neigiama, jei nėra tinkamai aptikti teigiamo kontrolinio ėminio anksti pasirodantys ir vėlai pasirodantys mutantai. Kolonijų apibūdinimą galima naudoti, siekiant gauti bendrąją informaciją apie bandomosios cheminės medžiagos gebėjimą sukelti taškinės mutacijas ir (arba) ir su chromosomomis susijusius įvykius (4 pastraipa).

Laboratorijos kvalifikacija

45. Siekdama įrodyti pakankamą bandymo atlikimo patirtį prieš jį taikydama įprastiniams bandymams, laboratorija turėtų būti atlikusi etaloninių teigiamų cheminių medžiagų, veikiančių pagal skirtingus mechanizmus (bent vieną aktyvią su metaboliniu aktyvinimu, vieną aktyvią be jo, medžiagas pasirenkant iš 1 lentelės sąrašo), ir įvairių neigiamų kontrolinių ėminių (įskaitant neapdorotas kultūras ir įvairius tirpiklius ir (arba) nešiklius) bandymų seriją. Šių teigiamų ir neigiamų kontrolinių ėminių atsakas turėtų atitikti literatūros duomenis. Šis reikalavimas netaikomas patirties turinčioms laboratorijoms, t. y. kurios turi istorinių duomenų bazę, prieinamą kaip apibrėžta 47–50 pastraipose. MLA gautos teigiamų ir neigiamų kontrolinių ėminių vertės turėtų atitikti IWGT rekomendacijas (žr. 2 lentelę).
46. Teigiamų kontrolinių medžiagų atranką (žr. 1 lentelę) reikėtų tirti atliekant trumpalaikį ir ilgalaikį apdorojimą (jei ilgalaikis apdorojimas naudojamas) be metabolinio aktyvinimo, taip pat trumpalaikį apdorojimą esant metaboliniam aktyvinimui, kad būtų galima įrodyti kvalifikaciją aptikti mutagenines chemines medžiagas, nustatyti metabolinio aktyvinimo sistemos efektyvumą ir įrodyti ląstelių augimo sąlygų apdorojimo, fenotipo ekspresijos ir mutantų atrankos metu bei skaičiavimo procedūrų tinkamumą. Pasirinktų cheminių medžiagų koncentracijos verčių intervalas turėtų būti pasirinktas taip, kad, siekiant įrodyti bandymo sistemos jautrį ir dinaminį intervalą, būtų gautas atkuriamas ir su koncentracija susijęs padidėjimas palyginti su fonu.

Istorinių kontrolinių ėminių duomenys

47. Laboratorija turėtų nustatyti:
 - istorinių teigiamų kontrolinių ėminių intervalą ir pasiskirstymą,
 - istorinių neigiamų kontrolinių ėminių (neapdorotų, tirpiklio) intervalą ir pasiskirstymą.
48. Pirmą kartą gaunant duomenis, skirtus istorinių neigiamų kontrolinių ėminių pasiskirstymui, viena laikiai neigiami kontroliniai ėminiai turėtų atitikti paskelbtus kontrolinius duomenis. Kontrolinių ėminių pasiskirstymą papildant vis didesniu

bandymų duomenų kiekiu, būtų gerai, kad vienalaikiai neigiami kontroliniai ėminiai patektų į to skirstinio 95 % kontrolines ribas (64) (65).

49. Laboratorijos istorinių neigiamų kontrolinių ėminių duomenų bazę iš pradžių turėtų sudaryti ne mažiau kaip 10 bandymų, bet būtų geriau, jei tokių palyginamosiomis bandymų sąlygomis atliktų bandymų skaičius būtų ne mažesnis kaip 20. Laboratorijos turėtų taikyti kokybės kontrolės metodus, pvz., kontrolines diagramas (pvz., C diagramas arba X stulpelines diagramas (65)), kad galėtų nustatyti savo teigiamų ir neigiamų kontrolinių ėminių duomenų kintamumą ir įrodyti laboratorijoje taikomų procedūrų „valdomumą“ (66). Papildomas rekomendacijas dėl istorinių duomenų kūrimo ir naudojimo galima rasti literatūroje (64).
50. Neigiamų kontrolinių ėminių duomenis turėtų sudaryti vienai kultūrai, bet geriau kartotinėms kultūroms gautas mutacijų dažnis, kaip aprašyta 27 pastraipoje. Būtų gerai, kad vienalaikiai neigiami kontroliniai ėminiai patektų į laboratorijos istorinių neigiamų kontrolinių ėminių duomenų bazės skirstinio 95 % kontrolines ribas. Jei neigiamų kontrolinių ėminių duomenys nepatenka į 95 % kontrolinę ribą, jie gali būti tinkami įtraukti į istorinių kontrolinių ėminių skirstinį, jei nėra kraštiniai riktai ir yra įrodymų, kad bandymo sistema „valdoma“ (žr. 49 pastraipą) ir kad nėra techninių ar žmogaus klaidų.
51. Į visus bandymų protokolo pakeitimus reikėtų žiūrėti atsižvelgiant į duomenų suderinamumą su esamomis laboratorijos istorinių kontrolinių ėminių duomenų bazėmis. Esant didesnėms neatitiktims, turėtų būti sukurta nauja istorinių kontrolinių ėminių duomenų bazė.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Rezultatų pateikimas

52. Pateikiamus MLA ir TK6 duomenis turėtų sudaryti apdorotų ir kontrolinių kultūrų duomenys, kurių reikia citotoksiškumui (RTG arba RS) ir mutacijų dažniui apskaičiuoti, kaip aprašyta toliau.
53. Taikant MLA, turėtų būti pateikti atskirų kultūrų RSG, RTG, klonavimo efektyvumo mutantų atrankos metu ir mutantinių kolonijų (agaro varianto) arba tuščių šulinėlių (mikrošulinėlių varianto) skaičiaus duomenys. Mutacijų dažnį reikėtų išreikšti mutantinių ląstelių skaičiumi viename milijonui gyvųjų ląstelių. Jei atsakas teigiamas, turėtų būti nurodytas mažiausiai vienos bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos (paprastai didžiausios teigiamos koncentracijos) ir neigiamų bei teigiamų kontrolinių ėminių mažų ir didelių kolonijų mutacijų dažnis (ir (arba) bendrojo mutacijų dažnio procentinė dalis). Jei atsakas neigiamas, turėtų būti

nurodytas neigiamo bei teigiamo kontrolinių ėminių mažų ir didelių kolonijų mutacijų dažnis.

54. Taikant TK6, turėtų būti pateikti atskirų kultūrų RS, klonavimo efektyvumo mutantų atrankos metu ir anksti bei vėlai pasirodančių mutantų tuščių šulinėlių skaičiaus duomenys. Mutacijų dažnį reikėtų išreikšti mutantinių ląstelių skaičiumi gyvųjų ląstelių skaičiui, ir reikėtų įtraukti bendrąjį mutacijų dažnį, taip pat anksti bei vėlai pasirodančių mutantų mutacijų dažnį (ir (arba) bendrojo mutacijų dažnio procentinę dalį).

Priimtino kriterijai

55. MLA ir TK6 turėtų atitikti šiuos kriterijus prieš nustatant bendruosius konkrečios bandomosios cheminės medžiagos rezultatus:

- buvo bandoma esant dviem bandymo sąlygoms (trumpalaikio apdorojimo su metaboliniu aktyvinimu arba be jo, žr. 33 pastraipą), jei teigiami rezultatai negaunami vienai iš jų;
- turėtų būti analizuojamas pakankamas ląstelių ir koncentracijos verčių skaičius (žr. 27, 34–36 pastraipas).
- didžiausios koncentracijos pasirinkimo kriterijai atitinka aprašytus 28–30 pastraipose.

Teigiamų ir teigiamų kontrolinių ėminių priimtino kriterijai

56. Po IWGT MLA ekspertų darbo grupės atliktos didelio kiekio MLA duomenų analizės buvo pasiektas tarptautinis susitarimas dėl konkrečių MLA priimtino kriterijų (1) (2) (3) (4) (5). Todėl šiame bandymo metode pateikiamos specialios rekomendacijos dėl neigiamų ir teigiamų kontrolinių ėminių priimtino nustatymo ir atskiros medžiagos rezultatų įvertinimo pagal MLA. TK6 duomenų bazė yra gerokai mažesnė ir darbo grupė neatliko jos įvertinimo.

57. Taikant MLA, kiekvienas bandymas turėtų būti įvertinamas pagal tai, ar neapdorotas ir (arba) tirpiklio kontrolinis ėminys atitinka IWGT MLA darbo grupės priimtino kriterijus ((4) ir 2 lentelė) dėl: 1) mutacijų dažnio (reikia pažymėti, kad MLA agaro ir mikrošulinėlių variantų IWGT priimtini mutacijų dažniai skiriasi), 2) klonavimo efektyvumo mutantų atrankos metu ir 3) tirpiklio kontrolinio ėminio suspensijos augimo (formulės pateiktos 2 priedėlyje).

2 lentelė. MLA priimtino kriterijai

Parametras	Minkštojo agaro metodas	Mikrošulinėlių metodas
Mutacijų dažnis	$35-140 \times 10^{-6}$	$50-170 \times 10^{-6}$
Klonavimo efektyvumas	65–120 %	65–120 %

Suspensijos augimas	8–32 kartų (3–4 h apdorojimas) 32–180 kartų (24 h apdorojimas, jei atliekamas)	8–32 kartų (3–4 h apdorojimas) 32–180 kartų (24 h apdorojimas, jei atliekamas)

58. Kiekvienas MLA bandymas taip pat turėtų būti įvertintas pagal tai, ar teigiamas (-i) kontrolinis (-iai) ėminys (-iai) atitinka mažiausiai vieną iš šių dviejų IWGT darbo grupės priimtumo kriterijų:

- teigiamas kontrolinis ėminys turėtų rodyti absoliutųjį bendrojo mutacijų dažnio padidėjimą, t. y. padidėjimą palyginti su spontaninių foninių mutacijų dažniu (sukeltų mutacijų dažniu (IMF)) ne mažiau kaip 300×10^{-6} . Ne mažiau kaip 40 % IMF turėtų būti gaunamas kaip mažų kolonijų mutacijų dažnis;
- teigiamo kontrolinio ėminio mažos kolonijos mutacijų dažnis padidėja ne mažiau kaip 150×10^{-6} palyginti su rodomu viena laiko neapdoroto ir (arba) tirpiklio kontrolinio ėminio mutacijų dažniu (mažos kolonijos IMF yra 150×10^{-6}).

59. TK6 bandymas bus priimtinas, jei viena laiko neigiamas kontrolinis ėminys laikomas tinkamu įtraukti į laboratorijos istorinių neigiamų kontrolinių duomenų bazę, kaip aprašyta 48–49 pastraipose. Be to, viena laikiu teigiami kontroliniai ėminiai (žr. 32 pastraipą) turėtų sukelti atsakus, kurie yra suderinami su sukurtais istorinių teigiamų kontrolinių ėminių duomenų bazėje, ir duoti statistiškai reikšmingą padidėjimą palyginti su viena laikiu neigiamu kontroliniu ėminiu.

60. Atliekant abu bandymus, stebima teigiamos kontrolinės kultūros viršutinė citotoksiškumo riba turėtų būti tokia pati kaip bandymo kultūrų. T. y. RTG/RS turėtų būti ne mažesnis kaip 10 %. Pakanka naudoti vieną koncentraciją (arba vieną teigiamos kontrolinės kultūros koncentraciją, jei naudojama daugiau kaip viena koncentracija) siekiant įrodyti, kad teigiamas kontrolinis ėminys atitinka priimtumo kriterijus. Be to, teigiamo kontrolinio ėminio mutacijų dažnis turėtų atitikti laboratorijai nustatytą priimtą intervalą.

Rezultatų įvertinimas ir aiškinimas

61. Didelį darbą, susijusį su MLA biologine svarba ir teigiamo atsako kriterijais, atliko IWGT pelių limfomos ekspertų darbo grupė (4). Todėl šiame bandymo metode pateikiamos specialios rekomendacijos dėl bandomosios cheminės medžiagos MLA rezultatų aiškinimo (žr. 62–64 pastraipas). TK6 duomenų bazė yra gerokai mažesnė ir darbo grupė neatliko jos įvertinimo. Todėl rekomendacijos dėl TK6 duomenų aiškinimo pateiktos bendresniais terminais (žr. 65–66 pastraipas). Papildomos rekomendacijos taikomos abiem bandymams (žr. 67–71 pastraipas).

MLA

62. Rekomenduojamas teigiamų ir neigiamų atsakų apibrėžimo metodas, siekiant užtikrinti, kad mutacijų dažnio padidėjimas būtų biologiškai svarbus. Vietoj statistinės analizės, paprastai naudojamos atliekant kitus bandymus, metodas remiasi iš anksto nustatytu sukeltų mutacijų dažniu (t. y. mutacijų dažnio padidėjimu palyginti su vienalaikiu kontroliniu ėminiu), vadinamu bendruoju įvertinimo faktoriumi (angl. *Global Evaluation Factor*, GEF), kuris pagrįstas iš dalyvaujančių laboratorijų gautų neigiamų kontrolinių ėminių duomenų pasiskirstymo analize (4). MLA agaro varianto GEF yra 90×10^{-6} , MLA mikrošulinėlių varianto GEF yra 126×10^{-6} .
63. Jei įvykdomi visi priimtino kriterijai, bandomoji cheminė medžiaga laikoma aiškiai teigiama, jei visomis tiriamomis bandymo sąlygomis (žr. 33 pastraipą) mutacijų dažnio padidėjimas palyginti su vienalaikiu fonu yra didesnis nei GEF ir padidėjimas yra susijęs su koncentracija (pvz., taikant tendencijos kriterijų). Laikoma, kad bandomoji cheminė medžiaga gali sukelti mutacijas šioje bandymų sistemoje.
64. Jei įvykdomi visi priimtino kriterijai, bandomoji cheminė medžiaga laikoma aiškiai neigiama, jei visomis tiriamomis bandymo sąlygomis (žr. 33 pastraipą) nėra su koncentracija susijusio atsako arba, jei padidėja mutacijų dažnis, jis nėra didesnis nei GEF. Laikoma, kad bandomoji cheminė medžiaga negali sukelti mutacijų šioje bandymų sistemoje.

TK6

65. Jei įvykdomi visi priimtino kriterijai, bandomoji cheminė medžiaga laikoma aiškiai teigiama, jei, esant kuriai nors tiriamai bandymo sąlygai (žr. 33 pastraipą):
- bent vienai bandymo koncentracijai gaunamas statistiškai reikšmingas padidėjimas palyginti su vienalaikiu neigiamu kontroliniu ėminiu;
 - padidėjimas yra susijęs su koncentracija, kai įvertinama pagal atitinkamą tendencijos kriterijų (žr. 33 pastraipą);
 - kuris nors iš rezultatų yra už istorinių neigiamų kontrolinių ėminių duomenų skirstinio ribų (pvz., Puasono skirstinio 95 % kontrolinės ribos; žr. 48 pastraipą).

Jei atitinkama visus šiuos kriterijus, laikoma, kad bandomoji cheminė medžiaga gali sukelti mutacijas šioje bandymų sistemoje. Rekomendacijų dėl tinkamiausių statistinių metodų galima rasti literatūroje (66) (67).

66. Jei įvykdomi visi priimtino kriterijai, bandomoji cheminė medžiaga laikoma aiškiai neigiama, jei visomis tiriamomis bandymo sąlygomis (žr. 33 pastraipą):
- jokiai bandymo koncentracijai negaunamas statistiškai reikšmingas padidėjimas palyginti su vienalaikiu neigiamu kontroliniu ėminiu,
 - nėra su koncentracija susijusio padidėjimo, kai įvertinama pagal atitinkamą tendencijos kriterijų,

- visi rezultatai patenka į istorinių neigiamų kontrolinių ėminių duomenų intervalą (pvz., į Puasono skirstinio 95 % kontrolinę ribą; žr. 48 pastraipą).

Laikoma, kad bandomoji cheminė medžiaga negali sukelti mutacijų šioje bandymų sistemoje.

MLA ir TK6:

67. Jei didžiausioji koncentracija pagrįsta citotoksiškumu, RTG/RS esant didžiausiajai koncentracijai turėtų būti nuo 20 % iki 10 %. Susitarta, kad reikėtų atsargiai aiškinti teigiamus rezultatus, kurių RTG/RS būtų tik nuo 20 % iki 10 %, ir rezultatas neturėtų būti laikomas teigiamu, jei mutacijų dažnis padidėtų RTG/RS (jei įvertinamas) esant 10 % arba mažiau (2) (59).
68. Yra kai kurios aplinkybės, kuriomis papildoma informacija gali padėti nustatant, kad cheminė medžiaga nėra mutageninė, kai nėra kultūros, kuriai būtų gauta RTG vertė, atitinkanti nuo 10 % iki 20 % RTG/RS. Šios aplinkybės apibūdinamos taip: 1) nėra mutageniškumo įrodymų (pvz., nėra atsako į dozę, mutacijų dažnis nėra didesnis nei viena laiko neigiamo kontrolinio ėminio arba istorinių fono intervalų ir kt.) keliems duomenų taškams nuo 100 % iki 20 % RTG/RS, taip pat yra mažiausiai vienas duomenų RTG/RS taškas nuo 20 % iki 25 %. 2) nėra mutageniškumo įrodymų (pvz., nėra atsako į dozę, mutacijų dažnis nėra didesnis nei viena laiko neigiamo kontrolinio ėminio arba istorinių fono intervalų ir kt.) keliems duomenų taškams nuo 100 % iki 25 % RTG/RS, taip pat neigiamų duomenų RTG/RS taškas yra šiek tiek mažiau nei 10 %. Abiem šiais atvejais galima daryti išvadą, kad bandomoji cheminė medžiaga yra neigiama.
69. Nėra reikalavimo patikrinti aiškų teigiamą ar neigiamą atsaką.
70. Tais atvejais, kai atsakas nėra aiškiai neigiamas ar aiškiai teigiamas, kaip apibūdinta pirmiau, ir (arba) siekiant padėti nustatyti rezultato biologinę svarbą, duomenys turėtų būti įvertinti pateikiant ekspertų nuomonę ir (arba) atliekant papildomus tyrimus. Galėtų būti naudinga atlikti kartotinį bandymą, galbūt pakeistomis bandymo sąlygomis (pvz., esant kitiems tarpams tarp koncentracijos verčių, kad būtų didesnė tikimybė gauti duomenų taškus 10–20 % RTG/RS intervale, naudojant kitas metabolinio aktyvinimo sąlygas (t. y. S9 koncentraciją ar S9 kilmę)).
71. Retais atvejais, netgi atlikus papildomus tyrimus, gautų duomenų rinkinio nepakaks padaryti išvadą, ar rezultatai yra teigiami ar neigiami. Todėl būtų daroma išvada, kad bandomosios cheminės medžiagos atsakas yra abejotinas (aiškinama, kad jis gali būti vienodai teigiamas ar neigiamas).

BANDYMO ATASKAITA

72. Į bandymo ataskaitą turėtų būti įtraukta ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga:

- šaltinis, partijos numeris, naudojimo pabaigos data, jei yra;
- pačios bandomosios cheminės medžiagos stabilumas, jei žinomas;
- bandomosios cheminės medžiagos tirpumas tirpiklyje ir stabilumas, jei žinomas;
- pH, osmolialumo ir nuosėdų matavimas kultūros terpėje, į kurią bandomoji cheminė medžiaga buvo pridėta, jei reikia.

Vienkomponentė medžiaga:

- fizinė išvaizda, tirpumas vandenyje ir papildomos būdingos fizikinės ir cheminės savybės;
- cheminio identifikavimo duomenys, pvz., IUPAC ar CAS pavadinimas, CAS numeris, SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė, grynumas, cheminis priemaišų pavadinimas, jei tinka bei praktiškai įmanoma ir kt.;

Daugiakomponentė medžiaga, UVCB ir mišiniai:

- kuo išsamesnis sudedamųjų dalių apibūdinimas, nurodant cheminį pavadinimą (žr. pirmiau), kiekybinį paplitimą ir būdingas fizikines ir chemines savybes.

Tirpiklis:

- tirpiklio pasirinkimo pagrindimas;
- tirpiklio galutinėje kultūros terpėje procentinė dalis.

Ląstelės:

laboratorijos pagrindinių kultūrų:

- ląstelių tipas ir šaltinis, istorija bandymų laboratorijoje;
- kariotipo ypatybės ir (arba) modalinis chromosomų skaičius;
- ląstelių kultūros priežiūros metodai;
- ar nėra užkrėstos mikoplazmomis;
- ląstelių dvigubėjimo trukmė.

Bandymo sąlygos:

- ląstelių kultūrų koncentracijos ir skaičiaus pasirinkimo pagrindimas; įskaitant, pvz., citotoksiškumo duomenis ir tirpumo apribojimus;
- terpių sudėtis, CO₂ koncentracija, drėgmės lygis;

- bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, išreikšta kaip galutinė koncentracija kultūros terpėje (pvz., μg ar mg/ml arba mmol/l kultūros terpės).
- tirpiklio ir bandomosios cheminės medžiagos, pridėtos į kultūros terpę, koncentracija (ir (arba) tūris);
- inkubavimo temperatūra;
- inkubavimo trukmė;
- apdorojimo trukmė;
- ląstelių tankis apdorojimo metu,
- metabolinio aktyvinimo sistemos tipas ir sudėtis (S9 šaltinis, S9 mišinio paruošimo metodas, S9 mišinio ir S9 galutinėje kultūros terpėje koncentracija ar tūris, S9 kokybės kontrolės ėminiai);
- teigiamos ir neigiamos kontrolinės cheminės medžiagos, galutinės koncentracijos vertės kiekvienai apdorojimo sąlygai;
- ekspresijos laikotarpio trukmė (įskaitant pasėtų ląstelių skaičių, persėjimų skaičius ir maitinimo tvarkaraščiai, jei reikia),
- atrankos medžiagos identifikavimo duomenys ir jos koncentracija;
- MLA turėtų būti nurodytas naudotas variantas (agaro ar mikrošulinėlio);
- bandymų priimtinumą kriterijai;
- gyvybingų ir mutantinių ląstelių skaičiaus nustatymo metodai,
- citotoksiškumo matavimo metodai,
- visa papildoma informacija, susijusi su citotoksiškumu ir taikomu metodu;
- inkubavimo po sėjimo trukmė;
- kolonijų, kurių dydis ir tipas nagrinėjimas, apibrėžtis (įskaitant „mažų“ ir „didelių“ kolonijų vertinimo kriterijus, jei reikia);
- tyrimų vertinimo kaip teigiamų, neigiamų ar abejotinių kriterijai;
- pH, osmolialumo nustatymo, jei atliekamas, metodai ir nuosėdų nustatymo, jei tinka, metodai.

Rezultatai:

- kiekvienos kultūros apdorotų ląstelių skaičius ir persėjamų ląstelių skaičius;
- toksiškumo parametrai (MLA RTG ir TK6 RS);
- nuosėdų susidarymo požymiai ir nustatymo laikas;
- į atrankiąją ir neatrankiąją terpę pasėtų ląstelių skaičius;

- kolonijų skaičius neatrankiojoje terpėje ir atsparių kolonijų skaičius atrankiojoje terpėje, ir susijęs mutacijų dažnis;
- neigiamų ir teigiamų kontrolinių ėminių ir, jei bandomoji cheminė medžiaga yra teigiama, mažiausiai vienos koncentracijos kolonijų dydžio nustatymas, ir susijęs mutacijų skaičius;
- koncentracijos ir atsako priklausomybė, jei įmanoma,
- vienalaikio neigiamo (tirpiklio) ir teigiamo kontrolinio ėminio duomenys (koncentracijos vertės ir tirpikliai);
- istorinių neigiamų kontrolinių ėminių (tirpiklio) ir teigiamų kontrolinių ėminių duomenys (koncentracijos ir tirpikliai), nurodant intervalus, vidurkius ir standartinius nuokrypius; bandymų, kuriais pagrįsti istorinių kontrolinių ėminių duomenys, skaičius;
- statistinės analizės rezultatai (atskirų kultūrų ir sujungtų kartotinių ėminių, jei reikia), ir p vertės, jei yra; MLA GEF įvertinimas.

Rezultatų aptarimas

Išvada

LITERATŪRA

- (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, Paris.
- (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) JTAP (2001). Stokholmo konvencija dėl patvariųjų organinių teršalų, Jungtinių Tautų aplinkos programa (JTAP).
- (53) Krahm 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. Pateikta [<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.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (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 priedėlis

APIBRĖŽTYS

Aneugenas – cheminė medžiaga arba procesas, kuris dėl sąveikos su mitozinio ir mejozinio ląstelių dalijimosi ciklo komponentais sukelia aneuploidiją ląstelėse ar organizmuose.

Aneuploidija – vienos arba daugiau kaip vienos chromosomų, bet ne viso (-ų) jų rinkinio (-ų) (poliploidija) nukrypimas nuo normalaus diploidinio (arba haploidinio) chromosomų skaičiaus.

Bazių porų pakaitas sukeliantys mutagenai – cheminės medžiagos, sukeliančios DNR molekulės bazių porų pakaitą.

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

Klonavimo efektyvumas – mažų tankiu pasėtų ląstelių, galinčių išaugti į suskaičiuojamų ląstelių koloniją, procentinė dalis.

Klastogenas – cheminė medžiaga ar procesas, sukeliantys struktūrines chromosomų aberacijas ląstelių populiacijose ar organizmuose.

Citotoksiškumas – pagal šio metodo bandymus citotoksiškumas identifikuojamas kaip MLA santykinio bendrojo augimo (RTG) arba TK6 santykinio išgyvenamumo (RS) sumažėjimas.

Tiesioginė mutacija – tėvinio tipo geno mutacija į mutantinę formą, dėl ko pakinta ar išnyksta koduojamo baltymo fermentinis aktyvumas arba funkcija.

Mutagenai, sukeliantys skaitymo rėmelio poslinkį – medžiagos, sukeliančios vienos ar kelių DNR molekulės bazių porų tarpus ar iškritas.

Genotoksinis – bendrasis terminas, kuriuo išreiškiamas visų tipų DNR arba chromosomų pažeidimas, įskaitant DNR trūkius, aduktus, pergrupavimus, mutacijas, chromosomų aberacijas ir aneuploidiją. Ne visų tipų genotoksiniai poveikiai sukelia mutacijas ar pastovų chromosomų pažeidimą.

Mitozinė rekombinacija – rekombinacija tarp homologinių chromatidžių mitozės metu, kuri gali sukelti DNR dviejų grandinių trūkius arba heterozigotiškumo praradimą.

Mutageninis – sukeliantis paveldimą DNR bazinės poros sekos (-ų) pokytį genuose arba chromosomų struktūroje (chromosomų aberacijas).

Mutacijų dažnis – stebimų mutantinių ląstelių skaičius, padalytas iš gyvybingų ląstelių skaičiaus.

Fenotipo ekspresijos trukmė – laikas po apdorojimo, per kurį nustatomas genomo

genetinis pokytis ir visi anksčiau buvusio geno produktai pašalinami tiek, kad pakinta fenotipinis požymis.

Santykinis išgyvenamumas – santykinis išgyvenamumas naudojamas kaip su apdorojimu susijusio citotoksiškumo matas taikant TK6. Tai yra iš karto po apdorojimo sėjamų ląstelių klonavimo efektyvumas (CE), koreguotas dėl ląstelių nuostolių apdorojimo metu, palyginti su neigiamo kontrolinio ėminio klonavimo efektyvumu.

Santykinis suspensijos augimas (RSG) – taikant MLA, bandymo kultūros santykinis bendrasis dviejų dienų suspensijos augimas palyginti su neigiamo ar tirpiklio kontrolinio ėminio dviejų dienų suspensijos augimu (Clive ir Spector, 1975). Į RSG turėtų būti įtrauktas bandymo kultūros santykinis augimas palyginti su neigiamo ar tirpiklio kontrolinio ėminio augimu apdorojimo laikotarpiu.

Santykinis bendrasis augimas (RTG) – RTG yra naudojamas kaip su apdorojimu susijusio citotoksiškumo matas taikant MLA. Tai yra bandymo kultūrų santykinio augimo (nešiklio kontrolinio ėminio atžvilgiu) matas, augimą matuojant apdorojimo, dviejų dienų ekspresijos ir mutantų atrankos klonavimo tarpsniais. Kiekvienos bandymo kultūros RSG dauginamas iš bandymo kultūros santykinio klonavimo efektyvumo mutantų atrankos metu ir išreiškiamas neigiamo ir (arba) tirpiklio kontrolinio ėminio klonavimo efektyvumo atžvilgiu (Clive ir Spector, 1975).

S9 kepenų frakcijos – skystis virš kepenų homogenato, gautas po centrifugavimo esant 9000 g, t. y. žalių kepenų ekstraktas.

S9 mišinys – S9 kepenų frakcijos ir fermentų metaboliniam aktyvumui būtinų kofaktorių mišinys.

Suspensijos augimas (SG) – kartais išreikštas ląstelių skaičiaus padidėjimas per MLA apdorojimo ir ekspresijos tarpsnius. Jei atliekamas trumpalaikis apdorojimas (3 ar 4 h), SG skaičiuojamas per 1 dieną kartais išreikštą padidėjimą dauginant iš per 2 dieną kartais išreikšto padidėjimo. Jei atliekamas 24 h apdorojimas, SG yra kartais išreikštas padidėjimas 24 h apdorojimo laikotarpiu, padaugintas iš kartais išreikšto padidėjimo 1 ir 2 ekspresijos dieną.

Tirpiklio kontrolinis ėminys – bendrasis terminas, apibūdinantis kontrolines kultūras, į kurias dedama vien tik tirpiklio, naudoto bandomajai cheminei medžiagai ištirpinti.

Bandomoji cheminė medžiaga – taikant šį metodą bandoma medžiaga arba mišinys.

Neapdoroti kontroliniai ėminiai – kultūros, kurios neapdorojamos (t. y. į jas nededama bandomosios cheminės medžiagos ar tirpiklio), bet su jomis atliekami veiksmai kaip su kultūromis, į kurias dedama bandomoji cheminė medžiaga.

2 priedėlis

FORMULĖS

Citotoksiškumas

Abiejų MLA variantų (agaro ir mikrošulinėlių)

Citotoksiškumas apibrėžiamas kaip santykinis bendrasis augimas (angl. RTG), kurį sudaro santykinis suspensijos augimas (angl. RSG) 2 dienų ekspresijos laikotarpiu ir santykinis klonavimo efektyvumas (angl. RCE), gautas mutantų atrankos metu. RTG, RSG ir RCE išreiškiami kaip procentinė dalis.

RSG skaičiavimas: suspensijos augimas su indeksu vienas (angl. SG₁) yra augimo santykis tarp 0 ir 1 dienos (ląstelių koncentracija 1 dieną/ląstelių koncentracija 0 dieną), suspensijos augimas su indeksu du (SG₂) yra augimo santykis tarp 1 ir 2 dienos (ląstelių koncentracija 2 dieną/ląstelių koncentracija 1 dieną). Apdorotos kultūros RSG yra bendrasis SG (SG₁ × SG₂) palyginti su neapdorotu ir (arba) tirpiklio kontroliniu ėminiu. Tai yra: $RSG = [SG_{1(test)} \times SG_{2(test)}] / [SG_{1(control)} \times SG_{2(control)}]$. SG₁ turėtų būti skaičiuojamas pagal pradinę ląstelių koncentraciją, naudotą ląstelių apdorojimo pradžioje. Taip atsižvelgiama į bandymo kultūros (-ų) citotoksiškumo skirtumą ląstelių apdorojimo metu.

RCE yra bandymo kultūros santykinis klonavimo efektyvumas palyginti su neapdoroto ir (arba) tirpiklio kontrolinio ėminio klonavimo efektyvumu, gautu mutantų atrankos metu.

Santykinis bendrasis augimas (angl. RTG): $RTG = RSG \times RCE$

TK6

Santykinis išgyvenamumas (angl. RS):

Citotoksiškumas įvertinamas pagal santykinį išgyvenamumą, t. y. iš karto po apdorojimo sėjamų ląstelių klonavimo efektyvumą, koreguotą dėl ląstelių nuostolių apdorojimo metu, palyginti su neigiamų kontrolinių ėminių koreguotu klonavimo efektyvumu (priskirtas 100 % išgyvenamumas). Dėl ląstelių nuostolių apdorojimo metu pakoreguotas klonavimo efektyvumas gali būti apskaičiuotas taip:

$$\text{Pakoreguotas CE} = CE \times \frac{\text{ląstelių skaič. apdorojimo pabaigoje}}{\text{ląstelių skaič. apdorojimo pradžioje}}$$

Bandomąja chemine medžiaga apdorotos kultūros RS apskaičiuojamas taip:

$$RS = \frac{\text{pakoreguotas CE apdorotoje kultūroje}}{\text{pakoreguotas CE tirpiklio kontrolinėje terpėje}} \times 100$$

MLA ir TK6 mutacijų dažnis

Mutacijų dažnis (angl. MF) yra mutantinių kolonijų atrankiojoje terpėje klonavimo efektyvumas (angl. CE_M), pakoreguotas dėl klonavimo efektyvumo neatrankioje terpėje mutantų atrankos metu (angl. CE_V). T. y. $MF = CE_M/CE_V$. Toliau aprašytas šių dviejų klonavimo efektyvumų skaičiavimas taikant agarą ir mikrošulinėlio klonavimo metodus.

MLA agaro variantas: MLA naudojant minkštojo agaro variantą, kolonijų skaičius mutantų atrankos lėkštelėje (C_M) ir kolonijų skaičius neatrankiosios terpės ar klonavimo efektyvumo (gyvybingųjų ląstelių skaičius) lėkštelėje (C_V) gaunamas tiesiogiai suskaičiuojant klonus. Kai klonavimo efektyvumui (CE) į mutantų atrankos (CE_M) lėkšteles bei į neatrankiosios terpės arba klonavimo efektyvumo (gyvybingųjų ląstelių skaičius) lėkšteles (CE_V) sėjama 600 ląstelių ir mutantų atrankai naudojama 3×10^6 ląstelių:

$$CE_M = C_M / (3 \times 10^6) = (C_M/3) \times 10^{-6}$$

$$CE_V = C_V / 600$$

MLA ir TK6 mikrošulinėlių variantas: Naudojant MLA mikrošulinėlių variantą, C_M ir C_V nustatomi kaip viso mikrošulinėlių plokštelių šulinėlių skaičiaus (angl. TW) ir tikėtino vieno šulinėlio kolonijų skaičiaus (angl. P) sandauga.

$$C_M = P_M \times TW_M$$

$$C_V = P_V \times TW_V$$

Pagal Puasono skirstinio nulinį narį (Furth *et al.*, 1981 m.) P gaunamas kaip:

$$P = -\ln(EW/TW)$$

Čia: EW – tuščių šulinėlių skaičius, TW – visų šulinėlių skaičius. Todėl:

$$CE_M = C_M/T_M = (P_M \times TW_M)/T_M$$

$$CE_V = C_V/T_V = (P_V \times TW_V)/T_V$$

Taikant MLA mikrošulinėlių variantą, mažų ir didelių kolonijų mutacijų dažniai apskaičiuojami panašiu būdu, mažoms ir didelėms kolonijoms naudojant reikiamą tuščių šulinėlių skaičių.

Taikant TK6, mažų ir didelių kolonijų mutacijų dažniai nustatomi pagal anksti pasirodanti ir vėlai pasirodanti mutantus.

B.68 TRUMPALAIKĖS EKSPOZICIJOS *IN VITRO* BANDYMO METODAS, SKIRTAS IDENTIFIKUOTI i) CHEMINES MEDŽIAGAS, SUKELIANČIAS RIMTĄ AKIŲ PAŽEIDIMĄ, IR ii) CHEMINES MEDŽIAGAS, KURIŲ NEREIKIA KLASIFIKUOTI DĖL AKIŲ DIRGINIMO AR RIMTO AKIŲ PAŽEIDIMO

IVADAS

1. Šis bandymų metodas atitinka EBPO bandymo gaires (TG) 491 (2017). Trumpalaikės ekspozicijos (angl. STE) bandymo metodas yra *in vitro* metodas, kuris tam tikrais atvejais ir su tam tikrais apribojimais gali būti taikomas cheminių medžiagų (medžiagų ir mišinių), sukeliančių rimtą akių pažeidimą, taip pat cheminių medžiagų, kurių nereikia klasifikuoti dėl rimto akių pažeidimo ar akių dirginimo, pavojų klasifikavimui ir ženklavimui, kaip apibrėžta Jungtinių Tautų (JT) visuotinai suderintoje cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklavimo sistemoje (GHS) (1) ir Europos Sąjungos (ES) Reglamente Nr. 1272/2008 dėl cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo, ženklavimo ir pakavimo (angl. CLP)¹.
2. Daugelį metų cheminių medžiagų pavojaus akims potencialas buvo įvertinamas, dažniausiai atliekant *in vivo* triušio akių bandymą (TM B.5 (8), atitinka EBPO TG 405). Šiuo metu visuotinai pripažįstama, kad artimiausioje ateityje joks atskiras alternatyvus *in vitro* bandymas negalėtų visiškai pakeisti *in vivo* akių bandymo, kad būtų galima prognozuoti visą rimto akių pažeidimo ir (arba) dirginimo atsakų intervalą skirtingoms cheminių medžiagų klasėms. Tačiau pagal (nuosekliųjų) bandymų strategiją naudojamų alternatyvių bandymo metodų strateginiai deriniai gali visiškai pakeisti triušių akių bandymą (2). Žemynkryptis metodas yra skirtas bandyti cheminėms medžiagoms, kurios, kaip būtų galima tikėtis, atsižvelgiant į turimą informaciją, gali turėti dideli dirginimo potencialą arba sukelti rimtą akių pažeidimą. Priešingai, aukštynkryptis metodas yra skirtas bandyti cheminėms medžiagoms, kurios, kaip būtų galima tikėtis, atsižvelgiant į turimą informaciją, nesukeltų pakankamai didelio akių dirginimo, kurį reikėtų klasifikuoti. Nors nemanoma, kad STE bandymo metodas gali visiškai pakeisti *in vivo* triušių akių bandymą, jį galima taikyti kaip reglamentavimo klasifikavimui ir ženklavimui skirtos nuosekliųjų bandymo strategijos dalį, pvz., žemynkryptį ir (arba) aukštynkryptį metodą, kad be papildomų bandymų būtų galima identifikuoti i) chemines medžiagas, sukeliančias

¹ 2008 m. gruodžio 16 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentas (EB) Nr. 1272/2008 dėl cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo, ženklavimo ir pakavimo, iš dalies keičiantis ir panaikinantis direktyvas 67/548/EEB bei 1999/45/EB ir iš dalies keičiantis Reglamentą (EB) Nr. 1907/2006, OL L 353, 2008 12 31.

rimtą akių pažeidimą (JT GHS ir CLP 1 kategorijos) ir ii) chemines medžiagas (išskyrus labai lakias medžiagas ir visas kietąsias chemines medžiagas, neįskaitant paviršinio aktyvumo medžiagų), kurių nereikia klasifikuoti dėl akių dirginimo ar rimto akių pažeidimo (JT GHS ir CLP *Be kategorijos*) (1) (2). Tačiau cheminę medžiagą, kurios taikant STE bandymo metodą negalima priskirti prie sukeliančių rimtą akių pažeidimą (JT GHS ir CLP 1 kategorija) arba prie JT GHS ir CLP *Be kategorijos* (nesukelia rimto akių pažeidimo arba akių dirginimo), reikėtų papildomai bandyti, kad būtų nustatytas galutinis klasifikavimas. Be to, reikėtų pasitarti su atitinkamomis reglamentuojančiomis institucijomis prieš taikant STE kaip aukštynkryptį metodą pagal kitas nei JT GHS ir CLP klasifikavimo schemas. Tinkamiausio bandymo metodo pasirinkimas ir šio bandymo metodo taikymas turėtų būti vertinamas atsižvelgiant į EBPO rekomendacinį dokumentą dėl rimto akių pažeidimo ir akių dirginimo integruotųjų bandymo ir vertinimo metodų (14).

3. Šio bandymo metodo tikslas – aprašyti procedūras, skirtas įvertinti bandomosios cheminės medžiagos pavojaus akims potencialą, pagrįstą gebėjimu sukelti citotoksiškumą, taikant trumpalaikės ekspozicijos bandymo metodą. Cheminių medžiagų citotoksinis poveikis ragenos epitelio ląstelėms yra svarbus veikimo būdas, sukeliantis ragenos epitelio pažeidimą ir akių dirginimą. Ląstelių gyvybingumas taikant STE bandymo metodą vertinamas pagal gyvųjų audinių dažiklio MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromido), taip pat vadinamo tiazolilo mėlynuoju, tetrazolinio bromidu, fermentinį virsmą veikiant gyvybingoms ląstelėms į mėlynos spalvos formazano druską, kiekybiškai nustatomą po ekstrakcijos iš ląstelių (3). Gautas ląstelių gyvybingumas lyginamas su tirpiklio kontroliniam ėminiui gautu gyvybingumu (santykinis gyvybingumas) ir yra naudojamas įvertinant galimą bandomosios cheminės medžiagos pavojų akims. Bandomoji cheminė medžiaga klasifikuojama kaip JT GHS ir CLP 1 kategorijos, kai abiem 5 % ir 0,05 % koncentracijoms gautas ląstelių gyvybingumas yra mažesnis kaip arba lygus ($\leq$) 70 %. Ir priešingai, cheminė medžiaga prognozuojama kaip JT GHS ir CLP *Be kategorijos*, kai abiem 5 % ir 0,05 % koncentracijoms gautas ląstelių gyvybingumas yra didesnis kaip ($>$) 70 %.
4. Šiame bandymo metode vartojamas terminas *bandomoji cheminė medžiaga* reiškia tai, kas yra bandoma, ir nėra susijęs su STE bandymo metodo tinkamumu bandyti medžiagas ir (arba) mišinius. Apibrėžtys pateiktos priedėlyje.

PRADINIAI ASPEKTAI IR APRIBOJIMAI

5. Šis bandymo metodas pagrįstas *Kao Corporation* (4) parengtu protokolu, kuris buvo dviejų skirtingų patvirtinimo tyrimų objektas: vieną atliko Japonijos alternatyvių bandymų su gyvūnais asociacijos (JSAAE) patvirtinimo komitetas (5) ir Japonijos alternatyvių metodų patvirtinimo centras (JaCVAM) (6). Ekspertizę atliko

NICEATM/ICCVAM pagal bandymo metodo patvirtinimo tyrimų ataskaitas ir bendruosius apžvalginius dokumentus (7).

6. Kai STE bandymo metodas taikomas rimtą akių pažeidimą sukeliančioms cheminėms medžiagoms (medžiagoms ir mišiniams) (JT GHS ir CLP 1 kategorijos) identifikuoti (1), duomenų, gautų 125 cheminėms medžiagoms (įskaitant medžiagas ir mišinius), bendrasis tikslumas palyginti su *in vivo* triušio akių bandymu (7) yra 83 % (104/125), klaidingai teigiamų rezultatų dalis – 1 % (1/86) ir klaidingai neigiamų rezultatų dalis – 51 % (20/39). Pagal šį metodą gauta klaidingai neigiamų rezultatų dalis nėra labai svarbi, nes visos bandomosios cheminės medžiagos, kurioms gaunamas ≤ 70 % ląstelių gyvybingumas esant 5 % koncentracijai, ir > 70 % esant 0,05 % koncentracijai, vėliau būtų bandomos pagal tinkamai patvirtintus *in vitro* bandymo metodus arba, kaip paskutinį variantą, atliekant *in vivo* triušio akių bandymą, priklausomai nuo reglamentavimo reikalavimų ir pagal šiuo metu rekomenduojamą nuosekliųjų bandymų strategiją bei įrodomosios duomenų galios metodus (1) (8). Daugiausia buvo bandomos vienkomentės medžiagos, nors yra šiek tiek duomenų apie mišinių bandymus. Bandymų metodas vis dėlto techniškai tinka daugiakomponentėms medžiagoms ir mišiniams bandyti. Tačiau, prieš taikant bandymų metodą mišiniui, kad būtų gauti numatomo reglamentavimo tikslui skirti duomenys, reikėtų panagrinėti, ar metodu galima pasiekti tą tikslą atitinkančius rezultatus ir, jei taip, dėl kokios priežasties. Tokie svarstymai nereikalingi, kai yra reglamentavimo reikalavimas bandyti mišinį. STE bandymo metodas neturėjo kitų specifinių trūkumų, jį taikant bandomosioms cheminėms medžiagoms identifikuoti kaip JT GHS ir CLP 1 kategorijos medžiagas. Tyrėjai, kurie taiko šį bandymo metodą bandomosioms cheminėms medžiagoms, galėtų spręsti, ar ≤ 70 % ląstelių gyvybingumas, esant 5 % ir 0,05 % koncentracijai turėtų būti priimtas kaip rimtą akių pažeidimą sukeliančio atsako rodiklis ir cheminę medžiagą reikėtų klasifikuoti kaip JT GHS ir CLP 1 kategorijos, neatliekant papildomų bandymų.
7. Kai STE bandymo metodas buvo taikomas identifikuoti cheminėms medžiagoms (medžiagoms ir mišiniams), kurių nereikia klasifikuoti dėl akių dirginimo ir rimto akių pažeidimo (JT GHS ir CLP *Be kategorijos*) (1), 130 cheminėms medžiagoms (įskaitant medžiagas ir mišinius) gautų duomenų bendrasis tikslumas palyginti su *in vivo* triušio akių bandymu (7) yra 85 % (110/130), klaidingai teigiamų rezultatų dalis – 12 % (9/73) ir klaidingai neigiamų rezultatų dalis – 19 % (11/57). Jei iš duomenų rinkinio pašalinamos labai lakios medžiagos ir kietosios medžiagos, išskyrus paviršinio aktyvumo medžiagas, bendrasis tikslumas padidėja iki 90 % (92/102), klaidingai neigiamų rezultatų dalis – 2 % (1/54) ir klaidingai teigiamų rezultatų dalis – 19 % (9/48) (7). Todėl galimi STE bandymo metodo trūkumai identifikuojant tas bandomąsias chemines medžiagas, kurių nereikia klasifikuoti dėl akių dirginimo ir rimto akių pažeidimo (JT GHS ir CLP *Be kategorijos*) yra didelė klaidingai neigiamų

rezultatų dalis i) labai lakių medžiagų, kurių garų slėgis didesnis kaip 6 kPa, ir ii) kietųjų cheminių medžiagų (medžiagų ir mišinių), išskyrus paviršinio aktyvumo medžiagas ir tik iš paviršinio aktyvumo medžiagų sudarytus mišinius. Tokios cheminės medžiagos neįtrauktos į STE bandymo metodo taikymo sritį (7).

8. Be 6 ir 7 pastraipose nurodytų cheminių medžiagų, STE bandymo metodu gautų vidinių duomenų rinkinyje taip pat yra 40 mišinių duomenys, kurių tikslumas palyginti su *in vivo Draize* akių bandymu yra 88 % (35/40), klaidingai teigiamų rezultatų dalis – 50 % (5/10) ir klaidingai neigiamų – 0 % (0/30) (9), kai daroma prognozė dėl mišinių, kurių nereikia klasifikuoti pagal JT GHS ir CLP klasifikavimo sistemas (9). Todėl STE bandymo metodas gali būti taikomas kaip apribojimo dėl kietųjų medžiagų išplėtimas JT GHS ir CLP *Be kategorijos* mišiniams identifikuoti aukštynkrypčiu metodu, išskyrus kietųjų medžiagų mišinius, kitus nei paviršinio aktyvumo medžiagų mišiniai. Be to, mišinius, turinčius cheminių medžiagų, kurių garų slėgis didesnis kaip 6 kPa, reikėtų vertinti atsargiai, kad būtų išvengta galimos sumažintos prognozės, ir reikėtų pagrįsti kiekvienu atveju atskirai.
9. STE bandymo metodas negali būti taikomas bandomosioms cheminėms medžiagoms identifikuoti kaip JT GHS ir CLP 2 kategorijos, arba JT GHS 2A (akių dirginimas) ar 2B (nestiprus akių dirginimas) kategorijos, dėl didelio skaičiaus JT GHS ir CLP 1 kategorijos cheminių medžiagų, kurioms gaunama sumažinta prognozė jas priskiriant 2, 2A ar 2B kategorijai, bei JT GHS ir CLP *Be kategorijos* cheminių medžiagų, kurioms gaunama padidinta prognozė jas priskiriant 2, 2A ar 2B kategorijai (7). Šiuo tikslu gali prireikti papildomų bandymų taikant kitą tinkamą metodą.
10. STE bandymo metodas tinka bandomosioms cheminėms medžiagoms, kurios tirpsta fiziologiniame tirpale, 5 % dimetilsulfoksido tirpale (DMSO) fiziologiniame tirpale arba mineralinėje alyvoje, arba gaunama ne mažiau kaip 5 minutes patvari vienalytė suspensija. STE bandymo metodas netinka bandomosioms cheminėms medžiagoms, kurios netirpsta fiziologiniame tirpale, 5 % DMSO fiziologiniame tirpale arba mineralinėje alyvoje, arba negaunama ne mažiau kaip 5 minutes patvari vienalytė suspensija. Pagal STE bandymo metodą galima naudoti mineralinę alyvą dėl mažos ekspozicijos trukmės. Todėl STE bandymo metodas tinka vandenyje netirpių bandomųjų cheminių medžiagų (pvz., ilgos grandinės sočiųjų alkoholių ar ketonų) pavojaus akims potencialui prognozuoti, jei jos maišosi bent su vienu iš pirmiau nurodytų trijų tirpiklių (4).

11. Šiame bandymo metode vartojamas terminas *bandomoji cheminė medžiaga* reiškia tai, kas yra bandoma¹¹ ir nėra susijęs su STE bandymo metodo tinkamumu bandyti medžiagas ir (arba) mišinius.

BANDYMO PRINCIPAS

12. STE bandymo metodas yra citotoksiškumu pagrįstas *in vitro* bandymas, atliekamas naudojant susiliejančio monoslauksnio *Statens Seruminstitut Rabbit Cornea* (SIRC) ląsteles, auginamas 96 šulinėlių mikroplokštelėje iš polikarbonato (4). Po penkių minučių veikimo bandomąją chemine medžiaga citotoksiškumas kiekybiškai matuojamas kaip SIRC ląstelių santykinis gyvybingumas, atliekant MTT bandymą (4). Sumažėjęs ląstelių gyvybingumas naudojamas galimo neigiamo, akių pažeidimą sukeliančio poveikio prognozei.
13. Pranešama, kad 80 % į triušio akį įlašinto tirpalo pasišalina per junginės maišelį per tris ar keturias minutes, nors daugiau kaip 80 % į žmogaus akį įlašinto tirpalo pasišalina per vieną ar dvi minutes (10). Taikant STE bandymo metodą mėginama suartinti šias ekspozicijos trukmes ir citotoksiškumą naudoti kaip vertinamąją baigtį vertinant SIRC ląstelėms padarytą pažeidimą po penkių minučių veikimo bandomąją chemine medžiaga.

KVALIFIKACIJOS ĮRODYMAS

14. Prieš pradėdamos taikyti šiame bandymo metode aprašytą STE metodą įprastiniu būdu, laboratorijos turėtų įrodyti savo techninę kvalifikaciją, teisingai klasifikuodamos vienuolika cheminių medžiagų, rekomenduojamų 1 lentelėje. Šios medžiagos buvo pasirinktos, kad būtų reprezentuojamas visas atsako į rimtą akių pažeidimą arba akių dirginimą intervalas, pagrįstas *in vivo* triušio akių bandymų (TG 405) rezultatais ir JT GHS ir CLP klasifikavimo sistema (1). Kitais pasirinkimo kriterijais yra galimybė medžiagų nusipirkti ir aukštos kokybės *in vivo* etaloninių duomenų bei aukštos kokybės *in vitro* STE bandymo metodo duomenų buvimas (3). Tais atvejais, kai sąraše nurodytos medžiagos nėra arba, jei būtų pagrįsta, gali būti naudojama kita medžiaga, kuriai turimi tinkami *in vivo* ir *in vitro* etaloniniai duomenys, jei taikomi čia aprašyti atrankos kriterijai.

¹ 2013 m. birželio mėn. bendrajame posėdyje buvo sutarta, kad, jei įmanoma, terminas *bandomosios cheminės medžiagos*, apibūdinantis tai, kas yra bandoma, dabar turėtų būti vartojamas nuosekliau rengiant naujus ir atnaujintus bandymo metodus.

1 lentelė. Kvalifikacijai įrodyti skirtų cheminių medžiagų sąrašas

Medžiaga	CASRN	Cheminių medžiagų klasė ¹	Agregatinė būsena	<i>In vivo</i> JT GHS ir CLP 2 kat.	STE bandymo tirpiklis	STE JT GHS ir CLP Kat.
Benzalkonio chloridas (10 %, vandeninis)	8001-54-5	Onio junginys	Skystis	1 kategorija	Fiziologinis tirpalas	1 kategorija
Triton X-100 (100 %)	9002-93-1	Eteris	Skystis	1 kategorija	Fiziologinis tirpalas	1 kategorija
Rūgštinis raudonasis 92	18472-87-2	Heterociklinis junginys; bromo junginys; chloro junginys	Kietoji medžiaga	1 kategorija	Fiziologinis tirpalas	1 kategorija
Natrio hidroksidas	1310-73-2	Šarmas; neorganinė cheminė medžiaga	Kietoji medžiaga	1 kategorija ³	Fiziologinis tirpalas	1 kategorija
Butirolaktonas	96-48-0	Laktonas; heterociklinis junginys	Skystis	2A kategorija (CLP 2 kategorija)	Fiziologinis tirpalas	Prognozės pateikti negalima
1-oktanolis	111-87-5	Alkoholis	Skystis	2A/B kategorija ⁴ (CLP 2 kategorija)	Mineralinė alyva	Prognozės pateikti negalima
Ciklopentanolis	96-41-3	Alkoholis Angliavandenis, ciklinis	Skystis	2A/B kategorija ⁵ (CLP 2 kategorija)	Fiziologinis tirpalas	Prognozės pateikti negalima
2-etoksietilacetatas	111-15-9	Alkoholis; eteris	Skystis	<i>Be kategorijos</i>	Fiziologinis tirpalas	<i>Be kategorijos</i>
Dodekanas	112-40-3	Alifatinis angliavandenis	Skystis	<i>Be kategorijos</i>	Mineralinė alyva	<i>Be kategorijos</i>
Metilizobutylketonas	108-10-1	Ketonas	Skystis	<i>Be kategorijos</i>	Mineralinė alyva	<i>Be kategorijos</i>
N,N-dimetilguanidino sulfatas	598-65-2	Amidinas; sieros junginys	Kietoji medžiaga	<i>Be kategorijos</i>	Fiziologinis tirpalas	<i>Be kategorijos</i>

Santrumpos: CASRN – Cheminių medžiagų santrumpų tarnybos registro numeris.

¹ Cheminė klasė buvo priskirta naudojant iš ankstesnių NICEATM leidinių paimtą informaciją, ir, jei jos nėra, naudojant Nacionalinės medicinos bibliotekos Vaistų medicininių dalykines antraštes (MeSH[®]) (per ChemIDplus[®] (Nacionalinė medicinos biblioteka) adresu <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>) ir NICEATM nustatytas struktūras.

² Pagal *in vivo* triušio akies bandymo (EBPO TG 405) rezultatus, bei naudojant JT GHS ir CLP (1).

³ Priskyrimas 1 kategorijai pagrįstas 100 % natrio hidroksido (įtraukto į EBPO TG 435 kaip kvalifikacijai įrodyti skirta odą esdinanti cheminė medžiaga) odos esdinimo potencialu bei JT GHS ir CLP 1 kategorijos kriterijumi (1).

⁴ Klasifikavimas kaip 2A ar 2B priklauso nuo JT GHS kriterijaus šioms dviem kategorijoms atskirti aiškinimo, t. y. poveikis 7 dieną 2 iš 6 gyvūnų palyginti su 4 iš 6 gyvūnų, kuris yra būtinas norint klasifikuoti kaip 2A kategorijos. *In vivo* duomenų

rinkinį sudarė 2 tyrimų su 3 gyvūnais kiekviename duomenys. Atliekant vieną tyrimą dviem iš trijų gyvūnų pasireiškė poveikis 7 dieną, todėl reikia klasifikuoti kaip 2A kategorijos (11), tuo tarpu, kai atliekant antrąjį tyrimą visų trijų gyvūnų visos vertinamosios baigtys grįžo prie nulinių verčių, todėl reikia klasifikuoti kaip 2B kategorijos (12).

⁵ Klasifikavimas kaip 2A ar 2B priklauso nuo JT GHS kriterijaus šioms dviem kategorijoms atskirti aiškinimo, t. y. poveikis 7 dieną 1 iš 3 gyvūnų palyginti su 2 iš 3 gyvūnų, kuris yra būtinas norint klasifikuoti kaip 2A kategorijos. Atliekant *in vivo* tyrimą, naudoti 3 gyvūnai. Visos vertinamosios baigtys, išskyrus vieno gyvūno ragenos drumstumą ir junginės paraudimą, grįžo prie nulinių verčių 7 parą arba anksčiau. Vieno gyvūno, kuris ne visiškai atsigavo iki 7 dienos, ragenos drumstumo balas buvo 1 ir junginės paraudimo balas buvo 1 (7 dieną), bet visiškai atsigavo 14 dieną (11).

PROCEDŪRA

Ląstelių monosluoksnio ruošimas

15. Taikant STE metodą reikėtų naudoti triušių ragenos ląstelių liniją SIRC. Rekomenduojama SIRC ląstelės gauti iš reikalavimus atitinkančio ląstelių banko, pvz., *American Type Culture Collection CCL60*.
16. SIRC ląstelės auginamos 37 °C temperatūros, 5 % CO₂ ir drėgnos atmosferos sąlygomis kolboje su kultūros terpe, sudaryta iš Eagle minimalios mitybos terpės (MEM), papildyta 10 % galvijų vaisiaus kraujo serumu (FBS), 2 mmol/l L-glutamino, 50–100 vienetų/ml penicilino ir 50–100 µg/ml streptomicino. Kultūros kolboje susiliejusios ląstelės turėtų būti atskirtos naudojant tripsino ir etilediamintetraacto rūgšties tirpalą, naudojant ląstelių grandiklį arba jo nenaudojant. Ląstelės dauginamos (pvz., nuo 2 iki 3 sėjimų) kultūros kolboje prieš jas naudojant įprastiniam bandymui, ir sėjimų skaičius po atitirpinimo neturėtų būti didesnis kaip 25.
17. Ruošiamos STE bandymui naudojamos ląstelės ir reikiamu tankiu sėjamos į 96 šulinėlių plokšteles. Rekomenduojamas ląstelių sėjimo tankis yra $6,0 \times 10^3$ ląstelių vienam šulinėliui, jei ląstelės naudojamos praėjus 4 dienoms nuo sėjimo, arba $3,0 \times 10^3$ ląstelių vienam šulinėliui, jei ląstelės naudojamos praėjus 5 dienoms nuo sėjimo, kai kultūros tūris 200 µl. STE bandymui naudojamos ląstelės, sėjamos atitinkamu tankiu kultūros terpėje, iki bandymo pradžios, t. y. per keturias ar penkias dienas nuo sėjimo, pasiekia didesnę kaip 80 % susiliejamą.

Bandomųjų cheminių medžiagų ir kontrolinių cheminių medžiagų uždėjimas

18. Kaip pirmas tirpiklis bandomųjų cheminių medžiagų tirpalams ar suspensijoms ruošti pasirenkamas fiziologinis tirpalas. Jei bandomosios cheminės medžiagos tirpumas fiziologiniame tirpale yra mažas arba negalima gauti ne mažiau kaip penkias minutes patvarią vienalytę suspensiją, kaip antras tirpiklis pasirenkamas 5 % DMSO (CAS Nr. 67-68-5) tirpalas fiziologiniame tirpale. Jei bandomosios cheminės medžiagos netirpsta fiziologiniame tirpale arba 5 % DMSO fiziologiniame tirpale, arba juose negali būti gauta ne mažiau kaip penkias minutes patvari vienalytė suspensija, kaip trečias tirpiklis pasirenkama mineralinė alyva (CAS Nr. 8042-47-5).

19. Ruošiamas bandomųjų cheminių medžiagų 5 % (m/m) koncentracijos tirpalas arba vienalytė suspensija pasirinktame tirpiklyje ir nuosekliai skiedžiama 10 kartų 0,5 % ir 0,05 % koncentracijai gauti. Kiekviena bandomoji cheminė medžiaga turi būti bandoma 5 % ir 0,05 % koncentracijos. 96 šulinėlių plokštelėje augintos ląstelės veikiamos kambario temperatūroje penkias minutes 200 µl/šulinėliui 5 % arba 0,05 % koncentracijos bandomosios cheminės medžiagos tirpalu (arba suspensija). Bandomosios cheminės medžiagos (vienkomponentės ar daugiakomponentės arba mišiniai) laikomos grynosiomis medžiagomis ir skiedžiamos arba jų suspensija ruošiama pagal metodą, neatsižvelgiant į jų grynumą.
20. Auginimo terpė, aprašyta 16 pastraipoje, naudojama kaip terpės kontrolinis ėminys kiekvieno kartotinio bandymo kiekvienoje plokštelėje. Be to, ląstelės taip pat turi būti veikiamos tirpiklio kontroliniais ėminiais kiekvieno kartotinio bandymo kiekvienoje plokštelėje. Buvo patvirtinta, kad 18 pastraipoje nurodyti tirpikliai nedaro neigiamo poveikio SIRC ląstelių gyvybingumui.
21. Taikant STE bandymo metodą, kaip teigiamas kontrolinis ėminys kiekvieno kartotinio bandymo kiekvienoje plokštelėje turi būti naudojamas 0,01 % natrio laurilsulfato (SLS) tirpalas fiziologiniame tirpale. Kad būtų galima apskaičiuoti teigiamų kontrolinių ėminių ląstelių gyvybingumą, kiekvieno kartotinio bandymo kiekvienoje plokštelėje turi būti fiziologinio tirpalo kontrolinis ėminys.
22. Turi būti naudojamas tuščiasis ėminys optinio tankio kompensacijai nustatyti ir tai turėtų būti atliekama naudojant šulinėlius tik su fiziologiniu tirpalu fosfatiname buferiniame tirpale, kuriame nebūtų kalcio ir magnio jonų arba ląstelių.
23. Atliekant kiekvieną kartotinį bandymą, kiekvienas ėminys (bandomosios cheminės medžiagos, 5 % ir 0,05 % koncentracijos, terpės, tirpiklio ir teigiamas kontrolinis ėminys) turi būti bandomas tris kartus, ląsteles penkias minutes laikant kambario temperatūroje 200 µl atitinkamos bandomosios arba kontrolinės cheminės medžiagos tirpale.
24. Palyginamosios medžiagos yra naudingos, kai reikia įvertinti tam tikrai cheminių medžiagų arba gaminių klasei priskiriamų nežinomų cheminių medžiagų gebą dirginti akis, arba akis dirginančios medžiagos santykinę dirginimo gebą tam tikrame atsako į dirginimą intervale.

Ląstelių gyvybingumo matavimas

25. Po ekspozicijos ląstelės plaunamos du kartus 200 µl PBS ir įpilama 200 µl MTT tirpalo (0,5 mg MTT/ml kultūros terpės). Po dviejų valandų trukmės reakcijos inkubatoriuje (37 °C, 5 % CO₂), MTT tirpalas dekantuojamas, MTT formazanas ekstrahuojamas tamsoje kambario temperatūroje 60 min, įpilant 200 µl 0,04 mol/l vandenilio chlorido rūgšties tirpalo izopropanolyje, ir MTT formazano tirpalo optinis

tankis matuojamas plokštelių spektrofotometru, esant 570 nm bangos ilgiui. Bandomųjų cheminių medžiagų (spalvotųjų medžiagų arba tiesioginių MTT reduktorių) trukdžiai atliekant MTT bandymą yra tik tokiu atveju, jei po ekspozicijos išplautoje bandymo sistemoje lieka reikšmingas bandomosios medžiagos kiekis, ir tai pasitaiko su 3D rekonstruotais žmogaus ragenos ar rekonstruoto žmogaus epidermio audiniais, bet nėra būdinga 2D ląstelių kultūroms, naudojamoms STE bandymo metode.

Rezultatų aiškinimas ir prognozavimo modelis

26. Gautos kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos optinio tankio (OT) vertės naudojamos ląstelių gyvybingumui skaičiuoti atžvilgiu tirpiklio kontrolinio ėminio, kurio gyvybingumas prilygintas 100 %. Santykinis ląstelių gyvybingumas išreiškiamas kaip procentinė dalis, ir gaunamas bandomosios cheminės medžiagos OT dalijant iš tirpiklio kontrolinio ėminio OT, iš abiejų verčių prieš tai atėmus tuščiojo ėminio OT.

$$\text{Ląstelių gyvybing. (\%)} = \frac{(\text{band. medž. OT}_{570}) - (\text{tuščio OT}_{570})}{(\text{tirpiklio kontr. OT}_{570}) - (\text{tuščio OT}_{570})} \times 100$$

Kiekvieno tirpiklio kontrolinio ėminio santykinis ląstelių gyvybingumas taip pat išreiškiamas kaip procentinė dalis ir gaunamas kiekvieno tirpiklio kontrolinio ėminio OT dalijant iš terpės kontrolinio ėminio OT, iš abiejų verčių prieš tai atėmus tuščiojo ėminio OT.

27. Turėtų būti atlikti trys kartotiniai bandymai, kiekvienu atveju naudojant tris kartotinius šulinėlius (t. y. $n = 9$). Santykinio ląstelių gyvybingumo aritmetinis vidurkis skaičiuojamas naudojant kiekvieno kartotinio bandymo trijų kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos ir tirpiklio kontrolinių ėminių šulinėlių vidurkį. Galutinis aritmetinis ląstelių gyvybingumo vidurkis skaičiuojamas kaip trijų nepriklausomų kartotinių bandymų vidurkis.
28. Ląstelių gyvybingumo ribinės vertės, pagal kurias bandomosios cheminės medžiagos identifikuojamos kaip sukeliančios rimtą akių pažeidimą (JT GHS ir CLP 1 kategorija) ir bandomosios cheminės medžiagos, kurių nereikia klasifikuoti dėl akių dirginimo ar rimto akių pažeidimo (JT GHS ir CLP *Be kategorijos*), pateiktos toliau.

2 lentelė. STE bandymo metodo prognozavimo modelis

Ląstelių gyvybingumas		JT GHS ir CLP klasifikavimas	Taikomumas
esant 5 %	esant 0,05 %		
> 70 %	> 70 %	<i>Be kategorijos</i>	Medžiagos ir mišiniai, išskyrus: i) labai lakias medžiagas, kurių garų slėgis

			didesnis kaip 6 kPa ¹ ir ii) kietasis chemines medžiagas (medžiagas ir mišinius), išskyrus paviršinio aktyvumo medžiagas ir tik iš paviršinio aktyvumo medžiagų sudarytus mišinius
≤ 70 %	> 70 %	Prognozės pateikti negalima	Netaikoma
≤ 70 %	≤ 70 %	1 kategorija	Medžiagos ir mišiniai ²

¹ Mišinius, turinčius cheminių medžiagų, kurių garų slėgis didesnis kaip 6 kPa, reikėtų vertinti atsargiai, kad būtų išvengta galimos sumažintos prognozės, ir reikėtų pagrįsti kiekvienu atveju atskirai.

² Atsižvelgiant į rezultatus, daugiausia gautus vienkomentems medžiagoms, nors yra nedidelis kiekis mišinių bandymo duomenų. Bandymų metodas vis dėlto techniškai tinka daugiakomponentėms medžiagoms ir mišiniams bandyti. Prieš taikant bandymų metodą mišiniui, kad būtų gauti numatomo reglamentavimo tikslui skirti duomenys, reikėtų panagrinėti, ar šiuo metodu galima pasiekti tą tikslą atitinkančius rezultatus ir, jei taip, tai dėl kokios priežasties. Tokie svarstymai nereikalingi, kai yra reglamentavimo reikalavimas bandyti mišinį.

Priimtumo kriterijai

29. Laikoma, kad rezultatai turi būti priimtini, kai jie atitinka visus tokius kriterijus:

- Terpės kontrolinio ėminio (veikiamo kultūros terpe) optinis tankis, atėmus tuščiojo ėminio optinį tankį, turėtų būti 0,3 arba didesnis.
- Tirpiklio kontroliniam ėminiui gautas gyvybingumas terpės kontrolinio ėminio gyvybingumo atžvilgiu turėtų būti 80 % arba didesnis. Jei atliekant kiekvieną kartotinį bandymą naudojami kartotiniai tirpiklio kontroliniai ėminiai, kiekvienam iš jų gautas ląstelių gyvybingumas turėtų būti didesnis kaip 80 %, kad būtų galima klasifikuoti bandomąsias chemines medžiagas, bandomas naudojant šiuos tirpiklius.
- Teigiamam kontroliniam ėminiui (0,01 % SLS) gautas ląstelių gyvybingumas neturėtų nukrypti nuo istorinio vidurkio daugiau kaip per du standartinius nuokrypius. Viršutinė ir apatinė teigiamo kontrolinio ėminio priimtumo ribos turėtų būti dažnai atnaujinamos, t. y. kas tris mėnesius, arba laboratorijoje kiekvieną kartą atliekamas priimtinas, jei bandymai atliekami nedažnai (t. y. rečiau kaip kartą per mėnesį). Jei laboratorijos atliekamų bandymų skaičius nėra pakankamas statistiškai pagrįstam teigiamų kontrolinių ėminių pasiskirstymui gauti, priimtina, kad būtų naudojamos metodo kūrėjo nustatytos viršutinė ir apatinė priimtumo ribos, t. y. nuo 21,1 % iki 62,3 % pagal jo laboratorijos istorinius duomenis, kai vidinis pasiskirstymas gaunamas per pirmuosius įprastinius bandymus.
- Galutinio ląstelių gyvybingumo, gauto atliekant tris nepriklausomus kartotinius bandymus, standartinis nuokrypis turėtų būti mažesnis kaip 15 % abiem 5 % ir 0,05 % bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos vertėms.

Jei rezultatai neatitinka vieno ar kelių šių kriterijų, jie turėtų būti atmesti ir atlikti dar trys nepriklausomi kartotiniai bandymai.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Duomenys

30. Ataskaitoje turi būti pateiktos kiekvieno atskiro kartotinio bandymo kiekvienam atskiram šulinėliui gautos vertės (pvz., ląstelių gyvybingumo vertės), taip pat bendrasis vidurkis, standartinis nuokrypis (SN) ir klasifikavimas.

Bandymo ataskaita

31. Į bandymo ataskaitą turėtų būti įtraukta ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga ir kontrolinės medžiagos

- Vienkomponentė medžiaga: cheminio identifikavimo duomenys, pvz., IUPAC ar CAS pavadinimas (-ai), CAS registro numeris (-iai), SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė ir (arba) kiti identifikavimo duomenys;
- daugiakomponentė medžiaga, UVCB ir mišinys: kuo išsamesnis sudedamųjų dalių apibūdinimas, pvz., cheminis pavadinimas (žr. pirmiau), grynumas, kiekybinis paplitimas bei būdingos fizikinės ir cheminės savybės, atsižvelgiant į turimus duomenis;
- agregatinė būsena, lakumas, pH, LogP, molekulinė masė, cheminių medžiagų klasė ir papildomos fizikinės ir cheminės savybės, susijusios su tyrimo atlikimu, kiek įmanoma išsamiau;
- grynumas, cheminis priemaišų pavadinimas, jei tinka ir praktiškai įmanoma, kt.;
- apdorojimas prieš bandymą, jei taikomas (pvz., šildymas, malimas);
- laikymo sąlygos ir stabilumas, atsižvelgiant į turimus duomenis.

Bandymo metodo sąlygos ir procedūros

- rėmėjo pavadinimas ir adresas, bandymų laboratorija ir tyrimo vadovas;
- taikyto bandymo metodo aprašymas;
- naudota ląstelių linija, jos šaltinis, bandymui naudotų ląstelių sėjimų skaičius ir susiliejo laipsnis;
- išsamūs taikytos procedūros duomenys;
- atliktų kartotinių bandymų ir naudotų kartotinių ėminių skaičius;
- bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos vertės (jei skiriasi nuo rekomenduojamų);
- kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos tirpiklio pasirinkimo pagrindimas;

- ekspozicijos bandomajai cheminei medžiagai trukmė (jei skiriasi nuo rekomenduojamų);
- visų bandymo procedūros pakeitimų aprašymas;
- taikytų įvertinimo ir sprendimo priėmimo kriterijų aprašymas;
- nuoroda į istorinių teigiamų kontrolinių ėminių vidurkį ir standartinį nuokrypį (SN);
- bandymo metodo taikymo laboratorijoje kvalifikacijos įrodymas (pvz., bandant kvalifikacijai įrodyti skirtas medžiagas) arba bandymo metodo taikymo charakteristikų atkuriamumo ilgą laiką įrodymas.

Rezultatai:

- Lentelėse turėtų būti pateiktos kiekvienos koncentracijos kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos ir kontrolinės medžiagos atskiros OT vertės, gautos kartotiniam šulinėliui, kiekvieno nepriklausomo kartotinio bandymo OT aritmetinio vidurkio vertės, kiekvieno nepriklausomo kartotinio bandymo ląstelių gyvybingumo vertės % bei galutinis visų trijų kartotinių bandymų ląstelių gyvybingumo aritmetinis vidurkis % ir SN;
- terpės, tirpiklio ir teigiamo kontrolinio ėminio rezultatai, įrodantys tinkamus tyrimo priimtinumą kriterijus;
- kitų pastebėtų reiškinių aprašymas;
- gautas bendrasis klasifikavimas su nuoroda į naudotą prognozavimo modelį ir (arba) į taikytus sprendimo priėmimo kriterijus.

Rezultatų aptarimas

Išvados

LITERATŪRA

- (1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Pateikta 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. Pateikta [http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf].
- (8) Šio priedo B.5 skyrius. Ūmus akių dirginimas ar ėsdinimas.
- (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). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (14) OECD (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 263). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

Priedėlis

APIBRĖŽTYS

Tikslumas – bandymo metodo rezultatų ir patvirtintų pamatinių verčių sutapimo artumas. Tikslumas yra bandymo metodo taikymo charakteristikų matas ir vienas iš tinkamumo aspektų. Terminas dažnai vartojamas kaip lygiavertis terminui „sutapimas“ ir reiškia tinkamų bandymo metodo rezultatų dalį (13).

Palyginamoji medžiaga – medžiaga, naudojama kaip etalonas lyginant su bandomąja chemine medžiaga. Palyginamoji medžiaga turi turėti tokias savybes: i) pastovų (-ius) ir patikimą (-us) šaltinį (-ius); ii) jos struktūrinės ir funkcinės savybės turi būti panašios į bandomųjų medžiagų klasės savybes; iii) žinomas fizikines ir (arba) chemines charakteristikas; iv) žinomą poveikį patvirtinančius duomenis ir v) žinomą veikimo gebą reikiamo atsako intervale.

Aukštynkryptis metodas – pakopinis metodas, taikomas bandomajai cheminei medžiagai, apie kurią daroma prielaida, kad jos nereikia klasifikuoti dėl akių dirginimo arba rimto akių pažeidimo, kai cheminės medžiagos, kurių nereikia klasifikuoti (duoda neigiamą rezultatą), nustatomos pradedant nuo kitų cheminių medžiagų (duoda teigiamą rezultatą).

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

Akių dirginimas – akių pokyčių atsiradimas uždėjus bandomosios cheminės medžiagos ant priekinio akies paviršiaus, kurie visiškai išnyksta per 21 parą nuo uždėjimo. Lygiavertis terminui *grįžtamasis poveikis akims* ir JT GHS ir CLP 2 kategorija.

Klaidingai neigiamų rezultatų dalis – visų teigiamų cheminių medžiagų, kurios taikant bandymų metodą klaidingai identifikuotos kaip neigiamos, dalis. Tai yra vienas iš bandymo metodo taikymo charakteristikų rodiklių.

Klaidingai teigiamų rezultatų dalis – visų neigiamų cheminių medžiagų, kurios taikant bandymų metodą klaidingai identifikuotos kaip teigiamos, dalis. Tai yra vienas iš bandymo metodo taikymo charakteristikų rodiklių.

Pavojus – būdingoji agento savybė arba situacija, galinti sukelti neigiamų padarinių, kai organizmą, sistemą ar populiaciją (arba jos dalį) veikia tas agentas.

Terpės kontrolinis ėminys – neapdorotas kartotinis ėminys, turintis visus bandymo sistemos komponentus. Šis ėminys tiriamas kartu su bandomąja chemine medžiaga apdorotais ėminiais ir kitais kontroliniais ėminiais, siekiant nustatyti, ar vyksta tirpiklio sąveika su bandymo sistema.

Mišinys – dviejų ar daugiau cheminių medžiagų mišinys ar tirpalas.

Vienkomponentė medžiaga – medžiaga, kurią apibrėžia jos kiekybinė sudėtis, kai

vienas pagrindinis komponentas sudaro ne mažiau kaip 80 % (masės).

MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolinio bromidas; tiazolilo mėlynasis, tetrazolinio bromidas.

Daugiakomponentė medžiaga – medžiaga, kurią apibrėžia jos kiekybinė sudėtis, kai daugiau kaip vieno pagrindinio komponento koncentracija ≥ 10 % (masės) ir < 80 % (masės). Daugiakomponentė medžiaga yra gamybos proceso rezultatas. Skirtumas tarp mišinio ir daugiakomponentės medžiagos yra tas, kad mišinys gaunamas sumaišant dvi medžiagas arba daugiau nevykstant cheminei reakcijai. Daugiakomponentė medžiaga yra cheminės reakcijos rezultatas.

OT – optinis tankis.

Teigiamas kontrolinis ėminys – kartotinis ėminys, turintis visus bandymo sistemos komponentus ir apdorotas chemine medžiaga, kuri yra žinoma kaip sukelianti teigiamą atsaką. Siekiant užtikrinti galimybę vertinti teigiamo kontrolinio ėminio atsako kintamumą per tam tikrą laiką, teigiamas atsakas neturėtų būti per stiprus.

Tinkamumas – santykio tarp bandymo ir tiriamo poveikio apibūdinimas bei bandymo reikšmingumo ir naudingumo siekiant tam tikro tikslo nustatymas. Tai yra atliekant bandymą tiriamo biologinio poveikio matavimo ar prognozavimo tikslumo laipsnis. Tinkamumas aprėpia bandymo metodo tikslumo (atitikties) aspektą (10).

Patikimumas – pagal tą patį protokolą atliekamo bandymų metodo, ilgą laiką taikomo laboratorijose ir tarp laboratorijų, atkuriamumo laipsnio matas. Jis įvertinamas apskaičiuojant atkuriamumą laboratorijoje ir tarp laboratorijų ir pakartojamumą laboratorijoje (13).

Jautris – visų teigiamų ir (arba) veikliųjų cheminių medžiagų, kurios yra tinkamai klasifikuotos atliekant bandymą, dalis. Jis yra bandymo metodo, kuriuo gaunami su kategorija susiję rezultatai, tikslumo matas ir svarbus aspektas vertinant bandymo metodo tinkamumą (10).

Rimtas akių pažeidimas – akies audinio pažeidimas arba rimtas fizinis regėjimo pablogėjimas, ant išorinio akies paviršiaus uždėjus bandomosios cheminės medžiagos, kuris ne visiškai išnyksta per 21 dieną nuo uždėjimo. Lygiavertis terminui *negrįžtamasis poveikis akims* ir JT GHS 1 kategorija.

Tirpiklio ar nešiklio kontrolinis ėminys – visus bandymo sistemos komponentus, įskaitant tirpiklį ar nešiklį, turintis neapdorotas ėminys, kuris tiriamas kartu su bandomąja chemine medžiaga apdorotais ėminiais ir kitais kontroliniais ėminiais, siekiant nustatyti atskaitos vertę ėminiams, apdorotiems bandomąja chemine medžiaga, ištirpinta tame pačiame tirpiklyje ar nešiklyje. Kai bandomas kartu su vienalaikiu terpės kontroliniu ėminiu, šis ėminys taip pat parodo, ar vyksta tirpiklio arba nešiklio sąveika su bandymo sistema.

Specifiškumas – visų neigiamų ar neveikliųjų cheminių medžiagų, kurios yra tinkamai

klasifikuotos atliekant bandymą, dalis. Jis yra bandymo metodo, kuriuo gaunami su kategorija susiję rezultatai, tikslumo matas ir svarbus aspektas vertinant bandymo metodo tinkamumą (13).

Medžiaga – natūralus arba gamybos proceso metu gautas cheminis elementas ir cheminių elementų junginys, įskaitant priedus, reikalingus jo stabilumui išlaikyti, ir priemaišas, atsirandančias gaminant, išskyrus tirpiklius, kurie gali būti atskirti nedarant poveikio cheminės medžiagos stabilumui ar nepakeičiant jos sudėties;

Paviršinio aktyvumo medžiaga – dar vadinama paviršinio aktyvumo agentu, tai yra medžiaga, pvz., ploviklis, kuri gali sumažinti skysčio paviršiaus įtempį, kad skystis galėtų putoti ar prasiskverbti į kietąsias medžiagas; be to, ji žinoma drėkiklio pavadinimu.

Bandomoji cheminė medžiaga – taikant šį metodą bandoma medžiaga arba mišinys.

Nuosekliųjų bandymų strategija – pakopomis atliekamų bandymų strategija, kai tam tikra eilės tvarka nagrinėjama visa turima informacija apie bandomąją cheminę medžiagą, kiekvienoje pakopoje taikant įrodomosios vertės analizės procesą, siekiant nustatyti, ar yra pakankamai duomenų sprendimui dėl pavojingumo kategorijos priimti, prieš pereinant prie kitos pakopos. Jei bandomajai cheminei medžiagai dirginamąją gebą galima priskirti atsižvelgiant į turimą informaciją, papildomų bandymų atlikti nereikia. Jei, atsižvelgiant į turimą informaciją, bandomajai cheminei medžiagai dirginamosios gebos priskirti neįmanoma, nuosekliųjų bandymų su gyvūnais procedūra taikoma tol, kol būtų galima gauti neabejotiną klasifikavimą.

Žemynkryptis metodas – pakopinis metodas, taikomas bandomajai cheminei medžiagai, apie kurią daroma prielaida, kad ji sukelia rimtą akių pažeidimą, kai cheminės medžiagos, kurios sukelia rimtą akių pažeidimą (duoda teigiamą rezultatą), nustatomos pradedant nuo kitų cheminių medžiagų (duoda neigiamą rezultatą).

Jungtinių Tautų visuotinai suderinta cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklavimo sistema (JT GHS) – sistema, kurioje pateikiamas cheminių medžiagų (medžiagų ir mišinių) klasifikavimas pagal standartizuotus fizikinių pavojų, pavojų sveikatai bei aplinkai tipus ir nagrinėjami atitinkami informaciniai elementai, pvz., piktogramos, signaliniai žodžiai, pavojingumo frazės, atsargumo frazės ir saugos duomenų lapai, kad būtų galima informuoti apie medžiagų neigiamą poveikį, siekiant apsaugoti žmones (įskaitant darbuotojus, darbininkus, vežėjus, vartotojus ir avarių likvidatorius) ir aplinką (1).

JT GHS ir CLP 1 kategorija – žr. *Rimtas akių pažeidimas*.

JT GHS ir CLP 2 kategorija – žr. *Akių dirginimas*.

JT GHS ir CLP be kategorijos – cheminės medžiagos, kurios neklasifikuojamos kaip JT GHS ir CLP 1 arba 2 kategorijos (arba JT GHS 2A arba 2B kategorijos).

UVCB – nežinomos ar kintamos sudėties medžiagos, sudėtingųjų reakcijų

produktai ar bioloģinēs medžiagos.

B.69 REKONSTRUOTO ŽMOGAUS RAGENOS SAVYBIŲ EPITELIO (RhCE) BANDYMO METODAS, SKIRTAS IDENTIFIKUOTI CHEMINĖMS MEDŽIAGOMS, KURIŲ NEREIKIA KLASIFIKUOTI IR ŽENKLINTI DĖL AKIŲ DIRGINIMO ARBA RIMTO AKIŲ PAŽEIDIMO

IVADAS

1. Šis bandymų metodas atitinka EBPO bandymo gaires (angl. TG) 492 (2017). *Rimtu akių pažeidimu* vadinamas akies audinio pažeidimas arba rimtas fizinis regėjimo pablogėjimas, ant išorinio akies paviršiaus uždėjus bandomosios cheminės medžiagos, kuris ne visiškai išnyksta per 21 dieną nuo uždėjimo, kaip apibrėžta Jungtinių Tautų (JT) visuotinai suderintoje cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklinimo sistemoje (angl. GHS) (1) ir Europos Sąjungos (ES) Reglamente Nr. 1272/2008 dėl cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo, ženklinimo ir pakavimo (angl. CLP)¹. Taip pat pagal JT GHS ir CLP *akių dirginimas* yra akių pokyčių atsiradimas uždėjus bandomosios cheminės medžiagos ant priekinio akies paviršiaus, kurie visiškai išnyksta per 21 parą nuo uždėjimo. Rimtą akių pažeidimą sukeliančios bandomosios cheminės medžiagos klasifikuojamos kaip JT GHS ir CLP 1 kategorijos, sukeliančios akių dirginimą – kaip JT GHS ir CLP 2 kategorijos. Bandomosios cheminės medžiagos, neklasifikuojamos kaip dirginančios akis ar sukeliančios smarkų akių pažeidimą, apibrėžiamos kaip medžiagos, kurios neatitinka JT GHS 1 arba 2 kategorijos (2A ar 2B) klasifikavimo reikalavimų, t. y. jos nurodomos kaip JT GHS ir CLP *Be kategorijos*.
2. Atliekant rimto akių pažeidimo ir (arba) akių dirginimo vertinimą paprastai buvo naudojami laboratoriniai gyvūnai (TM B.5 (2)). Tinkamiausio bandymo metodo pasirinkimas ir šio bandymo metodo taikymas turėtų būti vertinamas atsižvelgiant į EBPO rekomendacinį dokumentą dėl rimto akių pažeidimo ir akių dirginimo integruotųjų bandymo ir vertinimo metodų (39).
3. Šiame bandymo metode aprašoma *in vitro* procedūra, kurią taikant galima identifikuoti chemines medžiagas (medžiagas ir mišinius), kurių nereikia klasifikuoti ir ženklinti dėl akių dirginimo ar rimto akių pažeidimo pagal JT GHS ir CLP. Taikant metodą naudojamas rekonstruotas žmogaus ragenos savybių epitelis (angl. RhCE), kuris labai tiksliai atkartoja histologines, morfologines, biochemines ir fiziologines

¹ 2008 m. gruodžio 16 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentas (EB) Nr. 1272/2008 dėl cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo, ženklinimo ir pakavimo, iš dalies keičiantis ir panaikinantis direktyvas 67/548/EEB bei 1999/45/EB ir iš dalies keičiantis Reglamentą (EB) Nr. 1907/2006, OL L 353, 2008 12 31.

žmogaus ragenos epitelio savybes. Yra patvirtinti kiti keturi *in vitro* bandymo metodai, laikomi moksliskai pagrįstais ir priimti kaip B.47 (3), B.48 (4), B.61 (5) ir B.68 bandymo metodai (6), kad būtų tiriamas akių pažeidimas ir (arba) dirginimas kaip žmogaus sveikatos vertinamoji baigtis.

4. Į šį bandymo metodą įtraukti du patvirtinti bandymai, kuriems atlikti naudojami prekyboje esantys RhCE modeliai. Akių dirginimo ir (arba) rimto akių pažeidimo vertinimo patvirtinimo tyrimai buvo vykdomi (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) atliekant EpiOcular™ akių dirginimo bandymą (EIT) ir SkinEthic™ žmogaus ragenos epitelio (HCE) akių dirginimo bandymą (EIT). Atliekant abu šiuos bandymus kaip bandymo sistema naudojami prekyboje esantys RhCE audinių dariniai, kurie toliau tekste nurodomi kaip patvirtinti pamatiniai metodai – PPM1 ir PPM2. Pagal šių patvirtinimo tyrimų ir jų nepriklausomos ekspertizės rezultatus (9) (12) buvo prieita prie išvados, kad naudojant EpiOcular™ EIT ir SkinEthic™ HCE EIT galima teisingai identifikuoti chemines medžiagas (medžiagas ir mišinius), kurių nereikia klasifikuoti ir ženklinti dėl akių dirginimo ar rimto akių pažeidimo pagal JT GHS, ir bandymai buvo rekomenduoti šiam tikslui kaip moksliskai pagrįsti (13).
5. Šiuo metu visuotinai pripažįstama, kad artimiausioje ateityje joks atskiras *in vitro* bandymo metodas negalėtų visiškai pakeisti *Draize* akių bandymo *in vivo* (2) (14), kad būtų galima prognozuoti visą rimto akių pažeidimo ir (arba) dirginimo atsakų intervalą skirtingoms cheminių medžiagų klasėms. Tačiau pagal (nuosekliųjų) bandymų, pvz., aukštynkrypčių ir (arba) žemynkrypčių metodų, strategiją naudojamų kelių alternatyvių bandymo metodų strateginiai deriniai gali visiškai pakeisti *Draize* akių bandymą (15). Aukštynkryptį metodą (15) numatoma taikyti tada, kai atsižvelgiant į turimą informaciją manoma, kad cheminė medžiaga nepakankamai dirgina akis, dėl ko ją reikėtų klasifikuoti, o žemynkryptį metodą (15) numatoma taikyti tada, kai atsižvelgiant į turimą informaciją manoma, kad cheminė medžiaga gali sukelti rimtą akių pažeidimą. EpiOcular™ EIT ir SkinEthic™ HCE EIT rekomenduojami kaip bandymo strategijos dalis, kad būtų galima identifikuoti chemines medžiagas, kurių nereikia klasifikuoti dėl akių dirginimo arba rimto akių pažeidimo pagal JT GHS ir CLP (*Be kategorijos*), neatliekant papildomų bandymų, pvz., Scott *et al.* pasiūlytą aukštynkryptį ar žemynkryptį metodą, pvz., kaip pradinę aukštynkrypčio metodo pakopą arba kaip vieną iš paskutinių žemynkrypčio metodo pakopų (15). Tačiau EpiOcular™ EIT ir SkinEthic™ HCE EIT netaikomi nustatant skirtumą tarp JT GHS ir CLP 1 kategorijos (rimtas akių pažeidimas) bei JT GHS ir CLP 2 kategorijos (akių dirginimas). Šiam atskyrimui reikės taikyti kitą bandymų strategijos pakopą (15). Jei naudojant EpiOcular™ EIT arba SkinEthic™ HCE EIT nustatoma, kad bandomąją cheminę medžiagą reikia klasifikuoti dėl akių dirginimo arba rimto akių pažeidimo, turėtų būti atlikti papildomi bandymai (*in vitro* ir (arba) *in*

vivo), taikant, pvz., TM B.47, B.48, B.61 arba B.68, kad būtų gauta galutinė išvada (JT GHS ir CLP Be kategorijos, 2 kategorijos ar 1 kategorijos).

6. Šio bandymo metodo tikslas – aprašyti procedūras, skirtas įvertinti bandomosios cheminės medžiagos pavojaus akims potencialą, pagrįstą gebėjimu sukelti RhCE audinio darinio citotoksiškumą, matuojamą atliekant MTT bandymą (16) (žr. 21 pastraipą). RhCE audinio gyvybingumas po apdorojimo bandomąja chemine medžiaga nustatomas lyginant su audiniais, apdorotais neigiama kontroline medžiaga (gyvybingumo %) ir toliau ji naudojamas bandomosios cheminės medžiagos pavojaus akims potencialui prognozuoti.
7. Yra naudojimo charakteristikų standartai (17), kurie padėtų atlikti į EpiOcular™ EIT ir SkinEthic™ HCE EIT panašių naujų ar modifikuotų, *in vitro* RhCE pagrįstų bandymo metodų patvirtinimą, atsižvelgiant į EBPO rekomendacinio dokumento Nr. 34 principus (18), kad būtų galima laiku atlikti EBPO TG 492 pakeitimą dėl jų įtraukimo. Abipusis duomenų pripažinimas pagal EBPO susitarimą bus užtikrintas tik bandymams, patvirtintiems pagal naudojimo charakteristikų standartus, jei šiuos bandymus EBPO peržiūrėtų ir įtrauktų į atitinkamas bandymo gaires.

APIBRĖŽTYS

8. Apibrėžtys pateiktos 1 priedėlyje.

PRADINIAI ASPEKTAI IR APRIBOJIMAI

9. Taikant šį bandymo metodą naudojami prekyboje esantys trimačiai RhCE audinio dariniai, kurie gaminami naudojant pirminius žmogaus epidermio keratinocitus (t. y. EpiOcular™ OCL-200) arba imortalizuotas žmogaus ragenos epitelio ląsteles (t. y. SkinEthic™ HCE/S). EpiOcular™ OCL-200 ir SkinEthic™ HCE/S RhCE audinio dariniai yra panašūs į *in vivo* ragenos epitelio trimatę struktūrą ir gaminami naudojant tiriamų rūšių ląsteles (19) (20). Be to, bandymais tiesiogiai matuojamas citotoksiškumas dėl cheminės medžiagos prasiskverbimo per rageną ir sukkelto ląstelių bei audinio pažeidimo; pagal citotoksinį atsaką nustatomas bendrasis *in vivo* rimtas akių pažeidimo arba akių dirginimo rezultatas. Ląstelės gali būti pažeistos veikiant keliais būdais (žr. 20 pastraipą), bet citotoksiškumas vaidina svarbų, jei ne svarbiausią mechanizmo požiūriu vaidmenį nustatant bendrąjį rimto akių pažeidimo arba akių dirginimo atsaką į cheminę medžiagą, pasireiškiantį *in vivo* daugiausia kaip ragenos drumstumas, rainelės uždegimas, junginės paraudimas ir (arba) junginės chemozė, nepriklausomai nuo audinio pažeidimą sukėlusių fizikinių ir cheminių procesų.
10. Atliekant šio bandymo metodo patvirtinimą buvo bandoma didelė cheminių medžiagų grupė, aprėpianti įvairius cheminių medžiagų tipus, klases, molekulinės mases, logP,

cheminės struktūras ir kt. EpiOcular™ EIT patvirtinimo duomenų bazę iš viso sudarė 113 cheminių medžiagų, aprėpiančių 95 skirtingų organinių funkcinių grupių pagal EBPO QSAR taikomųjų programų analizę (8). Dauguma šių cheminių medžiagų buvo vienkomentės medžiagos, tačiau į tyrimą taip pat buvo įtrauktos kelios daugiakomentės medžiagos (įskaitant 3 homopolimerus, 5 kopolimerus ir 10 kvazispolimerų). Atsižvelgiant į agregatinę būseną bei JT GHS ir CLP kategorijas, 113 bandytų cheminių medžiagų buvo paskirstytos taip: 1 kategorijos skysčių – 13, 1 kategorijos kietųjų medžiagų – 15, 2A kategorijos skysčių – 6, 2A kategorijos kietųjų medžiagų – 10, 2B kategorijos skysčių – 7, 2B kategorijos kietųjų medžiagų – 7, *Be kategorijos* skysčių – 27, *Be kategorijos* kietųjų medžiagų – 28 (8). SkinEthic™ HCE EIT patvirtinimo duomenų bazę iš viso sudarė 200 cheminių medžiagų, aprėpiančių 165 skirtingų organinių funkcinių grupių (8) (10) (11). Dauguma šių cheminių medžiagų buvo vienkomentės medžiagos, tačiau į tyrimą taip pat buvo įtrauktos kelios daugiakomentės medžiagos (įskaitant 10 polimerų). Atsižvelgiant į agregatinę būseną bei JT GHS ir CLP kategorijas, 200 bandytų cheminių medžiagų buvo paskirstytos taip: 1 kategorijos skysčių – 27, 1 kategorijos kietųjų medžiagų – 24, 2A kategorijos skysčių – 19, 2A kategorijos kietųjų medžiagų – 10, 2B kategorijos skysčių – 9, 2B kategorijos kietųjų medžiagų – 8, *Be kategorijos* skysčių – 50, *Be kategorijos* kietųjų medžiagų – 53 (10) (11).

11. Šis bandymo metodas taikomas medžiagoms ir mišiniams, kietosioms medžiagoms, skysčiams, pusiau kietoms medžiagoms ir vaškam. Skysčiai gali būti vandeniniai arba nevandeniniai; kietosios medžiagos gali būti tirpios arba netirpios vandenyje. Jei įmanoma, kietąsias medžiagas prieš bandymą reikėtų sumalti; jokio kito ėminio parengiamojo apdorojimo atlikti nereikia. Atliekant patvirtinimo tyrimą, dujos ir aerozoliai nebuvo vertinami. Nors, kaip atrodo, dujas ir aerozolius būtų galima bandyti taikant RhCE procedūrą, dabartinis metodas jų bandymams nėra pritaikytas.
12. Bandomosios cheminės medžiagos, kurių šviesos absorbcijos sritis (natūraliai arba po apdorojimo) sutampa su MTT formazano, ir bandomosios cheminės medžiagos, kurios gali tiesiogiai redukuoti gyvųjų audinių dažiklį MTT (į MTT formazaną), gali trukdyti matuoti audinių gyvybingumą, todėl koregavimui turi būti naudojami pritaikyti kontroliniai ėminiai. Pritaikytų kontrolinių ėminių, kurių gali prireikti, tipas skirsis priklausomai nuo cheminės medžiagos sukiamų trukdžių ir nuo MTT formazano kiekybinio nustatymo procedūros (žr. 36–42 pastraipas).
13. Rezultatai, gauti atliekant parengiamojo patvirtinimo (21) (22) ir patvirtinimo (8) (10) (11) tyrimus, parodė, kad EpiOcular™ EIT ir SkinEthic™ HCE EIT galima perkelti į bandymų atlikimo patirties neturinčias laboratorijas ir rezultatai būtų atkuriami laboratorijų viduje ir tarp laboratorijų. Atsižvelgiant į šiuos tyrimus, tikėtinas EpiOcular™ EIT prognozių sutapimo atkuriamumo lygis, gautas pagal 113 cheminių medžiagų duomenis, laboratorijų viduje yra 95 %, tarp laboratorijų – 93 %. Tikėtinas

SkinEthic™ HCE EIT prognozių sutapimo atkuriamumo lygis, gautas pagal 120 cheminių medžiagų duomenis, laboratorijų viduje yra 92 %, tarp laboratorijų – 95 %.

14. EpiOcular™ EIT gali būti taikomas identifikuoti cheminėms medžiagoms, kurių nereikia klasifikuoti dėl akių dirginimo ir rimto akių pažeidimo pagal JT GHS ir CLP klasifikavimo sistemą. Atsižvelgiant į patvirtinimo tyrimo duomenis (8), EpiOcular™ EIT gautas bendrasis tikslumas yra 80 % (112 cheminių medžiagų), jautris – 96 % (57 cheminėms medžiagoms), klaidingai neigiamų rezultatų dalis – 4 % (57 cheminėms medžiagoms), specifiškumas – 63 % (55 cheminėms medžiagoms) ir klaidingai teigiamų rezultatų dalis – 37 % (55 cheminėms medžiagoms), palyginti su etaloniniais *in vivo* triušio akių bandymu duomenimis (B.5 bandymo metodas) (2) (14), klasifikuojamais pagal JT GHS ir CLP klasifikavimo sistemą. 97 skystųjų agrocheminių mišinių bandymo EpiOcular™ EIT tyrimas parodė, kad metodo taikymo šio tipo mišiniams charakteristikos yra panašios į gautas atliekant patvirtinimo tyrimą (23). 97 mišiniai, klasifikuojami pagal etaloninius *in vivo* triušio akių bandymu duomenis (B.5 bandymo metodas) (2) (14), taikant JT GHS klasifikavimo sistemą, buvo paskirstyti taip: 1 kategorijos – 21, 2A kategorijos – 19, 2B kategorijos – 14 ir *Be kategorijos* – 43. Gautas bendrasis tikslumas yra 82 % (97 mišiniams), jautris – 91 % (54 mišiniams), klaidingai neigiamų rezultatų dalis – 9 % (54 mišiniams), specifiškumas – 72 % (43 mišiniams) ir klaidingai teigiamų rezultatų dalis – 28 % (43 mišiniams) (23).
15. SkinEthic™ HCE EIT gali būti taikomas identifikuoti cheminėms medžiagoms, kurių nereikia klasifikuoti dėl akių dirginimo ir rimto akių pažeidimo pagal JT GHS ir CLP klasifikavimo sistemą. Atsižvelgiant į patvirtinimo tyrimo duomenis (10) (11), SkinEthic™ HCE EIT gautas bendrasis tikslumas yra 84 % (200 cheminių medžiagų), jautris – 95 % (97 cheminėms medžiagoms), klaidingai neigiamų rezultatų dalis – 5 % (97 cheminėms medžiagoms), specifiškumas – 72 % (103 cheminėms medžiagoms) ir klaidingai teigiamų rezultatų dalis – 28 % (103 cheminėms medžiagoms), palyginti su etaloniniais *in vivo* triušio akių bandymu duomenimis (B.5 bandymo metodas) (2) (14), klasifikuojamais pagal JT GHS ir CLP klasifikavimo sistemą.
16. Bendroji tikimybė, kad, atliekant medžiagų ir mišinių kartotinius RhCE bandymus, cheminės medžiagos bus klaidingai neigiamai identifikuotos kaip JT GHS ir CLP 2 kategorijos arba JT GHS ir CLP *Be kategorijos* pagal *in vivo Draize* akių bandymą yra mažesnė kaip 12 %; taip yra dėl metodui būdingo pakartojamumo (24). Pagal šiuos abu RhCE metodus medžiagoms ar mišiniams gauta klaidingai teigiamų rezultatų dalis nėra labai svarbi, nes visas bandomąsias chemines medžiagas, kurioms gautas audinių gyvybingumas yra lygus arba mažesnis nei nustatytos ribinės vertės (žr. 44 pastraipą), reikės toliau bandyti pagal kitus *in vitro* bandymo metodus, arba, kaip paskutinį variantą, atliekant bandymą su triušiais, priklausomai nuo reglamentavimo reikalavimų, įrodomosios duomenų galios metodui taikant

nuosekliųjų bandymų strategiją. Šie bandymo metodai gali būti taikomi visų tipų cheminėms medžiagoms, kai neigiamą rezultatą reikėtų priimti kaip įrodymą, kad cheminės medžiagos nereikia klasifikuoti dėl akių dirginimo ir rimto akių pažeidimo (JT GHS ir CLP *Be kategorijos*). Reikėtų pasitarti su atitinkamomis reglamentuojančiomis institucijomis prieš taikant EpiOcular™ EIT ir SkinEthic™ HCE EIT pagal kitas nei JT GHS ir CLP klasifikavimo schemas.

17. Šio bandymo metodo ribotumas – jį taikant negalima atskirti akių dirginimą arba grįžtamąjį poveikį akims (2 kategorija) ir rimtą akių pažeidimą arba negrįžtamą poveikį akims (1 kategorija), kaip apibrėžta JT GHS ir CLP, arba akis dirginančias medžiagas (neprivaloma 2A kategorija) ir nestipriai akis dirginančias medžiagas (neprivaloma 2B kategorija), kaip apibrėžta JT GHS (1). Todėl teks papildomai bandyti taikant kitus *in vitro* bandymo metodus.
18. Šiame bandymo metode vartojamas terminas *bandomoji cheminė medžiaga*¹ reiškia tai, kas yra bandoma, ir nėra susijęs su RhCE bandymo metodo tinkamumu bandyti medžiagas ir (arba) mišinius.

BANDYMO PRINCIPAS

19. Bandomoji cheminė medžiaga uždedama ant ne mažiau kaip dviejų trimačio RhCE audinio darinių ir, pasibaigus ekspozicijos bei inkubavimo po apdorojimo laikotarpiui, matuojamas gyvybingumas. RhCE audiniai rekonstruojami ir pirminių žmogaus epidermio keratinocitų arba iš imortalizuotų žmogaus ragenos epitelio ląstelių, kurios auginamos keletą dienų, kad susidarytų sluoksniuotas ir gerai diferencijuotas žvynuotas epitelis, morfologiškai panašus į žmogaus ragenos epitelį. EpiOcular™ RhCE audinio darinį sudaro ne mažiau kaip 3 gyvybingi ląstelių sluoksniai ir nesuragėjęs paviršius, turintis į rageną panašią struktūrą, analogišką randamai *in vivo*. SkinEthic™ HCE RhCE audinio darinį sudaro ne mažiau kaip 4 gyvybingi ląstelių sluoksniai, įskaitant cilindrines pagrindo ląsteles, tarpines dygliuotąsias ląsteles ir paviršines žvynuotas ląsteles, panašias į normalaus žmogaus ragenos epitelio ląsteles (20) (26).
20. Cheminių medžiagų sukeltas rimtas akių pažeidimas ir (arba) akių dirginimas, pasireiškiantis *in vivo* daugiausia kaip ragenos drumstumas, rainelės uždegimas,

¹ 2013 m. birželio mėn. EBPO bendrajame posėdyje buvo sutarta, kad, jei įmanoma, terminas *bandomosios cheminės medžiagos*, apibūdinantis tai, kas yra bandoma, dabar turėtų būti vartojamas nuosekliau rengiant naujas ir atnaujintas EBPO bandymo gaires.

junginės paraudimas ir (arba) junginės chemozė, yra įvykių sekos, kurios pradžia yra cheminės medžiagos prasiskverbimas pro rageną ir (arba) junginę ir ląstelių pažeidimas, rezultatas. Yra keli ląstelių pažeidimo būdai: ląstelių membranos lizė (pvz., paviršinio aktyvumo medžiagomis, organiniais tirpikliais); makromolekulių koaguliacija (ypač baltymų) (pvz., paviršinio aktyvumo medžiagomis, organiniais tirpikliais, šarmais ir rūgštimis); lipidų muilinimas (pvz., šarmais); ir alkilinimas arba kitokia kovalentinė sąveika su makromolekulėmis (pvz., cheminiais balikliais, peroksidaais ir alkilinimo agentais) (15) (27) (28). Bet yra įrodyta, kad citotoksiškumas vaidina svarbų, jei ne svarbiausią mechanizmo požiūriu vaidmenį nustatant bendrąjį rimto akių pažeidimo arba akių dirginimo atsaką į cheminę medžiagą, nepriklausomai nuo audinio pažeidimą sukėlusių fizikinių ir cheminių procesų (29) (30). Be to, cheminės medžiagos rimto akių pažeidimo arba dirginimo potencialą daugiausia lemia pradinio sužeidimo laipsnis (31), kuris koreliuoja su ląstelių žūties laipsniu (29), su vėlesnių atsakų laipsniu ir galutiniais rezultatais (32). Taigi, silpnai dirginančios medžiagos paprastai veikia tik paviršinį ragenos epitelį, nestipriai ir vidutiniškai dirginančios medžiagos daugiausia pažeidžia epitelį ir paviršinę stromą, o stipriai dirginančios medžiagos pažeidžia epitelį, giliau esančią stromą ir kartais ragenos endotelį (30) (33). RhCE audinio darinio gyvybingumo po vietinio bandomosios cheminės medžiagos uždėjimo matavimas, turint tikslą identifikuoti chemines medžiagas, kurių nereikia klasifikuoti dėl rimto akių pažeidimo arba akių dirginimo (JT GHS ir CLP *Be kategorijos*), grindžiamas prielaida, kad visos cheminės medžiagos, sukeliančios rimtą akių pažeidimą arba akių dirginimą, sukeltų ragenos epitelio ir (arba) junginės citotoksiškumą.

21. RhCE audinio gyvybingumas klasikiniu būdu matuojamas pagal gyvųjų audinių dažiklio MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromido, tiazolilo mėlynojo, tetrazolinio bromido, CAS Nr. 298-93-1), fermentinį virsmą veikiant audinio gyvybingoms ląstelėms į mėlynos spalvos MTT formazano druską, kiekybiškai nustatomą po ekstrakcijos iš audinių (16). Cheminės medžiagos, kurių nereikia klasifikuoti ir ženklinti pagal JT GHS ir CLP (*Be kategorijos*), identifikuojamos kaip medžiagos, nemažinančios audinio gyvybingumo iki mažesnės nei nustatyta slenkstinė vertė (t. y. audinio gyvybingumas > 60 %, EpiOcular™ EIT ir SkinEthic™ HCE EITL¹, arba > 50 %, SkinEthic™ HCE EITS²) (žr. 44 pastraipą).

¹ EITL: EIT skysčių naudojant SkinEthic™ HCE.

² EITS: EIT kietųjų medžiagų naudojant SkinEthic™ HCE.

KVALIFIKACIJOS ĮRODYMAS

22. Prieš pradėdamos naudoti RhCE bandymus reglamentavimo tikslais įprastiniu būdu, laboratorijos turėtų įrodyti savo techninę kvalifikaciją, pateikdamos teisingą prognozę dėl kvalifikacijos įrodymui skirtų penkiolikos cheminių medžiagų, išvardytų 1 lentelėje. Šios cheminės medžiagos buvo pasirinktos iš cheminių medžiagų, naudotų atliekant PPM patvirtinimo tyrimus (8) (10) (11). Į rinkinį įtrauktos, kiek tai buvo įmanoma, medžiagos, kurios: i) aprėpia skirtingas agregatines būsenas; ii) aprėpia visą intervalą *in vivo* rimto akių pažeidimo arba akių dirginimo atsakų, pagrįstų aukštos kokybės rezultatais, gautais atliekant etaloninę *in vivo* triušio akių bandymą (B.5 bandymo metodas) (2) (14), ir taikant JT GHS klasifikavimo sistemą (t. y. 1, 2A, 2B kategorijos arba *Be kategorijos*) (1) ir CLP klasifikavimo sistemą (t. y. 1, 2 kategorijos arba *Be kategorijos*); iii) aprėpia įvairius *in vivo* klasifikavimą lemiančius rodiklius (24) (25); iv) atitinka cheminių medžiagų klases, naudotas atliekant patvirtinimo tyrimą (8) (10) (11); v) aprėpia daug tinkamų organinių funkcinių grupių (8) (10) (11); vi) turi tinkamai apibūdintą cheminę sandarą (8) (10) (11); vii) yra spalvotos ir (arba) tiesioginiai MTT reduktoriai; viii) joms buvo gauti atkuriami rezultatai, atliekant RhCE bandymo metodų patvirtinimą; ix) buvo gauta tinkama prognozė, atliekant RhCE bandymo metodų patvirtinimo tyrimus; x) aprėpia visą *in vitro* atsakų, pagrįstų aukštos kokybės RhCE bandymo metodų duomenimis (nuo 0 % iki 100 % gyvybingumo), intervalą; xi) yra prekyboje; ir vii) nėra susijusios su labai didelėmis įsigijimo ir (arba) šalinimo išlaidomis. Tais atvejais, kai sąrašė nurodytos cheminės medžiagos nėra arba negali būti naudojama dėl kitų pagrįstų priežasčių, galėtų būti naudojama kita cheminė medžiaga, atitinkanti pirmiau aprašytus kriterijus, pvz., būtų PPM patvirtinimui naudota cheminė medžiaga. Tačiau tokie nukrypimai turėtų būti pagrįsti.

Cheminis pavadinimas	CASRN	Organinė funkcinė grupė ¹	Agregatinė būseną	PPM1 gyvybingumas (%) ²	PPM2 gyvybingumas (%) ³	PPM prognozavimas	MTT reduktorius	Spalvos trukdžiai
1-etil-3-metilimidazolinio etilsulfatas	342573-75-5	Alkoksi; amonio druska; arilas; imidazolas; sulfatas	L	79,9±6,4	79,4±6,2	<i>Be kategorijos</i>	N	N
Dikaprilileteris	629-82-3	Alkoksi; eteris	L	97,8±4,3	95,2±3,0	<i>Be kategorijos</i>	N	N
Piperonilbutoksidas	51-03-6	Alkoksi; benzdioksolas; benzilas; eteris	L	104,2±4,2	96,5±3,5	<i>Be kategorijos</i>	N	N
Ricinos aliejus, hidrintas, etoksilintas polietilenglikoliu (PEG-40)	61788-85-0	Acilalis; alkoholis; alilas; eteris	Klampi	77,6±5,4	89,1±2,9	<i>Be kategorijos</i>	N	N
1-(4-chlorfenil)-3-(3,4-dichlorfenil)karbamidas	101-20-2	Aromatinis heterociklinis halogenidas; arilhalogenidas; karbamido dariniai	S	106,7±5,3	101,9±6,6	<i>Be kategorijos</i>	N	N
2,2'-metilen-bis(6-(2H-benzotriazol-2-il)-4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenolis	103597-45-1	Alkanas, šakotasis su ketvirtiniu anglies atomu; kondensuotiųjų aromatinių junginių; kondensuotiųjų sotieji heterocikliniai junginiai; chinono junginių pirmtakai; <i>tret</i> -butilas	S	102,7±13,4	97,7±5,6	<i>Be kategorijos</i>	N	N
Kalio tetrafluorboratas	14075-53-7	Neorganinė druska	S	88,6±3,3	92,9±5,1	<i>Be kategorijos</i>	N	N

Santrumpos: CASRN – Cheminių medžiagų santrumpų tarnybos registro numeris; JT GHS – Jungtinių Tautų visuotinai suderinta cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklinimo sistema (JT GHS) (1); PPM1 – patvirtintas pamatinis metodas EpiOcular™ EIT; PPM2 – patvirtintas pamatinis metodas SkinEthic™ HCE EIT; Spalvos trukdžiai – spalvos trukdžiai atliekant standartinę MTT formazano optinio tankio (OT) matavimą.

¹ Organinė funkcinė grupė priskirta pagal EBPO taikomųjų programų 3.1 versijos hierarchinę analizę (8).

² Pagal rezultatus, gautus EpiOcular™ EIT atliekant EURL ECVAM/*Cosmetics Europe* akių dirginimo patvirtinimo tyrimą (EIVS) (8).

³ Pagal rezultatus, gautus SkinEthic™ HCE EIT atliekant patvirtinimo tyrimą (10) (11).

⁴ Pagal rezultatus, gautus atliekant *in vivo* triušio akių bandymą (TM B.5/EBPO TG 405) (2) (14) ir taikant JT GHS.

⁵Pagal rezultatus, gautus CEFIC konsorciame dėl *in vitro* akių dirginimo bandymo strategijos (CON4EI) tyrimo.

⁶Klasifikavimas kaip 2A ar 2B priklauso nuo JT GHS kriterijaus šioms dviem kategorijoms atskirti aiškinimo, t. y. poveikis 7 dieną 1 iš 3 gyvūnų palyginti su 2 iš 3 gyvūnų, kuris yra būtinas norint klasifikuoti kaip 2A kategorijos. Atliekant *in vivo* tyrimą, buvo naudojami 3 gyvūnai. Visos vertinamosios baigtys, išskyrus vieno gyvūno ragenos drumstumą, grįžo prie nulinių verčių 7 dieną arba anksčiau. Vieno gyvūno 1 balo ragenos drumstumas nevysiškai išnyko (7 dieną), bet visiškai išnyko 9 dieną.

23. Atliekant kvalifikacijos įrodymo bandymus, naudotojams taip pat rekomenduojama patikrinti po audinių gavimo jų apsaugines savybes, nurodytas RhCE audinio darinio gamintojo (žr. 25, 27 ir 30 pastraipas). Tai ypač svarbu, jei audiniai gabenami dideliais atstumais ir (arba) ilgą laiką. Kai bandymas sėkmingai parengtas ir jo atlikimo kvalifikacija įgyta bei įrodyta, vėliau tokio tikrinimo reguliariai daryti nebūtina. Tačiau, jei bandymas atliekamas nuolat, apsaugines savybes rekomenduojama ir toliau vertinti reguliariais laiko tarpais.

PROCEDŪRA

24. Į šį bandymo metodą šiuo metu įtraukti bandymo metodai yra moksliškai pagrįsti EpiOcular™ EIT ir SkinEthic™ HCE EIT (9) (12) (13), kurie nurodyti kaip patvirtinti pamatiniai metodai (PPM1 ir PPM2). Yra RhCE bandymo metodų standartinės veiklos procedūros, kurias reikėtų naudoti, įdiegiant ir taikant bandymo metodus laboratorijoje (34) (35). Kitose pastraipose ir 2 priedėlyje apibūdinami pagrindiniai RhCE bandymų komponentai ir procedūros.

RHCE BANDYMO METODO KOMPONENTAI

Bendrosios sąlygos

25. Atitinkamos iš žmogaus gautos ląstelės turėtų būti naudojamos rekonstruojant ragenos savybių epitelio trimatį audinį, kurį sudarytų tolygiai sluoksniuotos, bet nesuragėjusios ląstelės. RhCE audinio darinys ruošiamas įdėkluose su aktyvia sintetine membrana, per kurią maisto medžiagos gali patekti prie ląstelių. Rekonstruotą ragenos savybių epitelį turėtų sudaryti daug nesuragėjusių gyvųjų ląstelių sluoksnių. RhCE audinio darinio epitelinis paviršius turėtų tiesiogiai liestis su oru, kad bandomąsias chemines medžiagas būtų galima tiesiogiai uždėti vietoje taip, kaip ragenos epitelis būtų veikiamas *in vivo*. RhCE audinio darinys turėtų sudaryti patvarų veiksmingą barjerą, kuris būtų atsparus citotoksinių palyginamųjų medžiagų, pvz., Triton X-100 arba natrio dodecilsulfato (SDS), greitam prasiskverbimui. Apsauginė funkcija turėtų būti įrodyta ir gali būti įvertinta nustatant tam tikros pastovios koncentracijos palyginamosios medžiagos (pvz., 100 µl 0,3 % (V/V) Triton X-100) ekspozicijos trukmę, kuriai esant ląstelių gyvybingumas sumažėja 50 % (ET₅₀), arba nustatant koncentraciją, kuriai esant palyginamoji cheminė medžiaga per tam tikrą ekspozicijos laiką (pvz., 30 min po apdorojimo 50 µl SDS) sumažina audinių gyvybingumą 50 % (IC₅₀) (žr. 30 pastraipą). RhCE audinio darinio sulaikymo savybės turėtų apsaugoti nuo bandomosios cheminės medžiagos patekimo apeinant gyvojo audinio kraštą, dėl ko būtų blogai modeliuojama ragenos ekspozicija. RhCE audinio dariniui sukurti naudojamos iš žmogaus gautos ląstelės neturėtų būti

užkrėstos bakterijomis, virusais, mikoplazmomis ir grybeliais. Audinio darinio sterilumą turėtų tikrinti tiekėjas, ar jis nėra užkrėstas grybeliais ir bakterijomis.

Veikimo sąlygos

Gyvybingumas

26. Kiekybinio audinių gyvybingumo nustatymo bandymas yra MTT bandymas (16). Gyvybingos RhCE audinio darinio ląstelės redukuoja gyvųjų audinių dažiklį MTT į mėlynos spalvos MTT formazano nuosėdas, kurios ekstrahuojamos iš audinio izopropanoliu (arba panašiu tirpikliu). Ekstrahuotas MTT formazanas gali būti kiekybiškai nustatytas atliekant standartinį optinio tankio (OT) matavimą arba HPLC ar UPLC ir spektrofotometrijos procedūrą (36). Ekstrahavimui naudojamo tirpiklio OT turėtų būti pakankamai mažas, t. y. $OT < 0,1$. RhCE audinio darinio naudotojai turėtų užtikrinti, kad kiekviena naudoto RhCE audinio darinio partija atitiktų neigiamiems kontroliniams ėminiams nustatytus kriterijus. PPM neigiamų kontrolinių ėminių OT verčių priimtino intervalai pateikti 2 lentelėje. Taikantys HPLC arba UPLC ir spektrofotometrijos metodą, turėtų naudoti 2 lentelėje pateiktų neigiamų kontrolinių ėminių OT intervalus kaip neigiamo kontrolinio ėminio priimtino kriterijų. Ataskaitoje reikėtų dokumentuoti, kad neigiamu kontroliniu ėminiu apdorotų audinių kultūra yra stabili (gaunami panašūs gyvybingumo matavimo rezultatai) visą ekspozicijos laikotarpį. Panašios procedūros, kaip partijos išleidimo kokybės kontrolės dalies, turėtų laikytis audinio gamintojas, tačiau tokiu atveju gali būti taikomi kiti nei 2 lentelėje nurodyti priimtino kriterijai. Neigiamų kontrolinių ėminių OT verčių priimtino intervalą (viršutinę ir apatinę ribas) (kokybės kontrolės bandymo metodo sąlygomis) turėtų nustatyti RhCE audinio darinio kūrėjas arba tiekėjas.

2 lentelė. Neigiamų kontrolinių ėminių OT verčių priimtino intervalai (bandymo naudotojams)

Bandymas	Apatinė priimtino riba	Viršutinė priimtino riba
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – PPM1 (skysčių ir kietųjų medžiagų protokolų)	$> 0,8^1$	$< 2,5$
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – PPM2 (skysčių ir kietųjų medžiagų protokolų)	$> 1,0$	$\leq 2,5$

¹Taikant šią priimtino ribą, atsižvelgta į tai, kad gali būti ilgesnė gabenimo ir (arba) laikymo trukmė (pvz., > 4 dienas), kuri, kaip buvo įrodyta, neturi įtakos bandymo metodo taikymo charakteristikoms (37).

Apsauginė funkcija

27. RhCE audinio darinys turėtų būti pakankamai storas ir tvirtas, kad galėtų atsispirti sparčiam citotoksinių palyginamųjų medžiagų prasiskverbimui, įvertinamam, pvz., kaip ET_{50} (Triton X-100) arba IC_{50} (SDS) (3 lentelė). Kiekvienos naudojamo RhCE

audinio darinio partijos apsauginę funkciją turėtų įrodyti RhCE audinio darinio kūrėjas arba pardavėjas, kai audiniai tiekiami galutiniam naudotojui (žr. 30 pastraipą).

Morfologija

28. RhCE audinio darinio histologinis tyrimas turėtų įrodyti žmogaus ragenos savybių epitelio struktūrą (įskaitant ne mažiau kaip 3 sluoksnius gyvųjų epitelio ląstelių ir nesuragėjusių paviršių). Reikiamą morfologiją nustato kūrėjas ir (arba) tiekėjas dėl PPM, todėl bandymo metodo naudotojui jos nereikia pakartotinai nustatyti kiekvienai naudojamai audinio partijai.

Atkuriamumas

29. Teigiamų ir neigiamų kontrolinių ėminių rezultatai taikant bandymo metodą turėtų įrodyti atkuriamumą per ilgą laiką.

Kokybės kontrolė

30. RhCE audinio darinys turėtų būti naudojamas tik tokiu atveju, jei kūrėjas arba tiekėjas įrodo, kad kiekviena naudojamo RhCE audinio darinio partija atitinka nustatytus gaminių išleidimo kriterijus, iš kurių svarbiausi yra gyvybingumo (26 pastraipa) ir apsauginės funkcijos (žr. 27 pastraipą) kriterijai. Apsauginių funkcijų, matuojamų kaip ET_{50} arba IC_{50} , priimtino intervalo (viršutinę ir apatinę ribas) (žr. 25 ir 26 pastraipas) turėtų nustatyti RhCE audinio darinio kūrėjas arba tiekėjas. ET_{50} ir IC_{50} priimtino intervalas, kurį RhCE audinio darinių (naudotų PPM) kūrėjas ir (arba) tiekėjas naudoja kaip partijos išleidimo kokybės kontrolės kriterijų, pateiktas 3 lentelėje. RhCE audinio darinio kūrėjas ir (arba) tiekėjas turėtų pateikti bandymo metodo naudotojams duomenis, kurie įrodytų atitiktį visiems gaminių išleidimo kriterijams, kad šią informaciją jie galėtų įtraukti į bandymo ataskaitą. Siekiant patikimai prognozuoti chemines medžiagas, kurių nereikia klasifikuoti ir ženklinti dėl akių dirginimo arba rimto akių pažeidimo pagal JT GHS ir CLP, gali būti priimti tik tie rezultatai, kurie buvo gauti naudojant audinius, atitinkančius visus šiuos gaminio išleidimo kriterijus.

3 lentelė. Partijos išleidimo kokybės kontrolės kriterijai

Bandymas	Apatinė priimtino riba	Viršutinė priimtino riba
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – PPM1 (100 µl 0,3 % (V/V) Triton X-100)	$ET_{50} = 12,2 \text{ min}$	$ET_{50} = 37,5 \text{ min}$
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – PPM2 (30 min apdorojimas 50 µl SDS)	$IC_{50} = 1 \text{ mg/ml}$	$IC_{50} = 3,2 \text{ mg/ml}$

Bandomosios cheminės medžiagos ir kontrolinių cheminių medžiagų uždėjimas

31. Atliekant kiekvieną atskirą bandymą, kiekvienai bandomajai cheminei medžiagai ir kiekvienai kontrolinei medžiagai reikėtų naudoti ne mažiau kaip du kartotinius

audinio bandinius. Skystosioms ir kietosioms bandomosioms cheminėms medžiagoms naudojami skirtingi apdorojimo protokolai (34) (35). Taikant abu metodus ir protokolus, audinio darinio paviršius turėtų būti suvilgytas prieš bandomųjų cheminių medžiagų uždėjimą kalcio ir magnio jonų neturinčiu Dulbecco fiziologiniu tirpalu fosfatiname buferiniame tirpale ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ neturinčiu DPBS), kad būtų galima atkartoti žmogaus akies drėgmės sąlygas. Audinių apdorojimas pradedamas nuo veikimo bandomąja (-osiomis) chemine (-ėmis) medžiaga (-omis) ir kontrolinėmis medžiagomis. Pagal abiejų PPM abu apdorojimo protokolus reikėtų uždėti bandomosios cheminės medžiagos arba kontrolinės medžiagos kiekį, kurio pakaktų epidermio paviršiui tolygiai padengti, bet vengiant neribotos dozės (žr. 32 ir 33 pastraipas) (2 priedėlis).

32. Bandomosios cheminės medžiagos, kurias galima lašinti pipete 37 °C arba žemesnėje temperatūroje (jei reikia, stūmokline pipete), taikant PPM apdorojamos kaip skysčiai, kitais atvejais jas reikėtų apdoroti kaip kietąsias medžiagas (žr. 33 pastraipą). Taikant PPM, skysta bandomoji cheminė medžiaga tolygiai paskleidžiama audinio paviršiuje (t. y. užlašinama ne mažiau kaip 60 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$) (žr. 2 priedėlį (33) (34)). Kapiliarinių reiškinių (paviršiaus įtempties reiškinių), galinčių pasitaikyti dėl mažo į indėklą (ant audinio paviršiaus) lašinamo tūrio reikėtų kiek įmanoma vengti, kad būtų galima užtikrinti tinkamą audinio dozavimą. Skystomis bandomosiomis cheminėmis medžiagomis apdoroti audiniai inkubuojami 30 min standartinėmis auginimo sąlygomis, esant (37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2 , ≥ 95 % RH). Pasibaigus ekspozicijos laikotarpiui, skysta bandomoji cheminė medžiaga ir kontrolinės medžiagos turėtų būti kruopščiai pašalintos nuo audinio paviršiaus, skalaujant dideliu $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ neturinčiu DPBS kiekiu kambario temperatūroje. Po šio skalavimo veiksmo – poekspozicinis laikymas šviežioje terpėje kambario temperatūroje (kad būtų pašalinta visa audiniu absorbuota bandomoji cheminė medžiaga) iš anksto nustatytą laiko tarpą, kuris skiriasi priklausomai nuo taikomo PPM. Poekspozicinis inkubavimas šviežioje terpėje standartinėmis auginimo sąlygomis prieš atliekant MTT bandymą taikomas tik VMR1 (žr. 2 priedėlį (34) (35)).
33. Bandomosios cheminės medžiagos, kurių negalima lašinti pipete žemesnėje kaip 37 °C temperatūroje, taikant PPM apdorojamos kaip kietosios medžiagos. Uždedamos bandomosios cheminės medžiagos kiekio turėtų pakakti visam audinio paviršiui padengti, t. y. reikėtų uždėti ne mažiau kaip 60 mg/cm^2 (2 priedėlis). Jei įmanoma, kietąsias medžiagas reikėtų bandyti smulkių miltelių pavidalu. Kietosiomis bandomosiomis medžiagomis apdoroti audiniai nustatytą laiko tarpą (priklausomai nuo taikomo PPM) inkubuojami standartinėmis auginimo sąlygomis (žr. 2 priedėlį (34) (35)). Pasibaigus ekspozicijos laikotarpiui, skystoji bandomoji cheminė medžiaga ir kontrolinės medžiagos turėtų būti kruopščiai pašalintos nuo audinio paviršiaus, skalaujant dideliu $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ neturinčiu DPBS kiekiu kambario temperatūroje. Prieš

atliekant MTT bandymą, po šio skalavimo veiksmo – poekspozicinis laikymas šviežioje terpėje kambario temperatūroje (kad būtų pašalinta visa audiniu absorbuota bandomoji cheminė medžiaga) iš anksto nustatytą laiko tarpą, kuris skiriasi priklausomai nuo taikomo PPM, ir poekspozicinis inkubavimas šviežioje terpėje standartinėmis auginimo sąlygomis (žr. 2 priedėlį (34) (35)).

34. Į kiekvieną atskirą bandymą reikėtų įtraukti vienalaikius neigiamus ir teigiamus kontrolinius ėminius, siekiant įrodyti, kad audinių gyvybingumas (nustatomas pagal neigiamą kontrolinį ėminį) ir jautris (nustatomas pagal teigiamą kontrolinį ėminį) atitinka nustatytus priimtumo intervalus, pagrįstus istoriniais duomenimis. Pagal neigiamą kontrolinį ėminį taip pat nustatoma atskaitos linija (100 % audinio gyvybingumas), kad būtų galima apskaičiuoti bandomąją cheminę medžiagą apdoroto audinio santykinio gyvybingumo procentinę dalį (% gyvybingumo_{test}). Rekomenduojama teigiama kontrolinė medžiaga, kurią reikia naudoti taikant PPM, yra grynas metilacetatas (CAS Nr. 79-20-9, galima pirkti iš, pvz., Sigma-Aldrich, kat. Nr. 45997; skystis). Rekomenduojamos neigiamos kontrolinės medžiagos, kurias reikia naudoti taikant PPM1 ir PPM2 yra ypač grynas H₂O ir Ca²⁺/Mg²⁺ neturintis DPBS. Tai buvo PPM patvirtinimo tyrimams naudotos medžiagos, kurioms yra sukaupta daugiausia istorinių duomenų. Tinkamų alternatyvių teigiamų arba neigiamų kontrolinių medžiagų naudojimas turėtų būti moksliškai pagrįstas reikiamu būdu. Neigiamos ir teigiamos kontrolinės medžiagos turėtų būti bandomos pagal tą (tuos) patį (-ius) protokolą (-us), naudojamą į atskirą bandymą įtrauktoms bandomosioms cheminėms medžiagoms (t. y. skysčiams ir (arba) kietosioms medžiagoms). Po uždėjimo turėtų vykti apdorojamoji ekspozicija, skalavimas, poekspozicinis laikymas terpėje, poekspozicinis inkubavimas terpėje, jei tinka, kaip aprašyta kontroliniams ėminiams, bandomiems vienu metu su skystosiomis bandomosiomis cheminėmis medžiagomis (žr. 32 pastraipą) arba kontroliniams ėminiams, bandomiems vienu metu su kietosiomis bandomosiomis cheminėmis medžiagomis (žr. 33 pastraipą), prieš atliekant MTT bandymą (žr. 35 pastraipą) (34) (35). Vieno neigiamų ir teigiamų kontrolinių medžiagų rinkinio pakanka visoms vienos agregatinės būsenos bandomosioms cheminėms medžiagoms (skysčiams ar kietosioms medžiagoms), įtrauktoms į tą patį atskirą bandymą.

Audinių gyvybingumo matavimai

35. MTT bandymas yra standartizuotas kiekybinis metodas (16), kuris turėtų būti taikomas audinių gyvybingumui matuoti pagal šį bandymo metodą. Jis yra suderinamas su trimačiu audinio dariniu. MTT bandymas atliekamas iš karto pasibaigus poekspozicinio inkubavimo laikotarpiui. Taikant PPM, RhCE audinio darinio ėminys 180±15 min dedamas į 0,3 ml 1 mg/ml koncentracijos MTT tirpalo standartinėmis auginimo sąlygomis. Gyvybingos RhCE audinio darinio ląstelės redukuoja gyvųjų audinių dažiklį MTT į mėlynos spalvos MTT formazano nuosėdas.

Iškritusios mėlynos spalvos MTT formazano nuosėdos ekstrahuojamos iš audinio reikiamu izopropanolio (arba panašaus tirpiklio) tūriu (34) (35). Iš skystomis bandomosiomis cheminėmis medžiagomis apdorotų audinių reikėtų ekstrahuoti iš audinio viršaus ir apačios, o iš kietomis bandomosiomis cheminėmis medžiagomis ir spalvotais skysčiais apdorotų audinių – tik iš audinio apačios (kad būtų kuo mažesnė tikimybė užteršti izopropanolinį ekstrahavimo tirpalą bandomąja chemine medžiaga, kuri galbūt liko ant audinio). Sunkiai nuplaunamomis skystomis bandomosiomis cheminėmis medžiagomis apdoroti audiniai taip pat gali būti ekstrahuojami tik iš audinio apačios. Vienu metu bandomos neigiamos ir teigiamos kontrolinės medžiagos turėtų būti apdorojamos panašiai kaip bandomoji cheminė medžiaga. Ekstrahuotas MTT formazanas gali būti kiekybiškai nustatytas atliekant standartinį optinio tankio (OT) matavimą, bangos ilgis – 570 nm, filtro juostos plotis – ne didesnis kaip ± 30 nm, arba HPLC ar UPLC ir spektrofotometrijos procedūrą (žr. 42 pastraipą) (11) (36).

36. Bandomosios cheminės medžiagos optinės savybės arba jos cheminė sąveika su MTT gali trukdyti matuoti MTT formazaną, gaunant klaidingą gyvybingumo įvertį. Bandomosios cheminės medžiagos gali trukdyti matuoti MTT formazaną, tiesiogiai redukuodamos MTT į mėlynos spalvos formazaną, ir (arba) dėl spalvos trukdžių, jei bandomoji cheminė medžiaga natūraliai arba dėl apdorojimo procedūrų absorbuoja šviesą formazano optinio tankio nustatymo srityje (t. y. maždaug 570 nm). Pradiniai tikrinimai turėtų būti atliekami prieš bandymą, kad būtų galima identifikuoti galimus tiesioginius MTT reduktorius ir (arba) spalvos trukdžius sukeliančias chemines medžiagas, ir reikėtų naudoti papildomus kontrolinius ėminius, kad būtų galima aptikti ir koreguoti galimus tokių bandomųjų cheminių medžiagų trukdžius (žr. 37–41 pastraipą). Tai ypač svarbu, kai konkreti bandomoji cheminė medžiaga ne visiškai pašalinama iš RhCE audinio darinio skalaujant arba kai ji prasiskverbia į ragenos savybių epitelį, todėl jos yra RhCE audinio dariniuose atliekant MTT bandymą. Jei bandomųjų cheminių medžiagų šviesos absorbcijos sritis (natūraliai arba po apdorojimo) sutampa su MTT formazano ir jos yra nesuderinamos su MTT formazano standartiniu optinio tankio (OT) matavimu dėl per didelių trukdžių, t. y. didelės absorbcijos 570 ± 30 nm srityje, MTT formazaną galima matuoti naudojant HPLC arba UPLC ir spektrofotometrijos procedūrą (žr. 41 ir 42 pastraipą) (11) (36). Tiesioginės MTT redukcijos ir spalvotų medžiagų trukdžių aptikimo ir koregavimo išsamus aprašymas pateiktas PPM SVP (34) (35). Tiesioginių MTT reduktorių ir (arba) spalvos trukdžius sukeliančių cheminių medžiagų identifikavimo ir tvarkymo rekomendacijų aiškinimo schemas, skirtos PPM1 ir PPM2, pateiktos III ir IV priedėliuose.
37. Siekiant nustatyti galimus trukdžius, kuriuos kelia spalvotos bandomosios cheminės medžiagos (natūralios arba po apdorojimo), absorbuojančios šviesą MTT formazano absorbcijos srityje, ir nuspręsti, ar būtini papildomi kontroliniai ėminiai, bandomoji

cheminė medžiaga dedama į vandenį ir (arba) į izopropanolį ir inkubuojama reikiama laiką kambario temperatūroje (žr. 2 priedėlį, (34) (35)). Jei PPM1 atveju vandenyje ir (arba) izopropanolyje ištirpinta bandomoji cheminė medžiaga gana stipriai absorbuoja šviesą 570 ± 20 nm srityje (žr. 3 priedėlį), arba jei PPM2 atveju sumaišius bandomąją cheminę medžiagą su vandeniu susidaro spalvotas tirpalas (žr. 4 priedėlį), daroma prielaida, kad bandomoji cheminė medžiaga trukdo atlikti standartinį MTT formazano optinio tankio (OT) matavimą, todėl reikėtų atlikti papildomus spalvotų kontrolinių ėminių bandymus arba naudoti HPLC ar UPLC ir spektrofotometrijos procedūrą, ir tokiu atveju šių kontrolinių ėminių nereikia (žr. 41 ir 42 pastraipą bei III ir IV priedėlius) (34) (35). Kai atliekamas standartinis optinio tankio (OT) matavimas, kiekviena trukdžius kelianti bandomoji cheminė medžiaga turėtų būti dedama ant ne mažiau kaip dviejų gyvųjų audinių kartotinių bandinių, su kuriais atliekama visa bandymo procedūra, bet MTT inkubavimo pakopoje vietoj MTT tirpalo jie inkubuojami terpėje, kad būtų gautas nespecifinės spalvos (NSS_{gyv}) kontrolinis ėminys (34) (35). Jei bandoma spalvota bandomoji cheminė medžiaga, turi būti atliekamas viena laikis NSS_{gyv} kontrolinis bandymas ir kartotinių bandymų atveju atliekant kiekvieną bandymą (kiekvieną atskirą bandymą) turi būti atliekamas nepriklausomas NSS_{gyv} kontrolinis bandymas dėl gyviesiems audiniams būdingos biologinės įvairovės. Tikrasis audinio gyvybingumas apskaičiuojamas kaip audinių gyvybingumo procentinė vertė, gauta trukdančios bandomosios cheminės medžiagos veikiamiems gyviesiems audiniams ir inkubuotiems MTT tirpale (% gyvybingumo_{test}) minus nespecifinės spalvos procentinė vertė, gauta trukdančios bandomosios cheminės medžiagos veikiamiems gyviesiems audiniams, inkubuotiems terpėje be MTT, ir bandomiems vienu metu su koreguojamu bandymu (% NSS_{gyv}), t. y. tikrasis audinių gyvybingumas = (% gyvybingumo_{test}) – (% NSS_{gyv}).

38. Kiekvieną bandomąją cheminę medžiagą reikėtų įdėti į tik ką paruoštą MTT tirpalą, kad būtų galima identifikuoti tiesioginius MTT reduktorius. Reikiamas bandomosios cheminės medžiagos kiekis dedamas į MTT tirpalą ir mišinys inkubuojamas maždaug 3 h standartinėmis auginimo sąlygomis (žr. III ir IV priedėlį) (34) (35). Jei MTT mišinys, kuriame yra bandomoji cheminė medžiaga (arba netirpių bandomųjų cheminių medžiagų suspensija), nusidažo mėlyna arba violetine spalva, daroma prielaida, kad bandomoji cheminė medžiaga tiesiogiai redukuoja MTT ir reikėtų atlikti papildomą veikimo tikrinimą su negyvais RhCE audinio dariniais, nepriklausomai nuo to, ar naudojama standartinė optinio tankio (OT) matavimo, ar HPLC arba UPLC ir spektrofotometrijos procedūra. Šiam papildomam veikimo tikrinimui naudojami negyvi audiniai, kurie turi tik liekamąjį metabolinį aktyvumą, bet absorbuoja ir sulaiko bandomąją cheminę medžiagą panašiai kaip gyvieji audiniai. Negyvi PPM1 audiniai ruošiami laikant žemoje temperatūroje („šaltyje žuvę“). Negyvi PPM2 audiniai ruošiami juos ilgą laiką (pvz., ne mažiau kaip 24 ± 1 h) inkubuojant vandenyje ir vėliau laikant žemoje temperatūroje („vandenyje žuvę“).

Kiekviena MTT redukuojanti bandomoji cheminė medžiaga dedama ant ne mažiau kaip dviejų negyvų ląstelių kartotinių bandinių, kuriems atliekama visa bandymo procedūra, kad būtų gautas nespecifinės MTT redukcijos (NSMTT) kontrolinis ėminys (34) (35). Pakanka vieno NSMTT kontrolinio bandymo vienai bandomajai cheminei medžiagai, neatsižvelgiant į atliekamų nepriklausomų bandymų ir (arba) atskirų bandymų skaičių. Tikrasis audinio gyvybingumas apskaičiuojamas kaip audinių gyvybingumo procentinė vertė, gauta MTT reduktoriaus veikiamiems gyviesiems audiniams (% gyvybingumo_{test}), minus nespecifinės MTT redukcijos procentinė vertė, gauta to paties MTT reduktoriaus veikiamiems negyviems audiniams ir apskaičiuota vienu metu su koreguojamu bandymu bandomo neigiamo kontrolinio ėminio atžvilgiu (% NSMTT), t. y. tikrasis audinio gyvybingumas = (% gyvybingumo_{test}) – (% NSMTT).

39. Bandomosioms cheminėms medžiagoms, kurios identifikuojamos kaip keliančios spalvos trukdžius (žr. 37 pastraipą) ir yra tiesioginiai MTT reduktoriai (žr. 38 pastraipą), be NSMTT ir NSS_{gyv} kontrolinių ėminių, aprašytų pirmiau pateiktose pastraipose, reikės trečiojo kontrolinių ėminių rinkinio, kai atliekamas standartinis optinio tankio (OT) matavimas. Paprastai atlikti MTT bandymą trukdo tamsios spalvos (pvz., mėlynos, violetinės, juodos) bandomosios cheminės medžiagos, absorbuojančios šviesą 570±30 nm srityje, nes jų pačių spalva trukdo įvertinti jų gebėjimą tiesiogiai redukuoti MTT, kaip aprašyta 38 pastraipoje. Tai verčia naudoti NSMTT kontrolinius ėminius kaip numatytuosius ėminius kartu su NSS_{gyv} kontroliniais ėminiais. Bandomąsias chemines medžiagas, kurioms atliekami NSMTT ir NSS_{gyv} kontroliniai bandymai, gali absorbuoti ir sulaikyti gyvieji ir negyvi audiniai. Todėl šiuo atveju naudojant NSMTT kontrolinį ėminį gali būti koreguojama ne tik galima tiesioginė MTT redukcija, bet ir spalvos trukdžiai dėl bandomosios cheminės medžiagos absorbcijos ir sulaikymo ant negyvų audinių. Tai galėtų būti dvigubas spalvos trukdžių koregavimas, nes atliekant NSS_{gyv} kontrolinį bandymą jau koreguojami spalvos trukdžiai dėl bandomosios cheminės medžiagos absorbcijos ir sulaikymo gyvaisiais audiniais. Siekiant išvengti galimo dvigubo spalvos trukdžių koregavimo, reikia atlikti trečiąjį negyvų audinių nespecifinės spalvos (NSS_{negyv}) kontrolinį bandymą (žr. III ir IV priedėlius) (34) (35). Naudojant šį papildomą kontrolinį ėminį, bandomoji cheminė medžiaga dedama ant ne mažiau kaip dviejų negyvo audinio kartotinių bandinių, su kuriais atliekama visa bandymo procedūra, bet MTT inkubavimo pakopoje vietoje MTT tirpalo jie inkubuojami terpėje. Pakanka vieno NSS_{negyv} kontrolinio bandymo vienai bandomajai cheminei medžiagai, neatsižvelgiant į atliekamų nepriklausomų bandymų ir (arba) atskirų bandymų skaičių, bet jis turėtų būti atliekamas vienu metu su NSMTT kontroliniu bandymu ir su ta pačia audinio partija. Tikrasis audinio gyvybingumas apskaičiuojamas kaip audinių gyvybingumo procentinė vertė, gauta bandomosios cheminės medžiagos veikiamiems gyviesiems audiniams (% gyvybingumo_{test}) minus % NSMTT minus %

NSS_{gyv} plius nespecifinės spalvos procentinė vertė, gauta trukdančios bandomosios cheminės medžiagos veikiamiems negyviems audiniams, inkubuotiems terpėje be MTT, ir apskaičiuota vienu metu su koreguojamu bandymu bandomo neigiamo kontrolinio ėminio atžvilgiu ($\% NSS_{negyv}$), t. y. tikrasis audinio gyvybingumas = ($\% gyvybingumo_{test}$) – ($\% NSMTT$) – ($\% NSS_{gyv}$) + ($\% NSS_{negyv}$).

40. Svarbu pažymėti, kad audinio ekstraktui gautas OT (atliekant standartinius optinio tankio matavimus) dėl nespecifinės MTT redukcijos ir nespecifinės spalvos trukdžių gali būti didesnis nei spektrofotometro tiesiškumo intervalas ir kad audinio ekstrakto MTT formazano smailės plotas (atliekant HPLC arba UPLC ir spektrofotometrijos matavimus) dėl nespecifinės MTT redukcijos taip pat gali būti didesnis nei spektrofotometro tiesiškumo intervalas. Atsižvelgiant į tai yra svarbu, kad, prieš pradėdama bandyti bandomąsias chemines medžiagas reglamentavimo tikslais, kiekviena laboratorija nustatytų savo spektrofotometro OT arba smailės ploto tiesiškumo intervalą pagal, pvz., MTT formazaną (CAS Nr. 57360-69-7), kurį galima pirkti iš, pvz., Sigma-Aldrich (kat. Nr. M2003).
41. Atliekant standartinį optinio tankio (OT) matavimą spektrofotometru, galima įvertinti tiesioginius MTT reduktorius ir spalvos trukdžius sukeliančias bandomąsias chemines medžiagas, jei stebimi MTT formazano matavimo trukdžiai nėra labai dideli (t. y. audinių ekstraktų OT, gauti bandomajai cheminei medžiagai be koregavimo dėl tiesioginės MTT redukcijos ir (arba) spalvos trukdžių, yra spektrofotometro tiesiškumo intervale). Vis dėlto, į bandomosioms cheminėms medžiagoms gautus neigiamų kontrolinių ėminių $\% NSMTT$ ir (arba) $\% NSS_{gyv} \geq 60 \%$ (PPM1 ir PPM2 skysčių protokolo) arba 50% (PPM2 kietųjų medžiagų protokolo) reikėtų žiūrėti atsargiai, nes tai yra PPM ribinės vertės, pagal kurias atskiriamos klasifikuojamos ir neklasifikuojamo cheminės medžiagos (žr. 44 pastraipą). Tačiau standartinis optinis tankis (OT) gali nebūti išmatuotas, kai MTT formazano matavimo trukdžiai yra labai dideli (t. y. gaunami nekoreguoti bandymo audinio ekstraktų OT, nepatenkantys į spektrofotometro tiesiškumo intervalą). Spalvotas bandomąsias chemines medžiagas arba tapusias spalvotomis dėl sąlyčio su vandeniu ar izopropanoliu, kurios kelia didelius trukdžius atliekant standartinį MTT formazano optinio tankio (OT) matavimą, visgi galima įvertinti naudojant HPLC arba UPLC ir spektrofotometriją (žr. III ir IV priedėlį). Taip yra todėl, kad naudojant HPLC arba UPLC ir spektrofotometrijos sistemą, MTT formazaną galima atskirti nuo bandomosios cheminės medžiagos prieš jo kiekybinį nustatymą (36). Dėl šios priežasties NSS_{gyv} arba NSS_{negyv} kontrolinių ėminių niekuomet nereikia, kai naudojama HPLC/UPLC ir spektrofotometrija, nepriklausomai nuo bandomos cheminės medžiagos. Vis dėlto $NSMTT$ kontrolinius ėminius reikėtų naudoti, jei įtariama, kad bandomoji cheminė medžiaga tiesiogiai redukuoja MTT (pagal 38 pastraipoje aprašytą procedūrą). $NSMTT$ kontrolinius ėminius taip pat reikėtų naudoti spalvotoms bandomosioms

cheminėms medžiagos (spalvotoms natūraliai arba dėl sąlyčio su vandeniu), kurių spalva trukdo įvertinti jų gebėjimą tiesiogiai redukuoti MTT, kaip aprašyta 38 pastraipoje. Jei MTT formazanui matuoti naudojama HPLC arba UPLC ir spektrofotometrija, audinio gyvybingumo procentinė dalis skaičiuojama kaip MTT formazano smailės ploto, gauto bandomąja chemine medžiaga veikiamais gyviesiems audiniams, ir MTT formazano smailės ploto, gauto vienalaikiam neigiamam kontroliniam ėminiui, procentais išreikštas santykis. Jei bandomosios cheminės medžiagos gali tiesiogiai redukuoti MTT, tikrasis audinių gyvybingumas apskaičiuojamas kaip $\% \text{ gyvybingumo}_{\text{test}} - \% \text{ NSMTT}$, kaip aprašyta 38 pastraipos paskutiniame sakinyje. Pagaliau reikėtų pažymėti, kad RhCE bandymo metodais negalima vertinti tiesioginių MTT reduktorių, kurie taip pat gali kelti spalvos trukdžius ir kurie po apdorojimo lieka audiniuose ir taip stipriai redukuoja MTT, kad gauti bandomų audinių ekstraktų OT (atliekant standartinę OT matavimą) arba smailių plotai (naudojant UPLC arba HPLC ir spektrofotometriją) nepatenka į spektrofotometro tiesiškumo intervalą, nors tikimasi, kad tai būtų tik labai retas reiškinys.

42. HPLC arba UPLC ir spektrofotometriją MTT formazano matavimams galima naudoti visų tipų bandomosioms cheminėms medžiagoms (spalvotoms, nespalvotoms, MTT reduktoriams ir ne reduktoriams) (11) (36). Dėl HPLC arba UPLC ir spektrofotometrijos sistemų įvairovės kiekvienam naudotojui nėra įmanoma nustatyti tiksliai tokias pačias sistemos sąlygas. HPLC arba UPLC ir spektrofotometrijos sistemos tinkamumą reikėtų įrodyti prieš pradedant sistemą naudoti audinių ekstraktų MTT formazano kiekybiniam nustatymui, ir ji turi atitikti standartinių tinkamumo parametrų rinkinio priimtumo kriterijus, pagrįstus aprašytais JAV maisto ir vaistų administracijos rekomendacijose pramonei dėl biologinės analizės metodo patvirtinimo (36) (38). Šie pagrindiniai parametrai ir priimtumo kriterijai patekti 5 priedėlyje. Jei HPLC arba UPLC ir spektrofotometrijos sistema atitinka 5 priedėlyje nustatytus priimtumo kriterijus, ji laikoma tinkama ir paruošta MTT formazanui matuoti šiame bandymo metode aprašytais bandymo sąlygomis.

Priimtumo kriterijai

43. Atliekant kiekvieną atskirą bandymą, naudojantį kokybės kontrolę atitinkančias RhCE audinių partijas (žr. 30 pastraipą), neigiama kontroline medžiaga apdorotiems ėminiams turėtų būti gautos OT vertės, rodančios audinių kokybę po jų gabenimo, priėmimo veiksmų ir visų protokolo procesų, ir jos neturėtų būti mažesnės nei 2 lentelėje nurodytos istoriškai nustatytos ribos (žr. 26 pastraipą). Panašiai, teigiama kontroline medžiaga, t. y. metilacetatu, apdorotų audinių vidutinis gyvybingumas turėtų būti $< 50 \%$ neigiamo kontrolinio ėminio atžvilgiu pagal PPM1 skysčių ar kietųjų medžiagų protokolus, ir $\leq 30 \%$ neigiamo kontrolinio ėminio atžvilgiu pagal PPM2 (skysčių protokolą) arba $\leq 20 \%$ (kietųjų medžiagų protokolą), taip rodant

audinių gebėjimą reaguoti į dirginančią cheminę medžiagą bandymo metodo sąlygomis (34) (35). Kintamumas tarp audinio kartotinių bandinių, gautas bandomosioms cheminėms medžiagoms ir kontrolinėms medžiagoms, turėtų atitikti priimtas ribas (t. y. dviejų kartotinių audinio bandinių gyvybingumo skirtumas turėtų būti mažesnis kaip 20 % arba trijų kartotinių audinio bandinių standartinis nuokrypis (SN) neturėtų būti didesnis kaip 18 %). Jei į atskirą bandymą įtrauktas neigiamas ar teigiamas kontrolinis ėminys neatitinka priimtų intervalų ribų, atskiras bandymas laikomas „neatitinkančiu reikalavimų“ ir turėtų būti pakartotas. Jei audinio kartotinių bandinių kintamumas, gautas bandomajai cheminei medžiagai, neatitinka priimto intervalo ribų, bandymas turi būti laikomas „neatitinkančiu reikalavimų“ ir bandomąją cheminę medžiagą reikėtų bandyti iš naujo.

Rezultatų aiškinimas ir prognozavimo modelis

44. Gautas kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos kartotinių audinių ekstraktų OT vertes arba smailių plotus reikėtų naudoti vidutinei audinių gyvybingumo procentinei daliai (kartotinių audinių bandinių vidurkiui) apskaičiuoti atžvilgiu neigiamo kontrolinio ėminio, kuriam gautas gyvybingumas prilyginamas 100 %. Audinio gyvybingumo vidutinės procentinės dalies ribinė vertė, pagal kurią identifikuojamos bandomosios cheminės medžiagos, kurių nereikia klasifikuoti dėl akių dirginimo ar rimto akių pažeidimo (JT GHS ir CLP *Be kategorijos*) pateikta 4 lentelėje. Rezultatus reikėtų aiškinti taip:

- Bandomoji cheminė medžiaga identifikuojama kaip medžiaga, kurios nereikia klasifikuoti ir ženklini pagal JT GHS ir CLP (*Be kategorijos*), jei po ekspozicijos ir poekspozicinio inkubavimo audinio gyvybingumo vidutinė procentinė dalis yra didesnė nei ($>$) nustatyta audinio gyvybingumo procentinės dalies ribinė vertė, kaip nurodyta 4 lentelėje. Šiuo atveju nereikia atlikti papildomų bandymų, taikant kitus bandymo metodus.
- Jei po ekspozicijos ir poekspozicinio inkubavimo audinio gyvybingumo vidutinė procentinė dalis yra mažesnė nei arba lygi ($\leq$) nustatytai audinio gyvybingumo procentinės dalies ribinei vertei, prognozės pateikti negalima, kaip nurodyta 4 lentelėje. Šiuo atveju reikės atlikti papildomus bandymus taikant kitus bandymo metodus, nes RhCE bandymo metodais gaunamas tam tikras klaidingai teigiamų rezultatų skaičius (žr. 14–15 pastraipas) ir juos taikant negalima atskirti JT GHS ir CLP 1 ir 2 kategorijų (žr. 17 pastraipą).

4 lentelė. Prognozavimo modeliai pagal JT GHS ir CLP klasifikavimą

PPM	<i>Be kategorijos</i>	Prognozės pateikti negalima
PPM 1 - EpiOcular™ EIT (pagal abu protokolus)	Vidutinis audinio gyvybingumas $> 60 \%$	Vidutinis audinio gyvybingumas $\leq 60 \%$

PPM 2 - SkinEthic™ HCE EIT (pagal skystųjų medžiagų protokolą)	Vidutinis audinio gyvybingumas > 60 %	Vidutinis audinio gyvybingumas ≤ 60 %
PPM2 - SkinEthic™ HCE EIT (pagal kietųjų medžiagų protokolą)	Vidutinis audinio gyvybingumas > 50 %	Vidutinis audinio gyvybingumas ≤ 50 %

45. Jei dėl klasifikavimo neabejojama, bandomajai cheminei medžiagai turėtų pakakti vieno bandymo su ne mažiau kaip dviem kartotiniais audinio bandiniais. Tačiau, jei rezultatai ribiniai, pvz., kartotinių ėminių matavimų rezultatai nesutampa ir (arba) vidutinė procentinė gyvybingumo vertė lygi $60 \pm 5 \%$ (PPM1 ir PPM2 skysčių protokolui) arba $50 \pm 5 \%$ (PPM2 kietųjų medžiagų protokolui), reikėtų spręsti dėl antrojo bandymo, taip pat dėl trečiojo, jei pirmųjų dviejų atskirų bandymų rezultatai išsiskirtų.
46. Specialiųjų tipų mišiniais gali būti įvertintos skirtingos audinio gyvybingumo vidutinės procentinės dalies ribinės vertės, skiriančios klasifikuojamas bandomąsias chemines medžiagas nuo neklasifikuojamų, jei tikėtų ir būtų pagrįsta, kad būtų galima pagerinti bandymo metodo taikymo charakteristikas (žr. 14 pastraipą). Palyginamosios cheminės medžiagos gali būti naudingos įvertinant nežinomų bandomųjų cheminių medžiagų ar produktų klasės rimto akių pažeidimo ar akių dirginimo potencialą arba įvertinant klasifikuojamos cheminės medžiagos santykinį toksiškumo akims potencialą tam tikrame teigiamų atsakų intervale.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Duomenys

47. Lentelėse turėtų būti pateikti kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos atskirų audinio kartotinių bandinių atskiro bandymo duomenys (pvz., OT arba MTT formazano smailių ploto vertės, apskaičiuoti bandomosios cheminės medžiagos ir kontrolinių ėminių audinių gyvybingumo procentinių verčių duomenys ir galutinio RhCE bandymo metodo prognozė), įskaitant kartotinių bandymų duomenis, jei reikia. Be to, ataskaitoje reikėtų pateikti atskirų bandomųjų cheminių medžiagų ir kontrolinių ėminių vidutinio audinio gyvybingumo procentinę dalį ir dviejų kartotinių bandinių gyvybingumo skirtumą (jei kartotinių audinio bandinių $n = 2$) arba SN (jei kartotinių audinio bandinių $n \geq 3$). Bandomosios medžiagos trukdžiai matuojant MTT formazaną, susiję su tiesiogine MTT redukcija ir (arba) spalvos trukdžiais, turėtų būti pateikti ataskaitoje apie kiekvieną bandomąją cheminę medžiagą.

Bandymo ataskaita

48. Į bandymo ataskaitą turėtų būti įtraukta ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga

Vienkomponentė cheminė medžiaga

- cheminio identifikavimo duomenys, pvz., IUPAC ar CAS pavadinimas (-ai), CAS registro numeris (-iai), SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė ir (arba) kiti identifikavimo duomenys;
- agregatinė būseną, lakumas, pH, LogP, molekulinė masė, cheminių medžiagų klasė ir papildomos fizinės ir cheminės savybės, susijusios su tyrimo atlikimu, kiek įmanoma išsamiau;
- grynumas, cheminis priemaišų pavadinimas, jei tinka ir praktiškai įmanoma, kt.;
- apdorojimas prieš bandymą, jei taikomas (pvz., šildymas, malimas);
- laikymo sąlygos ir stabilumas, atsižvelgiant į turimus duomenis.

Daugiakomponentė medžiaga, UVCB ir mišinys:

- kuo išsamesnis sudedamųjų dalių apibūdinimas, pvz., cheminis pavadinimas (žr. pirmiau), grynumas, kiekybinis paplitimas ir būdingos fizinės ir cheminės savybės, atsižvelgiant į turimus duomenis;
- agregatinė būseną ir papildomos būdingos fizinės ir cheminės savybės, susijusios su tyrimo atlikimu, kiek įmanoma išsamiau;
- grynumas, cheminis priemaišų pavadinimas, jei tinka ir praktiškai įmanoma, kt.;
- apdorojimas prieš bandymą, jei taikomas (pvz., šildymas, malimas);
- laikymo sąlygos ir stabilumas, atsižvelgiant į turimus duomenis.

Teigiamos ir neigiamos kontrolinės medžiagos

- cheminio identifikavimo duomenys, pvz., IUPAC ar CAS pavadinimas (-ai), CAS registro numeris (-iai), SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė ir (arba) kiti identifikavimo duomenys;
- agregatinė būseną, lakumas, molekulinė masė, cheminių medžiagų klasė ir papildomos fizinės ir cheminės savybės, susijusios su tyrimo atlikimu, kiek įmanoma išsamiau;
- grynumas, cheminis priemaišų pavadinimas, jei tinka ir praktiškai įmanoma, kt.;
- apdorojimas prieš bandymą, jei taikomas (pvz., šildymas, malimas);
- laikymo sąlygos ir stabilumas, atsižvelgiant į turimus duomenis;
- kitos nei ypač grynas H_2O arba Ca^{2+}/Mg^{2+} neturintis DPBS neigiamos kontrolinės medžiagos naudojimo pagrindimas, jei tinka;

- kitos nei grynas metilacetatas teigiamos kontrolinės medžiagos naudojimo pagrindimas, jei tinka;
- nuoroda į istorinių teigiamų ir neigiamų kontrolinių ėminių rezultatus, kurie įrodytų tinkamus bandymo priėmimo kriterijus.

Informacija apie rėmėją ir bandymų laboratoriją

- rėmėjo pavadinimas ir adresas, bandymų laboratorija ir tyrimo vadovas.

RhCE audinio darinys ir naudotas protokolai (pateikiant variantų pagrindimą, jei tinka)

Bandymų metodo sąlygos

- Naudotas RhCE audinio darinys, įskaitant partijos numerį;
- bangos ilgis ir dažnių juostos plotis (jei tinka), naudojamas MTT formazano kiekybiniam nustatymui, ir matavimo prietaiso (pvz., spektrofotometro) tiesiškumo intervalas;
- MTT formazano kiekybinio nustatymo metodo aprašymas;
- HPLC arba UPLC ir spektrofotometrijos sistemos aprašymas, jei tinka;
- visa su konkrečiu RhCE audinio dariniu susijusi pagalbinė informacija, įskaitant jo naudojimo charakteristikas. Turėtų būti įtraukti šie ir kiti duomenys:
 - i) gyvybingumo kokybės kontrolė (tiekėjas);
 - ii) gyvybingumas bandymo metodo sąlygomis (naudotojas);
 - iii) apsauginės funkcijos kokybės kontrolė;
 - iv) morfologija, jei duomenys yra;
 - v) atkuriamumas ir prognozavimo geba;
 - vi) kitos RhCE audinio darinio kokybės kontrolės ėminiai, jei yra;
- nuoroda į RhCE audinio darinio istorinius duomenis. Turėtų būti įtraukti šie ir kiti duomenys: kokybės kontrolės duomenų priimtumas atsižvelgiant į anksčiau sukauptus partijos duomenis;
- pareiškimas, kad bandymo įstaiga įrodė bandymo metodo taikymo kvalifikaciją prieš pradedant jį taikyti įprastiniu būdu, bandydama kvalifikacijai įrodyti skirtas medžiagas;

Atskiros bandymo ir bandymo priimtumo kriterijai

- Teigiamų ir neigiamų kontrolinių ėminių vidurkiai bei priimtumo intervalai, pagrįsti istoriniais duomenimis;
- priimtinas kintamumas tarp audinio kartotinių bandinių, gautas teigiamiems ir neigiamiems kontroliniams ėminiams;

- priimtinas kintamumas tarp audinio kartotinių bandinių, gautas bandomajai cheminei medžiagai;

Bandymo procedūra

- naudojamos bandymo procedūros išsamūs duomenys;
- bandomosios cheminės medžiagos ir naudojamų kontrolinių medžiagų dozės;
- ekspozicijos trukmė ir temperatūra, poekspozicinio laikymo terpėje ir poekspozicinio inkubavimo laikotarpiai (jei tinka);
- visų bandymo procedūros pakeitimų aprašymas;
- su tiesioginiais MTT reduktoriais ir (arba) spalvotomis bandomosiomis cheminėmis medžiagomis naudojamų kontrolinių medžiagų nuoroda,
- audinių kartotinių bandinių, naudojamų bandomajai cheminei medžiagai ir kontroliniams ėminiams (teigiamam, neigiamam kontroliniams ėminiams, NSMTT, NSS_{gyv} ir NSS_{negyv} , jei tinka);

Rezultatai:

- lentelėse pateikti atskirų bandomųjų cheminių medžiagų ir kontrolinių ėminių kiekvieno atskiro bandymo (įskaitant kartotinius bandymus, jei tinka) ir kiekvieno kartotinio bandinio matavimų duomenys, įskaitant MTT formazano OT arba smailės plotą, audinio gyvybingumo procentinę dalį, vidutinę audinio gyvybingumo procentinę dalį, skirtumus tarp kartotinių audinio bandinių arba SN ir galutinę prognozę;
- jei tinka, kontrolinių ėminių, naudotų tiesioginiams MTT reduktoriams ir (arba) spalvotoms bandomosioms cheminėms medžiagoms, rezultatai, įskaitant MTT formazano OT arba smailės plotą, % NSMTT, % NSS_{gyv} , % NSS_{negyv} , skirtumą tarp audinio kartotinių bandinių arba SN, galutinę tikslią audinio gyvybingumo procentinę dalį ir galutinę prognozę;
- rezultatai gauti bandomajai (-ioms) cheminei (-ėms) medžiagai (-oms) ir kontrolinėms cheminėms medžiagoms, atsižvelgiant į nustatytus atskiro bandymo ir bandymo priimtimumo kriterijus;
- kitų pastebėtų reiškinių aprašymas, pvz., bandomąja chemine medžiaga nudažytų audinių spalva;

Rezultatų aptarimas

Išvada

LITERATŪRA

- (1) UN (2015). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, New York and Geneva: United Nations. Pateikta http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.
- (2) Šio priedo B.5 skyrius. Ūmus akių dirginimas ar ėsdinimas.
- (3) Šio priedo B.47 skyrius. Galvijų ragenos drumstumo ir pralaidumo bandymo metodas, skirtas identifikuoti i) chemines medžiagas, sukeliančias smarkų akių pažeidimą, ir ii) chemines medžiagas, kurių nereikia klasifikuoti kaip dirginančias akis ar sukeliančias smarkų akių pažeidimą.
- (4) Šio priedo B.48 skyrius. Atskirtų viščiukų akių bandymo metodas, skirtas identifikuoti i) chemines medžiagas, sukeliančias smarkius akių pažeidimus, ir ii) chemines medžiagas, kurių nereikia klasifikuoti.
- (5) Šio priedo B.61 skyrius. Fluoresceino nuotėkio bandymų metodas akis ėsdinančioms ir stipriai dirginančioms medžiagoms identifikuoti.
- (6) Šio priedo B.68 skyrius. Trumpalaikės ekspozicijos *in vitro* bandymo metodas, skirtas identifikuoti i) chemines medžiagas, sukeliančias rimtą akių pažeidimą ir ii) chemines medžiagas, kurių nereikia klasifikuoti dėl akių dirginimo ar rimto akių pažeidimo.
- (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. Pateikta <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC100280>.
- (9) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2014). ESAC Opinion on the EURL ECVAM Eye Irritation Validation Study (EIVS) on EpiOcularTM EIT and SkinEthicTM HCE and a related Cosmetics Europe study on HPLC/UPLC-spectrophotometry as an alternative endpoint detection system for MTT-formazan. ESAC Opinion No 2014-03 of 17 November 2014; EUR 28173 EN; doi: 10.2787/043697. Pateikta <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. Pateikta <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. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

- (18) OECD (2005). Series on Testing and Assessment No 34: Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (19) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Hayden, P., Kubilus, J., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2011). Development of the EpiOcular™ Eye Irritation Test for Hazard Identification and Labelling of Eye Irritating Chemicals in Response to the Requirements of the EU Cosmetics Directive and REACH Legislation. *Altern. Lab. Anim.* 39, 339-364.
- (20) Nguyen, D.H., Beuerman, R.W., De Wever, B., Rosdy, M. (2003). Three-dimensional construct of the human corneal epithelium for in vitro toxicology. In: Salem, H., Katz, S.A. (Eds), *Alternative Toxicological Methods*, CRC Press, 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. Pateikta

[<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. Pateikta <https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index>.
- (36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., McNamee, P. (2015). Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT-Reduction Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29, 741-761.
- (37) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Handa, Y., DeLuca, J., Truong, T., Hunter, A., Kearney, P., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2015). EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) for Hazard Identification and Labeling of Eye Irritating Chemicals: Protocol Optimization for Solid Materials and Extended Shipment Times. *Altern. Lab Anim.* 43, 101-127.
- (38) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. May 2001. Pateikta <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>.
- (39) OECD (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Series on Testing and Assessment No 263. ENV Publications, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

1 priedėlis

APIBRĖŽTYS

Tikslumas – bandymo metodo rezultatų ir patvirtintų pamatinių verčių sutapimo artumas. Tikslumas yra bandymo metodo taikymo charakteristikų matas ir vienas iš tinkamumo aspektų. Terminas dažnai vartojamas kaip lygiavertis terminui „sutapimas“ ir reiškia tinkamų bandymo metodo rezultatų dalį (18).

Palyginamoji cheminė medžiaga – cheminė medžiaga, naudojama kaip etalonas lyginant su bandomąja chemine medžiaga. Palyginamoji cheminė medžiaga turėtų turėti šias savybes: i) pastovų (-ius) ir patikimą (-us) šaltinį (-ius) jai identifikuoti ir apibūdinti; ii) jos struktūrinės ir funkcinės ir (arba) produkto klasės savybės turi būti panašios į bandomosios (-ųjų) cheminės (-ių) medžiagos (-ų) klasės savybes; iii) žinomas fizikines ir chemines charakteristikas; iv) žinomą poveikį patvirtinančius duomenis; ir v) žinomą veikimo gebą reikiamo atsako intervale.

Aukštynkryptis metodas – pakopinis metodas, taikomas bandomajai cheminei medžiagai, apie kurią daroma prielaida, kad jos nereikia klasifikuoti ir ženklinti dėl akių dirginimo arba rimto akių pažeidimo, kai cheminės medžiagos, kurių nereikia klasifikuoti ir ženklinti (duoda neigiamą rezultatą), nustatomos pradedant nuo kitų cheminių medžiagų (duoda teigiamą rezultatą).

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

Sutapimas – žr. *tikslumas*.

Ragena – permatoma priekinė akies obuolio dalis, dengianti rainelę bei vyzdį ir praleidžianti šviesą į vidų.

VK – variacijos koeficientas.

Nuokr. – nuokrypis.

EIT – akių dirginimo bandymas (angl. *Eye Irritation Test*).

EURL ECVAM – Europos Sąjungos etaloninė alternatyvių bandymų su gyvūnais laboratorija.

Akių dirginimas – akių pokyčių atsiradimas uždėjus bandomosios cheminės medžiagos ant priekinio akies paviršiaus, kurie visiškai išnyksta per 21 parą nuo uždėjimo. Lygiavertis terminui *grįžtamasis poveikis akims* ir JT GHS ir CLP 2 kategorija.

ET₅₀ – ekspozicijos trukmė, per kurią ląstelių gyvybingumas sumažėja 50 % jas veikiant tam tikros pastovios koncentracijos palyginamąja chemine medžiaga.

Klaidingai neigiamų rezultatų dalis – visų teigiamų medžiagų, kurios taikant bandymo metodą yra klaidingai identifikuotos kaip neigiamos, dalis. Tai yra vienas iš bandymo

metodo taikymo charakteristikų rodiklių.

Klaidingai teigiamų rezultatų dalis – visų neigiamų cheminių medžiagų, kurios taikant bandymų metodą klaidingai identifikuotos kaip teigiamos, dalis. Tai yra vienas iš bandymo metodo taikymo charakteristikų rodiklių.

Pavojus – būdingoji agento savybė arba situacija, galinti sukelti neigiamų padarinių, kai organizmą, sistemą ar populiaciją (arba jos dalį) veikia tas agentas.

HCE – SkinEthic™ žmogaus ragenos epitelis.

HPLC – efektyvioji skysčių chromatografija.

IC₅₀ – palyginamosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant audinių gyvybingumas sumažėja 50 % po tam tikros ekspozicijos trukmės (pvz., 30 min apdorojimo natrio dodecilsulfatu).

Neribota dozė – ant RhCE audinio konstrukcijos dedamas bandomosios cheminės medžiagos kiekis, didesnis už kiekį, kurio reikia visiškai ir tolygiai padengti epitelio paviršių.

Negrižtamas poveikis akims – žr. *Rimtas akių pažeidimas*.

LLOQ – apatinė kiekybinio nustatymo riba

LogP – pasiskirstymo tarp vandens ir oktanolio koeficiento logaritmas.

Mišinys – dviejų ar daugiau cheminių medžiagų mišinys ar tirpalas.

Vienkomponentė medžiaga – medžiaga, kurią apibrėžia jos kiekybinė sudėtis, kai vienas pagrindinis komponentas sudaro ne mažiau kaip 80 % (masės).

Daugiakomponentė medžiaga – medžiaga, kurią apibrėžia jos kiekybinė sudėtis, kai daugiau kaip vieno pagrindinio komponento koncentracija $\geq 10\%$ (masės) ir $< 80\%$ (masės). Daugiakomponentė medžiaga yra gamybos proceso rezultatas. Skirtumas tarp mišinio ir daugiakomponentės medžiagos yra tas, kad mišinys gaunamas sumaišant dvi medžiagas arba daugiau nevykstant cheminei reakcijai. Daugiakomponentė medžiaga yra cheminės reakcijos rezultatas.

MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolinio bromidas; tiazolilo mėlynasis, tetrazolinio bromidas.

Neigiamas kontrolinis ėminys – ėminys, turintis visus bandymo sistemos komponentus ir apdorotas chemine medžiaga, kuri yra žinoma kaip nesukelianti teigiamo bandymo sistemos atsako. Šis ėminys tiriamas kartu su bandomąja chemine medžiaga apdorotais ėminiais ir kitais kontroliniais ėminiais, ir yra naudojamas 100 % audinių gyvybingumui nustatyti.

Neklasifikuojamos – cheminės medžiagos, kurios neklasifikuojamos dėl akių dirginimo (JT GHS ir CLP 2 kategorija, JT GHS 2A ar 2B kategorija) ar dėl rimto akių pažeidimo (JT

GHS ir CLP 1 kategorija). Lygiavertis terminui JT GHS ir CLP *Be kategorijos*.

NSS_{negyv} – negyvų audinių nespecifinė spalva.

NSS_{gyv} – gyvųjų audinių nespecifinė spalva.

NSMTT – nespecifinė MTT redukcija.

OT – optinis tankis.

Naudojimo charakteristikų standartai – standartai, pagrįsti patvirtintu ir mokslškai tinkamu laikomu bandymo metodu, kurie yra pagrindas įvertinti mechanizmo ir funkciniu požiūriu panašaus siūlomo bandymo metodo palyginamumą. Įtraukti: i) esminiai bandymo metodo komponentai; ii) etaloninių cheminių medžiagų, parinktų iš cheminių medžiagų, naudojamų patvirtinto bandymo metodo priimtinioms naudojimo charakteristikoms įrodyti, būtinasis sąrašas; ir iii) palyginamieji tikslumo bei patikimumo lygiai, pagrįsti gautais patvirtintam bandymo metodui, kuriuos siūlomas bandymo metodas turėtų rodyti, kai yra įvertinamas naudojant būtinąjį etaloninių cheminių medžiagų sąrašą (18).

Teigiamas kontrolinis ėminys – ėminys, turintis visus bandymo sistemos komponentus ir apdorotas chemine medžiaga, kuri yra žinoma kaip sukelianti teigiamą bandymo sistemos atsaką. Šis ėminys tiriamas kartu su bandomąja chemine medžiaga apdorotais ėminiais ir kitais kontroliniais ėminiais. Siekiant užtikrinti galimybę vertinti teigiamo kontrolinio ėminio atsako kintamumą per tam tikrą laiką, teigiamas atsakas neturėtų būti per stiprus.

Tinkamumas – santykio tarp bandymo ir tiriamo poveikio apibūdinimas bei bandymo reikšmingumo ir naudingumo siekiant tam tikro tikslo nustatymas. Tai yra atliekant bandymą tiriamo biologinio poveikio matavimo ar prognozavimo tikslumo laipsnis. Tinkamumas aprėpia bandymo metodo tikslumo (atitikties) aspektą (18).

Patikimumas – pagal tą patį protokolą atliekamo bandymų metodo, ilgą laiką taikomo laboratorijose ir tarp laboratorijų, atkuriamumo laipsnio matas. Jis įvertinamas apskaičiuojant atkuriamumą laboratorijoje ir tarp laboratorijų bei pakartojamumą laboratorijoje (18).

Pakaitinis bandymas – bandymas, kuris skirtas pakeisti bandymą, paprastai naudojamą ir pripažintą tinkamu pavojui identifikuoti ir (arba) rizikai vertinti, ir kuris nustatytas kaip užtikrinantis lygiavertę ar geresnę žmonių ar gyvūnų sveikatos arba aplinkos apsaugą, kaip tinka, palyginti su pripažintu bandymu esant visoms įmanomoms bandymo aplinkybėms ir cheminėms medžiagoms (18).

Atkuriamumas – rezultatų, gautų pakartotinai bandant tą pačią bandomąją cheminę medžiagą pagal tą patį bandymo protokolą, sutapimas (žr. *Patikimumas*) (18).

Grižtamasis poveikis akims – žr. *Akių dirginimas*.

RhCE – rekonstruotas žmogaus ragenos savybių epitelis.

Atskiras bandymas – vienos arba daugiau bandomųjų cheminių medžiagų bandymas vienu metu su neigiamu kontroliniu ėminiu ir teigiamu kontroliniu ėminiu.

SN – standartinis nuokrypis

Jautris – visų teigiamų (arba) veikliųjų bandomųjų cheminių medžiagų, kurios yra tinkamai klasifikuotos atliekant bandymą, dalis. Jis yra bandymo metodo, kuriuo gaunami su kategorija susiję rezultatai, tikslumo matas ir svarbus aspektas vertinant bandymo metodo tinkamumą (18).

Rimtas akių pažeidimas – akies audinio pažeidimas arba rimtas fizinis regėjimo pablogėjimas, ant išorinio akies paviršiaus uždėjus bandomosios cheminės medžiagos, kuris ne visiškai išnyksta per 21 dieną nuo uždėjimo. Lygiavertis terminui *negrįžtamasis poveikis akims* bei JT GHS ir CLP 1 kategorija.

Standartinės veiklos procedūros – formalios rašytinės procedūros, kuriose išsamiai aprašoma, kaip laboratorijoje turėtų būti atliekami tam tikri įprastiniai ir su bandymo metodu susiję veiksmai. Jas reikia turėti atsižvelgiant į gerą laboratorinę praktiką.

Specifiškumas – visų neigiamų ar neveikliųjų cheminių medžiagų, kurios yra tinkamai klasifikuotos atliekant bandymą, dalis. Jis yra bandymo metodo, kuriuo gaunami su kategorija susiję rezultatai, tikslumo matas ir svarbus aspektas vertinant bandymo metodo tinkamumą (18).

Medžiaga – natūralus arba gamybos proceso metu gautas cheminis elementas ir cheminių elementų junginys, įskaitant priedus, reikalingus jo stabilumui išlaikyti, ir priemaišas, atsirandančias gaminant, išskyrus tirpiklius, kurie gali būti atskirti nedarant poveikio cheminės medžiagos stabilumui ar nepakeičiant jos sudėties;

Bandymas – viena bandomoji cheminė medžiaga vienu metu bandoma ne mažiau kaip su dviem kartotiniais audinio bandiniais, kaip nurodyta atitinkamose SVP.

Audinio gyvybingumas – bendrojo rekonstruoto audinio ląstelių populiacijos aktyvumo ir jų gebėjimo redukuoti gyvųjų audinių dažiklį MTT matavimo parametras, kuris, atsižvelgiant į matuojamą vertinamąją baigtį ir taikomą bandymo schemą, yra susijęs su suminių gyvųjų ląstelių kiekiu ir (arba) jų gyvybingumu

Žemynkryptis metodas – pakopinis metodas, taikomas cheminei medžiagai, apie kurią daroma prielaida, kad ji sukelia rimtą akių pažeidimą, kai cheminės medžiagos, kurios sukelia rimtą akių pažeidimą (duoda teigiamą rezultatą), nustatomos pradedant nuo kitų cheminių medžiagų (duoda neigiamą rezultatą).

Bandomoji cheminė medžiaga – taikant šį metodą bandoma medžiaga arba mišinys.

Nuosekliųjų bandymų strategija – pakopomis atliekamų bandymų strategija, kai metodai taikomi nuosekliu būdu. Visa turima informacija apie bandomąją cheminę medžiagą peržiūrima kiekviename pakopoje taikant įrodomosios duomenų galios analizės procesą, kad būtų galima nustatyti, ar yra pakankamai duomenų sprendimui dėl pavojingumo kategorijos

priimti, prieš pereinant prie kitos strategijos pakopos. Jei atsižvelgiant į turimą informaciją, bandomąją cheminę medžiagą tam tikroje pakopoje galima priskirti prie pavojingųjų ir (arba) veiksmingų medžiagų, papildomų bandymų atlikti nereikia (18).

ULOQ – viršutinė kiekybinio nustatymo riba.

Jungtinių Tautų visuotinai suderinta cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklinimo sistema (JT GHS) – sistema, kurioje pateikiamas cheminių medžiagų (medžiagų ir mišinių) klasifikavimas pagal standartizuotus fizikinių pavojų, pavojų sveikatai bei aplinkai tipus ir nagrinėjami atitinkami informaciniai elementai, pvz., piktogramos, signaliniai žodžiai, pavojingumo frazės, atsargumo frazės ir saugos duomenų lapai, kad būtų galima informuoti apie medžiagų neigiamą poveikį, siekiant apsaugoti žmones (įskaitant darbuotojus, darbininkus, vežėjus, vartotojus ir avarijų likvidatorius) ir aplinką (1).

JT GHS ir CLP 1 kategorija – žr. *Rimtas akių pažeidimas*.

JT GHS ir CLP 2 kategorija – žr. *Akių dirginimas*.

JT GHS ir CLP be kategorijos – cheminės medžiagos, kurios neatitinka JT GHS ir CLP 1 arba 2 kategorijos (arba JT GHS 2A arba 2B kategorijos) klasifikavimo reikalavimų. Lygiavertis terminui *neklasifikuojamos*.

UPLC – ypač efektyvi skysčių chromatografija.

UVCB – nežinomos ar kintamos sudėties medžiagos, sudėtingųjų reakcijų produktai ar biologinės medžiagos.

Tinkamas bandymo metodas – bandymo metodas, kurio tinkamumo ir patikimumo pakanka tam tikram tikslui pasiekti ir kuriam taikomi moksliskai pagrįsti principai. Bandymų metodas niekuomet nėra visiškai tinkamas absoliučiąja prasme, bet tik tam tikro tikslo atžvilgiu (18).

Patvirtinto tinkamumo bandymo metodas – bandymo metodas, kurio patvirtinimo tyrimai atlikti, kad būtų nustatytas jo tinkamumas tam tikram tikslui pasiekti (įskaitant tikslumą) ir patikimumas. Svarbu pažymėti, kad patvirtinto tinkamumo bandymo metodo tikslumo ir patikimumo charakteristikos gali būti nepakankamos, kad jį būtų galima laikyti priimtiniu siūlomam tikslui pasiekti (18).

PPM – patvirtintas pamatinis metodas.

PPM1 – EpiOcular™ EIT nurodomas kaip patvirtintas pamatinis metodas 1.

PPM2 – SkinEthic™ HCE EIT nurodomas kaip patvirtintas pamatinis metodas 2.

Įrodomoji duomenų galia – įvairių informacijos dalių privalumų ir trūkumų nagrinėjimo procesas priimant ir patvirtinant sprendimą dėl bandomosios cheminės medžiagos pavojingumo.

2 priedėlis

RHCE BANDYMŲ, PATVIRTINTŲ IDENTIFIKUOTI CHEMINES MEDŽIAGAS, KURIŲ NEREIKIA KLASIFIKUOTI IR ŽENKLINTI DĖL AKIŲ DIRGINIMO ARBA RIMTO AKIŲ PAŽEIDIMO, PAGRINDINIAI BANDYMO KOMPONENTAI

Bandymo komponentai	EpiOcular™ EIT (PPM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (PPM 2)	
Protokolai	Skysčiai (15 min lašinamos pipete 37±1 °C ar žemesnėje temperatūroje)	Kietosios medžiagos (nelašinamos pipete)	Skysčiai ir klampios medžiagos (lašinamos pipete)	Kietosios medžiagos (nelašinamos pipete)
Modelio paviršius	0,6 cm ²	0,6 cm ²	0,5 cm ²	0,5 cm ²
Kartotinių audinio bandinių skaičius	Ne mažiau kaip 2	Ne mažiau kaip 2	Ne mažiau kaip 2	Ne mažiau kaip 2
Pradinis tikrinimas dėl spalvos trukdžių	50 µl + 1 ml H₂O, 60 min, esant 37±2 °C, 5±1 % CO₂, ≥ 95 % RH (nespaltvotos bandomosios cheminės medžiagos), arba 50 µl + 2 ml izopropanolio, maišoma 2–3 h kambario temperatūroje (spaltvotos bandomosios cheminės medžiagos) → jei bandomosios cheminės medžiagos OT, esant 570±20 nm, atėmus izopropanolio ar vandens OT, yra > 0,08 (tai atitinka maždaug 5 % neigiamų kontrolinių ėminių vidutinio OT), reikėtų atlikti gyvojo audinio pritaikytą kontrolinių ėminių bandymą.	50 mg + 1 ml H₂O, 60 min, esant 37±2 °C, 5±1 % CO₂, ≥ 95 % RH (nespaltvotos bandomosios cheminės medžiagos) ir (arba) 50 mg + 2 ml izopropanolio, maišoma 2–3 h kambario temperatūroje (spaltvotos ir nespaltvotos bandomosios cheminės medžiagos) → jei bandomosios cheminės medžiagos OT, esant 570±20 nm, atėmus izopropanolio ar vandens OT, yra > 0,08 (tai atitinka maždaug 5 % neigiamų kontrolinių ėminių vidutinio OT), reikėtų atlikti gyvojo audinio pritaikytą kontrolinių ėminių bandymą.	10 µl + 90 µl H₂O, maišoma 30±2 min kambario temperatūroje (18–28 °C) → jei bandomoji cheminė medžiaga yra spalvota, reikėtų atlikti gyvojo audinio pritaikytą kontrolinių ėminių bandymą	10 mg + 90 µl H₂O, maišoma 30±2 min kambario temperatūroje → jei bandomoji cheminė medžiaga yra spalvota, reikėtų atlikti gyvojo audinio pritaikytą kontrolinių ėminių bandymą

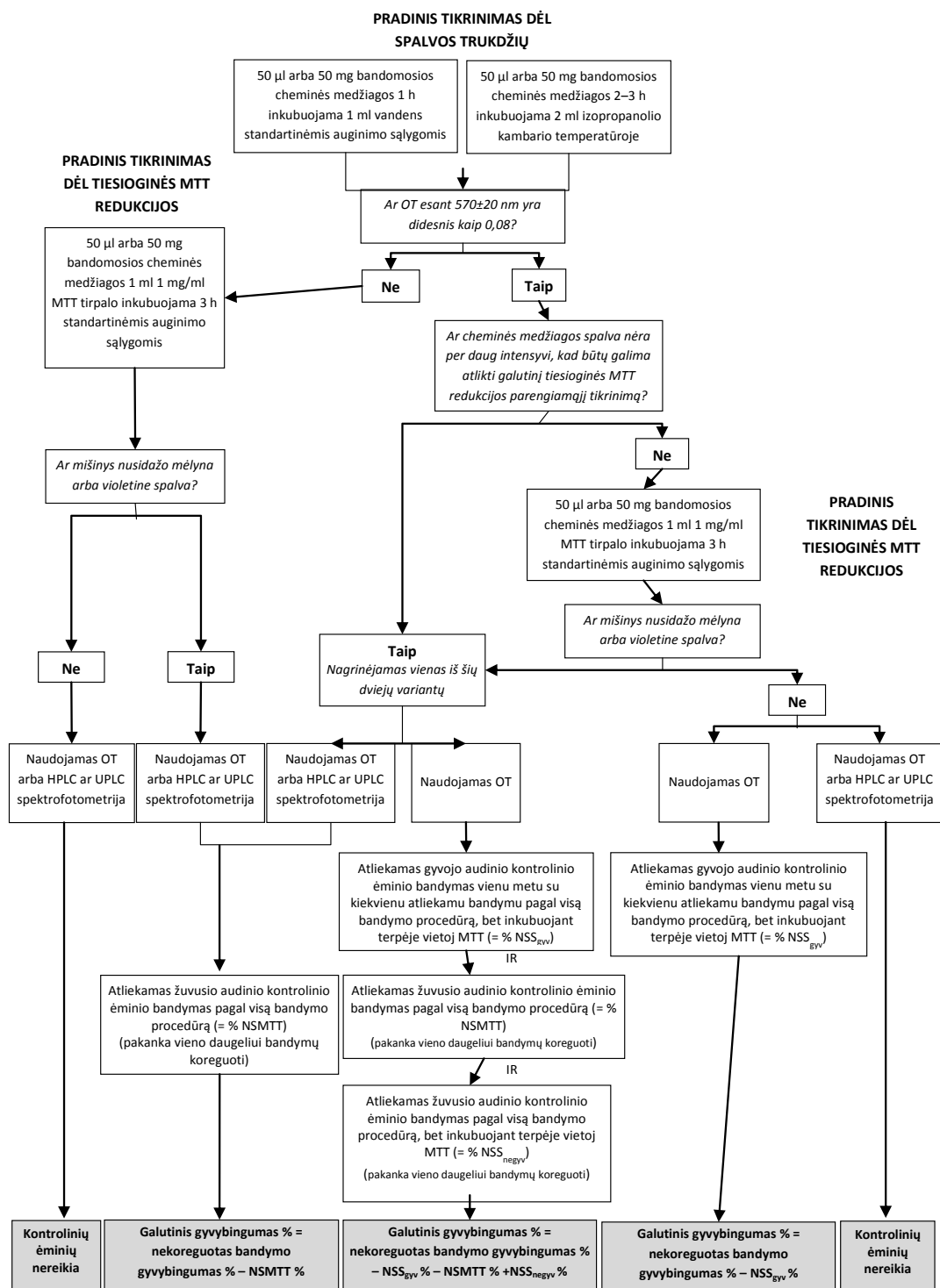
Bandymo komponentai	EpiOcular™ EIT (PPM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (PPM 2)	
Pradinis tikrinimas dėl tiesioginės MTT redukcijos	50 µl + 1 ml MTT 1 mg/ml tirpalo, 180±15 min, esant 37±2 °C, 5±1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH →jei tirpalo spalva pasikeičia į mėlyną ar violetinę, reikėtų atlikti vandenyje žuvusio audinio pritaiktų kontrolinių ėminių bandymą (50 µl sterilus dejonizuoto vandens MTT tirpale naudojama kaip neigiamas kontrolinis ėminys)	50 mg + 1 ml MTT 1 mg/ml tirpalo, 180±15 min, esant 37±2 °C, 5±1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH →jei tirpalo spalva pasikeičia į mėlyną ar violetinę, reikėtų atlikti vandenyje žuvusio audinio pritaiktų kontrolinių ėminių bandymą (50 µl sterilus dejonizuoto vandens MTT tirpale naudojama kaip neigiamas kontrolinis ėminys)	30 µl + 300 µl MTT 1 mg/ml tirpalo, 180± 15 min, esant 37±2°C, 5±1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH →jei tirpalo spalva pasikeičia į mėlyną ar violetinę, reikėtų atlikti vandenyje žuvusio audinio pritaiktų kontrolinių ėminių bandymą (30 µl sterilus dejonizuoto vandens MTT tirpale naudojama kaip neigiamas kontrolinis ėminys)	30 mg + 300 µl MTT 1 mg/ml tirpalo, 180± 15 min, esant 37±2 °C, 5±1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH →jei tirpalo spalva pasikeičia į mėlyną ar violetinę, reikėtų atlikti vandenyje žuvusio audinio pritaiktų kontrolinių ėminių bandymą (30 µl sterilus dejonizuoto vandens MTT tirpale naudojama kaip neigiamas kontrolinis ėminys)
Parengiamasis apdorojimas	20 µl Ca ²⁺ /Mg ²⁺ neturinčio DPBS 30 ± 2 min, esant 37±2 °C, 5±1 % CO ₂ , ≥95 % RH, apsaugota nuo šviesos.	20 µl Ca ²⁺ /Mg ²⁺ neturinčio DPBS 30±2 min, esant 37±2 °C, 5±1 % CO ₂ , ≥95 % RH, apsaugota nuo šviesos.	-	-
Apdorojimo dozės ir uždėjimo būdas	50 µl (83,3 µl/cm ²)	50 mg (83,3 mg/cm ²), naudojant kalibruotą įrankį (pvz., pilną sulig kraštais šaukštelį, sukalibruotą talpinti 50 mg natrio chlorido).	10 µl Ca ²⁺ /Mg ²⁺ neturinčio DPBS + 30 ± 2 µl (60 µl/cm ²) Klapioms medžiagoms naudojamas nailono tinklelis	30 µl Ca ²⁺ /Mg ²⁺ neturinčio DPBS + 30 ± 2 mg (60 mg/cm ²)
Ekspozicijos trukmė ir temperatūra	30 min (± 2 min) kultūros terpėje esant 37±2 °C, 5±1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH	6 h (± 0,25 h) kultūros terpėje esant 37±2 °C, 5±1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH	30 min (± 2 min) kultūros terpėje esant 37±2 °C, 5±1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH	4 h (± 0,1 h) kultūros terpėje esant 37±2 °C, 5±1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH
Skalavimas kambario temperatūroje	3 kartus 100 ml Ca ²⁺ /Mg ²⁺ neturinčio DPBS	3 kartus 100 ml Ca ²⁺ /Mg ²⁺ neturinčio DPBS	20 ml Ca ²⁺ /Mg ²⁺ neturinčio DPBS	25 ml Ca ²⁺ /Mg ²⁺ neturinčio DPBS

Bandymo komponentai	EpiOcular™ EIT (PPM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (PPM 2)	
Poekspozicinis laikymas	12 min (± 2 min) kultūros terpėje, kambario temperatūroje	25 min (± 2 min) kultūros terpėje, kambario temperatūroje	30 min (± 2 min) kultūros terpėje, esant 37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % RH	30 min (± 2 min) kultūros terpėje, kambario temperatūroje
Poekspozicinis inkubavimas	120 min (± 15 min) kultūros terpėje, esant 37±2 °C, 5±1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH	18 h (± 0,25 h) kultūros terpėje, esant 37±2 °C, 5±1 % CO ₂ , ≥95 % RH	nėra	18 h (± 0,5 h) kultūros terpėje, esant 37±2 °C, 5±1 % CO ₂ , ≥95 % RH
Neigiamas kontrolinis ėminys	50 µl H ₂ O Bandoma vienu metu	50 µl H ₂ O Bandoma vienu metu	30 ± 2µl Ca ²⁺ /Mg ²⁺ neturinčio DPBS Bandoma vienu metu	30 ± 2µl Ca ²⁺ /Mg ²⁺ neturinčio DPBS Bandoma vienu metu
Teigiamas kontrolinis ėminys	50 µl metilacetato Bandoma vienu metu	50 µl metilacetato Bandoma vienu metu	30 ± 2µl metilacetato Bandoma vienu metu	30 ± 2µl metilacetato Bandoma vienu metu
MTT tirpalas	300 µl, 1 mg/ml	300 µl, 1 mg/ml	300 µl, 1 mg/ml	300 µl, 1 mg/ml
MTT inkubavimo trukmė ir temperatūra	180 min (± 15 min), esant 37±2 °C, 5±1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH	180 min (± 15 min), esant 37±2 °C, 5±1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH	180 min (± 15 min), esant 37±2 °C, 5±1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH	180 min (± 15 min), esant 37±2 °C, 5±1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH
Ekstrahavimo tirpiklis	2 ml izopropanolio (ekstrahavimas nuo įdėklo viršaus ir apačios, praduriant audinį)	2 ml izopropanolio (ekstrahavimas nuo įdėklo apačios, praduriant audinį)	1,5 ml izopropanolio (ekstrahavimas nuo įdėklo viršaus ir apačios)	1,5 ml izopropanolio (ekstrahavimas nuo įdėklo apačios)
Ekstrahavimo trukmė ir temperatūra	2–3 h purtoma (~120 rpm) kambario temperatūroje arba per naktį 4–10 °C temperatūroje	2–3 h purtoma (~120 rpm) kambario temperatūroje arba per naktį 4–10 °C temperatūroje	4 h purtoma (~120 rpm) kambario temperatūroje arba laikoma bent per naktį 4–10 °C temperatūroje nepurtant	Netrumpiau kaip 2 h purtoma (~120 rpm) kambario temperatūroje
OT rodmenys	570 nm (550–590 nm) be palyginamojo filtro	570 nm (550–590 nm) be palyginamojo filtro	570 nm (540–600 nm) be palyginamojo filtro	570 nm (540–600 nm) be palyginamojo filtro
Audinių kokybės kontrolė	Apdorojimas 100 µl 0,3 % (V/V) Triton X-100 12,2 min ≤ ET ₅₀ ≤ 37,5 min	Apdorojimas 100 µl 0,3 % (V/V) Triton X-100 12,2 min ≤ ET ₅₀ ≤ 37,5 min	30 min apdorojimas SDS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC ₅₀ ≤ 3,5 mg/ml	30 min apdorojimas SDS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC ₅₀ ≤ 3,2 mg/ml

Bandymo komponentai	EpiOcular™ EIT (PPM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (PPM 2)	
Priimtumo kriterijai	1. Audinių kartotinių bandinių, apdorotų neigiamu kontroliniu ėminiu, vidutinis OT turėtų būti $> 0,8$ ir $< 2,5$ 2. Audinio kartotinių bandinių, 30 min veikiamų teigiamu kontroliniu ėminiu, vidutinis gyvybingumas, išreikštas % neigiamo kontrolinio ėminio atžvilgiu, turėtų būti $< 50 \%$ 3. Dviejų kartotinių audinio bandinių gyvybingumo skirtumas turėtų būti mažesnis kaip 20%.	1. Audinių kartotinių bandinių, apdorotų neigiamu kontroliniu ėminiu, vidutinis OT turėtų būti $> 0,8$ ir $< 2,5$ 2. Audinio kartotinių bandinių, 6 h veikiamų teigiamu kontroliniu ėminiu, vidutinis gyvybingumas, išreikštas % neigiamo kontrolinio ėminio atžvilgiu, turėtų būti $< 50 \%$ 3. Dviejų kartotinių audinio bandinių gyvybingumo skirtumas turėtų būti mažesnis kaip 20%.	1. Audinių kartotinių bandinių, apdorotų neigiamu kontroliniu ėminiu, vidutinis OT turėtų būti $> 1,0$ ir $\leq 2,5$ 2. Audinio kartotinių bandinių, 30 min veikiamų teigiamu kontroliniu ėminiu, vidutinis gyvybingumas, išreikštas % neigiamo kontrolinio ėminio atžvilgiu, turėtų būti $\leq 30 \%$ 3. Dviejų kartotinių audinio bandinių gyvybingumo skirtumas turėtų būti mažesnis kaip 20%.	1. Audinių kartotinių bandinių, apdorotų neigiamu kontroliniu ėminiu, vidutinis OT turėtų būti $> 1,0$ ir $\leq 2,5$ 2. Audinio kartotinių bandinių, 4 h veikiamų teigiamu kontroliniu ėminiu, vidutinis gyvybingumas, išreikštas % neigiamo kontrolinio ėminio atžvilgiu, turėtų būti $\leq 20 \%$ 3. Dviejų kartotinių audinio bandinių gyvybingumo skirtumas turėtų būti mažesnis kaip 20%.

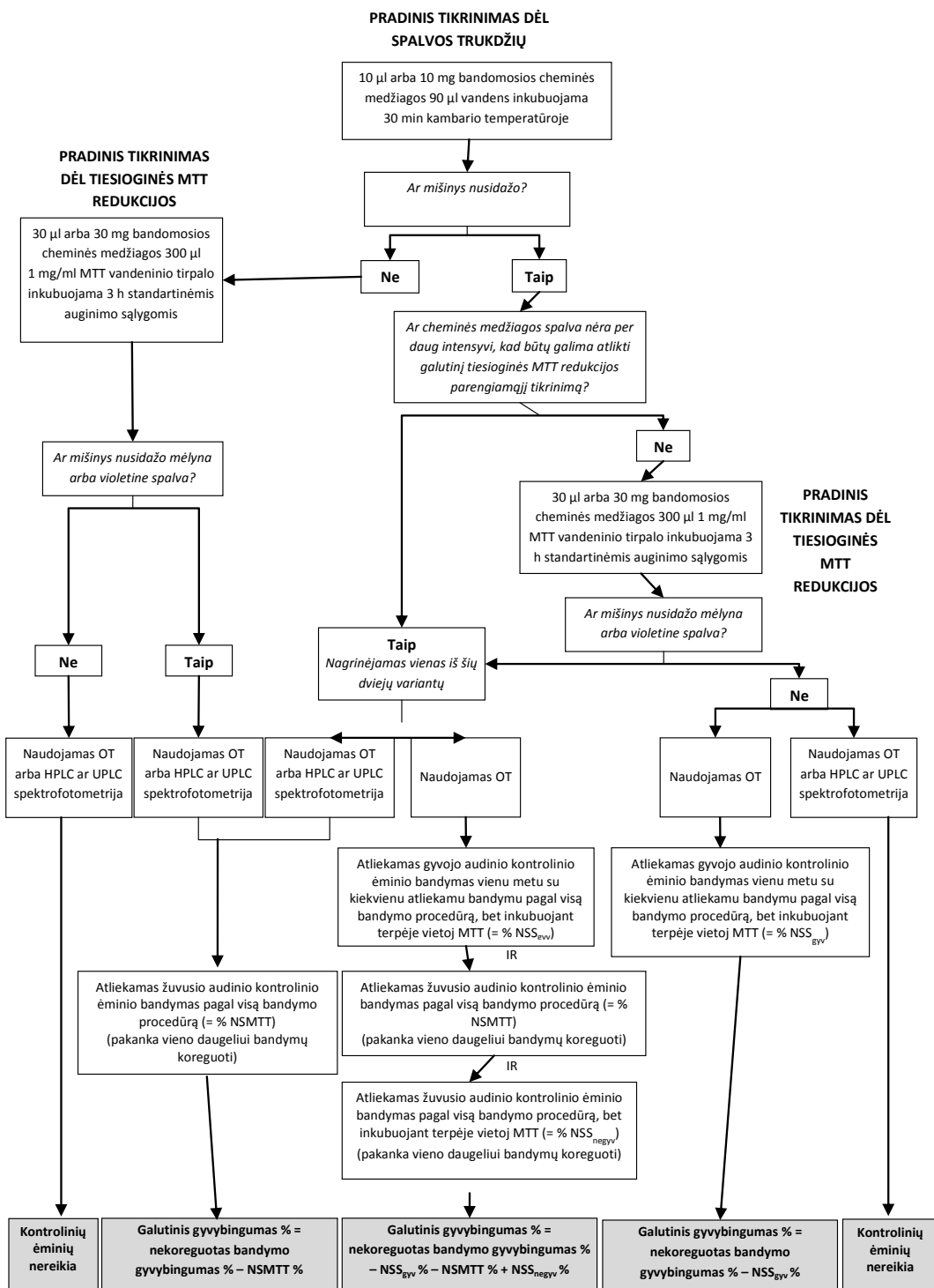
3 priedėlis

TIESIOGINIŲ MTT REDUKTORIŲ IR (ARBA) SPALVOS TRUKDŽIUS SUKELIANČIŲ CHEMINIŲ MEDŽIAGŲ IDENTIFIKAVIMO IR TVARKYMO REKOMENDACIJŲ AIŠKINIMO SCHEMA, PAGRĮSTA PPM1 SVP



4 priedėlis

TIESIOGINIŲ MTT REDUKTORIŲ IR (ARBA) SPALVOS TRUKDŽIUS SUKELIANČIŲ CHEMINIŲ MEDŽIAGŲ IDENTIFIKAVIMO IR TVARKYMO REKOMENDACIJŲ AIŠKINIMO SCHEMA, PAGRĮSTA PPM2 SVP



5 priedėlis

HPLC ARBA UPLC IR SPEKTROFOTOMETRIJOS SISTEMOS, SKIRTOS IŠ RHCE AUDINIO DARINIŲ EKSTRAHUOTAM MTT FORMAZANUI MATUOTI, TINKAMUMO ĮVERTINIMO PAGRINDINIAI PARAMETRAI IR PRIIMTINUMO KRITERIJAI

Parametras	Protokolas, parengtas pagal FDA rekomendacijas (36) (38)	Priimtino kriterijai
Atrankumas	Izopropanolio, gyvųjų audinių tuščiojo ėminio (neapdorotų RhCE audinio darinio gyvųjų ląstelių izopropanolio ekstrakto), negyvųjų audinių tuščiojo ėminio (neapdorotų RhCE audinio darinio negyvųjų ląstelių izopropanolio ekstrakto) ir dažiklio (pvz., metileno mėlynojo) analizė	$Plotas_{trukdžių} \leq 20 \%$ $Plotas_{LLOQ}^1$
Precižiškumas	Kokybės kontrolės ėminiai (t. y. MTT formazano 1,6 µg/ml, 16 µg/ml ir 160 µg/ml tirpalas) izopropanolyje (n = 5)	$VK \leq 15 \%$ arba $\leq 20 \%$ dėl LLOQ
Tikslumas	Kokybės kontrolės ėminiai izopropanolyje (n = 5)	% Nuokr. $\leq 15 \%$ arba $\leq 20 \%$ dėl LLOQ
Matricos efektas	Kokybės kontrolės medžiagos gyvųjų audinių tuščiajame ėminyje (n = 5)	$85 \% \leq \text{matricos efektas} \leq 115 \%$
Pernaša	Izopropanolio analizė po ULOQ ² etaloninio tirpalo	$Plotas_{trukdžių} \leq 20 \%$ $Plotas_{LLOQ}$
Atkuriamumas (vienos dienos)	3 nepriklausomos kalibravimo kreivės (gautos nuosekliai skiedžiant 6 kartus MTT formazaną izopropanolyje santykiu 1/3, pradedant ULOQ, t. y. 200 µg/ml); Kokybės kontrolės ėminiai izopropanolyje (n = 5)	Kalibravimo kreivės: % Nuokr. $\leq 15 \%$ arba $\leq 20 \%$ dėl LLOQ
Atkuriamumas (tarp dienų)	1 diena: 1 kalibravimo kreivė ir kokybės kontrolės ėminiai izopropanolyje (n = 3) 2 diena: 1 kalibravimo kreivė ir kokybės kontrolės ėminiai izopropanolyje (n = 3) 3 diena: 1 kalibravimo kreivė ir kokybės kontrolės ėminiai izopropanolyje (n = 3)	Kokybės kontrolės ėminiai: % Nuokr. $\leq 15 \%$ ir $VK \leq 15 \%$
MTT formazano RhCE audinio ekstrakto trumpalaikis stabilumas	Kokybės kontrolės medžiagos gyvųjų audinių tuščiajame ėminyje (n = 3), analizuojamos paruošimo dieną ir po 24 h laikymo kambario temperatūroje	% Nuokr. $\leq 15 \%$
MTT formazano RhCE audinio ekstrakto ilgalaikis stabilumas, jei reikia	Kokybės kontrolės medžiagos gyvųjų audinių tuščiajame ėminyje (n = 3), analizuojamos paruošimo dieną ir po kelių laikymo –20 °C temperatūroje dienų	% Nuokr. $\leq 15 \%$

¹ LLOQ: apatinė kiekybinio nustatymo riba, nurodoma kaip sudaranti 1–2 % audinio gyvybingumo, t. y. 0,8 µg/ml.

² ULOQ: viršutinė kiekybinio nustatymo riba, nurodoma kaip koncentracija, ne mažiau kaip du kartus didesnė nei didžiausia tikėtina MTT formazano koncentracija neigiamų kontrolinių ėminių izopropanolio ekstraktuose (~70 µg/ml taikant PPM), t. y. 200 µg/ml.

B.70 ŽMOGAUS REKOMBINANTINIO ESTROGENŲ RECEPTORIAUS (hrER) *IN VITRO* BANDYMAI PRIJUNGIMO PRIE ER GIMININGUMU PASIŽYMINČIOMS CHEMINĖMS MEDŽIAGOMS APTIKTI

BENDRASIS ĮVADAS

EBPO į rezultatus orientuotos bandymo gairės

1. Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymo gaires (TG) 493 (2015). TG 493 yra į rezultatus orientuotos bandymo gairės (PBTG), aprašančios žmogaus rekombinantų *in vitro* bandymo metodus, siekiant aptikti medžiagas, pasižyminčias prijungimo prie estrogenų receptorių giminingumu (prijungimo prie hrER bandymai). Jas sudaro du mechanizmo ir funkcinio požiūriu panašūs bandymai estrogenų receptorių (t. y. ERα) jungiamoms medžiagoms identifikuoti, ir jos turėtų palengvinti naujų panašių ar modifikuotų bandymų kūrimą, atsižvelgiant į patvirtinimo principus, išdėstytus EBPO rekomendaciniame dokumente dėl naujų ar atnaujintų pavojaus vertinimo bandymo metodų patvirtinimo ir tarptautinio pripažinimo (1). Visiškai patvirtinti pamatiniai bandymo metodai (2 priedėlis ir 3 priedėlis), kurie sudaro šio į rezultatus orientuoto bandymo metodo pagrindą, yra:

- Freyberger-Wilson (FW) *in vitro* estrogenų receptoriaus (ER) prijungimo bandymas, naudojant viso ilgio žmogaus rekombinantinį estrogenų receptorių ERα (2), ir
- Cheminių medžiagų įvertinimo ir tyrimų instituto (CERI) *in vitro* estrogenų receptoriaus (ER) prijungimo bandymas, naudojant žmogaus rekombinantinį ligandų prijungimo domeno baltymą (2).

Yra naudojimo charakteristikų standartai (3), skirti palengvinti tos pačios pavojaus vertinamosios baigties panašių bandymo metodų vystymą bei patvirtinimą ir laiku iš dalies pakeisti PBTG 493, kad nauji panašūs bandymai galėtų būti įtraukti į atnaujintas PBTG. Tačiau panašūs bandymai bus įtraukti tik tada, kai tik EBPO atliks peržiūrą ir sutiks, kad jie atitinka naudojimo charakteristikų standartus. Į TG 493 įtraukti bandymai gali būti naudojami sprendžiant be skirtumo klausimus, susijusius su EBPO valstybės narės reikalavimais jungimo prie estrogenų receptorių bandymo rezultatams, ir turėti naudos iš abipusio duomenų pripažinimo.

Į šį bandymo metodą įtrauktų bandymų pagrindimas ir principai

2. 1998 m. EBPO iniciatyva pradėta labai svarbi veikla, kurios tikslas – patikslinti esamas ir parengti naujas galimų endokrininę sistemą ardančių cheminių medžiagų atrankos ir bandymo gaires. Endokrininę sistemą ardančių cheminių medžiagų bandymo ir vertinimo EBPO konceptuali sistema (CF) buvo peržiūrėta 2012 m. Originalios ir peržiūrėtos CF yra įtrauktos kaip priedai į rekomendacinį dokumentą dėl endokrininę sistemą ardančių cheminių medžiagų vertinimo standartizuotų bandymo gairių (4). CF sudaro penki lygiai, kai kiekvienas lygis atitinka skirtingą biologinio sudėtingumo lygį. Šiame bandymo

metode aprašyti prijungimo prie ER bandymai yra 2 lygio ir juos sudaro *in vitro* bandymai, kuriais gaunami duomenys apie pasirinktą (-us) endokrininį (-ius) mechanizmą (-us) ir (arba) kelią (-ius). Šis bandymo metodas taikomas *in vitro* prisijungimo prie receptorių bandymams, skirtiems identifikuoti žmogaus estrogenų receptoriaus alfa (ER α) ligandus.

3. Buvo aiškiai įrodytas *in vitro* prijungimo prie ER bandymo ryšys su biologinėmis funkcijomis. Prijungimo prie ER bandymai yra skirti identifikuoti chemines medžiagas, kurios gali suardyti estrogenų hormonų seką, ir pastaruosius du dešimtmečius yra plačiai naudojami ER pasiskirstymui audiniuose apibūdinti, taip pat ER agonistams arba antagonistams identifikuoti. Šie bandymai rodo ligando ir receptoriaus sąveiką, kuri yra pradinis estrogenų signalų perdavimo kelio žingsnis ir yra svarbi visų stuburinių reprodukcijos funkcijai.
4. Estrogenų sąveika su estrogenų receptoriais gali turėti įtakos estrogenų valdomų genų transkripcijai ir sukelti negenominius poveikius, kurie gali sukelti arba slopinti ląstelių procesus, įskaitant tuos, kurie būtini ląstelių proliferacijai, normaliam vaisiaus vystymuisi ir reprodukcijos funkcijai (5) (6) (7). Normalių estrogeninių sistemų sutrikimas gali sukelti neigiamą poveikį normaliam vystymuisi (ontogenezei), reprodukcinei sveikatai ir reprodukcijos sistemos vientisumui. Netinkama ER signalų perdavimas gali sukelti tokius reiškinius, kaip didesnė nuo hormonų priklausančio vėžio rizika, mažesnis vaisingumas, vaisiaus augimo ir vystymosi pakitimai (8).
5. *In vitro* prijungimo bandymai yra pagrįsti tiesiogine medžiagos sąveika su specifinio receptoriaus ligando prijungimo vieta, kuri reguliuoja geno transkripciją. Pagrindinis žmogaus rekombinantinio estrogenų receptoriaus alfa (hrER α) prijungimo bandymo komponentas matuoja radioaktyviuoju izotopu žymėto ligando ([^{3} H]17 β -estradiolio) gebėjimą jungtis prie ER, esant didėjančiai bandomosios cheminės medžiagos (t. y. konkurento) koncentracijai. Didelį giminingumą ER turinčios bandomosios cheminės medžiagos konkuruoja su radioaktyviuoju izotopu žymėtu ligandu esant mažesnei koncentracijai palyginti su tomis cheminėmis medžiagomis, kurių giminingumas receptoriui yra mažesnis. Šį bandymą sudaro du pagrindiniai komponentai: sotinamojo prijungimo bandymo, skirto apibūdinti receptoriaus ir ligando sąveikos parametrus ir pagrįsti ER specifiškumą, ir konkurencinio prijungimo bandymo, kuris apibūdina bandomosios cheminės medžiagos ir radioaktyviuoju izotopu žymėto ligando konkurenciją dėl prijungimo prie ER.
6. CERI ir FW prijungimo bandymų patvirtinimo tyrimai įrodė jų tinkamumą ir patikimumą atsižvelgiant į numatytą tikslą (2).
7. Šio bandymo metodo aprašyme vartojamos apibrėžtys ir santrumpos pateiktos 1 priedėlyje.

Prijungimo prie receptorių bandymų taikymo sritis ir su jais apribojimai

8. Šie bandymai yra siūlomi atrankos ir pirmumo nustatymo tikslais, tačiau taip pat gali suteikti informacijos apie molekulinės iniciacijos įvykį (MIE), kuri gali būti naudojama taikant įrodomosios vertės analizės metodą. Jie nagrinėja cheminių medžiagų prijungimą prie ER α ligandų prijungimo domeno *in vitro* sistemoje. Todėl rezultatų nereikėtų tiesiogiai ekstrapoliuoti į nepalietos endokrininės sistemos *in vivo* sudėtingą signalizavimą ir reguliavimą.
9. Gamtinio ligando 17 β -estradiolio prijungimas yra molekulinį įvykių serijos pradinis žingsnis, kuris aktyvina tikslinių genų transkripciją ir dėl kurio galiausiai įvyksta fiziologinis pokytis (9). Todėl prijungimas prie ER α ligandų prijungimo domeno laikomas vienu iš pagrindinių ER tarpininkaujamų endokrininės sistemos ardymo mechanizmų, nors yra kitų endokrininės sistemos ardymo mechanizmų, įskaitant i) sąveikas su kitomis nei ER α ligandų prijungimo domenais sritimis, ii) sąveikas su kitais su estrogenų signalų perdavimu susijusiais receptoriais, ER β ir G baltymo sujungto estrogenų receptoriumi, kitais kitais receptoriais ir fermentų sistemomis endokrininės sistemos viduje, iii) hormonų sintezę, iv) hormonų metabolinį aktyvinimą ir (arba) inaktyvinimą, v) hormonų pasiskirstymą tiksliniuose audiniuose ir vi) hormonų pašalinimą iš kūno. Nei viename pagal šį bandymo metodą atliekamų bandymų šie veikimo būdai nenagrinėjami.
10. Taikant šį bandymo metodą tiriamas cheminių medžiagų gebėjimas prisijungti prie žmogaus ER α , bet skirtumas tarp ER α agonistų ar antagonistų nėra nustatomas. Atliekant šiuos bandymus nenagrinėjami tolesni įvykiai, pvz., genų transkripcija arba fiziologiniai pokyčiai. Atsižvelgiant į tai, kad atliekant patvirtinimą buvo naudotos tik atskiros vienkomentės medžiagos, tinkamumo mišiniams klausimas nebuvo sprendžiamas. Bandymai vis dėlto laikomi teoriškai tinkamais bandyti daugiakomponentes medžiagas ir mišinius. Prieš taikant bandymų metodą mišiniui, kad būtų gauti numatomo reglamentavimo tikslui skirti duomenys, reikėtų panagrinėti, ar metodu galima pasiekti tą tikslą atitinkančius rezultatus ir, jei taip, dėl kokios priežasties. Tokie svarstymai nereikalingi, kai yra reglamentavimo reikalavimas bandyti mišinį.
11. Ląstelių laisvųjų receptorių sistemos neturi būdingos metabolinės gebos ir nebuvo patvirtintos kartu su metabolinėmis fermentų sistemomis. Tačiau galbūt būtų galima įtraukti metabolinį aktyvumą į tyrimo planą, bet tam reikės papildomų patvirtinimo tyrimų.
12. Cheminės medžiagos, galinčios denatūruoti baltymą (t. y. receptoriaus baltymą), pvz., paviršinio aktyvumo medžiagos arba medžiagos, keičiančios bandymo buferinio tirpalo pH, negali būti bandomos arba gali būti bandomos tik tokios koncentracijos, kuriai esant tokios sąveikos nevyksta. Arba bandomoji cheminė medžiaga bandoma esant tokiam koncentracijos intervalui, kurį riboja jos tirpumas bandymo buferiniame tirpale.
13. Informacijos tikslais 1 lentelėje pateikti bandymo rezultatai, gauti 24 medžiagoms, kurios buvo bandomos atliekant abu šiame bandymo metode aprašytus visiškai patvirtintus bandymus. 17 šių medžiagų klasifikuojamos kaip prie ER jungiamos medžiagos ir 6 – kaip

nejungiamos, atsižvelgiant į paskelbtas ataskaitas, įskaitant *in vitro* ER transkripcijos aktyvacijos bandymus ir (arba) uterotrofinį bandymą (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). Atsižvelgiant į 1 lentelėje apibendrintus duomenis, buvo beveik 100 % visų medžiagų klasifikavimo pagal abu tyrimus sutapimas iki 10^{-4} mol/l, ir kiekviena medžiaga buvo teisingai klasifikuota kaip jungiama prie ER ar nejungiama. Papildomos informacijos apie šią medžiagų grupę, taip pat apie papildomas medžiagas, bandytas atliekant jungimo prie ER bandymų patvirtinimo tyrimus, pateikiama prijungimo prie hrER bandymui skirtuose naudojimo charakteristikų standartuose (3), 2 priedėlis (1, 2 ir 3 lentelės).

1 lentelė. Medžiagų klasifikavimas kaip prie ER jungiamų ar nejungiamų medžiagų, kai jos bandomos atliekant FW ir CERi prijungimo prie hrER bandymus ir lyginant su numanomu atsaku

	Medžiagos pavadinimas	CAS RN	Numanomas atsakas	FW bandymas		CERi bandymas		MESH cheminė klasė	Produkto klasė
				Koncentracijos intervalas (mol/l)	Klasifikavimas	Koncentracijos intervalas (mol/l)	Klasifikavimas		
1	17β-estradiolis	50-28-2	Jungiama medžiaga	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Jungiama medžiaga	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Jungiama medžiaga	Steroidas	Vaistai, veterinarijos priemonė
2	Noretinodrelis	68-23-5	Jungiama medžiaga	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-4}$	Jungiama medžiaga	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-4}$	Jungiama medžiaga	Steroidas	Vaistai, veterinarijos priemonė
3	Noretindronas	68-22-4	Jungiama medžiaga	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-4}$	Jungiama medžiaga	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-4}$	Jungiama medžiaga	Steroidas	Vaistai, veterinarijos priemonė
4	Di-n-butilftalatas	84-74-2	Nejungiama medžiaga*	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Nejungiama medžiaga**†	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Nejungiama medžiaga**†	Angliavandėnis (ciklinis), esteris	Plastifikatoriai, tarpiniai cheminiai produktai
5	DES	56-53-1	Jungiama medžiaga	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Jungiama medžiaga	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Jungiama medžiaga	Angliavandėnis (ciklinis), fenolis	Vaistai, veterinarijos priemonė
6	17α-etinilestradiolis	57-63-6	Jungiama medžiaga	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Jungiama medžiaga	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Jungiama medžiaga	Steroidas	Vaistai, veterinarijos priemonė
7	Mezo-heksetrolis	84-16-2	Jungiama medžiaga	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Jungiama medžiaga	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Jungiama medžiaga	Angliavandėnis (ciklinis), fenolis	Vaistai, veterinarijos priemonė
8	Genisteinas	446-72-0	Jungiama medžiaga	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Jungiama medžiaga	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Jungiama medžiaga	Angliavandėnis (heterociklinis), flavonoidas	Gamtinis produktas
9	Ekuolis	531-95-3	Jungiama medžiaga	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Jungiama medžiaga	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Jungiama medžiaga	Fitoestrogenų metabolitas	Gamtinis produktas
10	Butilparabenai (n-butil-4-hidroksibenzenkarboksilatai)	94-26-8	Jungiama medžiaga	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Jungiama medžiaga	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Jungiama medžiaga	Parabenai	Konservantai
11	Nonilfenolis (mišinys)	84852-15-3	Jungiama medžiaga	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Jungiama medžiaga	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Jungiama medžiaga	Alkilfenolis	Tarpinis junginys
12	o,p'-DDT	789-02-6	Jungiama medžiaga	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Jungiama medžiaga	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Jungiama medžiaga	Chloroorganinis junginys	Insekticidas
13	Kortikosteronas	50-22-6	Nejungiama medžiaga*	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Nejungiama medžiaga	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Nejungiama medžiaga	Steroidas	Gamtinis produktas
14	Zearalenonas	17924-92-4	Jungiama medžiaga	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Jungiama medžiaga	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Jungiama medžiaga	Angliavandėnis (heterociklinis), laktonas	Gamtinis produktas
15	Tamoksifenas	10540-29-1	Jungiama medžiaga	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Jungiama medžiaga	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Jungiama medžiaga	Angliavandėnis (ciklinis)	Vaistai, veterinarijos priemonė
16	5α-dihidrotestosteronas	521-18-6	Jungiama medžiaga	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Jungiama medžiaga	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Jungiama medžiaga	Steroidas, nefenolis	Gamtinis produktas
17	Bisfenolis A	80-05-7	Jungiama medžiaga	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Jungiama medžiaga	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Jungiama medžiaga	Fenolis	Tarpinis cheminis produktas

18	4- <i>n</i> -heptilfenolis	1987-50-4	<i>Jungiamoji medžiaga</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Abejotina medžiaga ^a	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Jungiamoji medžiaga	Alkilfenolis	Tarpinis produktas
19	Keponas (chlordekonas)	143-50-0	<i>Jungiamoji medžiaga</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Jungiamoji medžiaga	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Jungiamoji medžiaga	Angliavandėnis (halogenintas)	Pesticidas
20	Benz[a]antracenas	56-55-3	<i>Nejungiama medžiaga</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Nejungiama medžiaga ^b	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Nejungiama medžiaga ^b	Aromatinis angliavandėnis	Tarpinis produktas
21	Enterolaktonas	78473-71-9	<i>Jungiamoji medžiaga</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Jungiamoji medžiaga	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Jungiamoji medžiaga	Fitoestrogenas	Gamtinis produktas
22	Progesteronas	57-83-0	<i>Nejungiama medžiaga*</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Nejungiama medžiaga	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Nejungiama medžiaga	Steroidas	Gamtinis produktas
23	Oktiltrietoksisilanas	2943-75-1	<i>Nejungiama medžiaga</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Nejungiama medžiaga	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Nejungiama medžiaga	Silanas	Paviršiaus įtempies modifikatorius
24	Atrazinas	1912-24-9	<i>Nejungiama medžiaga*</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Nejungiama medžiaga	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Nejungiama medžiaga	Heterociklinis junginys	Herbicidas

*Tirpumo riba $< 1 \times 10^{-4}$ mol/l.

* Di-*n*-butilftalato (DBP) naudojimas ir klasifikavimas kaip nejungiamos medžiagos buvo pagrįstas ne didesnės 10^{-4} mol/l koncentracijos bandymais, nes atliekant parengiamojo patvirtinimo tyrimus kai kurios laboratorijos pastebėjo, kad medžiaga netirpsta esant 10^{-3} mol/l (pvz., drumstumas).

† Atliekant patvirtinimo tyrimą, di-*n*-butilftalatas (DBP) buvo bandomas kaip užkoduota bandomoji cheminė medžiaga, esant mažesnei kaip 10^{-3} mol/l koncentracijai. Šiomis sąlygomis kai kuriose laboratorijose buvo stebimas žymėtojo ligando prijungimo sumažėjimas esant didžiausiai koncentracijai (10^{-3} mol/l) ir (arba) nevienareikšmiškas kreivės priderinimas. Atliekant šiuos atskirus bandymus, DBP buvo klasifikuojamas kaip „abejotinas“ arba „jungiamoji medžiaga“ 3/5 laboratorijų, naudojančių CERi bandymą, ir 5/6 laboratorijų, naudojančių FW bandymą (žr. (2) nuorodos IV.B.3a,b ir VI.A skirsnius).

^a Klasifikacija neatitiko numanomos klasifikacijos. 4-*n*-heptilfenolio priskyrimas „abejotinai“ arba „nejungiamai medžiagai“ 3/5 laboratorijų davė vidutinę klasifikaciją kaip abejotinos medžiagos. Nuodugnesnis tikrinimas parodė, kad tai buvo susiję cheminės medžiagos tirpumo apribojimais, kurie trukdė gauti visą prijungimo kreivę.

^b Atliekant patvirtinimo tyrimą, benz(a)antracenas buvo perklasifikuotas į nejungiamą medžiagą (t. y. neigiamą), atsižvelgiant į paskelbtus literatūrinius duomenis, įrodančius, kad šiai medžiagai patvirtintas *in vitro* estrogeninis aktyvumas (16) visų pirma priklauso nuo jos metabolinio aktyvinimo (17)(18). Medžiagos fermentinis metabolinis aktyvinimas nebūtų numatytas, atliekant prijungimo prie ląstelių laisvojo hrER bandymus, kurie naudojami atliekant šį tarplaboratorinį patvirtinimo tyrimą. Todėl tinkamas šios medžiagos klasifikavimas yra „nejungiama medžiaga“, kai naudojama FW ir CERi bandymų sąlygomis.

PRIJUNGIMO PRIE HRER BANDYMO KOMPONENTAI

Pagrindiniai bandymo komponentai

- Šis bandymo metodas taikomas atliekant bandymus, naudojančius ER receptorių ir pakankamai stiprų receptoriaus ligandą, kuris gali būti naudojamas kaip bandymo žymeklis ir gali būti pavaduotas vis didesnės koncentracijos bandomąja chemine medžiaga. Prijungimo bandymus sudaro tokie du pagrindiniai komponentai: 1) sotinamasis prijungimas ir 2) konkurencinis prijungimas. Sotinamojo prijungimo bandymas naudojamas receptoriaus preparatų specifiškumui ir aktyvumui patvirtinti, kai konkurencinio prijungimo bandymas naudojamas bandomosios cheminės medžiagos gebėjimui jungtis prie hrER įvertinti.

Kontroliniai ėminiai

- Turėtų būti aprašytas pasiūlyto konkurencinio etaloninio estrogeno ir kontrolinių medžiagų pagrindimas. Vienalaikiai kontroliniai ėminiai (tirpiklio (nešiklio), teigiami (prie ER

jungiamos medžiagos; stipriai ir silpnai giminingos), neigiami (nejungiamos medžiagos)), jei tinka, naudojami kaip rodiklis, kad bandymas yra veiksmingas bandymo sąlygomis ir sudaro pagrindą bandymus lyginti tarpusavyje; paprastai jie yra tam tikro bandymo priimtino kriterijai (1). Etaloninio estrogeno ir kontrolinių ėminių (t. y. silpnai jungiamos medžiagos ir nejungiamos medžiagos) visų koncentracijos verčių kreivės turėtų būti naudojamos vienoje plokštelėje atliekant kiekvieną atskirą bandymą. Visose kitose plokštelėse turėtų būti: 1) po tris E2 ir silpnai jungiamos medžiagos didelės (maždaug visiškas pavadinimas radioaktyviuoju izotopu žymėto ligando) ir vidutinės (maždaug IC₅₀) koncentracijos kartotinius ėminius; 2) po tris kartotinius tirpiklio kontrolinio ir nespecifinio prijungimo ėminius.

Standartinės kokybės kontrolės procedūros

16. Turėtų būti atliekamos kiekvienam bandymui aprašytos standartinės kokybės kontrolės procedūros, siekiant užtikrinti receptorių aktyvumą, tinkamas cheminių medžiagų koncentracijas, stabilias daugelio kartotinių bandymų leidžiamųjų nuokrypų ribas, ir ilgą laiką išsaugoti gebėjimą duoti tikėtinus prijungimo prie ER atsakus.

Laboratorijos kvalifikacijos įrodymas

17. Prieš nežinomų cheminių medžiagų bandymus pagal šį bandymo metodą, kiekviena laboratorija turėtų įrodyti bandymo šiuo metodu kvalifikaciją, atlikdama sotinamojo prijungimo bandymus ER preparato specifiskumui ir aktyvumui patvirtinti bei etaloninio estrogeno ir kontrolinių medžiagų (silpnai jungiamos ir nejungiamos medžiagos) konkurencinio prijungimo bandymus. Laboratorija turėtų sukurti istorinių duomenų bazę, kurioje būtų etaloninio estrogeno ir kontrolinių ėminių rezultatai, gauti skirtingomis dienomis atliekant 3–5 nepriklausomus bandymus. Šie bandymai būtų laboratorijos etaloninio estrogeno ir istorinių kontrolinių ėminių duomenų pagrindas ir būtų naudojami kaip bandymo priimtino vertinimo dalis, ateityje atliekant atskirus bandymus.
18. Bandymo sistemos jautris taip pat būtų patvirtintas bandant kvalifikacijai įrodyti skirtas medžiagas, išvardytas 2 lentelėje. Kvalifikacijai įrodyti skirtų medžiagų sąrašas sudaro prijungimo prie ER bandymams skirtuose naudojimo charakteristikų standartuose pateiktų etaloninių medžiagų rinkinio dalį (3). Šių medžiagų yra prekyboje, jos reprezentuoja cheminių medžiagų klases, paprastai susijusias su prijungimo prie ER aktyvumu, rodo tinkamą prie ER jungiamų medžiagų tikėtino veiksmingumo intervalą (t. y. nuo silpnų iki stiprių) ir jų tarpe yra nejungiamų (t. y. neigiamų) medžiagų. Kiekvienos kvalifikacijai įrodyti skirtos medžiagos bandymo koncentracija turėtų aprėpti 2 lentelėje nurodytą intervalą. Turėtų būti atliekami bent trys kiekvienos medžiagos bandymai, kurių rezultatai turėtų atitikti numanomą cheminį aktyvumą. Kiekvienas bandymas turėtų būti atliekamas nepriklausomai (t. y. iš naujo skiedžiant receptoriaus, cheminių medžiagų ir reagento tirpalus), ruošiant tris kiekvienos koncentracijos kartotinius ėminius. Kvalifikacija įrodoma, jei teisingai klasifikuojama kiekviena kvalifikacijai įrodyti skirta medžiaga (teigiama ar

neigiama). Kvalifikaciją turėtų patikrinti kiekvienas laborantas, kai mokosi atlikti bandymus.

2 lentelė. hrER konkurencinio prijungimo bandymų kontrolinių medžiagų ir kvalifikacijai įrodyti skirtų medžiagų sąrašas¹

Nr.	Medžiagos pavadinimas	CASRN ²	Numanomas atsakas ^{3,4}	Bandymo koncentracijos intervalas (mol/l)	MESH cheminė klasė ⁵	Produkto klasė ⁶
Kontrolinės medžiagos (etaloninis estrogenas, silpnai jungiama medžiaga, nejudanti medžiaga)						
1	17-εστραδιολισ	50-28-2	Jungiama medžiaga	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Steroidas	Vaistai, veterinarijos priemonė
2	Noretinodrelis (arba) noretindronas	68-23-5 (arba) 68-22-4	Jungiama medžiaga	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-6}$	Steroidas	Vaistai, veterinarijos priemonė
3	Oktiltrietoksisilanas	2943-75-1	Nejudanti medžiaga	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Silanas	Paviršiaus įtempties modifikatorius
Kvalifikacijai įrodyti skirtos medžiagos⁶						
4	Dietilstilbestrolis	56-53-1	Jungiama medžiaga	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Angliavandenilis (ciklinis), fenolis	Vaistai, veterinarijos priemonė
5	17α-etinilestradiolis	57-63-6	Jungiama medžiaga	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Steroidas	Vaistai, veterinarijos priemonė
6	Mezo-heksestrolis	84-16-2	Jungiama medžiaga	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Angliavandenilis (ciklinis), fenolis	Vaistai, veterinarijos priemonė
7	Tamoksifenas	10540-29-1	Jungiama medžiaga	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Angliavandenilis (ciklinis)	Vaistai, veterinarijos priemonė
8	Genisteinas	446-72-0	Jungiama medžiaga	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Heterociklinis junginys, flavonoidas	Gamtinis produktas
9	Bisfenolis A	80-05-7	Jungiama medžiaga	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Fenolis	Tarpinis cheminis produktas
10	Zearalononas	17924-92-4	Jungiama medžiaga	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-3}$	Heterociklinis junginys, laktonas	Gamtinis produktas

11	Butilparabenas	94-26-8	Jungiama medžiaga	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-3}$	Karboksirūgštis, fenolis	Konservantas
12	Atrazinas	1912-24-9	Nejungiama medžiaga	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Heterociklinis junginys	Herbicidas
13	Di- <i>n</i> -butilftalatas (DBP) ⁷	84-74-2	Nejungiama medžiaga ⁸	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Angliavandenilis (ciklinis), esteris	Plastifikatorius, tarpinis cheminis produktas
14	Kortikosteronas	50-22-6	Nejungiama medžiaga	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-4}$	Steroidas	Gamtinis produktas

¹Jei kvalifikacijai įrodyti skirtų medžiagų nebėra prekyboje, gali būti naudojama tos pačios prijungimo prie ER klasės, palyginamo veiksmingumo ir tos pačios cheminių medžiagų klasės medžiaga.

² Santrumpos: CASRN – Cheminių medžiagų santrumpų tarnybos registro numeris.

³ Klasifikavimas kaip prie ER α jungiamos medžiagos ar nejungiamos medžiagos atliekant CERI ir FW prijungimo prie hrER bandymų patvirtinimo tyrimą (2).

⁴Prijungimo prie ER aktyvumas buvo pagrįstas prijungimo prie ER ir TA bandymų ICCVAM bendraisiais apžvalginiais dokumentais (BRD) (9), taip pat empiriniais duomenimis ir kita informacija, gauta iš paskelbtų ir peržiūrėtų nuorodose pateiktų bandymų (10) (11) (12) (13) (14) (15).

⁵ Cheminė klasė buvo priskirta medžiagoms, naudojant JAV Nacionalinės medicinos bibliotekos Vaistų medicininių dalykines antraštes (MeSH), tarptautiniu mastu pripažintą standartizuotą klasifikavimo schemą (adresu: <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁶ Medžiagos buvo priskirtos vienai ar daugiau produktų klasių, naudojant JAV nacionalinės medicinos bibliotekos pavojingųjų medžiagų duomenų bazę (adresu: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>)

⁷ DPB gali būti naudojamas kaip alternatyvi kontrolinė nejungiamo medžiaga, kai jos didžiausia koncentracija yra 10^{-4} mol/l.

⁸ Šios medžiagos tirpumo riba yra 10^{-4} mol/l. Di-*n*-butilftalato (DBP) naudojimas ir klasifikavimas kaip nejungiamos medžiagos yra pagrįstas ne didesnės 10^{-4} mol/l koncentracijos bandymais, nes atliekant parengiamojo patvirtinimo tyrimus kai kurios laboratorijos pastebėjo, kad medžiaga netirpsta esant 10^{-3} mol/l (pvz., drumstumas).

Bandomųjų cheminių medžiagų tirpumo bandymas ir koncentracijos intervalo nustatymas

19. Reikėtų atlikti parengiamąjį bandymą, kad būtų galima nustatyti kiekvienos cheminės medžiagos tirpumo ribą ir identifikuoti reikiamą koncentracijos intervalą, kuris būtų naudojamas bandymui atlikti. Iš pradžių turi būti nustatyta kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos tirpumo tirpiklyje riba ir vėliau patvirtinama bandymo sąlygomis. Didžiausia bandoma koncentracija neturėtų būti didesnė kaip 1 mmol/l. Intervalo nustatymo bandymą sudaro tirpiklio kontrolinio ėminio ir aštuonių pagal logaritminę eilutę atskiestų tirpalų bandymas, pradedant didžiausiąja leidžiama koncentracija (pvz., 1 mmol/l ar mažesne, atsižvelgiant į tirpumo ribą) ir esant drumstumui ar nuosėdoms. Antrojo ir trečiojo bandymo koncentracijos turėtų būti atitinkamai koreguojamos, kad būtų galima geriau apibūdinti atsako priklausomybės nuo koncentracijos kreivę.

Atskiro bandymo priimtino kriterijai

20. Atskiro bandymo priėmimas arba atmetimas grindžiamas kiekvieno bandymo etaloninio estrogeno ir kontrolinių ėminių rezultatų įvertinimu. Visų pirma, kiekvieno bandymo 1 plokštelės etaloninių kontrolinių ėminių visų koncentracijos verčių kreivės turėtų atitikti kreivės priderinimo parametrus (pvz., IC_{50} ir Hillo krypties koeficientui) taikomus veiksmingumo matavimams, pagrįstus paskelbtais atitinkamų CERi ir FW bandymų protokolų rezultatais (2 ir 3 priedėliai) ir bandymą atliekančios laboratorijos istoriniais kontrolinių ėminių duomenimis. Visos kontrolinės medžiagos (etaloninis estrogenas, silpnai jungiama medžiaga ir nejungiama medžiaga) turėtų būti tinkamai klasifikuojamos atliekant kiekvieną bandymą. Antra, visų kitų plokštelių kontroliniai ėminiai turi būti vertinami dėl suderinamumo su 1 plokšte. Bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos verčių intervalas turėtų būti pakankamai platus, kad būtų galima aiškiai nustatyti konkurencinio prijungimo kreivės viršutinę dalį. Kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos kartotinių ėminių, taip pat trijų nepriklausomų atskirų bandymų rezultatų kintamumas turėtų būti priimtinas ir mokslškai pagrįstas. Gebėjimas nuosekliai atlikti bandymą turėtų būti įrodytas sukuriant ir tvarkant etaloninio estrogeno ir kontrolinių medžiagų istorinių duomenų bazę. Kaip laboratorijos atkuriamumo matą galima naudoti kartotinių bandymų skaičiui gautų etaloninių estrogeno ir kontrolinės silpnai jungiamos medžiagos kreivių priderinimo parametrų vidurkių standartinius nuokrypius (SN) arba variacijos koeficientus (VK). Atliekant kiekvieno atskiro bandymo, taip pat kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos plokštelių kontrolinių ėminių rezultatų analizę reikėtų, kad juos įvertintų specialistai.

Be to, reikėtų atitikti šiuos priimtino kriterijams taikomus principus:

- duomenų turėtų pakakti prijungimo prie ER kiekybiniam vertinimui;
- bandymo koncentracijos turėtų atitikti bandomosios cheminės medžiagos tirpumo intervalą.

Duomenų analizė

21. Taikant nustatytą sotinamojo ir konkurencinio prijungimo duomenų analizės procedūrą, būtina laikytis pagrindinių receptoriaus ir ligandų sąveikų apibūdinimo principų. Paprastai sotinamojo prijungimo duomenys analizuojami naudojant netiesinės regresijos modelį, kuris atsižvelgia į bendrąjį ir nespecifinį prijungimą. Gali prireikti koregavimo dėl ligando kiekio sumažėjimo (pvz., Swillens, 1995 m. (19)), kai nustatoma $B_{\max}$ ir K_d . Konkurencinio prijungimo bandymų duomenys paprastai transformuojami (pvz., specifinio prijungimo procentinė dalis ir bandomosios cheminės medžiagos koncentracija ($\log$ (mol/l))). Kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos $\log$ (IC_{50}) įverčiai turėtų būti nustatyti naudojant tinkamą netiesinio kreivių priderinimo programą keturių parametrų Hill'o lygčiai priderinti. Baigus pradinę analizę, reikėtų atlikti kreivės priderinimo parametrų analizę, taip pat vizualią duomenų atitikties sukurta konkurencinio prijungimo kreivei analizę. Kartais gali tekti atlikti papildomą analizę geriausiam kreivės priderinimui gauti (pvz., riboti kreivės viršų ir (arba) apačią, taikyti 10 % taisyklę, žr. 4 priedėlį ir 2 nuorodą (III.A.2 skirsnį).
22. Atitiktis priimtino kriterijams (20 pastraipa) rodo tinkamą bandymo sistemos veikimą, bet tai neužtikrina, kad atliekant konkretų bandymą bus gauti tikslūs duomenys. Pirmojo bandymo tikslų rezultatų pakartojimas yra geriausias tikslų duomenų gavimo rodiklis.

Bendrieji duomenų aiškinimo kriterijai

23. Šiuo metu nėra visuotinai sutarto prijungimo prie ER duomenų aiškinimo metodo. Tačiau hrER tarpininkaujamo aktyvumo kokybinius (pvz., jungiama ar nejudinama medžiaga) ir (arba) kiekybinius (pvz., IC_{50} , santykinis prijungimo giminingumas (RBA) ir kt.) vertinimo rezultatus reikėtų pagrįsti empiriniais duomenimis ir svariais moksliniais įrodymais.

Bandymo ataskaita

24. Į bandymo ataskaitą turėtų būti įtraukta ši informacija:

Bandymas:

- naudotas bandymas;

Kontrolinė medžiaga, pamatinis etalonas, bandomoji cheminė medžiaga:

- šaltinis, partijos numeris, naudojimo pabaigos data, jei yra;
- pačios bandomosios cheminės medžiagos stabilumas, jei žinomas;
- bandomosios cheminės medžiagos tirpumas tirpiklyje ir stabilumas, jei yra žinomas;
- pH, osmolialumo ir nuosėdų matavimas kultūros terpėje, į kurią bandomoji cheminė medžiaga buvo pridėta, jei reikia.

Vienkomponentė medžiaga:

- fizinė išvaizda, tirpumas vandenyje ir papildomos būdingos fizikinės ir cheminės savybės;

- cheminio identifikavimo duomenys, pvz., IUPAC ar CAS pavadinimas, CAS numeris, SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė, grynumas, cheminis priemaišų pavadinimas, jei tinka bei praktiškai įmanoma ir kt.;

Daugiakomponentė medžiaga, UVCB ir mišiniai:

- kuo išsamesnis sudedamųjų dalių apibūdinimas, nurodant cheminį pavadinimą (žr. pirmiau), kiekybinį paplitimą ir būdingas fizikines ir chemines savybes.

Tirpiklis ir (arba) nešiklis

- apibūdinimas (tipas, tiekėjas ir partija);
- tirpiklio ir (arba) nešiklio pasirinkimo pagrindimas;
- bandomosios cheminės medžiagos tirpumas ir stabilumas tirpiklyje ar nešiklyje, jei yra žinomas;

Receptoriai:

- receptorių šaltinis (tiekėjas, katalogo Nr., partija, receptoriaus rūšis, tiekėjo nurodyta aktyvioji receptoriaus koncentracija, tiekėjo sertifikatas);
- receptorių apibūdinimas (įskaitant sotinamojo prijungimo rezultatus): K^d , B_{max} ,
- receptorių laikymo sąlygos;
- radioaktyviuoju izotopu žymėtas ligandas:
- tiekėjas, katalogo Nr., partija, savitasis aktyvumas;

Bandymo sąlygos:

- tirpumo apribojimai bandymo sąlygomis;
- prijungimo buferinio tirpalo sudėtis;
- receptoriaus koncentracija;
- izotopinio žymeklio (t. y. radioaktyviuoju izotopu žymėto ligando) koncentracija;
- bandomosios cheminės medžiagos koncentracija;
- nešiklio procentinė dalis atliekant galutinį bandymą;
- inkubavimo temperatūra ir trukmė,
- prijungto ir laisvojo kiekio atskyrimo metodas;
- teigiamos ir neigiamos kontrolinės ir (arba) etaloninės medžiagos;
- bandymų vertinimo kaip teigiamų, neigiamų ar abejotinių kriterijai;

Priimtinojo tikrinimas:

- vienašiu laikų teigiamų ir neigiamų kontrolinių ėminių ir (arba) etaloninių medžiagų faktinės IC_{50} ir Hillo krypties koeficiento vertės;

Rezultatai:

- neapdoroti ir prijungto bei laisvojo kiekio duomenys;
- denatūravimo patvirtinamasis tikrinimas, jei tinka;
- mažiausioji efektyvioji koncentracija (LEC), jei yra;
- RBA ir (arba) IC_{50} vertės, jei tinka;
- koncentracijos ir atsako priklausomybė, jei įmanoma,
- statistinės analizės duomenys, jei yra, kartu su paklaidų ir pasiklivimo matu (pvz., vidurkio standartinė paklaida, SN, VK arba 95 % pasiklivimo intervalas) ir šių verčių gavimo būdo aprašymas;

Rezultatų aptarimas

- 10 % taisyklės taikymas.

Išvada

LITERATŪRA

- (1) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (2) OECD (2015). Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrER α), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (3) OECD (2015). Performance Standards for Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrER α), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 222), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (4) OECD (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (5) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept, Climacteric, 5 Suppl 2: 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), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (14) Takeyoshi, M. (2006). Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line, Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI): Japan. 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; Zrally, Z; Neca, J; Simeckova, P; Vondracek, J; Machala, M. (2008). Estrogenic Activity of Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Uterus of Immature Wistar Rats. *Toxicol. Letters*, 180: 213-221.
- (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 priedėlis

APIBRĖŽTYS IR SANTRUMPOS

10 % taisyklė – galimybė pašalinti iš analizės duomenų taškus, kurių kartotinių ėminių [^3H]17 β -estradiolio specifinio prijungimo vidurkio procentinė dalis yra 10 % arba daugiau didesnė nei esant mažesnei koncentracijai stebima vidutinė vertė (žr. 4 priedėlį).

Priimtino kriterijai – minimalūs reikalavimai, keliami bandymo kontrolinių ėminių ir pamatinių etalonų bandymo rezultatams. Būtina atitikti visus priimtino kriterijus, kad bandymą būtų galima laikyti tinkamu.

Tikslumas (sutapimas) – bandymo rezultatų ir patvirtintų pamatinių verčių sutapimo artumas. Tikslumas yra bandymo naudojimo charakteristikų matas ir vienas iš „tinkamumo“ aspektų. Terminas dažnai vartojamas kaip lygiavertis terminui „sutapimas“ ir reiškia tinkamų bandymo rezultatų dalį (1).

CF – endokrininę sistemą ardančių cheminių medžiagų bandymo ir vertinimo EBPO konceptuali sistema (angl. *Conceptual Framework*).

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

VK – variacijos koeficientas.

E2 – 17 β -estradiolis

ED – endokrininės sistemos ardymas

hER α – žmogaus estrogenų receptoriaus alfa.

ER – estrogenų receptorius.

Estrogeninis aktyvumas – cheminės medžiagos gebėjimas rodyti panašias į 17 β -estradiolio savybes jungtis prie estrogenų receptorių. Prisijungimas prie hER α gali būti aptiktas šiuo bandymo metodu.

IC₅₀ – pusė didžiausiosios efektyviosios slopinančios bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos.

ICCVAM – alternatyvių metodų patvirtinimo tarpžinybinis koordinavimo komitetas.

Atkuriamumas tarp laboratorijų – laipsnio, kuriuo skirtingos kvalifikuotos laboratorijos, naudodamos tą patį protokolą ir bandančios tas pačias medžiagas, gali gauti kokybiškai ir kiekybiškai panašius rezultatus, matas. Atkuriamumas tarp laboratorijų nustatomas, atliekant parengiamąjį patvirtinimą ir tinkamumo patvirtinimą, ir rodo laipsnį, kuriuo bandymas gali būti sėkmingai perkeltas tarp laboratorijų; taip pat vadinamas tarplaboratoriniu atkuriamumu (1).

Atkuriamumas laboratorijoje – laipsnio, kuriuo kvalifikuoti darbuotojai toje pačioje laboratorijoje gali sėkmingai atkartoti rezultatus, skirtingu metu naudodami tam tikrą protokolą, matas. Dar vadinamas *laboratoriniu atkuriamumu* (1).

LEC – mažiausioji efektyvioji koncentracija (angl. *lowest effective concentration*) yra mažiausia bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant gaunamas atsakas (t. y. mažiausia bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant indukcijos pokytis kartais statistiškai skiriasi nuo vienalaikio nešiklio kontrolinio ėminio).

„Aš irgi“ (angl. *me-too*) bandymas – šnekamosios kalbos pasakymas, kuriuo vadinamas bandymo metodas, struktūriniu ir funkciniu požiūriu panašus į patvirtinto tinkamumo ir pripažintą pamatinį bandymo metodą. Taikomas kaip lygiavertis terminui „panašus bandymo metodas“.

PBTG – į rezultatus orientuotos bandymo gairės.

Naudojimo charakteristikų standartai – patvirtintu bandymo metodu pagrįsti standartai, kurie yra pagrindas įvertinti mechanizmo ir funkciniu požiūriu panašaus siūlomo bandymo metodo palyginamumą. Įtraukti: 1) esminiai bandymo metodo komponentai; 2) etaloninių cheminių medžiagų, parinktų iš cheminių medžiagų, naudojamų patvirtinto bandymo metodo priimtinoms naudojimo charakteristikoms įrodyti, būtinasis sąrašas; ir 3) palyginamieji tikslumo bei patikimumo lygiai, pagrįsti gautais patvirtintam bandymo metodui, kuriuos siūlomas bandymo metodas turėtų rodyti, kai yra įvertinamas naudojant būtinąjį etaloninių cheminių medžiagų sąrašą (1).

Kvalifikacijai įrodyti skirtos medžiagos – į naudojimo charakteristikų standartus įtrauktų etaloninių medžiagų, kurias laboratorijos gali naudoti, norėdamos įrodyti standartizuoto bandymo metodo taikymo techninę kompetenciją, rinkinio dalis. Šių medžiagų atrankos kriterijus paprastai sudaro jų atitiktis atsakų intervalui, galimybė jų nusipirkti ir aukštos kokybės etaloninių duomenų buvimas.

Kvalifikacija – įrodytas gebėjimas tinkamai atlikti bandymą prieš bandant nežinomas medžiagas.

Etaloninis estrogenas – 17β -estradiolis (E2, CAS 50-28-2).

Pamatiniai bandymo metodai – bandymai, kuriais pagrįstos PBTG 493.

RBA – santykinis prijungimo giminingumas (angl. *Relative Binding Affinity*). Medžiagos RBA skaičiuojamas kaip procentais išreikštas medžiagos $\log(IC_{50})$ ir 17β -estradiolio $\log(IC_{50})$ santykis.

Tinkamumas – santykio tarp bandymo ir tiriamo poveikio apibūdinimas bei bandymo reikšmingumo ir naudingumo siekiant tam tikro tikslo nustatymas. Tai yra atliekant bandymą tiriamo biologinio poveikio matavimo ar prognozavimo tikslumo laipsnis. Tinkamumas aprėpia bandymo metodo tikslumo (atitikties) aspektą (1).

Patikimumas – pagal tą patį protokolą atliekamo bandymo, ilgą laiką taikomo laboratorijose ir tarp laboratorijų, atkuriamumo laipsnio matas. Patikimumas įvertinamas apskaičiuojant atkuriamumą laboratorijoje ir tarp laboratorijų.

SN – standartinis nuokrypis

Bandomoji cheminė medžiaga – taikant šį metodą bandoma medžiaga arba mišinys.

Patvirtinto tinkamumo bandymo metodas – bandymo metodas, kurio tinkamumo tam tikram tikslui pasiekti patvirtinimo tyrimai buvo atlikti, nustatant tinkamumą (įskaitant tikslumą) ir

patikimumą. Svarbu pažymėti, kad patvirtinto tinkamumo bandymo metodo tikslumo ir patikimumo charakteristikos gali būti nepakankamos, kad jį būtų galima laikyti priimtinu siūlomam tikslui pasiekti (1).

Tinkamumo patvirtinimas – tam tikro būdo, metodo, bandymo, proceso ar vertinimo patikimumo ir tinkamumo nurodytam tikslui nustatymo procesas (1).

2 priedėlis

FREYBERGER-WILSON *IN VITRO* ESTROGENŲ RECEPTORIAUS (ER α) SOTINAMOJO IR KONKURENCINIO PRIJUNGIMO BANDYMAI, NAUDOJANT VISO ILGIO REKOMBINANTINĮ ESTROGENŲ RECEPTORIŲ ER α

PRADINIAI ASPEKTAI IR APRIBOJIMAI (TAIP PAT ŽR. *BENDRASIS ĮVADAS*)

1. Atliekant šį *in vitro* sotinamojo ir konkurencinio prijungimo prie estrogenų receptoriaus (ER α) bandymą naudojamas viso ilgio žmogaus estrogenų receptoriaus ER α (hrER α), kuris gaunamas ir išskiriamas iš bakulovirusu infekuotų vabzdžių ląstelių. Buvo atliktas Freyberger ir Wilson sukurto protokolo tarplaboratorinis patvirtinimo tyrimas (2), kuris įrodė protokolo tinkamumą ir patikimumą atsižvelgiant į numatytą bandymo tikslą.
2. Šis bandymas yra atrankos procedūra, skirta identifikuoti medžiagas, kurios gali prisijungti prie viso ilgio hrER α . Jis naudojamas nustatant bandomosios cheminės medžiagos gebėjimą konkuruoti su 17 β -estradioliu dėl prisijungimo prie hrER α . Kiekybinius bandymo duomenis gali sudaryti IC₅₀ (bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos, kuriai esant pavaiduojama pusė prie hrER α prijungto [³H]-17 β -estradiolio, matas) ir bandomųjų cheminių medžiagų santykinis prijungimo prie hrER α giminingumas palyginti su 17 β -estradioliu. Cheminių medžiagų atrankos tikslais priimtinus kokybinius bandymo rezultatus gali sudaryti bandomųjų cheminių medžiagų klasifikavimas kaip prie hrER α jungiamų, nejungiamų arba abejotinių medžiagų pagal prijungimo kreivėms aprašytus kriterijus.
3. Atliekant bandymą naudojamas radioaktyvusis ligandas, todėl laboratorijai reikia gauti darbo su radioaktyviosiomis medžiagomis licenciją. Visos procedūros su radioaktyviaisiais izotopais ir pavojingosiomis cheminėmis medžiagomis turėtų atitikti reglamentus ir procedūras, aprašytas nacionaliniuose teisės aktuose.
4. Prieš naudojant šį bandymą reglamentavimo tikslais, reikėtų perskaityti ***BENDRASIS ĮVADAS*** IR ***PRIJUNGIMO PRIE hrER BANDYMO KOMPONENTAI***. Šiose bandymo gairėse vartojamos apibrėžtys ir santrumpos pateiktos 1 priedėlyje.

BANDYMO PRINCIPAI (TAIP PAT ŽR. *BENDRASIS ĮVADAS*)

5. Atliekant prijungimo prie hrER α bandymą, matuojama radioaktyviuoju izotopu žymėto ligando ([³H]17 β -estradiolio) gebėjimas prisijungti prie ER, didėjant bandomosios cheminės medžiagos (t. y. konkurento) koncentracijai. Didelį giminingumą ER turinčios bandomosios cheminės medžiagos konkuruoja su radioaktyviuoju izotopu žymėtu ligandu esant mažesnei koncentracijai palyginti su tomis cheminėmis medžiagomis, kurių giminingumas receptoriui yra mažesnis.

6. Šį bandymą sudaro du pagrindiniai komponentai: sotinamojo prijungimo bandymo, skirto apibūdinti receptoriaus ir ligando sąveikos parametrus, ir konkurencinio prijungimo bandymo, kuris apibūdina bandomosios cheminės medžiagos ir radioaktyviuoju izotopu žymėto ligando konkurencija dėl prijungimo prie ER.
7. Sotinamojo prijungimo bandymo tikslas – apibūdinti prijungimo prie tam tikros receptorių grupės giminingumą ir jų skaičių, ruošiant konkurencinio prijungimo bandymą. Atliekant sotinamojo prijungimo bandymą pusiausvyros sąlygomis, nustatomas pastovios koncentracijos estrogeno receptoriaus giminingumas jo natūraliam ligandui (rodo disociacijos konstanta, K_d) ir aktyviųjų receptorių vietų koncentracija (B_{max}).
8. Atliekant konkurencinio prijungimo bandymą matuojamas medžiagos giminingumas konkuruoti su [^3H]17 β -estradioliu dėl prijungimo prie ER. Giminingumas kiekybiškai įvertinamas kaip bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuri esant pusiausvyrai slopina 50 % [^3H]17 β -estradiolio specifinio prijungimo (vadinama „50 % slopinamąja koncentracija“ arba IC_{50}). Jį taip pat galima įvertinti naudojant santykinį prijungimo giminingumą (RBA, atžvilgiu estradiolio IC_{50} , išmatuotos atskirai atliekant tą patį atskirą bandymą). Atliekant konkurencinio prijungimo bandymą matuojamas pastovios koncentracijos [^3H]17 β -estradiolio prijungimas, esant dideliame bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos intervalui (aštuonios dydžio eilės). Tada duomenys priderinami, jei įmanoma, Hillo lygčiai gauti (Hill, 1910 m.), kuri aprašo žymėtojo ligando pavadavimą konkurencine vietoje jungiama medžiaga. Radioaktyviuoju izotopu žymėto estradiolio pavadavimo esant pusiausvyrai laipsnis naudojamas bandomajai cheminei medžiagai apibūdinti kaip jungiamai, nejungiamai arba duodančiai abejotiną atsaką.

PROCEDŪRA

Priimtinių hrER α baltymo veikimo charakteristikų įrodymas

9. Prieš pradedant atlikti įprastinius sotinamojo ir konkurencinio prijungimo bandymus, reikėtų įrodyti, kad kiekvienos naujai gautos hrER α partijos savybės atitinka laboratorijos, kurioje ji bus naudojama, reikalavimus. Turėtų būti atliekamas dviejų veiksmų procesas tinkamumo charakteristikoms įrodyti. Tai būtų tokie veiksmai:
 - Atliekamas [^3H]-17 β -estradiolio sotinamojo prijungimo bandymas, kad būtų įrodytas hrER α specifiškumas ir prisotinimas. Šių duomenų netiesinės regresijos analizė (pvz., BioSoft; McPherson, 1985 m.; Motulsky, 1995 m.) ir vėliau gautas Scatchardo grafikas turėtų dokumentais patvirtinti kiekvienos hrER α partijos [^3H]-17 β -estradiolio prijungimo prie hrER α giminingumą (K_d) ir receptorių skaičių (B_{max}).
 - Atliekamas konkurencinio prijungimo bandymas, naudojant kontrolines medžiagas (etaloninį estrogeną (17 β -estradiolį), silpnai jungiamą medžiagą (pvz., noretinodrelį arba noretindroną) ir nejungiamą medžiagą (oktiltrietoksisilaną, OTES). Kiekviena laboratorija turėtų sukurti istorinių duomenų bazę, kad būtų galima dokumentuoti etaloninio estrogeno

ir silpnai jungiamos medžiagos IC_{50} ir kitų reikiamų verčių pastovumą tarp bandymų ir naudojant skirtingas hrER α partijas. Kontrolinių medžiagų konkurencinio prijungimo kreivių parametrai turėtų atitikti 95 % pasiklovimo intervalo ribas (žr. 1 lentelę), kurios buvo gautos naudojant šio bandymo patvirtinimo tyrime dalyvavusių laboratorijų duomenis (2).

1 lentelė. Etaloniniam estrogenui ir silpnai jungiamai medžiagai sukurti veiksmingumo kriterijai, atliekant FW prijungimo prie hrER bandymą

Medžiaga	Parametras	Vidurkis ^a	Standartinis nuokrypis (n)	95 % pasiklovimo intervalai ^b	
				Apatinė riba	Viršutinė riba
17β-estradiolis	Viršus (%)	100,44	10,84 (67)	97,8	103,1
	Apačia (%)	0,29	1,25 (67)	–0,01	0,60
	Hillo krypties koeficientas	–1,06	0,20 (67)	–1,11	–1,02
	Log IC ₅₀ (mol/l)	–8,92 ^c	0,18 (67)	–8,97	–8,88
Noretinodrelis	Viršus (%)	99,42	8,90 (68)	97,27	101,60
	Apačia (%)	2,02	3,42 (68)	1,19	2,84
	Hillo krypties koeficientas	–1,01	0,38 (68)	–1,10	–0,92
	Log IC ₅₀ (mol/l)	–6,39	0,27 (68)	–6,46	–6,33
Noretindronas^c	Viršus (%)	96,14	8,44 (27)	92,80	99,48
	Apačia (%)	2,38	5,02 (27)	0,40	4,37
	Hillo krypties koeficientas	–1,41	0,32 (27)	–1,53	–1,28
	Log IC ₅₀ (mol/l)	–5,73	0,27 (27)	–5,84	–5,62

^aVidurkis (n) ± standartinis nuokrypis (SN) buvo apskaičiuoti naudojant kreivės priderinimo parametrų įverčius (4 parametrų Hillo lygties), patvirtinimo tyrimo metu gautus keturiose laboratorijose atliekant kontrolinių ėminių atskirus bandymus (žr. 2 nuorodos N priedą).

^b 95 % pasiklovimo intervalai yra pateikti kaip priimtumo kriterijų rodiklis.

^c Noretindrono bandymas buvo neprivalomas kaip 4 papildomos užduoties bandymas atliekant patvirtinimo tyrimą (žr. 2 nuorodą, žr. 4 papildomą užduotį). Taigi, vidurkis ± SN (n) buvo apskaičiuojami naudojant kreivės priderinimo įverčius (4 parametrų Hillo lygties), dviejose laboratorijose atliekant kontrolinių ėminių atskirus bandymus.

IC₅₀ intervalas priklausys nuo receptoriaus kompozicijos K_d ir nuo kiekvienoje laboratorijoje naudojamo radioaktyviojo izotopo žymėto ligando koncentracijos. Būtų priimtinas atitinkamas IC₅₀ intervalo koregavimas, atsižvelgiant į bandymui atlikti naudojamas sąlygas.

Laboratorijos kvalifikacijos įrodymas

10. Žr. šio bandymo metodo **PRIJUNGIMO PRIE hrER BANDYMO KOMPONENTAI** 17 ir 18 pastraipas bei 2 lentelę. Kiekvieną bandymą (sotinamojo ir konkurencinio prijungimo) turėtų sudaryti trys skirtingomis dienomis atliekami atskiri bandymai (t. y. su iš naujo atskiestais receptoriaus, cheminių medžiagų ir reagentų tirpalais), ir kiekvienas atskiras bandymas būtų trijų kartotinių ėminių bandymas.

Receptoriaus (hrERα) koncentracijos nustatymas

11. Aktyviojo receptoriaus koncentracija kažkiek skiriasi priklausomai nuo partijos ir laikymo sąlygų. Dėl šios priežasties reikėtų nustatyti iš tiekėjo gauto aktyviojo receptoriaus koncentraciją. Taip būtų gauta atitinkama aktyviojo receptoriaus koncentracija atskiro bandymo atlikimo metu.

12. Nominaliosios 0,25, 0,5, 0,75 ir 1 nmol/l koncentracijos receptoriaus turėtų būti inkubuojamas konkurencinio prijungimo sąlygomis (t. y. 1 nmol/l [^3H]-estradiolio), nesant 1 $\mu\text{mol/l}$ nežymėtojo estradiolio (bendrasis prijungimas) ir jam esant (nespecifinis prijungimas). Braižoma specifinio prijungimo, apskaičiuojamo kaip bendrojo ir nespecifinio prijungimo skirtumas, priklausomybės nuo nominaliosios receptoriaus koncentracijos kreivė. Receptoriaus koncentracija, kuriai gaunamos specifinio prijungimo vertės, atitinkančios 20 % pridėto radioaktyviojo žymeklio, susiejama su atitinkama nominaliąja receptoriaus koncentracija, ir ši receptoriaus koncentracija turėtų būti naudojama atliekant sotinamojo ir konkurencinio prijungimo bandymus. Galutinė 0,5 nmol/l hrER koncentracija dažnai atitiktų šią sąlygą.
13. Jei 20 % kriterijų negalima įvykdyti kelis kartus, reikėtų patikrinti bandymo schemą dėl galimų klaidų. Negebėjimas atitikti 20 % kriterijų gali rodyti, kad rekombinanto partijoje yra labai mažai aktyviojo receptoriaus, reikėtų spręsti klausimą dėl kitos receptoriaus partijos naudojimo.

Sotinamojo prijungimo bandymas

14. Reikėtų įvertinti tris kartotinius aštuonių didėjančių [^3H]-17 β -estradiolio koncentracijos verčių ėminių esant tokioms trimis sąlygoms (žr. 2 lentelę):
- Nesant nežymėtojo 17 β -estradiolio ir nesant ER. Taip nustatomas bendrasis prijungimas, matuojant radioaktyvumą šulinėliuose, kuriuose yra tik [^3H]-17 β -estradiolis.
 - Esant 1000 kartų didesnei nežymėtojo 17 β -estradiolio koncentracijai palyginti su žymėtojo 17 β -estradiolio koncentracija ir esant ER. Šios sąlygos tikslas – prisotinti aktyviasias prijungimo vietas nežymėtojo 17 β -estradioliu ir matuojant radioaktyvumą šulinėliuose nustatyti nespecifinį prijungimą. Laikoma, kad visas likęs žymėtasis estradiolis, kuris galėtų jungtis prie receptoriaus, jungiasi prie nespecifinės vietos, nes nežymėtojo estradiolio koncentracija turėtų būti tokia didelė, kad jis prisijungtų prie visų esamų specifinių receptoriaus vietų.
 - Nesant nežymėtojo 17 β -estradiolio ir nesant ER (bendrojo radioaktyvumo nustatymas).

[^3H]-17 β -estradiolio ir nežymėtojo 17 β -estradiolio tirpalų ruošimas

15. Atskiesti [^3H]-17 β -estradiolio tirpalai turėtų būti ruošiami įpilant bandymo buferinio tirpalo į 12 nmol/l [^3H]-17 β -estradiolio pradinį tirpalą, kad gautos pradinės koncentracijos būtų nuo 0,12 nmol/l iki 12 nmol/l. Įpilant 40 μl šių tirpalų į atitinkamus 96 šulinėlių mikrotitravimo plokštelės bandymo šulinėlius (galutinio 160 μl tūrio), gaunamos galutinės bandymo koncentracijos nuo 0,03 nmol/l iki 3,0 nmol/l. Bandymo buferio, [^3H]-17 β -estradiolio pradinio tirpalo ir atskiestų tirpalų ruošimas bei koncentracijos nustatymas yra nuodugniai aprašytas FW protokole (2).
16. Etanolinio 17 β -estradiolio atskiesti tirpalai turėtų būti ruošiami įpilant bandymo buferinio tirpalo, kad būtų gauti aštuoni didėjančios pradinės koncentracijos nuo 0,06 $\mu\text{mol/l}$ iki

6 $\mu\text{mol/l}$ tirpalai. Įpilant 80 μl šių tirpalų į atitinkamus 96 šulinėlių mikrotitravimo plokštelės bandymo šulinėlius (galutinio 160 μl tūrio), gaunamos galutinės bandymo koncentracijos nuo 0,03 $\mu\text{mol/l}$ iki 3,0 $\mu\text{mol/l}$. Galutinė nežymėtojo 17 β -estradiolio koncentracija atskiruose nespecifinio prijungimo bandymo šulinėliuose turėtų būti 1000 kartų didesnė nei žymėtojo [^3H]-17 β -estradiolio koncentracija. Nežymėtojo 17 β -estradiolio atskiestų tirpalų ruošimas nuodugnai aprašytas FW protokole (2).

17. Reikėtų naudoti tokią nominaliąją receptoriaus koncentraciją, kuriai gaunamas $20 \pm 5\%$ specifinis prijungimas (žr. 12–13 pastraipas). hrER α tirpalą reikėtų ruošti prieš pat naudojimą.

18. 96 šulinėlių mikrotitravimo plokštelės ruošiamos kaip parodyta 2 lentelėje, imant 3 kartotinius kiekvienos koncentracijos ėminius. [^3H]-17 β -estradiolio, nežymėtojo 17 β -estradiolio, buferinio tirpalo ir receptoriaus koncentracijos ir tūrio priskyrimo plokštelėje pavyzdys pateiktas 2.2 priedėlyje.

2 lentelė. Sotinamojo prijungimo bandymo mikrotitravimo plokštelės schema

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nmol/l [³ H] E ₂ + ER			0,06 nmol/l [³ H] E ₂ + ER			0,08 nmol/l [³ H] E ₂ + ER			0,10 nmol/l [³ H] E ₂ + ER			Bendrasis prijungimas (tirpiklis)
B	0,30 nmol/l [³ H] E ₂ + ER			0,60 nmol/l [³ H] E ₂ + ER			1,0 nmol/l [³ H] E ₂ + ER			3,0 nmol/l [³ H] E ₂ + ER			
C													
D	0,03 nmol/l [³ H] E ₂ + ER + 0,03 μmol/l E ₂			0,06 nmol/l [³ H] E ₂ + ER + 0,06 μmol/l E ₂			0,08 nmol/l [³ H] E ₂ + ER + 0,08 μmol/l E ₂			0,10 nmol/l [³ H] E ₂ + ER + 0,10 μmol/l E ₂			Nespecificinis prijungimas
E	0,30 nmol/l [³ H] E ₂ + ER + 0,30 μmol/l E ₂			0,60 nmol/l [³ H] E ₂ + ER + 0,60 μmol/l E ₂			1,0 nmol/l [³ H] E ₂ + ER			3,0 nmol/l [³ H] E ₂ + ER +			
F													
G													
H													

[^3H] E $_2$ – [^3H]-17 β -estradiolis.

ER – estrogenų receptorius.

E $_2$ – nežymėtasis 17 β -estradiolis

19. Bandymo mikrotitravimo plokštelės turėtų būti inkubuojamos nuo 2 $^{\circ}\text{C}$ iki 8 $^{\circ}\text{C}$ temperatūroje nuo 16 iki 20 h ir inkubavimo laikotarpiui dedamos ant sukamosios purtyklės.

Prie hrER α prijungto [^3H]-17 β -estradiolio matavimas

20. Prie hrER α prijungtą [^3H]-17 β -estradiolį reikėtų atskirti nuo laisvojo [^3H]-17 β -estradiolio, į kiekvieną šulinėlį įpilant 80 μl šaltos DCC suspensijos, 10 min purtant mikrotitravimo plokštelės ir centrifuguojant 10 min maždaug 2500 aps/min greičiu. Siekiant kiek įmanoma

sumažinti prijungto [³H]-17β-estradiolio ir hrERα disociaciją šio proceso metu, yra ypač svarbu, kad buferiniai tirpalai ir bandymo šulinėlių temperatūra būtų nuo 2 °C iki 8 °C ir kiekvienas veiksmas būtų atliekamas greitai. Būtinai reikia turėti mikrotitravimo plokštelių purtyklę, kad plokštelės būtų apdorojamos efektyviai ir greitai.

21. Tada ypač atsargiai reikėtų paimti 50 μl skysčio virš nuosėdų, kuriame yra prie hrERα prijungtas [³H]-17β-estradiolis, kad būtų išvengta šulinėlių užteršimo dėl DCC patekimo, ir pernešti į antrąją mikrotitravimo plokštelę.

22. Į kiekvieną šulinėlį (nuo A1 iki B12 ir nuo D1 iki E12) įpilama po 200 μl scintiliacijų skysčio, galinčio paversti kinetinę branduolių spinduliuotės energiją šviesos energija. G1-H12 šulinėliai (identifikuojami kaip bendrojo skilimų per minutę skaičiaus (dpm) šulinėliai) yra [³H]-17β-estradiolio vienu santykiu atskiesti tirpalai (40 μl), kuriuos reikėtų tiesiogiai įpilti į matavimo šulinėlių scintiliacijų skystį, kaip nurodyta 3 lentelėje, t. y. šiuose šulinėliuose yra tik 200 μl scintiliacijų skysčio ir atitinkamos koncentracijos [³H]-17β-estradiolio. Šie matavimai rodo, kiek dpm vienetais išreikšto [³H]-17β-estradiolio buvo įdėtą į kiekvieną bendrojo prijungimo ir nespecifinio prijungimo šulinėlių rinkinį.

3 lentelė. Sotinamojo prijungimo bandymo mikrotitravimo plokštelės schema, radioaktyvumo matavimas

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nmol/l [³ H] E ₂ + ER			0,06 nmol/l [³ H] E ₂ + ER			0,08 nmol/l [³ H] E ₂ + ER			0,10 nmol/l [³ H] E ₂ + ER			Bendrasis prijungimas (tirpiklis)
B	0,30 nmol/l [³ H] E ₂ + ER			0,60 nmol/l [³ H] E ₂ + ER			1,0 nmol/l [³ H] E ₂ + ER			3,0 nmol/l [³ H] E ₂ + ER			
C													
D	0,03 nmol/l [³ H] E ₂ + ER + 0,03 μmol/l E ₂			0,06 nmol/l [³ H] E ₂ + ER + 0,06 μmol/l E ₂			0,08 nmol/l [³ H] E ₂ + ER + 0,08 μmol/l E ₂			0,10 nmol/l [³ H] E ₂ + ER + 0,10 μmol/l E ₂			Nespecifinis prijungimas
E	0,30 nmol/l [³ H] E ₂ + ER + 0,30 μmol/l E ₂			0,60 nmol/l [³ H] E ₂ + ER + 0,60 μmol/l E ₂			1,0 nmol/l [³ H] E ₂ + ER			3,0 nmol/l [³ H] E ₂ + ER +			
F													
G	0,03 nmol/l [³ H] E ₂ (bendrasis dpm)			0,06 nmol/l [³ H] E ₂			0,08 nmol/l [³ H] E ₂			0,10 nmol/l [³ H] E ₂			Bendrasis dpm*
H	0,30 nmol/l [³ H] E ₂			0,60 nmol/l [³ H] E ₂			1,0 nmol/l [³ H] E ₂			3,0 nmol/l [³ H] E ₂			

[³H] E₂ – [³H]-17β-estradiolis.

ER – estrogenų receptorius.

E₂ – nežymėtasis 17β-estradiolis;

dpm – skilimų per minutę skaičius.

* Žymėtojo [³H]-17β-estradiolio vienu santykiu atskiesti tirpalai turėtų būti tiesiogiai įpilami į 200 μl scintiliacijų skysčio G1–H12 šulinėliuose.

23. Matavimą reikėtų pradėti praėjus mažiausiai 2 h, ir skaičiavimo trukmė turėtų būti 40 min kiekvienam šulinėliui. Reikėtų naudoti mikrotitravimo plokštelės scintiliacijų skaitiklį dpm/šulinėliui nustatyti, koreguojant dėl gesinimo. Arba, jei mikrotitravimo plokštelės scintiliacijų skaitiklio nėra, ėminius galima matuoti įprastu skaitikliu. Šiomis sąlygomis galbūt būtų galima sumažinti skaičiavimo trukmę.

Konkurencinio prijungimo bandymas

24. Atliekant konkurencinio prijungimo bandymą matuojamas vienos koncentracijos [^3H]-17 β -estradiolio prijungimas, esant vis didesnei bandomosios cheminės medžiagos koncentracijai. Atliekant atskirą bandymą, turėtų būti po tris vienalaikius vienos koncentracijos ėminius. Be to, turėtų būti atliekami trys nevienalaikiai kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos atskiri bandymai. Bandymas turėtų būti ruošiamas vienoje 96 šulinėlių mikrotitravimo plokštelėje arba jų gali būti daugiau.

Kontroliniai ėminiai

25. Atliekant bandymą, į kiekvieną jų reikėtų įtraukti vienalaikius tirpiklio ir kontrolinius ėminius (t. y. etaloninio etalono, silpnai jungiamos medžiagos ir nejungiamos medžiagos). Etaloninio estrogeno ir kontrolinių ėminių (t. y. silpnai jungiamos medžiagos ir nejungiamos medžiagos) visų koncentracijos verčių kreivės turėtų būti naudojamos vienoje plokštelėje atliekant kiekvieną atskirą bandymą. Visose kitose plokštelėse turėtų būti i) po tris didžiausios (didžiausio pavidavimo) ir vidutinės (t. y. maždaug IC_{50}) koncentracijos E2 ir silpnai jungiamos medžiagos kartotinius ėminius; ii) ne mažiau kaip po tris kartotinius tirpiklio kontrolinio ir nespecifinio prijungimo ėminius. Bandymo buferinio tirpalų, kontrolinių medžiagų, [^3H]-17 β -estradiolio, hrER α ir bandomųjų cheminių medžiagų tirpalų ruošimo procedūros aprašytos 2 nuorodoje (K priedas, žr. FW bandymo protokolą).

Tirpiklio kontrolinis ėminys:

26. Tirpiklio kontrolinis ėminys rodo, kad nėra tirpiklio sąveikos su bandymo sistema, ir taip pat matuojamas bendrasis prijungimas (TB). Tinkamiausias tirpiklis yra etanolis. Arba galima naudoti DMSO, jei didžiausios koncentracijos bandomoji cheminė medžiaga netirpsta etanolyje. Etanolio arba DMSO, jei naudojamas, koncentracija galutinio bandymo šulinėliuose yra 1,5 % ir negali viršyti 2 %.

Buferinio tirpalo kontrolinis ėminys:

27. Buferinio tirpalo kontroliniame ėminyje (BK) neturėtų būti tirpiklio ar bandomosios cheminės medžiagos, bet turėtų būti visi kiti bandymo komponentai. Buferinio tirpalo kontrolinio ėminio rezultatai lyginami su tirpiklio kontrolinio ėminio rezultatais, kad būtų galima patikrinti, ar naudojamas tirpiklis nedaro įtakos bandymo sistemai.

Stipriai jungiama medžiaga (etaloninis estrogenas)

28. 17 β -estradiolis (CAS 50-28-2) yra endogeninis ligandas, kurio prijungimo prie alfa potipio ER giminingumas yra didelis. Turėtų būti gauta kiekvieno konkurencinio prijungimo prie

hrER α bandymo standartinė kreivė, naudojant nežymėtąjį 17 β -estradiolį, kad būtų galima vertinti kintamumą, kai bandymas ilgą laiką atliekamas toje pačioje laboratorijoje. Reikėtų paruošti aštuonis nežymėtojo 17 β -estradiolio tirpalus etanolyje, kai koncentracijų bandymo šulinėliuose intervalas yra nuo 100 nmol/l iki 10 pmol/l (nuo $-7[\log(\text{mol/l})]$ iki $-11[\log(\text{mol/l})]$) ir jos skiriasi taip: $-7[\log(\text{mol/l})]$, $-8[\log(\text{mol/l})]$, $-8,5[\log(\text{mol/l})]$, $-9[\log(\text{mol/l})]$, $-9,5[\log(\text{mol/l})]$, $-10[\log(\text{mol/l})]$, $-11[\log(\text{mol/l})]$. Didžiausios koncentracijos nežymėtasis 17 β -estradiolis (1 $\mu\text{mol/l}$) taip pat naudojamas kaip nespecifinio prijungimo indikatorius. Ši koncentracija 4 lentelėje pažymėta kaip nespecifinis prijungimas (NSB), nors ji taip pat yra standartinės kreivės dalis.

Silpnai jungiama medžiaga

29. Reikėtų įtraukti silpnai jungiamą medžiagą (noretinodrelį (CAS68-23-5) arba noretindroną (CAS 68-22-4)), kad būtų įrodytas kiekvieno bandymo jautris ir kad būtų galima įvertinti kintamumą, kai bandymas atliekamas ilgą laiką. Reikėtų paruošti aštuonis silpnai jungiamos medžiagos tirpalus etanolyje, kai koncentracijų bandymo šulinėliuose intervalas yra nuo 3 nmol/l iki 30 $\mu\text{mol/l}$ (nuo $-8,5[\log(\text{mol/l})]$ iki $-4,5[\log(\text{mol/l})]$) ir jos skiriasi taip: $-4,5[\log(\text{mol/l})]$, $-5[\log(\text{mol/l})]$, $-5,5[\log(\text{mol/l})]$, $-6[\log(\text{mol/l})]$, $-6,5[\log(\text{mol/l})]$, $-7[\log(\text{mol/l})]$, $-7,5[\log(\text{mol/l})]$, $-8,5[\log(\text{mol/l})]$.

Nejungiama medžiaga

30. Kaip neigiama kontrolinė medžiaga (nejungiama medžiaga) turėtų būti naudojamas oktiltrietoksisilanas (OTES, CAS 2943-75-1). Taip užsitikrinama, kad atliekant bandymą bus nustatytos bandomosios cheminės medžiagos, kurios nesijungia prie hrER α . Reikėtų paruošti aštuonis silpnai jungiamos medžiagos tirpalus etanolyje, kai koncentracijų bandymo šulinėliuose intervalas yra nuo 0,1 nmol/l iki 1000 $\mu\text{mol/l}$ (nuo $-10[\log(\text{mol/l})]$ iki $-3[\log(\text{mol/l})]$), log prieaugiais. Di-*n*-butilftalatas (DBP) gali būti naudojamas kaip alternatyvi kontrolinė nejungiama medžiaga. Buvo įrodyta, kad jo didžiausias tirpumas yra $-4[\log(\text{mol/l})]$.

hrER α koncentracija

31. Reikėtų naudoti tokį receptoriaus kiekį, kuriam gaunamas 1 nmol/l žymėtojo ligando 20 ± 5 % specifinis prijungimas (žr. 2 priedėlio 12–13 pastraipas). hrER α tirpalą reikėtų ruošti prieš pat naudojimą.

[^3H]-17 β -estradiolis

32. [^3H]-17 β -estradiolio koncentracija bandymo šulinėliuose turėtų būti 1,0 nmol/l.

Bandomosios cheminės medžiagos

33. Iš pradžių būtina atlikti tirpumo bandymą, kad būtų nustatyta kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos tirpumo riba ir identifikuotas reikiamas koncentracijos intervalas, kuris būtų naudojamas pagal bandymo protokolą. Iš pradžių turi būti nustatyta kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos tirpumo tirpiklyje riba ir vėliau patvirtinama bandymo sąlygomis. Didžiausia bandoma koncentracija neturėtų būti didesnė kaip 1 mmol/l.

Intervalo nustatymo bandymą sudaro tirpiklio kontrolinio ėminio ir 8 pagal logaritminę eilutę atskiestų tirpalų bandymas, pradedant didžiausiąja leidžiama koncentracija (pvz., 1 mmol/l ar mažesne, atsižvelgiant į tirpumo ribą) ir esant drumstumui ar nuosėdoms (taip pat žr. 35 pastraipą). Bandomoji cheminė medžiaga turėtų būti bandoma naudojant pagal logaritminį mastelį išdėstytų 8 koncentracijos verčių kreives, kaip nurodyta prieš tai aprašytame intervalo nustatymo bandyme. Antrojo ir trečiojo bandymo koncentracijos turėtų būti atitinkamai koreguojamos, kad būtų galima geriau apibūdinti atsako priklausomybės nuo koncentracijos kreivę.

34. Atskiesti bandomosios cheminės medžiagos tirpalai turėtų būti ruošiami atitinkamame tirpiklyje (žr. 2 priedėlio 26 pastraipą). Jei didžiausios koncentracijos bandomoji cheminė medžiaga neištirpsta etanolyje ar DMSO, ir įpilant daugiau tirpiklio jo koncentracija galutinio tirpalo mėgintuvėlyje viršytų leidžiama ribą, didžiausią koncentraciją galima sumažinti iki gretimos mažesnės koncentracijos. Šiuo atveju galima įtraukti dar vieną mažiausią koncentracijos verčių serijos koncentraciją. Kitos serijos koncentracijos turėtų likti tos pačios.
35. Į bandymo šulinėlį pilami bandomosios cheminės medžiagos tirpalai turėtų būti atidžiai stebimi, nes bandomoji cheminė medžiaga gali iškristi į nuosėdas ją pilant į šulinėlį. Visų šulinėlių, kuriuose yra nuosėdų, duomenys neturėtų būti įtraukiami į kreivės priderinimą, ir reikėtų nurodyti jų pašalinimo priežastį.
36. Jei yra kitų šaltinių ankstesnė informacija apie bandomosios cheminės medžiagos $\log(\text{IC}_{50})$, galbūt tiktų atskiestų tirpalų koncentraciją išdėstyti pagal geometrinę progresiją (t. y. kas 0,5 log vieneto į abi puses nuo numanomos $\log(\text{IC}_{50})$). Galutinis rezultatas turėtų rodyti pakankamą koncentracijų aprėptį į abi puses nuo $\log(\text{IC}_{50})$, įskaitant „viršų“ ir „apačią“, kad būtų galima tinkamai apibūdinti prijungimo kreivę.

Išdėstymo bandymo plokštelėje schema

37. Žymėtųjų medžiagų mikrotitravimo plokštelės turėtų būti ruošiamos, atsižvelgiant į tai, kad inkubuojama po šešis kartotinius koduotus tirpiklio kontrolinius ėminius, didžiausios koncentracijos etaloninio estrogeno, kuris taip pat yra nespecifinio prijungimo (NSB) indikatorius, ėminius ir buferinio tirpalo kontrolinius ėminius, ir atsižvelgiant tai, kad inkubuojama po tris koduotus visų aštuonių koncentracijų nejungiamos kontrolinės medžiagos (oktikrietoksisilano) ėminius, 7 mažesnės koncentracijos etaloninio estrogeno ėminius, aštuonių koncentracijų silpnai jungiamos medžiagos ėminius ir 8 kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos ėminius (TC). Etaloninio estrogeno ir kontrolinio ėminio visų koncentracijos verčių kreivių plokštelės išdėstymo schemos pavyzdys pateiktas toliau 4 lentelėje. Naudojamos papildomos bandomųjų cheminių medžiagų plokštelės ir į jas reikėtų įtraukti plokštelės kontrolinius ėminius, (t. y. 1) po tris didžiausios (didžiausio pavadavimo) ir vidutinės (t. y. maždaug IC_{50}) koncentracijos E2 ir silpnai jungiamos medžiagos kartotinius ėminius; 2) po šešis tirpiklio kontrolinio ir nespecifinio prijungimo ėminius (5 lentelė)). Konkurencinio prijungimo bandymo

mikrotitravimo plokštelių išdėstymo schemas pavyzdys, naudojant tris nežinomas bandomąsias chemines medžiagas, pateikiamas 2.3 priedėlyje. 4 ir 5 lentelėse nurodytos koncentracijos yra galutinės bandymo koncentracijos. Didžiausioji E2 koncentracija turėtų būti 1×10^{-7} mol/l, ir, kalbant apie silpnai jungiamą medžiagą, turėtų būti naudojama silpnai jungiamos medžiagos 1 plokštelės koncentracija. Laboratorija turėtų nustatyti IC_{50} koncentraciją, pagrįsta istorinių kontrolinių ėminių duomenų baze. Tikimasi, kad ši vertė turėtų būti panaši į stebimą atliekant patvirtinimo tyrimus (žr. 1 lentelę).

4 lentelė. Konkurencinio prijungimo bandymo mikrotitravimo plokštelės schema, etaloninio estrogeno ir kontrolinių ėminių visų koncentracijos verčių kreivės (1 plokštelė)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (tik tirpiklis)			TB (tik tirpiklis)			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})			Tuščiasis ėminys*		
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	Tuščiasis ėminys (žymėtojo ėminio)**			Tuščiasis ėminys (žymėtojo ėminio)**			Buferinio tirpalo kontrolinis ėminys			Buferinio tirpalo kontrolinis ėminys		

Šiame pavyzdyje silpnai jungiama medžiaga yra noretinodrelis (NE).

* Tikrasis tuščiasis ėminys, šulinėlis nenaudojamas.

** Tuščiasis ėminys, kuris nenaudojamas inkubavimo metu, bet naudojamas bendrajam pridėtam radioaktyvumui nustatyti.

5 lentelė. Konkurencinio prijungimo bandymo mikrotitravimo plokštelės schema, bandomųjų cheminių medžiagų ir plokštelės kontrolinių ėminių visų koncentracijos verčių kreivės

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (tik tirpiklis)			TB (tik tirpiklis)			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})		

Šiame pavyzdyje silpnai jungiama medžiaga yra noretinodrelis (NE).

Konkurencinio prijungimo bandymo atlikimas

38. Kaip parodyta 6 lentelėje, į šulinėlius reikėtų įpilti 80 µl tirpiklio kontrolinio ėminio, buferinio tirpalo kontrolinio ėminio, pamatinio estrogeno, silpnai jungiamos medžiagos, nejungiamos medžiagos ir bandymo buferiniame tirpale paruoštų bandomųjų cheminių medžiagų ėminių. Tada į kiekvieną šulinėlį reikėtų įpilti 40 µl 4 nmol/l [³H]-17β-estradiolio tirpalo. Po nestipraus nuo 10 iki 15 min trukmės maišymo ant sukamosios purtyklės nuo 2 °C iki 8 °C temperatūroje, reikėtų įpilti 40 µl hrERα tirpalo. Bandymo mikrotitravimo plokštelės turėtų būti inkubuojamos nuo 2 °C iki 8 °C temperatūroje nuo 16 iki 20 h ir inkubavimo laikotarpiui dedamos ant sukamosios purtyklės.

6 lentelė. Bandymo komponentų mikrotitravimo plokštelėse tūris, atliekant konkurencinio prijungimo prie hrER bandymą

Tūris (µl)	Sudedamoji dalis
80	Nežymėtasis 17β-estradiolis, noretinodrelis, OTES, bandomosios cheminės medžiagos, tirpiklis arba buferinis tirpalas
40	4 nmol/l [³ H]-17β-estradiolio tirpalas
40	hrERα tirpalas, koncentracija kaip nustatyta
160	Bendrasis kiekvieno šulinėlio tūris

39. Tada reikėtų atlikti prie hrERα prijungto [³H]-17β-estradiolio kiekybinį nustatymą, kaip aprašyta sotinamojo prijungimo bandymo 20–23 pastraipose, atskyrus prie hrERα prijungtą [³H]-17β-estradiolį nuo laisvojo [³H]-17β-estradiolio, į kiekvieną šulinėlį įpilant 80 µl šaltos DCC suspensijos.
40. H1-6 šulinėliai (identifikuojami kaip 4 lentelės tuštieji ėminiai (žymėtųjų ėminių)) rodo 40 µl esančio [³H]-17β-estradiolio skilimų per minutę skaičių. 40 µl alikvotinį tūrį reikėtų įpilti tiesiai į scintiliacijų skystį H1–H6 šulinėliuose.

Priimtino kriterijai

Sotinamojo prijungimo bandymas

41. Naudojant vis didesnę [³H]-17β-estradiolio koncentraciją, turėtų būti pasiekta specifinio prijungimo kreivės gulstė, kuri rodo hrERα prisotinimą ligandu.
42. Specifinis prijungimas, esant 1 nmol/l [³H]-17β-estradiolio koncentracijai, turėtų patekti į priimtina nuo 15 % iki 25 % bendrojo radioaktyvumo, pridėto atliekant visus atskirus bandymus, išmatuoto vidurkio intervalą. Atsitiktiniai nedideli nukrypimai nuo šių intervalo ribų yra priimtini, tačiau, jei atskirų bandymų rezultatai nuolat yra už šio intervalo ribų arba kurio nors atskiro bandymo rezultatas reikšmingai neatitinka šio intervalo, reikia koreguoti baltymo koncentraciją ir kartoti sotinamojo prijungimo bandymą.

43. Duomenims turėtų būti gautas tiesinis Scatchardo grafikas.

44. Nespecifinis prijungimas neturėtų būti per didelis. Nespecifinio prijungimo vertė paprastai turėtų būti $< 35 \%$ bendrojo prijungimo. Tačiau santykis kartais gali būti gerokai didesnis nei ši riba, kai bandant mažiausios koncentracijos radioaktyviuoju izotopu žymėtą 17β -estradiolį matuojamas labai mažas dpm.

Konkurencinio prijungimo bandymas

45. Vis didėjančios koncentracijos nežymėtasis 17β -estradiolis turėtų pavaduoti $[^3\text{H}]\text{-}17\beta$ -estradiolį prie receptoriaus konkurencinį prijungimą vienoje vietoje atitinkančiu būdu.

46. Pamatinio estrogeno (t. y. 17β -estradiolio) IC_{50} vertė turėtų būti maždaug lygi molinei $[^3\text{H}]\text{-}17\beta$ -estradiolio koncentracijai plius K_d , nustatytą atliekant sotinamojo prijungimo bandymą.

47. Bendrasis specifinis prijungimas nuolat turėtų patekti į priimtina $20 \pm 5 \%$ intervalą, kai atliekant visus atskirus bandymus į kiekvieną šulinėlį pridėto bendrojo radioaktyvumo vidutinė išmatuota koncentracija buvo 1 nmol/l . Atsitiktiniai nedideli nukrypimai nuo šių intervalo ribų yra priimtini, tačiau, jei atskirų bandymų rezultatai nuolat yra už šio intervalo ribų arba kurio nors atskiro bandymo rezultatas reikšmingai neatitinka šio intervalo, reikia koreguoti baltymo koncentraciją.

48. Tirpiklis neturėtų pakeisti bandymo jautrį arba atkuriamumą. Tirpiklio kontrolinio ėminio rezultatai (TB šulinėliai) lyginami su buferinio tirpalo kontrolinio ėminio rezultatais, kad būtų galima patikrinti, ar naudojamas tirpiklis nedaro įtakos bandymo sistemai. TB ir buferinio tirpalo kontrolinio ėminio rezultatai turėtų būti palyginami, jei tirpiklis nedaro įtakos bandymui.

49. Nejungiamo medžiaga neturėtų pavaduoti daugiau kaip 25% prie hrER α prijungto $[^3\text{H}]\text{-}17\beta$ -estradiolio, kai jos bandymo koncentracija yra ne didesnė kaip 10^{-3} mol/l (OTES) arba 10^{-4} mol/l (DBP).

50. Veiksmingumo kriterijai buvo sukurti etaloniniam estrogenui ir dviem silpnai jungiamoms medžiagoms (pvz., noretinodreliui, noretindronui), naudojant FW prijungimo prie hrER bandymo patvirtinimo tyrimo duomenis (2 nuorodos N priedas). Pateikti visų patvirtinimo tyrime dalyvavusių laboratorijų visų atskirtų kontrolinių ėminių atskirų bandymų vidurkio $(n) \pm \text{SN } 95 \%$ pasiklovimo intervalai. Buvo apskaičiuoti etaloninio estrogeno ir silpnai jungiamų medžiagų kreivės priderinimo parametrų (t. y. viršaus, apačios, Hillo krypties koeficiento, $\log \text{IC}_{50}$) ir silpnai jungiamų medžiagų $\log_{10}\text{RBA}$ atžvilgiu etaloninio estrogeno 95% pasiklovimo intervalai, kurie yra pateikti kaip teigiamų kontrolinių ėminių veiksmingumo kriterijai. 1 lentelėje pateikti kreivės priderinimo parametrų, kurie gali būti naudojami kaip veiksmingumo kriterijai, tikėtini intervalai. Praktiškai IC_{50} intervalas gali kažkiek kisti priklausomai nuo receptoriaus kompozicijos K_d ir ligando koncentracijos.

51. Bandomųjų cheminių medžiagų kreivės priderinimo parametrų veiksmingumo kriterijai nebuvo sukurti dėl labai didelės grupės potencialių bandomųjų cheminių medžiagų ir dėl potencialaus giminingumo bei rezultatų kitimo (pvz., visa kreivė, dalinė kreivė, nėra kreivės priderinimo). Tačiau, atliekant kiekvieno bandomosios cheminės medžiagos atskiro bandymo rezultatų analizę reikėtų, kad juos įvertintų specialistai. Bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos verčių intervalas turėtų būti pakankamai platus (pvz., 90–100 % prijungimo), kad būtų galima aiškiai nustatyti konkurencinio prijungimo kreivės viršutinę dalį. Kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos kartotinių ėminių, taip pat 3 nevienalaikių atskirų bandymų rezultatų kintamumas turėtų būti priimtinas ir moksliškai pagrįstas. Kiekvieno bandomosios cheminės medžiagos atskiro bandymo kontroliniai ėminiai turėtų artėti prie nurodytų šio FW bandymo veiksmingumo matų ir atitikti kiekvienos atitinkamos laboratorijos istorinius kontrolinių ėminių duomenis.

DUOMENŲ ANALIZĖ

Sotinamojo prijungimo bandymas

52. Matuojamas bendrasis ir nespecifinis prijungimas. Pagal šias vertes apskaičiuojamas didėjančios koncentracijos $[^3\text{H}]\text{-}17\beta\text{-estradiolio}$ specifinis prijungimas pusiausvyros sąlygomis, iš bendrojo prijungimo rezultato atimant nespecifinio prijungimo rezultatą. Specifinio prijungimo priklausomybės nuo $[^3\text{H}]\text{-}17\beta\text{-estradiolio}$ koncentracijos kreivėje turėtų būti gauta didžiausiojo specifinio prijungimo gulstė, kuri rodo hrER α prisotinimą $[^3\text{H}]\text{-}17\beta\text{-estradioliu}$. Be to, duomenų analizė turėtų dokumentuoti $[^3\text{H}]\text{-}17\beta\text{-estradiolio}$ prijungimą vienoje, didelio giminingumo prijungimo vietoje. Sotinamojo prijungimo kreivėje turėtų būti rodomas nespecifinis, bendrasis ir specifinis prijungimas. Toliau šie duomenys turėtų būti analizuojami atliekant netiesinės regresijos analizę (pvz., BioSoft; McPherson, 1985 m.; Motulsky, 1995 m.), kai galutinai duomenys pateikiami kaip Scatchardo grafikas.

53. Atliekant duomenų analizę, B_{max} ir K_d turėtų būti nustatomi vien tik pagal bendrojo prijungimo duomenis, darant prielaidą, kad nespecifinis prijungimas yra tiesinis, jei nebūtų pagrįstas skirtingo metodo taikymas. Be to, reikėtų naudoti atspariąją regresiją, kai nustatomas geriausias priderinimas, jei nebūtų pateiktas pagrindimas. Turėtų būti nurodytas atspariosios regresijos metodas. Visada reikėtų atlikti koregavimą dėl ligando kiekio sumažėjimo (pvz., taikant Swillens metodą, 1995 m.), kai pagal sotinamojo prijungimo duomenis nustatoma B_{max} ir K_d .

Konkurencinio prijungimo bandymas

54. Konkurencinio prijungimo kreivė braižoma kaip specifinio $[^3\text{H}]\text{-}17\beta\text{-estradiolio}$ prijungimo priklausomybės nuo konkurento koncentracijos (išreikštos $\log_{10}$ vienetais) kreivė. Bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant slopinama 50 % didžiausiojo specifinio $[^3\text{H}]\text{-}17\beta\text{-estradiolio}$ prijungimo yra IC_{50} vertė.

55. Teigiamų kontrolinių ėminių (pvz., etaloninio estrogeno ir silpnai jungiamos medžiagos) $\log(\text{IC}_{50})$ įverčiai turėtų būti nustatyti naudojant tinkamą netiesinio kreivių priderinimo programą keturių parametrų Hill lygčiai priderinti. (pvz., BioSoft; McPherson, 1985 m.; Motulsky, 1995 m.). Priderinant šias kreives, viršus, apačia, krypties koeficientas ir $\log(\text{IC}_{50})$ paprastai turėtų likti neapriboti. Reikėtų naudoti atspariąją regresiją, kai nustatomas geriausias priderinimas, jei nebūtų pateiktas pagrindimas. Koregavimas dėl ligando kiekio sumažėjimo neturėtų būti atliekamas. Po pradinės analizės kiekviena prijungimo kreivė turėtų būti analizuojama iš naujo, kad būtų užtikrintas geriausias priderinimas prie modelio. Silpnai jungiamos medžiagos santykinį prijungimo giminingumą (RBA) reikėtų skaičiuoti kaip procentais išreikštą silpnai jungiamos medžiagos $\log(\text{IC}_{50})$ ir 17β -estradiolio $\log(\text{IC}_{50})$ santykį. Teigiamų medžiagų kontrolinių ėminių ir nejungiamos medžiagos kontrolinio ėminio rezultatai turėtų būti įvertinti, taikant 2 priedėlio 45–50 pastraipose pateiktus naudojimo charakteristikų matus.
56. Visų bandomųjų cheminių medžiagų duomenys turėtų būti analizuojami taikant pakopinį metodą, siekiant užtikrinti, kad duomenų analizė būtų tinkamai atlikta ir kiekviena konkurencinio prijungimo kreivė būtų teisingai klasifikuojama. Rekomenduojama, kad iš pradžių būtų atliekama kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos atskiro bandymo standartizuota duomenų analizė, kuri atitiktų etaloninio estrogeno ir silpnai jungiamų medžiagų kontrolinių ėminių analizę (žr. 55 pastraipa). Baigus šią analizę, reikėtų atlikti kiekvieno atskiro bandymo techninę kreivės priderinimo parametrų analizę, taip pat vizualią duomenų atitikties sukurtai konkurencinio prijungimo kreivei analizę. Atliekant šią techninę analizę gauti specifiskai prijungiamo ^3H - 17β -estradiolio procentinės dalies sumažėjimo priklausomai nuo koncentracijos stebėjimo duomenys, mažas kiekvienos koncentracijos techninių kartotinių ėminių kintamumas ir trims atskiriems bandymams gautas priderinimo parametrų pastovumas yra geras tinkamo bandymų atlikimo ir duomenų analizės rodiklis.

Duomenų aiškinimas

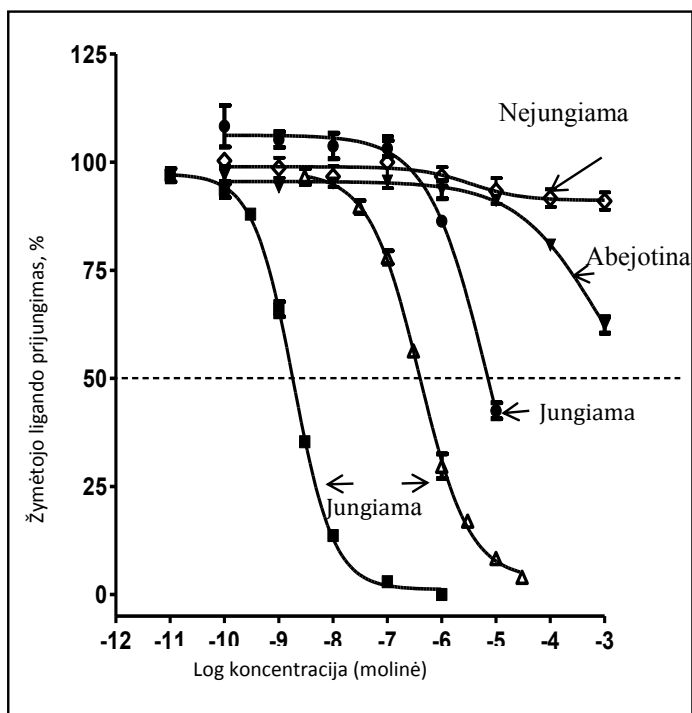
57. Jei įvykdomi visi priimtino kriterijai, bandomoji cheminė medžiaga laikoma prie hrER α jungiama medžiaga, jei gali būti priderinta prijungimo kreivė ir duomenų intervalą atitinkančio žemiausio atsako kreivės taško vertė yra mažesnė kaip 50 % (1 paveikslas).
58. Jei įvykdomi visi priimtino kriterijai, bandomoji cheminė medžiaga laikoma nejungiama prie hrER α , jei:
- galima priderinti prijungimo kreivę ir duomenų intervalą atitinkančio žemiausio priderintos atsako kreivės taško vertė yra didesnė kaip 75 %, arba
 - prijungimo kreivė negali būti priderinta ir procentais išreikštas mažiausias neišlygintas vidutinis prijungimas tarp koncentracijų grupių duomenų yra didesnis kaip 75 %.

59. Bandomosios cheminės medžiagos laikomos abejotinomis medžiagomis, jei nevykdoma jokia iš pirmiau nurodytų sąlygų (pvz., žemiausias priderintos atsako kreivės taškas yra 76–51 % intervale).

7 lentelė. Klasifikavimo pagal bandomosios cheminės medžiagos konkurencinio prijungimo kreivę kriterijai

Klasifikavimas	Kriterijai
Jungiama medžiaga ^a	Prijungimo kreivė gali būti priderinta. Duomenų intervalą atitinkančio žemiausio atsako kreivės taško vertė yra mažesnė kaip 50 %.
Nejungiama medžiaga ^b	Jei prijungimo kreivė gali būti priderinta, duomenų intervalą atitinkančio žemiausio atsako kreivės taško vertė yra didesnė kaip 75 %. Jei prijungimo kreivė negali būti priderinta, procentais išreikštas mažiausias neišlygintas vidutinis prijungimas tarp koncentracijų grupių duomenų yra didesnis kaip 75 %.
Abejotina medžiaga ^c	Atliekant atskirą bandymą bandyta medžiaga, kuri nėra jungiama ar nejungiama (pvz., žemiausias priderintos atsako kreivės taškas yra 76–51 % intervale).

1 paveikslas. Bandomosios cheminės medžiagos klasifikavimo naudojant konkurencinio prijungimo kreivę pavyzdžiai



60. Laboratorijoje atlikti bandomosios cheminės medžiagos kartotiniai atskiri bandymai sujungiami kiekvienam iš jų priskiriant skaitinę vertę ir gaunant atskirų bandymų vidurkį, kaip parodyta 8 lentelėje. Kiekvienos laboratorijos sujungtų atskirų bandymų rezultatai lyginami su kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos numanoma klasifikacija.

8 lentelė. Bandomosios cheminės medžiagos klasifikavimo metodas, laboratorijoje atliekant kartotinius atskirus bandymus

Priskirti vertę kiekvienam atskiram bandymui:	
Klasifikavimas	Skaitinė vertė
Jungiamą medžiagą	2
Abejotina medžiaga	1
Nejungiamą medžiagą	0
Klasifikuoti visų atskirų bandymų skaitinės vertės vidurkį:	
Klasifikavimas	Skaitinė vertė
Jungiamą medžiagą	Vidurkis $\geq 1,5$
Abejotina medžiaga	$0,5 \leq \text{vidurkis} < 1,5$
Nejungiamą medžiagą	Vidurkis $< 0,5$

BANDYMO ATASKAITA

61. Žr. šio bandymo metodo ***PRIJUNGIMO PRIE hrER BANDYMO KOMPONENTAI*** 24 pastraipą.

2.1 priedėlis

TERMINŲ SĄRAŠAS

[³H]E2 – 17β-estradiolis, žymėtas radioaktyviuoju tričio izotopu.

DCC – dekstranu dengtos medžio anglys.

E2 – nežymėtasis 17β-estradiolis (inertinis).

Bandymo buferinis tirpalas – 10 mmol/l tris-(hidroksimetil)aminometano, 10 mg galvijų kraujo serumo albumino /ml, 2 mmol/l ditiotreitolio, 10 % glicerolio, 0,2 mmol/l leupeptino, pH 7,5.

hrERα – žmogaus rekombinantinio estrogenų receptoriaus alfa (ligandų prijungimo domenai).

Kartotinis ėminys – vienas iš kartotinių tos pačios sudėties ir koncentracijos šulinėlių, bandomų vienu metu atliekant vieną atskirą bandymą. Pagal šį protokolą bandomi trys kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos ėminiai; t. y. vienu metu bandomi trys kartotiniai bandomosios cheminės medžiagos kiekvienos koncentracijos ėminiai.

Atskiras bandymas – vienu metu atliekamas viso mikrotitravimo plokštelės bandymo šulinėlių rinkinio bandymas, kai gaunama visa informacija, kuri yra būtina bandomosios cheminės medžiagos prijungimui prie hrERα apibūdinti (t. y. bendrasis [³H]-17β-estradiolis, pridėtas į bandymo šulinėlį, didžiausias [³H]-17β-estradiolio prijungimas prie hrERα, nespecifinis prijungimas ir įvairios koncentracijos bandomosios cheminės medžiagos bendrasis prijungimas). Atskirą bandymą gali sudaryti keli kaip vienas (t. y. kartotiniai) bandymo šulinėliai viena koncentracijai, bet kadangi pagal šį protokolą reikalaujama bandyti tris kartotinius ėminius, vieną atskirą bandymą sudaro trijų vienos koncentracijos bandymo šulinėlių bandymas. Be to, pagal šį protokolą reikalaujama atlikti tris nepriklausomus (t. y. nevienalaikius) kiekvienos cheminės medžiagos atskirus bandymus.

2.2 priedėlis

TIPINIS SOTINAMOJO PRIJUNGIMO PRIE $[^3\text{H}]$ -17 β -ESTRADIOLIO BANDYMAS, NAUDOJANT TRIS KARTOTINIŲ ĖMINIŲ ŠULINĖLIUS

Tipinis sotinamojo prijungimo prie $[^3\text{H}]$ -17 β -estradiolio bandymas, naudojant tris kartotinių ėminių šulinėlius											
Padėtis	Kartotinis ėminys	Šulinėlio tipo kodas	Žymėtojo E2 pradinė koncentracija (nmol/l)	Žymėtojo E2 tūris (μl)	Žymėtojo E2 galutinė koncentracija (nmol/l)	Nežymėtojo E2 pradinė koncentracija (μmol/l)	Nežymėtojo E2 tūris (μl)	Nežymėtojo E2 galutinė koncentracija (μmol/l)	Buferinio tirpalo tūris (μl)	Receptoriaus tūris (μl)	Bendrasis šulinėlio tūris
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

Tipinis sotinamojo prijungimo prie [³H]-17β-estradiolio bandymas, naudojant tris kartotinių ėminių šulinėlius

Padėtis	Kartotinis ėminys	Šulinėlio tipo kodas	Žymėtojo E2 pradinė koncentracija (nmol/l)	Žymėtojo E2 tūris (μl)	Žymėtojo E2 galutinė koncentracija (nmol/l)	Nežymėtojo E2 pradinė koncentracija (μmol/l)	Nežymėtojo E2 tūris (μl)	Nežymėtojo E2 galutinė koncentracija (μmol/l)	Buferinio tirpalo tūris (μl)	Receptoriaus tūris (μl)	Bendrasis šulinėlio tūris
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	Žymėtasis	0,12	40	0,03	–	–	–	–	–	40
G2	2	Žymėtasis	0,12	40	0,03	–	–	–	–	–	40
G3	3	Žymėtasis	0,12	40	0,03	–	–	–	–	–	40
G4	1	Žymėtasis	0,24	40	0,06	–	–	–	–	–	40
G5	2	Žymėtasis	0,24	40	0,06	–	–	–	–	–	40
G6	3	Žymėtasis	0,24	40	0,06	–	–	–	–	–	40
G7	1	Žymėtasis	0,32	40	0,08	–	–	–	–	–	40
G8	2	Žymėtasis	0,32	40	0,08	–	–	–	–	–	40
G9	3	Žymėtasis	0,32	40	0,08	–	–	–	–	–	40
G10	1	Žymėtasis	0,40	40	0,10	–	–	–	–	–	40
G11	2	Žymėtasis	0,40	40	0,10	–	–	–	–	–	40
G12	3	Žymėtasis	0,40	40	0,10	–	–	–	–	–	40
H1	1	Žymėtasis	1,20	40	0,30	–	–	–	–	–	40
H2	2	Žymėtasis	1,20	40	0,30	–	–	–	–	–	40
H3	3	Žymėtasis	1,20	40	0,30	–	–	–	–	–	40
H4	1	Žymėtasis	2,40	40	0,60	–	–	–	–	–	40
H5	2	Žymėtasis	2,40	40	0,60	–	–	–	–	–	40
H6	3	Žymėtasis	2,40	40	0,60	–	–	–	–	–	40
H7	1	Žymėtasis	4,00	40	1,00	–	–	–	–	–	40
H8	2	Žymėtasis	4,00	40	1,00	–	–	–	–	–	40
H9	3	Žymėtasis	4,00	40	1,00	–	–	–	–	–	40
H10	1	Žymėtasis	12,00	40	3,00	–	–	–	–	–	40
H11	2	Žymėtasis	12,00	40	3,00	–	–	–	–	–	40
H12	3	Žymėtasis	12,00	40	3,00	–	–	–	–	–	40

Atkreipiamas dėmesys į tai, kad „žymėtieji“ šulinėliai yra tušti inkubavimo metu. 40 μl įpilama tik scintiliacijoms skaičiuoti.

2.3 priedėlis. Konkurencinio prijungimo bandymo šulinėlių schema

Plokštelė	Padėtis	Kartotinis ėminys	Šulinėlio tipas	Šulinėlio kodas	Koncentracijos kodas	Konkurento pradinė koncentracija (mol/l)	IREK pradinio tirpalo tūris (μl)	Buferinio tirpalo tūris (μl)	Zymekto (žymėtojo E2) tūris (μl)	Tūris iš skiedimo plokštelės (μl)	Galutinis tūris (μl)	Konkurento galutinė koncentracija (mol/l)
S	A1	1	bendrasis	TB	TB1	-	40		40	80	160	-
S	A2	2	bendrasis	TB	TB2	-	40		40	80	160	-
S	A3	3	bendrasis	TB	TB3	-	40		40	80	160	-
S	A4	1	bendrasis	TB	TB4	-	40		40	80	160	-
S	A5	2	bendrasis	TB	TB5	-	40		40	80	160	-
S	A6	3	bendrasis	TB	TB6	-	40		40	80	160	-
S	A7	1	nežymėtasis E2	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	A8	2	nežymėtasis E2	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	A9	3	nežymėtasis E2	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	A10	1	nežymėtasis E2	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	A11	2	nežymėtasis E2	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	A12	3	nežymėtasis E2	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	B1	1	nežymėtasis E2	S	S1	2,00E-07	40	-	40	80	160	1,0E-07
S	B2	2	nežymėtasis E2	S	S1	2,00E-07	40	-	40	80	160	1,0E-07
S	B3	3	nežymėtasis E2	S	S1	2,00E-07	40	-	40	80	160	1,0E-07
S	B4	1	nežymėtasis E2	S	S2	2,00E-08	40	-	40	80	160	1,0E-08
S	B5	2	nežymėtasis E2	S	S2	2,00E-08	40	-	40	80	160	1,0E-08
S	B6	3	nežymėtasis E2	S	S2	2,00E-08	40	-	40	80	160	1,0E-08
S	B7	1	nežymėtasis E2	S	S3	6,00E-09	40	-	40	80	160	3,0E-09
S	B8	2	nežymėtasis E2	S	S3	6,00E-09	40	-	40	80	160	3,0E-09
S	B9	3	nežymėtasis E2	S	S3	6,00E-09	40	-	40	80	160	3,0E-09
S	B10	1	nežymėtasis E2	S	S4	2,00E-09	40	-	40	80	160	1,0E-09
S	B11	2	nežymėtasis E2	S	S4	2,00E-09	40	-	40	80	160	1,0E-09
S	B12	3	nežymėtasis E2	S	S4	2,00E-09	40	-	40	80	160	1,0E-09
S	C1	1	nežymėtasis E2	S	S5	6,00E-10	40	-	40	80	160	3,0E-10
S	C2	2	nežymėtasis E2	S	S5	6,00E-10	40	-	40	80	160	3,0E-10
S	C3	3	nežymėtasis E2	S	S5	6,00E-10	40	-	40	80	160	3,0E-10
S	C4	1	nežymėtasis E2	S	S6	2,00E-10	40	-	40	80	160	1,0E-10
S	C5	2	nežymėtasis E2	S	S6	2,00E-10	40	-	40	80	160	1,0E-10
S	C6	3	nežymėtasis E2	S	S6	2,00E-10	40	-	40	80	160	1,0E-10
S	C7	1	nežymėtasis E2	S	S7	2,00E-11	40	-	40	80	160	1,0E-11
S	C8	2	nežymėtasis E2	S	S7	2,00E-11	40	-	40	80	160	1,0E-11
S	C9	3	nežymėtasis E2	S	S7	2,00E-11	40	-	40	80	160	1,0E-11
S	C10	1	tuščiasis ėminys	tuščiasis	B1	-	-	160	-	-	160	-
S	C11	2	tuščiasis ėminys	tuščiasis	B2	-	-	160	-	-	160	-
S	C12	3	tuščiasis ėminys	tuščiasis	B3	-	-	160	-	-	160	-
S	D1	1	noretinodrelis	NE	WP1	6,00E-05	40	-	40	80	160	3,0E-05
S	D2	1	noretinodrelis	NE	WP1	6,00E-05	40	-	40	80	160	3,0E-05
S	D3	1	noretinodrelis	NE	WP1	6,00E-05	40	-	40	80	160	3,0E-05
S	D4	1	noretinodrelis	NE	WP2	2,00E-05	40	-	40	80	160	1,0E-05
S	D5	1	noretinodrelis	NE	WP2	2,00E-05	40	-	40	80	160	1,0E-05
S	D6	1	noretinodrelis	NE	WP2	2,00E-05	40	-	40	80	160	1,0E-05
S	D7	1	noretinodrelis	NE	WP3	6,00E-06	40	-	40	80	160	3,0E-06
S	D8	1	noretinodrelis	NE	WP3	6,00E-06	40	-	40	80	160	3,0E-06
S	D9	1	noretinodrelis	NE	WP3	6,00E-06	40	-	40	80	160	3,0E-06
S	D10	1	noretinodrelis	NE	WP4	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	D11	1	noretinodrelis	NE	WP4	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	D12	1	noretinodrelis	NE	WP4	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06

Konkurencinio prijungimo bandymo šulinėlių schema												
Plokštelė	Padėtis	Kartotinis ėminys	Šulinėlio tipas	Šulinėlio kodas	Koncentracijos kodas	Konkurento pradinė koncentracija (mol/l)	HFCK pradinio tirpalo tūris (μl)	Buferinio tirpalo tūris (μl)	Zymekno (žymėtojo E2) tūris (μl)	Tūris iš skiedimo plokštelės (μl)	Galutinis tūris (μl)	Konkurento galutinė koncentracija (mol/l)
S	E1	1	noretinodrelis	NE	WP	6,00E-07-	40		40	80	160	3,0E-07
S	E2	2	noretinodrelis	NE	WP	6,00E-07-	40		40	80	160	3,0E-07
S	E3	3	noretinodrelis	NE	WP	6,00E-07-	40		40	80	160	3,0E-07
S	E4	1	noretinodrelis	NE	WP	2,00E-07-	40		40	80	160	1,0E-07
S	E5	2	noretinodrelis	NE	WP	2,00E-07-	40		40	80	160	1,0E-07
S	E6	3	noretinodrelis	NE	WP	2,00E-07-	40		40	80	160	1,0E-07
S	E7	1	noretinodrelis	NE	WP	6,00E-08-	40	-	40	80	160	3,0E-08
S	E8	2	noretinodrelis	NE	WP	6,00E-08-	40	-	40	80	160	3,0E-08
S	E9	3	noretinodrelis	NE	WP	6,00E-08-	40	-	40	80	160	3,0E-08
S	E10	1	noretinodrelis	NE	WP	6,00E-09-	40	-	40	80	160	3,0E-09
S	E11	2	noretinodrelis	NE	WP	6,00E-09-	40	-	40	80	160	3,0E-09
S	E12	3	noretinodrelis	NE	WP	6,00E-09-	40	-	40	80	160	3,0E-09
S	F1	1	OTES	N	OTES	2,00E-03	40	-	40	80	160	1,0E-03
S	F2	2	OTES	N	OTES	2,00E-03	40	-	40	80	160	1,0E-03
S	F3	3	OTES	N	OTES	2,00E-03	40	-	40	80	160	1,0E-03
S	F4	1	OTES	N	OTES	2,00E-04	40	-	40	80	160	1,0E-04
S	F5	2	OTES	N	OTES	2,00E-04	40	-	40	80	160	1,0E-04
S	F6	3	OTES	N	OTES	2,00E-04	40	-	40	80	160	1,0E-04
S	F7	1	OTES	N	OTES	2,00E-05	40	-	40	80	160	3,0E-05
S	F8	2	OTES	N	OTES	2,00E-05	40	-	40	80	160	3,0E-05
S	F9	3	OTES	N	OTES	2,00E-05	40	-	40	80	160	3,0E-05
S	F10	1	OTES	N	OTES	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	F11	2	OTES	N	OTES	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	F12	3	OTES	N	OTES	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	G1	1	OTES	N	OTES	2,00E-07	40	-	40	80	160	3,0E-07
S	G2	2	OTES	N	OTES	2,00E-07	40	-	40	80	160	3,0E-07
S	G3	3	OTES	N	OTES	2,00E-07	40	-	40	80	160	3,0E-07
S	G4	1	OTES	N	OTES	2,00E-08	40	-	40	80	160	1,0E-08
S	G5	2	OTES	N	OTES	2,00E-08	40	-	40	80	160	1,0E-08
S	G6	3	OTES	N	OTES	2,00E-08	40	-	40	80	160	1,0E-08
S	G7	1	OTES	N	OTES	2,00E-09	40	-	40	80	160	1,0E-09
S	G8	2	OTES	N	OTES	2,00E-09	40	-	40	80	160	1,0E-09
S	G9	3	OTES	N	OTES	2,00E-09	40	-	40	80	160	1,0E-09
S	G10	1	OTES	N	OTES	2,00E-10	40	-	40	-	160	1,0E-10
S	G11	2	OTES	N	OTES	2,00E-10	40	-	40	-	160	1,0E-10
S	G12	3	OTES	N	OTES	2,00E-10	40	-	40	-	160	1,0E-10
S	H1	1	žymėtasis	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H2	1	žymėtasis	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H3	1	žymėtasis	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H4	1	žymėtasis	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H5	1	žymėtasis	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H6	1	žymėtasis	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H7	1	buferinio tirpalo kontrolinis ėminys	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H8	1	buferinio tirpalo kontrolinis ėminys	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H9	1	buferinio tirpalo kontrolinis ėminys	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H10	1	buferinio tirpalo kontrolinis ėminys	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H11	1	buferinio tirpalo kontrolinis ėminys	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H12	1	buferinio tirpalo kontrolinis ėminys	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-

Atkreipiamas dėmesys į tai, kad „žymėtieji“ šulinėliai yra tušti inkubavimo metu. 40 μl įpilama tik scintiliacijoms skaičiuoti.

Konkurencinio prijungimo bandymo šulinėlių schema												
Plokštelė	Padėtis	Kartotinis ėminys	Šulinėlio tipas	Šulinėlio kodas	Koncentracijos kodas	Konkurento pradinė koncentracija (mol/l)	hr/EK pradinio tirpalo tūris (μl)	Buferinio tirpalo tūris (μl)	Zymeklio (žymėtojo E2) tūris (μl)	skiedimo plokštelės (μl)	Galutinis tūris (μl)	Konkurento galutinė koncentracija (mol/l)
P1	A1	1	bendrasis	TB	TBB1B1	-	40	-	40	80	160	-
P1	A2	2	bendrasis	TB	TB2	-	40	-	40	80	160	-
P1	A3	3	bendrasis	TB	TB3	-	40	-	40	80	160	-
P1	A4	1	bendrasis	TB	TB4	-	40	-	40	80	160	-
P1	A5	2	bendrasis	TB	TB5	-	40	-	40	80	160	-
P1	A6	3	bendrasis	TB	TB6	-	40	-	40	80	160	-
P1	A7	1	nežymėtasis E2	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
P1	A8	2	nežymėtasis E2	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
P1	A9	3	nežymėtasis E2	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
P1	A10	1	nežymėtasis E2	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
P1	A11	2	nežymėtasis E2	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
P1	A12	3	nežymėtasis E2	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
P1	B1	1	Bandomoji	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B2	2	Bandomoji	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B3	3	Bandomoji	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B4	1	Bandomoji	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B5	2	Bandomoji	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B6	3	Bandomoji	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B7	1	Bandomoji	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B8	2	Bandomoji	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B9	3	Bandomoji	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B10	1	Bandomoji	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	B11	2	Bandomoji	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	B12	3	Bandomoji	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	C1	1	Bandomoji	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C2	2	Bandomoji	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C3	3	Bandomoji	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C4	1	Bandomoji	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C5	2	Bandomoji	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C6	3	Bandomoji	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C7	1	Bandomoji	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C8	2	Bandomoji	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C9	3	Bandomoji	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C10	1	Bandomoji	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	C11	2	Bandomoji	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	C12	3	Bandomoji	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	D1	1	Bandomoji	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D2	2	Bandomoji	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D3	3	Bandomoji	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D4	1	Bandomoji	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D5	2	Bandomoji	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D6	3	Bandomoji	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D7	1	Bandomoji	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D8	2	Bandomoji	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D9	3	Bandomoji	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D10	1	Bandomoji	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	D11	2	Bandomoji	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	D12	3	Bandomoji	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	E1	1	Bandomoji	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E2	2	Bandomoji	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E3	3	Bandomoji	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07

Konkurencinio prijungimo bandymo šulinėlių schema												
Plokštelė	Padėtis	Kartotinis ėminys	Šulinėlio tipas	Šulinėlio kodas	Koncentracijos kodas	Konkurento pradinė koncentracija (mol/l)	hrER pradinio tirpalo tūris (μl)	Buferinio tirpalo tūris (μl)	Zymeklio (žymėtojo E2) tūris (μl)	Tūris iš skiedimo plokštelės (μl)	Galutinis tūris (μl)	Konkurento galutinė koncentracija (mol/l)
P1	E4	1	Bandomoji	TC2	6	-	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E5	2	Bandomoji	TC2	6	-	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E6	3	Bandomoji	TC2	6	-	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E7	1	Bandomoji	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E8	2	Bandomoji	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E9	3	Bandomoji	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E10	1	Bandomoji	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	E11	2	Bandomoji	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	E12	3	Bandomoji	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	F1	1	Bandomoji	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F2	2	Bandomoji	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F3	3	Bandomoji	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F4	1	Bandomoji	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F5	2	Bandomoji	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F6	3	Bandomoji	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F7	1	Bandomoji	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F8	2	Bandomoji	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F9	3	Bandomoji	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F10	1	Bandomoji	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	F11	2	Bandomoji	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	F12	3	Bandomoji	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	G1	1	Bandomoji	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G2	2	Bandomoji	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G3	3	Bandomoji	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G4	1	Bandomoji	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G5	2	Bandomoji	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G6	3	Bandomoji	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G7	1	Bandomoji	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G8	2	Bandomoji	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G9	3	Bandomoji	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G10	1	Bandomoji	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	G11	2	Bandomoji	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	G12	3	Bandomoji	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	H1	1	noretinodrelis	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H2	2	noretinodrelis	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H3	3	noretinodrelis	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H4	1	noretinodrelis	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H5	2	noretinodrelis	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H6	3	noretinodrelis	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H7	1	nežymėtasis E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H8	2	nežymėtasis E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H9	3	nežymėtasis E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H10	1	nežymėtasis E2 S			1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H11	2	nežymėtasis E2 S			1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H12	3	nežymėtasis E2 S			1,00E-7	40	0	40	80	160	

3 priedėlis

CHEMINIŲ MEDŽIAGŲ ĮVERTINIMO IR TYRIMŲ INSTITUTO (CERI) *IN VITRO* ESTROGENŲ RECEPTORIAUS (ER) PRIJUNGIMO BANDYMAS, NAUDOJANT ŽMOGAUS REKOMBINANTINĮ ERA LIGANDŲ PRIJUNGIMO DOMENO BALTYMĄ

PRADINIAI ASPEKTAI IR APRIBOJIMAI (TAIP PAT ŽR. *BENDRASIS ĮVADAS*)

1. Atliekant šį *in vitro* estrogenų receptoriaus (ER α) prisotinimo ir konkurencinio prijungimo bandymą naudojamas žmogaus ER α (hrER α) ligandų prijungimo domenas (LBD). Šis baltymų darinys buvo pagamintas Japonijos cheminių medžiagų įvertinimo ir tyrimų institute (CERI) ir yra kaip *E. coli* ekspresuotas glutationo-S-transferazės (GST) susiliejo baltymas. Buvo atliktas CERI protokolo tarplaboratorinis patvirtinimo tyrimas (2), kuris įrodė protokolo tinkamumą ir patikimumą atsižvelgiant į numatytą bandymo tikslą.
2. Šis bandymas yra atrankos procedūra, skirta identifikuoti medžiagas, kurios gali prisijungti prie hrER α . Jis naudojamas nustatant bandomosios cheminės medžiagos gebėjimą konkuruoti su 17 β -estradioliu dėl prisijungimo prie hrER α -LBD. Kiekybinius bandymo duomenis gali sudaryti IC₅₀ (bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos, kuriai esant pavaiduojama pusė prie hrER α prijungto [³H]-17 β -estradiolio, matas) ir bandomųjų cheminių medžiagų santykinis prijungimo prie hrER α giminingumas palyginti su 17 β -estradioliu. Cheminių medžiagų atrankos tikslais priimtinus kokybinius bandymo rezultatus gali sudaryti bandomųjų cheminių medžiagų klasifikavimas kaip prie hrER α jungiamų, nejungiamų arba abejotinų medžiagų pagal prijungimo kreivėms aprašytus kriterijus.
3. Atliekant bandymą naudojamas radioaktyvusis ligandas, todėl laboratorijai reikia gauti darbo su radioaktyviosiomis medžiagomis licenciją. Visos procedūros su radioaktyviaisiais izotopais ir pavojingosiomis cheminėmis medžiagomis turėtų atitikti reglamentus ir procedūras, aprašytas nacionaliniuose teisės aktuose.
4. Prieš naudojant šį bandymą reglamentavimo tikslais, reikėtų perskaityti ***BENDRASIS ĮVADAS*** ir ***PRIJUNGIMO PRIE hrER BANDYMO KOMPONENTAI***. Šiose bandymo gairėse vartojamos apibrėžtys ir santrumpos pateiktos 1 priedėlyje.

BANDYMO PRINCIPAI (TAIP PAT ŽR. *BENDRASIS ĮVADAS*)

5. Atliekant prijungimo prie hrER α bandymą, matuojama radioaktyviuoju izotopu žymėto ligando ([³H]17 β -estradiolio) gebėjimas prisijungti prie ER, didėjant bandomosios cheminės medžiagos (t. y. konkurento) koncentracijai. Didelį giminingumą ER turinčios bandomosios cheminės medžiagos konkuruoja su radioaktyviuoju izotopu žymėtu ligandu esant mažesnei koncentracijai palyginti su tomis cheminėmis medžiagomis, kurių giminingumas receptoriui yra mažesnis.
6. Šį bandymą sudaro du pagrindiniai komponentai: sotinamojo prijungimo bandymo, skirto apibūdinti receptoriaus ir ligando sąveikos parametrus, ir konkurencinio prijungimo

bandymo, kuris apibūdina bandomosios cheminės medžiagos ir radioaktyviuoju izotopu žymėto ligando konkurencija dėl prijungimo prie ER.

7. Sotinamojo prijungimo bandymo tikslas – apibūdinti prijungimo prie tam tikros receptorių grupės giminingumą ir jų skaičių, ruošiant konkurencinio prijungimo bandymą. Atliekant sotinamojo prijungimo bandymą pusiausvyros sąlygomis, nustatomas pastovios koncentracijos estrogeno receptoriaus giminingumas jo natūraliam ligandui (rodo disociacijos konstanta, K_d) ir aktyviųjų receptorių vietų koncentracija (B_{max}).
8. Atliekant konkurencinio prijungimo bandymą matuojamas medžiagos giminingumas konkuruoti su [^3H]17 β -estradioliu dėl prijungimo prie ER. Giminingumas kiekybiškai įvertinamas kaip bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuri esant pusiausvyrai slopina 50 % [^3H]17 β -estradiolio specifinio prijungimo (vadinama „50 % slopinamąja koncentracija“ arba IC_{50}). Ji taip pat galima įvertinti naudojant santykinį prijungimo giminingumą (RBA, atžvilgiu estradiolio IC_{50} , išmatuotos atskirai atliekant tą patį atskirą bandymą). Atliekant konkurencinio prijungimo bandymą matuojamas pastovios koncentracijos [^3H]17 β -estradiolio prijungimas, esant dideliame bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos intervalui (aštuonios dydžio eilės). Tada duomenys priderinami, jei įmanoma, Hillo lygčiai gauti (Hill, 1910 m.), kuri aprašo žymėtojo ligando pavadavimą konkurencine vietoje vietoje jungiama medžiaga. Radioaktyviuoju izotopu žymėto estradiolio pavadavimo esant pusiausvyrai laipsnis naudojamas bandomajai cheminei medžiagai apibūdinti kaip jungiamai, nejungiamai arba duodančiai abejotiną atsaką.

PROCEDŪRA

Priimtinių hrER α baltymo veikimo charakteristikų įrodymas

9. Prieš pradėdant atlikti įprastinius sotinamojo ir konkurencinio prijungimo bandymus, reikėtų įrodyti, kad kiekvienos naujai gautos hrER α partijos savybės atitinka laboratorijos, kurioje ji bus naudojama, reikalavimus. Turėtų būti atliekamas dviejų veiksmų procesas tinkamumo charakteristikoms įrodyti. Tai būtų tokie veiksmai:
 - Atliekamas [^3H]-17 β -estradiolio sotinamojo prijungimo bandymas, kad būtų įrodytas hrER α specifiškumas ir prisotinimas. Šių duomenų netiesinės regresijos analizė (pvz., BioSoft; McPherson, 1985 m.; Motulsky, 1995 m.) ir vėliau gautas Scatchardo grafikas turėtų dokumentais patvirtinti konkrečios hrER α partijos [^3H]-17 β -estradiolio prijungimo prie hrER α giminingumą (K_d) ir receptorių skaičių (B_{max}).
 - Atliekamas konkurencinio prijungimo bandymas, naudojant kontrolines medžiagas (etaloninį estrogeną (17 β -estradiolį), silpnai jungiamą medžiagą (pvz., noretinodrelį arba noretindroną) ir nejungiamą medžiagą (oktiltrietoksisilaną, OTES). Kiekviena laboratorija turėtų sukurti istorinių duomenų bazę, kad būtų galima dokumentuoti etaloninio estrogeno ir silpnai jungiamos medžiagos IC_{50} ir kitų reikiamų verčių pastovumą tarp bandymų ir naudojant skirtingas hrER α partijas. Be to, kontrolinių medžiagų konkurencinio prijungimo kreivių parametrai turėtų atitikti 95 % pasiklivimo intervalo ribas (žr. 1 lentelę), kurios

buvo gautos naudojant šio bandymo patvirtinimo tyrime dalyvavusių laboratorijų duomenis (2).

1 lentelė. Etaloniniam estrogenui ir silpnai jungiamai medžiagai sukurti veiksmingumo kriterijai, atliekant CERi prijungimo prie hrER bandymą

Medžiaga	Parametras	Vidurkis ^a	Standartinis nuokrypis (n)	95 % pasiklivimo intervalai ^b	
				Apatinė riba	Viršutinė riba
17β-estradiolis	Viršus	104,74	13,12 (70)	101,6	107,9
	Apačia	0,85	2,41 (70)	0,28	1,43
	Hillo krypties koeficientas	-1,22	0,20 (70)	-1,27	-1,17
	LogIC ₅₀	-8,93	0,23 (70)	-8,98	-8,87
Noretinodrelis	Viršus	101,31	10,55 (68)	98,76	103,90
	Apačia	2,39	5,01 (68)	1,18	3,60
	Hillo krypties koeficientas	-1,04	0,21 (68)	-1,09	-0,99
	LogIC ₅₀	-6,19	0,40 (68)	-6,29	-6,10
Noretindronas^c	Viršus	92,27	7,79 (23)	88,90	95,63
	Apačia	16,52	10,59 (23)	11,94	21,10
	Hillo krypties koeficientas	-1,18	0,32 (23)	-1,31	-1,04
	LogIC ₅₀	-6,01	0,54 (23)	-6,25	-5,78

^a Vidurkis ± standartinis nuokrypis (SN), kai imties dydis (n), buvo apskaičiuoti naudojant kreivės priderinimo parametrų įverčius (4 parametrų Hillo lygties), patvirtinimo tyrimo metu gautus keturiuose laboratorijose atliekant kontrolinių ėminių atskirus bandymus (žr. 2 nuorodos N priedą).

^b 95 % pasiklivimo intervalai yra pateikti kaip priimtumo kriterijų rodiklis.

^c Noretindrono bandymas buvo neprivalomas kaip 4 papildomos užduoties bandymas atliekant patvirtinimo tyrimą (žr. 2 nuorodą, žr. 4 papildomą užduotį). Taigi, vidurkis ± SN (n) buvo apskaičiuojami naudojant kreivės priderinimo įverčius (4 parametrų Hillo lygties), dviejose laboratorijose atliekant kontrolinių ėminių atskirus bandymus.

IC₅₀ intervalas priklausys nuo receptoriaus kompozicijos K_d ir nuo kiekvienoje laboratorijoje naudojamo radioaktyviojo izotopu žymėto ligando koncentracijos. Būtų priimtinas atitinkamas IC₅₀ intervalo koregavimas, atsižvelgiant į bandymui atlikti naudojamas sąlygas.

Laboratorijos kvalifikacijos įrodymas

- Žr. šio bandymo metodo **PRIJUNGIMO PRIE hrER BANDYMO KOMPONENTAI** 17 ir 18 pastraipas bei 2 lentelę. Kiekvieną bandymą (sotinamojo ir konkurencinio prijungimo) turėtų sudaryti trys skirtingomis dienomis atliekami atskiri bandymai (t. y. su iš naujo atskiestais receptoriaus, cheminių medžiagų ir reagentų tirpalais), ir kiekvienas atskiras bandymas būtų trijų kartotinių ėminių bandymas.

Receptoriaus (hrERα) koncentracijos nustatymas

- Aktyviojo receptoriaus koncentracija kažkiek skiriasi priklausomai nuo partijos ir laikymo sąlygų. Dėl šios priežasties reikėtų nustatyti iš tiekėjo gauto aktyviojo receptoriaus koncentraciją. Taip būtų gauta atitinkama aktyviojo receptoriaus koncentracija atskiro bandymo atlikimo metu.
- Nominaliosios 0,1, 0,2, 0,4 ir 0,6 nmol/l koncentracijos receptorius turėtų būti inkubuojamas konkurencinį prijungimą atitinkančiomis sąlygomis (t. y. 0,5 nmol/l [³H]-

estradiolio), nesant 1 $\mu\text{mol/l}$ nežymėtojo estradiolio (bendrasis prijungimas) ir jam esant (nespecifinis prijungimas). Braižoma specifinio prijungimo, apskaičiuojamo kaip bendrojo ir nespecifinio prijungimo skirtumas, priklausomybės nuo nominaliosios receptoriaus koncentracijos kreivė. Receptoriaus koncentracija, kuriai gaunamos specifinio prijungimo vertės, atitinkančios 40 % pridėto radioaktyviojo žymeklio, susiejama su atitinkama receptoriaus koncentracija, ir ši receptoriaus koncentracija turėtų būti naudojama atliekant sotinamojo ir konkurencinio prijungimo bandymus. Galutinė 0,2 nmol/l hrER koncentracija dažnai atitiktų šią sąlygą.

13. Jei 40 % kriterijų negalima įvykdyti kelis kartus, reikėtų patikrinti bandymo schemą dėl galimų klaidų. Negebėjimas atitikti 40 % kriterijų gali rodyti, kad rekombinanto partijoje yra labai mažai aktyviojo receptoriaus, reikėtų spręsti klausimą dėl kitos receptoriaus partijos naudojimo.

Sotinamojo prijungimo bandymas

14. Reikėtų įvertinti tris kartotinius aštuonių didėjančių [^3H]-17 β -estradiolio koncentracijos verčių ėminius esant tokioms trimis sąlygoms (žr. 2 lentelę):
 - a. Nesant nežymėtojo 17 β -estradiolio ir nesant ER. Taip nustatomas bendrasis prijungimas, matuojant radioaktyvumą šulinėliuose, kuriuose yra tik [^3H]-17 β -estradiolis.
 - b. Esant 2000 kartų didesnei nežymėtojo 17 β -estradiolio koncentracijai palyginti su žymėtojo 17 β -estradiolio koncentracija ir esant ER. Šios sąlygos tikslas – prisotinti aktyviasias prijungimo vietas nežymėtoju 17 β -estradioliu ir matuojant radioaktyvumą šulinėliuose nustatyti nespecifinį prijungimą. Laikoma, kad visas likęs žymėtasis estradiolis, kuris galėtų jungtis prie receptoriaus, jungiasi prie nespecifinės vietos, nes nežymėtojo estradiolio koncentracija turėtų būti tokia didelė, kad jis prisijungtų prie visų esamų specifinių receptoriaus vietų.
 - c. Nesant nežymėtojo 17 β -estradiolio ir nesant ER (bendrojo radioaktyvumo nustatymas).

[^3H]-17 β -estradiolio, nežymėtojo 17 β -estradiolio tirpalų ir hrERa ruošimas

15. 40 nmol/l [^3H]-17 β -estradiolio tirpalą reikėtų ruošti iš 1 $\mu\text{mol/l}$ [^3H]-17 β -estradiolio tirpalo DMSO, įpilant DMSO (kad būtų gauta 200 nmol/l) ir bandymo buferinio tirpalo kambario temperatūroje (kad būtų gauta 40 nmol/l). Iš 40 nmol/l tirpalo ruošiami vienodu santykiu atskiesti [^3H]-17 β -estradiolio tirpalai nuo 0,313 nmol/l iki 40 nmol/l, įpilant bandymo buferinio tirpalo kambario temperatūroje (kaip parodyta 2 lentelės 12 eilutėje). Įpilant 10 μl šių tirpalų į atitinkamus 96 šulinėlių mikrotitravimo plokštelės bandymo šulinėlius, gaunamos galutinės bandymo koncentracijos nuo 0,0313 nmol/l iki 4,0 nmol/l (žr. 2 ir 3 lenteles). Bandymo buferio ruošimas, [^3H]-17 β -estradiolio pradinio tirpalo koncentracijos skaičiavimas, atsižvelgiant į jo savitąjį aktyvumą, atskiestų tirpalų ruošimas ir koncentracijos nustatymas yra nuodugniai aprašytas CERI protokole (2).

16. Nežymėtojo 17β -estradiolio atskiesti tirpalai turėtų būti ruošiami į pradinį 1 nmol/l 17β -estradiolio tirpalą įpilant bandymo buferinio tirpalo, kad būtų gauti aštuoni didėjančios pradinės koncentracijos nuo 0,625 μ mol/l iki 80 μ mol/l tirpalai. Įpilant 10 μ l šių tirpalų į nespecifiniam prijungimui matuoti skirtos 96 šulinėlių mikrotitravimo plokštelės atitinkamus bandymo šulinėlius, gaunamos galutinės bandymo koncentracijos nuo 0,0625 μ mol/l iki 8,0 μ mol/l (žr. 2 ir 3 lenteles). Nežymėtojo 17β -estradiolio atskiestų tirpalų ruošimas nuodugniai aprašytas CERI protokole (2).
17. Reikėtų naudoti tokią receptoriaus koncentraciją, kuriai gaunamas 40 ± 10 % specifinis prijungimas (žr. 12–13 pastraipas). hrER α tirpalas turėtų būti ruošiamas prieš pat naudojimą skiedžiant ledinės temperatūros buferiniu tirpalu, t. y. po to, kai yra paruošti visi bendrojo prijungimo, nespecifinio prijungimo ir vien tik žymėtojo ligando šulinėliai.
18. 96 šulinėlių mikrotitravimo plokštelės ruošiamos kaip parodyta 2 lentelėje, imant 3 kartotinius vienos [^{3} H]- 17β -estradiolio koncentracijos ėminių. [^{3} H]- 17β -estradiolio, nežymėtojo 17β -estradiolio, buferinio tirpalo ir receptoriaus tūrio priskyrimas pateiktas 3 lentelėje.

2 lentelė. Sotinamojo prijungimo bandymo mikrotitravimo plokštelės schema

	1*	2*	3*	4*	5*	6*	7*	8*	9*	10	11**	12**
	TB matavimas			NSB matavimas			Vien tik žymėtajam ligandui nustatyti				Plokštelės 4–6 stulpelio nežymėtojo E2 atskiesti	Plokštelės 1–9 stulpelio [^{3} H] E2 atskiesti tirpalai
A	0,0313 nmol/l [^{3} H] E ₂ + ER			0,0313 nmol/l [^{3} H] E2 + 0,0625 μ mol/l E2 + ER			0,0313 nmol/l				0,625 μ mol/l	0,313 nmol/l
B	0,0625 nmol/l [^{3} H] E ₂ + ER			0,0625 nmol/l [^{3} H] E2 + 0,125 μ mol/l E2 + ER			0,0625 nmol/l				1,25 μ mol/l	0,625 nmol/l
C	30,125 nmol/l [^{3} H] E ₂ + ER			0,125 nmol/l [^{3} H] E2 + 0,25 μ mol/l E2 + ER			0,125 nmol/l				2,5 μ mol/l	1,25 nmol/l
D	0,250 nmol/l [^{3} H] E ₂ + ER			0,250 nmol/l [^{3} H] E2 + 0,5 μ mol/l E2 + ER			0,250 nmol/l				5 μ mol/l	2,5 nmol/l
E	0,50 nmol/l [^{3} H] E ₂ + ER			0,50 nmol/l [^{3} H] E2 + 1 μ mol/l E2 + ER			0,50 nmol/l				10 μ mol/l	5 nmol/l
F	1,00 nmol/l [^{3} H] E ₂ + ER			1,00 nmol/l [^{3} H] E2 + 2 μ mol/l E2 + ER			1,00 nmol/l				20 μ mol/l	10 nmol/l
G	2,00 nmol/l [^{3} H] E ₂ + ER			2,00 nmol/l [^{3} H] E2 + 4 μ mol/l E2 + ER			2,00 nmol/l				40 μ mol/l	20 nmol/l

H	4,00 nmol/l [³ H] E ₂ + ER	4,00 nmol/l [³ H] E ₂ + 8 μmol/l E ₂ + ER	4,00 nmol/l		80 μmol/l	40 nmol/l

TB – bendrasis prijungimas;

NSS – nespecifinis prijungimas;

[³H]E₂ – [³H]-17β-estradiolis;

E₂ – nežymėtasis 17β-estradiolis;

*Čia nurodytos koncentracijos yra galutinės koncentracijos kiekviename šulinėlyje.

**Nežymėtojo E₂ ir [³H] E₂ tirpalai gali būti ruošiami skirtingoje plokštelėje.

3 lentelė. Sotinamojo bandymo mikrotitravimo plokštelės reagentų tūriai

Eilutės numeris		1	2	3	4	5	6	7*	8*	9*
Ruošimo veiksmas		TB šulinėliai			NSB šulinėliai			Vien tik žymėtasis		
Pirmiau nurodytų reakcijos šulinėlių komponentų tūris ir įpylimo tvarka	Buferinis tirpalas	60 µl			50 µl			90 µl		
	nežymėtasis E2 iš 2 lentelės 11 eilutės	-			10 µl			-		
	[³ H]E2 iš 2 lentelės 12 eilutės	10 µl			10 µl			10 µl		
	hrERα	30 µl			30 µl			-		
Bendrasis reakcijos tūris		100 µl			100 µl			100 µl		
Inkubavimas		PO 2 VALANDŲ INKUBAVIMO REAKCIJOS						Radioaktyvumo kiekybinis nustatytas iškart po paruošimo. Be inkubavimo		
Apdorojimas 0,4 % DCC		Taip			Taip			Ne		
0,4 % DCC tūris		100 µl			100 µl			-		
Filtravimas		Taip			Taip			Ne		
DPM MATAVIMAS										
Kiekybinio nustatymo tūris, įpiltas į scintiliacijų mišinį		100 µl**			100 µl**			50 µl		

* Jei mikroplokštelių dpm matuoti naudojamas scintiliacijų skystyje skaičiavimas (LSC), vien tik žymėtojo ligando ruošimas vienoje plokštelėje su TB ir NSB šulinėliais netinka. Vien tik žymėtasis ligandas turėtų būti ruošiamas atskiroje plokštelėje.

** Jei DCC atskiriamas centrifugavimu, 50 μl skysčio virš nuosėdų reikėtų matuoti taikant LSC, kad būtų išvengta DCC užteršimo.

19. Bendrajam prijungimui ir nespecifiniam prijungimui nustatyti naudojamos bandymo mikrotitravimo plokštelės turėtų būti dviem valandoms inkubuojamos kambario temperatūroje (nuo 22 °C iki 28 °C).

Prie hrERα prijungto [³H]-17β-estradiolio matavimas

20. Prie hrERα prijungtą [³H]-17β-estradiolį po dvejų valandų inkubavimo laikotarpio reikėtų atskirti nuo laisvojo [³H]-17β-estradiolio, į šulinėlius įpilant 100 μl ledinės 0,4 % DCC

suspensijos. Toliau plokšteles reikėtų dėti 10 min ant ledo ir reakcijos mišinys su DCC suspensiją turėtų būti filtruojamas, pernešant į mikrotitravimo plokštelės filtrą, kad būtų pašalintas DCC. Tada į scintiliacijų skystį LSC buteliukuose reikėtų įpilti 100 µl filtrato, kad būtų nustatytas skilimų skaičius per minutę (dpm) vienam buteliukui, atliekant scintiliacijų skystyje skaičiavimą.

21. Arba, jei mikrotitravimo plokštelės filtro nėra, DCC galima pašalinti centrifugavimu. Tada ypač atsargiai reikėtų paimti 50 µl skysčio virš nuosėdų, kuriame yra prie hrERα prijungtas [³H]-17β-estradiolis, kad būtų išvengta šulinėlių užteršimo dėl DCC patekimo, ir jį naudoti scintiliacijų skaičiavimui.
22. Nustatant į bandymo šulinėlius įpildo [³H]-17β-estradiolio skilimų skaičių per minutę (dpm), reikėtų, kad būtų vien tik žymėtasis ligandas. Kiekybinis radioaktyvumo nustatymas turėtų būti atliekamas iš karto po paruošimo. Šie šulinėliai neturėtų būti inkubuojami ir turėtų būti apdoroti DCC suspensija, bet jų turinį reikėtų įpilti tiesiai į scintiliacijų skystį. Šie matavimai rodo, kiek dpm vienetais išreikšto [³H]-17β-estradiolio buvo įdėta į kiekvieną bendrojo prijungimo ir nespecifinio prijungimo šulinėlių rinkinį.

Konkurencinio prijungimo bandymas

23. Atliekant konkurencinio prijungimo bandymą matuojamas vienos koncentracijos [³H]-17β-estradiolio prijungimas, esant vis didesnei bandomosios cheminės medžiagos koncentracijai. Atliekant atskirą bandymą, turėtų būti po tris vienalaikius vienos koncentracijos ėminius. Be to, turėtų būti atliekami trys nevienalaikiai kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos atskiri bandymai. Bandymas turėtų būti ruošiamas vienoje 96 šulinėlių mikrotitravimo plokštelėje arba jų gali būti daugiau.

Kontroliniai ėminiai

24. Atliekant bandymą, į kiekvieną jų reikėtų įtraukti vienalaikius tirpiklio ir kontrolinius ėminius (t. y. etaloninio etalono, silpnai jungiamos medžiagos ir nejungiamos medžiagos). Etaloninio estrogeno ir kontrolinių ėminių (t. y. silpnai jungiamos medžiagos ir nejungiamos medžiagos) visų koncentracijos verčių kreivės turėtų būti naudojamos vienoje plokštelėje atliekant kiekvieną atskirą bandymą. Visose kitose plokštelėse turėtų būti i) po tris didžiausios (didžiausio pavidavimo, t. y. maždaug visiško radioaktyviuoju izotopu žymėto ligando pavidavimo) ir vidutinės (t. y. maždaug IC₅₀) koncentracijos E2 ir silpnai jungiamos medžiagos kartotinius ėminius; ii) po tris kartotinius tirpiklio kontrolinio ir nespecifinio prijungimo ėminius. Bandymo buferinio tirpalų, [³H]-17β-estradiolio, hrERα ir bandomųjų cheminių medžiagų tirpalų ruošimo procedūros nuodugniai aprašytos CERi protokole.

Tirpiklio kontrolinis ėminys:

25. Tirpiklio kontrolinis ėminys rodo, kad nėra tirpiklio sąveikos su bandymo sistema, ir taip pat matuojamas bendrasis prijungimas (TB). Tinkamiausias tirpiklis yra DMSO. Arba galima naudoti etanolį, jei didžiausios koncentracijos bandomoji cheminė medžiaga netirpsta DMSO. DMSO koncentracija galutinio bandymo šulinėliuose turėtų būti 2,05 % ir

ją būtų galima padidinti iki 2,5 %, jei bandomosios medžiagos tirpumas yra per mažas. Didesnės kaip 2,5 % koncentracijos DMSO neturėtų būti naudojamas dėl didesnės koncentracijos trukdžių atliekant bandymą. Jei bandomosios cheminės medžiagos netirpsta DMSO, bet tirpsta etanolyje, galima naudoti ne didesnės kaip 2 % koncentracijos etanolį, kad atliekant bandymą būtų išvengta trukdžių.

Buferinio tirpalo kontrolinis ėminys:

26. Buferinio tirpalo kontroliniame ėminyje (BK) neturėtų būti tirpiklio ar bandomosios cheminės medžiagos, bet turėtų būti visi kiti bandymo komponentai. Buferinio tirpalo kontrolinio ėminio rezultatai lyginami su tirpiklio kontrolinio ėminio rezultatais, kad būtų galima patikrinti, ar naudojamas tirpiklis nedaro įtakos bandymo sistemai.

Stipriai jungiama medžiaga (etaloninis estrogenas)

27. 17β -estradiolis (CAS 50-28-2) yra endogeninis ligandas, kurio prijungimo prie alfa potipio ER giminingumas yra didelis. Turėtų būti gauta kiekvieno konkurencinio prijungimo prie hrER α bandymo standartinė kreivė, naudojant nežymėtąjį 17β -estradiolį, kad būtų galima vertinti kintamumą, kai bandymas ilgą laiką atliekamas toje pačioje laboratorijoje. Reikėtų paruošti aštuonis nežymėtojo 17β -estradiolio tirpalus DMSO ir bandymo buferiniame tirpale, kai standartiniai kreivei gauti naudojamos galutinės koncentracijos bandymo šulinėliuose turėtų skirtis taip: 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , $10^{-8,5}$, 10^{-9} , $10^{-9,5}$, 10^{-10} , 10^{-11} mol/l. Didžiausios koncentracijos nežymėtasis 17β -estradiolis (1 μ mol/l) taip pat turėtų būti naudojamas kaip nespecifinio prijungimo indikatorius. Ši koncentracija 4 lentelėje pažymėta kaip nespecifinis prijungimas (NSB), nors ji taip pat yra standartinės kreivės dalis.

Silpnai jungiama medžiaga

28. Reikėtų įtraukti silpnai jungiamą medžiagą (noretinodrelį (CAS 68-23-5) arba noretindroną (CAS 68-22-4)), kad būtų įrodytas kiekvieno bandymo jautris ir kad būtų galima įvertinti kintamumą, kai bandymas atliekamas ilgą laiką. Reikėtų paruošti aštuonis silpnai jungiamos medžiagos tirpalus DMSO ir bandymo buferiniame tirpale, kai galutinės koncentracijos bandymo šulinėliuose turėtų būti tokios: $10^{-4,5}$, $10^{-5,5}$, 10^{-6} , $10^{-6,5}$, 10^{-7} , $10^{-7,5}$, 10^{-8} ir 10^{-9} mol/l.

Nejungiama medžiaga

29. Kaip neigiama kontrolinė medžiaga (nejungiama medžiaga) turėtų būti naudojamas oktiltrietoksisilanas (OTES, CAS 2943-75-1). Taip užsitikrinama, kad atliekant bandymą bus nustatytos bandomosios cheminės medžiagos, kurios nesijungia prie hrER α . Reikėtų paruošti aštuonis nejungiamos medžiagos tirpalus DMSO ir bandymo buferiniame tirpale, kai galutinės koncentracijos bandymo šulinėliuose turėtų būti tokios: 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} ir 10^{-10} mol/l. Kaip alternatyvioji nejungiama medžiaga gali būti naudojamas dibutilftalatas (DBP, CAS 84-72-2), bet jį galima bandyti tik ne didesnės kaip 10^{-4} mol/l koncentracijos. Įrodyta, kad didžiausias DBP tirpumas bandymo sąlygomis yra 10^{-4} mol/l.

hrER α koncentracija

30. Reikėtų naudoti tokį receptoriaus kiekį, kuriam gaunamas 40 ± 10 % specifinis prijungimas (žr. 3 priedėlio 12–13 pastraipas). hrER α tirpalą reikėtų ruošti prieš pat naudojimą, skiedžiant aktyvųjį hrER α lediniu bandymo buferiniu tirpalu.

[³H]-17 β -estradiolis

31. Galutinė [³H]-17 β -estradiolio koncentracija bandymo šulinėliuose turėtų būti 0,5 nmol/l.

Bandomosios cheminės medžiagos

32. Iš pradžių būtina atlikti tirpumo bandymą, kad būtų nustatyta kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos tirpumo riba ir identifikuotas reikiamas koncentracijos intervalas, kuris būtų naudojamas pagal bandymo protokolą. Iš pradžių turi būti nustatyta kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos tirpumo tirpiklyje riba ir vėliau patvirtinama bandymo sąlygomis. Didžiausia bandoma koncentracija neturėtų būti didesnė kaip 1 mmol/l. Intervalo nustatymo bandymą sudaro tirpiklio kontrolinio ėminio ir ne mažiau kaip 8 pagal logaritminę eilutę atskiestų tirpalų bandymas, pradedant didžiausiąja leidžiama koncentracija (pvz., 1 mmol/l ar mažesne, atsižvelgiant į tirpumo ribą) ir esant drumstumui ar nuosėdoms (taip pat žr. 3 priedėlio 35 pastraipą). Nustačius bandymo koncentracijos verčių intervalą, bandomoji cheminė medžiaga turėtų būti bandoma naudojant pagal logaritminį mastelį išdėstytas 8 koncentracijos vertes, kaip nurodyta prieš tai aprašytame intervalo nustatymo bandyme. Antrojo ir trečiojo bandymo koncentracijos turėtų būti toliau atitinkamai koreguojamos, jei būtina, kad būtų galima geriau apibūdinti atsako priklausomybės nuo koncentracijos kreivę.
33. Atskiesti bandomosios cheminės medžiagos tirpalai turėtų būti ruošiami atitinkamame tirpiklyje (žr. 3 priedėlio 25 pastraipą). Jei didžiausios koncentracijos bandomoji cheminė medžiaga neištirpsta etanolyje ar DMSO, ir įpilant daugiau tirpiklio jo koncentracija galutinio tirpalo mėgintuvėlyje viršytų leidžiama ribą, didžiausią koncentraciją galima sumažinti iki gretimos mažesnės koncentracijos. Šiuo atveju galima įtraukti dar vieną mažiausią koncentracijos verčių serijos koncentraciją. Kitos serijos koncentracijos turėtų likti tos pačios.
34. Į bandymo šulinėlį pilami bandomosios cheminės medžiagos tirpalai turėtų būti atidžiai stebimi, nes bandomoji cheminė medžiaga gali iškristi į nuosėdas ją pilant į šulinėlį. Visų šulinėlių, kuriuose yra nuosėdų, duomenys neturėtų būti įtraukiami į kreivės priderinimą, ir reikėtų nurodyti jų pašalinimo priežastį.
35. Jei yra kitų šaltinių ankstesnė informacija apie bandomosios cheminės medžiagos log(IC₅₀), galbūt tiktų atskiestų tirpalų koncentraciją išdėstyti glaudžiau pagal geometrinę progresiją į abi puses nuo numanomos log(IC₅₀) (t. y. kas 0,5 log vieneto). Galutinis rezultatas turėtų rodyti gana pakankamą koncentracijų aprėptį į abi puses nuo log(IC₅₀), įskaitant „viršų“ ir „apačią“, kad būtų galima tinkamai apibūdinti prijungimo kreivę.

Išdėstymo bandymo plokštelėje schema

36. Žymėtųjų medžiagų mikrotitravimo plokštelės turėtų būti ruošiamos, inkubuojant po šešis kartotinius koduotus tirpiklio kontrolinius ėminius, didžiausios koncentracijos etaloninio estrogeno (E2), kuris taip pat yra nespecifinio prijungimo (NSB) indikatorius, ėminius, buferinio tirpalo kontrolinius ėminius, aštuonių koncentracijų nejungiamos kontrolinės medžiagos (oktikrietoksisilano) ėminius, septynis mažesnės koncentracijos etaloninio estrogeno (E2) ėminius, aštuonių koncentracijų silpnai jungiamos medžiagos (noretinodrelio arba noretindrono) ėminius ir aštuonis kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos ėminius (TC). Etaloninio estrogeno ir kontrolinių ėminių visų koncentracijos verčių kreivių plokštelės išdėstymo schemos pavyzdys pateiktas toliau 4 lentelėje. Naudojamos papildomos bandomosios cheminės medžiagos plokštelės ir į jas reikėtų įtraukti plokštelės kontrolinius ėminius, (t. y. i) po tris didžiausios (didžiausio pavaidavimo) ir vidutinės (t. y. maždaug IC_{50}) koncentracijos E2 ir silpnai jungiamos medžiagos kartotinius ėminius; ii) po šešis tirpiklio kontrolinio (kaip bendrojo prijungimo) ir nespecifinio prijungimo ėminius (5 lentelė)). Konkurencinio prijungimo bandymo mikrotitravimo plokštelių išdėstymo schemos pavyzdys, naudojant tris nežinomas bandomąsias chemines medžiagas, pateikiamas 3.3 priedėlyje. Schemoje bei 4 ir 5 lentelėse nurodytos koncentracijos yra galutinės koncentracijos, naudojamos kiekviename bandymo šulinėlyje. Didžiausioji E2 koncentracija turėtų būti 1×10^{-7} mol/l, ir, kalbant apie silpnai jungiamą medžiagą, turėtų būti naudojama silpnai jungiamos medžiagos 1 plokštelės koncentracija. Laboratorija turėtų nustatyti IC_{50} koncentraciją, pagrįsta istorinių kontrolinių ėminių duomenų baze. Tikimasi, kad ši vertė turėtų būti panaši į stebimą atliekant patvirtinimo tyrimus (žr. 1 lentelę).

4 lentelė. Konkurencinio prijungimo bandymo mikrotitravimo plokštelės schema^{1,2}, etaloninio estrogeno ir kontrolinių ėminių visų koncentracijos verčių kreivės (1 plokštelė)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Buferinio tirpalo ir teigiamos medžiagos kontroliniai ėminiai (E2)			Silpnai jungiama teigiama medžiaga (noretinodrelis)			Neigiamos medžiagos kontrolinis ėminys (OTES)			TB ir NSB		
A	Tuščiasis ėminys*			1 × 10 ⁻⁹ mol/l			1 × 10 ⁻¹⁰ mol/l			TB (tirpiklio kontrolinis ėminys) (2,05 % DMSO)		
B	E2 (1×10 ⁻¹¹ mol/l)			1 × 10 ⁻⁸ mol/l			1 × 10 ⁻⁹ mol/l					
C	E2 (1 × 10 ⁻¹⁰ mol/l)			1 × 10 ^{-7,5} mol/l			1 × 10 ⁻⁸ mol/l			NSB (10 ⁻⁶ mol/l E2)		
D	E2 (1 × 10 ^{-9,5} mol/l)			1 × 10 ⁻⁷ mol/l			1 × 10 ⁻⁷ mol/l					
E	E2 (1 × 10 ⁻⁹ mol/l)			1 × 10 ^{-6,5} mol/l			1 × 10 ⁻⁶ mol/l			Buferinio tirpalo kontrolinis ėminys		
F	E2 (1 × 10 ^{-8,5} mol/l)			1 × 10 ⁻⁶ mol/l			1 × 10 ⁻⁵ mol/l					

G	E2 (1×10^{-8} mol/l)	$1 \times 10^{-5.5}$ mol/l	1×10^{-4} mol/l	Tuščiasis ėminys (žymėtojo ėminio)**
H	E2 (1×10^{-7} mol/l)	$1 \times 10^{-4.5}$ mol/l	1×10^{-3} mol/l	

¹ Atliekant kiekvieną bandymą naudojamų etaloninių medžiagų mikrotitravimo plokštelės pavyzdinė schema.

² Atkreipiamas dėmesys į tai, kad ši mikrotitravimo plokštelė ruošama naudojant ankstesniuose skirsniuose aprašytus etaloninių medžiagų atskiestus tirpalus.

Šiame pavyzdyje silpnai jungiama medžiaga yra noretinodrelis (NE).

* Tikrasis tuščiasis ėminys, šulinėlis nenaudojamas.

**Tuščiasis ėminys, kuris nenaudojamas inkubavimo metu, bet naudojamas bendrajam pridėtam radioaktyvumui nustatyti.

5 lentelė. Konkurencinio prijungimo bandymo mikrotitravimo plokštelės schema, papildomos bandomųjų cheminių medžiagų (TC) ir plokštelės kontroliniai ėminiai

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Bandomoji cheminė medžiaga 1 (TC-1)			Bandomoji cheminė medžiaga 2 (TC-2)			Bandomoji cheminė medžiaga 3 (TC-3)			Kontroliniai ėminiai		
<i>A</i>	TC-1 (1×10^{-10} mol/l)			TC-2 (1×10^{-10} mol/l)			TC-3 (1×10^{-10} mol/l)			E2 (1×10^{-7} mol/l)		
<i>B</i>	TC-1 (1×10^{-9} mol/l)			TC-2 (1×10^{-9} mol/l)			TC-3 (1×10^{-9} mol/l)			E ₂ (IC ₅₀)		
<i>C</i>	TC-1 (1×10^{-8} mol/l)			TC-2 (1×10^{-8} mol/l)			TC-3 (1×10^{-8} mol/l)			NE ($1 \times 10^{-4.5}$ mol/l)		
<i>D</i>	TC-1 (1×10^{-7} mol/l)			TC-2 (1×10^{-7} mol/l)			TC-3 (1×10^{-7} mol/l)			NE (IC ₅₀)		
<i>E</i>	TC-1 (1×10^{-6} mol/l)			TC-2 (1×10^{-6} mol/l)			TC-3 (1×10^{-6} mol/l)			NSB (10^{-6} mol/l E2)		
<i>F</i>	TC-1 (1×10^{-5} mol/l)			TC-2 (1×10^{-5} mol/l)			TC-3 (1×10^{-5} mol/l)					
<i>G</i>	TC-1 (1×10^{-4} mol/l)			TC-2 (1×10^{-4} mol/l)			TC-3 (1×10^{-4} mol/l)			TB (tirpiklio kontrolinis ėminys)		
<i>H</i>	TC-1 (1×10^{-3} mol/l)			TC-2 (1×10^{-3} mol/l)			TC-3 (1×10^{-3} mol/l)					

Šiame pavyzdyje silpnai jungiama medžiaga yra noretinodrelis (NE).

Konkrencinio prijungimo bandymo atlikimas

37. Išskyrus bendrojo prijungimo ir tuščiojo ėminio (žymėtojo ėminio) šulinėlius, kaip parodyta 6 lentelėje, į kiekvieną šulinėlį reikėtų įpilti 50 µl bandymo buferinio tirpalo, kurį reikėtų sumaišyti su 10 µl tirpiklio kontrolinio ėminio, etaloninio estrogeno (E2), silpnai jungiamos medžiagos, nejungiamos medžiagos ir bandomųjų cheminių medžiagų tirpalų, ir įpilti 10 µl 5 nmol/l [³H]-17β-estradiolio tirpalo. Tada į kiekvieną plokštelę įpilama 30 µl ledinio receptoriaus tirpalo ir nestipriai maišoma. hrERα tirpalas turėtų būti paskutinis priedamas reagentas. Bandymo mikrotitravimo plokštelės turėtų būti inkubuojamos 2 h kambario temperatūroje (nuo 22 °C iki 28 °C).

6 lentelė. Bandymo komponentų mikrotitravimo plokštelėse turis, atliekant konkurencinio prijungimo prie hrER bandymą

<i>Eilutės numerio ruošimo veiksmai</i>		Kiti nei TB šulinėliai	TB šulinėliai	Tuščiasis ėminys (žymėtojo ėminio)
Pirmiau nurodytų	Kambario temperatūros bandymo buferinis tirpalas	50 µl	60 µl	90 µl

reakcijos šulinėlių komponentų tūris ir įpylimo tvarka	Nežymėtasis E2, silpnai jungiama medžiaga, nejungiama medžiaga, tirpiklis ir bandomosios cheminės	10 µl	-	-
	[³ H]-17β-estradiolis galutinei 0,5 nmol/l koncentracijai gauti (t. y. 5 nmol/l)	10 µl	10 µl	10 µl
	rERα koncentracija, kaip nustatyta (žr. 12–13 pastraipas)	30 µl	30 µl	-
Bendrasis kiekvieno šulinėlio tūris		100 µl	100 µl	100 µl

* Tinkamai paruoštas galutinei koncentracijai gauti naudojant priimtinos koncentracijos tirpiklį.

38. Tada reikėtų atlikti prie hrERα prijungto [³H]-17β-estradiolio kiekybinį nustatymą, kaip aprašyta 3 priedėlio sotinamojo prijungimo bandymo 21–23 pastraipose, atskyrus prie hrERα prijungtą [³H]-17β-estradiolį nuo laisvojo [³H]-17β-estradiolio, į kiekvieną šulinėlį įpilant 80 µl ledinės DCC suspensijos.

39. G10-12 ir H10-12 šulinėliai (identifikuoti kaip tuštieji ėminiai (žymėtojo ėminio) 4 lentelėje) rodo žymėtojo [³H]-estradiolio dpm 10 µl. 10 µl alikvotinį tūrį reikėtų įpilti tiesiai į scintiliacijų skystį.

Priimtino kriterijai

Sotinamojo prijungimo bandymas

40. Naudojant vis didesnę [³H]-17β-estradiolio koncentraciją, turėtų būti pasiekta specifinio prijungimo kreivės gulstė, kuri rodo hrERα prisotinimą ligandu.

41. Specifinis prijungimas, esant 0,5 nmol/l [³H]-17β-estradiolio koncentracijai, turėtų patekti į priimtina nuo 30 % iki 50 % bendrojo radioaktyvumo, pridėto atliekant visus atskirus bandymus, išmatuoto vidurkio intervalą. Atsitiktiniai nedideli nukrypimai nuo šių intervalo ribų yra priimtini, tačiau, jei atskirų bandymų rezultatai nuolat yra už šio intervalo ribų arba kurio nors atskiros bandymo rezultatas reikšmingai neatitinka šio intervalo, reikia koreguoti baltymo koncentraciją ir kartoti sotinamojo prijungimo bandymą.

42. Duomenims turėtų būti gautas tiesinis Scatchardo grafikas.

43. Nespecifinis prijungimas neturėtų būti per didelis. Nespecifinio prijungimo vertė paprastai turėtų būti < 35 % bendrojo prijungimo. Tačiau santykis kartais gali būti gerokai didesnis nei ši riba, kai bandant mažiausios koncentracijos radioaktyviuoju izotopu žymėtą 17β-estradiolį matuojamas labai mažas dpm.

Konkurencinio prijungimo bandymas

44. Vis didėjančios koncentracijos nežymėtasis 17β-estradiolis turėtų pavaduoti [³H]-17β-estradiolį prie receptoriaus konkurencinį prijungimą vienoje vietoje atitinkančiu būdu.

45. Pamatinio estrogeno (t. y. 17β-estradiolio) IC₅₀ vertė turėtų būti maždaug lygi molinei [³H]-17β-estradiolio koncentracijai plius K_d, nustatytą atliekant sotinamojo prijungimo bandymą.

46. Bendrasis specifinis prijungimas nuolat turėtų patekti į priimtą $40 \pm 10 \%$ intervalą, kai atliekant visus atskirus bandymus į kiekvieną šulinėlį pridėto bendrojo radioaktyvumo vidutinė išmatuota koncentracija buvo $0,5 \text{ nmol/l}$. Atsitiktiniai nedideli nukrypimai nuo šio intervalo ribų yra priimtini, tačiau, jei atskirų bandymų rezultatai nuolat yra už šio intervalo ribų arba kurio nors atskiro bandymo rezultatas reikšmingai neatitinka šio intervalo, reikia koreguoti baltymo koncentraciją.
47. Tirpiklis neturėtų pakeisti bandymo jautrį arba atkuriamumą. Tirpiklio kontrolinio ėminio rezultatai (TB šulinėliai) lyginami su buferinio tirpalo kontrolinio ėminio rezultatais, kad būtų galima patikrinti, ar naudojamas tirpiklis nedaro įtakos bandymo sistemai. TB ir buferinio tirpalo kontrolinio ėminio rezultatai turėtų būti palyginami, jei tirpiklis nedaro įtakos bandymui.
48. Nejungiamo medžiaga neturėtų pavaduoti daugiau kaip 25% prie hrER α prijungto [^3H]- 17β -estradiolio, kai jos bandymo koncentracija yra ne didesnė kaip 10^{-3} mol/l (OTES) arba 10^{-4} mol/l (DBP).
49. Veiksmingumo kriterijai buvo sukurti etaloniniam estrogenui ir dviem silpnai jungiamoms medžiagoms (pvz., noretinodreliui, noretindronui), naudojant CERI prijungimo prie hrER bandymo patvirtinimo tyrimo duomenis (2 nuorodos N priedas). Pateikti keturių patvirtinimo tyrime dalyvavusių laboratorijų visų atskirtų kontrolinių ėminių atskirų bandymų vidurkio $\pm \text{SN (n)}$ 95% pasiklovimo intervalai. Buvo apskaičiuoti etaloninio estrogeno ir silpnai jungiamų medžiagų kreivės priderinimo parametrai (t. y. viršaus, apačios, Hillo krypties koeficiento, $\log \text{IC}_{50}$) ir silpnai jungiamų medžiagų $\log_{10}\text{RBA}$ atžvilgiu etaloninio estrogeno 95% pasiklovimo intervalai. 1 lentelėje pateikti kreivės priderinimo parametrai, kurie gali būti naudojami kaip veiksmingumo kriterijai, tikėtini intervalai. Praktiškai IC_{50} intervalas gali kažkiek kisti priklausomai nuo bandymo keliu gauto receptoriaus kompozicijos K_d ir atliekant bandymą naudojamo radioaktyviuoju izotopu žymėto ligando koncentracijos.
50. Bandomųjų cheminių medžiagų kreivės priderinimo parametrai veiksmingumo kriterijai nebuvo sukurti dėl labai didelės grupės potencialių bandomųjų cheminių medžiagų ir dėl potencialaus giminingumo bei rezultatų kitimo (pvz., visa kreivė, dalinė kreivė, nėra kreivės priderinimo). Tačiau, atliekant kiekvieno bandomosios cheminės medžiagos atskiro bandymo rezultatų analizę reikėtų, kad juos įvertintų specialistai. Bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos verčių intervalas turėtų būti pakankamai platus (pvz., 90% - 100% prijungimo), kad būtų galima aiškiai nustatyti konkurencinio prijungimo kreivės viršutinę dalį. Kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos kartotinių ėminių, taip pat 3 nevienalaikių atskirų bandymų rezultatų kintamumas turėtų būti priimtinas ir moksliskai pagrįstas. Kiekvieno bandomosios cheminės medžiagos atskiro bandymo kontroliniai ėminiai turėtų artėti prie nurodytų šio CERI bandymo veiksmingumo matų ir atitikti kiekvienos atitinkamos laboratorijos istorinius kontrolinių ėminių duomenis.

DUOMENŲ ANALIZĖ

Sotinamojo prijungimo bandymas

51. Matuojamas bendrasis ir nespecifinis prijungimas. Pagal šias vertes apskaičiuojamas didėjančios koncentracijos $[^3\text{H}]\text{-}17\beta\text{-estradiolio}$ specifinis prijungimas pusiausvyros sąlygomis, iš bendrojo prijungimo rezultato atimant nespecifinio prijungimo rezultatą. Specifinio prijungimo priklausomybės nuo $[^3\text{H}]\text{-}17\beta\text{-estradiolio}$ koncentracijos kreivėje turėtų būti gauta didžiausiojo specifinio prijungimo gulstė, kuri rodo hrER α prisotinimą $[^3\text{H}]\text{-}17\beta\text{-estradioliu}$. Be to, duomenų analizė turėtų dokumentuoti $[^3\text{H}]\text{-}17\beta\text{-estradiolio}$ prijungimą vienoje, didelio giminingumo prijungimo vietoje. Sotinamojo prijungimo kreivėje turėtų būti rodomas nespecifinis, bendrasis ir specifinis prijungimas. Toliau šie duomenys turėtų būti analizuojami atliekant netiesinės regresijos analizę (pvz., BioSoft; McPherson, 1985 m.; Motulsky, 1995 m.), kai galutinai duomenys pateikiami kaip Scatchardo grafikas.
52. Atliekant duomenų analizę, $B_{\max}$ ir K_d turėtų būti nustatomi vien tik pagal bendrojo prijungimo duomenis, darant prielaidą, kad nespecifinis prijungimas yra tiesinis, jei nebūtų pagrįstas skirtingo metodo taikymas. Be to, reikėtų naudoti atspariąją regresiją, kai nustatomas geriausias priderinimas, jei nebūtų pateiktas pagrindimas. Turėtų būti nurodytas atspariosios regresijos metodas. Visada reikėtų atlikti koregavimą dėl ligando kiekio sumažėjimo (pvz., taikant Swillens metodą, 1995 m.), kai pagal sotinamojo prijungimo duomenis nustatoma $B_{\max}$ ir K_d .

Konkurencinio prijungimo bandymas

53. Konkurencinio prijungimo kreivė braižoma kaip specifinio $[^3\text{H}]\text{-}17\beta\text{-estradiolio}$ prijungimo priklausomybės nuo konkurento koncentracijos (išreikštos $\log_{10}$ vienetais) kreivė. Bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant slopinama 50 % didžiausiojo specifinio $[^3\text{H}]\text{-}17\beta\text{-estradiolio}$ prijungimo yra IC_{50} vertė.
54. Teigiamų kontrolinių ėminių (pvz., etaloninio estrogeno ir silpnai jungiamos medžiagos) įverčiai turėtų būti nustatyti naudojant tinkamą netiesinio kreivių priderinimo programą keturių parametrų Hill lygčiai priderinti. (pvz., BioSoft; McPherson, 1985 m.; Motulsky, 1995 m.). Priderinant šias kreives, viršus, apačia, krypties koeficientas ir $\log(\text{IC}_{50})$ paprastai turėtų likti neapriboti. Reikėtų naudoti atspariąją regresiją, kai nustatomas geriausias priderinimas, jei nebūtų pateiktas pagrindimas. Koregavimas dėl ligando kiekio sumažėjimo neturėtų būti atliekamas. Po pradinės analizės kiekviena prijungimo kreivė turėtų būti analizuojama iš naujo, kad būtų užtikrintas geriausias priderinimas prie modelio. Silpnai jungiamos medžiagos santykinį prijungimo giminingumą (RBA) reikėtų skaičiuoti kaip procentais išreikštą silpnai jungiamos medžiagos $\log(\text{IC}_{50})$ ir $17\beta\text{-estradiolio}$ $\log(\text{IC}_{50})$ santykį. Teigiamų medžiagų kontrolinių ėminių ir nejungiamos medžiagos kontrolinio ėminio rezultatai turėtų būti įvertinti, taikant 3 priedėlio 44–49 pastraipose pateiktus naudojimo charakteristikų matus.
55. Visų bandomųjų cheminių medžiagų duomenys turėtų būti analizuojami taikant pakopinį metodą, siekiant užtikrinti, kad duomenų analizė būtų tinkamai atlikta ir kiekviena

konkurencinio prijungimo kreivė būtų teisingai klasifikuojama. Rekomenduojama, kad iš pradžių būtų atliekama kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos atskiro bandymo standartizuota duomenų analizė, kuri atitiktų etaloninio estrogeno ir silpnai jungiamų medžiagų kontrolinių ėminių analizę (žr. šio 3 priedėlio 54 pastraipą). Baigus šią analizę, reiktų atlikti kiekvieno atskiro bandymo techninę kreivės priderinimo parametrų analizę, taip pat vizualią duomenų atitikties sukurtai konkurencinio prijungimo kreivei analizę. Atliekant šią techninę analizę gauti specifiskai prijungiamo ^3H -17 β -estradiolio procentinės dalies sumažėjimo priklausomai nuo koncentracijos stebėjimo duomenys, mažas kiekvienos koncentracijos techninių kartotinių ėminių kintamumas ir trims atskiriems bandymams gautas priderinimo parametrų pastovumas yra geras tinkamo bandymų atlikimo ir duomenų analizės rodiklis.

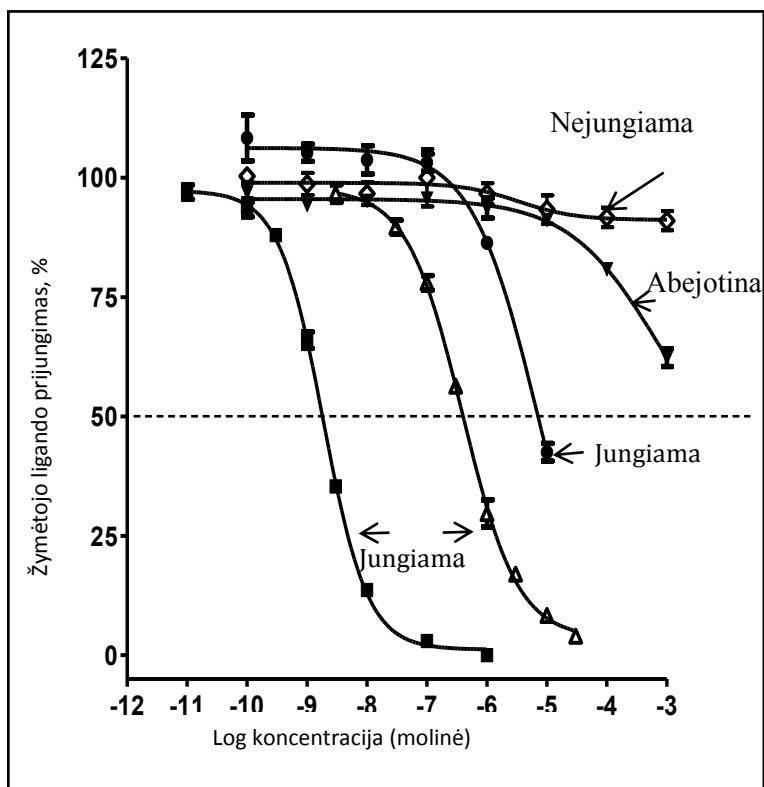
Duomenų aiškinimas

56. Jei įvykdomi visi priimtino kriterijai, bandomoji cheminė medžiaga laikoma prie hrER α jungiama medžiaga, jei gali būti priderinta prijungimo kreivė ir duomenų intervalą atitinkančio žemiausio atsako kreivės taško vertė yra mažesnė kaip 50 % (1 paveikslas).
57. Jei įvykdomi visi priimtino kriterijai, bandomoji cheminė medžiaga laikoma nejungiama prie hrER α , jei:
- galima priderinti prijungimo kreivę ir duomenų intervalą atitinkančio žemiausio priderintos atsako kreivės taško vertė yra didesnė kaip 75 %, arba
 - prijungimo kreivė negali būti priderinta ir procentais išreikštas mažiausias neišlygintas vidutinis prijungimas tarp koncentracijų grupių duomenų yra didesnis kaip 75 %.
58. Bandomosios cheminės medžiagos laikomos abejotinomomis medžiagomis, jei nevykdoma jokia iš pirmiau nurodytų sąlygų (pvz., žemiausias priderintos atsako kreivės taškas yra 76–51 % intervale).

7 lentelė. Klasifikavimo pagal bandomosios cheminės medžiagos konkurencinio prijungimo kreivę kriterijai

Klasifikavimas	Kriterijai
Jungiama medžiaga ^a	Prijungimo kreivė gali būti priderinta. Duomenų intervalą atitinkančio žemiausio atsako kreivės taško vertė yra mažesnė kaip 50 %.
Nejungiama medžiaga ^b	Jei prijungimo kreivė gali būti priderinta, duomenų intervalą atitinkančio žemiausio atsako kreivės taško vertė yra didesnė kaip 75 %. Jei prijungimo kreivė negali būti priderinta, procentais išreikštas mažiausias neišlygintas vidutinis prijungimas tarp koncentracijų grupių duomenų yra didesnis kaip 75 %.
Abejotina medžiaga ^c	Atliekant atskirą bandymą bandyta medžiaga, kuri nėra jungiama ar nejungiama (pvz., žemiausias priderintos atsako kreivės taškas yra 76–51 % intervale).

1 paveikslas. Bandomosios cheminės medžiagos klasifikavimo naudojant konkurencinio prijungimo kreivę pavyzdžiai



59. Laboratorijoje atlikti bandomosios cheminės medžiagos kartotiniai atskiri bandymai sujungiami kiekvienam iš jų priskiriant skaitinę vertę ir gaunant atskirų bandymų vidurkį, kaip parodyta 8 lentelėje. Kiekvienos laboratorijos sujungtų atskirų bandymų rezultatai lyginami su kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos numanoma klasifikacija.

8 lentelė. Bandomosios cheminės medžiagos klasifikavimo metodas, laboratorijoje atliekant kartotinius atskirus bandymus

Priskirti vertę kiekvienam atskiram bandymui:	
Klasifikavimas	Skaitinė vertė
Jungiama medžiaga	2
Abejotina medžiaga	1
Nejungiama medžiaga	0
Klasifikuoti visų atskirų bandymų skaitinės vertės vidurkį:	
Klasifikavimas	Skaitinė vertė
Jungiama medžiaga	Vidurkis $\geq 1,5$
Abejotina medžiaga	$0,5 \leq \text{vidurkis} < 1,5$
Nejungiama medžiaga	Vidurkis $< 0,5$

BANDYMO ATASKAITA

60. Žr. šio bandymo metodo *PRIJUNGIMO PRIE hrER BANDYMO KOMPONENTAI*
24 pastraipą.

3.1 priedėlis

TERMINŲ SĄRAŠAS

[³H]E2 – 17 β -estradiolis, žymėtas radioaktyviuoju tričio izotopu.

DCC – dekstranu dengtos medžio anglys.

E2 – nežymėtas 17 β -estradiolis (inertinis).

Bandymo buferinis tirpalas – 10 mmol/l tris-(hidroksimetil)aminometano hidrochlorido, pH 7,4, turinčio 1 mmol/l EDTA, 1 mmol/l EGTA, 1 mmol/l NaVO₃, 10 % glicerolio, 0,2 mmol/l leupeptino, 1 mmol/l ditiotreitolio ir 10 mg/ml galvijų kraujo serumo albumino.

hrER α – žmogaus rekombinantinio estrogenų receptoriaus alfa (ligandų prijungimo domenai).

Kartotinis ėminys – vienas iš kartotinių tos pačios sudėties ir koncentracijos šulinėlių, bandomų vienu metu atliekant vieną atskirą bandymą. Pagal šį protokolą bandomi trys kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos ėminiai; t. y. vienu metu bandomi trys kartotiniai bandomosios cheminės medžiagos kiekvienos koncentracijos ėminiai.

Atskiras bandymas – vienu metu atliekamas viso mikrotitravimo plokštelės bandymo šulinėlių rinkinio bandymas, kai gaunama visa informacija, kuri yra būtina bandomosios cheminės medžiagos prijungimui prie hrER α apibūdinti (t. y. bendrasis [³H]-17 β -estradiolis, pridėtas į bandymo šulinėlį, didžiausias [³H]-17 β -estradiolio prijungimas prie hrER α , nespecifinis prijungimas ir įvairios koncentracijos bandomosios cheminės medžiagos bendrasis prijungimas). Atskirą bandymą gali sudaryti keli kaip vienas (t. y. kartotiniai) bandymo šulinėliai viena koncentracijai, bet kadangi pagal šį protokolą reikalaujama bandyti tris kartotinius ėminius, vieną atskirą bandymą sudaro trijų vienos koncentracijos bandymo šulinėlių bandymas. Be to, pagal šį protokolą reikalaujama atlikti tris nepriklausomus (t. y. nevienalaikius) kiekvienos cheminės medžiagos atskirus bandymus.

3.2 priedėlis

KONKURENCINIO PRIJUNGIMO BANDYMO ŠULINĖLIŲ SCHEMA

Plokštelė	Padėtis	Kartotinis ėminys	Šulinėlio tipas	Šulinėlio kodas	Koncentracijos kodas	Konkurento pradinė koncentracija (mol/l)	hrER pradinio tirpalo tūris (μl)	Buferinio tirpalo tūris (μl)	Zymeklio (žymėtojo E2) tūris (μl)	Tūris iš skiedimo plokštelės (μl)	Galutinis tūris (μl)	Konkurento galutinė koncentracija (mol/l)
S	A1	1	Tuščias	BK	BK1	–	–	–	–	–	–	–
S	A2	2	Tuščias	BK	BK2	–	–	–	–	–	–	–
S	A3	3	Tuščias	BK	BK3	–	–	–	–	–	–	–
S	B1	1	nežymėtasis E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	B2	2	nežymėtasis E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	B3	3	nežymėtasis E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	C1	1	nežymėtasis E2	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	C2	2	nežymėtasis E2	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	C3	3	nežymėtasis E2	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	D1	1	nežymėtasis E2	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	D2	2	nežymėtasis E2	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	D3	3	nežymėtasis E2	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	E1	1	nežymėtasis E2	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	E2	2	nežymėtasis E2	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	E3	3	nežymėtasis E2	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	F1	1	nežymėtasis E2	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	F2	2	nežymėtasis E2	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	F3	3	nežymėtasis E2	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	G1	1	nežymėtasis E2	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	G2	2	nežymėtasis E2	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	G3	3	nežymėtasis E2	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	H1	1	nežymėtasis E2	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	H2	2	nežymėtasis E2	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	H3	3	nežymėtasis E2	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	A4	1	noretinodrelis	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	A5	2	noretinodrelis	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	A6	3	noretinodrelis	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B4	1	noretinodrelis	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	B5	2	noretinodrelis	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	B6	3	noretinodrelis	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C4	1	noretinodrelis	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	C5	2	noretinodrelis	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	C6	3	noretinodrelis	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	D4	1	noretinodrelis	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D5	2	noretinodrelis	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D6	3	noretinodrelis	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	E4	1	noretinodrelis	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07
S	E5	2	noretinodrelis	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07
S	E6	3	noretinodrelis	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07
S	F4	1	noretinodrelis	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F5	2	noretinodrelis	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F6	3	noretinodrelis	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	G4	1	noretinodrelis	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	G5	2	noretinodrelis	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	G6	3	noretinodrelis	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06

Konkurencinio prijungimo bandymo šulinėlių schema

Plokštelė	Padėtis	Kartotinis ėminys	Šulinėlio tipas	Šulinėlio kodas	Koncentracijos kodas	Konkurento pradinė koncentracija (mol/l)	hrER pradinio tirpalo tūris (μl)	Buferinio tirpalo tūris (μl)	Žymeklio (žymėtojo E2) tūris (μl)	Tūris iš skiedimo plokštelės (μl)	Galutinis tūris (μl)	Konkurento galutinė koncentracija (mol/l)
S	H4	1	noretinodrelis	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	H5	2	noretinodrelis	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	H6	3	noretinodrelis	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	A7	1	OTES	N	OTES1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	A8	2	OTES	N	OTES1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	A9	3	OTES	N	OTES1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	B7	1	OTES	N	OTES2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B8	2	OTES	N	OTES2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B9	3	OTES	N	OTES2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	C7	1	OTES	N	OTES3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C8	2	OTES	N	OTES3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C9	3	OTES	N	OTES3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	D7	1	OTES	N	OTES4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D8	2	OTES	N	OTES4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D9	3	OTES	N	OTES4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	E7	1	OTES	N	OTES5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	E8	2	OTES	N	OTES5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	E9	3	OTES	N	OTES5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F7	1	OTES	N	OTES6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
S	F8	2	OTES	N	OTES6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
S	F9	3	OTES	N	OTES6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
S	G7	1	OTES	N	OTES7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
S	G8	2	OTES	N	OTES7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
S	G9	3	OTES	N	OTES7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
S	H7	1	OTES	N	OTES8DBP7	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
S	H8	2	OTES	N	OTES88	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
S	H9	3	OTES	N	OTES8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
S	A10	1	bendrasis	TB	TB1	-	30	60	10	-	100	-
S	A11	2	bendrasis	TB	TB2	-	30	60	10	-	100	-
S	A12	3	bendrasis	TB	TB3	-	30	60	10	-	100	-
S	B10	4	bendrasis	TB	TB4	-	30	60	10	-	100	-
S	B11	5	bendrasis	TB	TB5	-	30	60	10	-	100	-
S	B12	6	bendrasis	TB	TB6	-	30	60	10	-	100	-
S	C10	1	nežymėtasis E2	NSB	S1	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	C11	2	nežymėtasis E2	NSB	S2	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	C12	3	nežymėtasis E2	NSB	S3	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D10	4	nežymėtasis E2	NSB	S4	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D11	5	nežymėtasis E2	NSB	S5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D12	6	nežymėtasis E2	NSB	S6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	E10	1	Buferinio tirpalo	BC	BC1	-	-	100	-	-	100	-
S	E11	2	Buferinio tirpalo	BC	BC2	-	-	100	-	-	100	-
S	E12	3	Buferinio tirpalo	BC	BC3	-	-	100	-	-	100	-
S	F10	4	Buferinio tirpalo	BC	BC4	-	-	100	-	-	100	-
S	F11	5	Buferinio tirpalo	BC	BC5	-	-	100	-	-	100	-
S	F12	6	Buferinio tirpalo	BC	BC6	-	-	100	-	-	100	-
S	G10*	1	Tuščiasis ėminys	Žymėtasis	H1	-	90	-	10	-	100	-
S	G11*	2	Tuščiasis ėminys	Žymėtasis	H2	-	90	-	10	-	100	-
S	G12*	3	Tuščiasis ėminys	Žymėtasis	H3	-	90	-	10	-	100	-
S	H10*	4	Tuščiasis ėminys	Žymėtasis	H4	-	90	-	10	-	100	-
S	H11*	5	Tuščiasis ėminys	Žymėtasis	H5	-	90	-	10	-	100	-
S	H12	6	Tuščiasis ėminys	Žymėtasis	H6	-	90	-	10	-	100	-

* Atkreipiamas dėmesys į tai, kad „karšti“ šulinėliai yra tušti inkubavimo metu. 10 μl įpilama tik scintiliacijoms skaičiuoti.

Konkurencinio prijungimo bandymo šulinėlių schema												
Plokštelė	Padėtis	Kartotinis ėminys	Šulinėlio tipas	Šulinėlio kodas	Koncentracijos kodas	Konkurento pradinė koncentracija (mol/l)	hrER pradinio tirpalo tūris (μl)	Buferinio tirpalo tūris (μl)	Žymeklio (žymėtojo E2) tūris (μl)	Tūris iš skiedimo plokštelės (μl)	Galutinis tūris (μl)	Konkurento galutinė koncentracija (mol/l)
P1	A1	1	Nežinoma 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A2	2	Nežinoma 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A3	3	Nežinoma 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B1	1	Nežinoma 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B2	2	Nežinoma 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B3	3	Nežinoma 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C1	1	Nežinoma 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C2	2	Nežinoma 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C3	3	Nežinoma 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D1	1	Nežinoma 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D2	2	Nežinoma 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D3	3	Nežinoma 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E1	1	Nežinoma 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E2	2	Nežinoma 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E3	3	Nežinoma 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F1	1	Nežinoma 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F2	2	Nežinoma 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F3	3	Nežinoma 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G1	1	Nežinoma 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G2	2	Nežinoma 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G3	3	Nežinoma 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H1	1	Nežinoma 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H2	2	Nežinoma 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H3	3	Nežinoma 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A4	1	Nežinoma 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A5	2	Nežinoma 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A6	3	Nežinoma 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B4	1	Nežinoma 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B5	2	Nežinoma 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B6	3	Nežinoma 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C4	1	Nežinoma 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C5	2	Nežinoma 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C6	3	Nežinoma 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D4	1	Nežinoma 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D5	2	Nežinoma 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D6	3	Nežinoma 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E4	1	Nežinoma 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E5	2	Nežinoma 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E6	3	Nežinoma 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F4	1	Nežinoma 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F5	2	Nežinoma 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F6	3	Nežinoma 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G4	1	Nežinoma 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G5	2	Nežinoma 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G6	3	Nežinoma 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H4	1	Nežinoma 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H5	2	Nežinoma 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H6	3	Nežinoma 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03

Konkurencinio prijungimo bandymo šulinėlių schema

Plokštelė	Padėtis	Kartotinis ėminys	Šulinėlio tipas	Šulinėlio kodas	Koncentracijos kodas	Konkurento pradinė koncentracija (mol/l)	hrER pradinio tirpalo tūris (μl)	Buferinio tirpalo tūris (μl)	Žymeklio (žymėtojo E2) tūris (μl)	Tūris iš skiedimo plokštelės (μl)	Galutinis tūris (μl)	Konkurento galutinė koncentracija (mol/l)
P1	A7	1	Nežinoma 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A8	2	Nežinoma 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A9	3	Nežinoma 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B7	1	Nežinoma 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B8	2	Nežinoma 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B9	3	Nežinoma 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C7	1	Nežinoma 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C8	2	Nežinoma 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C9	3	Nežinoma 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D7	1	Nežinoma 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D8	2	Nežinoma 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D9	3	Nežinoma 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E7	1	Nežinoma 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E8	2	Nežinoma 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E9	3	Nežinoma 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F7	1	Nežinoma 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F8	2	Nežinoma 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F9	3	Nežinoma 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G7	1	Nežinoma 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G8	2	Nežinoma 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G9	3	Nežinoma 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H7	1	Nežinoma 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H8	2	Nežinoma 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H9	3	Nežinoma 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A10	1	Kontrolinis E2	S	E2max1	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	A11	2	Kontrolinis E2	S	E2max2	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	A12	3	Kontrolinis E2	S	E2max3	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	B10	1	Kontrolinis E2	S	E2IC501	E2IC50x10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	B11	2	Kontrolinis E2	S	E2IC502	E2IC50x10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	B12	3	Kontrolinis E2	S	E2IC503	E2IC50x10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	C10	1	Kontrolinis NE	S	NEmax1	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	C11	2	Kontrolinis NE	S	NEmax2	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	C12	3	Kontrolinis NE	S	Nemax3	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	D10	1	Kontrolinis NE	S	NEIC501	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	D11	2	Kontrolinis NE	S	NEIC502	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	D12	3	Kontrolinis NE	S	NEIC503	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	E10	1	nežymėtasis E2	NSB	S1	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E11	2	nežymėtasis E2	NSB	S2	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E12	3	nežymėtasis E2	NSB	S3	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F10	4	nežymėtasis E2	NSB	S4	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F11	5	nežymėtasis E2	NSB	S5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F12	6	nežymėtasis E2	NSB	S6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	G10	1	bendrasis	TB	TB1	-	30	60	10	-	100	-
P1	G11	2	bendrasis	TB	TB2	-	30	60	10	-	100	-
P1	G12	3	bendrasis	TB	TB3	-	30	60	10	-	100	-
P1	H10	4	bendrasis	TB	TB4	-	30	60	10	-	100	-
P1	H11	5	bendrasis	TB	TB5	-	30	60	10	-	100	-
P1	H12	6	bendrasis	TB	TB6	-	30	60	10	-	100	-

4 priedėlis

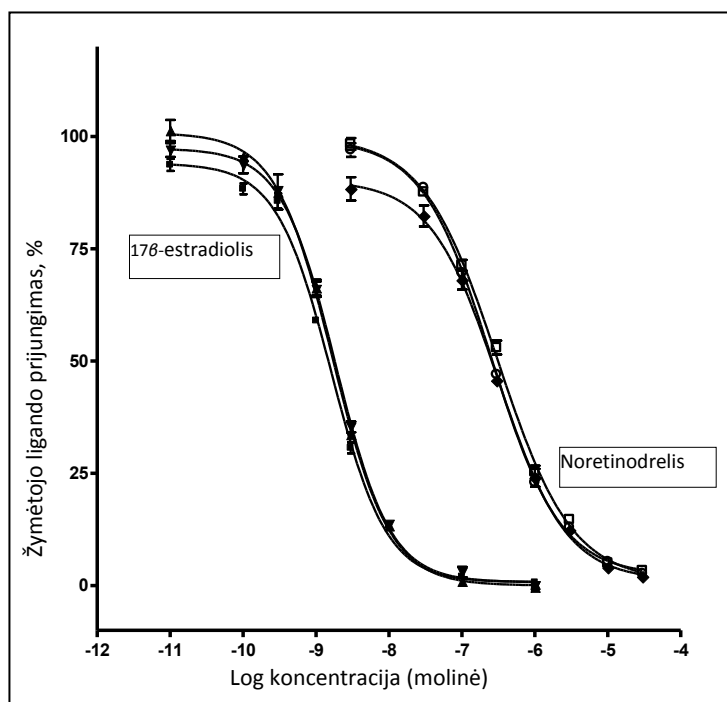
PRIJUNGIMO PRIE HRER KONKURENCINIO BANDYMO DUOMENŲ ANALIZĖS ASPEKTAI

1. Atliekant konkurencinio prijungimo prie hrER α bandymą matuojamas vienos koncentracijos [^3H]-17 β -estradiolio prijungimas, esant vis didesnei bandomosios cheminės medžiagos koncentracijai. Konkurencinio prijungimo kreivė braižoma kaip specifinio [^3H]-17 β -estradiolio prijungimo priklausomybės nuo konkurento koncentracijos (log10 vienetai) kreivė. Bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant slopinama 50 % didžiausiojo specifinio [^3H]-17 β -estradiolio prijungimo yra IC₅₀.

Etaloninio estrogeno ir silpnai jungiamos medžiagos duomenų analizė (1)

2. Kontrolinių ėminių atskirų bandymų duomenys yra transformuojami (t. y. [^3H]-17 β -estradiolio specifinio prijungimo procentinė dalis ir bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos logaritmas) tolesnei analizei. Teigiamų kontrolinių ėminių (pvz., etaloninio estrogeno ir silpnai jungiamos medžiagos) įverčiai turėtų būti nustatyti naudojant tinkamą netiesinio kreivių priderinimo programą keturių parametrų Hill lygčiai priderinti, t. y. (pvz., BioSoft; GraphPad Prism) (2). Priderinant šias kreives, viršus, apačia, krypties koeficientas ir log(IC₅₀) paprastai gali likti neapriboti. Reikėtų naudoti atspariąją regresiją, kai nustatomas geriausias priderinimas, jei nebūtų pateiktas pagrindimas. Turėtų būti nurodytas atspariosios regresijos metodas. Koregavimas dėl ligando kiekio sumažėjimo nebuvo būtinas atliekant FW ar CERI hrER bandymus, bet į jį galima atsižvelgti, jei reikia. Po pradinės analizės kiekviena prijungimo kreivė turėtų būti analizuojama iš naujo, kad būtų užtikrintas geriausias priderinimas prie modelio. Silpnai jungiamos medžiagos santykinį prijungimo giminingumą (RBA) galima skaičiuoti kaip procentais išreikštą silpnai jungiamos medžiagos log (IC₅₀) ir 17 β -estradiolio log (IC₅₀) santykį. Teigiamų medžiagų kontrolinių ėminių ir nejungiamos medžiagos kontrolinio ėminio rezultatai turėtų būti įvertinti, taikant naudojimo charakteristikų matus ir priimtumo kriterijus, kaip aprašyta šiame bandymo metode (20 pastraipa), 2 priedėlyje (FW bandymas, 41–51 pastraipos) ir 3 priedėlyje (CERI bandymas, 41–51 pastraipos). Etaloninio estrogeno ir silpnai jungiamos medžiagos 3 atskirų bandymų pavyzdžiai pateikti 1 paveiksle.

1 paveikslas. Etaloninio estrogeno ir kontrolinės silpnai jungiamos medžiagos konkurencinio prijungimo kreivių pavyzdžiai

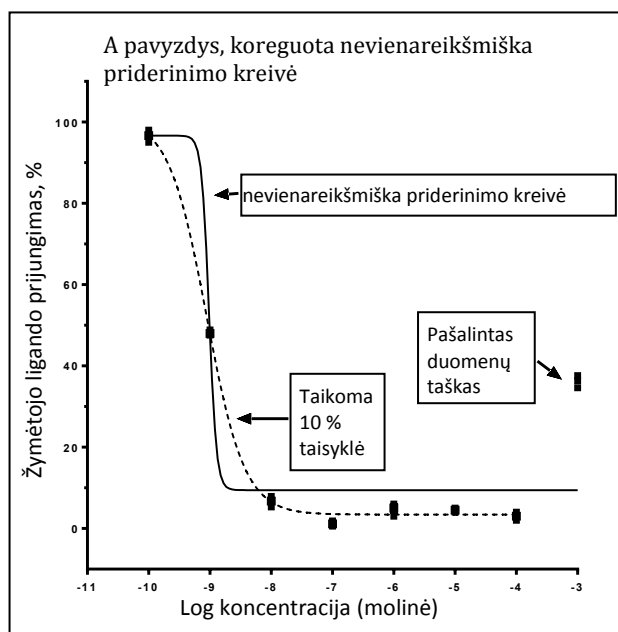


Bandomųjų cheminių medžiagų duomenų analizė

3. Visų bandomųjų cheminių medžiagų duomenys turėtų būti analizuojami taikant pakopinį metodą, siekiant užtikrinti, kad duomenų analizė būtų tinkamai atlikta ir kiekviena konkurencinio prijungimo kreivė būtų teisingai klasifikuojama. Iš pradžių reikėtų atlikti bandomosios cheminės medžiagos kiekvieno atskiro bandymo standartizuotą duomenų analizę, kuri atitiktų etaloninio estrogeno ir silpnai jungiamų medžiagų kontrolinių ėminių analizę. Baigus šią analizę, reikėtų atlikti kiekvieno atskiro bandymo techninę kreivės priderinimo parametrų analizę, taip pat vizualią duomenų atitikties sukurta konkurencinio prijungimo kreivei analizę. Atliekant šią techninę analizę gauti specifiskai prijungiamo ^3H]-17 β -estradiolio procentinės dalies sumažėjimo priklausomai nuo koncentracijos stebėjimo duomenys, mažas kiekvienos koncentracijos techninių kartotinių ėminių kintamumas ir trims atskiriems bandymams gautas priderinimo parametrų pastovumas yra geras tinkamo bandymų atlikimo ir duomenų analizės rodiklis. Atliekant kiekvieno bandomosios cheminės medžiagos atskiro bandymo rezultatų analizę reikėtų, kad juos įvertintų specialistai, ir duomenys, naudojami kiekvienai bandomajai cheminei medžiagai klasifikuoti kaip jungiamai ar nejungiamai turėtų būti moksliškai pagrįsti.
4. Kartais gali pasitaikyti tokie duomenys, kuriems reikia skirti papildomą dėmesį, kad būtų galima tinkamai analizuoti ir aiškinti prijungimo prie hrER duomenis. Atliekant ankstesnius tyrimus būdavo atvejų, kai konkurencinio prijungimo prie receptoriaus duomenų analizę ir aiškinimą galėjo apsunkinti specifinio prijungimo procentinės dalies padidėjimas, kai bandomos didžiausios koncentracijos cheminės medžiagos (2 paveikslas).

Tai yra gerai žinoma problema, su kuria susiduriama, kai protokolai naudojami atliekant kelis konkurencinio prijungimo prie receptoriaus bandymus(3). Šiais atvejais nuo koncentracijos priklausomas atsakas stebimas esant mažesnei koncentracijai, bet bandomosios cheminės medžiagos koncentracijai artėjant prie tirpumo ribos [^3H]17 β -estradiolio pavadavimas nebemažėja. Šiais atvejais didesnėms koncentracijoms gauti duomenys rodo, kad pasiekta bandymo biologinė riba. Pavyzdžiui, šis reiškinys labai dažnai yra susijęs su cheminės medžiagos netirpumu ir nuosėdų susidarymu, esant didelei koncentracijai, arba jis gali rodyti, kad dekstranu dengtos medžio anglys nesugeba atskirti neprijungtą radioaktyviuoju izotopu žymėtą ligandą, esant didžiausioms cheminių medžiagų koncentracijoms. Jei tokie duomenų taškai paliekami konkurencinio prijungimo duomenis derinant prie sigmoidės, kartais gali būti klaidingai klasifikuojamas bandomosios cheminės medžiagos prijungimo prie ER potencialas (2 paveikslas). Siekiant to išvengti, pagal FW ir CERI prijungimo prie hrER bandymo protokolus iš analizės duomenų galima pašalinti tuos taškus, kurių kartotinių ėminių [^3H]17 β -estradiolio specifinio prijungimo vidurkio procentinė dalis yra 10 % arba daugiau didesnė nei esant mažesnei koncentracijai stebima vidutinė vertė (t. y. tai paprastai vadinama 10 % taisykle). Ši taisyklė gali būti taikoma tik kartą konkrečiai kreivei, ir turi likti ne mažiau kaip likusių 6 koncentracijos verčių duomenys, kad kreivę būtų tinkamai klasifikuoti.

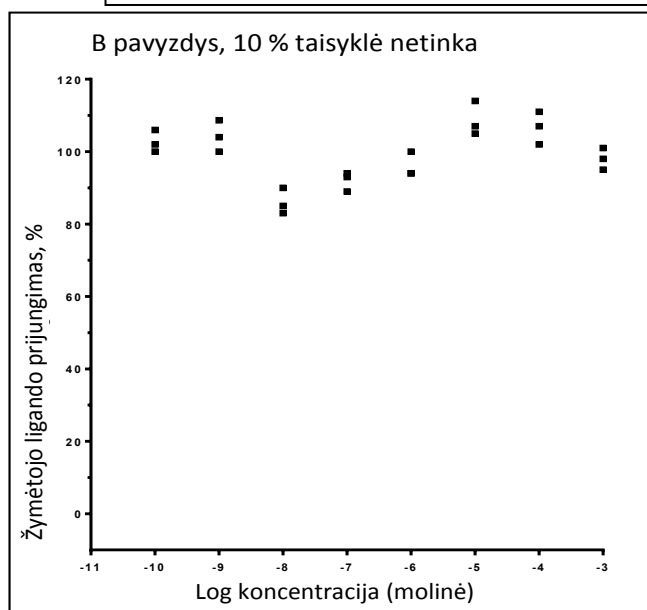
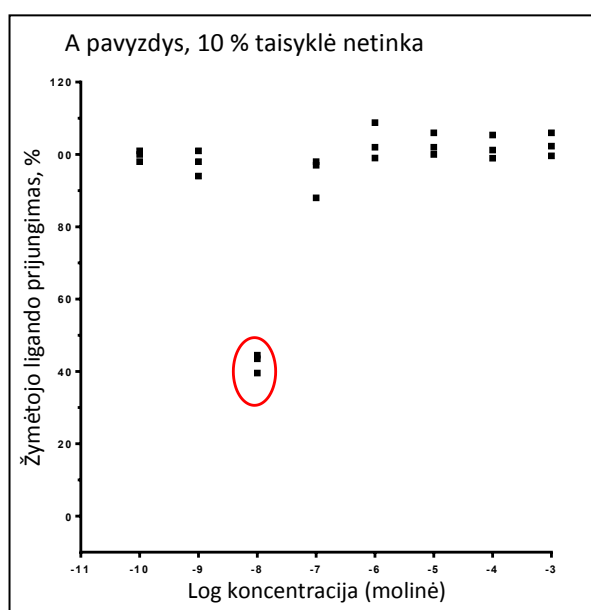
2 paveikslas. Konkurencinio prijungimo kreivių, taikant 10 % taisyklę ir jos netaikant, pavyzdžiai



- Reikėtų atidžiai atsižvelgti į galimybę tinkamai taikyti 10 % taisyklę šioms kreivėms koreguoti ir tai turėtų būti daroma tik tais atvejais, kai yra aiškių įrodymų, kad tai yra prie hrER jungiama medžiaga. Atliekant FW hrER prijungimo bandymo patvirtinimo tyrimo bandymus buvo pastebėta, kad 10 % taisyklės taikymas kartais turėjo netikėtas ir

nenumatytas pasekmes. Cheminėms medžiagoms, kurios nesijungia prie receptoriaus (t. y., tikros nejungiamos medžiagos), kintamumas esant maždaug 100 % žymėtojo ligando prijungimui tirtų koncentracijų diapazone buvo didesnis nei 10 %. Jei mažiausioji vertė pasitaikydavo esant mažai koncentracijai, taikant 10 % taisyklę iš analizės galėtų būti pašalinti visų didesnių koncentracijų duomenys, netgi tais atvejais, kai tos koncentracijos galėtų būti naudingos nustatant, ar cheminė medžiaga yra nejungiamoji medžiaga. 3 paveiksle pateikti pavyzdžiai, kuriems 10 % taisyklė netinka.

3 paveikslas. Konkurencinio prijungimo duomenų, kuriems netinka 10 % taisyklė, pavyzdžiai



Nuorodos

- (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), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (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](http://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.