

Briselē, 2019. gada 25. februārī
(OR. en)

6800/19
ADD 1

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

PAVADVĒSTULE

Sūtītājs:	Eiropas Komisija
Saņemšanas datums:	2019. gada 22. februāris
Saņēmējs:	Padomes Ģenerālsēkretariāts
Iepr. dok. Nr.:	Annex to D060575/02
Temats:	Pielikums KOMISIJAS REGULA (ES) .../.. (XXX), ar kuru, pielāgojot tehnikas attīstībai, groza pielikumu Regulai (EK) Nr. 440/2008 par testēšanas metožu noteikšanu saskaņā ar Eiropas Parlamenta un Padomes Regulu (EK) Nr. 1907/2006, kas attiecas uz ķīmikāliju reģistrēšanu, vērtēšanu, licencēšanu un ierobežošanu (REACH)

Pielikumā ir pievienots dokuments *Annex to D060575/02*.

Pielikumā: *Annex to D060575/02*

Pielikums (1. daļa no 2)

LV

PIELIKUMS

Regulas (EK) Nr. 440/2008 pielikumu groza šādi:

1) Pielikuma B daļā B.4. nodaļu aizstāj ar šādu:

“B.4. AKŪTS ĀDAS KAIRINĀJUMS/KOROZIJA (KODĪGA IEDARBĪBA UZ ĀDU)**IEVADS**

1. Šī testēšanas metode ir ekvivalenta ESAO Testēšanas vadlīnijā (TG) Nr. 404 (2015) aprakstītajam. ESAO ķīmisko vielu testēšanas vadlīnijas tiek regulāri pārskatītas, lai nodrošinātu, ka tās atspoguļo zinātnes jaunākās atziņas. Pārskatot ESAO TG Nr. 404, īpaši uzmanīgi tika apsvērts, ko iespējams uzlabot dzīvnieku labturības aspektos, kā arī izvērtēta visa par testējamo ķīmikāliju jau esošā informācija, lai nebūtu jāveic lieka testēšana ar laboratorijas dzīvniekiem. Atjauninātajā ESAO TG Nr. 404 (sākotnēji pieņemta 1981. gadā, pārstrādāta 1992., 2002. un 2015. gadā) ir atsauce uz *Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion (IATA)* (Norādījumu dokuments par integrētām pieejām testēšanai un novērtēšanai attiecībā uz ādas kairinājumu/koroziju) (1), kurā testēšanai attiecībā uz ādas kairinājumu un ādas koroziju ierosināta modulāra pieeja. IATA apraksta vairākus modulus, kuros tiek grupēti informācijas avoti un analīzes rīki, un, pirmkārt, sniedz norādījumus par to, kā, novērtējot ķīmikāliju potenciālu radīt ādas kairinājumu un ādas koroziju, integrēt un izmantot jau esošos testēšanā un citādi iegūtos datus, un, otrkārt, ierosina pieeju, ko izmantot, ja vajadzīga turpmāka testēšana (1). Bez tam attiecīgā gadījumā minētā vadlīnija ieteic sākotnējā *in vivo* testā trīs kompreses dzīvniekam aplicēt nevis vienlaikus, bet secīgi.
2. Ādas kairinājuma un korozijas definīcijas sniegtas šīs testēšanas metodes apraksta papildinājumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI

3. Tiklab zinātnes kā dzīvnieku labturības interesēs ir neveikt testēšanu *in vivo*, iekams visi dati, kas relevanti attiecībā uz testējamās ķīmikālijas potenciālajām ādai kodīgajām/kairinošajām īpašībām, nav izvērtēti *Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Corrosion and Irritation* (Norādījumu dokumentā par integrētu pieeju ādas korozijas un kairinājuma testēšanu un novērtēšanu), proti, tā trijās daļās un attiecīgajos modulos (1) aprakstītajā pierādījumsvara (*WoE*) analīzē.

Īsumā — 1. daļā noteikts, ka esošos datus aplūko septiņos moduļos, kuri aptver datus par cilvēku, *in vivo* pētījumos iegūtos datus, attiecīgos *in vitro* datus, datus par fizikālķīmiskajām īpašībām (piem., pH, jo īpaši stiprs skābums vai sārmainums) un datus, kas iegūti ar metodēm, kuras neparedz testēšanu. 2. daļa nosaka, kā izdarāma *WoE* analīze. Ja *WoE* analīze joprojām nesniedz skaidrus rezultātus, jāveic 3. daļā aprakstītā papildu testēšana, sākot ar *in vitro* metodēm, bet *in vivo* testēšana jāizmanto kā pēdējā iespēja. Tātad šāda analīze mazina nepieciešamību veikt *in vivo* testēšanu attiecībā uz tādu testējamo ķīmikāliju kodīgajām/kairinošajām īpašībām, attiecībā uz kurām par šiem diviem beigupunktiem pietiekami daudz datu jau iegūts citos pētījumos.

IN VIVO TESTA PRINCIPS

4. Uz eksperimenta dzīvnieku ādas aplicē vienu devu testējamās ķīmikālijas. Par kontroli izmanto tā paša testā izmantotā dzīvnieka ādas neskartās daļas. Nosaka kairinājuma/korozijas pakāpi, ko ar noteiktiem starplaikiem nolasa, novērtē ar atzīmēm un ietekmes pilnīgai izvērtēšanai apraksta sīkāk. Pētījuma ilgumam jāpietiek novērotās ietekmes atgriezeniskuma vai neatgriezeniskuma novērtēšanai.
5. Dzīvnieki, kuriem jebkurā testa posmā novērojamas pastāvīgas stipru ciešanu un/vai sāpju pazīmes, humāni jānonāvē, un testējamā ķīmikālija attiecīgi jānovērtē. Kritēriji, pēc kuriem pieņem lēmumu humāni nonāvēt mirstošus dzīvniekus un dzīvniekus, kam ir smagas ciešanas, sniegti atsevišķā norādījumu dokumentā (2).

SAGATAVOŠANĀS IN VIVO TESTAM

Dzīvnieku sugas izraudzīšanās

6. Piemērotākais laboratorijas dzīvnieks ir albīnais trusis, un izmanto jaunus veselus pieaugušus dzīvniekus. Ja izmanto citu sugu dzīvniekus, tas attiecīgi jāpamato.

Dzīvnieku sagatavošana

7. Apmēram 24 stundas pirms testa dzīvniekiem ķermeņa mugurdaļā rūpīgi nocērpj apmatojumu. Jāraugās ādu nesaskrāpēt un jāizmanto tikai dzīvnieki ar veselu un nebojātu ādu.
8. Dažām trušu līnijām ir bieza apspalvojuma vietas, kas zināmos gadalaikos kļūst izteiktākas. Šādas vietas, kur apmatojums uz ķermeņa ir ļoti blīvs, testēšanai neizmanto.

Turēšanas un barošanas apstākļi

9. Dzīvnieki jātur atsevišķi. Eksperimenta trušu telpas temperatūra ir 20°C ($\pm$ 3°C). Lai gan relatīvajam mitrumam jābūt vismaz 30 % un, izņemot telpu uzkopšanas laiku, vēlams nepārsniegt 70 %, jāorientējas uz 50–60 %. Dzīvniekus 12 stundas diennaktī tur mākslīgā

apgaismojumā, bet 12 stundas — tumsā. Var izmantot parasto laboratorijas barību ar neierobežotu piekļuvi dzirdināmajam ūdenim.

TESTA PROCEDŪRA

Testējamās ķīmikālijas aplicēšana

10. Testējamo ķīmikāliju aplicē uz nelielas ādas virsmas platības (apmēram 6 cm²), kuru pārklāj ar marles kompresi, ko piestiprina ar nekairinošu plāksteri. Ja tieša aplicēšana nav iespējama (piem., šķidrumiem vai daļai pastu), testējamo ķīmikāliju vispirms pārnes uz marles kompreses, kuru pēc tam aplicē uz ādas. Kompresē jāpieguļ ādai, taču ne blīvi, un to panāk, eksponēcijas laikā izmantojot attiecīgu puspiegulošu pārsēju. Ja testējamo ķīmikāliju pārnes uz kompresi, tā ādai jāpiestiprina tā, lai ķīmikālijai ar ādu būtu laba saskare un tā uz ādas būtu sadalīta vienmērīgi. Jāpanāk, ka dzīvnieks kompreseī nevar pieskarties, tādējādi izslēdzot iespēju, ka testējamā ķīmikālija tiek ieēsta vai ieelpota.
11. Šķidras testējamās ķīmikālijas parasti pārbauda neatšķaidītas. Testējot cietas vielas (kuras, ja uzskata par nepieciešamu, var saberzt pulverī), testējamā ķīmikālija jāsamitrina ar mazāko daudzumu ūdens (vai, ja nepieciešams, cita piemērota nesēja), ar ko pietiek, lai panāktu labu saskari ar ādu. Ja ūdens vietā izmanto citus nesējus, testētās ķīmikālijas izraisītā ādas kairinājumā nesēja ietekmei, ja tāda vispār ir, jābūt iespējami minimālai.
12. Eksponēcijas perioda (parasti četras stundas) beigās testējamās ķīmikālijas atliekas no ādas noņem, ja iespējams, ar ūdeni vai citu piemērotu šķīdinātāju, kas neietekmē izveidojušos atbildreakciju un nebojā epidermu.

Devas līmenis

13. Uz testa anatomiskās vietas aplicē 0,5 ml šķidruma vai 0,5 g cietas vielas vai pastas.

Sākotnējais tests (ādas kairinājuma/korozijas *in vivo* tests ar vienu dzīvnieku)

14. Ja uz pierādījumsvara analīzes vai agrākas *in vitro* testēšanas pamata par attiecīgo testējamo ķīmikāliju nospriests, ka tā ir kodīga, kairinoša vai nav klasificēta, tālāka *in vivo* testēšana parasti nav vajadzīga. Tomēr, ja tiek uzskatīts, ka vajadzīgi papildu dati, *in vivo* testu sākotnēji parasti izdara ar vienu dzīvnieku, izmantojot šādu pieeju. Vienam dzīvniekam secīgi aplicē trīs testa kompreses. Pirmo kompresi noņem pēc trim minūtēm. Ja nopietnu ādas reakciju nenovēro, citā vietā aplicē otru kompresi, ko noņem pēc stundas. Ja novērojumi šajā testa posmā liecina, ka eksponēciju iespējams humāni paildzināt līdz četrām stundām, uzliek trešo kompresi, ko noņem pēc četrām stundām, un novērtē atbildreakciju.
15. Ja pēc kādas no trim secīgām eksponēcijām tiek novērota kodīga ietekme, testu nekavējoties beidz. Ja pēc pēdējās kompreses noņemšanas kodīgu ietekmi nenovēro, dzīvnieku novēro vēl 14 dienas, ja vien korozija neizveidojas jau pirms šā laika beigām.

16. Ja netiek gaidīts, ka testējamā ķīmikālija būs kodīga, bet tā var būt kairinoša, vienam dzīvniekam uz četrām stundām aplicē vienu kompresi.

Apstiprinošs tests (ādas kairinājuma *in vivo* tests, kurā izmanto papildu dzīvniekus)

17. Ja sākotnējā testā kodīga ietekme nav novērota, kairinājuma atbildreakcija vai tās neesība jāapstiprina, izmantojot ne vairāk kā divus papilddzīvniekus, kuriem katram aplicē vienu kompresi, ko tur četras ekspozīcijas stundas. Ja sākotnējā testā novērota kairinoša ietekme, apstiprinājuma testu var veikt secīgi vai divus papilddzīvniekus eksponējot vienlaicīgi. Izņēmuma gadījumā, kur sākotnējs tests netiek veikts, diviem vai trijiem dzīvniekiem aplicē vienu kompresi, ko noņem pēc četrām stundām. Ja izmanto divus dzīvniekus un atbildreakcija abiem ir vienāda, turpmāka testēšana nav nepieciešama. Pretējā gadījumā jāveic testi ar vēl vienu dzīvnieku. Neskaidru reakciju izvērtēšanai var būt nepieciešams izmantot papildu dzīvniekus.

Novērošanas periods

18. Ar novērošanas periodu jāpietiek, lai varētu pilnīgi izvērtēt novērotās ietekmes atgriezeniskumu vai neatgriezeniskumu. Taču eksperiments vienmēr jāpārtrauc jebkurā brīdī, kad dzīvniekiem parādās pastāvīgu smagu sāpju vai ciešanu pazīmes. Lai novērtētu ietekmes atgriezeniskumu, pēc kompresu noņemšanas dzīvnieki vēl līdz 14 dienām ilgi jānovēro. Ja iedarbības atgriezeniskumu konstatē pirms 14 dienu perioda beigām, eksperiments tajā brīdī jābeidz.

Klīniskie novērojumi un ādas reakciju pakāpes

19. Visiem dzīvniekiem eritēmas un tūskas pazīmes jāpārbauda un atbildreakcija ar atzīmi jānovērtē 60 minūtes pēc tampona noņemšanas un vēl pēc 24, 48 un 72 stundām. Sākotnējā testā ar vienu dzīvnieku tūlīt pēc kompreses noņemšanas apskata arī testa anatomisko vietu. Ādas reakcijas novērtē pa pakāpēm un reģistrē pēc zemāk dotās pakāpju tabulas. Ja ir ādas bojājums, ko pēc 72 stundām nevar identificēt par kairinājumu vai koroziju, tad, lai noteiktu, vai ietekme ir atgriezeniska, novērošana var būt jāturpina līdz 14. dienai. Papildus kairinājuma novērojumam pilnīgi jāraksturo un jāreģistrē arī jebkāda tāda lokāla toksiska ietekme kā ādas attaukošanās un jebkāda sistēmiski kaitīga ietekme (piem., ietekme uz toksiskuma klīniskajām pazīmēm un ķermeņa masas pārmaiņām). Jāapsver, vai neskaidru atbildreakciju precizēšanai neveikt histopatoloģiskus izmeklējumus.
20. Ādas reakciju iedalīšana pakāpēs neizbēgami ir subjektīva. Lai veicinātu ādas reakciju pakāpju saskaņošanu un palīdzētu testēšanas laboratorijām, novērojumu veicējiem un interpretētājiem, personālam, kas veic novērojumus, jābūt pietiekami apmācītam par izmantojamo atzīmju sistēmu (sk. tabulu zemāk). Var noderēt ilustrēti norādījumi par ādas kairinājuma un citu bojājumu pakāpēm (3).

DATI UN PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

21. Pētījuma rezultāti testēšanas galīgajā pārskatā jāapkopo tabulas veidā, aptverot visus 24. punkta sarakstā norādītos jautājumus.

Rezultātu izvērtēšana

22. Ādas kairinājuma novērtējuma atzīmes jāizvērtē kopsakarā ar bojājumu dabu un smagumu un to atgriezeniskumu vai neatgriezeniskumu. Konkrētās novērtējuma atzīmes nav absolūts materiāla kairinošo īpašību standarts, jo tiek novērtēta arī testējamā materiāla cita veida ietekme. Individuālās novērtējuma atzīmes būtu uzskatāmas par bāzesvērtībām, kuras jāizvērtē kombinācijā ar visiem citiem pētījumā veiktajiem novērojumiem.
23. Kairinājuma atbildreakcijas izvērtēšanā jāņem vērā, vai ādas bojājumi ir atgriezeniski. Ja tādas reakcijas kā apmatojuma zaudējums (ierobežotā platībā), hiperkeratoze (ādas pārragošanās), hiperplāzija un plaisāšana saglabājas līdz 14 dienu ilga novērošanas perioda beigām, testējamā ķimikālija jāuzskata par kairinošu.

Testēšanas pārskats

24. Testēšanas pārskatā jānorāda šāda informācija.

In vivo testēšanas pamatojums:

- jau esošu testēšanas datu, arī ar secīgas testēšanas stratēģiju iegūtu rezultātu pierādījumsvara analīze;
- relevantu agrākā testēšanā iegūtu datu apraksts;
- katrā testēšanas stratēģijas posmā iegūtie dati;
- izdarīto *in vitro* testu apraksts, arī detalizēta informācija par procedūrām un ar testējamajām vielām un standartvielām iegūtajiem rezultātiem;
- *in vivo* pētījuma veikšanai nepieciešamā pierādījumsvara analīze.

Testējamā ķimikālija:

- vienkomponta viela: ķīmiskā identifikācija, piemēram, *IUPAC* vai *CAS* nosaukums, *CAS* numurs, *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula, tīrība, attiecīgā gadījumā un ja praktiski iespējams — piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. c.;
- daudzkomponentu vielas, maisījumi un vielas, kuru sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kuras ir kompleksi reakcijas produkti vai bioloģiski materiāli (UVCB): iespējami izsmeloši raksturotas pēc to komponentu ķīmiskās identitātes (sk. iepriekš), kvantitatīvās sastopamības un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām;
- izskats, šķīdība ūdenī un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības;
- avots, no kura dzīvnieki saņemti, sērijas numurs, ja zināms;

- testējamās ķīmikālijas / kontrolvielas pirmstestēšanas apstrāde (piem., sildīšana, sasmalcināšana) ja tāda veikta;
- testējamās ķīmikālijas stabilitāte, izmantošanas termiņš vai atkārtotas analīzes datums, ja tas zināms;
- glabāšanas apstākļi.

Nesējs:

- identifikācija, koncentrācija (attiecīgā gadījumā), izmantotais tilpums;
- nesēja izraudzīšanās pamatojums.

Testa dzīvnieks (dzīvnieki):

- izmantotais celms/līnija, izraudzīšanās pamatojums gadījumos, kur neizmanto albīnos trušus;
- katra dzimuma dzīvnieku skaits;
- katra dzīvnieka masa testa sākumā un beigās;
- vecums pētījuma sākumā;
- avots, no kura dzīvnieki saņemti, turēšanas apstākļi, uzturs u. tml.

Testēšanas nosacījumi:

- kompreses vietas sagatavošanas paņēmieni;
- detalizēta informācija par izmantotajiem kompreses materiāliem un kompreses uzlikšanas paņēmieni;
- detalizēta informācija par testējamās ķīmikālijas sagatavošanu, aplicēšanu un noņemšanu.

Rezultāti:

- tabulā apkopotas atzīmes par katram dzīvniekam novēroto kairinājuma/korozijas veida atbildreakciju visos mērītajos laika punktos;
- visu novēroto bojājumu apraksts;
- stāstījuma veida apraksts par novērotā kairinājuma vai korozijas dabu un pakāpi un jebkādi histopatoloģiski konstatējumi;
- papildus ādas kairinājuma vai korozijas aprakstam — apraksts par vēl citu nelabvēlīgu vietēju (piem., ādas attaukošanās) vai sistēmisku ietekmi.

Rezultātu iztirzājums

Secinājumi

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.

TABULA. ĀDAS REAKCIJAS KLASIFICĒŠANA**Eritēmas un nekrotisku krevelu veidošanās**

Eritēmas nav.....	0
Ļoti neliela eritēma (tikko manāma).....	1
Labi saskatāma eritēma.....	2
Vidēja līdz smaga eritēma.....	3
Smaga eritēma (liellopa gaļas sarkanums) ar izveidojušos nekrotisku kreveli, kas liedz iespēju noteikt eritēmas pakāpi.....	4

Maksimālie iespējamie punkti: 4

Tūska veidošanās

Tūska nav.....	0
Ļoti neliela tūska (tikko manāma).....	1
Neliela tūska (skarto vietu viegli noteikt pēc izteikta pietūkuma).....	2
Vidēja tūska (pietūkums apm. 1 mm).....	3
Smaga tūska (pietūkums vairāk nekā 1 mm, arī aiz eksponētā ādas laukuma).....	4

Maksimālie iespējamie punkti: 4

Neskaidras atbildreakcijas var precizēt ar histopatoloģiskiem izmeklējumiem.

Papildinājums

DEFINĪCIJAS

Ķimikālija ir viela vai maisījums.

Ādas kairinājums ir atgriezenisks ādas bojājums, kas rodas, testējamo ķimikāliju aplicējot uz laiku līdz četrām stundām.

Ādas korozija ir neatgriezenisku ādas bojājumu rašanās; proti, redzama nekroze, kas caur epidermu skar zemādu un rodas, testējamo ķimikāliju uz ādas aplicējot līdz četrām stundām. Reakcijām uz kodīgumu parasti ir raksturīgas čūlas, asiņošana, asiņainas kreveles un 14 dienu novērošanas perioda beigās — ādas izbalējuma radīta atkrāsošanās, ādas laukumi, kur izkritis apmatojums, un rētas. Neskaidros gadījumos bojājums jānovērtē histopatoloģiski.

Testējamā ķimikālija ir jebkura viela vai maisījums, ko testē ar šo testēšanas metodi.”;

(2) Pielikuma B daļā B.17. nodaļu aizstāj ar šādu:

“B.17. ZĪDĪTĀJU ŠŪNU GĒNU MUTĀCIJU *IN VITRO* TESTI AR GĒNIEM HPRT UN XPRT

IEVADS

1. Šī testēšanas metode (TM) ir ekvivalenta ESAO Testēšanas vadlīnijā (TG) Nr. 476 (2016) aprakstītajam. Testēšanas metodes tiek pastāvīgi pārskatītas zinātnes sasniegumu, mainīgo regulatīvo prasību un dzīvnieku labturības apsvērumu gaismā. Šī pašreizējā pārstrādātā TM B.17 versija atspoguļo gandrīz trīsdesmitgadīgu pieredzi šā testa veikšanā un arī rezultātus, kas gūti, izstrādājot atsevišķu jaunu metodi zīdītāju šūnu gēnu mutāciju *in vitro* testiem, kuros izmanto timidīna kināzes gēnu. TM B.17 pieder pie ģenētiski toksikoloģiskās testēšanas metožu sērijas. ESAO izstrādājusi dokumentu, kas īsi informē par ģenētiski toksikoloģisko testēšanu un sniedz pārskatu par jaunākajiem ESAO genotoksicitātes testēšanas vadlīnijas grozījumiem (1).
2. Šā zīdītāju šūnu gēnu mutāciju *in vitro* testa nolūks ir detektēt ķimikāliju izraisītas gēnu mutācijas. Ar šajos testos izmantotajām šūnu līnijām mēra turpvērstas mutācijas, kas notiek ar reportierģeniem — endogēnisko hipoksantīna–gvanīna fosforiboziltransferāzes gēnu (grauzēju šūnu Hprt, cilvēka šūnu HPRT; šajā testēšanas metodes aprakstā tie apvienoti saukti par gēnu Hprt un HPRT testu) un ksantīna–gvanīna fosforiboziltransferāzes transgēnu (gpt) (tas saukts par XPRT testu). HPRT un XPRT mutāciju testi detektē dažāda spektra ģenētiskus notikumus. Papildus ar šo HPRT testu detektētajiem mutatīvajiem notikumiem (piem., bāzu pāra maiņas mutācijām, nolasīšanas fāzes nobīdēm, mazām delēcijām un insercijām) transgēna gtp autosomālā lokalizācija var dot iespēju detektēt mutācijas, kas radušās no lielām HPRT testā nedetektētām delēcijām un varbūt arī mitotiskām rekombinācijām, jo gēns Hprt atrodas X hromosomā (2) (3) (4) (5) (6) (7). Regulatīviem nolūkiem pašlaik XPRT izmanto mazāk nekā HPRT testu.
3. Izmantotās definīcijas ir sniegtas 1. pielikumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI

4. *In vitro* testos metaboliskai aktivācijai parasti jāizmanto eksogēniskais avots. Eksogēniskā metaboliskās aktivācijas sistēma *in vivo* apstākļus atdarina nepilnīgi.
5. Būtu jāraugās, lai nerodas tādi apstākļi (proti, varbūtēja mijiedarbība ar testēšanas sistēmu), kas novestu pie artefaktuāli pozitīviem rezultātiem, kurus nerada tieša testējamo ķimikāliju un šūnas ģenētiskā materiāla mijiedarbība; pie tādiem apstākļiem pieder arī pH vai osmolalitātes pārmaiņas (8) (9) (10), mijiedarbība ar barotnes komponentiem (11) (12) vai pārāk augsti citotoksicitātes līmeņi (13). HPRT testā par pārāk augstiem uzskata līmeņus, kas pārsniedz 19. punktā definētos ieteicamos augšējos citotoksicitātes līmeņus.

6. Pirms šo testēšanas metodi izmanto attiecībā uz maisījumu, lai iegūtu datus kādai plānotai regulatīvai vajadzībai, jāapsver, vai un kādēļ tā var sniegt tādām nolūkam piemērotus rezultātus. Ja pastāv normatīva prasība maisījumu testēt, tāda apsvēršana nav vajadzīga.

TESTA PRINCIPS

7. Mutantšūnas, kurām Hprt fermenta darbība HPRT testā vai xprt fermenta darbība XPRT testā neizpaužas, ir rezistentas pret purīna analoga 6-tiogvanīna (TG) citostatisko ietekmi. Hprt (HPRT testā) vai gpt (XPRT testā) standartšūnas ir jutīgas pret TG, kurš inhibē šūnu vielmaiņu un šūnām aptur tālāku dalīšanos. Tātad mutantšūnas TG klātbūtnē spēj proliferēt, turpretī normālas šūnas, kas satur Hprt (HPRT testā) vai gpt (XPRT testā) fermentu, to nespēj.
8. Šūnas, kas ir suspensijā vai vienslāņa kultūrās, uz piemērotu laiku (3–6 stundām) gan ar eksogēnisku metaboliskas aktivācijas avotu, gan bez tā (sk. 14. punktu) eksponē testējamajai ķimikālijai, bet pēc tam kultivē apakškultūrās, lai varētu noteikt citotoksicitāti un lai pirms mutantu atlasīšanas varētu notikt fenotipiskā ekspresija (14), (15), (16), (17). Citotoksicitāti nosaka pēc relatīvās izdzīvotības (*RS*), t. i., pēc klonēšanās efektivitātes, ko izmēra tūlīt pēc apstrādes un koriģē attiecībā uz jebkādiem apstrādes laikā notikušiem šūnu zudumiem salīdzinājumā ar negatīvo kontroli (18. punkts un 2. papildinājums). Kultūras, kas apstrādātas, barotnē tur pietiekami ilgu laiku (katra veida šūnām tas ir savs), lai būtu iespējama gandrīz optimāla izraisīto mutāciju fenotipiskā ekspresija (parasti vismaz 7–9 dienas). Kad notikusi fenotipiskā ekspresija, nosaka mutantu biežumu, noteiktu skaitu šūnu izsējot tādā barotnē, kas satur selektīvo līdzekli, ar kuru detektē mutantu kolonijas, un barotnē bez selektīvā līdzekļa, pēc kuras nosaka klonēšanās efektivitāti (dzīvotspēju). Pēc piemērota inkubēšanas laika kolonijas saskaita. Mutantu biežumu aprēķina pēc mutantu koloniju skaita, ko koriģē atbilstoši klonēšanās efektivitātei mutantu selekcijas laikā.

METODES APRAKSTS

Preparāti

Šūnas

9. HPRT un XPRT testiem jāizmanto tādu tipu šūnas, kam apliecināts jutīgums pret ķīmiskiem mutagēniem, augsta klonēšanās efektivitāte, stabils kariotips un stabils spontānu mutantu biežums. Pie HPRT testam visbiežāk izmantotajām šūnām pieder Ķīnas kāmjā šūnu CHO, CHL un V79 līnija, peļu limfomas šūnas L5178Y un cilvēka limfoblastu šūnas TK6 (18) (19). No CHO atvasinātās šūnas AS52, kam ir transgēns gpt (bet gēns Hprt ir deletēts), izmanto XPRT testā (20) (21); HPRT testu ar šūnām AS52 nevar veikt, jo hprt gēni ir deletēti. Citu šūnu līniju izmantošana jāpamato un jāvalidē.

10. Šūnu līnijām regulāri jāpārbauda, vai modālais hromosomu skaits ir stabils un vai nav notikusi kontaminācija ar mikoplazmu (22) (23), un, ja konstatē mikoplazmu vai ja modālais hromosomu skaits ir mainījies, šūnas nav izmantojamas. Jānosaka, kāds ir testēšanas laboratorijā izmantoto šūnu normālais cikla ilgums, un tam jāsakrīt ar publicētajiem šūnu raksturlielumiem. Jāpārbauda arī spontāno mutantu biežums šūnu izejkultūrā, un, ja tas nav pieņemams, kultūra nav izmantojama.
11. Pirms kultūras izmanto šajā testā, tās var būt jāattīra no jau esošām mutantšūnām, piem., HPRT testa vajadzībām kultivējot HAT barotnē, bet XPRT testa vajadzībām — MPA barotnē (5) (24) (sk. 1. papildinājumu). Attīrītās šūnas iespējams saglabāt krioniski un pēc tam atkausēt, lai izmantotu par darba kultūrām. Tikko atkausētu darba kultūru var sākt testam izmantot, kad sasniegts parastais dubultošanās laiks. Izdarot XPRT testu, parastas šūnu AS52 kultūras gadījumā būtu jāizmanto apstākļi, kas garantē transgēna gpt saglabāšanos (20).

Barotne un kultivēšanas apstākļi

12. Kultūru uzturēšanai jāizmanto attiecīgas barotnes un attiecīgi inkubācijas apstākļi (kultivēšanas trauki, mitrināta atmosfēra ar CO₂ koncentrāciju 5 %, inkubācijas temperatūra 37 °C). Šūnu kultūras vienmēr būtu jātur tādos apstākļos, lai būtu nodrošināts, ka augšana notiek eksponenciālā fāzē. Īpaši svarīgi ir izraudzīties tādu barotni un tādas kultivēšanas apstākļus, kuri nodrošina šūnu optimālu augšanu ekspresijas periodā un gan mutantšūnām, gan nemutējušām šūnām — optimālu klonēšanās efektivitāti.

Kultūru sagatavošana

13. Šūnu līnijas tiek pavairotas no izejkultūrām, ko kultūras barotnē iesēj tādā blīvumā, lai apstrādes periodā un ekspresijas periodā šūnas suspensijās vai vienslāņa kultūrās joprojām augtu eksponenciāli (piem., attiecībā uz šūnām vienslāņa kultūrās jāizvairās no konfluences).

Metaboliskā aktivācija

14. Ja strādā ar šūnām, kuru endogēniskā metaboliskā kapacitāte nav pietiekama, jāizmanto eksogēniskas metaboliskās aktivācijas sistēmas. Visplašāk izmantotā sistēma, kuru iesaka pēc noklusējuma, ja vien nav pamata izmantot citu, ir ar kofaktoru papildināta postmitohondriālā frakcija (S9) no graužēju (parasti žurku) aknām, kas apstrādātas ar tādām fermentus inducējošām vielām kā *Aroclor 1254* (25) (26) (27) (28) vai fenobarbitāls kombinācijā ar β-naftoflavonu (29) (30) (31) (32). Pēdējā minētā kombinācija nav pretrunā ar Stokholmas Konvenciju par noturīgajiem organiskajiem piesārņotājiem (33) un jauktas funkcijas oksidāžu inducēšanā izrādījusies tikpat iedarbīga kā *Aroclor 1254* (29) (31). S9 frakciju parasti izmanto koncentrācijā 1–2 % (tilp./tilp.), bet galīgajā testa barotnē koncentrāciju var paaugstināt līdz 10 % (tilp./tilp.). To, kādu eksogēniskās metaboliskās

aktivācijas sistēmas vai metaboliskā inducētāja veidu un koncentrāciju izraugās, var ietekmēt testējamo vielu klase (34) (35) (36).

Testējamās ķīmikālijas sagatavošana

15. Cietas testējamās ķīmikālijas jāgatavo attiecīgos šķīdinātājos un attiecīgā gadījumā pirms šūnu apstrādes jāatšķaida (sk. 16. punktu). Šķīdros testējamās ķīmikālijas var testa sistēmai pievienot tieši un/vai pirms testa sistēmas apstrādes atšķaidīt. Gāzveida vai gaistošas testējamās ķīmikālijas vēlams testēt pēc attiecīgām standarta protokolu modifikācijām, piemēram, apstrādi veicot hermētiski noslēgtos kultivēšanas traukos (37) (38). Testējamās ķīmikālijas preparāti jāgatavo tieši pirms apstrādes, ja vien dati par stabilitāti neliecina, ka tos var glabāt.

TESTA APSTĀKĻI

Šķīdinātāji

16. Šķīdinātājs jāizvēlas tā, lai testējamo ķīmikāliju šķīdību optimizētu, šķīdinātājam negatīvi neietekmējot testa norisi, piem., nemainot šūnu augšanu, neskarot testējamās ķīmikālijas integritāti, nereaģējot ar kultivēšanas traukiem, nepasliktinot metaboliskās aktivācijas sistēmu. Ja vien iespējams, ieteicams vispirms apsvērt, vai neizmantojot šķīdinātāju (vai kultūras barotni) uz ūdens bāzes. Plaši atzīti šķīdinātāji, piemēram, ir ūdens un dimetilsulfoksīds. Galīgajā apstrādes barotnē organiskajiem šķīdinātājiem parasti nevajadzētu pārsniegt 1 % (tilp./tilp.), bet šķīdinātājiem uz ūdens bāzes (sālsūdens vai ūdens) — 10 % (tilp./tilp.). Ja tiek izmantoti ne tik plaši atzīti šķīdinātāji (piem., etanols vai acetons), to izmantošana jāpamato ar datiem, kas apliecina, ka tie sader ar testējamo ķīmikāliju un ar testa sistēmu un ka izmantotajā koncentrācijā tiem nepiemīt genotoksicitāte. Ja šādu apliecināšanu datu nav, svarīgi ir izmantot arī neapstrādātas kontroles (sk. 1. papildinājumu), lai ar tām pierādītu, ka izraudzītais šķīdinātājs nerada nekādu deletējošu vai mutagēnisku ietekmi.

Citotoksicitātes mērīšana un ekspozīcijas koncentrāciju izraudzīšanās

17. Nosakot augstāko testējamās ķīmikālijas koncentrāciju, neizraugās koncentrācijas, kas spēj izraisīt tādas artefaktuāli pozitīvas atbildreakcijas kā pārmērīga citotoksicitāte (sk. 20. punktu), nogulsnes barotnē (sk. 21. punktu) vai manāmas pH vai osmolalitātes pārmaiņas (sk. 5. punktu). Ja testējamā ķīmikālija pievienošanas brīdī manāmi maina barotnes pH, lai nepieļautu artefaktuāli pozitīvus rezultātus un saglabātu pienācīgus kultivēšanas apstākļus, pH var koriģēt, galīgajā apstrādes barotnē pievienojot buferšķīdumu.
18. Koncentrācijas izraugās pēc citotoksicitātes un citiem apsvērumiem (sk. 20.–22. punktu). Kaut arī citotoksicitātes izvērtēšana sākotnējā testā var noderēt, lai sekmīgāk noteiktu galvenajā eksperimentā izmantojamās koncentrācijas, sākotnējais tests nav jāveic obligāti.

Pat ja citotoksicitāte izvērtēta jau no sākuma, galvenajā eksperimentā tā joprojām jānosaka katrai kultūrai. Citotoksicitāti izvērtē pēc *RS*, proti, pēc to šūnu klonēšanās efektivitātes (*CE*), kuras tūlīt pēc apstrādes uzsētas uz platēm, *CE* koriģējot pēc negatīvo kontroļu (kurām izdzīvotība ir 100 %) klonēšanās efektivitātes, sk. formulu 2. papildinājumā.

19. Jāizvērtē vismaz četras testa koncentrācijas (nerēķinot šķīdinātāju un pozitīvās kontroles), kas atbilst pieņemamības kritērijiem (attiecīga citotoksicitāte, šūnu skaits u. c.). Lai gan ir ieteicams izmantot kultūru dublikātus, ar katru testa koncentrāciju var izmantot vai nu replikātus, vai atsevišķas apstrādātas kultūras. Ar vienas noteiktas koncentrācijas atsevišķajām replikātu kultūrām iegūtie rezultāti pārskatā būtu jāatspoguļo atsevišķi, bet datu analīzes vajadzībām tos drīkst apkopot (17). Attiecībā uz testējamām ķīmikālijām, ar kurām tiek uzrādīta neliela citotoksicitāte vai tās nav, parasti noderēs koncentrācijas intervāli ar koeficientu aptuveni no 2 līdz 3. Citotoksicitātes gadījumā izraudzītajām testa koncentrācijām jāaptver gan koncentrācijas, kuras rada citotoksicitāti, gan koncentrācijas, ar kurām citotoksicitāte ir vidēja, neliela vai tās vispār nav. Daudzām testējamajām ķīmikālijām ir novērojama stāva koncentrācijatkarīgās atbildreakcijas līkne, un, lai aptvertu visu citotoksicitātes diapazonu vai lai detalizēti izpētītu devas un atbildreakcijas sakarību, var būt nepieciešams izmantot koncentrācijas ar tuvākiem intervāliem un vairāk nekā četras koncentrācijas, jo īpaši situācijās, kur eksperiments jāatkārto (sk. 43. punktu). Izmantot vairāk nekā 4 koncentrācijas var būt īpaši svarīgi, ja jāizmanto atsevišķas kultūras.
20. Ja maksimālās koncentrācijas pamatā ir citotoksicitāte, ar augstāko koncentrāciju būtu jācenšas panākt *RS* diapazonā no 20–10 %. Piesardzīgi būtu jāinterpretē pozitīvi rezultāti, kas konstatēti tikai ar *RS* 10 % vai zemāku (43. punkts).
21. Kas attiecas uz mazšķīstošām testējamām ķīmikālijām, kuras pie koncentrācijām, kas zemākas par zemāko nešķīstošās frakcijas koncentrāciju, nav citotoksiskas, pie augstākās analizētās koncentrācijas pēc apstrādes ar testējamo ķīmikāliju jārodas ar neapbruņotu aci vai ar invertēto mikroskopu redzamai duļķainībai vai nogulsnēm. Pat ja citotoksicitāte novērojama pie koncentrācijas, kas pārsniedz zemāko nešķīstošās frakcijas koncentrāciju, ieteicams testēt tikai vienu koncentrāciju, pie kuras rodas duļķainība vai acīm redzamas nogulsnes, jo nogulsnes var rezultātus ietekmēt artefaktuāli. Darbojoties ar koncentrāciju, pie kuras rodas nogulsnes, būtu jācenšas nodrošināt, ka nogulsnes neietekmē testa izdarīšanu. Var būt lietderīgi pirms eksperimenta noteikt šķīdību kultūras barotnē.
22. Ja nogulsnes vai ierobežojoša citotoksicitāte netiek novēroti, augstākajai testa koncentrācijai jāatbilst 10 mM, 2 mg/ml vai 2 µl/ml atkarībā no tā, kura ir zemāka (39) (40). Ja testējamās ķīmikālijas sastāvs nav noteikts, piem., tā ir viela, kuras sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, tā ir komplekss reakcijas produkts vai bioloģisks materiāls (t.i., ķīmiska viela, kuras sastāvs nav zināms vai ir mainīgs (UVCB)), (41), vides ekstrakti u. tml., gadījumos, kur netiek novērota pietiekama citotoksicitāte, augstākā koncentrācija var

būt jāpalielina (piem, 5 mg/mL), lai būtu panākta augstāka katra komponenta koncentrācija. Tomēr jāpiebilst, ka attiecībā uz cilvēku zālēm šīs prasības var būt citādas (42).

Kontroles

23. Paralēlas negatīvās kontroles (sk. 16. punktu), proti, tikai šķīdinātājs apstrādes barotnē, ar ko rīkojas tieši tāpat kā ar apstrādātajām kultūrām, ir ikviena eksperimenta nosacījums.
24. Lai varētu pierādīt laboratorijas spēju izmantotā testa protokola apstākļos identificēt mutagēnus un — attiecīgā gadījumā — eksogēniskās metaboliskās aktivācijas sistēmas efektivitāti, ir vajadzīgas paralēlas pozitīvās kontroles. Pozitīvo kontroļu piemēri sniegti zemāk 1. tabulā. Var izmantot alternatīvas pozitīvās kontrolvielas, ja tas pamatoti. Tā kā ģenētiski toksikoloģiskie zīdītāju šūnu *in vitro* testi ir pietiekami standartizēti, testus, kuros izmanto apstrādi ar eksogēnisku metabolisku aktivāciju un bez tās, drīkst izdarīt tikai ar pozitīvu kontroli, kas prasa metabolisku aktivāciju. Šajā gadījumā viena vienīga pozitīva kontroles atbildreakcija apliecinās gan metaboliskās aktivācijas sistēmas darbību, gan testa sistēmas reaģētspēju. Lai pierādītu testa sistēmas jutīgumu, katra pozitīvā kontrole būtu jāizmanto ar vienu vai vairākām tādām koncentrācijām, ar kurām gaidāma reproducējama un detektējama palielināšanās salīdzinājumā ar fonu, turklāt atbildreakciju nedrīkstētu kompromitēt citotoksicitāte, kas pārsniedz šai testēšanas metodei specificētās robežas (sk. 20. punktu).

1. tabula. References ķīmikālijas, ko ieteicams izmantot laboratorijas kompetences novērtēšanai un pozitīvo kontroļu izraudzīšanās vajadzībām

Nosacījums attiecībā uz metabolisko aktivāciju	Lokuss	Viela un CAS numurs
Eksogēniska metaboliska aktivācija nenotiek	<i>Hprt</i>	Etilmetānsulfonāts [CAS Nr. 62-50-0] Etilnitrozūrea [CAS Nr. 759-73-9] 4-nitrohinolīna 1-oksīds [CAS Nr. 56-57-5]
	<i>xprt</i>	Streptonigrīns [CAS Nr. 3930-19-6] Mitomicīns C [CAS Nr. 50-07-7]
Ar eksogēnisku metabolisku aktivāciju	<i>Hprt</i>	3-metilholantrēns [CAS Nr. 56-49-5] 7,12-dimetilbenzantracēns [CAS Nr. 57-97-6] Benz[a]pirēns [CAS Nr. 50-32-8]
	<i>xprt</i>	Benz[a]pirēns [CAS Nr. 50-32-8]

PROCEDŪRA

Apstrāde ar testējamo ķīmikāliju

25. Proliferējošas šūnas ar testējamo ķīmikāliju apstrādā gan metaboliskās aktivācijas sistēmas klātbūtnē, gan bez tās. Ekspozīcijai jāilgst attiecīgu laiku (parasti pietiek ar 3–6 stundām).

26. Minimālais šūnu skaits, ko izmanto katrai testa kultūrai (gan kontrolkultūrai, gan apstrādātai kultūrai), katrā testa posmā jābalsta uz spontāno mutantu biežumu. Vispārīgs princips ir šūnas apstrādāt un pasāžām ņemt tādā skaitā, lai visās testa fāzēs katrā kultūrā saglabātos vismaz 10 spontāni mutanti (17). Parasti spontāno mutantu biežums ir $5\text{--}20 \times 10^{-6}$. Lai spontāno mutantu biežums būtu 5×10^{-6} un lai pietiekams spontāno mutantu skaits (10 vai vairāk) saglabātos arī kultūrās, ko apstrādes laikā apstrādā ar koncentrācijām, kuras rada 90 % citotoksicitāti (10 % RS), jāapstrādā vismaz 20×10^6 šūnas. Turklāt pietiekamā skaitā (bet nekādā gadījumā mazāk par 2 miljoniem) jābūt arī šūnām, ko kultivē ekspresijas periodā un mutantu selekcijas nolūkā uzsēj uz platēm (17).

Fenotipiskās ekspresijas laiks un mutantu biežuma mērīšana

27. Pēc apstrādes perioda šūnas kultivē, lai izpaustos mutantu fenotips. Lai notiktu gandrīz optimāla jauninducētu Hprt un xprt mutantu fenotipiskā ekspresija, parasti pietiek ar minimālo laiku 7 līdz 9 dienas (43) (44). Šajā periodā pastāvīgi veido šūnu apakškultūras, lai visu laiku saglabātos eksponenciāla augšana. Kad fenotipiskā ekspresija notikusi, šūnas pārsēj barotnē ar selektīvo līdzekli (6-tiogvanīnu) un bez tā, lai attiecīgi varētu noteikt mutantu skaitu un klonēšanās efektivitāti selekcijas laikā. Šajā pārsēšanā vienslāņa kultūrām var izmantot trauciņus, bet šūnām suspensijā — mikroiedobju plates. Mutantu selekcijas vajadzībām šūnas jāuzsēj tādā blīvumā, lai būtu garantēta optimāla mutantu izguve (proti, lai nevarētu notikt metaboliska sadarbība) (17). Plates inkubē optimālai koloniju augšanai atbilstošu laiku (piem., 7–12 dienas) un kolonijas saskaita. Mutantu biežumu aprēķina pēc mutantu koloniju skaita, ko koriģē atbilstoši klonēšanās efektivitātei mutantu selekcijas laikā (formulas sk. 2. papildinājumā).

Laboratorijas kompetence

28. Lai pirms testa pastāvīgas izmantošanas iegūtu pietiekamu vajadzīgo pieredzi, laboratorijai jābūt veikušai eksperimentu sēriju ar pozitīvās kontroles references vielām, kam ir dažādi iedarbības mehānismi (tās izraugās no 1. tabulas saraksta un vismaz vienai no tām jābūt tādai, kas ir aktīva ar metabolisku aktivāciju, un vienai — aktīvai bez tās), un ar dažādām negatīvajām kontrolēm (izmantojot dažādus šķīdinātājus/nesējus). Šo pozitīvo un negatīvo kontroļu atbildreakcijām jāaskan ar literatūras datiem. Tas neattiecas uz laboratorijām, kurām pieredze jau ir, t. i., kuru rīcībā ir vēsturiska datubāze, kāda aprakstīta 30.–33. punktā.
29. Lai varētu pierādīt, ka laboratorija ir kompetenta detektēt mutagēniskas ķīmikālijas, noteikt metaboliskās aktivācijas sistēmas darbībspēju un pierādīt, ka šūnu augšanas apstākļi apstrādes laikā, fenotipiskā ekspresija un mutantu selekcija, kā arī atzīmju likšanas procedūras atbilst vajadzīgajam, pozitīvas kontroles vielu (sk. 1. tabulu 25. punktā) izlase jāpēta gan bez metaboliskas aktivācijas, gan ar to. Lai varētu pierādīt testa sistēmas jutību un dinamisko diapazonu, jāizraugās tāds izlases ķīmikāliju koncentrāciju diapazons, kurā pieaugumi virs fona līmeņa būs reproducējami un ar koncentrāciju saistīti.

Vēsturisko kontroļu dati

30. Laboratorijai jānosaka:

- vēsturisks pozitīvo kontroļu diapazons un sadalījums,
- vēsturisks negatīvo (neapstrādātu, ar šķīdinātāju) kontroļu diapazons un sadalījums.

31. Pirmo reizi iegūstot datus par vēsturisku negatīvo kontroļu sadalījumu, paralēlām negatīvajām kontrolēm jāatbilst publicētajiem datiem par kontrolēm (22). Kontroļu sadalījumam tiekot papildinātam ar jauniem eksperimentu datiem, paralēlajām negatīvajām kontrolēm ideālā gadījumā jābūt minētā sadalījuma 95 % kontrolrobežās (17) (45) (46).

32. Laboratorijas vēsturisko negatīvo kontroļu datubāze sākotnēji jāveido ar vismaz 10 eksperimentiem, bet vēlams, lai tajā būtu vismaz 20 eksperimenti, kas veikti salīdzināmos eksperimentēšanas apstākļos. Lai varētu noteikt, cik mainīgi ir laboratorijas pozitīvo un negatīvo kontroļu dati, un parādīt, ka laboratorijā šī metodika “tiek kontrolēta” (46), laboratorijām jāizmanto tādas kvalitātes kontroles metodes kā kontroldiagrammas (piem., C diagrammas vai X joslu diagrammas (47)). Papildu ieteikumi par vēsturisko datu izveidi un izmantošanu (t. i., kritēriji datu iekļaušanai vēsturiskajos datos un izslēgšanai no tiem un konkrēta eksperimenta pieņemamības kritēriji) atrodami literatūrā (45).

33. Negatīvo kontroļu datiem vajadzētu būt mutantu biežumam atsevišķās vai, ieteicams, replikātu kultūrās; sk. aprakstu 23. punktā. Paralēlajām negatīvajām kontrolēm ideālā gadījumā jābūt laboratorijas vēsturisko negatīvo kontroļu datubāzes sadalījuma 95 % kontrolrobežās (17) (45) (46). Tādus paralēlo negatīvo kontroļu datus, kas ir ārpus 95 % kontrolrobežas, iekļaušanai vēsturiskajā kontroļu sadalījumā var pieņemt tikai tad, ja šie dati nav pārmērīgi anomālas vērtības un ja ir pierādījumi, ka testa sistēma “tiek kontrolēta” (sk. augstāk) un nav gadījusies ne tehniska kļūme, ne cilvēka kļūda.

34. Jebkādas eksperimenta protokola pārmaiņas jāapsver, ņemot vērā to atbilstību laboratorijas esošajām vēsturisko kontroļu datubāzēm. Jebkādu būtisku neatbilstību gadījumā jāveido jauna vēsturisko kontroļu datubāze.

DATI UN PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

Rezultātu izklāsts

35. Rezultātu izklāstā jāiekļauj visi citotoksicitātes aprēķināšanai vajadzīgie dati (izteikti kā *RS*). Gan datus par apstrādātajām kontrolēm, gan par kontrolkultūrām jāiekļauj šūnu skaits pēc apstrādes beigām, tūlīt pēc apstrādes uzsēto šūnu skaits un koloniju skaitīšanas rezultāti (vai attiecībā uz mikroiedobju metodi — tādu iedobju skaits, kurās koloniju nav). Katras kultūras *RS* ieteicams izteikt kā procentu attiecībā pret paralēlo šķīdinātāja kontroli (definīcijas sk. 1. papildinājumā).

36. Rezultātu izklāstā jāiekļauj visi mutantu biežuma aprēķināšanai vajadzīgie dati. Gan datos par apstrādātajām kultūrām, gan datos par kontrolkultūrām jāiekļauj: 1) gan ar selekcijas līdzekli, gan bez tā uz platēm uzsēto šūnu skaits (brīdī, kad šūnas uzsēj mutantu selekcijai) un 2) gan attiecībā uz platēm ar selektīvo līdzekli, gan platēm bez selektīvā līdzekļa — saskaitīto koloniju skaits (vai attiecībā uz mikroiedobju metodi, tādu iedobju skaits, kurās koloniju nav) Mutantu biežumu aprēķina pēc mutantu koloniju skaita (uz platēm ar selektīvu līdzekli), kas koriģēts atbilstoši klonēšanās efektivitātei (uz platēm bez selekcijas līdzekļa). Mutantu biežums būtu jāizteic kā mutantsūnu skaits uz miljonu dzīvotspējīgu šūnu (definīcijas sk. 1. papildinājumā).

37. Norāda datus par atsevišķām kultūrām. Turklāt visus datus apkopo tabulas veidā.

Pieņemamības kritēriji

38. Testa pieņemamības pamatā ir šādi kritēriji:

- paralēlā negatīvā kontrole tiek uzskatīta par pieņemamu iekļaušanai laboratorijas vēsturisko negatīvo kontroļu datubāzē saskaņā ar 33. punktu;
- paralēlās pozitīvās kontroles (sk. 24. punktu) inducē atbildreakcijas, kas atbilst tām, kuras ģenerētas vēsturiskajā pozitīvo kontroļu datubāzē iekļautajās kontrolēs, un izsaka statistiski ievērojamu pieaugumu salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli;
- testēšana notikusi ar diviem eksperimentēšanas nosacījumiem (t.i., ar metabolisko aktivāciju un bez tās), ja vien vienā no tiem rezultāti nav bijuši pozitīvi (sk. 25. punktu);
- šūnas un koncentrācijas bijušas analizējamās pietiekamā skaitā (25., 26. un 19. punkts);
- maksimālās koncentrācijas izraudzīšanās kritēriji atbilst 20., 21. un 22. punktā aprakstītajam.

Rezultātu izvērtēšana un interpretēšana

39. Ja visi pieņemamības kritēriji ir izpildīti, testējamo ķīmikāliju par viennozīmīgi pozitīvu uzskata tad, ja ar kādu no izvērtētajiem eksperimentēšanas nosacījumiem:

- vismaz vienai no testa koncentrācijām salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli novērojams statistiski nozīmīgs palielinājums;
- šo palielinājumu izvērtējot ar attiecīgu trenda testu, konstatējams, ka tas saistīts ar devu;
- kāds no rezultātiem ir ārpus vēsturisko negatīvo kontroļu datu sadalījuma (piem., ārpus 95 % kontrolrobežām Puasona sadalījumā; sk. 33. punktu).

Ja visi šie kritēriji ir izpildīti, šajā testēšanas sistēmā uzskata, ka testējamā ķīmikālija kultivētās zīdītāju šūnās spēj izraisīt gēnu mutācijas. Ieteikumi par piemērotākajām statistiskajām metodēm atrodami literatūrā (46) (48).

40. Ja ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķīmikāliju par viennozīmīgi negatīvu uzskata tad, ja ne ar vieniem no izvērtētajiem eksperimentēšanas nosacījumiem:

- ne ar vienu no testa koncentrācijām salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli nav novērojams statistiski nozīmīgs palielinājums;
- ar attiecīgu trenda testu nav konstatējams ar koncentrāciju saistīts palielinājums,
- visi rezultāti ir vēsturisko negatīvo kontroļu datu sadalījuma robežās (piem., 95 % kontrolrobežās Puasona sadalījumā); sk. 33. punktu).

Tādā gadījumā šajā testa sistēmā uzskata, ka testējamā ķīmikālija nespēj kultivētās zīdītāju šūnās izraisīt gēnu mutācijas.

41. Nepārprotami pozitīva vai negatīva atbildreakcija nav obligāti jāverificē.

42. Ja atbildreakcija nav atbilstoši iepriekš rakstītajam nedz nepārprotami negatīva, nedz nepārprotami pozitīva vai lai varētu labāk noteikt rezultāta bioloģisko relevantumu, šie dati jāizvērtē ekspertam un/vai jāturpina pētīt. Var būt lietderīgi izdarīt atkārtotu eksperimentu ar modificētiem nosacījumiem (piem., koncentrāciju intervāls, atšķirīgi metaboliskās aktivācijas nosacījumi (proti, S9 koncentrācija vai S9 avots]).

43. Retos gadījumos datu kopums pat pēc sīkākas izpētes neļauj izdarīt secinājumu par pozitīviem vai negatīviem rezultātiem. Tāpēc būtu jāsecina, ka testējamās ķīmikālijas atbildreakcija bijusi neskaidra (to vienlīdz varbūtīgi ir interpretēt gan kā pozitīvu, gan kā negatīvu).

Testēšanas pārskats

44. Testēšanas pārskatā norāda šādu informāciju.

Testējamā ķīmikālija:

- avots, sērijas numurs, izmantošanas termiņš, ja pieejams;
- pašas testējamās ķīmikālijas stabilitāte, ja zināms;
- testējamās ķīmikālijas šķīdība un stabilitāte šķīdinātājā/nesējā, ja zināms;
- pH, osmolalitātes un nogulšņu mērījums barotnē, kurā testējamā ķīmikālija pievienota (attiecināms gadījumā).

Vienkomponenta viela:

- izskats, šķīdība ūdenī un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības;
- ķīmiskā identifikācija, piemēram, *IUPAC* vai *CAS* nosaukums, *CAS* numurs, *SMILES* vai InChI kods, struktūrformula, tīrība, attiecīgā gadījumā, ja praktiski iespējams, piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. tml.

Daudzkomponentu viela, UVCB un maisījumi:

- iespējami izsmelīgi raksturoti pēc komponentu ķīmiskās identitātes (sk. iepriekš), kvantitatīvās sastopamības un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām.

Šķīdinātājs:

- šķīdinātāja izraudzīšanās pamatojums;
- šķīdinātāja īpatsvars galīgajā kultūras barotnē.

Šūnas:

attiecībā uz laboratorijas pamatkultūrām:

- kultūru tips, šūnu līniju avots;
- pasāžu skaits, ja uzzināms, un to vēsture attiecīgajā laboratorijā;
- kariotipiskās īpašības un/vai modālais hromosomu skaits;
- šūnu kultūru audzēšanas metodes;
- mikoplazmas neesība;
- šūnu dubultošanās laiks.

Testa nosacījumi:

- koncentrāciju izvēles un kultūru skaita izraudzīšanās pamatojums, piem., citotoksicitātes dati un šķīdības ierobežojumi;
- barotnes sastāvs, CO₂ koncentrācija, mitruma līmenis;
- testējamās ķīmikālijas koncentrācija, izteikta kā galīgā koncentrācija kultūras barotnē (piem., kultūras barotnes µg vai mg/ml vai mM);
- barotnē pievienotā šķīdinātāja un testējamās ķīmikālijas koncentrācija (un/vai tilpums);
- inkubācijas temperatūra;
- inkubācijas laiks;
- apstrādes ilgums;
- šūnu blīvums apstrādes laikā;
- metaboliskās aktivācijas sistēmas veids un sastāvs (S9 avots, S9 maisījuma sagatavošanas metode, S9 maisījuma koncentrācija vai tilpums un S9 koncentrācija vai tilpums galīgajā barotnē, S9 kvalitātes kontroles);
- attiecībā uz katru no apstrādes nosacījumiem — pozitīvās un negatīvās kontroles vielas, galīgās koncentrācijas;

- fenotipiskās ekspresijas periods (norādot uzsēto šūnu skaitu, subkultūras un attiecīgā gadījumā barošanas grafiku);
- selektīvā līdzekļa identitāte un koncentrācija;
- testu pieņemamības kritēriji;
- dzīvotspējīgo šūnu un mutantšūnu skaitīšanas metodes;
- citotoksicitātes mērīšanas metodes;
- jebkāda citotoksicitātei un izmantotajai metodei relevanta papildinformācija;
- inkubācijas laiks pēc uzsēšanas;
- kritēriji, pēc kuriem novērtē, vai pētījuma rezultāts ir pozitīvs, negatīvs vai neskaidrs;
- pH, osmolalitātes un izgulsnēšanās noteikšanai izmantotās metodes.

Rezultāti:

- par katru kultūru — apstrādāto šūnu un apakškultūrām izmantoto šūnu skaits;
- citotoksicitātes mērījumi un citi novērojumi, ja tādi ir;
- izgulsnēšanās pazīmes un noteikšanas laiks;
- selektīvā un neselektīvā barotnē uzsēto šūnu skaits;
- koloniju skaits neselektīvajā barotnē un rezistentu koloniju skaits selektīvajā barotnē, saistītais mutantu biežums;
- ja iespējams, koncentrācijas—atbildreakcijas sakarība;
- paralēlās negatīvās (šķīdinātājs) un pozitīvās kontroles dati (koncentrācijas un šķīdinātāji);
- vēsturisko negatīvo (šķīdinātājs) un pozitīvo kontroļu dati ar diapazoniem, vidējām vērtībām, standartnovirzēm un ticamības intervālu (piem., 95 %), kā arī datu skaits;
- statistiskās analīzes (par atsevišķām kultūrām un attiecīgā gadījumā par apkopotiem replikātiem) un p-vērtības, ja tādas ir.

Rezultātu iztirzājums

Secinājumi

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) UNEP. (2001). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Available at: [<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). Available upon request from the Organisation for Economic Cooperation and Development.
- (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. Available at: [<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. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Bāzu pāru maiņas mutagēni: ķimikālijas, kas izraisa DNS bāzu pāru maiņu.

Ķimikālija: viela vai maisījums.

Klonēšanās efektivitāte: to zemā blīvumā uzsēto šūnu procents, no kurām var izaugt pieskaitāma kolonija.

Koncentrācijas: testējamās ķimikālijas galīgās koncentrācijas kultūras barotnē.

Citotoksicitāte: attiecībā uz testiem, ko aptver šī testēšanas metode, citotoksicitāte ir apstrādāto šūnu relatīvās izdzīvotības samazinājums salīdzinājumā ar negatīvo kontroli (sk. attiecīgo punktu).

Turpvērsta mutācija: tāda gēna mutācija no vecāktipa uz mutantformu, kura maina vai izdzēš iekodētā proteīna fermentatīvo darbību vai tā funkciju.

Nolasīšanas fāzes nobīdes mutagēni: ķimikālijas, kas DNS molekulā izraisa viena vai vairāku bāzu pāru pievienošanu vai izžušanu.

Genotoksisks: vispārīgs termins, kas aptver visu veidu bojājumus DNS vai hromosomās, arī DNS pārrāvumus, aduktus, pārkārtosumus, mutācijas, hromosomu aberācijas un aneiploidiju. Ne visas genotoksiskās ietekmes rada mutācijas vai noturīgus hromosomu bojājumus.

HAT barotne: barotne, kuras sastāvā ir hipoksantīns, aminopterīns un timidīns un kuru izmanto Hprt mutantu attīrīšanai.

Mitotiska rekombinācija: mitozes laikā notiekoša homologisku hromatīdu rekombinācija, kuras rezultātā var inducēties DNS dubultpavedienu pārtraukumi vai zust heterozigotāte.

MPA barotne: barotne, kuras sastāvā ir ksantīns, adenīns, timidīns, aminopterīns un mikofenolskābe un kuru izmanto Xprt mutantu attīrīšanai.

Mutagēnisks: tāds, kas pārmantojami maina vienu vai vairākas DNS bāzu pāru sekvenču gēnos vai hromosomu struktūru (hromosomu aberācijas).

Mutantu biežums (MF): konstatēto mutantu koloniju skaits, kas dalīts ar selektīvā barotnē uzsēto šūnu skaitu un pārrēķināts atbilstoši klonēšanās efektivitātei (vai dzīvotspējai) selekcijas laikā.

Fenotipiskās ekspresijas laiks: tas laiks pēc apstrādes, kad ģenētiskā pārmaiņa nostiprinās genomā un jebkādi līdzšinējie gēna produkti tiktāl izsīkst, ka mainās arī fenotipiskā pazīme.

Relatīvā izdzīvotība (RS): RS izmanto par apstrādes izraisītas citotoksicitātes mēru. RS ir tūlīt pēc apstrādes uzsētu šūnu klonēšanās efektivitāte (CE), kas pārrēķināta atbilstoši jebkadam šūnu zudumam apstrādes laikā, salīdzinājumā ar klonēšanās efektivitāti negatīvajās kontrolēs (tajās konstatēto izdzīvotību pieņem par 100 %).

Aknu S9 frakcijas: ar 9000g centrifugēta aknu homogenāta supernatants, t. i., jēlu aknu ekstrakts.

S9 maisījums: aknu S9 frakcijas un metaboliskajai fermentatīvajai darbībai nepieciešamo kofaktoru maisījums.

Šķīdinātāja kontrole: vispārīgs termins, ar ko definē kontroles kultūras, kuras saņem vienīgi testējamās ķīmikālijas šķīdināšanai izmantoto šķīdinātāju.

Testējamā ķīmikālija: jebkura viela vai maisījums, kuru testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

Neapstrādāta kontrole: kultūras, kuras neapstrādā (t. i., ne ar testējamo ķīmikāliju, ne ar šķīdinātāju), bet ar kurām paralēli izdara tādas pašas manipulācijas kā ar kultūrām, kuras apstrādā ar testējamo ķīmikāliju.

UVCB: ķīmiskas vielas, kuru sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kompleksi reakcijas produkti un bioloģiski materiāli.

2. papildinājums

CITOTOKSICITĀTES UN MUTANTU BIEŽUMA NOTEIKŠANAS FORMULAS

Citotoksicitāti izvērtē pēc relatīvās izdzīvotības, proti, pēc to šūnu klonēšanās efektivitātes (*CE*), kuras tūlīt pēc apstrādes uzsētas uz platēm, *CE* koriģējot atbilstoši negatīvo kontroļu klonēšanās efektivitātei (kurām izdzīvotība ir 100 %), sk. *RS* formulu zemāk.

Koriģēto *CE* ar testējamo ķīmikāliju apstrādātai kultūrai aprēķina šādi:

$$\text{Adjusted CE} = \frac{\text{Number of cells at the end of treatment}}{\text{Number of cells at the beginning of treatment}}$$

RS ar testējamo ķīmikāliju apstrādātai kultūrai aprēķina šādi:

$$RS = \frac{\text{Adjusted CE in treated culture}}{\text{Adjusted CE in the solvent control}} \times 100$$

Mutantu biežums ir mutantu koloniju klonēšanās efektivitāte selektīvā barotnē, dalīta ar klonēšanās efektivitāti neselektīvā barotnē; abas efektivitātes mērītas vienai un tai pašai kultūrai selekcijas brīdī.

$$\text{Mutant frequency} = \frac{\text{Cloning efficiency of mutant colonies in selective medium}}{\text{Cloning efficiency in non – selective medium}}$$

Ja klonēšanās efektivitātes noteikšanai izmanto plates:

$$CE = \text{koloniju skaits} / \text{uz plates uzsēto šūnu skaits}$$

Ja klonēšanās efektivitātes noteikšanai izmanto mikroiedobju plates:

Koloniju skaitu uz vienu mikroiedobju plates iedobi raksturo ar Puasona sadalījumu.

$$\text{klonēšanās efektivitāte} = -\text{LnP}(0) / \text{vienā iedobē uzsēto šūnu skaits}$$

$-\text{LnP}(0)$ ir varbūtīgais tukšo iedobju skaits no apsēto iedobju skaita, un to apraksta ar formulu

$$\text{LnP}(0) = -\text{Ln}(\text{tukšo iedobju skaits} / \text{apsēto iedobju skaits})'';$$

(3) Pielikuma B daļā B.22. nodaļu aizstāj ar šādu:

“B.22. GRAUZĒJU DOMINANTO LETĀLO MUTĀCIJU TESTS

IEVADS

1. Šī testēšanas metode (TM) ir ekvivalenta ESAO Testēšanas vadlīnijā (TG) Nr. 478 (2016) aprakstītajam. Testēšanas metodes tiek pastāvīgi pārskatītas zinātnes sasniegumu, mainīgo regulatīvo prasību un dzīvnieku labturības apsvērumu gaismā. Šī modificētā testēšanas metodes versija atspoguļo vairāk nekā trīsdesmit gadu pieredzi šā testa veikšanā un šā testa potenciālu tikt integrētam vai kombinētam ar tādiem citiem toksiskuma testiem kā pētījumi par ontogēnētisko un reproduktīvo toksicitāti vai genotoksicitāti; tomēr šā testa ierobežojumu dēļ, kā arī tādēļ, ka tajā izmanto daudz dzīvnieku, to paredzēts izmantot nevis par primāru metodi, bet gan par papildu testēšanas metodi, kuru var izmantot tad, ja regulatīvās prasības neatstāj citu alternatīvu. Ja toksiskumu testē kombinēti, iespējams būtiski samazināt testos izlietoto dzīvnieku skaitu. ESAO nesen izstrādājusi dokumentu, kas īsi informē par ģenētiski toksikoloģisko testēšanu un sniedz pārskatu par jaunākajiem ESAO genotoksicitātes testēšanas vadlīnijas grozījumiem (1).
2. Dominanto letālo mutāciju (DL) testa nolūks ir izpētīt, vai ķīmikālijas neizraisa mutācijas, kuru cēlonis ir hromosomu aberācijas dīgļšūnās. Dominanto letālo mutāciju tests genotoksicitātes novērtēšanai ir relevants arī tāpēc, ka, lai gan dažādām sugām *in vivo* metabolisms, farmakokinētika un DNS reparācijas procesi var atšķirties, šie faktori tomēr ir aktīvi un piedalās atbildreakcijā. DL mutācijas inducēšanās pēc tam, kad testa dzīvnieks eksponēts testējamai ķīmikālijai, liecina, ka ķīmikālija skārusi dīgļaudus.
3. DL mutācijas izraisa embrija vai augļa nāvi. DL mutācijas inducēšanās pēc tam, kad testa dzīvnieks eksponēts testējamai ķīmikālijai, liecina, ka ķīmikālija skārusi dīgļšūnas.
4. DL tests ir relevants beigupunkts cilvēka apdraudējuma un pa dīgļlīniju nodotu ģenētisku slimību riska prognozēšanā un noder tam, lai ar somatisku *in vivo* beigupunktu palīdzību apstiprinātu pozitīvus testu rezultātus. Tomēr šim testam vajag daudz dzīvnieku un tas ir darbietilpīgs; tāpēc tā veikšana ir ļoti dārga un patērē daudz laika. Tā kā dominantu letālu mutāciju spontālais biežums ir diezgan augsts, šā testa jutīgums nelielu mutāciju biežuma palielinājumu detektēšanā parasti ir ierobežots.
5. Galveno terminu definīcijas sniegtas 1. papildinājumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI

6. Šo testu visbiežāk izdara ar pelēm (2) (3) (4), taču dažos gadījumos, ja tas zinātniski pamatoti, var būt lietderīgi izmantot tādas citas sugas kā žurka (5) (6) (7) (8). Parasti DL ir

lielu hromosomālu aberāciju (strukturālu un skaitlisku anomāliju) rezultāts (9) (10) (11), taču nevar izslēgt gēnu mutācijas. *DL* mutācija ir tāda tieši dīglšūnā radusies vai agrīnā embrijā pēc apaugļošanas konstatēta mutācija, kura neizraisa gametas disfunkciju, bet ir apaugļotajai olšūnai vai augošajam embrijam letāla.

7. Atsevišķus tēviņus attiecīgos intervālos secīgi pāro ar iepriekš nepārotām mātītēm. Pēc apstrādes notikušo pārošanās reižu skaits ir atkarīgs no *DL* pētījuma galanolūka (23. punkts), un tam jābūt tādām, lai būtu drošība, ka attiecībā uz *DL* ir izvērtētas visas vīrišķo dīglšūnu nobriešanas fāzes (12).
8. Ja ir pierādījumi, ka testējamā ķimikālija vai tās metabolīts vai metabolīti sēkliniekos nenokļūš, šo testu izmantot nav lietderīgi.

TESTA PRINCIPS

9. Parasti tēviņus attiecīgā ekspozīcijas ceļā eksponē testējamai ķimikālijai un pāro ar neapstrādātām iepriekš nepārotām mātītēm. Izmantojot secīgus pārošanas intervālus, var testēt dažādu tipu dīglšūnas. Kad pēc pārošanas pagājis attiecīgs laiks, mātītes eitanazē un tām izpēta dzemdi, lai noteiktu implantējušos augļus un nedzīvo un dzīvo embriju skaitu. Testējamās ķimikālijas dominanto letalitāti nosaka, dzīvo implantējušos augļu skaitu uz vienu mātīti apstrādātajā grupā salīdzinot ar dzīvo implantējušos augļu skaitu uz vienu mātīti nesēja/šķīdinātāja kontrolgrupā. Pārsvars, kāds nedzīvo implantējušos augļu skaitam uz vienu mātīti apstrādātajā grupā ir pār nedzīvo implantējušos augļu skaitu uz vienu mātīti kontrolgrupā, atspoguļo testējamās ķimikālijas inducēto pēcimplantācijas zudumu. Pēcimplantācijas zudumu aprēķina, nosakot nedzīvo implantējušos augļu skaita attiecību pret implantējušos augļu kopskaitu apstrādātajā grupā un to salīdzinot ar nedzīvo implantējušos augļu skaita attiecību pret implantējušos augļu kopskaitu kontrolgrupā. Pirmsimplantācijas zudumu var aplēst, salīdzinot, kāds apstrādātajā grupā un kontrolgrupā ir dzelteno ķermeņu skaits mīnus implantējušos augļu kopskaits vai arī implantējušos augļu kopskaits uz vienu mātīti.

LABORATORIJAS KOMPETENCES VERIFICĒŠANA

10. Kompetence šā testa veikšanā jāpierāda, demonstrējot spēju reproducēt dominanto letālo mutāciju biežumu no publicētiem datiem (piem., (13) (14) (15) (16) (17) (18)) ar tādām pozitīvo kontroļu vielām (arī ja atbildreakcijas ir vājas) kā 1. tabulas sarakstā norādītās un ar nesēju kontrolēm un iegūstot negatīvo kontroļu biežumus, kas atbilst pieņemamam datu diapazonam 1 (sk. atsaucē augstāk) vai laboratorijas vēsturisko kontroļu sadalījumam, ja tāds pieejams.

METODES APRAKSTS

Preparāti

Dzīvnieku sugas izraudzīšanās

11. Jāizmanto veseli dzimumnobrieduši tipisku laboratorijas celmu dzīvnieki. Parasti izmanto peles, bet var būt lietderīgi izmantot arī žurkas. Var izmantot arī jebkuras citas piemērotas sugas zīdītājus, ja vien pārskatā tas tiek zinātniski pamatots.

Dzīvnieku turēšanas un barošanas apstākļi

12. Attiecībā uz grauzējiem telpā, kurā tur eksperimenta dzīvniekus, jābūt 22 °C (± 3 °C) temperatūrai. Relatīvajam mitrumam ideālā gadījumā jābūt 50–60 %, bet katrā ziņā vismaz 40 % un, vēlams, ne augstākam par 70 %, izņemot telpu uzkopšanas laiku. Dzīvniekus 12 stundas diennaktī tur mākslīgā apgaismojumā, bet 12 stundas — tumsā. Var izmantot parasto laboratorijas barību ar neierobežotu piekļuvi dzirdināmajam ūdenim. Barības izvēli var ietekmēt vajadzība tai piemaisīt testējamo ķīmikāliju, ja ķīmikāliju ievada šādā ceļā. Pirms apstrādes vai pārošanas, ja netiek gaidīts vai novērots, ka grauzēji izturēsies agresīvi, tos ieteicams turēt mazās viendzimuma grupās (ne vairāk kā pa pieci), vēlams, būros ar cietu grīdu un ar attiecīgi bagātinātu vidi. Ja tas zinātniski pamatoti, dzīvniekus var turēt atsevišķi.

Dzīvnieku sagatavošana

13. Veselus un dzimumnobriedušus pieaugušus tēviņus un mātītes nejaušināti sadala kontrolgrupās un apstrādes grupās. Katru dzīvnieku unikālā veidā identificē, izmantojot humānu, minimāli invazīvu metodi (piem., apgredzenojot, izmantojot krotālijas, ievietojot mikroshēmu vai izmantojot biometrisku identificēšanu, bet ne apgriežot ausis vai pirkstus) un vismaz piecas dienas aklimatizē laboratorijas apstākļiem. Būrus izvieto tā, lai būru novietojuma varbūtējā ietekme būtu iespējami maza. Nedrīkst pieļaut pozitīvās kontroles un testējamās ķīmikālijas šķērskontaminēšanos. Pētījuma sākumā dzīvnieku masas atšķirībām jābūt minimālām un tās nedrīkst pārsniegt ±20 % no vidējās masas, kas noteikta katram dzimumam atsevišķi.

Devu sagatavošana

14. Pirms dzīvniekiem dod devas, cietas testējamās ķīmikālijas jāizšķīdina vai jāsuspendē attiecīgos šķīdinātājos vai nesējos vai jāpievieno uzturam vai dzirdināmajam ūdenim. Šķidras testējamās ķīmikālijas var dot tādas pašas vai pirms devu došanas atšķaidīt. Inhalatīvas ekspozīcijas vajadzībām testējamās ķīmikālijas atkarībā no to fizikālķīmiskajām īpašībām var būt gāzes, tvaiku vai cietu/šķidru daļiņu aerosola veidā. Ja vien dati par testējamās ķīmikālijas preparātu stabilitāti neliecina, ka tos var uzglabāt, un nav noteikti pareizi glabāšanas nosacījumi, jāizmanto svaigi pagatavoti preparāti.

Testa nosacījumi

Šķīdinātājs/nesējs

15. Lietotajās devās šķīdinātājam vai nesējam nedrīkst būt toksiskas ietekmes un nedrīkst būt aizdomas, ka tas spēj reaģēt ar testējamo ķīmikāliju. Citu, mazāk izplatītu šķīdinātāju vai nesēju izmantošana jāpamato ar atsaucē datiem par to saderību. Ieteicams vienmēr, kad vien iespējams, vispirms apsvērt, vai neizmantot šķīdinātāju vai nesēju uz ūdens bāzes. Plaši izmantoti saderīgi šķīdinātāji/nesēji ir, piem., ūdens, fizioloģiskais šķīdums, metilcelulozes šķīdums, karboksimetilcelulozes nātrija sāls šķīdums, olīveļļa un kukurūzas eļļa.

Pozitīvās kontroles

16. Būtu vienmēr jāizmanto paralēlas pozitīvas kontroles dzīvnieki, ja vien laboratorija nav apliecinājusi kompetenci testa veikšanā un vēl nesen (piem., pēdējo piecu gadu laikā) testu izmantojusi regulāri. Tomēr pozitīvās kontroles dzīvnieki nav jāapstrādā tādā pašā apstrādes ceļā kā dzīvnieki, kas saņem testējamo ķīmikāliju; nav arī jāņem paraugi no visiem pārošanas intervāliem. Pozitīvās kontroles vielām jābūt tādām, par kurām zināms, ka testam izmantotajos apstākļos tās rada *DL*. Izņemot apstrādi, ar kontrolgrupu dzīvniekiem jārīkojas tieši tāpat kā ar apstrādāto grupu dzīvniekiem.
17. Pozitīvās kontroles vielu devas jāizraugās tā, lai tās konsekvēnti radītu pozitīvu ietekmi, kura izpaužas kā dominantas letālas mutācijas, taču lai šī ietekme būtu vāja vai vidēja, tādējādi paverot iespēju kritiski izvērtēt testa veikspēju un jutīgumu. Pozitīvās kontroles vielu un attiecīgu devu piemēri sniegti 1. tabulā.

1. tabula. Pozitīvās kontroles vielu piemēri

Viela [CAS Nr.] (atsauces Nr.)	Iedarbīgo devu diapazons (mg/kg) (grauzēju suga)	Devu došanas laiks (dienas)
Trietilēnmelamīns [51-18-3] (15)	0,25 (pelēm)	1
Ciklofosfamīds [50-18-0] (19)	50–150 (pelēm)	5
Ciklofosfamīds [50-18-0] (5)	25–100 (žurkām)	1
Etilmetānsulfonāts [62-50-0] (13)	100–300 (pelēm)	5
Monomērakrilamīds [79-06-1] (17)	50 (pelēm)	5
Hlorambucils [305-03-3] (14)	25 (pelēm)	1

Negatīvās kontroles

18. Katrā paraugošanas reizē jābūt arī negatīvās kontroles dzīvniekiem, ko apstrādā tikai ar šķīdinātāju vai nesēju, bet pārējās darbības izdara tāpat kā ar grupām, kam dotas devas

(20). Ja nav vēsturisku vai publicētu kontroldatu, kas liecinātu, ka izraudzītais šķīdinātājs/nesējs neierosina *DL* vai citu kaitīgu iedarbību, katrā paraugošanas reizē jābūt arī neapstrādātiem kontroldzīvniekiem, lai varētu konstatēt, cik pieņemami ir nesēju izmantot par kontrolvielu.

PROCEDŪRA

Dzīvnieku skaits

19. Atsevišķus tēviņus attiecīgos iepriekš noteiktos intervālos (piem., ar nedēļas intervālu, 21. un 23. punkts) secīgi pāro ar, vēlams, vienu atsevišķu iepriekš nepārotu mātīti. Tēviņu skaits grupā būtu iepriekš jānosaka tā, lai ar to pietiktu (kombinācijā ar katrā pārošanas intervālā pāroto mātīšu skaitu) tādas statistiskas jaudas iegūšanai, kāda vajadzīga, lai detektētu, ka *DL* biežums vismaz dubultojas (44. punkts).
20. Ar statistiskās jaudas aprēķiniem būtu iepriekš jānosaka, ar kādu mātīšu skaitu uz vienu pārošanas intervālu būs iespējams detektēt, ka *DL* biežums vismaz dubultojas (proti, tikdaudz grūsnu mātīšu, lai būtu iegūti vismaz 400 implantējušies augļi) (20) (21) (22) (23) un lai būtu gaidāms vismaz viens nedzīvs implantējies auglis uz analizējamo vienību (t.i. vienai devai atbilstošo pārošanas grupu) (24).

Devu došanas periods un pārošanas intervāli

21. Pārošanas intervālu skaits pēc apstrādes ir atkarīgs no apstrādes grafika un ar to būtu jānodrošina, ka attiecībā uz *DL* inducēšanos jāizvērtē visas vīrišķo dīgļšūnu nobriešanas fāzes (12) (25). Kas attiecas uz vienu apstrādi, proti, līdz piecām devu došanas reizēm dienā, ir ieteicams, lai pēc pēdējās apstrādes ar nedēļu ilgiem intervāliem notiktu 8 (peļu) vai 10 (žurku) pārošanās. Ja devu došanas reizes ir vairākas, proporcionāli devu došanas perioda paildzināšanai var samazināt pārošanas intervālu skaitu, taču saglabājot mērķi izvērtēt visas spermatogēnēzes fāzes (piem., ja eksponēšana ilgusi 28 dienas, peļu gadījumā visu spermatogēnēzes fāžu izvērtēšanai pietiek tikai ar 4 pārošanas reizēm nedēļā). Visi apstrādes un pārošanas grafiki būtu zinātniski jāpamato.
22. Mātītes būtu jāatstāj kopā ar tēviņiem vismaz vienu estrālo ciklu (piem., gan pelēm, gan žurkām vienu estrālo ciklu aptver viena nedēļa). Mātītes, kas kādā nedēļu ilgā intervālā nav pārojušās, var izmantot vēlākam pārošanas intervālam. Tās var arī atstāt, līdz pārošanās notikusi, par ko liecina sperma vagīnā vai vagināla korķa esība.
23. Izmantotā ekspozīcija un pārošanas režīms ir atkarīgi no *DL* pētījuma galanolūka. Ja mērķis ir noteikt, vai kāda konkrēta ķīmikālija pati par sevi inducē *DL* mutācijas, atzīts paņēmieni ir eksponēt dzīvniekus visā spermatogēnēzes ciklā (piem., pelei 7 nedēļas, 5–7 apstrādes nedēļā) un pārrot tos vienreiz tā noslēgumā. Tomēr, ja mērķis ir apzināt pret *DL* inducēšanos jutīgo dīgļšūnu tipu, priekšroka dodama vienreizējai vai piecas dienas ilgai ekspozīcijai, kam seko pārošana reizi nedēļā.

Devu līmeņi

24. Iepriekšējs diapazona noteikšanas pētījums, kas jāizdara tāpēc, ka nav devas izvēlei piemērotu datu, jāveic tajā pašā laboratorijā, izmantojot to pašu sugu, celmu, dzimumu un apstrādes režīmu, kas tiks izmantoti galvenajā testā (26). Pētījuma mērķim jābūt noskaidrot maksimālo panesamo devu (*MTD*), kas ir lielākā pieļaujamā deva, kura pētījuma ilgumam atbilstošā laikā ir panesama bez pētījumu ierobežojošu toksiskuma pazīmju izraisīšanas (piem., inducē anormālu izturēšanos vai reakcijas, nelielu ķermeņa masas samazināšanos vai citotoksicitāti hematopoētiskajā sistēmā, bet neizraisa nāvi vai tādas sāpju, ciešanu vai diskomforta pazīmes, kā dēļ būtu humāni jāizdara eitanāzija (27)).
25. *MTD* arī nedrīkst nelabvēlīgi ietekmēt pārošanās rezultativitāti (21).
26. Testējamās ķīmikālijas, kuras zemā netoksiskā devā iedarbojas bioloģiski specifiski (tādas kā hormoni un mitogēni), un ķīmikālijas, kurām ir ļoti izteiktas toksikokinētiskās īpašības, var būt šo devu noteikšanas kritēriju izņēmumi un tātad attiecībā uz devām var būt jānovērtē atsevišķi.
27. Lai iegūtu informāciju par devas–atbildreakcijas sakarību, pilnīgā pētījumā jāiekļauj negatīva kontrolgrupa un vismaz trīs devu līmeņi, kuru atstatuma koeficients parasti ir 2, bet nepārsniedz 4. Ja testējamai ķīmikālijai diapazona noteikšanas pētījumā toksiskums neizpaužas vai ķīmikālijas toksiskums neizpaužas uz esošo datu pamata, lielākajai vienreizējai devai jābūt 2000 mg uz kg ķermeņa masas. Ja testējamai ķīmikālijai toksiskums tomēr izpaužas, *MTD* jābūt augstākajai ievadītajai devai un izmantotajiem devu līmeņiem būtu jāaptver diapazons no maksimālās devas līdz devai, kas ir maztoksiska vai netoksiska. Attiecībā uz netoksiskām ķīmikālijām robeždeva devu došanas periodam 14 dienas vai vairāk ir 100 mg uz kg ķermeņa masas dienā, bet devu došanas periodiem, kas nesasniedz 14 dienas, — 2000 mg uz kg ķermeņa masas dienā.

Devu došana

28. Testi jāplāno, ņemot vērā iespējamo cilvēka ekspozīcijas ceļu. Kā pamatots var izraudzīties dažādus ekspozīcijas ceļus, piem., ar uzturu, ar dzirdināmo ūdeni, ievadīšanu zemādas audos, intravenozu ievadīšanu, vietēju aplikāciju, ieelpošanu, perorālu uzņemšanu (ar gavāžu) vai implantāciju. Jebkurā gadījumā ceļš jāizraugās tā, lai mērķaudiem nodrošinātu pietiekamu ekspozīciju. Parasti nav ieteicama intraperitoneāla injekcija, jo cilvēkam šāds ekspozīcijas ceļš nav raksturīgs, un tā būtu jāizmanto tikai ar konkrētu zinātnisko pamatojumu. Ja testējamo ķīmikāliju piejauc barībai vai dzirdināmam ūdenim, jo īpaši vienreizējas devas gadījumā, jāgādā, lai starp pārtikas un ūdens patēriņu un pārošanu paietu pietiekami daudz laika, lai būtu iespējams detektēt ietekmes (sk. 31. punktu). Maksimālais šķidrums tilpums, ko vienā paņēmienā var ievadīt ar gavāžu vai injekciju, atkarīgs no testa dzīvnieka lieluma. Tilpums parasti nedrīkst pārsniegt 1 ml uz 100 g ķermeņa masas, izņemot ūdens šķīdumus, kuru gadījumā var lietot ne vairāk kā 2 ml uz 100 g ķermeņa masas. Ja izmanto lielāku tilpumu (ja dzīvnieku labturības tiesību akti to

atļauj), tas jāpamato. Testa tilpuma mainība būtu jāsamazina līdz minimumam, koncentrāciju koriģējot tā, lai visos devu līmeņos tilpuma attiecība pret ķermeņa masu saglabātos konstanta.

Novērojumi

29. Vismaz reizi dienā, vēlams — vienā un tajā pašā laikā vai laikos un ņemot vērā, kurā periodā pēc devu došanas gaidāms ietekmju maksimums, testa dzīvniekiem jāizdara vispārīgi klīniski novērojumi un jāreģistrē novērotās klīniskās pazīmes. Devas došanas periodā visus dzīvniekus vismaz divreiz dienā novēro attiecībā uz morbiditāti un mirstību. Visi dzīvnieki jānosver pētījuma sākumā, atkārtotas devas pētījumos pēc tam vismaz reizi nedēļā, kā arī eitanazēšanas brīdī. Vismaz reizi nedēļā jāmēra barības patēriņš. Ja testējamo ķīmikāliju ievada ar dzirdināmo ūdeni, ūdens patēriņš jāmēra katru reizi, kad ūdens tiek mainīts, un vismaz reizi nedēļā. Dzīvnieki, kam ar neletālām pazīmēm izpaužas pārlieds toksiskums, pirms testa perioda beigām būtu jāeitanazē (27).

Audu ievākšana un pārstrāde

30. Mātītes eitanazē otrajā grūtniecības pusē 13. grūsnības dienā (GD) pelēm un 14.–15. GD žurkām. Izmeklē dzemdi attiecībā uz dominantām letālām ietekmēm, nosakot implantējušos augļu skaitu, dzīvo un mirušo embriju skaitu un dzelteno ķermeņu skaitu.
31. Lai saskaitītu dzeltenos ķermeņus, atsedz dzemdes ragus un olnīcas; izņem, skaita un nosver augļus. Jāraugās, lai tiktu pamanītas rezorbcijas, ko var aizsegt dzīvi augļi; visas rezorbcijas jāuzskaita. Dokumentē augļu mirstību. Dokumentē arī veiksmīgi apaugļojušos mātīšu skaitu, kopējo implantāciju un pirmsimplantācijas zudumu skaitu, kā arī pēcimplantācijas mirstību (ieskaitot agrīnas un vēlīnas rezorbcijas gadījumus). Turklāt redzamos augļus var vismaz 2 nedēļas saglabāt Buina fiksācijas šķīdumā, fiksējot lielas ārējas kroplības (28) un tādējādi gūstot papildinformāciju par testējamā līdzekļa reproduktīvo un ontogēnētisko ietekmi.

DATI UN PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

Rezultātu apstrāde

32. Dati jāapkopo tabulā, norādot pāroto tēviņu skaitu, grūsno mātīšu skaitu, kā arī to mātīšu skaitu, kurām nav iestājusies grūtniecība. Katras pārošanās rezultāti līdz ar katra tēviņa un mātītes identitāti jāatspoguļo atsevišķi. Attiecībā uz katru mātīti jāreģistrē pārošanas intervāls, apstrādāto tēviņu devu līmenis un dzīvo un nedzīvo implantējušos augļu skaits.
33. Pēcimplantācijas zudumu aprēķina, nosakot nedzīvo implantējušos augļu skaita attiecību pret implantējušos augļu kopskaitu apstrādātajā grupā un to salīdzinot ar nedzīvo implantējušos augļu skaita attiecību pret augļu kopskaitu nesēja/šķīdinātāja kontrolgrupā.

34. Pirmsimplantācijas zudumu var aprēķināt pēc dzelteno ķermeņu un implantējušos augļu skaita starpības vai pēc implantējušos augļu vidējā skaita samazinājuma vienā dzemdē salīdzinājumā ar kontroles dzīvnieku pārošanās rezultātiem. Ja aplēs pirmsimplantācijas zudumu, tas jānorāda ziņojumā.
35. Dominanto letālo koeficientu aplēs šādi: (nāves gadījumi pēc implantācijas / kopējās implantācijas uz vienu mātīti) x 100.
36. Pārskatā jāatspoguļo 29. punktā minētie toksiskuma un klīnisko pazīmju dati.

Pieņemamības kritēriji

37. Testa pieņemamību nosaka, pamatojoties uz šādiem kritērijiem:

- paralēlā negatīvā kontrole atbilst publicētajām vēsturisko negatīvo kontroļu datu normām un laboratorijas vēsturiskajiem kontroļu datiem, ja tādi ir (sk. 10. un 18. punktu);
- paralēlās pozitīvās kontroles inducētā reakcija atbilst publicētajām vēsturisko pozitīvo kontroļu datu normām vai laboratorijas vēsturisko pozitīvo kontroļu datubāzei, ja tāda ir, un salīdzinājumā ar negatīvajām kontrolēm ir iegūts statistiski būtisks palielinājums (sk. 17. un 18. punktu);
- ir izanalizēts pietiekams kopējo implantējušos augļu un devu skaits (20. punkts);
- maksimālās devas izraudzīšanās kritēriji atbilst 24. un 27. punktā aprakstītajiem.

Rezultātu izvērtēšana un interpretēšana

38. Lai iegūtu devas un atbildreakcijas izanalizēšanai pietiekamus datus, jāizanalizē vismaz trīs grupas, kas saņēmušas devas.
39. Ja ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķīmikāliju uzskata par viennozīmīgi pozitīvu, ja:
- vismaz vienai no testa devām salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli novērojams statistiski nozīmīgs palielinājums,
 - attiecībā uz vismaz vienu no eksperimenta nosacījumiem (piem., pārošanas intervāls viena nedēļa) palielinājums, to attiecīgā testā izvērtējot, ir saistīts ar devu un
 - kāds no iegūtajiem rezultātiem ir ārpus pieņemamā negatīvo kontroļu datu diapazona vai ārpus laboratorijas vēsturisko negatīvo kontroļu datu sadalījuma (piem., ārpus 95 % kontrolrobežām Puasona sadalījumā), ja tāds pieejams.

Šajā gadījumā tiek uzskatīts, ka testējamā ķīmikālija testa dzīvnieku dīglšūnās spēj inducēt dominantas letālas mutācijas. Ieteikumi par piemērotākajām statistiskajām metodēm

sniegti 44. punktā, citas ieteicamas statistiskas pieejas var atrast arī literatūrā (20) (21) (22) (24) (29). Izmantotajos statistiskajos testos par eksperimenta vienību jāuzskata dzīvnieks.

40. Ja ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķimikāliju uzskata par viennozīmīgi negatīvu, ja:

- ne ar vienu no testa koncentrācijām salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli nav novērojams statistiski nozīmīgs palielinājums,
- ne ar vienu no eksperimenta nosacījumiem nav novērojams ar devu saistīts palielinājums un
- visi rezultāti ir pieņemamajā negatīvo kontroļu datu vai laboratorijas vēsturisko negatīvo kontroļu datu (ja tādi pieejami) diapazonā (piem., 95 % kontrolrobežās Puasona sadalījumā).

Šajā gadījumā tiek uzskatīts, ka testējamā ķimikālija testa dzīvnieku dīgļšūnās nespēj inducēt dominantas letālas mutācijas.

41. Nepārprotami pozitīva vai nepārprotami negatīva atbildreakcija nav jāverificē.

42. Ja atbildreakcija nav viennozīmīgi negatīva vai viennozīmīgi pozitīva un lai varētu vieglāk noskaidrot kāda rezultāta bioloģisko nozīmīgumu (piem., neizteikts palielinājums vai robežgadījums), dati būtu jāizvērtē, izmantojot ekspertu spriedumus un/vai tālāku izmeklēšanu, kurā izmanto jau esošos eksperimentu datus, piem., spriež, vai pozitīvais rezultāts ir ārpus negatīvo kontroļu datu vai laboratorijas vēsturisko negatīvo kontroļu datu pieņemamības diapazona (30).

43. Retos gadījumos pat pēc sīkākas izskatīšanas datu kopums neļauj secināt, vai testējamā ķimikālija rada pozitīvus vai negatīvus rezultātus, un tad uzskata, ka rezultāti ir neskaidri.

44. Izmantotajos statistiskajos testos par eksperimenta vienību ieteicams uzskatīt tēviņu. Lai gan skaitīšanas datu (piem., implantējušos augļu skaits uz vienu mātīti) sadalījums var būt pēc Puasona, un/vai īpatsvara (piem., nedzīvo implantējušos augļu procentuālās daļas) sadalījums var būt binomiāls, tomēr bieži gadās, ka šādiem datiem ir palielināta dispersija (31). Tātad statistiskajā analīzē vispirms, izmantojot tādas dispersijas testus kā Kokrana binomiālās mainības tests (32) vai Tarona $C(\alpha)$ tests binomiālās palielinātās dispersijas noteikšanai, vajadzētu testēt, vai dispersija nav palielināta / nepietiekama (31) (33). Ja nekonstatē novirzi no binomiālā sadalījuma, pa devu līmeņiem proporcionālas tendences var testēt ar Kokrana–Ārmitidža tendenčtestu (34), savukārt pārveida salīdzinājumus ar kontrolgrupu — ar Fišera precīzo testu (35). Līdzīgi, nekonstatējot novirzi no Puasona sadalījuma, var ar Puasona regresijas metodi (36) testēt skaitījuma tendences, bet pārveida salīdzinājumus ar kontrolgrupu — Puasona modeļa kontekstā, izmantojot pāru kontrastus (36). Ja konstatē būtiski palielinātu vai pazeminātu dispersiju, ieteicams izmantot neparametriskas metodes (23) (31). Pie tām pieder tādi ranžējoši testi kā Džonkhīra–

Terpstras tendenčtests (37) un Manna–Vitnija testi (38) pārveida salīdzinājumiem ar nesēja/šķīdinātāja kontroles grupu, kā arī permutāciju testi, atkārtotu paraugošanu testi vai *bootstrap* testi tendenču konstatēšanai un pārveida salīdzinājumiem ar kontrolgrupu (31) (39).

45. Pozitīvi *DL* testa rezultāti liecina, ka testējamā ķimikālija devu saņēmuša testētās sugas tēviņa dīgļšūnām ir genotoksiska.

46. Apsverot, vai novērotās vērtības ir vēsturiskā kontroles diapazona robežās vai ārpus tām, var iegūt pieturas punktus atbildreakcijas bioloģiskā nozīmīguma izvērtēšanai (40).

Testēšanas pārskats

47. Testēšanas pārskatā norāda šādu informāciju.

Kopsavilkums

Testējamā ķimikālija:

- avots, sērijas numurs, izmantošanas termiņš, ja pieejams;
- pašas testējamās ķimikālijas stabilitāte, ja zināma;
- testējamās ķimikālijas šķīdība un stabilitāte šķīdinātājā/nesējā, ja zināmas;
- pH, osmolalitātes un nogulšņu mērījums barotnē, kurā testējamā ķimikālija pievienota (attiecīgā gadījumā).

Vienkomponenta viela:

- izskats, šķīdība ūdenī un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības;
- ķīmiskā identifikācija, piemēram, *IUPAC* vai *CAS* nosaukums, *CAS* numurs, *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula, tīrība, attiecīgā gadījumā, ja praktiski iespējams, piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. tml.

Daudzkomponentu viela, UVCB un maisījumi:

- iespējami izsmeļoši raksturoti pēc komponentu ķīmiskās identitātes (sk. iepriekš), kvantitatīvās sastopamības un sastāvdaļu relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām.

Testējamās ķimikālijas sagatavošana:

- nesēja izraudzīšanās pamatojums;
- testējamās ķimikālijas šķīdība un stabilitāte šķīdinātājā/nesējā, ja zināmas;
- barības, dzirdināmā ūdens vai inhalācijas preparātu sagatavošana;
- preparātu analītiska noteikšana (piem., stabilitāte, homogenitāte, nominālās koncentrācijas), ja tāda veikta.

Testa dzīvnieki:

- izmantotā suga/līnija un izraudzīšanās pamatojums;
- dzīvnieku skaits, vecums un dzimums;
- avots, turēšanas apstākļi, uzturs u. tml.;
- dzīvnieku unikālās identificēšanas metode;
- īslaicīgiem pētījumiem: tēviņu individuālā masa testa sākumā un beigās; par nedēļu ilgākiem pētījumiem: individuālā masa pētījuma laikā un barības patēriņš. Norāda katras grupas dzīvnieku ķermeņa masas diapazonu, vidējo vērtību un standartnovirzi.

Testēšanas nosacījumi:

- pozitīvās un negatīvās (nesēja/šķīdinātāja) kontroles dati;
- devu diapazona noteikšanas pētījuma dati;
- devu līmeņa izraudzīšanās pamatojums;
- detalizēta informācija par testējamās ķimikālijas sagatavošanu;
- detalizēta informācija par testējamās ķimikālijas devu došanu;
- ievadīšanas ceļa izraudzīšanās pamatojums;
- metodes, ar kādām mēra testējamās vielas toksiskumu dzīvniekiem, ja tādas ir, arī histopatoloģiskas vai hematoloģiskas analīzes un dzīvnieku novērošanas un svēršanas biežums;
- ja rezultāti ir negatīvi, ar kādām metodēm verificēts, ka testējamā ķimikālija nonākusi mērķaudos vai vispārējā asinsritē;
- faktiskā deva (mg uz kg ķermeņa masas dienā), kas aprēķināta pēc testējamās ķimikālijas koncentrācijas (ppm) barībā / dzirdināmajā ūdenī un pēc uzņemtā daudzuma (attiecīgā gadījumā);
- detalizēta informācija par barības un ūdens kvalitāti;
- detalizēta informācija par krātiņa vides bagātinājumu;
- detalizēts apstrādes un paraugošanas grafiku apraksts un izraudzīšanās pamatojums;
- atsāpināšanas metode;
- eitanāzijas metode;
- audu izolēšanas un saglabāšanas procedūras;
- visu komplektu un reaģentu avots un sērijas numuri (attiecīgā gadījumā);
- *DL* skaitīšanas metodes;
- pārošanas grafiks;

- pārošanas veiksmīguma noteikšanas metode;
- eitanazēšanas laiks;
- *DL* ietekmju novērtējuma atzīmju kritēriji, ieskaitot dzelteno ķermeni, implantācijas gadījumus, rezorpcijas gadījumus un pirmsimplantācijas zudumus, dzīvos implantējušos augļus, nedzīvos implantējušos augļus.

Rezultāti:

- dzīvnieka stāvoklis pirms testa perioda un tā laikā, arī toksiskuma pazīmes;
- tēviņu ķermeņa masa devu došanas un pārošanas periodos;
- pāroto mātīšu skaits;
- ja iespējams, devas–atbildreakcijas sakarība;
- tagadējie un vēsturiskie negatīvas kontroles dati ar diapazoniem, vidējām vērtībām un standartnovirzēm;
- tagadējie pozitīvās kontroles dati;
- tabulā apkopoti dati par katru mātīti, arī: dzelteno ķermeņu skaits katrai mātītei; implantāciju skaits katrai mātītei; resorpcijas gadījumu un pirmsimplantēšanās bojāejas gadījumu skaits katrai mātītei; dzīvo implantējušos augļu skaits katrai mātītei; nedzīvo implantējušos augļu skaits katrai mātītei; augļu svars;
- augstāk minēto datu summa par katru pārošanas periodu un devu, norādot dominanto letālo mutāciju biežumu;
- izmantotā statistiskā analīze un metodes.

Rezultātu iztirzājums

Secinājums.

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. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Ķimikālija: viela vai maisījums.

Dzeltenais ķermenis: hormonus izdalošs veidojums, kas olnīcā izveidojies olšūnas pamesta folikula vietā. Dzeltenu ķermeņu skaits olnīcās atbilst ovulējušo olšūnu skaitam.

Dominanta letāla mutācija: mutācija, kas notiek dīgļšūnā vai nostiprinās pēc apaugļošanās un izraisa embrija vai augļa nāvi.

Auglības koeficients: pāroto grūsno mātīšu skaits uz visu pāroto mātīšu skaitu.

Pārošanas intervāls: laiks starp ekspozīcijas beigām un apstrādātu tēviņu pārošanu. Kontrolējot šo intervālu, iespējams izvērtēt ķimikāliju ietekmi uz dažādu tipu dīgļšūnām. Pelēm, kuras pāro 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7. un 8. nedēļā pēc ekspozīcijas beigām, tiek mērīta ietekme uz spermu, kondensētajiem spermatīdiem, apaļajiem spermatīdiem, pahitēnas spermatocītiem, agrīnajiem spermatocītiem, spermatogonijiem, kas diferencējušies, spermatogonijiem, kas diferencējas, un dīgļšūnu spermatogonijiem.

Pirmsimplantācijas zudums: dzeltenu ķermeņu un implantējušos augļu skaita starpība. To var aplēst, arī salīdzinot kopējo implantējušos augļu skaitu uz vienu mātīti devu grupās un kontroles grupās.

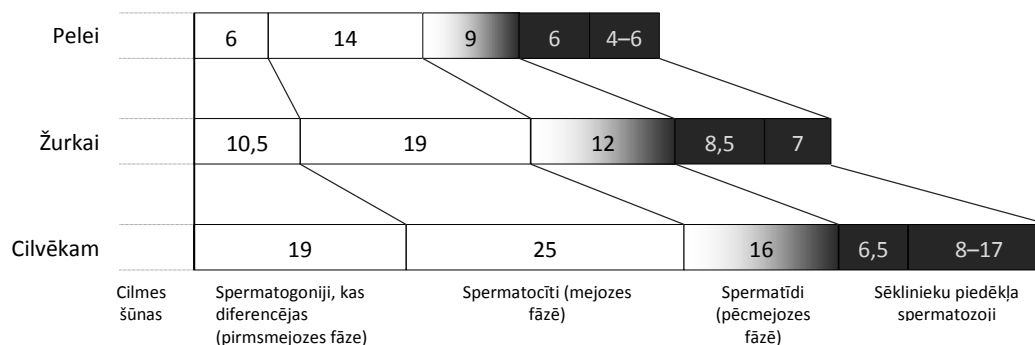
Pēcimplantācijas zudums: nedzīvo implantējušos augļu skaita attiecība apstrādātajā grupā salīdzinājumā ar nedzīvo implantējušos augļu skaita attiecību pret implantējušos augļu kopskaitu kontrolgrupā.

Testējamā ķimikālija: jebkura viela vai maisījums, kuru testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

UVCB: ķīmiska viela, kuras sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kura ir komplekss reakcijas produkts vai bioloģisks materiāls.

2. papildinājums

ZĪDĪTĀJU SPERMATOGENĒZES LAIKI



1. attēls: Peļu, žurku un cilvēka vīrišķo dīglšūnu attīstības ilguma (dienās) salīdzinājums. Ar ēnojumu iezīmētajos periodos nenotiek DNS reparācija.

Augstāk sniegts peļu, žurku un cilvēka spermatogēzes shematiskais attēls (avots *Adler*, 1996). Pie spermatogonijiem, kas diferenciējušies, pieder: A atsevišķie; A sapārotie; A sarindotie spermatogoniji (*Hess and de Franca*, 2008). Par īstajām cilmes šūnām uzskata A atsevišķos spermatogonijus; tāpēc, lai novērtētu ietekmi uz cilmes šūnām, no testējamās ķīmikālijas pēdējās injekcijas līdz pārošanai jāpaiet vismaz 49 dienām.

Atsauces

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) Pielikuma B daļā B.23. nodaļu aizstāj ar šādu:

“B.23. ZĪDĪTĀJU SPERMATOGONIJU HROMOSOMU ABERĀCIJU TESTS

IEVADS

1. Šī testēšanas metode (TM) ir ekvivalenta ESAO Testēšanas vadlīnijā (TG) Nr. 483 (2016) aprakstītajam. Testēšanas metodes tiek pastāvīgi pārskatītas zinātnes sasniegumu, mainīgo regulatīvo prasību un dzīvnieku labturības apsvērumu gaismā. Šis modificētais testēšanas metodes variants atspoguļo ilggadēju pieredzi šā testa veikšanā un šā testa potenciālu tikt integrētam vai kombinētam ar citiem toksiskuma vai genotoksicitātes pētījumiem. Ja toksiskumu testē kombinēti, iespējams būtiski samazināt testos izlieto dzīvnieku skaitu. Šī testēšanas metode pieder pie ģenētiski toksikoloģiskās testēšanas metožu sērijas. ESAO nesen izstrādājusi dokumentu, kas īsi informē par ģenētiski toksikoloģisko testēšanu un sniedz pārskatu par neseniem ESAO genotoksicitātes testēšanas vadlīnijas grozījumiem (1).
2. Zīdītāju spermatogoniju hromosomu aberāciju *in vivo* testā nosaka vielas, kas zīdītāju spermatogonijās rada strukturālas hromosomu aberācijas (1) (2) (3) (4) (5). Dominanto letālo mutāciju tests genotoksicitātes novērtēšanai ir relevants arī tāpēc, ka dažādām sugām *in vivo* metabolisms, farmakokinētika un DNS reparācijas procesi gan var atšķirties, tomēr šie faktori ir aktīvi un piedalās atbildreakcijā. Šī testēšanas metode nav izstrādāta skaitlisku anomāliju mērīšanai; šo testu tam parasti neizmanto.
3. Šis tests mēra strukturālas hromosomu aberācijas (gan hromosomu, gan hromatīdu tipa) spermatogoniju dīgļšūnu dalīšanās procesā un tāvad gaidāms, ka tas spēj prognozēt pārmantojamu mutāciju inducēšanos šajās dīgļšūnās.
4. Galveno terminu definīcijas sniegtas papildinājumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI

5. Šajā testā parasti izmanto grauzējus, bet dažos gadījumos ir lietderīgi izmantot citas sugas, ja tas ir zinātniski pamatoti. Grauzēju sēklinieku citoģenētiskos standartpreparātos tiek ģenerēta mitotiska (spermatogoniji) un meiotiska (spermatocīti) metafāze. Balstoties uz hromosomu morfoloģiju, identificē mitotisko un meiotisko metafāzi (4). Šis citoģenētiskais *in vivo* tests detektē strukturālas hromosomu aberācijas spermatogoniju mitozē. Šai metodei nav citu mērķšūnu.
6. Lai spermatogoniju šūnās varētu detektēt hromatīdu tipa aberācijas, pirms nākamajās šūnu dalīšanās reizēs šīs aberācijas pārvēršas par hromosomveida aberācijām, jāizpēta pirmā mitotiskā šūnu dalīšanās pēc apstrādes. Papildu informāciju par apstrādātiem spermatocītiem var iegūt, diakinēzes I metafāzē un II metafāzē attiecībā uz strukturālām aberācijām analizējot meiotiskas hromosomas.

7. Sēkliniekos atrodas vairāku paaudžu spermatogoniji (5), un šo dažādo tipu dīgļšūnām jutība pret apstrādi ar kādu ķīmikāliju var izpausties individuālā diapazonā. Tātad detektētās aberācijas ir apstrādāto spermatogoniju šūnu populāciju agregēta atbildreakcija. Sēklinieku preparātos lielākā daļa mitotisko šūnu ir B spermatogoniji, kuriem šūnas cikls ir apmēram 26 h (3).
8. Ja ir pierādījumi, ka testējamā ķīmikālija, tās metabolīts vai metabolīti sēkliniekos nenokļūš, šo testu izmantot nav lietderīgi.

TESTĒŠANAS METODES PRINCIPS

9. Dzīvniekus attiecīgā ekspozīcijas ceļā eksponē testējamai ķīmikālijai un pēc apstrādes pienācīgā laikā eitanazē. Pirms eitanāzijas dzīvniekiem ievada metafāzi apturošu vielu (piem., kolhicīnu vai *Colcemid*[®]). Tad no dzimumšūnām pagatavo hromosomu preparātus, ko iekrāso, un nosaka hromosomu aberācijas metafāzes šūnām.

LABORATORIJAS KOMPETENCES VERIFICĒŠANA

10. Šā testa izpildes kompetence būtu jāapliecina, pierādot spēju ar 1. tabulā norādītajām pozitīvajām kontrolvielām (arī ar tādām, uz kurām ir vāja atbildreakcija) reproducēt gaidāmo spermatogoniju strukturālo hromosomu aberāciju biežumu un iegūt tādu negatīvo kontroļu biežumu, kas atbilst pieņemtajam kontroldatu diapazonam publicētajā literatūrā (piem., (2)(3)(6)(7)(8)(9)(10)) vai laboratorijas vēsturisko kontroļu sadalījumam, ja tāds ir.

METODES APRAKSTS

Preparāti

Dzīvnieku sugas izraudzīšanās

11. Jāizmanto veseli, jauni pieauguši tipisku laboratorijas celmu dzīvnieki. Parasti izmanto peļu tēviņus; tomēr var izmantot citu attiecīgu zīdītāju sugu tēviņus, ja tas zinātniski pamatoti un lai būtu iespējams šā testa izpildi apvienot ar citu testēšanas metodi. Ja grauzēju vietā izmanto citas sugas, to izmantošana pārskatā zinātniski jāpamato.

Dzīvnieku turēšanas un barošanas apstākļi

12. Attiecībā uz grauzējiem telpā, kurā tur eksperimenta dzīvniekus, jābūt 22 °C (± 3 °C) temperatūrai. Ideālā gadījumā relatīvajam mitrumam jābūt 50–60 %, bet katrā ziņā vismaz 40 % un, vēlams, ne augstākam par 70 %, izņemot telpu uzkopšanas laiku. Dzīvniekus 12 stundas diennaktī tur mākslīgā apgaismojumā, bet 12 stundas — tumsā. Var izmantot parasto laboratorijas uzturu ar neierobežotu piekļuvi dzirdināmajam ūdenim. Uztura izvēli var ietekmēt vajadzība tam piemaisīt testējamo ķīmikāliju, ja ķīmikāliju ievada šādā ceļā. Ja netiek gaidīts vai novērots, ka grauzēji izturēsies agresīvi, tos ieteicams turēt mazās viendzimuma grupās (ne

vairāk kā pa pieci), vēlams, būros ar cietu grīdu un attiecīgi bagātinātu vidi. Ja tas zinātniski pamatoti, dzīvniekus var turēt atsevišķi.

Dzīvnieku sagatavošana

13. Veselīgus jaunus pieaugušus tēviņus (devu došanas sākumā 8–12 nedēļas vecus) nejaušināti iedala kontroles grupās un grupās, kas saņem devas. Katru dzīvnieku unikālā veidā identificē, izmantojot humānu, minimāli invazīvu metodi (piem., apgredzenojot, izmantojot krotālijas, ievietojot mikroshēmu vai izmantojot biometrisku identificēšanu, bet ne apgriežot ausis vai pirkstus) un vismaz piecas dienas aklimatizē laboratorijas apstākļiem. Būrus izvieto tā, lai būru novietojuma varbūtējā ietekme būtu iespējami maza. Nav pieļaujama pozitīvās kontroles un testējamās ķīmikālijas šķērskontaminēšanās. Pētījuma sākumā dzīvnieku masas individuālajām atšķirībām jābūt minimālām un tās nedrīkst pārsniegt $\pm 20\%$.

Devu sagatavošana

14. Pirms dzīvniekiem dod devas, cietas testējamās ķīmikālijas jāizšķīdina vai jāsuspendē attiecīgos šķīdinātājos vai nesējos vai jāpievieno uzturam vai dzirdināmajam ūdenim. Šķidras testējamās ķīmikālijas var dot tādas pašas vai pirms devas došanas atšķaidīt. Inhalatīvas ekspozīcijas vajadzībām testējamās ķīmikālijas atkarībā no fizikālķīmiskajām īpašībām var būt gāzes, tvaiku vai cietu/šķidru daļiņu aerosola veidā. Ja vien dati par testējamās ķīmikālijas preparātu stabilitāti neliecina, ka tos var uzglabāt, un ja vien no tiem neizriet pareizie glabāšanas nosacījumi, jāizmanto svaigi pagatavoti preparāti.

Testa apstākļi — šķīdinātājs/nesējs

15. Lietotajās devās šķīdinātājam vai nesējam nedrīkst būt toksiskas ietekmes un tas nedrīkst būt spējīgs reaģēt ar testējamo ķīmikāliju. Citu, mazāk izplatītu šķīdinātāju vai nesēju izmantošana jāpamato ar atsaucēm datiem par to saderību. Kad vien iespējams, vispirms ieteicams izmantot šķīdinātājus vai nesējus uz ūdens bāzes. Plaši izmantoti saderīgi šķīdinātāji/nesēji ir, piem., ūdens, fizioloģiskais šķīdums, metilcelulozes šķīdums, karboksimetilcelulozes nātrija sāls šķīdums, olīveļļa un kukurūzas eļļa. Ja nav pieejami vēsturiski vai publicēti kontroļu dati, kas apliecinātu, ka izvēlētais atipiskais šķīdinātājs/nesējs neinducē strukturālas hromosomu aberācijas un tam nav citādas kaitīgas ietekmes, jāveic sākotnējs pētījums, lai noteiktu šķīdinātāja/nesēja kontroles pieņemamību.

Pozitīvās kontroles

16. Būtu vienmēr jāizmanto paralēlas pozitīvas kontroles dzīvnieki, ja vien laboratorija nav apliecinājusi kompetenci testa veikšanā un vēl nesen (piem., pēdējo piecu gadu laikā) testu izmantojusi regulāri. Ja nav paralēlas pozitīvas kontrolgrupas, katrā eksperimentā jāparedz novērtēšanas kontroles (fiksēti un neiekrāsoti priekšmetstikliņi). To var panākt, pētījumā ar atzīmēm novērtējot arī attiecīgus etalonparaugus, kas saglabāti pēc iegūšanas kādā atsevišķā pozitīvās kontroles eksperimentā, ko testējošā laboratorija izdara regulāri (piem., ik 6–18 mēnešus), piem., kompetences testēšanā un pēc tam regulāri pēc vajadzības.

17. Pozitīvās kontroles vielām stabili jārada detektējams tādu šūnu biežuma pieaugums, kurās strukturālās hromosomu aberācijas pārsniedz spontāno līmeni. Pozitīvās kontroles devas izvēlas tā, lai to ietekme būtu skaidri redzama, tomēr vērtētajam nebūtu uzreiz redzama kodēto paraugu identitāte. Pozitīvās kontroles vielu piemēri norādīti 1. tabulā.

1. tabula. Pozitīvās kontroles vielu piemēri.

Vielas [CAS Nr.] (atsauces Nr.)
Ciklofosfamīds (monohidrāts) [CAS Nr. 50-18-0 (CAS Nr. 6055-19-2)] (9)
Streptonigrīns [CAS Nr. 108-91-8] (7)
Mitomicīns C [CAS Nr. 50-07-7] (6)
Monomērakrilamīds [CAS Nr. 79-06-1] (10)
Trietilēnmelamīns [CAS Nr. 51-18-3] (8)

Negatīvās kontroles

18. Katrā paraugošanas reizē jābūt arī negatīvās kontroles dzīvniekiem, ko apstrādā tikai ar šķīdinātāju vai nesēju, bet pārējās darbības izdara tāpat kā ar grupām, kam dotas devas. Ja nav vēsturisku vai publicētu kontroldatu, kas liecinātu, ka izraudzītais šķīdinātājs/nesējs neierosina hromosomu aberācijas un tam nav citādas kaitīgas ietekmes, katrā paraugošanas reizē jābūt arī neapstrādātiem kontroldzīvniekiem, lai varētu konstatēt, cik pieņemami ir nesēju izmantot par kontrolvielu.

PROCEDŪRA

Dzīvnieku skaits

19. Pētījuma sākumā būtu jānosaka grupu lielums tā, lai katrā grupā būtu vismaz 5 tēviņi. Šādu dzīvnieku skaitu uzskata par pietiekamu adekvātas statistiskās jaudas nodrošināšanai (proti, lai parasti būtu iespējams ar 80 % varbūtību nozīmīguma līmenī 0,05 detektēt vismaz hromosomu aberāciju biežuma dubultošanos pie negatīvās kontroles līmeņa 1 % vai augstāka.) (3) (11). Orientējošs piemērs parastām prasībām attiecībā uz dzīvnieku maksimālo skaitu: pētījumā ar divām paraugošanas reizēm izmanto trīs devu grupas un paralēlu negatīvo kontrolgrupu, kā arī pozitīvo kontrolgrupu (pieci viena dzimuma dzīvnieki katrā grupā); būtu nepieciešami 45 dzīvnieki.

Devu došanas grafiks

20. Testējamo ķīmikāliju parasti dod vienreiz (proti, kā vienreizēju devu); var izmantot citus devu režīmus, ja vien tie ir zinātniski pamatoti.
21. No grupas, kurā pārbauda lielāko devu, paraugus pēc devas došanas ņem divās paraugošanas reizēs. Tā kā testējamās(-o) ķīmikālijas(-u) uzņemšanai un metabolizēšanai, kā arī tās iedarbībai

uz šūnas cikla kinētiku vajadzīgais laiks var ietekmēt hromosomu aberāciju noteikšanas optimālo laiku, ieteicama viena agrīna un viena vēla paraugošanas reize apmēram 24 un 28 stundas pēc devas došanas. Izņemot lielāko devu, paraugošanu ieteicams izdarīt agri, 24 stundas (par B spermatogonija šūnas cikla laiku īsāks vai ar to vienāds laiks, tāpēc optimizējas varbūtība, ka būs iespējams novērtēt pirmās pēcapstrādes metafāzes) pēc devas došanas, ja vien nav zināms cits, piemērotāks un pamatots paraugošanas laiks.

22. Var izmantot citus paraugošanas laikus. Piemēram, kas attiecas uz ķīmikālijām, kuras rada no S neatkarīgu ietekmi, lietderīgs var būt agrāks paraugošanas laiks (t.i., agrāk nekā pēc 24 stundām).
23. Var izmantot tādu apstrādes režīmu ar atkārtotām devām, kāds rodas apvienojumā ar cita beigupunkta testu, kurā izmantots devu došanas periods 28 dienas (piem., TM B.58); tomēr, lai būtu iespējami atšķirīgi paraugošanas laiki, būtu vajadzīgas vēl citas dzīvnieku grupas. Tātad katrā gadījumā zinātniski jāpamato šāda grafika lietderība.
24. Pirms eitanazēšanas dzīvniekiem intraperitoniāli injicē attiecīgu devu metafāzi apturošas vielas (piem. *Colcemid*® vai kolhicīnu). Pēc tam ar attiecīgiem intervāliem no dzīvniekiem ņem paraugus. Pēc un žurkām šis intervāls ir aptuveni 3 – 5 stundas.

Devu līmeņi

25. Ja veic iepriekšēju diapazona noteikšanas pētījumu, jo nav piemērotu datu, kas palīdzētu izraudzīties devu, tas jāveic tajā pašā laboratorijā, izmantojot to pašu sugu, celmu, dzimumu un devu došanas režīmu, kas tiks izmantots galvenajā pētījumā, un ievērojot ieteikumus par devu diapazona noteikšanas pētījumu izpildi (12). Šajā pētījumā būtu jāorientējas uz maksimālās panesamās devas (*MTD*) apzināšanu; *MTD* definē kā devu, kura pētījuma ilgumam atbilstošā laikā izraisa nelielu toksisku ietekmi (piem., anormāla izturēšanās vai reakcijas, neliels ķermeņa masas samazinājums vai citotoksicitāte hematopoētiskajā sistēmā), bet neizraisa nāvi vai tādas sāpju, ciešanu vai diskomforta pazīmes, kā dēļ dzīvnieki būtu jāeitanazē (13).
26. Augstāko devu var definēt arī kā devu, kura kaut kādā veidā liecina par toksiskumu spermatogoniju šūnām (piem., samazinās spermatogoniju mitožu attiecība pret pirmo un otro meiotisko metafāzi). Šim samazinājumam nevajadzētu pārsniegt 50 %.
27. Testējamās ķīmikālijas, kuras zemā netoksiskā devā iedarbojas bioloģiski specifiski (tādas kā hormoni un mitogēni), un ķīmikālijas, kurām ir ļoti izteiktas toksikokinētiskās īpašības, var būt šo devu noteikšanas kritēriju izņēmumi un tātad attiecībā uz devām var būt jānovērtē atsevišķi.
28. Lai iegūtu informāciju par atbildreakciju uz devu, pilnīgā pētījumā jābūt negatīvai kontrolgrupai (18. punkts) un vismaz trijiem devu līmeņiem, kuru atstatuma koeficients parasti ir 2, bet nepārsniedz 4. Ja diapazona noteikšanas pētījumā testējamā ķīmikālija toksicitāti nerada vai to nerada saskaņā ar esošajiem datiem, lielākajai vienreizējai devai jābūt 2000 mg uz kg ķermeņa masas. Ja testējamai ķīmikālijai toksiskums tomēr izpaužas, *MTD* jābūt augstākajai

ievadītajai devai un izmantotajiem devu līmeņiem būtu jāaptver diapazons no maksimālās devas līdz devai, kas ir maztoksiska vai netoksiska. Ja pie visiem testētajiem devu līmeņiem tiek novērota toksiska ietekme uz mērķaudiem (t.i., sēkliniekiem), ieteicams veikt vēl vienu pētījumu ar netoksiskām devām. Pētījumos, kuros plānots pilnīgāk raksturot kvantitatīvo atbildreakciju uz devu, var būt nepieciešams izmantot papildu devu grupas. Atsevišķiem testējamo ķīmikāliju veidiem (piem., cilvēku zālēm), uz kuriem attiecas konkrētas prasības, šīs robežas var būt mainīgas. Ja testējamā ķīmikālija rada toksicitāti, būtu jāizraugās robeždeva plus divas zemākas devas (kā aprakstīts iepriekš). Robeždeva devu došanas periodam 14 dienas vai vairāk ir 100 mg uz kg ķermeņa masas dienā, bet devu došanas periodiem, kas nesasniedz 14 dienas, — 2000 mg uz kg ķermeņa masas dienā.

Devu došana

29. Testi jāplāno, ņemot vērā iespējamo cilvēka ekspozīcijas ceļu. Tāpēc kā pamatotus var izvēlēties tādas ekspozīcijas ceļus kā, piem., ar uzturu, ar dzirdināmo ūdeni, ievadīšanu zemādas audos, intravenozu ievadīšanu, perorālu uzņemšanu (ar gavāžu), inhalāciju vai implantāciju. Jebkurā gadījumā ceļš jāizraugās tā, lai mērķaudiem nodrošinātu pietiekamu ekspozīciju. Ja vien intraperitoneāla injekcija nav zinātniski pamatota, tā parasti nav ieteicama, jo cilvēkam šāds ekspozīcijas ceļš nav raksturīgs. Ja testējamo ķīmikāliju piejauc barībai vai dzirdināmajam ūdenim, jo īpaši vienreizējas devas gadījumā, jāgādā, lai starp pārtikas un ūdens patēriņu un paraugošanu pārietu pietiekami daudz laika, lai būtu iespējams detektēt ietekmes (sk. 33. punktu). Maksimālais šķidrums tilpums, ko vienā paņēmienā var ievadīt ar gavāžu vai injekciju, atkarīgs no testa dzīvnieka lieluma. Tilpums parasti nedrīkst pārsniegt 1 ml uz 100 g ķermeņa masas, izņemot ūdens šķīdumus, kuru gadījumā var lietot ne vairāk kā 2 ml uz 100 g ķermeņa masas. Ja izmanto lielāku tilpumu (ja dzīvnieku labturības tiesību akti to atļauj), tas jāpamato. Testa tilpuma mainība būtu jāsamazina līdz minimumam, koncentrāciju koriģējot tā, lai visos devu līmeņos tilpuma attiecība pret ķermeņa masu saglabātos konstanta.

Novērojumi

30. Vismaz reizi dienā, vēlams — vienā un tajā pašā laikā vai laikos un ņemot vērā, kurā periodā pēc devu došanas gaidāms ietekmju maksimums, testa dzīvniekiem jāizdara vispārīgi klīniski novērojumi un jāreģistrē novērotās klīniskās pazīmes. Vismaz divreiz dienā visus dzīvniekus novēro attiecībā uz morbiditāti un mirstību. Pētījuma sākumā, atkārtotas devas pētījumos vismaz reizi nedēļā un eitanāzijas laikā visi dzīvnieki jānosver. Pētījumos, kuri ilgst vismaz vienu nedēļu, vismaz reizi nedēļā jāmēra barības patēriņš. Ja testējamo ķīmikāliju ievada ar dzirdināmo ūdeni, ūdens patēriņš jāmēra katru reizi, kad ūdens tiek mainīts, un vismaz reizi nedēļā. Dzīvnieki, kam ar neletālām pazīmēm izpaužas pārlieds toksiskums, pirms testa perioda beigām būtu jāeitanazē (13).

Hromosomu preparātu sagatavošana

31. Tūlīt pēc eitanazēšanas no viena vai abiem sēkliniekiem iegūst dīgļšūnu suspensijas, ko apstrādā ar hipotonisku šķīdumu un fiksē saskaņā ar vispārpieņemtiem protokoliem (piem., (2)

(14) (15)). Šūnas pēc tam uzklāj uz priekšmetstikliņiem un krāso (16) (17). Visi priekšmetstikliņi būtu jāapzīmē ar kodu, lai vērtētajam nebūtu pieejama to identitāte.

Analīze

32. Par katru dzīvnieku būtu jāaskaita vismaz 200 izteikti izplatījušos metafāzu (3) (11). Ja vēsturiskās negatīvās kontroles biežums ir $< 1\%$, statistiskās jaudas palielināšanai novērtēšanā par vienu dzīvnieku būtu jānovērtē vairāk nekā 200 šūnu (3). Būtu jāizmanto krāsošanas paņēmieni, ar kuriem iespējams identificēt centromēru.
33. Hromatīdas un hromosomas tipa aberācijas jāreģistrē atsevišķi un jāklasificē pa apakštipiem (pārrāvumi, apmaiņas). Pārtraukumi būtu jāatspoguļo ziņojumā, bet nebūtu jāņem vērā, nosakot, vai kāda ķimikālija būtiski palielina tādu šūnu incidenci, kurām vērojamas hromosomu aberācijas. Laboratorijā izmantojamām procedūrām būtu jānodrošina, ka hromosomu aberācijas analizē labi apmācīti vērtētāji. Apzinoties, ka priekšmetstikliņu sagatavošanas procedūrā daļa metafāzes šūnu bieži vien tiek bojātas un zaudē hromosomas, centromēru skaitam novērtētajās šūnās jābūt vismaz $2n \pm 2$, kur n ir attiecīgās sugas haploidālais hromosomu skaits.
34. Testa nolūks gan ir detektēt strukturālas hromosomu aberācijas, tomēr, ja novēro tādus notikumus kā poliploidālas šūnas vai šūnas ar endoreduplicētām hromosomām, arī to biežumu ir svarīgi atspoguļot (sk. 44. punktu).

DATI UN PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

Rezultātu apstrāde

35. Datus par katru dzīvnieku apkopo tabulas veidā. Katram dzīvniekam nosaka šūnu skaitu, kurās ir strukturālas hromosomu aberācijas, kā arī hromosomu aberāciju skaitu uz vienu šūnu. Hromatīdas tipa un hromosomas tipa aberācijas, kas klasificētas pēc apakštipa (pārrāvumi, apmaiņas) sarakstā jānorāda atsevišķi, minot skaitu un biežumu eksperimenta grupās un kontrolgrupās. Atsevišķi dokumentē pārtraukumus. Ziņojumā pārtraukumu biežumu atspoguļo, tomēr strukturālo aberāciju kopējā biežuma analizē to parasti neiekļauj. Ziņojumā atspoguļo gan poliploidijas, gan/vai to šūnu īpatsvaru, kam ir endoreduplicētas hromosomas, ja šādas parādības ir.
36. Pārskatā jāatspoguļo 30. punktā minētie toksiskuma un klīnisko pazīmju dati.

Pieņemamības kritēriji

37. Testa pieņemamību nosaka, pamatojoties uz šādiem kritērijiem:
 - paralēlā negatīvā kontrole atbilst publicētajām normām, kas attiecas uz vēsturisko negatīvo kontroļu datiem (parasti gaida, ka hromosomu aberācijas būs vērojamas $> 0\%$ un $\leq 1,5\%$ šūnu) un laboratorijas vēsturiskajiem kontroļu datiem (sk. 10. un 18. punktu).

- paralēlās pozitīvās kontrolēs inducētā reakcija atbilst publicētajām vēsturisko pozitīvo kontroļu datu normām vai laboratorijas vēsturisko pozitīvo kontroļu datubāzei, ja tāda ir, un salīdzinājumā ar negatīvajām kontrolēm ir iegūts statistiski būtisks palielinājums (sk. 17. un 18. punktu);
- ir izanalizēts pietiekams šūnu un devu skaits (sk. 28. punktu un 32. punktu).
- maksimālās devas izraudzīšanās kritēriji atbilst 25. un 26. punktā aprakstītajiem.

38. Ja novēro gan mitotus, gan mejozus, par citotoksicitātes mēru visiem devu saņēmējiem un negatīvās kontroles dzīvniekiem būtu jāizraugās spermatogoniju mitotus attiecība pret pirmo un otro mejozisko metafāzi apkopotā paraugā, kas ir 100 dalošās šūnas uz katru dzīvnieku. Ja novēro tikai mitotus, katram dzīvniekam nosaka mitotisko indeksu vismaz 1000 šūnām.

Rezultātu izvērtēšana un interpretēšana

39. Lai iegūtu devas un atbildreakcijas izanalizēšanai pietiekamus datus, jāizanalizē vismaz trīs grupas, kas saņēmušas devas.

40. Ja ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķīmikāliju uzskata par viennozīmīgi pozitīvu, ja:

- vismaz vienai no testa devām salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli novērojams statistiski nozīmīgs palielinājums,
- vismaz vienā paraugošanas reizē palielinājums ir devatkarīgs un
- kāds no šiem rezultātiem ir ārpus pieņemamā negatīvo kontroļu datu diapazona vai laboratorijas vēsturisko negatīvo kontroļu datu sadalījuma (piem., ārpus 95 % kontrolrobežām Puasona sadalījumā), ja tādas ir.

Šajā gadījumā tiek uzskatīts, ka testējamā ķīmikālija testa dzīvnieku spermatogoniju šūnās spēj inducēt hromosomu aberācijas. Ieteikumi par piemērotākajām statistiskajām metodēm atrodami arī literatūrā (11) (18). Izmantotajos statistiskajos testos par eksperimenta vienību jāuzskata dzīvnieks.

41. Ja ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķīmikāliju uzskata par viennozīmīgi negatīvu, ja:

- ne ar vienu no testa koncentrācijām salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli nav novērojams statistiski nozīmīgs palielinājums,
- ne ar vienu no eksperimenta nosacījumiem nav novērojams ar devu saistīts palielinājums un
- visi rezultāti ir pieņemamajā negatīvo kontroļu datu vai laboratorijas vēsturisko negatīvo kontroļu datu (ja tādi pieejami) diapazonā (piem., 95 % kontrolrobežās Puasona sadalījumā).

Testējamo ķīmikāliju šajā testa sistēmā tad uzskata par nespējīgu inducēt hromosomu aberācijas kultivētās zīdītāju šūnās. Ieteikumi par piemērotākajām statistiskajām metodēm atrodami arī literatūrā (11) (18). Negatīvs rezultāts neizslēdz iespējamību, ka ķīmikālija varbūt inducē hromosomu aberācijas vēlākās, nepētītās ontogēnēzes fāzēs vai gēnu mutācijas.

42. Nepārprotami pozitīva vai nepārprotami negatīva atbildreakcija nav jāverificē.
43. Ja atbildreakcija nav nepārprotami negatīva vai pozitīva un lai varētu vieglāk noskaidrot kāda rezultāta bioloģisko nozīmīgumu (piem., neizteikts palielinājums vai robežgadījums), dati būtu jāizvērtē, izmantojot ekspertu slēdzienus un/vai tālāku izmeklēšanu, kurā izmanto jau esošos eksperimentu datus, piem., jāapsver, vai pozitīvais rezultāts ir ārpus negatīvās kontroles datu vai laboratorijas vēsturisko negatīvo kontroļu datu pieņemamības diapazona (19).
44. Retos gadījumos pat pēc sīkākas izskatīšanas datu kopums neļauj secināt, vai testējamā ķīmikālija rada pozitīvus vai negatīvus rezultātus, un tad uzskata, ka rezultāti ir neskaidri.
45. Poliploidālo šūnu skaita palielināšanās var norādīt, ka testējamai ķīmikālijai ir potenciāls inhibēt mitotiskos procesus un inducēt skaitliskas hromosomu aberācijas (20). Ja palielinās tādu šūnu skaits, kam ir endoreduplicētas hromosomas, tas var liecināt, ka testējamajai ķīmikālijai ir potenciāls inhibēt šūnu cikla norisi (21) (22); tas ir vēl cits, no mitotisku procesu inhibēšanas atšķirīgs mehānisms, kā hromosomās tiek inducētas skaitliskas pārmaiņas (sk. 2. punktu). Tāpēc poliploidālo šūnu incidence un tādu šūnu incidence, kam ir endoreduplicētas hromosomas, jādokumentē atsevišķi.

Testēšanas pārskats

46. Testēšanas pārskatā norāda šādu informāciju.

Kopsavilkums

Testējamā ķīmikālija:

- avots, sērijas numurs, izmantošanas termiņš, ja pieejams;
- pašas testējamās ķīmikālijas stabilitāte, ja zināma;
- testējamās ķīmikālijas šķīdība un stabilitāte šķīdinātājā/nesējā, ja zināmas;
- pH, osmolalitātes un nogulšņu mērījums barotnē, kurā testējamā ķīmikālija pievienota (attiecīgā gadījumā).

Vienkomponenta viela:

- izskats, šķīdība ūdenī un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības;
- ķīmiskā identifikācija, piemēram, *IUPAC* vai *CAS* nosaukums, *CAS* numurs, *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula, tīrība, attiecīgā gadījumā, ja praktiski iespējams, piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. tml.

Daudzkomponentu viela, UVCB un maisījumi:

- iespējami izsmēļoši raksturoti pēc komponentu ķīmiskās identitātes (sk. iepriekš), kvantitatīvās sastopamības un sastāvdaļu relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām.

Testējamās ķīmikālijas sagatavošana:

- nesēja izraudzīšanās pamatojums;
- testējamās ķīmikālijas šķīdība un stabilitāte šķīdinātājā/nesējā;
- barības, dzirdināmā ūdens vai inhalācijas preparātu sagatavošana;
- preparātu analītiska noteikšana (piem., stabilitāte, homogenitāte, nominālās koncentrācijas),
- ja tāda veikta.

Testa dzīvnieki:

- izmantotā suga/celms un tā izmantošanas pamatojums;
- dzīvnieku skaits un vecums;
- avots, turēšanas apstākļi, uzturs u. tml.;
- dzīvnieku unikālās identificēšanas metode;
- īslaicīgiem pētījumiem: dzīvnieku individuālā masa testa sākumā un beigās; par nedēļu ilgākiem pētījumiem: individuālā masa pētījuma laikā un barības patēriņš. Norāda katras grupas dzīvnieku ķermeņa masas diapazonu, vidējo vērtību un standartnovirzi.

Testēšanas nosacījumi:

- pozitīvās un negatīvās (nesēja/šķīdinātāja) kontroles dati;
- diapazona noteikšanas testa rezultāti, ja tas veikts;
- devu līmeņa izraudzīšanās pamatojums;
- ievadīšanas ceļa izraudzīšanās pamatojums;
- detalizēta informācija par testējamās ķīmikālijas sagatavošanu;
- detalizēta informācija par testējamās ķīmikālijas devu došanu;
- nonāvēšanas laika pamatojums;
- metodes, ar kādām mēra testējamās vielas toksiskumu dzīvniekiem, ja tādas ir, arī histopatoloģiskas vai hematoloģiskas analīzes un dzīvnieku novērošanas un svēršanas biežums;
- ja rezultāti ir negatīvi, ar kādām metodēm verificēts, ka testējamā ķīmikālija nonākusi mērķaudos vai vispārējā asinsritē;
- faktiskā deva (mg uz kg ķermeņa masas dienā), kas aprēķināta pēc testējamās ķīmikālijas koncentrācijas (ppm) barībā / dzirdināmajā ūdenī un pēc uzņemtā daudzuma (attiecīgā gadījumā);

- detalizēta informācija par barības un ūdens kvalitāti;
- detalizēts apstrādes un paraugošanas grafiku apraksts un izraudzīšanās pamatojums;
- eitanāzijas metode;
- atsāpināšanas metode (ja tāda izmantota);
- audu izolēšanas procedūras;
- metafāzes apturēšanai izmantojamās ķimikālijas identifikācija, tās koncentrācija un apstrādes ilgums;
- priekšmetstikliņu sagatavošanas metodes;
- aberāciju atzīmju kritēriji;
- analizēto šūnu skaits uz vienu dzīvnieku;
- kritēriji, pēc kuriem novērtē, vai testa rezultāts ir pozitīvs, negatīvs vai neskaidrs.

Rezultāti

- dzīvnieka stāvoklis pirms testa perioda un tā laikā, arī toksiskuma pazīmes;
- ķermeņa un orgānu masa nonāvēšanas brīdī (ja devas dotas vairākreiz, ķermeņa masas fiksējumi devu došanas režīma laikā);
- toksiskuma pazīmes;
- mitotiskais indekss;
- spermatogoniju šūnu mitožu attiecība pret pirmo un otro meiotisko metafāzi vai citas mērķaudos vērojamas liecības par eksponētību;
- aberāciju veids un skaits, ko norāda katram dzīvniekam atsevišķi;
- kopējais aberāciju skaits katrā grupā, vidējās vērtības un standartnovirzes;
- to šūnu skaits katrā grupā, kam ir aberācijas, vidējās vērtības un standartnovirzes;
- ja iespējams, devas–atbildreakcijas sakarība;
- izmantotā statistiskā analīze un metodes;
- līdztekus veiktās negatīvās kontroles dati;
- vēsturiskie negatīvo kontroļu dati ar diapazoniem, vidējām vērtībām, standartnovirzēm un ticamības intervālu 95 % (kur tādi pieejami) vai publicētie vēsturiskie negatīvo kontroļu dati, kurus izmanto attiecībā uz šā testa rezultātu pieņemamību;
- paralēlās pozitīvās kontroles dati;
- ploīdijas pārmaiņas, ja tādas tiek novērotas, arī poliploidālo un/vai endoreduplicēto šūnu biežums.

Rezultātu iztirzājums

Secinājumi

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.

Papildinājums

DEFINĪCIJAS

Aneiploīdija: novirze no normālā diploidālā (vai haploidālā) hromosomu skaita par vienu vai vairākām atsevišķām hromosomām, bet ne veselu hromosomu komplektu vai komplektiem (poliploīdija).

Centromēra: hromosomas rajons(-i), ar kuru(-iem) šūnas dalīšanās laikā saistās vārpstas šķiedras, nodrošinot meithromosomu pareizu pārvietošanos uz meitšūnu poliem.

Ķimikālija: viela vai maisījums.

Hromosomu daudzveidība: hromosomu formu (piem., metacentriskas, akrocentriskas u. tml.) un lielumu daudzveidība.

Hromatīdīda aberācija: strukturāls hromosomas bojājums, kas izpaužas kā atsevišķas hromatīdas pārrāvums vai hromatīdu pārrāvums un savienošana.

Hromosomīda aberācija: strukturāls hromosomas bojājums, kas izpaužas kā abu hromatīdu pārrāvums vai pārrāvums un savienošana vienā un tajā pašā vietā.

Klastogēns: jebkura ķimikālija, kas izraisa strukturālas hromosomālas aberācijas šūnu vai organismu populācijās.

Pārtraukums: ahromatisks bojājums, kas mazāks par vienas hromatīdas platumu un saistīts ar ļoti nelielu hromatīdisku nobīdi.

Genotoksisks: vispārīgs termins, kas aptver visu veidu bojājumus DNS vai hromosomās, arī pārrāvumus, delēcijas, aduktus, nukleotīdu modifikācijas un sasaistes, pārkārtumus, gēnu mutācijas, hromosomu aberācijas un aneiploīdiju. Ne visas genotoksiskās ietekmes rada mutācijas vai pastāvīgus hromosomu bojājumus.

Mitotiskais indekss (MI): metafāzē esošu šūnu skaita attiecība pret šūnu kopējo skaitu populācijā; raksturo attiecīgās populācijas proliferācijas pakāpi.

Mitoze: šūnas kodola dalīšanās process, kuru parasti sīkāk iedala šādās stadijās: profāze, prometafāze, metafāze, anafāze un telofāze.

Mutagēnisk: tāds, kas pārmantojami maina vienu vai vairākas DNS bāzu pāru sekvenču gēnos vai hromosomu struktūru (hromosomu aberācijas).

Skaitliska anomālija: testam izmantojamajiem dzīvniekiem raksturīgā parastā hromosomu skaita pārmaiņa.

Poliploīdija: haploidālā hromosomu skaita (n) daudzkārtis (t.i., $3n$, $4n$ utt.), izņemot diploidālo skaitu.

Strukturālas pārmaiņas: hromosomas struktūras pārmaiņas, kas detektējamas, ar mikroskopu

apskatot šūnas to dalīšanās metafāzē, un kas izpaužas kā delēcijas un fragmentācija.

Testējamā ķimikālija: jebkura viela vai maisījums, kuru testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

UVCB: Ķīmiskas vielas, kuru sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kuras ir kompleksi reakcijas produkti vai bioloģiski materiāli”

(5) Pielikuma B daļā B.40. nodaļu aizstāj ar šādu:

“B.40. ĀDAS KOROZIJA *IN VITRO*: TRANSKUTĀNĀS ELEKTRISKĀS PRETESTĪBAS (TEP) TESTS

IEVADS

1. Šī testēšanas metode (TM) ir ekvivalenta ESAO testēšanas vadlīnijā (TG) Nr. 430 (2015) aprakstītajam. Ādas korozija ir nepārejošs ādas bojājums, kas izpaužas kā tāda redzama nekroze visā epidermā, kura ietiecas dermā un radusies pēc tam, kad uz ādas aplikēta testējamā ķimikālija [atbilstoši definīcijai, kas dota Apvienoto Nāciju Organizācijas (ANO) Ķimikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētajā sistēmā (*GHS*) (1) un Eiropas Savienības (ES) Regulā Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakojšanu (*CLP* regula)¹]. Šajā atjauninātajā testēšanas metodē B.40 aprakstīta *in vitro* procedūra, kas dod iespēju saskaņā ar ANO *GHS* (1) un ar *CLP* identificēt nekodīgas un kodīgas vielas.
2. Kodīgumu ādai parasti novērtē, izmantojot laboratorijas dzīvniekus (TM B.4, kas ekvivalenta ESAO *TG* Nr. 404, kura sākotnēji pieņemta 1981. gadā un pārstrādāta 1992., 2002. un 2015. gadā) (2). Papildus pašreizējai testēšanas metodei B.40, attiecībā uz to, kā testēt ķimikāliju potenciālu izraisīt ādas koroziju, validētas un kā TM B.40a (ekvivalenta ESAO *TG* 431) (3) un TM B.65 (ekvivalenta ESAO *TG* 435) (4) pieņemtas ir citas *in vitro* testēšanas metodes, ar kurām vajadzības gadījumā iespējams arī identificēt kodīgu ķimikāliju apakš kategorijas. Vairākas tādas *in vitro* testēšanas metodes kā TM B.56 (ekvivalenta ESAO *TG* 439 (5)) ir pieņemtas izmantošanai ādas kairinājuma testēšanā. ESAO norādījumu dokuments par Integrētu testēšanas un novērtēšanas pieeju (*LATA*) attiecībā uz ādas koroziju un kairinājumu apraksta vairākus moduļus, kādos grupēti informācijas avoti un analīzes instrumenti, un, pirmkārt, sniedz norādījumus par to, kā, novērtējot ķimikāliju potenciālu radīt ādas kairinājumu un ādas koroziju, integrēt un izmantot jau esošos testēšanā un citādi iegūtos datus, un, otrkārt, ierosina pieeju, ko izmantot, ja vajadzīga turpmāka testēšana (6).
3. Šīs testēšanas metodes apraksts pievēršas tādām cilvēkveselības beigupunktam kā ādas korozija. Metodes pamatā ir žurkas ādas transkutānās elektriskās pretestības (TEP) tests, kurā, izmantojot ādas diskus, kodīgas vielas tiek atpazītas pēc to spējas izraisīt *stratum corneum* normālā veseluma un barjerfunkcijas zudumu. Attiecīgā ESAO testēšanas vadlīnija sākotnēji

¹ Eiropas Parlamenta un Padomes 2008. gada 16. decembra Regula (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakojšanu un ar ko groza un atceļ Direktīvas 67/548/EEK un 1999/45/EK un groza Regulu (EK) Nr. 1907/2006 (OV L 353/1, 31.12.2008.).

pieņemta 2004. gadā un 2015. gadā atjaunināta, lai ietvertu atsauci uz *IATA* norādījumu dokumentu.

4. Lai izvērtētu regulatīvām vajadzībām veiktu ādas korozijas testēšanu *in vitro*, tika izdarīti pirmsvalidācijas pētījumi (7), pēc kuriem tika veikts oficiāls validācijas pētījums attiecībā uz tādu žurkas ādas TEP testēšanas metodi, ar ko novērtē kodīgumu ādai (8) (9) (10) (11). Šo pētījumu iznākums bija ieteikums TEP testēšanas metodi (kas ir noteikta par validēto references metodi, VRM) izmantot regulatīvām vajadzībām kodīguma ādai novērtēšanā *in vivo* (12) (13) (14).
5. Pirms kādu piedāvātu līdzīgu vai modificētu *in vitro* TEP testēšanas metodi, kas nav VRM, attiecībā uz ādas koroziju iespējams izmantot regulatīvām vajadzībām, saskaņā ar veikspējas standartu (*PS*) (15) prasībām būtu jānosaka tās ticamība, relevantums (pareizība) un piedāvātā lietojuma ierobežojumi, lai būtu drošība par tās līdzību VRM. ESAO datu savstarpējā atzīšana (*Mutual acceptance of data*) būs garantēta tikai tad, kad jebkāda jauna ierosināta vai atjaunināta VS atbilstoša testēšanas metode būs pārskatīta un iekļauta attiecīgajā ESAO testēšanas vadlīnijā.

DEFINĪCIJAS

6. Izmantotās definīcijas sniegtas papildinājumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI

7. Validācijas pētījums (10) un citi publicēti pētījumi (16) (17) liecina, ka žurkas ādas TEP testēšanas metode spēj ādai kodīgas un nekodīgas vielas 122 vielu datubāzē atšķirt ar kopējo jutību 94 % (51/54) un specifiskumu 71% (48/68).
8. Šī testēšanas metode attiecas uz ādas koroziju *in vitro*. Ar tās palīdzību iespējams saskaņā ar ANO *GHS* / *CLP* identificēt nekodīgas un kodīgas testējamās ķīmikālijas. Kā pierāda validācijas pētījumi (8) (9) (10) (11), viens šīs testēšanas metodes ierobežojums ir tāds, ka ar to nav iespējams kodīgas vielas un maisījumus sadalīt apakškategorijs atbilstoši ANO *GHS* vai *CLP*. Tāpēc šīs testēšanas metodes izmantošanas veids būs atkarīgs no piemērojamā tiesiskā regulējuma. Šī testēšanas metode gan pietiekami neinformē par ādas kairinājumu, taču jānorāda, ka tādai ietekmei uz veselību kā ādas kairinājums īpaši pievēršas TM B.46. Attiecībā uz to, kā pilnīgi izvērtēt lokālo ietekmi uz ādu pēc vienreizējas dermālas ekspozīcijas, jāizmanto ESAO norādījumu dokuments par integrētajām testēšanas un novērtēšanas pieejām (*IATA*) (6).
9. Validēšanā, kas ir pamatā šai testēšanas metodei, testēts daudz dažādu ķīmikāliju, galvenokārt vielu, un validācijas pētījuma empīriskajā datubāzē bija pat 60 vielas, kas aptver daždažādas ķīmikāliju klases (8)(9). Raugoties pēc kopējiem datiem, kas pieejami, šī testēšanas metode ir piemērojama plašam ķīmikāliju klašu un agregātstāvokļu klāstam, ieskaitot šķidrumus,

puscietas un cietas vielas, kā arī vaskus. Tomēr, tā kā attiecībā uz specifiskiem agregātstāvokļiem testējami objekti ar piemērotiem atsauces datiem nav viegli pieejami, jānorāda, ka validēšanā tikuši novērtēti samērā nedaudzi vaski un kodīgas cietas vielas. Šķidrumi var būt ūdens vai neūdens šķīdumi; cietas vielas var būt gan ūdenī šķīstošas, gan nešķīstošas. Ja pierādījumi liecina, ka šī testēšanas metode kādai konkrētai vielu kategorijai nav izmantojama, to attiecībā uz konkrēto minēto kategoriju neizmanto. Turklāt, balstoties uz šīs testēšanas metodes izmantojamību attiecībā uz vielām, tiek uzskatīts, ka tā izmantojama arī attiecībā uz maisījumiem. Tomēr maisījumi aptver plašu kategoriju un sastāvu spektru un patlaban par maisījumu testēšanu sevišķi daudz informācijas nav pieejams, tāpēc, ja var pierādīt, ka kādai konkrētai maisījumu kategorijai (piemēram, saskaņā ar stratēģiju, ko piedāvā *Eskes* u. c., 2012. g.) (18) attiecīgā testēšanas metode nav izmantojama, šo testēšanas metodi šai konkrētajai maisījumu kategorijai nevajag izmantot. Pirms attiecībā uz maisījumu izmanto šo testēšanas metodi, lai iegūtu datus kādai plānotai regulatīvai vajadzībai, jāapsver, vai un kādēļ tā var sniegt tādām nolūkam piemērotus rezultātus. Ja pastāv normatīva prasība maisījumu testēt, tāda apsvēršana nav vajadzīga. Validācijas pētījumos vēl nav vērtētas gāzes un aerosoli (8) (9). Kaut arī jādoma, ka vispār gāzes un aerosolus ar TEP tehnoloģiju testēt ir iespējams, ar pašreizējo testēšanas metodi tos testēt nevar.

TESTA PRINCIPS

10. Testēšanas sistēmā ar diviem nodalījumiem, kurus vienu no otra nodala ādas diski, testējamo vielu uz laiku līdz 24 stundām aplicē šo ādas disku epidermālajai virsmai. Ādas diskus ņem no humāni nonāvētām 28–30 dienas vecām žurkām. Kodīgas ķīmikālijas identificē pēc to spējas izraisīt *stratum corneum* normālā veseluma un barjerfunkcijas zudumu, ko mēra kā TEP pazemināšanos zem sliekšņlīmeņa (16) (sk. 32. punktu). Žurkas ādas TEP vajadzībām ir izraudzīta robežvērtība $5\text{ k}\Omega$, balstoties uz plašiem datiem par lielu ķīmisko vielu klāstu, kur lielākā daļa vērtību nepārprotami bijusi vai nu par šo vērtību krietni augstāka (bieži vien $> 10\text{ k}\Omega$), vai krietni zemāka (parasti $< 3\text{ k}\Omega$) (16). Testējamās ķīmikālijas, kas dzīvniekiem nerada ādas koroziju, bet ir vai nav kairinošas, TEP vērtību parasti nepazemina zemāk par šo robežvērtību. Bez tam, ja izmanto citus ādas preparātus vai citu aparāturu, robežvērtība var mainīties, tāpēc var būt vajadzīga papildu validācija.
11. Testēšanas procedūrā, ar ko apstiprinoši testē pozitīvus TEP rezultātus, ieskaitot vērtības $\text{ap}\Omega$, tiek iekļauts krāsvielas saistīšanas solis. Krāsvielas saistīšanas solī tiek noteikts, vai jonu caurlaidības palielinājumu izraisījusi fiziska *stratum corneum* noārdīšanās. Ir apliecināts, ka TEP metode, kurā izmanto žurkas ādu, spēj prognozēt kodīgumu B.4. testēšanas metodē, ko *in vivo* īsteno ar trušiem (2).

KOMPETENCES PIERĀDĪŠANA

12. Pirms šai testēšanas metodei atbilstošo žurkas ādas TEP testēšanas metodi sākt izmantot regulāri, laboratorijām būtu jāpierāda tehniskā kompetence, pareizi saklasificējot 1. tabulā

ieteiktās standartvielas. Gadījumos, kur kāda sarakstā norādīta viela nav pieejama vai kur tas attaisnojami, var izmantot citu vielu, par kuru pieejami pietiekami *in vivo* un *in vitro* references dati (piem., vielu no references ķīmikāliju saraksta (16)), ja vien tiek izmantoti tie paši 1. tabulā aprakstītie izraudzīšanās kritēriji.

1. tabula. Standartvielu¹ saraksts

Vielā	CAS Nr.	Ķīmikāliju klase ²	ANO GHS/CLP Kategorijas, kuru pamatā ir <i>in vivo</i> rezultāti ³	VRM Kategorijas, kuru pamatā ir <i>in vitro</i> rezultāti	Agregātstāvoklis	pH ⁴
<i>In vivo</i> kodīgas vielas						
<i>N,N'</i> -dimetil dipropilēntriāmins	10563-29-8	organiska bāze	1.A	6 x K	Š	8,3
1,2-diaminopropāns	78-90-0	organiska bāze	1.A	6 x K	Š	8,3
sērskābe (10 %)	7664-93-9	neorganiska skābe	(1.A/1.B/1.C)	5 x K 1x NK	Š	1,2
kālija hidroksīds (10 % ūd.)	1310-58-3	neorganiska bāze	(1.A/1.B/1.C)	6 x K	Š	13,2
oktānskābe (kaprīlskābe)	124-07-2	organiska skābe	1.B/1.C	4 x K 2 x NK	Š	3,6
2- <i>terc</i> -butilfenols	88-18-6	fenols	1.B/1.C	4 x K 2 x NK	Š	3,9
<i>In vivo</i> nekodīgas vielas						
izostearīnskābe	2724-58-5	organiska skābe	NK:	6 x NK	Š	3,6
4-amino-1,2,4-triazols	584-13-4	organiska bāze	NK	6 x NK	KV	5,5
fenetilbromīds	103-63-9	elektrofila viela	NK	6 x NK	Š	3,6
4-(metiltio)-benzaldehīds	3446-89-7	elektrofila viela	NK	6 x NK	Š	6,8
1,9-dekadiēns	1647-16-1	neitrāla organiska	NK	6 x NK	Š	3,9
tetrahlortilēns	127-18-4	neitrāla organiska	NK	6 x NK	Š	4,5

Saīsinājumi: aq = uz ūdens bāzes; CAS Nr. = *Chemical Abstracts Service* reģistra numurs; VRM = validēta references metode; ND = nav noteikts.

¹Standartvielas tika izraudzītas no vielām, kuras izmantotas žurkas ādas TEP testēšanas metodes *ECVAM* validācijas pētījumā, un šeit ir sagrupētas vispirms kodīgās un nekodīgās vielās, pēc tam pa kodīguma apakškategorijām un tad pa ķīmikāliju klasēm (8) (9). Ja nav norādīts citādi, vielas testētas tīrības līmenī, kāds bijis pirkumā no komerciāla piegādātāja (8). Izlasē, cik vien iespējams, ietvertas vielas, kas: i) ir reprezentatīvas attiecībā uz tādu kodīguma atbildreakciju diapazonu (piem., nekodīgas; vāji līdz stipri kodīgas), ko iespējams mērīt vai prognozēt ar VRM; ii) ir reprezentatīvas attiecībā uz validācijas pētījumā izmantotajām ķīmikāliju klasēm; iii) atspoguļo VRM veikspējas raksturlielumus; iv) ir ar labi definētu ķīmisku struktūru; v) ar *in vivo* testēšanas references metodi inducē skaidrus rezultātus; vi) ir komerciāli pieejamas; un vii) nav saistītas ar augstām likvidēšanas izmaksām.

² Ķīmikāliju klase, ko piešķirusi *Barratt et al.* (8).

³ ANO *GHS/CLP* 1.A, 1.B un 1.C kategorijai attiecīgās ANO iepakojuma grupas ir I, II un III.

⁴pH vērtības iegūtas no *Fentem et al.* (9) un *Barratt et al.* (8).

PROCEDŪRA

13. Uz žurkas ādas TEP balstītās ādas korozijas testēšanas metodes sakarā ir pieejamas darba standartprocedūras (*SOP*) (19). Šīs testēšanas metodes aptvertajām uz žurkas ādas TEP ādas balstītajām korozijas testēšanas metodēm būtu jāatbilst šādiem nosacījumiem:

Dzīvnieki

14. Būtu jāizmanto žurka, jo tās ādas jutība pret vielām šajā testēšanas metodē ir jau iepriekš pierādīta (10) un žurka ir vienīgais oficiāli validētais ādas avots (8) (9). Sevišķi liela nozīme ir žurku vecumam (laikā, kad ņem ādu) un līnijai, lai būtu droši, ka apmatojuma folikulas ir snaudas fāzē, kāda ir pirms pieauguša dzīvnieka apmatojuma augšanas sākšanās.
15. Jauniem, apmēram 22 dienas veciem (atvasināti no *Wistar* vai līdzīga līnija) žurku vīrišķā vai sievišķā dzimuma īpatņiem uzmanīgi nocērp muguras un sānu apmatojumu. Pēc tam dzīvniekus rūpīgi slaukot, mazgā, cirpto vietu iemērcot antibiotiku šķīdumā (kas satur, piemēram, streptomicīnu, penicilīnu, hloramfenikolu un amfotericīnu koncentrācijā, kura iedarbīgi inhibē baktēriju augšanu). Trešajā vai ceturtajā dienā pēc pirmās mazgāšanas dzīvniekus atkal mazgā ar antibiotikām, un tos izmanto triju dienu laikā pēc otrās mazgāšanas, kad pēc apmatojuma noņemšanas *stratum corneum* ir atjaunojies.

Ādas disku preparātu sagatavošana

16. 28–30 dienu vecumā dzīvniekus humāni nonāvē; vecums ir kritiski svarīgs. Tad ņem katra dzīvnieka muguras un sānu ādu, no kuras atdala zemādas taukus, tos uzmanīgi atslāņojot. Izgriež ādas diskus ar diametru apm. 20 mm. Ja pierādīts, ka pozitīvo un negatīvo kontroļu dati ir līdzvērtīgi datiem, kas iegūti, izmantojot svaigu ādu, āda var būt glabāta līdz disku izmantošanas brīdim.
17. Ādas disku novieto uz viena PTFE (politetrafluoretilēna) caurulītes gala tā, lai epidermālā virsma būtu kontaktā ar caurulīti. Pāri caurulītes galam ādas fiksēšanai uzmauc gumijas gredzenu, liekos audus nogriež. Pēc tam gumijas gredzena piestiprinājuma vietu PTFE caurulītei hermetizē, rūpīgi apziežot ar vazelīnu. Caurulīti ar atsperīgu spaili nostiprina receptora kamerā, kurā ir MgSO_4 šķīdums (154 mM) (1. attēls). Ādas diskam jābūt pilnīgi iegremdētam MgSO_4 šķīdumā. No vienas žurkas ādas var iegūt 10–15 diskus. Caurulītes un gredzena izmēri norādīti 2. attēlā.
18. Pirms sākt testēšanu, katra dzīvnieka ādai izdara kvalitātes kontroles procedūru, proti, izmēra divu ādas disku TEP. Lai pārējos diskus varētu izmantot testēšanas metodes vajadzībām, abu disku pretestībai jāpārsniedz 10 k Ω . Ja pretestība nerasniedz 10 k Ω , šīs ādas diski nav derīgi.

Testējamās ķīmikālijas un kontrolvielu aplicēšana

19. Katrā izpildes reizē (eksperimentā) jāizmanto paralēlas pozitīvas un negatīvas kontroles, lai būtu nodrošināta adekvāta eksperimenta modeļa veikspēja. Katrā izpildes reizē (eksperimentā) jāizmanto tikai viena dzīvnieka ādas diski. Pozitīvai un negatīvai kontrolei ieteicams izmantot attiecīgi 10 M sālsskābes un ūdens.
20. Šķidras testējamās vielas (150 μ l) vienmērīgi aplicē uz epidermālās virsmas caurulītes iekšpusē. Testējot cietus materiālus, uz diska vienmērīgi aplicē tikdaudz cietās vielas, lai visa epidermālā virsma būtu pārklāta. Uz cietās vielas virsmas pievieno dejonizētu ūdeni (150 μ l) un cauruli viegli sakrata. Lai panāktu maksimālu saskari ar ādu, cietas vielas var būt jāuzsilda līdz 30 °C, lai testējamo ķīmikāliju izkausētu, padarītu mīkstāku vai sasmalcinātu, iegūstot granulveida vai pulverveida materiālu.
21. Katrai testējamai ķīmikālijai un kontrolķīmikālijai katrā testa izpildes reizē (eksperimentā) izmanto trijus ādas diskus. Testējamās ķīmikālijas aplicē uz 24 stundām 20–23 °C temperatūrā. Testējamo ķīmikāliju noņem ar ūdensvada ūdens strūklu, kura temperatūra nepārsniedz istabas temperatūru, skalošanu beidzot, kad vairāk materiāla nav noņemams.

TEP mērīšana

22. Ādas pretestību mēra kā TEP, izmantojot Vitstona tiltu zemsprieguma maiņstrāvas režīmā (18). Tilta vispārīgie parametri ir darba spriegums 1–3 V, sinusoīdas veida vai taisnstūrveida maiņstrāva ar frekvenci 50–1000 Hz un mērījumu diapazons vismaz 0,1–30 k Ω . Ar validēšanai izmantoto mērtiltu virknes vai paralēlajā slēgumā tika mērīta induktivitāte, kapacitāte un pretestība attiecīgi līdz 2000 H, 2000 μ F un 2 M Ω pie frekvences 100 Hz vai 1 kHz. TEP kodīguma testa vajadzībām mērījumi tiek atspoguļoti virknes slēgumam kā pretestība pie frekvences 100 Hz. Pirms elektriskās pretestības mērīšanas samazina ādas virsmas spraigumu, pievienojot tādu tilpumu 70 % etanola, lai būtu pārklāta epiderma. Pēc dažām sekundēm etanolu no caurulītes izlej un audus hidratē, pievienojot 3 mL MgSO₄ šķīduma (154 mM). Mērtilta elektrodus novieto abās ādas diska pusēs, lai izmērītu ādas disku pretestību k Ω (1. attēls). Elektroda izmēri un elektroda daļas garums zem turētāja spaiļes aplūkoti 2. attēlā. Iekšējā elektroda turētāja spaiļe pretestības mērīšanas laikā balstās uz PTFE caurules, lai nodrošinātu, ka MgSO₄ šķīdumā pastāvīgi ir iegremdēts vienāds elektroda garums. Ārējais elektrods receptora kamerā tiek ievietots tādā veidā, ka elektrods balstās pret kameras dibenu. Attālums starp atsperes spaili un PTFE caurulītes apakšu nedrīkst mainīties (2. attēls), jo šis attālums ietekmē iegūto pretestības vērtību. Tātad attālumam starp iekšējo elektrodu un ādas disku jābūt nemainīgam un iespējami mazam (1–2 mm).
23. Par 20 k Ω augstāku izmērītās pretestības vērtību var radīt arī uz ādas diska epidermālās virsmas palikušas testējamās ķīmikālijas paliekas. Šo pārklājumu pilnīgāk likvidēt var mēģināt, piemēram, PTFE caurulīti hermētiski aizspiežot ar cimdotu īkšķi un apm. 10 sekundes pakratot; MgSO₄ šķīdumu izlej un pretestības mērīšanu atkārtoti ar svaigu MgSO₄ šķīdumu.

24. Iegūtās TEP vērtības var būt ietekmējuši testēšanai izmantotās aparatūras raksturlielumi, izmēri un eksperimenta procedūra. Kodīguma sliekšnis 5 k Ω atvasināts, izmantojot datus, kas iegūti ar šajā metodes aprakstā norādīto specifisko aparatūru un procedūru. Ja tiek grozīti testēšanas nosacījumi vai ja izmanto citu aparatūru, var būt piemērojamas citas sliekšņvērtības un kontrolvērtības. Tādējādi metodika un pretestības sliekšņvērtības jākalibrē, testējot virkni standartvielu, kuras izraugās no validācijas pētījumā izmantoto vielu klāsta (8) (9) vai pētāmajām vielām līdzīgu ķīmikāliju klašu vielām. Piemērotu standartvielu komplekss ir norādīts 1. tabulā.

Krāsvielu saistīšanas metodes

25. Saskaņā ar noteiktiem nekodīgiem materiāliem pretestība var samazināties zem robežvērtības 5 k Ω , paverot iespēju joniem izkļūt caur *stratum corneum* un vēl samazinot elektrisko pretestību (9). Piemēram, neitrālas organiskās vielas un virsmaktīvas vielas (deterģenti, emulgatori u. c.) var noņemt ādas lipīdus, palielinot membrānas joncaurlaidību. Tāpēc, ja ar šādām ķīmikālijām iegūtās TEP vērtības ir apmēram 5 k Ω vai mazākas, bet saskatāma ādas bojājuma nav, kontrolaudiem un apstrādātajiem audiem jānoteic krāsvielas penetrācija, lai noskaidrotu, vai iegūtās TEP vērtības ir ādas caurlaidības paaugstināšanās vai ādas korozijas rezultāts (7) (9). Pēdējā gadījumā, ja ir *stratum corneum* pārrāvumi, audu slāni zem ādas virsmas ātri penetrē un nokrāso uz tās aplicēta krāsviela sulforodamīns B. Minētā krāsviela ir stabila pret ļoti daudz ķīmisko vielu iedarbību, kā arī ir stabila turpmāk aprakstītajā ekstrakcijas procedūrā.

Krāsvielas sulforodamīna B aplicēšana un noņemšana

26. Pēc TEP noteikšanas magnija sulfāta šķīdumu no caurulītes izlej un uzmanīgi apskatās, vai ādai nav acīmredzamu bojājumu. Ja acīmredzama liela bojājuma (piem., perforācijas) nav, katra ādas diska epidermālajai virsmai uz divām stundām aplicē 150 μ l 10 % (masa/tilp.) krāsvielas sulfurodamīna (skābais sarkanais 52; C.I. 45100; CAS numurs 3520-42-1) šķīduma destilētā ūdenī. Lai visu lieko/nesaistīto krāsvielu noņemtu, ādas diskus pēc tam apmēram 10 sekundes skalo ar ūdensvada ūdeni, kura temperatūra nepārsniedz istabas temperatūru. Katru ādas disku no PTFE caurulītes piesardzīgi izņem un ievieto mēģenē (piemēram, 20 mL stikla scintilācijas mēģenē) ar dejonizētu ūdeni (8 ml). Mēģenes uzmanīgi 5 minūtes krata, lai noņemtu vēl jebkādu nesaistītu krāsvielu. Pēc tam skalošanas procedūru atkārto, tad ādas diskus izņem un ievieto mēģenēs ar 5 ml nātrija dodecilsulfāta (NDS) 30 % šķīdumu destilētā ūdenī un 60 °C temperatūrā inkubē līdz nākamajai dienai.
27. Pēc inkubācijas visus ādas diskus izņem un atmet, bet šķīdumu 8 minūtes centrifugē 21 °C temperatūrā (relatīvais centrālās spēks $\sim 175 \times g$). Paraugu, kurā ir 1 mL supernatanta, 1:5 (tilp./tilp) (t. i., 1 mL + 4 mL) atšķaida ar 30 % (masa/tilp) NDS šķīdumu destilētā ūdenī. Mēra šķīduma optisko blīvumu (OB) pie 565 nm.

Krāsvielas satura aprēķināšana

28. Krāsvielas sulforodamīna B saturu diskā aprēķina pēc OB vērtībām (9) (sulforodamīna B krāsvielas molārās ekstinkcijas koeficients pie 565 nm = $8,7 \times 10^4$; molekulmasa = 580). Krāsvielas saturu katram ādas diskam nosaka, izmantojot attiecīgo kalibrēšanas līkni, un pēc tam replikātiem aprēķina krāsvielas vidējo saturu.

Pieņemamības kritēriji

29. Vidējie TEP rezultāti ir derīgi, ja paralēlās pozitīvās un negatīvās kontroles vērtības atbilst diapazoniem, kas attiecībā uz šo metodi ir pieņemami testēšanas laboratorijā. Pieņemamie pretestības diapazoni attiecībā uz iepriekš aprakstīto metodoloģiju un aparātu ir norādīti šajā tabulā:

Kontrole	Viela	Pretestības diapazons (KΩ)
pozitīvā	1 M sālsskābes	0,5–1,0
negatīvā	Destilēts ūdens	10–25

30. Vidējie krāsvielas saistīšanas rezultāti derīgi ar nosacījumu, ka paralēlo kontroļu vērtības atbilst diapazoniem, kas attiecībā uz šo metodi ir pieņemami. Ieteicamie pieņemamie krāsvielas satura diapazoni kontrolvielām, kuras izmanto ar augstāk aprakstīto metodoloģiju un aparāturu, norādīti šajā tabulā:

Kontrole	Viela	Krāsvielas satura diapazons (µg/disks)
pozitīvā	1 M sālsskābes	40–100
negatīvā	Destilēts ūdens	15–35

Rezultātu interpretēšana

31. Šo testēšanas metodi optimizējot, noteikta, pirmsvalidācijas fāzē testēta un oficiālā validācijas pētījumā apstiprināta tika TEP robežvērtība, pie kuras kodīgas ķīmikālijas tiek nošķirtas no nekodīgām.
32. Ar ANO *GHS / CLP* asociētais prognozēšanas modelis attiecībā uz ādas korozijas testēšanas metodi, kas balstās uz žurkas ādas TEP ir sniegts zemāk:

Uzskatāms, ka testējamā ķīmikālija uz ādu kodīgi neiedarbojas:

- ja attiecībā uz testējamo ķīmikāliju iegūtā vidējā TEP vērtība ir lielāka par ($>$) 5 kΩ vai
 - attiecībā uz testējamo ķīmikāliju iegūtā vidējā TEP vērtība ir mazāka par vai vienāda ar ($>$) 5 kΩ un
- ādas diski nav acīmredzami bojāti (piem., perforēti) un
 - vidējais krāsvielas saturs uz disku ir mazāks par ($<$) vidējo krāsvielas saturu uz disku, kāds ir paralēlajai 10 M HCl pozitīvajai kontrolei (attiecībā uz pozitīvās kontroles vērtībām sk. 30. punktu).

Uzskatāms, ka testējamā ķīmikālija uz ādu iedarbojas kodīgi:

- i) ja attiecībā uz šo testējamo ķīmikāliju vidējā TEP vērtība ir mazāka par vai vienāda ar ($\leq$) 5 k Ω un šie ādas diski ir acīmredzami bojāti (piem., perforēti) vai
- ii) attiecībā uz testējamo ķīmikāliju iegūtā vidējā TEP vērtība ir mazāka par vai vienāda ar ($>$) 5 k Ω un

- ādas diski nav acīmredzami bojāti (piem., perforēti), bet
- vidējais krāsvielas saturs uz disku ir lielāks par vai vienāds ar ($\geq$) vidējo krāsvielas saturu uz disku, kāds ir paralēlajai 10 M HCl pozitīvajai kontrolei (attiecībā uz pozitīvajām kontrolvērtībām sk. 30. punktu).

33. Vienai atsevišķai testēšanas reizei (eksperimentam) ar vismaz trim ādas disku replikātiem jābūt pietiekamai gadījumos, kur testējamās ķīmiskās vielas klasifikācija ir nepārprotama. Tomēr ja rezultāti ir uz robežas, piemēram, replikātu mērījumiem trūkst konkordances un/vai vidējais TEP ir 5 ± 0.5 k Ω , jāapsver, vai nav vajadzīga otrā testēšanas reize (eksperiments), kā arī vai nav vajadzīga trešā, ja abu pirmo divu testēšanas reižu (eksperimentu) rezultāti nesakrīt.

DATI UN PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

Dati

34. Attiecīgā gadījumā testējamās ķīmikālijas pretestības vērtības (k Ω) un krāsvielas satura vērtības (μ g uz disku) būtu jāatspoguļo tabulas veidā, ieskaitot datus par katru atsevišķo replikāta disku katrā testēšanas reizē (eksperimentā) un vidējās vērtības $\pm$ standartnovirze. Jāatspoguļo visi eksperimentu atkārtojumi. Attiecībā uz katru testējamo ķīmikāliju ziņojumā būtu jāatspoguļo novērotie ādas disku bojājumi.

Testēšanas pārskats

35. Testēšanas pārskatā norāda šādu informāciju.

Testējamā ķīmikālija un kontroles ķīmikālijas:

- vienkomponta viela: ķīmiskā identifikācija, piemēram, *IUPAC* vai *CAS* nosaukums, *CAS* numurs, *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula, tīrība, attiecīgā gadījumā un ja praktiski iespējams — piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. c.;
- daudzkomponentu vielas, *UVCB* un maisījumi iespējami izsmeļoši raksturotas pēc to komponentu ķīmiskās identitātes (sk. iepriekš), kvantitatīvās sastopamības un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām;
- izskats, šķīdība ūdenī un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības;
- avots, no kura dzīvnieki saņemti, sērijas numurs, ja zināms;
- testējamās ķīmikālijas / kontrolvielas pirmstestēšanas apstrāde (piem., sildīšana, sasmalcināšana), ja tāda veikta;

- testējamās ķīmikālijas stabilitāte, izmantošanas termiņš vai atkārtotas analīzes datums, ja tas zināms;
- glabāšanas apstākļi.

Testa dzīvnieki:

- izmantotā līnija un dzimums;
- par donordzīvniekiem izmantoto dzīvnieku vecums;
- avots, turēšanas apstākļi, uzturs u. tml.;
- detalizēta informācija par ādas preparātu sagatavošanu.

Testēšanas nosacījumi:

- testēšanas iekārtu kalibrēšanas līknes;
- krāsvielas saistīšanas testa izpildes kalibrācijas līknes, OB mērīšanai izmantotās vērtības un attiecīgā gadījumā mērierīces (piem., spektrofotometra) OB linearitātes diapazons;
- detalizēta informācija par TEP mērīšanai izmantoto testēšanas procedūru;
- attiecīgā gadījumā — detalizēta informācija par krāsvielas saistīšanas noteikšanai izmantoto procedūru;
- testā izmantotās devas, ekspozīcijas perioda vai periodu ilgums un ekspozīcijas temperatūra vai temperatūras;
- detalizēta informācija par mazgāšanas procedūru, ko izmanto pēc ekspozīcijas perioda;
- uz vienu testējamo ķīmikāliju un uz kontrolēm (pozitīvo un negatīvo kontroli) izmantoto replicēto ādas disku skaits;
- testa procedūras modifikāciju apraksts, ja tādas bijušas;
- norāde uz modeļa vēsturiskajiem datiem. No tiem jānorāda vismaz:
 - i) pozitīvās un negatīvās kontroles TEP vērtību (izteiktas $k\Omega$) pieņemamība ar norādi uz pozitīvās un negatīvās kontroles pretestības diapazoniem,
 - ii) pozitīvās un negatīvās kontroles krāsvielas satura vērtību (izteiktas $\mu\text{g}/\text{disc}$) pieņemamība ar norādi uz pozitīvās un negatīvās kontroles krāsvielas satura diapazoniem,
 - iii) testa rezultātu pieņemamība ar norādi uz ādas disku replikātu vēsturisko mainību;
- izmantoto lēmuma pieņemšanas kritēriju / prognozēšanas modeļa apraksts.

Rezultāti:

- tabulas veidā apkopoti TEP un krāsas saistīšanas testu (attiecīgā gadījumā) dati par atsevišķām testējamām ķīmikālijām un kontrolēm, sniegti par katru testēšanas reizi (eksperimentu) un katru ādas diska replikātu (pa atsevišķiem dzīvniekiem un atsevišķiem ādas paraugiem, vidējās vērtības, standartnovirze un variācijas koeficients;

- apraksts par jebkādu novērotu ietekmi;
- atvasinātā klasifikācija ar norādi uz izmantoto prognozēšanas modeli un/vai lēmuma pieņemšanas kritēriju.

Rezultātu iztirzājums

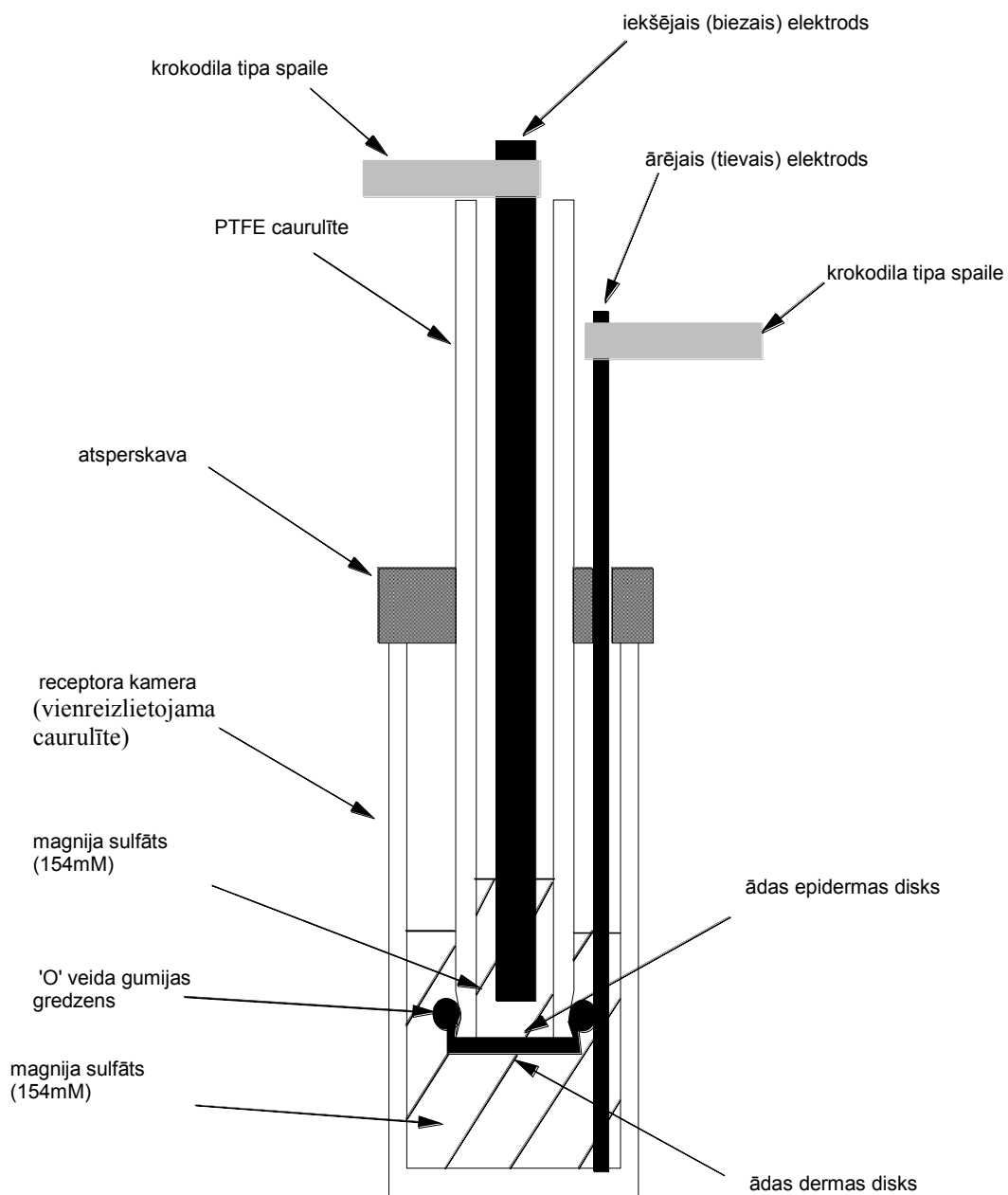
Secinājumi

LITERATŪRA

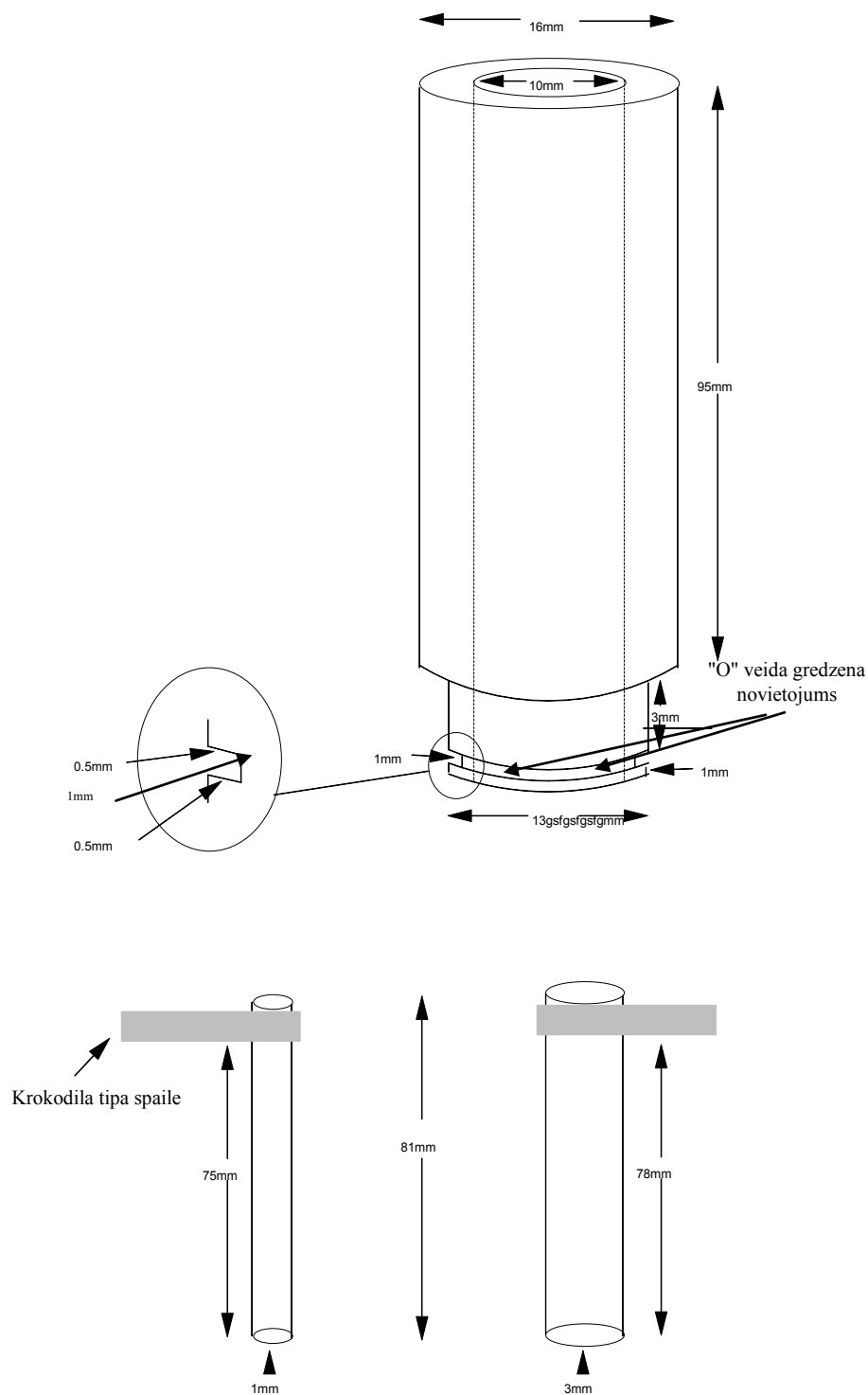
- (1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Available at: [\[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html\]](http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html).
- (2) Chapter B.4 of this Annex, Acute Dermal Irritation, Corrosion.
- (3) Chapter B.40bis of this Annex, *In Vitro* Skin Model.
- (4) Chapter B.65 of this Annex, *In Vitro* Membrane Barrier Test Method.
- (5) Chapter B.46 of this Annex, *In Vitro* Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method.
- (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., Brüscheweiler 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. ATTĒLS. ŽURKAS ĀDAS TEP TESTA APARĀTS



2. ATTĒLS. POLITETRAFLUORETILĒNA (PTFE) CAURULĪTES, RECEPTORA KAMERAS UN ELEKTRODU IZMĒRI.



Attēlotā aparāta darbības kritiskie faktori:

- PTFE caurulītes iekšējais diametrs,

- elektrodu garumam attiecībā pret PTFE caurulīti un receptora kameru jābūt tādām, lai elektrodi nepieskartos ādas diskam un lai elektroda standartgarums būtu saskarē ar MgSO_4 šķīdumu,
- MgSO_4 šķīduma līmenim receptora kamerā jābūt tādām, lai attiecībā uz šķidruma līmeni PTFE caurulītē līmenis būtu kā 1. attēlā,
- lai elektriskās pretestības mērījums patiesi atspoguļotu ādas īpašības, ādas diskam jābūt pietiekami labi fiksētam pie PTFE caurulītes.

Papildinājums

DEFINĪCIJAS

Pareizība: pakāpe, kādā testēšanas metodes rezultāti sakrīt ar pieņemtajām atsaucēs vērtībām. Tas ir testēšanas metodes veikspējas mērs un viens no relevantuma aspektiem. Šo terminu bieži izmanto tādā pašā nozīmē kā terminu “konkordantums”, ar to saprotot testēšanas metodes pareizo iznākumu īpatsvaru (20).

K: kodīgs.

Ķīmikālija: viela vai maisījums.

Konkordantums: tādas testēšanas metodes veikspējas mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un viens no relevantuma aspektiem. Šo terminu bieži vien izmanto tādā pašā nozīmē kā terminu “pareizība”, ar to saprotot visu to testēto ķīmikāliju īpatsvaru, kas pareizi klasificētas kā pozitīvas vai negatīvas. Konkordantums lielā mērā ir atkarīgs no to pozitīvo rezultātu prevalences, kādi iegūti attiecībā uz pētāmajiem testējamo ķīmikāliju veidiem (20).

GHS (Ķīmisko vielu klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētā sistēma): sistēma, kas piedāvā ķīmikāliju (vielu un maisījumu) klasifikāciju pa standartizētiem fizisko apdraudējumu, veselības apdraudējumu un vidisko apdraudējumu tipiem un līmeņiem un izmanto tādas attiecīgus komunikācijas elementus kā piktogrammas, signālvārdi, bīstamības apzīmējumi, drošības prasību apzīmējumi un drošības datu lapas, lai sniegtu informāciju par ķīmikāliju nelabvēlīgo ietekmi un tādējādi aizsargātu cilvēkus (arī darba devējus un darba ņēmējus, transporta darbiniekus, patērētājus un avārijas dienestu darbiniekus) un vidi (1).

IATA: integrētā testēšanas un novērtēšanas pieeja.

Maisījums: maisījums vai šķīdums, kas sastāv no divām vai vairākām vielām.

Vienkomponenta viela: tāda pēc kvantitatīvā sastāva definēta viela, kurā vismaz 80 % (masa/masa) veido viena galvenā sastāvdaļa.

Daudzkomponentu viela: tāda pēc kvantitatīvā sastāva definēta viela, kurā vairāk nekā viena no galvenajām sastāvdaļām ir koncentrācijā $\geq 10\%$ (masa/masa) un $< 80\%$ (masa/masa). Daudzkomponentu vielas tiek iegūtas ražošanas procesā. Atšķirība starp maisījumu un daudzkomponentu vielu ir tāda, ka maisījumu iegūst, divas vai vairākas vielas sajaucot bez ķīmiskas reakcijas. Daudzkomponentu viela rodas ķīmiskā reakcijā.

NK: nekodīgs.

OD: optiskais blīvums.

PK: pozitīvā kontrole, replikāts, kurā ir visi testēšanas sistēmas komponenti un kurš apstrādāts ar vielu, par ko zināms, ka tā inducē pozitīvu atbildreakciju. Lai būtu iespējams novērtēt pozitīvās kontroles atbildreakcijas mainību laikā, pozitīvās atbildreakcijas intensitāte nedrīkstētu būt pārāk liela.

Veiktspējas standarti (VS): uz validētu testēšanas metodi bāzēti standarti, pēc kuriem izvērtē noteikšanas mehānisma vai funkcionalitātes ziņā līdzīgu testēšanas metožu salīdzināmību. Tajos ietilpst: ((i) nepieciešamie testēšanas metodes komponenti; (ii) minimāls tādu references ķīmikāliju saraksts, kuras izraudzītas no citām ķīmikālijām, ko izmanto, lai pierādītu pieņemamu validētās testēšanas metodes veiktspēju; kā arī iii), uz attiecīgajā validētajā testēšanas metodē iegūto rezultātu pamata — tādi paši ticamības un pareizības līmeņi, kā būtu jāiegūst ar novērtējamo testēšanas metodi, to izvērtējot ar references vielām no minimālā saraksta.

Relevantums: parametrs, kas raksturo testēšanas metodes un interesējošās ietekmes sakarību un to, vai testu lietot konkrētam nolūkam ir jēgpilni un noderīgi. Pakāpe, kādā ar testēšanas metodi var pareizi izmērīt vai prognozēt interesējošo bioloģisko ietekmi. Relevantums ietver arī testēšanas metodes pareizības (konkordantuma) aspektu (20).

Ticamība: parametrs, kas izsaka, kādā pakāpē, izmantojot vienu un to pašu protokolu, kādu testēšanas metodi vienā un tajā pašā laboratorijā vai dažādās laboratorijās ilgākā laika nogrieznī var izmantot reproducējami. To novērtē, aprēķinot intralaboratorisko un interlaboratorisko reproducējamību (20).

Jūtība: tas, cik liela daļa no visām pozitīvajām/aktīvajām ķīmikālijām ar šo testēšanas metodi tiek klasificētas pareizi. Tas ir tādas testēšanas metodes pareizības mērs, ar kuru iegūst kategorālus rezultātus, un svarīgs faktors testēšanas metodes relevantuma izvērtēšanā (20).

Ādas korozijs *in vivo*: neatgriezenisku ādas bojājumu rašanās; proti, redzama nekroze, kas caur epidermu skar dermu un radusies pēc tam, kad testējamā viela uz ādas aplicēta līdz četrām stundām. Tipiskas reakcijas uz kodīgumu ir čūlas, asiņošana, asiņainas kreveles un 14 dienu novērošanas perioda beigās — ādas izbalējuma radīta atkrāsošanās, ādas laukumi, kur izkritis apmatojums, un rētas. Neskaidros gadījumos bojājums jānovērtē histopatoloģiski.

Specifiskums: tas, cik liela daļa no visām negatīvajām/neaktīvajām ķīmikālijām ar testēšanas metodi tiek klasificētas pareizi. Tādas testēšanas metodes pareizības mērs, ar kuru iegūst kategorālus rezultātus, un svarīgs faktors testēšanas metodes relevantuma izvērtēšanā (20).

Viela: ķīmiskais elements un tā dabiski radušies vai ražošanas procesā iegūti savienojumi, ieskaitot to stabilizācijai nepieciešamās piedevas, kā arī izmantotajos procesos radušos piejaukumus, bet izņemot šķīdinātājus, kurus var atdalīt, neietekmējot vielas stabilitāti un nemainot tās sastāvu.

(Testēšanas) reize: atsevišķas testējamās ķīmikālijas paralēla testēšana ar vismaz trijiem replicētiem ādas diskiem.

Testējamā ķīmikālija: jebkura viela vai maisījums, kuru testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

Transkutānā elektriskā pretestība (TEP): ādas elektriskās pretestības mērs, kas izteikts kiloomos (kΩ). Vienkārša un robusta metode, kā novērtē barjerfunkciju, ar Vitstona tilta palīdzību reģistrējot jonu pāreju caur ādu.

UVCB: vielas, kuru sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kompleksi reakcijas produkti vai bioloģiski materiāli. ”;

(6) pielikuma B daļas B.40a nodaļu aizstāj ar šādu:

“B.40.a ĀDAS KOROZIJA *IN VITRO*: REKONSTRUĒTAS CILVĒKA EPIDERMAS *RhE* TESTS

IEVADS

1. Šī testēšanas metode (TM) ir ekvivalenta ESAO testēšanas vadlīnijā (TG) Nr. 431 (2016) aprakstītajam. Ādas korozija ir nepārejošs ādas bojājums, kas izpaužas kā tāda redzama nekroze visā epidermā, kura ietiecas dermā un radusies pēc tam, kad uz ādas aplikēta testējamā ķīmikālija [atbilstoši definīcijai, kas dota Apvienoto Nāciju Organizācijas (ANO) Ķīmikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētajā sistēmā (*GHS*) (1) un Eiropas Savienības (ES) Regulā Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakojšanu (*CLP* regula)¹]. Šīs atjauninātās testēšanas metodes B.40a aprakstā raksturota *in vitro* procedūra, kas dod iespēju saskaņā ar ANO *GHS* (1) un ar *CLP* identificēt nekodīgas un kodīgas vielas. Ar tās palīdzību kodīgas vielas ir iespējams arī daļēji iedalīt apakškategorijs.
2. Ķīmikāliju ādas korozijas radīšanas potenciāla novērtēšana parasti bijusi saistīta ar laboratorijas dzīvnieku izmantošanu (TM B.4, līdzvērtīga ESAO *TG* 404; sākotnēji pieņemta 1981. g. un pārskatīta 1992., 2002. un 2015. g. (2). Lai testētu ķīmikāliju potenciālu izraisīt ādas koroziju, bez pašreizējās testēšanas metodes B.40a validētas un pieņemtas ir tādas citas *in vitro* testēšanas metodes kā TM B.40a (ekvivalenta ESAO *TG* 430) (3) un TM B.65 (ekvivalenta ESAO *TG* 435) (4). Turklāt ādas kairinājuma potenciāla testēšanai ir pieņemta *in vitro* TM B.46 (ekvivalenta ESAO *TG* 439) (5). ESAO norādījumu dokuments par integrētu testēšanas un novērtēšanas pieeju (*IATA*) attiecībā uz ādas koroziju un kairinājumu apraksta vairākus modulus, kādos grupēti informācijas avoti un analīzes instrumenti, un pirmkārt, sniedz norādījumus par to, kā, novērtējot ķīmikāliju potenciālu radīt ādas kairinājumu un ādas koroziju, integrēt un izmantot jau esošos testēšanā un citādi iegūtos datus, un otrkārt, ierosina pieeju, ko izmantot, ja vajadzīga turpmāka testēšana (6).
3. Šīs testēšanas metodes apraksts pievēršas tādām cilvēkveselības beigupunktam kā ādas korozija. Tas paredz izmantot rekonstruētu cilvēka epidermu (*RhE*) (iegūta no nepārveidotiem no cilvēka atvasinātiem epidermas keratinocītiem), kura tuvu atdarina cilvēka ādas augšējo slāņu jeb epidermas, histoloģiskās, morfoloģiskās, bioķīmiskās un fizioloģiskās īpašības. Attiecīgā testēšanas vadlīnija sākotnēji pieņemta 2004. gadā, 2013. gadā atjaunināta, lai tajā

¹ Eiropas Parlamenta un Padomes 2008. gada 16. decembra Regula (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakojšanu un ar ko groza un atceļ Direktīvas 67/548/EEK un 1999/45/EK un groza Regulu (EK) Nr. 1907/2006 (OV L 353/1, 31.12.2008.).

iekļautu papildu testēšanas metodes, kurās izmantoti *RhE* modeļi un paredzēta iespēja šīs metodes izmantot, lai uz tām balstītu kodīgu ķīmikāliju iedalīšanu apakškategoriās, kā arī 2015. gadā atjaunināta, lai ietvertu atsauci uz *IATA* norādījumu dokumentu un ieviestu alternatīvu procedūru, ko izmanto dzīvotspējas mērīšanai.

4. Šajā testēšanas metodē ir iekļauti četri validēti komerciāli pieejami *RhE* modeļi. Ir veikti pirmsvalidācijas pētījumi(7), pēc kuriem izdarīts oficiāls validācijas pētījums par ādas korozijas (8)(9)(10) novērtēšanu (11) (12) attiecībā uz diviem komerciāli pieejamiem testa modeļiem, *EpiSkin™ Standard Model* (SM) un *EpiDerm™ Skin Corrosivity Test* (SCT) (*EPI-200*) (tālākajā tekstā saukti par validētajām references metodēm — VRM). Šo pētījumu iznākamā radās ieteikums, ka divas iepriekš minētās VRM varētu izmantot regulatīvām vajadzībām, lai kodīgas (C) vielas atšķirtu no nekodīgām (NC) vielām, un ka turklāt *EpiSkin™* var izmantot par atbalstu kodīgu vielu iedalīšanā apakškategoriās (13) (14) (15). Saskaņā ar validāciju, kas balstās uz PS, līdzīgus rezultātus kā VRM *EpiDerm™* ir uzrādījuši vēl divi citi komerciāli pieejami *in vitro* ādas korozijas *RhE* testa modeļi (16) (17) (18). Tie ir *SkinEthiC™ RHE*¹ un *epiCS®* (agrākais nosaukums *EST-1000*), un arī tos var regulatīviem nolūkiem izmantot kodīgu vielu atšķiršanai no nekodīgām vielām (19)(20). Pēcvalidācijas pētījumi, ko *RhE* modeļa izstrādātāji 2012. līdz 2014. gadā izdarījuši ar precizētu protokolu, ar kura palīdzību tika koriģēta interference, ko rada testējamo ķīmikāliju izraisīta nespecifiska MTT redukcija, uzlaboja gan C/NC atšķiršanas veikspēju, gan atbalstu kodīgo vielu iedalīšanai apakškategoriās (21) (22). Ar *EpiDerm™ SCT*, *SkinEthiC™ RHE* un *EpiCS®* iegūtie pēcvalidācijas dati ir tālāk statistiski izanalizēti, lai apzinātu alternatīvus prognozēšanas modeļus, kas uzlabojuši prognozētspēju attiecībā uz apakškategorizēšanu (23).
5. Pirms kādu piedāvātu līdzīgu vai modificētu *in vitro RhE* testēšanas metodi, kas nav VRM, attiecībā uz ādas koroziju iespējams izmantot regulatīvām vajadzībām, saskaņā ar veikspējas standartu (PS) (24) prasībām, kuras aprakstītas saskaņā ar ESAO norādījumu dokumenta Nr. 34 (25) principiem būtu jānosaka tās ticamība, relevantums (pareizība) un piedāvātā lietojuma ierobežojumi, lai būtu drošība par tās līdzību VRM. Datu savstarpējā atzīšana (*Mutual acceptance of data*) būs garantēta tikai tad, ja visas jaunierosinātās vai atjauninātās VS atbilstošās testēšanas metodes būs pārskatītas un iekļautas attiecīgajā testēšanas vadlīnijā. Minētajā testēšanas vadlīnijā iekļautos testa modeļus var izmantot, lai, turklāt izmantojot datu savstarpējās atzīšanas priekšrocības, apmierinātu valstu prasības attiecībā uz testu rezultātiem, kas iegūti ar kādu *in vitro* testēšanas metodi ādas korozijas noteikšanai.

¹ Visos uz *RhE* tehnoloģiju balstītajos modeļos izmanto saīsinājumu *RhE* (= rekonstruēta cilvēka epiderma). Modeļa *SkinEthiC™* nosaukumā šis saīsinājums nozīmē to pašu, taču šīs konkrētās testēšanas metodes tirdznieciski izmantotajā nosaukumā visi saīsinājuma burti ir lielie burti.

DEFINĪCIJAS

6. Izmantotās definīcijas ir sniegtas 1. pielikumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI

7. Ar šīs testēšanas palīdzību iespējams saskaņā ar ANO *GHS* / *CLP* identificēt nekodīgas un kodīgas vielas un maisījumus. Šī testēšanas metode tālāk atbalsta kodīgu vielu un maisījumu apakškategorizēšanu ANO *GHS* (1) atbilstošā izvēles 1.A apakškategorijā un 1.B un 1.C apakškategorijas kombinācijā (21) (22) (23). Šo testēšanas metodi ierobežo nelielais labi zināmu 1.C apakškategorijas *in vivo* ādai kodīgu ķīmikāliju kopums, tāpēc ar tās palīdzību saskaņā ar ANO *GHS* un ar *CLP* savstarpēji nošķirt “kodīgs ādai” 1.B un 1.C apakškategoriju nav iespējams. Iedalīšana apakškategorijās ir iespējama ar testēšanas modeļiem *EpiSkin*TM, *EpiDerm*TM *SCT*, *SkinEthic*TM *RHE* un *epiCS*[®] testa modeļiem (proti, 1.A apakškategorija attiecībā pret 1.B un 1.C apakškategoriju un attiecībā pret NK).
8. Validācijā, kas atbalsta šajā testēšanas metodes aprakstā ietvertos testēšanas modeļus, kuri tiek izmantoti nekodīgu un kodīgu vielu identificēšanai, ķīmikālijas ir testētas plašā klāstā, kurā galvenokārt pārstāvētas atsevišķas vielas; validācijas pētījuma empīriskajā datubāzē bija 60 ķīmikāliju un tā aptvēra plašu ķīmikāliju klašu klāstu (8) (9) (10). Testēšanas metodes izstrādātāji izdarīja testēšanu, kurā tika pierādīta testa jutība, specifiskums, pareizība un intralaboratoriskā reproducējamība tādām vajadzībām kā iedalīšana apakškategorijās, un rezultātus pārskatīja ESAO (21) (22) (23). Raugoties pēc pieejamiem vispārējiem datiem, šī testēšanas metode ir piemērojama plašam ķīmikāliju klašu un agregātstāvokļu klāstam, ieskaitot šķidrumus, puscietas un cietas vielas, kā arī vaskus. Šķidrumi var būt ūdens vai neūdens šķīdumi; cietas vielas var būt gan ūdenī šķīstošas, gan nešķīstošas. Ja iespējams, cietas vielas pirms aplicēšanas jāsamal smalkā pulverī; nekāda cita priekšapstrāde paraugam nav vajadzīga. Ja pierādījumi liecina, ka šie testa modeļi kādai konkrētai testēšanas metodes apraksta aptvertai testējamajai ķīmikāliju kategorijai nav izmantojama, to attiecībā uz minēto konkrēto kategoriju neizmanto. Turklāt, paplašinot šīs testēšanas metodes izmantojamību attiecībā uz vielām, tiek uzskatīts, ka tā izmantojama arī attiecībā uz maisījumiem. Tomēr, ņemot vērā, ka maisījumi aptver plašu kategoriju un sastāva spektru un patlaban pieejams tikai neliels daudzums informācijas par maisījumu testēšanu, tad, ja var pierādīt testēšanas metodes nepiemērojamību konkrētai maisījumu kategorijai (piemēram, saskaņā ar stratēģiju, kas piedāvāta (26)), attiecīgo testēšanas metodi minētajai konkrētajai maisījumu kategorijai neizmanto. Pirms attiecībā uz maisījumu izmanto šo testēšanas metodi, lai iegūtu datus kādai plānotai regulatīvai vajadzībai, jāapsver, vai un kādēļ tā var sniegt tādām nolūkam piemērotus rezultātus. Ja pastāv normatīva prasība maisījumu testēt, tāda apsvēršana nav vajadzīga. Validācijas pētījumos vēl nav vērtēti gāzes un aerosoli (8) (9) (10). Kaut arī jādomā, ka vispār gāzes un aerosolus ar *RhE* tehnoloģiju testēt ir iespējams, ar pašreizējo testēšanas metodi tos testēt nevar.
9. Testējamās ķīmikālijas, kas gaismu absorbē tādā pašā diapazonā kā MTT formazāns, un testējamās ķīmikālijas, kas vitālo krāsvielu MTT spēj tieši reducēt (līdz MTT formazānam), var

ietekmēt audu dzīvotspējas mērījumus un tādēļ korigēšanai var būt nepieciešams izmantot pielāgotas kontroles. Tas, kāda veida pielāgotas kontroles var būt vajadzīgas, var mainīties atkarībā no tā, kāda veida interferenci testējamā ķīmikālija rada, un atkarībā no MTT formazāna mērīšanai izmantotās procedūras (sk. 25.–31. punktu).

10. Lai arī ar šo testēšanas metodi nevar iegūt pietiekamu informāciju par ādas kairinājumu, jānorāda, ka tādai ietekmei uz veselību kā ādas kairinājums *in vitro* īpaši pievēršas TM B.46, kura balstās uz to pašu *RhE* testēšanas sistēmu, lai gan tai ir cits protokols (5). Attiecībā uz to, kā pilnīgi izvērtēt lokālo ietekmi uz ādu pēc vienreizējas dermālas ekspozīcijas, jāizmanto ESAO norādījumu dokuments par integrētajām testēšanas un novērtēšanas pieejām (6). Šajā *IATA* pieejā, pirms apsver, vai neveikt testēšanu ar dzīvniekiem, izdara *in vitro* testus uz kodīgumu ādai (tādus, kā doti šajā metodes aprakstā) un kairinājumu ādai. Ir atzīts, ka cilvēka ādas izmantošanai jāatbilst nacionālām un starptautiskām ētikas normām un nosacījumiem.

TESTA PRINCIPS

11. Testējamo ķīmikāliju vietēji aplicē uz trīsdimensiju *RhE* modeļa, kuru veido nepārveidoti cilvēka epidermas keratinocīti, kas kultivēti tā, lai veidotos labi diferencēts daudzslāņains cilvēka epidermas modelis. Tai ir bazālais, spinālais un granulārais slānis, kā arī vairākslāņu *stratum corneum* ar lamelāriem lipīdu starpšūnu slāņiem, kuru uzbūve ir reprezentatīva galvenajām lipīdu klasēm *in vivo*.
12. *RhE* testēšanas metodes pamatā ir premisa, ka kodīgas ķīmikālijas difūzijas vai erozijas ceļā spēj izklūt cauri *stratum corneum* un ka tās ir citotoksiskas apakšā esošo slāņu šūnām. Šūnu dzīvotspēju mēra pēc vitālās krāsvielas MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolija bromīds, tiazolila zilais tetrazolija bromīds; CAS Nr. 298-93-1] fermentatīvās pārvēršanās par zilās krāsas formazāna sāli, kura daudzumu kvantitatīvi nosaka audu ekstraktā (27). Kodīgas ķīmikālijas identificē pēc to spējas šūnu dzīvotspēju samazināt zem noteiktām sliekšņvērtībām (sk. 35. un 36. punktu). Ir parādīts, ka uz *RhE* balstītā ādas korozijas testēšanas metode spēj prognozēt trušiem saskaņā ar TM B.4 novērtētu ādas korozijas ietekmi *in vivo* (2).

KOMPETENCES PIERĀDĪŠANA

13. Pirms kādu no četriem šai testēšanas metodei atbilstošajiem validētajiem *RhE* testa modeļiem sāk izmantot regulāri, laboratorijām ieteicams pierādīt tehnisko kompetenci, pareizi saklasificējot divpadsmit 1. tabulas sarakstā norādītās standartvielas. Ja izmanto metodi, kura paredzēta sīkākai klasificēšanai, jāpierāda arī, ka pareizi tiek veikta iedalīšana apakškategoriās. Gadījumos, kur kāda sarakstā norādīta viela nav pieejama vai kur tas attaisnojami, var izmantot citu vielu, par kuru pieejami pietiekami *in vivo* un *in vitro* references dati (piem., vielu no references ķīmikāliju saraksta (24)), ja vien tiek izmantoti tie paši 1. tabulā aprakstītie izraudzīšanās kritēriji.

1. tabula. Standartvielu¹ saraksts

Vielā	CAS Nr.	Ķīmikāliju klase ²	ANO GHS/CLP kat. uz <i>in vivo</i> rezultātu bāzes ³	VRM kat. uz <i>in vitro</i> rezultātu ⁴ bāzes	MTT Reducētājs ⁵	Agregāt- stāvoklis
1.A kategorija, <i>In Vivo</i> kodīgas vielas						
brometiķskābe	79-08-3	organiska skābe	1.A	(3) 1.A	–	CV
bora trifluorīdihidrāts	13319-75-0	neorganiska skābe	1.A	(3) 1.A	–	Š
fenols	108-95-2	fenols	1.A	(3) 1.A	–	CV
dihloracetil- hlorīds	79-36-7	elektrofīla viela	1.A	(3) 1.A	–	Š
Apakškategoriju 1B-un-1C kombinācija, <i>In Vivo</i> kodīgas vielas						
glioksilskābes monohidrāts	563-96-2	organiska skābe	1B-un-1C	(3) 1B-un-1C	–	S
pienskābe	598-82-3	organiska skābe	1B-un-1C	(3) 1B-un-1C	–	L
etanolamīns	141-43-5	organiska bāze	1B	(3) 1B-un-1C	Y	viskoza
hlorūdeņražskābe (14,4 %)	7647-01-0	neorganiska skābe	1.B-un-1.C	(3) 1.B-un-1.C	–	L
<i>in vivo</i> nekodīgas vielas (vielas, kas nav kodīgas)						
fenetilbromīds	103-63-9	elektrofīla viela	NK	(3) NK	jā	Š
4-amino-1,2,4- triazols	584-13-4	organiska bāze	NK	(3) NK	–	CV
4-(metiltio)- benzaldehyds	3446-89-7	elektrofīla viela	NK	(3) NK	jā	Š
laurīnskābe	143-07-7	organiska skābe	NK	(3) NK	–	CV

Saīsinājumi: CAS Nr. = *Chemical Abstracts Service* reģistra numurs VRM = validēta references metode; NK = nekodīga viela

¹ Standartvielas, kas sagrupētas vispirms kodīgās un nekodīgās vielās, pēc tam pa kodīguma apakškategoriām un tad pa ķīmikāliju klasēm, tika izraudzītas no vielām, kuras tika izmantotas *ECVAM EpiSkin*TM un *EpiDerm*TM validācijas pētījumos (8) (9) (10) un pēcvalidācijas pētījumos, kuru pamatā ir *EpiSkin*TM (22), *EpiDerm*TM, *SkinEthic*TM un *epiCS*[®] izstrādātāju sagādātie dati (23). Ja nav norādīts citādi, vielas testētas tīrības līmenī, kāds piemīt komerciāli iegādātai vielai (8). Izlasē, cik vien iespējams, iekļautas vielas, kas: i) ir reprezentatīvas attiecībā uz to kodīguma atbildreakciju diapazonu (piem., nekodīgas, vāji līdz stipri kodīgas), ko iespējams mērīt vai paredzēt ar VRM, ii) ir reprezentatīvas attiecībā uz validācijas pētījumos izmantotajām ķīmikāliju klasēm, iii) ir ar labi definētu ķīmisku struktūru, iv) ar VRM inducē reproducējamus rezultātus, v) ar *in vivo* testēšanas references metodi inducē skaidrus rezultātus; vi) ir komerciāli pieejamas un vii) nav saistītas ar augstām likvidēšanas izmaksām.

² Ķīmikāliju klasi piešķirušī *Barratt et al.* (8).

³ Attiecīgās ANO iepakojuma grupas attiecīgi priekš ANO *GHS/CLP* 1.A, 1.B un 1.C kategorijas ir I, II un III.

⁴ Šajā tabulā atspoguļotās VRM *in vitro* prognozes iegūtas ar testa modeļiem *EpiSkin*TM un *EpiDerm*TM (VRM) testēšanas metodes izstrādātāju veiktā pēcvalidācijas testēšanā.

⁵ *ECVAM* ādas korozijas validācijas pētījumos iegūtas vērtības, kas raksturo ādas dzīvotspēju, netika koriģētas attiecībā uz tiešo MTT redukciju (validācijas pētījumos netika izdarītas kontroles ar nonāvētiem audiem). Tomēr šajā tabulā sniegtie testēšanas metodes izstrādātāju radītie pēcvalidācijas dati iegūti ar pielāgotām kontrolēm (23).

14. Kompetences pierādīšanā lietotājam ieteicams pēc audu saņemšanas verificēt, ka to barjerīpašības atbilst *RhE* modeļa ražotāja dotajai specifikācijai. Īpaši svarīgi tas ir tad, ja audu sūtījums piegādāts no tālienes vai piegāde bijusi ilga. Kad testēšanas metode sekmīgi apgūta un kompetence tās izmantošanā pierādīta, šādu verifikāciju vairs nav nepieciešams veikt katru reizi. Tomēr, ja testēšanas metodi izmanto parastajā praksē, barjerfunkciju ieteicams joprojām novērtēt regulāri.

PROCEDŪRA

15. Tālāk vispārīgi aprakstīti šīs testēšanas metodes aptverto ādas korozijas novērtēšanai paredzēto *RhE* testēšanas modeļu komponenti un procedūras. *RhE* modeļus, kas atzīti par zinātniski derīgiem izmantošanai šajā testēšanas metodē, proti, modeļus *EpiSkin*TM (*SM*), *EpiDerm*TM (*EPI-200*), *SkinEthic*TM *RHE* un *epiCS*[®] (16)(17)(19)(28)(29)(30)(31)(32)(33), var iegūt no komerciāliem piegādātājiem. Attiecībā uz šiem četriem *RhE* modeļiem ir pieejamas darba standartprocedūras (*SOP*), un pārskats par šo modeļu testēšanas metodes galvenajiem komponentiem sniegts 2. papildinājumā. Jebkuru no šiem modeļiem īstenojot un izmantojot laboratorijā, ieteicams iepazīties ar attiecīgo *SOP*. Testēšanai ar šīs testēšanas metodes aptvertajiem četriem *RhE* testēšanas modeļiem būtu jāatbilst tālāk minētajiem nosacījumiem.

RHE TESTĒŠANAS METODES KOMPONENTI

Vispārīgie nosacījumi

16. Epitēlija rekonstruēšanai jāizmanto nepārveidoti cilvēka keratinocīti. Zem funkcionējoša *stratum corneum* jābūt vairākiem dzīvotspējīgu epitēlija šūnu slāņiem (bazālajam slānim, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*). *Stratum corneum* jābūt vairākslāņainam, ar tādu esenciālo lipīdu profilu, lai izveidotos funkcionāla barjera, kura ir pietiekami robusta, lai nepieļautu citotoksisku etalonķimikāliju, piemēram, nātrija dodecilsulfāta (*SDS*) vai *Triton X-100*, ātru penetrēšanos. Barjerfunkcija būtu uzskatāmi jāpierāda, un šo funkciju iespējams novērtēt, vai nu nosakot, pie kādas koncentrācijas etalonķimikālija pēc noteikta ekspozīcijas laika par 50 % samazina audu dzīvotspēju (*IC*₅₀), vai nosakot, kāds ekspozīcijas laiks vajadzīgs, lai pēc tam, kad konkrētā noteiktā koncentrācijā aplicēta etalonķimikālija (sk. 18. punktu), par 50 % samazinātos šūnu dzīvotspēja (*ET*₅₀). *RhE* modeļa aizturētājīpašībām jābūt tādām, lai ap *stratum corneum* esošais materiāls nenokļūtu dzīvotspējīgos audos, kā dēļ var tikt nepareizi modelēta ādas ekspozīcija. *RhE* modelis nedrīkst būt kontaminēts ar baktērijām, vīrusiem, mikoplazmu vai sēnītēm.

Funkcionālie nosacījumi

Dzīvotspēja

17. Audu dzīvotspējas kvantitatīvai noteikšanai izmanto MTT testu (27). *RhE* audu modeļa dzīvotspējīgās šūnas vitālo krāsvielu MTT spēj reducēt par zilās krāsas MTT formazāna nogulsniem, kuras pēc tam no audiem tiek ekstrahētas ar izopropanolu (vai līdzīga šķīdinātāja)

starpniecību. Jau paša ekstrakcijas šķīduma optiskajam blīvumam (OB) jābūt pietiekami zēmam, t. i., $OB < 0,1$. Ekstrahēto MTT formazānu kvantitatīvi var izteikt, vai nu izmantojot standartabsorbcijas OB mērīšanu, vai *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas procedūru (38). *RhE* modeļa lietotājiem jānodrošina, ka visas izmantotās *RhE* modeļa partijas atbilst negatīvās kontroles vajadzībām definētajiem kritērijiem. *RhE* modeļa izstrādātājam/piegādātājam jānosaka negatīvās kontroles OB vērtību pieņemamības diapazons (augšējā un apakšējā robežvērtība). Četru validēto šajā testēšanas metodē iekļauto *RhE* testa modeļu negatīvās kontroles OB vērtību pieņemamības diapazoni ir norādīti 2. tabulā. *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas lietotājam par negatīvās kontroles pieņemšanas kritēriju jāizmanto 2. tabulā norādītie negatīvās kontroles OB diapazoni. Jādokumentē, vai visā ekspozīcijas periodā ar negatīvo kontroli apstrādātie audi kultūrā ir stabili (uzrāda tādus pašus OB rādītājus).

2. tabula. Partijas kvalitātes kontrolei paredzētie negatīvās kontroles optiskā blīvuma vērtību pieņemamības diapazoni

	Apakšējā pieņemamības	Augšējā pieņemamības
<i>EpiSkin</i> TM	> 0,6	< 1,5
<i>EpiDerm</i> TM SCT (EPI-200)	> 0,8	< 2,8
<i>SkinEthic</i> TM RHE	> 0,8	< 3,0
<i>epiCS</i> [®]	> 0,8	< 2,8

Barjerfunkcija

18. *Stratum corneum* un tā lipīdsastāvam jābūt pietiekamam, lai nepieļautu noteiktu citotoksisku etalonķimikāliju, piemēram, SDS vai *Triton X-100*, strauju penetrēšanos, un to nosaka ar IC_{50} vai ET_{50} (3. tabula). *RhE* modeļa izstrādātājam/tirgotājam, piegādājot audus galalietotājam, jāpierāda katras izmantotā *RhE* modeļa partijas barjerfunkcija (sk. 21. punktu).

Morfoloģija

19. *RhE* modelis būtu histoloģiski jāizmeklē, pierādot, ka tam ir vairākslāņu struktūra, kas ir tāda pati kā cilvēka epidermas struktūra un satur *stratum basale*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum* un *stratum corneum*, un cilvēka epidermas lipīdprofilam līdzīgs lipīdprofils. *RhE* modeļa izstrādātājam/tirgotājam, piegādājot audus galalietotājam, jāiesniedz katras izmantotā *RhE* modeļa partijas histoloģisks izmeklējums, kas pierāda, ka tam piemīt vajadzīgā audu morfoloģija (sk. 21. punktu).

Reproducējamība

20. Testēšanas metodes lietotājiem būtu jāpierāda šo testēšanas metožu reproducējamība, tās izmantojot ilgākā laika nogrieznī ar pozitīvajām un negatīvajām kontrolēm. Turklāt šī testēšanas metode būtu jāizmanto tikai tad, ja *RhE* modeļa izstrādātājs/piegādātājs sagādā datus, kas pierāda metodes reproducējamību, to izmantojot ilgākā laika nogrieznī ar kodīgām un nekodīgām ķimikālijām no, piem., kontrolvielu saraksta (1. tabula). Ja kādu no testēšanas

metodēm izmanto iedalīšanai apakškategoriās, jāpierāda arī reproducējamība attiecībā uz iedalīšanu apakškategoriās.

Kvalitātes kontrole (QC)

21. *RhE* modelis jāizmanto tikai tad, ja izstrādātājs/piegādātājs pierādījis, ka visas izmantotās *RhE* modeļa partijas atbilst definētajiem produkcijas pieņemamības kritērijiem, kuru vidū svarīgākie ir *dzīvotspēja* (17. punkts), *barjerfunkcija* (18. punkts) un *morfoloģija* (19. punkts). Šos datus dara pieejamus testēšanas metodes lietotājiem, lai tie šo informāciju varētu iekļaut testēšanas pārskatā. Kodīgu vielu klasificēšanā uzticamām prognozēm der tikai rezultāti, kas iegūti ar kvalitātes kontrolē pieņemtām audu partijām. *RhE* modeļa izstrādātājam/piegādātājam jānosaka *IC*₅₀ vai *ET*₅₀ vērtību pieņemamības diapazons (augšējā un apakšējā robežvērtība). Pieņemamības diapazoni attiecībā uz četriem validētajiem testa modeļiem ir norādīti 3. tabulā.

3. tabula. Partiju caurlaišanas QC kritēriji

	Apakšējā pieņemamības	Augšējā pieņemamības
<i>EpiSkin</i>TM (18 stundas ilga apstrāde ar <i>SDS</i> (33)).	<i>IC</i> ₅₀ = 1,0 mg/ml	<i>IC</i> ₅₀ = 3,0 mg/ml
<i>EpiDerm</i>TM SCT (<i>EPI-200</i>) (1 % <i>Triton X-100</i>)(34)	<i>ET</i> ₅₀ = 4,0 stundas	<i>ET</i> ₅₀ = 8,7 stundas
<i>SkinEthic</i>TM <i>RHE</i> (1 % <i>Triton X-100</i>)(35)	<i>ET</i> ₅₀ = 4,0 stundas	<i>ET</i> ₅₀ = 10,0 stundas
<i>epiCS</i>[®] (1 % <i>Triton X-100</i>)(36)	<i>ET</i> ₅₀ = 2,0 stundas	<i>ET</i> ₅₀ = 7,0 stundas

Testējamās ķīmikālijas un kontrolķīmikāliju aplicēšana

22. Uz katru testējamo ķīmikāliju un kontrolēm un katru ekspozīcijas laiku jāizmanto vismaz divi audu replikāti. Testējamās ķīmiskās vielas, kas ir šķīdras vai cietas vielas, uz epidermas virsmas vienmērīgā slānī jāaplicē pietiekamā daudzumā, t. i., vismaz 70 μl/cm² vai 30 mg/cm², raugoties, lai netiktu testēta nefiksēta deva. Atkarībā no modeļa, lai nodrošinātu iespējami labāku testējamās vielas saskari ar epidermas virsmu, testējot cietas vielas, epidermas virsma vispirms jāsamitrina ar dejonizētu vai destilētu ūdeni, un tikai tad var aplicēt vielu (34) (35) 36) (37). Ja vien iespējams, cietas vielas jātestē smalka pulvera veidā. Aplicēšanas metodei jābūt testējamai ķīmikālijai piemērotai (sk., piem., atsauces (34–37)). Ekspozīcijas perioda beigās testējamā ķīmikālija no epidermas virsmas rūpīgi jānoskalo ar buferšķīdumu uz ūdens bāzes vai 0,9 % NaCl šķīdumu. Atkarībā no tā, kurš no četriem validētajiem *RhE* testēšanas modeļiem tiek izmantots, uz katru testējamo ķīmikāliju tiek izmantot divi vai trīs ekspozīcijas laiki (attiecībā uz visiem četriem derīgajiem *RhE* modeļiem 3 min un 1 h; attiecībā uz *EpiSkin*TM papildu ekspozīcijas laiks četras stundas). Atkarībā no izmantotā *RhE* testēšanas modeļa un

novērtētā ekspozīcijas perioda, inkubācijas temperatūra ekspozīcijas laikā var variēt no istabas temperatūras līdz pat 37 °C.

23. Katrā izpildes reizē jāizmanto paralēlā negatīvā kontrole un pozitīvā kontrole (PC), lai pierādītu, ka audu dzīvotspēja (izmanto negatīvās kontroles), barjerfunkcija un no tās izrietošais audu jutīgums (izmanto PC) ietilpst noteiktā vēsturiskā pieņemamības diapazonā. Ierosinātās pozitīvās kontroles ķīmikālijas atkarībā no izmantotā *RhE* modeļa ir ledus etiķskābe vai 8N KOH. Jāņem vērā, ka 8N KOH ir tiešs MTT reducētājs, attiecībā uz kuru varētu būt vajadzīgas 25. un 26. punktā aprakstītās pielāgotās kontroles. Ieteicamās negatīvās kontroles vielas ir 0,9 % NaCl šķīdums vai ūdens.

Šūnu dzīvotspējas mērījumi

24. Šūnu dzīvotspējas mērīšanai šajā testēšanas metodē būtu jāizmanto MTT tests, kas ir kvantitatīvs tests (27). Audu paraugu uz 3 stundām ievieto attiecīgas koncentrācijas (piemēram, 0,3–1 mg/ml) MTT šķīdumā. Pēc tam iegūtās zilas krāsas formazāna nogulsnes ekstrahē ar šķīdinātāju (piemēram, izopropanolu vai paskābinātu izopropanolu) un nosaka formazāna koncentrāciju, mērot optisko blīvumu pie viļņa garuma 570 nm ar frekvenču joslas filtru, kura maksimums ir ± 30 nm, vai izmantojot *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas procedūru (sk. 30. un 31. punktu) (38).
25. Testējamās ķīmikālijas ar MTT testu var interferēt, MTT tieši reducējoties līdz zilajam formazānam un/vai notiekot krāsu interferencei, ja testējamajai ķīmikālijai absorbcija dabiski vai apstrādes procedūru rezultātā notiek tajā pašā OB diapazonā kā formazānam (570 ± 30 nm, galvenokārt zilas un violetas ķīmikālijas). Būtu jāizmanto tādas papildu kontroles, kurās detektē un ievērtē šādu testējamo ķīmikāliju izraisītu potenciālo interferenci, kā, piemēram, nespecifiskās MTT redukcijas kontrole (NSMTT kontrole) un nespecifiskas krāsas kontrole (NSC kontrole) (sk. 26. līdz 30. punktu). Tas ir īpaši svarīgi tad, ja kāda konkrēta testējamā ķīmikālija no audiem netiek pilnīgi noskalota vai izkļūst caur epidermu un tālāk brīdī, kad tiek veikts dzīvotspējas tests ar MTT, atrodas šajos audos. Detalizēts apraksts, kā ievērtēt tiešo MTT reducēšanos un krāsvielu radītas interferences, atrodams testa modeļiem paredzētajās *SOP* (34) (35) (36) (37).
26. Lai noteiktu tiešus MTT reducētājus, katra testējamā ķīmikālija jāpievieno svaigi sagatavotai MTT “barotnei” (34) (35) (36) (37). Ja testējamo ķīmikāliju saturošais MTT maisījums iekrāsojas zils/violets, uzskata, ka testējamā ķīmikālija tieši reducē MTT, un neatkarīgi no tā, vai mēra standartabsorbciju (OB) vai izdara *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas procedūru, tālāk jāizdara funkcionāla pārbaude ar dzīvotnespējīgu epidermu. Šajā papildu funkcionālajā pārbaudē izmanto nonāvētus audus, kam piemīt tikai reziduāla metaboliska aktivitāte, taču testējamo ķīmikāliju tie absorbē līdzīgā daudzumā kā dzīvotspējīgi audi. Katru MTT reducētāju ķīmikāliju uz vienu ekspozīcijas laiku aplicē vismaz diviem nonāvētu audu replikātiem, ar kuriem veic pilnu ādas korozijas testu. Pēc tam aprēķina audu faktisko dzīvotspēju, no procentuālās audu dzīvotspējas, kas iegūta ar MTT reducētājam eksponētiem dzīviem audiem,

atņemot procentuālo nespecifisko MTT redukciju, kas iegūta ar tam pašam MTT reducētājam eksponētiem nonāvētiem audiem un aprēķināta attiecībā pret negatīvo kontroli, kura izpildīta paralēli koriģējamam testam (% *NSMTT*).

27. Lai noteiktu iespējamo interferenci, ko rada krāsainas testējamās ķīmikālijas vai testējamās ķīmikālijas, kuras saskarē ar ūdeni vai izopropanolu iekrāsojas, un izlemtu, vai nav vajadzīgas papildu kontroles, jāizdara testējamās ķīmikālijas spektrālanalīze ūdenī (eksponēcijas vide) un/vai izopropanolā (ekstrakcijas šķīdums). Ja testējamā ķīmikālija ūdenī un/vai izopropanolā absorbē gaismu 570 ± 30 nm diapazonā, jāizdara vēl papildu kontroles ar krāsvielām vai arī jāizmanto *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas procedūra, kuras gadījumā kontroles nav vajadzīgas (sk. 30. un 31. punktu). Mērot standartabsorbciju OB, katru interferējošo krāsaino testējamo ķīmikāliju vienā eksponēcijas laikā aplicē uz vismaz diviem dzīvotspējīgu audu replikātiem, kuriem izdara visu ādas korozijas testu, taču, lai iegūtu nespecifiskas krāsas (*NSC_{living}*) kontroli, MTT inkubācijas solī tos inkubē barotnē, nevis MTT šķīdumā. Sakarā ar to, ka dzīvjiem audiem piemīt bioloģiska mainība, par katru krāsaino testējamo ķīmikāliju katrā izpildes reizē uz eksponēcijas laiku jābūt paralēlai kontrolei *NSC_{living}*. Pēc tam aprēķina audu faktisko dzīvotspēju, no procentuālās audu dzīvotspējas, kas iegūta ar interferējošai testējamajai ķīmikālijai eksponētiem un MTT šķīdumā inkubētiem dzīvjiem audiem, atņemot procentuālo nespecifisko krāsu, kas iegūta ar interferējošai testējamajai ķīmikālijai eksponētiem dzīvjiem audiem, kuri paralēli koriģējamam testam inkubēti barotnē bez MTT (% *NSC_{living}*).
28. Mērot tādu testējamo ķīmikāliju standartabsorbciju OB, par kurām konstatēts, ka tās gan tieši reducē MTT (sk. 26. punktu), gan izraisa krāsu interferenci (sk. 27. punktu), papildus iepriekšējos punktos aprakstītajām kontrolēm *NSMTT* un *NSC_{living}* jābūt arī kādam trešajam kontroļu kopumam. Tas parasti attiecas uz MTT testā interferējošām tumšas (piem., zilas, violetas, melnas) krāsas testējamajām ķīmikālijām, jo raksturīgās krāsas dēļ ir grūti novērtēt to spēju tieši reducēt MTT, kā aprakstīts 26. punktā. Šīs testējamās ķīmikālijas var piesaistīties gan dzīvjiem, gan nonāvētiem audiem, un tāpēc ar kontroli var *NSMTT* koriģēt ne tikai iespējamu tiešu MTT redukciju, ko izraisījusi testējamā ķīmikālija, bet arī krāsas interferenci, ko radījusi testējamās ķīmikālijas piesaistīšanās nonāvētajiem audiem. Tādējādi koriģēšana attiecībā uz krāsas interferenci var notikt dubultā, jo krāsas interference, ko radījusi testējamās ķīmikālijas saistīšanās ar dzīvjiem audiem, jau tiek koriģēta ar kontroli *NSC_{living}*. Lai nepieļautu varbūtību, ka krāsas interference tiek koriģēta divreiz, jāizdara trešā kontrole attiecībā uz nespecifisku krāsu nonāvētajos audos (*NSC_{killed}*). Šajā papildu kontrolē testējamo ķīmikāliju uz katru eksponēcijas laiku aplicē vismaz diviem nonāvēto audu replikātiem, kam veic visu testēšanas procedūru, taču MTT inkubācijas posmā tos inkubē nevis MTT šķīdumā, bet gan barotnē. Neatkarīgi no veikto testu/izpildes reižu skaita attiecībā uz katru testējamo ķīmikāliju pietiek ar vienu kontroli *NSC_{killed}*, taču tā jāizdara paralēli kontrolei *NSMTT* un, ja iespējams, ar to pašu audu partiju. Pēc tam aprēķina audu faktisko dzīvotspēju, no procentuālās audu dzīvotspējas, kas iegūta ar testējamajai ķīmikālijai eksponētiem dzīvjiem audiem, atņemot % *NSMTT* un % *NSC_{living}* un pieskaitot procentuālo nespecifisko krāsu, kas iegūta ar interferējošai testējamajai ķīmikālijai eksponētiem un barotnē bez MTT inkubētiem nonāvētajiem audiem un

aprēķināta attiecībā pret negatīvo kontroli, kura izpildīta paralēli koriģējamam testam (% NSC_{killed}).

29. Svarīgi ievērot, ka nespecifiskas MTT redukcijas un nespecifiskas krāsas interferenču dēļ var tikt iegūti audu ekstrakta rādījumi, kas pārsniedz spektrofotometra linearitātes diapazonu. Tādēļ katrai laboratorijai, pirms regulatīvos nolūkos sākt testēt testējamās ķīmikālijas, jānosaka sava spektrofotometra linearitātes diapazons, izmantojot komerciāli pieejamu MTT formazānu (*CAS* Nr. 57360-69-7). Ja tādu audu ekstraktu optiskais blīvums, kas iegūti ar testējamo ķīmikāliju, neveicot korekciju attiecībā uz tiešu MTT redukciju un/vai krāsas interferenci, ir spektrofotometra lineārā diapazona robežās vai ar testējamo ķīmikāliju iegūtā nekorrigētā procentuālā dzīvotspēja jau ir $\leq 50\%$, tiešo MTT reducētāju un interferējošas krāsas testējamo ķīmikāliju novērtēšanai ar spektrofotometru ir lietderīgi mērīt standartabsorbciju (OB). Tomēr rezultāti attiecībā uz tādām testējamām ķīmikālijām, kurām % $NSMTT$ un/ vai % $NSC_{living} > 50\%$ no negatīvās kontroles, jāinterpretē piesardzīgi.
30. Attiecībā uz testējamām krāsainām ķīmikālijām, kuras standartabsorbcijas (OB) mērījumiem nav piemērotas, jo pārāk stipri interferē ar MTT testu, MTT formazāna mērīšanai var izmantot alternatīvo *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas procedūru (sk. 31. punktu) (37). *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas sistēma dod iespēju MTT formazānu pirms tā kvantitatīvas noteikšanas atdalīt no testējamās ķīmikālijas (38). Tāpēc neatkarīgi no testējamās ķīmikālijas, ja tiek izmantota *HPLC/UPLC* spektrofotometrija, NSC_{living} vai NSC_{killed} kontroles nav jāveic. Taču, ja ir aizdomas, ka testējamā ķīmikālija tieši reducē MTT, vai tai ir krāsa, kas traucē novērtēt ķīmikālijas spēju tieši reducēt MTT (kā aprakstīts 26. punktā), ir jāizmanto $NSMTT$ kontroles. MTT formazāna mērīšanai izmantojot *HPLC/UPLC* spektrofotometriju, kā MTT formazāna smailes laukuma, kas iegūts ar testējamajai ķīmikālijai eksponētiem dzīvjiem audiem, procentuālo attiecību pret MTT formazāna smailes laukumu, kas iegūts ar paralēlo negatīvo kontroli, aprēķina audu procentuālo dzīvotspēju. Attiecībā uz testējamām ķīmikālijām, kas spēj tieši reducēt MTT, audu faktisko dzīvotspēju aprēķina, no procentuālās audu dzīvotspējas, kas iegūta ar testējamajai ķīmikālijai eksponētiem dzīvjiem audiem, atņemot % $NSMTT$. Visbeidzot jāatzīmē, ka nav iespējams novērtēt tādus tiešus MTT reducētājus, kuri arī var radīt krāsas interferenci, kuri pēc apstrādes saglabājas audos un kuri MTT reducē tik spēcīgi, ka testētā audu ekstrakta OB (izmantojot standarta OB mērīšanu) vai smailes laukumi (izmantojot *HPLC/UPLC* spektrofotometriju) pārsniedz spektrofotometra linearitātes diapazonu, taču šādi gadījumi ir ļoti reti.
31. Ar jebkāda veida testējamām ķīmikālijām (krāsainas, bezkrāsainas, MTT reducētājas un MTT nereducētājas) MTT formazāna mērīšanai var izmantot arī *HPLC/UPLC* spektrofotometriju (38). Tā kā *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas sistēmas ir daudzveidīgas, pirms *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas sistēmu izmanto, lai kvantitatīvi noteiktu MTT formazānu no audu ekstraktiem, būtu jāpierāda minētās sistēmas kvalifikācija, izpildot pieņemamības kritērijus, kas noteikti attiecībā uz tādu kvalifikācijas standartparametru kopumu, kuru pamatā ir ASV Pārtikas un zāļu pārvaldes izstrādātās nozares vadlīnijās par bioanalītisko metožu validēšanu

aprakstītie parametri (38) (39). Šie galvenie parametri un to pieņemamības kritēriji ir norādīti 4. papildinājumā. Kad 4. papildinājumā noteiktie pieņemamības kritēriji izpildīti, *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas sistēmu uzskata par kvalificētu un gatavu tam, lai noteiktu MTT formazāna daudzumu, ievērojot šīs testēšanas metodes aprakstā sniegtos eksperimentēšanas nosacījumus.

Pieņemamības kritēriji

32. Attiecībā uz jebkuru testēšanas metodi, kurā tiek izmantoti derīgi *RhE* modeļi, ar negatīvo kontroli apstrādātu audu optiskajam blīvumam vajadzētu atbilst 2. tabulā aprakstīto audu kvalitātei un tas nedrīkstētu būt mazāks par vēsturiski noteiktajām robežvērtībām. Ar PK, proti, ledus etiķskābi vai 8N KOH apstrādātajiem audiem būtu jāatspoguļo audu spēja reaģēt uz kodīgu ķīmikāliju apstākļos, kur ievēroti testēšanas modeļa nosacījumi (sk. 2. papildinājumu). Testējamai ķīmikālijai un/vai kontrolķīmikālijām izmantoto audu replikātu mainībai jābūt robežās, kas pieņemtas attiecībā uz katru derīgo *RhE* modeli izvirzītajās prasībās (sk. 2. papildinājumu) (piem., divu audu replikātu mainības starpība nedrīkst pārsniegt 30 %). Ja kādā izpildes reizē iekļautā negatīvā kontrole vai pozitīvā kontrole ir ārpus pieņemtajiem diapazoniem, izpildes reizi uzskata par nederīgu un tā jāatkārto. Ja ārpus definētā diapazona ir mainība attiecībā uz testējamām ķīmikālijām, tās jātestē atkārtoti.

Rezultātu interpretēšana un prognozēšanas modelis

33. Par katru testējamo ķīmikāliju iegūtās OB vērtības var izmantot dzīvotspējīgo šūnu procentuālā īpatsvara aprēķināšanai salīdzinājumā ar negatīvo kontroli, kurai to pieņem par 100 %. Ja izmanto *HPLC/UPLC* spektrofotometriju, audu procentuālo dzīvotspēju aprēķina kā MTT formazāna smailes laukuma, kas iegūts ar testējamajai ķīmikālijai eksponētiem dzīvjiem audiem, procentuālo attiecību pret MTT formazāna smailes laukumu, kas iegūts ar paralēlo negatīvo kontroli. Procentuālās šūnu dzīvotspējas robežvērtības, kas korozīvas testējamās ķīmikālijas šķir no nekoroziīvām (vai dod iespēju atšķirt dažādas kodīgu vielu apakškategorijas), attiecībā uz katru šīs testēšanas metodes aptverto testa modeli ir definētas zemāk 35. un 36. punktā un šīs vērtības būtu jāizmanto rezultātu interpretēšanai.
34. Ja rezultātā iegūtā klasifikācija nav nepārprotama, attiecībā uz testējamu ķīmikāliju vajadzētu pietikt ar vienu testēšanas izpildes reizi, kurā ietilpst vismaz divi audu replikāti. Tomēr, ja rezultāti ir uz robežas, piemēram, ja nesakrīt replikātu mērījumi, var apsvērt, vai neveikt otru izpildes reizi, bet, ja divu pirmo izpildes reižu rezultāti nesakrīt, arī trešo.
35. Ar ANO *GHS / CLP* asociētais prognozēšanas modelis attiecībā uz *EpiSkin*TM ādas korozijas testēšanas modeli (9)(34)(22), ir sniegts 4. tabulā.

4. tabula. *EpiSkin*TM prognozēšanas modelis.

Pa ekspozīcijas laikiem mērītā dzīvotspēja (t = 3, 60 un 240 minūtes)	Prognoze, ko aplūko
Pēc 3 min ekspozīcijas < 35 %	kodīga: • fakultatīvā 1.A apakškategorija*

Pēc 3 min ekspozīcijas $\geq 35\%$ UN pēc 60 min ekspozīcijas $< 35\%$ VAI pēc 60 min ekspozīcijas $\geq 35\%$ UN pēc 240 min ekspozīcijas $< 35\%$	kodīga: fakultatīvo apakš kategoriju 1.B un 1.C kombinācija
pēc 240 min ekspozīcijas $\geq 35\%$	nekodīga

*) Saskaņā ar datiem, kas radīti, lai novērtētu, kā *RhE* testēšanas modeļi noder par atbalstu vielu iedalīšanai apakš kategorijās, tika pierādīts, ka attiecībā uz testēšanas modeli *EpiSkin*TM apmēram 22 % 1.A apakš kategorijas rezultātu faktiski var būt 1.B apakš kategorijas vai 1.C apakš kategorijas vielas vai maisījumi (proti, pārspīlēta klasifikācija) (sk. 3. papildinājumu).

36. Ar ANO *GHS/CLP* klasifikācijas sistēmu asociētajiem ādas korozijas testēšanas modeļiem *EpiDerm*TM *SCT* (10)(23)(35), *SkinEthiC*TM *RHE* (17)(18) (23) (36), un *epiCS*[®] (16)(23)(37) 5. tabula sniedz prognozēšanas modeļus.

5. tabula. *EpiDerm*TM *SCT*, *SkinEthiC*TM *RHE* un *epiCS*[®]

Pa ekspozīcijas laikiem mērītā dzīvotspēja (t = 3 60 minūtes)	Prognoze, ko aplūko
1. SOLIS attiecībā uz <i>EpiDerm</i>TM <i>SCT</i>, <i>SkinEthiC</i>TM <i>RHE</i> un <i>epiCS</i>[®]	
Pēc 3 min ekspozīcijas $< 50\%$	kodīga
Pēc 3 min ekspozīcijas $\geq 50\%$ UN Pēc 60 min ekspozīcijas $< 15\%$	kodīga
Pēc 3 min ekspozīcijas $\geq 50\%$ UN Pēc 60 min ekspozīcijas $\geq 15\%$	nekodīga
2. SOLIS attiecībā uz <i>EpiDerm</i>TM <i>SCT</i> sakarā ar vielām, kas 1. solī identificētas kā kodīgas	
Pēc 3 min ekspozīcijas $< 25\%$	fakultatīvā 1.A apakš kategorija *
Pēc 3 min ekspozīcijas $\geq 25\%$	fakultatīvo apakš kategoriju 1.B un 1.C kombinācija
2. SOLIS attiecībā uz <i>SkinEthiC</i>TM <i>RHE</i> sakarā ar vielām, kas 1. solī identificētas kā kodīgas	
Pēc 3 min ekspozīcijas $< 18\%$	fakultatīvā 1.A apakš kategorija *
Pēc 3 min ekspozīcijas $\geq 18\%$	fakultatīvo apakš kategoriju 1.B un 1.C kombinācija
2. SOLIS attiecībā uz <i>epiCS</i>[®] sakarā ar vielām, kas 1. solī identificētas kā kodīgas	
Pēc 3 min ekspozīcijas $< 15\%$	fakultatīvā 1.A apakš kategorija *
Pēc 3 min ekspozīcijas $\geq 15\%$	fakultatīvo apakš kategoriju 1.B un 1.C kombinācija

DATI UN PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

Dati

37. Par katru testu, arī par atkārtotiem eksperimentiem, ja tos veic, visus datus par atsevišķajiem audu replikātiem (piemēram, optiskā blīvuma vērtības, datus par testējamās vielas ietekmi uz šūnu dzīvotspēju un tās klasifikācijas datus) apkopo tabulas veidā. Turklāt ziņojumā attiecībā uz katru testu būtu jāiekļauj audu replikātu dzīvotspējas un mainības koeficienta vidējās vērtības un diapazoni. Par katru testējamo ķīmikāliju ziņojumā jāatspoguļo tiešu MTT reducētāju vai testējamo krāsainu ķīmikāliju novērotā mijiedarbība ar MTT reaģentu.

Testēšanas pārskats

38. Testēšanas pārskatā norāda šādu informāciju.

Testējamās un kontroles ķīmikālijas:

- Vienkomponenta viela: ķīmiskā identifikācija, piemēram, *IUPAC* vai *CAS* nosaukums, *CAS* numurs, *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula, tīrība, attiecīgā gadījumā un ja praktiski iespējams — piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. tml.
- Daudzkomponentu vielas, UVCB un maisījumi: iespējami izsmelīgi raksturoti pēc komponentu ķīmiskās identitātes (sk. iepriekš), kvantitatīvās sastopamības un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām.
- izskats, šķīdība ūdenī un papildu relevantās fizikālķīmiskās īpašības;
- avots, no kura dzīvnieki saņemti, sērijas numurs, ja zināms;
- testējamās ķīmikālijas / kontrolvielas pirmstestēšanas apstrāde (piem., sildīšana, sasmalcināšana), ja tāda veikta;
- testējamās ķīmikālijas stabilitāte, izmantošanas termiņš vai atkārtotas analīzes datums, ja tas zināms;
- glabāšanas apstākļi.

Izmantotais RhE modelis un protokols un attiecīgās izvēles pamatojums (attiecīgā gadījumā)

Testa apstākļi:

- izmantotais *RhE* modelis (arī sērijas numurs);
- MTT kvantitatīvajai noteikšanai izmantotās mērierīces (piemēram, spektrofotometra) kalibrēšanas dati, viļņa garums un frekvenču joslas filtrs (attiecīgā gadījumā), un mērierīces linearitātes diapazons;
- MTT formazāna kvantitatīvajai noteikšanai izmantotās metodes apraksts;
- *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas sistēmas kvalifikācijas apraksts (attiecīgā gadījumā);
- pietiekama papildinformācija par izmantoto konkrēto *RhE* modeli, arī tā veiktspēju. No tiem jānorāda vismaz:

- i) dzīvotspēja,
- ii) barjerfunkcija,
- iii) morfoloģija,
- iv) reproducējamība un prognozēšanas spēja,
- v) modeļa kvalitātes kontroles (*QC*);

- norāde uz modeļa vēsturiskajiem datiem. No tiem jānorāda vismaz:
- kvalitātes kontroles datu pieņemamība attiecībā uz vēsturiskajiem datiem par partiju kontroles rezultātiem,
- Apliecināta testēšanas metodes izmantošanas kompetence, kas pirms attiecīgās testēšanas metodes regulāras izmantošanas pierādīta, testējot standartvielas.

Testa procedūra:

- detalizēta informācija par izmantoto testēšanas procedūru (arī par mazgāšanas procedūrām, ko izmanto pēc ekspozīcijas perioda);
- izmantotās testējamās ķīmikālijas un kontrolķīmikāliju devas;
- ekspozīcijas laiks vai laiki un temperatūra vai temperatūras;
- attiecībā uz tiešajiem MTT reducētājiem un/vai testējamām krāsojošām ķīmikālijām izmantotās kontroles; norādes (attiecīgā gadījumā);
- uz katru testējamo ķīmikāliju un kontrolēm (pozitīvā kontrole, negatīvā kontrole un *NSMTT*, *NSCliving* un *NSKilled*, attiecīgā gadījumā) izmantoto audu replikātu skaits uz vienu ekspozīcijas laiku;
- apraksts par lēmuma pieņemšanas kritēriju / prognozēšanas modeli, kas izmantots, pamatojoties uz lietoto *RhE* modeli;
- apraksts par jebkādam testa procedūras (arī mazgāšanas procedūru) modifikācijām.

Izpildes reizes un testa pieņemamības kritēriji:

- pozitīvās un negatīvās kontroles vidējās vērtības un pieņemamības diapazoni, kas balstīti uz vēsturiskajiem datiem;
- pieņemamā mainība pozitīvām un negatīvām kontrolēm izmantojamiem audu replikātiem;
- pieņemamā mainība testējamai ķīmikālijai izmantojamiem audu replikātiem.

Rezultāti:

- tabulās apkopoti dati par atsevišķām testējamām ķīmikālijām un kontrolēm par katru ekspozīcijas laiku, katru izpildes reizi un katru replikāta mērījumu, norādot arī OB vai MTT formazāna smailes laukumu, audu procentuālo dzīvotspēju, audu vidējo procentuālo

dzīvotspēju, replikātu atšķirības, standartnovirzi un/vai mainības koeficientu (attiecīgā gadījumā);

- attiecīgā gadījumā to kontroļu rezultāti, kas izmantotas tiešiem MTT reducētājiem un/vai krāsojošām testējamām ķimikālijām, norādot arī OB vai MTT formazāna smailis laukumu, % *NSMTT*, % *NSC_{living}*, % *NSC_{killed}*, standartnovirzi un/vai mainības koeficientu (attiecīgā gadījumā) un audu galīgo pareizo procentuālo dzīvotspēju;
- rezultāti, kas iegūti ar testējamo ķimikāliju (ķimikālijām) un kontrolķimikālijām, salīdzinājumā ar noteiktajiem izpildes reizes un testa pieņemamības kritērijiem;
- citu novērotu ietekmju apraksts;
- atvasinātā klasifikācija ar norādi uz izmantoto prognozēšanas modeli un/vai lēmuma pieņemšanas kritēriju.

Rezultātu iztirzājums

Secinājumi

LITERATŪRA

- (1) UN (2013). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth Revised Edition, UN New York and Geneva. Available at: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html
- (2) Chapter B.4 of this Annex, Acute Dermal Irritation, Corrosion.
- (3) Chapter B.40 of this Annex, *In Vitro* Skin Corrosion.
- (4) Chapter B.65 of this Annex, *In Vitro* Membrane Barrier Test Method.
- (5) Chapter B.46 of this Annex, *In Vitro* Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method.
- (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., Holzhutter H.-G., and Liebsch M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxicol. in Vitro* 12:483-524.
- (10) Liebsch M., Traue D., Barrabas C., Spielmann H., Uphill, P., Wilkins S., Wiemann C., Kaufmann T., Remmele M. and Holzhütter H. G. (2000). The ECVAM Prevalidation Study on the Use of EpiDerm for Skin Corrosivity Testing, *ATLA* 28: 371-401.
- (11) Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., Bruner L., Combes R.D., Ekwall B., Fielder R.J., Guillouzo A., Lewis R.W., Lovell D.P., Reinhardt C.A., Repetto G., Sladowski D., Spielmann H. et Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops, *ATLA* 23:129-147.

- (12) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, 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). Available at:
[\[http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf\]](http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf).

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Pareizība: pakāpe, kādā testēšanas metodes rezultāti sakrīt ar pieņemtajām atsaucēs vērtībām. Tas ir testēšanas metodes veikspējas raksturlielums un viens no relevantuma aspektiem. Ar šo terminu, tāpat kā terminu “konkordantums”, bieži vien saprot testa pareizo rezultātu īpatsvaru (25).

Šūnu dzīvotspēja: parametrs, kas raksturo šūnu populācijas kopējo aktivitāti, piemēram, šūnu mitohondriju dehidrogenāžu spēju reducēt vitālo krāsvielu MTT (3–(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijs bromīds, tiazolilzilais), kas atkarībā no nosakāmā testēšanas beigupunkta un izmantotā testēšanas plāna korelē ar dzīvo šūnu kopējo skaitu un/vai dzīvotspēju.

Ķīmikālija: viela vai maisījums.

Konkordantums: tādas testēšanas metodes veikspējas mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un viens no relevantuma aspektiem. Šo terminu bieži izmanto tādā pašā nozīmē kā terminu “pareizība”, ar to saprotot visu to testēto ķīmikāliju īpatsvaru, kas pareizi klasificētas kā pozitīvas vai negatīvas. Konkordantums ir lielā mērā atkarīgs no to pozitīvo rezultātu prevalences, kādi iegūti attiecībā uz pētāmajiem testējamo ķīmikāliju veidiem (25).

ET₅₀: parametrs, ko var aprēķināt pēc ekspozīcijas laika, kas pēc specifiskas noteiktas koncentrācijas etalonķīmikālijas aplicēšanas nepieciešams šūnu dzīvotspējas samazināšanai par 50 % (sk. arī IC₅₀).

GHS (Ķīmikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētā sistēma): sistēma, kas piedāvā ķīmikāliju (vielu un maisījumu) klasifikāciju pa standartizētiem fizisko apdraudējumu, veselības apdraudējumu un vidisko apdraudējumu tipiem un līmeņiem un izmanto tādas attiecīgus komunikācijas elementus kā piktogrammas, signālvārdi, bīstamības apzīmējumi, drošības prasību apzīmējumi un drošības datu lapas, lai sniegtu informāciju par ķīmikāliju nelabvēlīgo ietekmi un tādējādi aizsargātu cilvēkus (arī darba devējus un darba ņēmējus, transporta darbiniekus, patērētājus un avārijas dienestu darbiniekus) un vidi(1).

HPLC. augstas izšķirtspējas šķidrumhromatogrāfija.

IATA: integrētā testēšanas un novērtēšanas pieeja.

IC₅₀: parametrs, ko var aprēķināt pēc etalonķīmikālijas koncentrācijas, pie kuras audu dzīvotspēja pēc noteikta ekspozīcijas laika samazinās par 50 % (IC₅₀) (sk. arī ET₅₀).

Nefiksēta deva: uz epidermas aplicētas testējamās ķīmikālijas daudzums, kas lielāks par epidermas virsmas pilnīgai un vienmērīgai pārklāšanai nepieciešamo daudzumu. Maisījums vai šķīdums, kas sastāv no divām vai vairāk vielām, kuras tajā savstarpēji nereaģē.

Vienkomponenta viela: tāda pēc kvantitatīvā sastāva definēta viela, kurā vismaz 80 % (masa/masa) veido viena galvenā sastāvdaļa.

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijs bromīds; tiazolilzilā tetrazolijs bromīds.

Daudzkomponentu viela: tāda pēc kvantitatīvā sastāva definēta viela, kurā vairāk nekā viena no galvenajām sastāvdaļām ir koncentrācijā $\geq 10\%$ (masa/masa) un $< 80\%$ (masa/masa). Daudzkomponentu vielas tiek iegūtas ražošanas procesā. Atšķirība starp maisījumu un daudzkomponentu vielu ir tāda, ka maisījumu iegūst, divas vai vairākas vielas sajaucot bez ķīmiskas reakcijas. Daudzkomponentu viela rodas ķīmiskā reakcijā.

NK: nekodīgs.

Kontrole *NSC_{killed}*: nespecifiskas krāsas kontrole nonāvētos audos.

Kontrole *NSC_{living}*: nespecifiskas krāsas kontrole dzīvos audos.

NSMTT: nespecifiskā MTT redukcija.

OB: optiskais blīvums.

PK: pozitīvā kontrole, proti, replikāts, kurā ir visi testēšanas sistēmas komponenti un kurš apstrādāts ar ķimikāliju, par ko zināms, ka tā izraisa pozitīvu atbildreakciju. Lai būtu iespējams novērtēt pozitīvās kontroles atbildreakcijas mainību laikā, pozitīvās atbildreakcijas intensitāte nedrīkstētu būt pārāk liela.

Veiktspējas standarti (VS): uz validētu testēšanas metodi bāzēti standarti, pēc kuriem izvērtē noteikšanas mehānisma vai funkcionalitātes ziņā līdzīgu testēšanas metožu salīdzināmību. Tajos ietilpst: (i) nepieciešamie testēšanas metodes komponenti; (ii) minimāls tādu references ķimikāliju saraksts, kuras izraudzītas no citām ķimikālijām, ko izmanto, lai pierādītu pieņemamu validētās testēšanas metodes veiktspēju; kā arī iii), uz attiecīgajā validētajā testēšanas metodē iegūto rezultātu pamata — tādi paši pareizības un ticamības līmeņi, kā būtu jāiegūst ar novērtējamo testēšanas metodi, to izvērtējot ar references vielām no minimālā saraksta (25).

Relevantums: parametrs, kas raksturo testēšanas metodes un interesējošās ietekmes sakarību un to, vai testu lietot konkrētam nolūkam ir jēgpilni un noderīgi. Pakāpe, kādā ar testu var pareizi izmērīt vai prognozēt interesējošo bioloģisko ietekmi. Relevantums ietver arī testēšanas metodes pareizības (konkordantuma) aspektu (25).

Ticamība: parametrs, kas izsaka, kādā pakāpē, izmantojot vienu un to pašu protokolu, kādu testēšanas metodi vienā un tajā pašā laboratorijā vai dažādās laboratorijās ilgākā laika nogrieznī var izmantot reproducējami. To novērtē, aprēķinot intralaboratorisko un interlaboratorisko reproducējamību (25).

Izpildes reize: reize, kurā vienu vai vairākas ķimikālijas testē paralēli negatīvai kontrolei un pozitīvai kontrolei.

Jutība: tas, cik liela daļa no visām pozitīvajām/aktīvajām ķīmikālijām ar šo testēšanas metodi tiek klasificētas pareizi. Tas ir pareizības mērs testēšanas metodei, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testēšanas metodes relevantuma izvērtēšanā (25).

Ādas korozija *in vivo*: neatgriezenisku ādas bojājumu rašanās; proti, redzama nekroze, kas caur epidermu skar zemādu un rodas, testējamo ķīmikāliju aplicējot uz ādas uz laiku līdz četrām stundām. Reakcijām uz kodīgumu parasti ir raksturīgas čūlas, asiņošana, asiņainas kreveles un 14 dienu novērošanas perioda beigās — ādas izbalējuma radīta atkrāsošanās, ādas laukumi, kur izkritis apmatojums, un rētas. Neskaidros gadījumos bojājums jānovērtē histopatoloģiski.

Specifiskums: tas, cik liela daļa no visām negatīvajām/neaktīvajām ķīmikālijām ar testēšanas metodi tiek klasificētas pareizi. Tādas testēšanas metodes pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testēšanas metodes relevantuma izvērtēšanā (25).

Vielā: ķīmiskais elements un tā dabiski radušies vai ražošanas procesā iegūti savienojumi, ieskaitot to stabilizācijai nepieciešamās piedevas, kā arī izmantotajos procesos radušos piejaukumus, bet izņemot šķīdinātājus, kurus var atdalīt, neietekmējot vielas stabilitāti un nemainot tās sastāvu. **Testējamā ķīmikālija:** jebkura viela vai maisījums, kuru testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

UPLC: īpaši augstas izšķirtspējas šķīdumhromatogrāfija.

UVCB: vielas, kuru sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kompleksi reakcijas produkti vai bioloģiski materiāli.

2. papildinājums

ĀDAS KOROZIJAS TESTĒŠANAS VAJADZĪBĀM VALIDĒTO *RHE* TESTĒŠANAS MODEĻU GALVENIE KOMPONENTI

Testēšanas modeļa komponenti	<i>EpiSkinTM</i>	<i>EpiDermTM SCT</i>	<i>SkinEthicTM RHE</i>	<i>epiCS[®]</i>
Modeļa virsma	0,38 cm ²	0,63 cm ²	0,5 cm ²	0,6 cm ²
Audu replikātu skaits	uz ekspozīcijas laiku vismaz 2	uz ekspozīcijas laiku 2–3	uz ekspozīcijas laiku vismaz 2	uz ekspozīcijas laiku vismaz 2

Testēšanas modeļa komponenti	<i>EpiSkin™</i>	<i>EpiDerm™ SCT</i>	<i>SkinEthic™ RHE</i>	<i>epiCS®</i>
Apstrādes devas un aplicēšana	<u>Šķidrums un viskozas vielas</u>: 50 µl ± 3 µl (131,6 µl/cm²) <u>Cietas vielas</u>: 20 ± 2 mg (52,6 mg/cm²) + 100 µl ± 5µl NaCl šķīduma (9 g/l) <u>Vaskainas/lipīgas vielas</u>: 50 ± 2 mg (131,6 mg/cm²) ar neilona tīkliņu	<u>Šķidrums</u>: 50 µl (79,4 µl/cm²) ar neilona tīkliņu vai bez tā <i>Testējamās ķīmikālijas pirmstestēšanas saderība ar neilona tīkliņu</i> <u>Puscietas vielas</u>: 50 µl (79,4 µl/cm²) <u>Cietas vielas</u>: 25 µl H₂O (vai attiecīgā gadījumā vairāk) + 25 mg (39,7 mg/cm²) <u>Vaski</u>: plakanu “diskveida” gabalu (diametrā apm. 8. mm) novieto uz salvetes, kas samitrināta ar 15 µl H₂O.	<u>Šķidrums un viskozas vielas</u>: 40 µl ± 3µl (80 µl/cm²) ar neilona tīkliņu <i>Testējamās ķīmikālijas pirmstestēšanas saderība ar neilona tīkliņu</i> <u>cietas vielas</u>: 20 µl ± 2µl H₂O + 20 ± 3 mg (40 mg/cm²) <u>vaskainas/lipīgas vielas</u>: 20 ± 3 mg (40 mg/cm²) ar neilona tīkliņu	<u>Šķidrums</u>: 50 µl (83,3 µl/cm²) ar neilona tīkliņu <i>Testējamās ķīmikālijas pirmstestēšanas saderība ar neilona tīkliņu</i> <u>puscietas vielas</u>: 50 µl (83,3 µl/cm²) <u>cietas vielas</u>: 25 mg (41,7 mg/cm²) + 25 µl H₂O (vai attiecīgā gadījumā vairāk) <u>vaskainas vielas</u>: plakanu “diskveida” gabalu (diametrā apm. 8. mm) novieto uz salvetes, kas samitrināta ar 15 µl H₂O.

Testēšanas modeļa komponenti	<i>EpiSkin™</i>	<i>EpiDerm™ SCT</i>	<i>SkinEthic™ RHE</i>	<i>epiCS®</i>
Priekšpārbaude attiecībā uz tiešo MTT reducēšanos	50 µl (šķidrums) vai 20 mg (cietas vielas) + 2 ml MTT 0,3 mg/ml šķīduma uz 180 ± 5 min 37 °C temperatūrā pie 5 % CO₂, gaisa relatīvais mitrums 95 % → ja šķīdums iekrāsojas zils vai violets, jāizdara pielāgotas kontroles ar nonāvētiem ūdensapstrādātiem audiem	50 µl (šķidrums) vai 25 mg (cietas vielas) + 1 ml MTT 1 mg/ml šķīduma uz 60 min 37 °C temperatūrā pie 5 % CO₂, gaisa relatīvais mitrums 95 % → ja šķīdums iekrāsojas zils vai violets, jāizdara pielāgotas kontroles ar nonāvētiem aukstumapstrādātiem audiem	40 µl (šķidrums) vai 20 mg (cietas vielas) + 1 ml MTT 1 mg/ml šķīduma uz 180 ± 15 min 37 °C temperatūrā pie 5 % CO₂, gaisa relatīvais mitrums 95 % → ja šķīdums iekrāsojas zils vai violets, jāizdara pielāgotas kontroles ar nonāvētiem aukstumapstrādātiem audiem	50 µl (šķidrums) vai 25 mg (cietas vielas) + 1 ml MTT 1 mg/ml šķīduma uz 60 min 37 °C temperatūrā pie 5 % CO₂, gaisa relatīvais mitrums 95 % → ja šķīdums iekrāsojas zils vai violets, jāizdara pielāgotas kontroles ar nonāvētiem aukstumapstrādātiem audiem
Priekšpārbaude attiecībā uz krāsas interferenci	10 µl (šķidrums) vai 10 mg (cietas vielas) + 90 µl H₂O, maisīts 15 min istabas temperatūrā → ja šķīdums iekrāsojas, jāizdara pielāgotas kontroles ar dzīviem audiem	50 µl (šķidrums) vai 25 mg (cietas vielas) + 300 µl H₂O uz 60 min 37 °C temperatūrā pie 5 % CO₂, gaisa relatīvais mitrums 95 % → ja šķīdums iekrāsojas, jāizdara pielāgotas kontroles ar dzīviem audiem	40 µl (šķidrums) vai 20 mg (cietas vielas) + 300 µl H₂O, maisīts 60 min istabas temperatūrā → ja testējamā ķimikālija ir krāsaina, jāizdara pielāgotas kontroles ar dzīviem audiem	50 µl (šķidrums) vai 25 mg (cietas vielas) + 300 µl H₂O uz 60 min 37 °C temperatūrā pie 5 % CO₂, gaisa relatīvais mitrums 95 % → ja šķīdums iekrāsojas, jāizdara pielāgotas kontroles ar dzīviem audiem
Ekspozīcijas laiks un temperatūra	3 min, 60 min (± 5 min) un 240 min (± 10 min) vēdināmā skapī istabas temperatūrā (IT, 18–28°C)	3 min istabas temperatūrā un 60 min 37 °C temperatūrā pie 5 % CO₂, gaisa relatīvais mitrums 95 %	3 min istabas temperatūrā un 60 min 37 °C temperatūrā pie 5 % CO₂, gaisa relatīvais mitrums 95 %	3 min istabas temperatūrā un 60 min 37 °C temperatūrā pie 5 % CO₂, gaisa relatīvais mitrums 95 %

Testēšanas modeļa komponenti	<i>EpiSkin™</i>	<i>EpiDerm™ SCT</i>	<i>SkinEthic™ RHE</i>	<i>epiCS®</i>
Skalošana	25 ml 1 x fosfātu fizioloģiskais buferšķīdums (2 ml / izsviešana)	20 reižu ar pastāvīgu maigu strūklu 1 x fosfātu fizioloģiskā buferšķīduma	20 reižu ar pastāvīgu maigu strūklu 1 x fosfātu fizioloģiskā buferšķīduma	20 reižu ar pastāvīgu maigu strūklu 1 x fosfātu fizioloģiskā buferšķīduma
Negatīvā kontrole	50 µl NaCl šķīduma (9 g/l) testēta ar katru ekspozīcijas laiku	50 µl H ₂ O testēta ar katru ekspozīcijas laiku	40 µl H ₂ O testēta ar katru ekspozīcijas laiku	50 µl H ₂ O testēta ar katru ekspozīcijas laiku
Pozitīvā kontrole	50 µl ledus etiķskābes testēšana tikai 4 stundas	50 µl 8N KOH testēta ar katru ekspozīcijas laiku	40 µl 8N KOH testēšana tikai 1 stundu	50 µl 8N KOH testēta ar katru ekspozīcijas laiku
MTT šķīdums	2 ml 0,3 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
MTT inkubācijas laiks un temperatūra	180 min (± 15 min) 37 °C temperatūrā pie 5% CO ₂ , gaisa relatīvais mitrums 95 %	180 min 37 °C temperatūrā pie 5 % CO ₂ , gaisa relatīvais mitrums 95 %	180 min (± 15 min) 37°C temperatūrā pie 5 % CO ₂ , gaisa relatīvais mitrums 95 %	180 min 37 °C temperatūrā pie 5 % CO ₂ , gaisa relatīvais mitrums 95 %
Ekstrahēšanas šķīdinātājs	500 µl paskābināta izopropanola (0,04 N HCl izopropanolā) (pilnīgi iegremdēti izolēti audi).	2 ml izopropanola (ekstrahē no iegremdētā materiāla augšpusē un apakšpusē)	1,5 ml izopropanola (ekstrahē no iegremdētā materiāla augšpusē un apakšpusē)	2 ml izopropanola (ekstrahē no iegremdētā materiāla augšpusē un apakšpusē)
Ekstrahēšanas laiks un temperatūra	istabas temperatūrā pa nakti, aizsargāti no gaismas	bez kratīšanas istabas temperatūrā pa nakti vai ar kratīšanu istabas temperatūrā 120 min (~120 rpm)	bez kratīšanas istabas temperatūrā pa nakti vai ar kratīšanu istabas temperatūrā 120 min (~120 rpm)	bez kratīšanas istabas temperatūrā pa nakti vai ar kratīšanu istabas temperatūrā 120 min (~120 rpm)

Testēšanas modeļa komponenti	<i>EpiSkin™</i>	<i>EpiDerm™ SCT</i>	<i>SkinEthic™ RHE</i>	<i>epiCS®</i>
Optiskā blīvuma lasījumi	570 nm (545 – 595 nm) bez references filtra	570 nm (vai 540 nm) bez references filtra	570 nm (540 – 600 nm) bez references filtra	540 – 570 nm bez references filtra
Audu kvalitātes kontrole	18 stundas ilga apstrāde ar SDS $1,0 \text{ mg/ml} \leq IC_{50} \leq 3,0 \text{ mg/ml}$	apstrāde ar 1 % <i>Triton X-100</i> 4,08 stundas $\leq ET_{50} \leq 8,7$ stundas	apstrāde ar 1 % <i>Triton X-100</i> 4,0 stundas $\leq ET_{50} \leq 10,0$ stundas	apstrāde ar 1 % <i>Triton X-100</i> 2,0 stundas $\leq ET_{50} \leq 7,0$ stundas
Pieņemamības kritēriji	1. Ar negatīvo kontroli (NaCl) apstrādāto audu replikātu vidējam optiskajam blīvumam attiecībā uz katru ekspozīcijas laiku vajadzētu būt $\geq 0,6$ and $\leq 1,5$ 2. Tādiem audu replikātiem, kas 4 stundas eksponēti pozitīvajā kontrolē (ledus etiķskābe), vidējai dzīvotspējai, kura izteikta procentos no negatīvās kontroles, vajadzētu būt $\leq 20 \%$ 3. Dzīvotspējas diapazonā 20–100 % un attiecībā uz OB $\geq 0,3$, šo divu audu replikātu dzīvotspējas atšķirība nedrīkstētu pārsniegt 30 %.	1. Ar negatīvo kontroli (H₂O) apstrādāto audu replikātu vidējam optiskajam blīvumam attiecībā uz katru ekspozīcijas laiku vajadzētu būt $\geq 0,8$ and $\leq 2,8$ 2. Tādiem audu replikātiem, kas 1 stundu eksponēti pozitīvajā kontrolē (8N KOH), vidējai dzīvotspējai, kura izteikta procentos no negatīvās kontroles, vajadzētu būt $\leq 15 \%$ 3. Dzīvotspējas diapazonā 20–100 % mainības koeficientiem (<i>CV</i>) starp audu replikātiem jābūt $\leq 30 \%$.	1. Ar negatīvo kontroli (H₂O) apstrādāto audu replikātu vidējam optiskajam blīvumam attiecībā uz katru ekspozīcijas laiku vajadzētu būt $\geq 0,8$ and $\leq 3,0$ 2. Tādiem audu replikātiem, kas 1 stundu (un attiecīgā gadījumā 4 stundas) eksponēti pozitīvajā kontrolē (8N KOH), vidējai dzīvotspējai, kura izteikta procentos no negatīvās kontroles, vajadzētu būt $< \leq 15 \%$ 3. Dzīvotspējas diapazonā 20–100 % un attiecībā uz OB $\geq 0,3$, šo divu audu replikātu dzīvotspējas atšķirība nedrīkstētu pārsniegt 30 %	1. Ar negatīvo kontroli (H₂O) apstrādāto audu replikātu vidējam optiskajam blīvumam attiecībā uz katru ekspozīcijas laiku vajadzētu būt $\geq 0,8$ and $\leq 2,8$ 2. Tādiem audu replikātiem, kas 1 stundu eksponēti pozitīvajā kontrolē (8N KOH), vidējai dzīvotspējai, kura izteikta procentos no negatīvās kontroles, vajadzētu būt $\leq 20 \%$ 3. Dzīvotspējas diapazonā 20–100 % un attiecībā uz OB $\geq 0,3$, šo divu audu replikātu dzīvotspējas atšķirība nedrīkstētu pārsniegt 30 %

3. papildinājums

TESTĒŠANAS MODEĻU VEIKTSPĒJA ATTIECĪBĀ UZ IEDALĪŠANU APAKŠKATEGORIJĀS

Tabulā zemāk norādīta šo četru testēšanas modeļu veiktspēja, kas aprēķināta uz tādu 80 ķīmikāliju kopumu, kuras testējuši četri testa izstrādātāji. Aprēķinus izdarījis ESAO sekretariāts un pārskatījusi un par tiem vienojusies ekspertu apakšgrupa (21) (23).

Iedalīšana apakškategorijās ir iespējama ar testēšanas modeļiem *EpiSkin*TM, *EpiDerm*TM SCT, *SkinEthic*TM RHE un *epiCS*[®] (proti, 1.A apakškategorija attiecībā pret 1.B un 1.C apakškategoriju un attiecībā pret NK).

Šo četru testa modeļu veiktspēja, pārspīlētas klasificēšanas rādītāji, nepietiekami prasīgas klasificēšanas rādītāji un pareizība (prognozētspēja) to 80 ķīmikāliju kopumam, kuras attiecībā uz katru testa modeli testētas 2 vai 3 reizes:

STATISTIKA PAR PROGNOZĒM, KAS IEGŪTAS PAR VISU ĶĪMIKĀLIJU KOPUMU				
(n = 80 ķīmikālijas, kas vairāk nekā divās neatkarīgās izpildes reizēs testētas ar <i>epiCS</i> [®] vai trijās neatkarīgās izpildes reizēs attiecībā uz <i>EpiDerm</i> TM SCT, <i>EpiSkin</i> TM un <i>SkinEthic</i> TM RHE, proti, attiecīgi 159* vai 240 klasifikācijas)				
* sakarā ar nepieejamību viena ķīmikālija ar <i>epiCS</i> [®] testēta vienreiz (23)				
	<i>EpiSkin</i> TM	<i>EpiDerm</i> TM	<i>SkinEthic</i> TM	<i>epiCS</i> [®]
Pārspīlētas klasificēšanas gadījumi:				
1B un 1.C pārspīlēti klasificēti par 1.A	21,50 %	29,0 %	31,2 %	32,8 %
Nekodīgas vielas pārspīlēti klasificētas par 1.B	20,7 %	23,4 %	27,0 %	28,4 %
Nekodīgas vielas pārspīlēti klasificētas par 1.A	0,00 %	2,7 %	0,0 %	0,00 %
Vielā pārspīlēti klasificēta par kodīgu vielu.	20,7 %	26,1 %	27,0 %	28,4 %
Vispārējais pārspīlētas klasificēšanas līmenis	17,9 %	23,3 %	24,5 %	25,8 %
Nepietiekami prasīgas klasificēšanas				
1.A nepietiekami prasīgi klasificēti par 1.B un	16,7 %	16,7 %	16,7 %	12,5 %
1.A nepietiekami prasīgi klasificēti par nekodīgu	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
1.B un 1.C nepietiekami klasificēti par	2,2 %	0,00 %	7,5 %	6,6 %
Vispārējais nepietiekami prasīgas	3,3 %	2,5 %	5,4 %	4,4 %
Pareiza klasifikācija:				
Pareizi klasificēti 1.A	83,3 %	83,3 %	83,3 %	87,5 %

Pareizi klasificēta 1.B un 1.C	76,3 %	71,0 %	61,3 %	60,7 %
Pareizi klasificēta nekodīga viela	79,3 %	73,9 %	73,0 %	71,62 %
Kopējā pareizība	78,8 %	74,2 %	70 %	69,8 %

NK: nekodīga

4. papildinājums

Galvenie parametri un pieņemamības kritēriji no *RhE* audiem ekstrahēta MTT formazāna mērīšanai paredzētas *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas sistēmas kvalificēšanai

Parametrs	Saskaņā ar <i>FDA</i> norādījumiem izstrādāts protokols (37) (38)	Pieņemamības kritēriji
Selektivitāte	Izopropanola, dzīva tukšā parauga (izopropanola ekstrakts no neapstrādātiem dzīviem <i>RhE</i> audiem), nedzīva tukšā parauga (izopropanola ekstrakts no neapstrādātiem nedzīviem <i>RhE</i> audiem) analīze	$\text{Laukums}_{\text{interference}} \leq 20 \%$ no $\text{laukuma}_{\text{LLOQ}}^1$
Precizitāte	Kvalitātes kontroles (t. i., MTT formazāns koncentrācijā 1,6 µg/ml, 16 µg/ml un 160 µg/ml) izopropanolā (n=5)	$CV \leq 15 \%$ vai attiecībā uz $\text{LLOQ} \leq 20 \%$
Pareizība	Kvalitātes kontroles izopropanolā (n=5)	% novirze $\leq 15 \%$ vai attiecībā uz $\text{LLOQ} \leq 20 \%$
Matricas ietekme	Kvalitātes kontroles dzīvā tukšajā paraugā (n=5)	$85 \% \leq \text{matricas ietekme} \leq 115 \%$
Pārnesums	Izopropanola analīze, ko izdara pēc ULOQ^2 standarta analīzes	$\text{Laukums}_{\text{interference}} \leq 20 \%$ no $\text{laukuma}_{\text{LLOQ}}$
Reproducējamība (vienā un tajā pašā dienā)	3 neatkarīgas kalibrēšanas līknes (balstītas uz 6 secīgiem MTT formazāna 1/3 atšķaidījumiem izopropanolā, sākot no ULOQ , t. i., 200 µg/ml); Kvalitātes kontroles izopropanolā (n=5)	Kalibrēšanas līknes: % novirze $\leq 15 \%$ vai attiecībā uz $\text{LLOQ} \leq 20 \%$ Kvalitātes kontroles: % Novirze $\leq 15 \%$ un $CV \leq 15 \%$
Reproducējamība (pa dienām)	1. diena: 1 kalibrēšanas līkne un kvalitātes kontroles izopropanolā (n=3)	
	2. diena: 1 kalibrēšanas līkne un kvalitātes kontroles izopropanolā (n=3) 3. diena: 1 kalibrēšanas līkne un kvalitātes kontroles izopropanolā (n=3)	
MTT formazāna īslaicīgā stabilitāte <i>RhE</i> audu ekstraktā	Kvalitātes kontroles dzīvā tukšajā paraugā (n=3), kas analizēts sagatavošanas dienā un pēc 24 stundu ilgas glabāšanas istabas temperatūrā	% novirze $\leq 15 \%$
MTT formazāna ilglaicīgā stabilitāte <i>RhE</i> audu ekstraktā (ja vajadzīgs)	Kvalitātes kontroles dzīvā tukšajā paraugā (n=3), kas analizēts sagatavošanas dienā un pēc vairāku dienu ilgas glabāšanas noteiktā temperatūrā (piem., 4 °C, -20 °C, -80 °C)	% novirze $\leq 15 \%$

¹*LLOQ*: apakšējā kvantitatīvās noteikšanas robeža, kas noteikta tā, lai aptvertu audu dzīvotspēju 1–2 %, proti, 0,8 µg/ml.

²*ULOQ*: augšējā kvantitatīvās noteikšanas robeža, kas saskaņā ar definīciju vismaz divreiz pārsniedz augstāko gaidāmo MTT formazāna koncentrāciju no negatīvajām kontrolēm iegūtos izopropanola ekstraktos, proti, 200 µg/ml.”

(7) B daļā B.46. nodaļu aizstāj ar šādu:

“B.46. ĀDAS KAIRINĀJUMA NOTEIKŠANA AR CILVĒKA EPIDERMAS REKONSTRUKCIJAS MODEĻA *IN VITRO* TESTU

IEVADS

1. Šī testēšanas metode (TM) ir ekvivalenta ESAO testēšanas vadlīnijai (TG) Nr. 439 (2015). Ādas kairinājums ir atgriezenisks ādas bojājums, kas rodas, testējamo ķīmikāliju aplicējot uz laiku līdz četrām stundām [atbilstoši definīcijai, kas dota Apvienoto Nāciju Organizācijas (ANO) Ķīmikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētajā sistēmā (GHS) (1) un Eiropas Savienības (ES) Regulā Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakojšanu (CLP regula)¹]. Šajā testēšanas metodē aprakstīta *in vitro* procedūra, ko var izmantot kairinošu ķīmikāliju (vielu un maisījumu) bīstamības identificēšanai saskaņā ar ANO GHS / CLP 2. kategoriju (2). Reģionos, kas nepieņem fakultatīvo ANO GHS 3. kategoriju (vāji kairinātāji), šo testēšanas metodi var izmantot arī neklasificētu ķīmikāliju identificēšanai. Tāpēc atkarībā no tiesiskā regulējuma un izmantotās klasifikācijas sistēmas šo testēšanas metodi var izmantot, lai noteiktu ķīmikāliju spēju izraisīt ādas kairinājumu; to izmanto vai nu kā atsevišķu aizstājējtestu *in vivo* ādas kairinājuma testēšanai, vai kā daļēju aizstājējtestu testēšanas stratēģijas ietvaros (3).
2. Ādas kairinājumu parasti novērtē, izmantojot laboratorijas dzīvniekus [TM B.4, kas ekvivalenta ESAO TG Nr. 404, kura sākotnēji pieņemta 1981. gadā un pārstrādāta 1992., 2002. un 2015. gadā] (4). Korozivitātes testēšanai ir pieņemtas trīs validētas *in vitro* testēšanas metodes: ESAO TM B.40 (ekvivalenta ESAO TG Nr. 430), TM B.40a (ekvivalenta ESAO TG Nr. 431) un TM B.65 (ekvivalenta ESAO TG Nr. 435) (5) (6) (7). ESAO norādījumu dokuments par integrētām pieejām testēšanai un novērtēšanai attiecībā uz ādas koroziju un kairinājumu (IATA) apraksta vairākus moduļus, kuros tiek grupēti informācijas avoti un analīzes rīki, un, pirmkārt, sniedz norādījumus par to, kā, novērtējot ķīmikāliju potenciālu radīt ādas kairinājumu un ādas koroziju, integrēt un izmantot jau esošos testēšanā un citādi iegūtos datus, un, otrkārt, ierosina pieeju, ko izmantot, ja vajadzīga turpmāka testēšana (3).

¹ Eiropas Parlamenta un Padomes 2008. gada 16. decembra Regula (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakojšanu un ar ko groza un atceļ Direktīvas 67/548/EEK un 1999/45/EK un groza Regulu (EK) Nr. 1907/2006 (OV L 353/1, 31.12.2008.).

3. Šī testēšanas metode pievēršas tādām cilvēka veselības beigupunktam kā ādas kairinājums. Tās pamatā ir *in vitro* testēšanas sistēma, kurā izmanto cilvēka epidermas rekonstrukcijas modeļus (*RhE*), kuru bioķīmiskās un fizioloģiskās īpašības ir ļoti līdzīgas cilvēka ādas virsējās daļas, t. i., epidermas, īpašībām. Lai rekonstruētu epidermas modeli, kam ir reprezentatīva histoloģija un citoloģiskā arhitektūra, *RhE* testēšanas sistēmā par šūnu avotu izmanto nepārveidotus cilvēka keratinocītus. Ir pieejami veikspējas standarti (VS), kas atvieglo līdzīgu un modificētu *RhE* testēšanas metožu validēšanu un novērtēšanu saskaņā ar ESAO norādījumu dokumenta Nr. 34 principiem (8) (9). Attiecīgā testēšanas vadlīnija sākotnēji pieņemta 2010. gadā, 2013. gadā atjaunināta, lai tajā iekļautu papildu *RhE* modeļus, un 2015. gadā atjaunināta, lai ietvertu atsauci uz *IATA* norādījumu dokumentu un ieviestu alternatīvu procedūru, ko izmanto dzīvotspējas mērīšanai.
4. Pirmsvalidēšanas, optimizēšanas un validēšanas pētījumi ir pabeigti attiecībā uz četriem komerciāli pieejamiem *in vitro* testa modeļiem (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28), kuru pamatā ir *RhE* testēšanas sistēma (jutība 80 %, specifiskums 70 % un precizitāte 75 %). Minētie četri testa modeļi ir iekļauti šajā *TG* un norādīti 2. papildinājumā, kurā sniegta arī informācija par tā validēšanas pētījuma veidu, kas izmantots attiecīgo testēšanas metožu validēšanai. Kā norādīts 2. papildinājumā, šīs testēšanas metodes un veikspējas standartu (8) izstrādē ir izmantota validētā references metode (VRM).
5. ESAO datu savstarpējā atzīšana tiks nodrošināta tikai attiecībā uz testa modeļiem, kas validēti saskaņā ar veikspējas standartiem (8), ja minētos testa modeļus ESAO ir pārskatījusi un pieņēmusi. Šajā testēšanas metodē iekļautos testa modeļus un attiecīgo ESAO *TG* var bez izšķirības izmantot, lai, turklāt izmantojot datu savstarpējās atzīšanas priekšrocības, izpildītu valstu prasības attiecībā uz testa rezultātiem, kas iegūti, izmantojot *in vitro* testēšanas metodes ādas kairinājuma noteikšanai.
6. Šajā dokumentā izmantoto terminu definīcijas ir dotas 1. papildinājumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI

7. Kā liecina pilnīgais provizoriskās validācijas pētījums, kurā novērtētas un raksturotas *RhE* testēšanas metodes (16), minētās testēšanas metodes ierobežojums ir tāds, ka tā nenodrošina iespēju ķīmikālijas klasificēt fakultatīvajā ANO *GHS* 3. kategorijā (vāji kairinātāji) (1). Tāpēc šīs testēšanas metodes izmantošanas veids būs atkarīgs no dalībvalstu tiesiskā regulējuma. Kas attiecas uz ES, 3. kategorija *CLP* regulā nav iekļauta. Attiecībā uz to, kā pilnīgi izvērtēt lokālo ietekmi uz ādu pēc vienreizējas dermālas ekspozīcijas, jāizmanto ESAO norādījumu dokuments par integrētajām testēšanas un novērtēšanas pieejām (3). Ir atzīts, ka cilvēka ādas izmantošanai jāatbilst nacionālām un starptautiskām ētiskajām normām un nosacījumiem.

8. Šī testēšanas metode pievēršas tādām cilvēka veselības beigupunktam kā ādas kairinājums. Lai gan tā nesniedz pietiekamu informāciju par ādas koroziju, tomēr jānorāda, ka TM B.40a par ādas koroziju (līdzvērtīga ESAO TG Nr. 431) pamatojas uz tādu pašu *RhE* testēšanas sistēmu, bet izmanto citu protokolu (6). Šīs testēšanas metodes pamatā ir *RhE* modeļi, kuros izmanto cilvēka keratinocītus un kuri tādējādi *in vitro* pārstāv attiecīgās sugas mērķorgānu. Tā turklāt tiešā veidā aptver iekaisuma kaskādes/mehānisma sākotnējo posmu norisēs (šūnu un audu bojājumi, kuru rezultāts ir lokalizēta trauma), kuras notiek, kairinājumam rodoties *in vivo*. Ar šo testēšanas metodi saistītajā validēšanas procesā ir testēts plašs ķīmikāliju spektrs, un validēšanas pētījuma datubāze aptver kopumā 58 ķīmikālijas (16)(18)(23). Šī testēšanas metode ir izmantojama cietvielām, šķīdriem, pusšķidrām vielām un vaskiem. Šķīdri var būt ūdens vai neūdens šķīdumi; cietvielas var būt gan ūdenī šķīstošas, gan nešķīstošas. Ja iespējams, cietvielas pirms aplicēšanas jāsamal smalkā pulverī; nekāda cita priekšapstrāde paraugam nav vajadzīga. Validācijas pētījumā vēl nav novērtētas gāzes un aerosoli (29). Kaut arī jādomā, ka vispār gāzes un aerosolus ar *RhE* tehnoloģiju testēt ir iespējams, ar pašreizējo testēšanas metodi tos testēt nevar.
9. Pirms testēšanas metodi attiecībā uz maisījumu izmanto, lai iegūtu datus kādai plānotai regulatīvai vajadzībai, jāapsver, vai un kādēļ tā var sniegt tādām nolūkam piemērotus rezultātus. Šādi apsvērumi nav vajadzīgi, ja pastāv regulatīva prasība maisījumu testēt. Tomēr maisījumi aptver plašu kategoriju un sastāvu spektru un patlaban par maisījumu testēšanu sevišķi daudz informācijas nav pieejams, tāpēc, ja var pierādīt, ka kādai konkrētai maisījumu kategorijai (piemēram, saskaņā ar stratēģiju, ko piedāvā *Eskes* u. c., 2012. g.) (30) attiecīgā testēšanas metode nav izmantojama, šo testēšanas metodi šai konkrētajai maisījumu kategorijai nevajag izmantot. Līdzīga rūpība jāievēro gadījumos, kad ir konstatēta konkrētu ķīmikāliju klašu vai fizikālķīmisko īpašību nepiemērotība pašreizējai testēšanas metodei.
10. Testējamās ķīmikālijas, kas gaismu absorbē tādā pašā diapazonā kā MTT formazāns, un testējamās ķīmikālijas, kas vitālo krāsvielu MTT spēj tieši reducēt (līdz MTT formazānam), var ietekmēt šūnu dzīvotspējas mērījumus un tādēļ koriģēšanai var būt nepieciešams izmantot pielāgotas kontroles (sk. 28.–34. punktu).
11. Vienai atsevišķai testēšanas reizei ar trim audu replikātiem jābūt pietiekamai gadījumos, kad testējamās ķīmiskās vielas klasifikācija ir nepārprotama. Tomēr ja rezultāti ir uz robežas, piemēram, replikātu mērījumiem trūkst konkordances un/vai vidējā procentuālā dzīvotspēja ir $50 \pm 5 \%$, jāapsver, vai nav vajadzīga otrā testēšanas reize, kā arī vai nav vajadzīga trešā, ja nesakrīt abu pirmo divu testēšanas reižu rezultāti.

TESTA PRINCIPS

12. Testējamo ķīmikāliju topikāli aplicē uz trīsdimensiju *RhE* modeļa, kuru veido nepārveidoti cilvēka epidermas keratinocīti, kas kultivēti tā, lai veidotos labi diferencēts daudzslāņains

cilvēka epidermas modelis. Tam ir bazālais, spinālais un granulārais slānis, vairākslāņu *stratum corneum* ar lamelāriem lipīdu starpšūnu slāņiem, kuru uzbūve ir reprezentatīva galvenajām lipīdu klasēm *in vivo*.

13. Ķīmikāliju izraisīts ādas kairinājums, kas izpaužas galvenokārt kā eritēma un tūska, ir notikumu kaskādes rezultāts, kuras sākums ir ķīmikāliju penetrācija caur *stratum corneum*, kur tās var radīt bojājumus apakšējos keratinocītu un citu ādas šūnu slāņos. Bojātās šūnas var vai nu izdalīt iekaisuma mediatorus, vai izraisīt iekaisuma kaskādi, kas skar arī dermā esošās šūnas, jo īpaši asinsvadu stromālās un endoteliālās šūnas. Novēroto eritēmu un tūska izraisa endoteliālo šūnu dilatācija un pieaugoša caurlaidība (29). Uz *RhE* balstītas testēšanas metodes ļauj bez vaskularizācijas *in vitro* testēšanas sistēmā, izmantojot šūnu dzīvotspējas rādījumus, mērīt kaskādes iniciācijas notikumus, piemēram, šūnu/audu bojājumus (16) (17).
14. Šūnu dzīvotspēju *RhE* modeļos mēra pēc vitālās krāsvielas MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijs bromīds, tiazolilzilais; CAS Nr. 298-93-1] fermentatīvās pārvēršanās par zilas krāsas formazāna sāli, kura daudzumu audu ekstraktā nosaka kvantitatīvi (31). Kairinošas ķīmikālijas tiek klasificētas pēc to spējas šūnu dzīvotspēju samazināt zemāk par noteiktu robežvērtību (t. i., $\leq 50\%$, ANO *GHS* / *CLP* 2. kategorija). Atkarībā no tiesiskā regulējuma un testēšanas metodes piemērojamības ķīmikālijas, kuru iedarbībā šūnu dzīvotspēja pārsniedz noteikto robežvērtību, var uzskatīt par kairinājumu neizraisošām (t. i., $> 50\%$, neklasificētas vielas).

KOMPETENCES PIERĀDĪŠANA

15. Pirms kādu no četriem šai testēšanas metodei atbilstošajiem validētajiem testa modeļiem (2. papildinājumā) sākt izmantot regulāri, laboratorijām jāpierāda tehniskā kompetence, izmantojot 1. tabulā ieteiktās 10 standartvielas. Gadījumos, kad, piemēram, kāda sarakstā norādīta viela nav pieejama, var izmantot citu vielu, par kuru pieejami pietiekami *in vivo* un *in vitro* references dati (piem., vielu no references ķīmikāliju saraksta (8)), ja vien tiek izmantoti tie paši 1. tabulā aprakstītie izraudzīšanās kritēriji. Alternatīvas standartvielas izmantošana ir jāpamato.
16. Ieteicams, lai kompetences pārbaudes ietvaros lietotāji pēc audu saņemšanas verificētu šo audu barjeras funkcijas, kā precizējis *RhE* modeļa ražotājs. Īpaši svarīgi tas ir tad, ja audu sūtījums veicis tālu ceļu vai aizņēmis ilgu laiku. Kad testēšanas metode ir sekmīgi ieviesta un tās izmantošanas prasme apgūta un uzskatāmi parādīta, šādu verifikāciju vairs nav nepieciešams veikt regulāri. Tomēr, ja testēšanas metodi izmanto parastajā praksē, ir ieteicams turpināt regulāri novērtēt barjeras funkcijas.

1. tabula. Standartvielas¹

Vielas	CAS Nr.	<i>In vivo</i>	Agregātvoklis	ANO <i>GHS</i>

		punkti ²		kategorija
NEKLASIFICĒTAS VIELAS (ANO GHS nekategorizētas vielas)				
naftalīnetiķskābe	86-87-3	0	Ciets	Nekat.
izopropanols	67-63-0	0,3	Šķidr	Nekat.
metilstearāts	112-61-8	1	Ciets	Nekat.
heptilbutirāts	5870-93-9	1,7	Šķidr	Nekat. (Fakult. 3. kat.) ³
heksilsalicilāts	6259-76-3	2	Šķidr	Nekat. (Fakult. 3. kat.) ³
KLASIFICĒTAS VIELAS (ANO GHS 2. kategorija)				
ciklamenaldehīds	103-95-7	2,3	Šķidr	2. kat.
1-bromheksāns	111-25-1	2,7	Šķidr	2. kat.
kālija hidroksīds (5 % ūd.)	1310-58-3	3	Šķidr	2. kat.
1-metil-3-fenil-1-piperazīns	5271-27-2	3,3	Ciets	2. kat.
heptanāls	111-71-7	3,4	Šķidr	2. kat.

1 Standartvielas ir validēšanas pētījumā izmantotu vielu apakškopa, un tās izraugās pēc šādiem kritērijiem: i) ķīmiskās vielas ir komerciāli pieejamas, ii) tās ir visam Dreiza [*Draize*] kairinājuma skalas diapazonam reprezentatīvas (no nekairinošām līdz stipri kairinošām), iii) tās ir ar precīzi noteiktu ķīmisko struktūru, iv) vielas ir reprezentatīvas validēšanas procesā izmantotajām ķīmiskajām funkcijām, v) tās vairākās testēšanas reizēs un vairākās laboratorijās devušas reproducējamus *in vitro* rezultātus, vi) par tām ir iegūtas pareizas prognozes *in vitro* un vii) tās nav ārkārtīgi toksiskas (piem., kancerogēnas vai reproduktīvajai sistēmai toksiskas) un to utilizācijas izmaksas nav pārlietu augstas.

2 *In vivo* punkti saskaņā ar TM B.4 (4).

3 Pēc šīs testēšanas metodes atsevišķi neklasificē vielas, ko var klasificēt ANO GHS 3. kat. (vāji kairinātāji) (1).

PROCEDŪRA

17. Turpmāk aprakstīti ādas kairinājuma noteikšanai izmantojamās *RhE* testēšanas metodes komponenti un procedūras (sk. arī 3. papildinājumu par parametriem, kas attiecas uz katru testa modeli). Par četriem šai testēšanas metodei atbilstīgajiem modeļiem ir pieejamas darba standartprocedūras (*SOP*) (32) (33) (34) (35).

RHE TESTĒŠANAS METODES KOMPONENTI

Vispārīgi nosacījumi

18. Epitēlija rekonstruēšanai jāizmanto nepārveidoti cilvēka keratinocīti. Zem funkcionāla *stratum corneum* jābūt vairākiem dzīvotspējīgu epitēlija šūnu slāņiem (bazālajam slānim, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*). *Stratum corneum* jābūt vairākslāņainam, ar tādu esenciālo lipīdu profilu, lai izveidotos funkcionāla barjera, kura ir pietiekami robusta, lai nepieļautu citotoksisku etalonķimikāliju, piemēram, nātrija dodecilsulfāta (SDS) vai *Triton X-100*, ātru penetrēšanos. Barjeras funkcija ir uzskatāmi jāparāda, un to var novērtēt, nosakot koncentrāciju, kurā etalonķimikālija pēc noteikta ekspozīcijas laika samazina audu dzīvotspēju par 50 % (*IC*₅₀), vai nosakot ekspozīcijas laiku, kas pēc noteiktas koncentrācijas etalonķimikālijas aplicēšanas nepieciešams šūnu dzīvotspējas

samazināšanai par 50 % (ET_{50}). *RhE* modeļa aizturēšanas īpašībām jānovērš ap *stratum corneum* esošā materiāla pāreja dzīvotspējīgos audos, kuras dēļ var tikt nepareizi modelēta ekspozīcija uz ādu. *RhE* modelis nedrīkst būt kontaminēts ar baktērijām, vīrusiem, mikoplazmu vai sēnītēm.

Funkcionāli nosacījumi

Dzīvotspēja

19. Dzīvotspējas kvantificēšanai izmanto MTT testu (31). *RhE* audu modeļa dzīvotspējīgās šūnas var vitālo krāsvielu MTT reducēt par zilas krāsas MTT formazāna nogulsni, kuras pēc tam tiek ekstrahētas no audiem, izmantojot izopropanolu (vai līdzīgu šķīdinātāju). Ekstrakcijas šķīdinātāja optiskajam blīvumam (OD) jābūt pietiekami mazam, t. i., $OD < 0,1$. Ekstrahēto MTT formazānu var kvantificēt, izmantojot vai nu standartabsorbcijas (OD) mērīšanu, vai *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas procedūru (36). *RhE* modeļa lietotājiem jānodrošina, ka visas izmantotās *RhE* modeļa partijas atbilst negatīvās kontroles vajadzībām definētajiem kritērijiem. *RhE* modeļa izstrādātājs/piegādātājs nosaka negatīvās kontroles OD vērtību pieņemamības diapazonu (augšējā un apakšējā robežvērtība) (ādas kairinājuma noteikšanai izmantojamās testēšanas metodes apstākļos). Pieņemamības diapazoni šajā testēšanas metodē iekļautajiem četriem validētajiem *RhE* modeļiem ir norādīti 2. tabulā. *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas lietotājam negatīvās kontroles OD diapazoni, kas norādīti 2. tabulā, jāizmanto par negatīvās kontroles pieņemšanas kritēriju. Jādokumentē ar negatīvo kontroli apstrādāto audu stabilitāte kultūrā (jābūt ar salīdzināmiem dzīvotspējas rādītājiem) visas testa ekspozīcijas perioda laikā.

2. tabula. Šajā TM iekļauto testa modeļu negatīvās kontroles OD vērtību pieņemamības diapazoni

	Apakšējā pieņemamības robežvērtība	Augšējā pieņemamības robežvērtība
<i>EpiSkinTM (SM)</i>	$\geq 0,6$	$\leq 1,5$
<i>EpiDermTM SIT (EPI-200)</i>	$\geq 0,8$	$\leq 2,8$
<i>SkinEthicTM RHE</i>	$\geq 0,8$	$\leq 3,0$
<i>LabCyte EPI-MODEL24 SIT</i>	$\geq 0,7$	$\leq 2,5$

Barjeras funkcija

20. *Stratum corneum* un tā lipīdsastāvam jābūt pietiekamam, lai nepieļautu citotoksisku etalonķimikāliju, piemēram, SDS vai *Triton X-100*, strauju penetrēšanos, un to nosaka ar IC_{50} vai ET_{50} (3. tabula).

Morfoloģija

21. Jāveic *RhE* modeļa histoloģiski izmeklējumi, kas uzskatāmi parāda modeļa līdzību cilvēka epidermas struktūrai (ieskaitot vairākslāņu *stratum corneum*).

Reproducējamība

22. Testēšanas metodes pozitīvās un negatīvās kontroles rezultātiem uzskatāmi jāparāda reproducējamība laikā.

Kvalitātes kontrole (QC)

23. *RhE* modelis jāizmanto tikai tad, ja izstrādātājs/piegādātājs uzskatāmi parāda, ka visas izmantotās *RhE* modeļa partijas atbilst definētajiem produkcijas pieņemamības kritērijiem, kuru vidū svarīgākie ir *dzīvotspēja* (19. punkts), *barjeras funkcija* (20. punkts) un *morfoloģija* (21. punkts). Šie dati jā dara pieejami testēšanas metodes lietotājiem, lai tie šo informāciju iekļautu testēšanas pārskatā. *RhE* modeļa izstrādātājam/piegādātājam jānosaka IC_{50} vai ET_{50} vērtību pieņemamības diapazons (augšējā un apakšējā robežvērtība). Kairinātāja klasifikācijas prognozēšanai ir derīgi tikai ar prasībām atbilstošiem audu modeļiem iegūtie rezultāti. Pieņemamības diapazoni šajā *TG* iekļautajiem četriem testa modeļiem ir norādīti 3. tabulā.

3. tabula. Šajā TM iekļauto testa modeļu partiju *QC* pieņemamības kritēriji

	Apakšējā pieņemamības robežvērtība	Augšējā pieņemamības robežvērtība
<i>EpiSkin™ (SM)</i> (18 stundu apstrāde ar SDS)(32)	$IC_{50} = 1,0 \text{ mg/ml}$	$IC_{50} = 3,0 \text{ mg/ml}$
<i>EpiDerm™ SIT (EPI-200)</i> (1 % <i>Triton X-100</i>)(33)	$ET_{50} = 4,0 \text{ h}$	$ET_{50} = 8,7 \text{ h}$
<i>SkinEthic™ RHE</i> (1 % <i>Triton X-100</i>)(34)	$ET_{50} = 4,0 \text{ h}$	$ET_{50} = 10,0 \text{ h}$
<i>LabCyte EPI-MODEL24 SIT</i> (18 stundu apstrāde ar SDS)(35)	$IC_{50} = 1,4 \text{ mg/ml}$	$IC_{50} = 4,0 \text{ mg/ml}$

Testējamo un kontroles ķīmikāliju aplicēšana

24. Katrai testējamai ķīmikālijai un kontrolei katrā izpildes reizē vajadzīgi vismaz trīs replikāti. Testējamās ķīmikālijas, kas ir šķīdras vai cietas vielas, uz epidermas virsmas vienmērīgā slānī jāaplicē pietiekamā daudzumā, t. i., no 26 līdz 83 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ vai mg/cm^2 , raugoties, lai deva nebūtu pārmērīga (sk. 3. papildinājumu). Pirms cietu ķīmikāliju aplicēšanas epidermas virsma jāsamitrina ar dejonizētu vai destilētu ūdeni, lai nodrošinātu labāku testējamās ķīmikālijas un epidermas virsmas kontaktu. Ja iespējams, cietas vielas jātestē smalka pulvera veidā. Dažos gadījumos vielas izlīdzināšanai var izmantot neilona tīkliņu (sk. 3. papildinājumu). Ekspozīcijas perioda beigās testējamā ķīmikālija no epidermas virsmas rūpīgi jānoskalo ar buferšķīdumu vai 0,9 % NaCl. Atkarībā no izmantotā *RhE* testa modeļa ekspozīcijas periods ilgst no 15 līdz 60 minūtēm un inkubācijas temperatūra ir no 20 līdz 37 °C. Minētos ekspozīcijas periodus un temperatūras optimizē katrai *RhE* testēšanas metodei atsevišķi, un tie reprezentē testa modeļu atšķirīgās būtiskās īpašības (piemēram, barjeras funkcija) (sk. 3. papildinājumu).

25. Katrā izpildes reizē jāizmanto paralēlā negatīvā kontrole (*NC*) un pozitīvā kontrole (*PC*), lai uzskatāmi parādītu, ka audu dzīvotspēja (izmanto *NC*), barjeras funkcija un no tās izrietošais audu jutīgums (izmanto *PC*) atbilst noteiktam vēsturiskam pieņemamības diapazonam. Ieteicamā *PC* ir SDS 5 % šķīdums ūdenī. Ieteicamā *NC* ir ūdens vai fosfātu fizioloģiskais buferšķīdums (PBS).

Šūnu dzīvotspējas mērījumi

26. Saskaņā ar testa procedūru ir svarīgi, lai dzīvotspējas mērīšana tiktu veikta nevis tūlīt pēc testējamās ķimikālijas ekspozīcijas, bet gan pēc tam, kad ir pagājis pietiekami ilgs noskaloto audu pēcapstrādes inkubācijas periods jaunā barotnē. Minētajā periodā izzūd vājas citotoksiskas iedarbības pazīmes un parādās nepārprotamas citotoksiskas iedarbības izpausmes. Optimizējot divus no šai testēšanas metodei pamatā esošajiem *RhE* testa modeļiem, tika konstatēts, ka optimāls ir 42 stundu ilgs pēcapstrādes inkubācijas periods (11) (12) (13) (14) (15).
27. Šūnu dzīvotspējas mērīšanai saskaņā ar šo testēšanas metodi izmantojamā standartizētā kvantitatīvā metode ir MTT tests. Tā ir audu trīsdimensiju modelim piemērota metode. Audu paraugu uz 3 stundām ievieto atbilstošas koncentrācijas (piemēram, 0,3–1 mg/ml) MTT šķīdumā. Dzīvotspējīgās šūnas pārveido MTT par zilas krāsas formazānu. Pēc tam veic nogulsnētā zilas krāsas formazāna produkta ekstrakciju ar šķīdinātāju (piemēram, izopropanolu vai paskābinātu izopropanolu) un nosaka formazāna koncentrāciju, mērot optisko blīvumu pie viļņa garuma $570\text{ nm} \pm 30\text{ nm}$ vai izmantojot *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas procedūru (sk. 34. punktu) (36).
28. Testējamās ķimikālijas optiskās īpašības vai ķīmiskā iedarbība uz MTT (piemēram, ķimikālija var gan kavēt, gan veicināt krāsas veidošanos vai atkrāsošanos) var traucēt testu, un tāpēc dzīvotspēja var būt noteikta nepareizi. Tas var notikt gadījumos, kad testējamo ķimikāliju pilnībā nenoskalo no audiem vai tad, ja tā penetrējas epidermā. Ja testējamā ķimikālija tieši iedarbojas uz MTT (piemēram, MTT reducētājs), tai ir dabiska krāsa vai krāsa izveidojas ekspozīcijas laikā, testējamās ķimikālijas radīto dzīvotspējas mērījumu traucējumu noteikšanai un korekcijām jāizmanto papildu kontroles (sk. 29. un 33. punktu). Darba standartprocedūrās par šajā testēšanas metodē iekļautajiem četriem validētajiem modeļiem ir pieejams sīks apraksts par to, kā koriģēt tiešo MTT redukciju un interferenci, ko rada krāsvielas (32) (33) (34) (35).
29. Lai noteiktu tiešos MTT reducētājus, katra testējamā ķimikālija jāpievieno svaigi sagatavotam MTT šķīdumam. Ja testējamo ķimikāliju saturošais MTT maisījums iekrāsojas zilā/violetā krāsā, uzskata, ka testējamā ķimikālija tieši reducē MTT, un jāveic no standartabsorbcijas (*OD*) mērīšanas vai *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas procedūras neatkarīga nedzīvotspējīgo *RhE* šūnu funkcionāla pārbaude. Šajā papildu funkcionālajā pārbaudē izmanto nedzīvus audus, kam piemīt tikai reziduāla metaboliska aktivitāte, taču tie testējamo ķimikāliju absorbē līdzīgi kā dzīvotspējīgi audi. Katru MTT reducējošu

testējamo ķīmikāliju aplicē uz vismaz diviem nedzīvo audu replikātiem, kam veic visu testēšanas procedūru ar mērķi ģenerēt nespecifisku MTT redukciju (*NSMTT*) (32) (33) (34) (35). Neatkarīgi no veikto neatkarīgo testu/izpildes reižu skaita katrai testējamajai ķīmikālijai ir pietiekami veikt vienu *NSMTT* kontroli. Faktisko audu dzīvotspēju tad aprēķina, no audu dzīvotspējas procentiem, kas iegūti ar MTT reducētājam eksponētiem dzīviem audiem, atņemot nespecifiskas MTT redukcijas procentus, kas iegūti ar tam pašam MTT reducētājam eksponētiem nedzīviem audiem un aprēķināti attiecībā pret negatīvo kontroli, kas veikta paralēli koriģējamajam testam (*%NSMTT*).

30. Lai noteiktu iespējamo interferenci, ko rada testējamās ķīmikālijas, kurām ir krāsa, vai testējamās ķīmikālijas, kuras krāsu iegūst, nonākot saskarē ar ūdeni vai izopropanolu, un lemtu par papildu kontroli nepieciešamību, jāveic testējamās ķīmikālijas spektrālnalīze ūdenī (ekspozīcijas vide) un/vai izopropanolā (ekstrakcijas šķīdums). Ja testējamā ķīmikālija ūdenī un/vai izopropanolā absorbē gaismu 570 ± 30 nm diapazonā, jāveic turpmākas krāsvielu kontroles vai arī jāizmanto *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas procedūra, kuras gadījumā kontroles nav vajadzīgas (sk. 33. un 34. punktu). Mērot standartabsorbciju (*OD*), katru interferējošo iekrāsoto testējamo ķīmikāliju aplicē uz vismaz diviem dzīvotspējīgu audu replikātiem, kuriem veic visu testēšanas procedūru, taču, lai iegūtu nespecifiskas krāsas (*NSC_{living}*) kontroli, MTT inkubācijas solī tos inkubē barotnē, nevis MTT šķīdumā. Ņemot vērā dzīvajiem audiem raksturīgo bioloģisko mainību, *NSC_{living}* kontrole jāveic paralēli iekrāsotās ķīmikālijas testēšanai un vairākkārtējas testēšanas gadījumā katram veiktajam testam (katrā izpildes reizē) jāveic neatkarīga *NSC_{living}* kontrole. Faktisko audu dzīvotspēju tad aprēķina, no audu dzīvotspējas procentiem, kas iegūti ar traucējošajai testējamajai ķīmikālijai eksponētiem un MTT šķīdumā inkubētiem dzīviem audiem, atņemot nespecifiskas krāsas procentus, kas iegūti ar traucējošajai testējamajai ķīmikālijai eksponētiem dzīviem audiem, kuri paralēli koriģējamajam testam inkubēti barotnē bez MTT (*%NSC_{living}*).
31. Mērot tādu testējamo ķīmikāliju standartabsorbciju (*OD*), par kurām konstatēts, ka tās gan tieši reducē MTT (sk. 29. punktu), gan izraisa krāsu interferenci (sk. 30. punktu), papildus iepriekšējos punktos aprakstītajām *NSMTT* un *NSC_{living}* kontrolēm jābūt arī kādam trešajam kontroli kopumam. Tas parasti attiecas uz MTT testu traucējošām tumšas (piem., zilas, violetas, melnas) krāsas testējamajām ķīmikālijām, jo tām raksturīgās krāsas dēļ ir grūti novērtēt to spēju tieši reducēt MTT, kā aprakstīts 29. punktā. Šīs testējamās ķīmikālijas var piesaistīties gan dzīviem, gan nedzīviem audiem, un tāpēc ar *NSMTT* kontroli var koriģēt ne tikai iespējamu tiešu MTT redukciju, ko izraisa testējamā ķīmikālija, bet arī krāsas interferenci, ko rada testējamās ķīmikālijas piesaistīšanās nedzīviem audiem. Tā rezultātā var notikt dubulta krāsas interferences korekcija, jo ar *NSC_{living}* kontroli jau tiek koriģēta krāsas interference, ko rada testējamās ķīmikālijas piesaistīšanās dzīviem audiem. Lai izvairītos no iespējamās dubultas krāsas interferences korekcijas, ir jāveic trešā kontrole attiecībā uz nespecifisku krāsu nedzīvos audos (*NSC_{killed}*). Šajā papildu kontrolē testējamo

ķimikāliju izmanto vismaz diviem nedzīvu audu replikātiem, kam veic visu testēšanas procedūru, taču MTT inkubācijas posmā tos inkubē barotnē, nevis MTT šķīdumā. Katrai ķimikālijai neatkarīgi no veikto testu/izpildes reižu skaita ir pietiekami veikt vienu *NSC_{killed}* kontroli, taču tā jāveic paralēli *NSMTT* kontrolei un, ja iespējams, ar to pašu audu partiju. Faktisko audu dzīvotspēju tad aprēķina, no audu dzīvotspējas procentiem, kas iegūti ar testējamajai ķimikālijai eksponētiem dzīviem audiem, atņemot *%NSMTT* un *%NSC_{living}* un pieskaitot nespecifiskas krāsas procentus, kas iegūti ar traucējošajai testējamajai ķimikālijai eksponētiem un barotnē bez MTT inkubētiem nedzīviem audiem un aprēķināti attiecībā pret negatīvo kontroli, kas veikta paralēli koriģējamajam testam (*%NSC_{killed}*).

32. Svarīgi atzīmēt, ka nespecifiskas MTT redukcijas un nespecifiskas krāsas interferenču dēļ var tikt iegūti audu ekstrakta rādījumi, kas pārsniedz spektrofotometra linearitātes diapazonu. Tādēļ katrai laboratorijai pirms regulatīvos nolūkos veicamas testējamo ķimikāliju testēšanas sākšanas jānosaka sava spektrofotometra linearitātes diapazons, izmantojot komerciāli pieejamu MTT formazānu (*CAS* Nr. 57360-69-7). Gadījumos, kad tādu audu ekstraktu optiskais blīvums, kas iegūti ar testējamo ķimikāliju, neveicot korekcijas par tiešu MTT redukciju un/vai krāsas interferenci, ir spektrofotometra lineārā diapazona robežās vai ar testējamo ķimikāliju iegūtā nekorrigētā dzīvotspēja procentos jau ir $\leq 50\%$, tiešo MTT reducētāju un interferējošas krāsas testējamo ķimikāliju novērtēšanai ir atbilstoši veikt standartabsorbcijas (*OD*) mērījumus ar spektrofotometru. Tomēr par testējamām ķimikālijām iegūtie rezultāti, kas uzrāda *%NSMTT* un/vai *%NSC_{living}* $\geq 50\%$ no negatīvās kontroles, būtu jāuztver piesardzīgi, jo tos izmanto par robežvērtību klasificēto un neklasificēto ķimikāliju nošķiršanai (sk. 36. punktu).
33. Attiecībā uz testējamām ķimikālijām, kurām ir krāsa un kuras nav piemērotas standarta absorbcijas (*OD*) mērījumiem, jo pārāk lielā mērā interferē ar MTT testu, MTT formazāna mērīšanai var izmantot alternatīvo *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas procedūru (sk. 34. punktu) (36). *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas sistēma ļauj pirms kvantificēšanas MTT formazānu atdalīt no testējamās ķimikālijas (36). Tāpēc neatkarīgi no testējamās ķimikālijas, ja tiek izmantota *HPLC/UPLC* spektrofotometrija, *NSC_{living}* vai *NSC_{killed}* kontroles nav jāveic. Taču, ja ir aizdomas, ka testējamā ķimikālija tieši reducē MTT, vai tai ir krāsa, kas traucē novērtēt ķimikālijas spēju tieši reducēt MTT (kā aprakstīts 29. punktā), ir jāizmanto *NSMTT* kontroles. Izmantojot *HPLC/UPLC* spektrofotometriju MTT formazāna mērīšanai, audu dzīvotspēju aprēķina kā MTT formazāna smailes laukuma, kas iegūts ar testējamajai ķimikālijai eksponētiem dzīviem audiem, un MTT formazāna smailes laukuma, kas iegūts ar paralēlo negatīvo kontroli, attiecību procentos. Testējamām ķimikālijām, kas spēj tieši reducēt MTT, audu faktisko dzīvotspēju aprēķina, no audu dzīvotspējas procentiem, kas iegūti ar testējamajai ķimikālijai eksponētiem dzīviem audiem, atņemot *%NSMTT*. Visbeidzot jāatzīmē, ka tiešos MTT reducētājus, kuri arī var radīt krāsas interferenci, kurus pēc apstrādes saglabā audos un kuri reducē MTT tik spēcīgi, ka testētā audu ekstrakta *OD* (izmantojot standarta *OD* mērīšanu) vai smailes

laukumi (izmantojot *HPLC/UPLC* spektrofotometriju) pārsniedz spektrofotometra linearitātes diapazonu, nevar novērtēt, taču šādi gadījumi ir ļoti reti.

34. *HPLC/UPLC* spektrofotometriju MTT formazāna mērīšanai var izmantot arī ar visa veida ķīmikālijām (ar krāsu, bez krāsas, MTT reducētāji un MTT nereducētāji) (36). Ņemot vērā *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas sistēmu daudzveidību, pirms *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas sistēmu izmanto, lai kvantificētu no audu ekstraktiem iegūtu MTT formazānu, būtu jāpierāda minētās sistēmas kvalifikācijas atbilstība pieņemamības kritērijiem, kas noteikti kvalifikācijas standartparametru kopumam, kuru pamatā ir parametri, kas aprakstīti ASV Pārtikas un zāļu pārvaldes izstrādātājās nozares vadlīnijās par bioanalītisko metožu validēšanu (36) (37). Minētie galvenie parametri un to pieņemamības kritēriji ir norādīti 4. papildinājumā. Ja ir izpildīti 4. papildinājumā noteiktie pieņemamības kritēriji, *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas sistēmu uzskata par kvalificētu un gatavu MTT formazāna mērījumu veikšanai ar šajā testēšanas metodē aprakstītajiem eksperimentēšanas nosacījumiem.

Pieņemamības kritēriji

35. Katrai testēšanas metodei, kurā izmanto testēšanai derīgas *RhE* modeļu partijas (sk. 23. punktu), ar negatīvās kontroles vielu apstrādātajiem audiem noteiktajām optiskā blīvuma vērtībām jāraksturo šo audu kvalitāte visos nosūtīšanas un saņemšanas cikla posmos un visos protokola procesos. Optiskā blīvuma kontrolvērtības nedrīkst būt zemākas par vēsturiski noteiktajām robežvērtībām. Tāpat arī audiem, kas apstrādāti ar pozitīvās kontroles vielām, piemēram, SDS 5 % šķīdumu ūdenī, būtu jāatspoguļo to spēja reaģēt uz kairinošu ķīmikāliju šīs testa metodes apstākļos (sk. 3. papildinājumu un papildinformāciju šajā *TG* iekļauto četru testa modeļu *SOP* (32) (33) (34) (35)). Saistītajiem attiecīgajiem audu replikātu mainības mērījumiem, t. i., standartnovirzēm, ir jāatbilst pieņemamības robežvērtībām, kas noteiktas izmantotajam testa modelim (sk. 3. papildinājumu).

Rezultātu interpretēšana un prognozes modelis

36. Katrai testējamajai ķīmikālijai iegūtās *OD* vērtības var izmantot dzīvotspējīgo šūnu daļas aprēķināšanai salīdzinājumā ar negatīvo kontroli, kuru pieņem par 100 %. Ja izmanto *HPLC/UPLC* spektrofotometriju, audu dzīvotspēju aprēķina kā MTT formazāna smailes laukuma, kas iegūts ar testējamajai ķīmikālijai eksponētiem dzīviem audiem, un MTT formazāna smailes laukuma, kas iegūts ar paralēlo negatīvo kontroli, attiecību procentos. Precīzi jānosaka un jādokumentē šūnu dzīvotspējas robežvērtība, pēc kuras identificē un atšķir testējamās kairinošās ķīmikālijas no šādi neklasificētajām ķīmikālijām, kā arī testēšanas rezultātu izvērtēšanai izmantotās statistiskās procedūras, un uzskatāmi jāparāda to piemērotība (informācijai sk. testa modeļu *SOP*). Kairināmības prognozēšanas robežvērtības ir šādas:

- ja pēc ekspozīcijas un pēcapstrādes inkubēšanas vidējā audu dzīvotspēja procentos ir mazāka nekā vai vienāda ar ($\leq$) 50 %, ķīmikāliju identificē kā tādu, kas jāklasificē un jāmarkē saskaņā ar ANO *GHS / CLP* (2. kategorija vai 1. kategorija). Tā kā ar šajā testēšanas metodē iekļautajiem *RhE* testa modeļiem nav iespējams noteikt, vai ķīmikālija ietilpst ANO *GHS / CLP* 1. vai 2. kategorijā, lēmuma pieņemšanai par galīgo klasifikāciju ir vajadzīga papildinformācija par ādas koroziju [sk. arī ESAO norādījumu dokumentu par *IATA* (3)]. Ja tiek konstatēts, ka testējamā ķīmikālija nav kodīga (piemēram, pamatojoties uz *TM* 40, B.40a vai B.65), un audu dzīvotspēja pēc ekspozīcijas un pēcapstrādes inkubēšanas ir mazāka nekā vai vienāda ar ($\leq$) 50 %, uzskata, ka testējamā ķīmikālija izraisa tādu ādas kairinājumu, ka tā jāklasificē ANO *GHS / CLP* 2. kategorijā;
- ja audu dzīvotspēja pēc ekspozīcijas un pēcapstrādes inkubēšanas ir lielāka par ($>$) 50 %, atkarībā no dalībvalstu tiesiskā regulējuma var uzskatīt, ka testējamā ķīmikālija neizraisa ādas kairinājumu un ANO *GHS / CLP* sistēmā ir neklasificēta viela.

DATI UN PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

Dati

37. Par katru izpildes reizi, arī par atkārtotiem eksperimentiem, ja tos veic, tabulas veidā apkopo visus datus par visiem audu replikātiem (piemēram, optiskā blīvuma vērtības, procentos aprēķinātas šūnu dzīvotspējas datus par katru ķīmikāliju un tās klasifikācijas datus). Par katru izpildes reizi jānorāda rezultāta vidējā vērtība $\pm$ standartnovirze. Par katru testējamo ķīmikāliju jādokumentē novērotā iedarbība ar MTT reaģentu un testējamo ķīmikāliju, kurai ir krāsa.

Testēšanas pārskats

38. Testēšanas pārskatā norāda šādu informāciju.

Testējamā ķīmikālija un kontroles ķīmikālijas:

- vienkomenta viela: ķīmiskā identifikācija, piemēram, *IUPAC* vai *CAS* nosaukums, *CAS* numurs, *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula, tīrība, attiecīgā gadījumā un ja praktiski iespējams — piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. c.;
- daudzkomponentu viela, *UVCB* un maisījums: iespējami izsmeļoši raksturoti pēc komponentu ķīmiskās identitātes (sk. iepriekš), kvantitatīvās sastopamības un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām;
- izskats, šķīdība ūdenī un papildu relevantās fizikālķīmiskās īpašības;
- avots, sērijas numurs, ja zināms;
- testējamās ķīmikālijas / kontroles ķīmikāliju pirmstestēšanas apstrāde (piem., sildīšana, sasmalcināšana), ja tāda veikta;

- testējamās ķīmikālijas stabilitāte, izmantošanas termiņš vai atkārtotas analīzes datums, ja tas zināms;
- glabāšanas apstākļi.

Izmantotais *RhE* modelis un protokols (un attiecīgās izvēles pamatojums)

Testa apstākļi:

- izmantotais *RhE* modelis (arī partijas numurs);
- MTT kvantificēšanai izmantotās mērierīces (piemēram, spektrofotometra) kalibrēšanas dati, viļņa garums un frekvenču joslas filtrs (attiecīgā gadījumā), un mērierīces linearitātes diapazons; MTT formazāna kvantificēšanai izmantotās metodes apraksts;
- *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas sistēmas kvalifikācijas apraksts (attiecīgā gadījumā); pilnīga papildinformācija par izmantoto *RhE* modeli un tā veikspējas raksturlielumiem. No tiem jānorāda vismaz:
 - i) dzīvotspēja;
 - ii) barjeras funkcija;
 - iii) morfoloģija;
 - iv) reproducējamība un prognozējamība;
 - v) modeļa kvalitātes kontroles (*QC*);
- vēsturiskie dati par modeli. No tiem jānorāda vismaz kvalitātes kontroles datu pieņemamība saskaņā ar vēsturiskajiem datiem par partiju kontroles rezultātiem;
- apliecināta kompetence testēšanas metodes veikšanā, kura pirms attiecīgās testēšanas metodes regulāras izmantošanas pierādīta, veicot standartvielu testēšanu.

Testa procedūra:

- detalizēta informācija par izmantoto testa procedūru (arī par mazgāšanas procedūrām, ko izmanto pēc ekspozīcijas perioda); testējamās ķīmikālijas deva un izmantotās kontroles;
- ekspozīcijas ilgums un temperatūra un pēcekspozīcijas inkubēšanas laiks;
- kontroles, kas izmantotas tiešajiem MTT reducētājiem un/vai testējamām ķīmikālijām, kurām ir krāsa (attiecīgā gadījumā);
- izmantoto audu replikātu skaits katrai ķīmikālijai un kontrolei (pozitīvā kontrole, negatīvā kontrole un *NSMTT*, *NSC_{living}* un *NSC_{killed}*, ja tāda veikta);
- apraksts par lēmuma pieņemšanas kritēriju / prognozes modeli, kas piemērots, pamatojoties uz izmantoto *RhE* modeli;

- testa procedūras (arī mazgāšanas procedūru) modifikāciju apraksts, ja tādas bijušas.

Izpildes reizes un testa pieņemamības kritēriji:

- pozitīvās un negatīvās kontroles vidējās vērtības un pieņemamības diapazoni, kas balstīti uz vēsturiskajiem datiem; pieņemama mainība starp pozitīvām un negatīvām kontrolēm izmantojamiem audu replikātiem;
- pieņemama mainība starp testējamai ķīmikālijai izmantojamiem audu replikātiem.

Rezultāti:

- tabulā apkopoti dati par individuālu testējamo ķīmikāliju par katru izpildes reizi un katru replikāta mērījumu, tostarp *OD* vai *MTT* formazāna smailes laukums, audu dzīvotspēja procentos, vidējā audu dzīvotspēja procentos un standartnovirze;
- attiecīgā gadījumā — to kontroļu rezultāti, kas izmantotas tiešajiem *MTT* reducētājiem un/vai testējamām ķīmikālijām, kurām ir krāsa, tostarp *OD* vai *MTT* formazāna smailes laukums, $\%NSMTT$, $\%NSC_{living}$, $\%NSC_{killed}$, standartnovirze, pareiza galīgā audu dzīvotspēja procentos;
- rezultāti, kas iegūti ar testējamo ķīmikāliju (ķīmikālijām) un kontrolēm, salīdzinājumā ar noteiktajiem izpildes reizes un testa pieņemamības kritērijiem;
- jebkādas citas novērotās ietekmes apraksts;
- atvasinātā klasifikācija ar norādi uz izmantoto prognozes modeli un/vai lēmuma pieņemšanas kritēriju.

Rezultātu iztirzājums

Secinājumi

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. Available at: 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. Available at: 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) Šā pielikuma B.4. nodaļa “Akūts ādas kairinājums/korozija”.
- (5) Šā pielikuma B.40. nodaļa “Ādas korozija *in vitro*: transkutānā elektriskā pretestība (TEP).
- (6) Šā pielikuma B.40a nodaļa “Ādas korozija *in vitro*: rekonstruētas cilvēka epidermas *RHE* tests”
- (7) Šā pielikuma B.65. nodaļa “*In vitro* barjeriembrānas testa metode”.
- (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. Available at: 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. These are the original PS used for the validation of two test methods. These PS should not be used any longer as an updated version (8) is now available.*
- (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. Available at: [<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. This is the current version of the ECVAM PS, updated in 2009 in view of the implementation of UN GHS. These PS should not be used any longer as an updated version (8) is now available related to the present TG.*
- (40) EURL-ECVAM. (2009). ESAC Statement on the Performance Standards (PS) for *In Vitro* Skin Irritation Testing Using Reconstructed Human Epidermis, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 8 July 2009.
- (41) EC (2001). Commission Directive 2001/59/EC of 6 August 2001 Adapting to Technical Progress for the 28th Time Council Directive 67/548/EEC on the Approximation of Laws, Regulations and Administrative Provisions Relating to the Classification, Packaging and Labelling of Dangerous Substances, Official Journal of the European Union L225, 1-333.

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Pareizība: pakāpe, kādā testēšanas metodes rezultāti sakrīt ar pieņemtajām atsauces vērtībām. Tas ir testēšanas metodes veikspējas mērs un viens no relevantuma aspektiem. Šo terminu bieži izmanto tādā pat nozīmē kā terminu “konkordantums”, ar to saprotot testēšanas metodes pareizo iznākumu īpatsvaru (9).

Šūnu dzīvotspēja: parametrs, kas raksturo šūnu populācijas kopējo aktivitāti, piemēram, šūnu mitohondriju dehidrogenāžu spēju reducēt vitālo krāsvielu MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijs bromīds, tiazolilzilais), kas atkarībā no nosakāmā testēšanas beigupunkta un izmantotā testēšanas plāna korelē ar dzīvo šūnu kopējo skaitu un/vai dzīvotspēju.

Ķīmikālija: viela vai maisījums.

Konkordantums: tādu testa modeļu veikspējas mērs, ar kuriem iegūst kategoriālus rezultātus, un viens no relevantuma aspektiem. Šo terminu bieži izmanto tādā pat nozīmē kā terminu “pareizība”, ar to saprotot visu to testēto ķīmikāliju īpatsvaru, kas pareizi klasificētas kā pozitīvas vai negatīvas. Konkordantums lielā mērā ir atkarīgs no to pozitīvo rezultātu prevalences, kādi iegūti attiecībā uz pētāmajiem testējamo ķīmikāliju veidiem (9).

ET₅₀: parametrs, ko var aprēķināt pēc ekspozīcijas laika, kas pēc noteiktas koncentrācijas etalonķīmikālijas aplicēšanas nepieciešams šūnu dzīvotspējas samazināšanai par 50 % (sk. arī IC₅₀).

GHS (Apvienoto Nāciju Organizācijas (ANO) Ķīmikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētā sistēma): sistēma, kurā ķīmikālijas (vielas un maisījumus) klasificē pēc standartizētiem fizisko apdraudējumu, veselības apdraudējumu un vidisko apdraudējumu tipiem un līmeņiem un izmanto tādas attiecīgus komunikācijas elementus kā piktogrammas, signālvārdi, bīstamības apzīmējumi, drošības prasību apzīmējumi un drošības datu lapas, lai sniegtu informāciju par ķīmikāliju nelabvēlīgo ietekmi un tādējādi aizsargātu cilvēkus (arī darba devējus un darba ņēmējus, transporta darbiniekus, patērētājus un avārijas dienestu darbiniekus) un vidi (1).

HPLC: augsti efektīvā šķidrums hromatogrāfija.

IATA: integrētā testēšanas un novērtēšanas pieeja.

IC₅₀: parametrs, ko var aprēķināt pēc etalonķīmikālijas koncentrācijas, kurā audu dzīvotspēja pēc noteikta ekspozīcijas laika samazinās par 50 % (IC₅₀) (sk. arī ET₅₀).

Pārmērīga deva: uz epidermas aplicētās testējamās ķīmikālijas daudzums, kas ir lielāks par epidermas virsmas pilnīgai un vienmērīgai pārklāšanai nepieciešamo daudzumu.

Maisījums: maisījums vai šķīdums, kas sastāv no divām vai vairāk vielām.

Vienkomponenta viela: tāda pēc kvantitatīvā sastāva definēta viela, kurā vismaz 80 % (masa/masa) veido viena galvenā sastāvdaļa.

MTT: 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijs bromīds; tiazolilzilā tetrazolijs bromīds.

Daudzkomponentu viela: tāda pēc kvantitatīvā sastāva definēta viela, kurā vairāk nekā viena no galvenajām sastāvdaļām ir koncentrācijā $\geq 10\%$ (masa/masa) un $< 80\%$ (masa/masa). Daudzkomponentu vielas tiek iegūtas ražošanas procesā. Atšķirība starp maisījumu un daudzkomponentu vielu ir tāda, ka maisījumu iegūst, divas vai vairākas vielas sajaucot bez ķīmiskas reakcijas. Daudzkomponentu viela rodas ķīmiskā reakcijā.

NSC_{killed}: nespecifiska krāsa nedzīvos audos.

NSC: nespecifiska krāsa dzīvos audos.

NSMTT: nespecifiska MTT redukcija.

Veiktspējas standarti (VS): uz validētu testēšanas metožu bāzēti standarti, pēc kuriem izvērtē pēc noteikšanas mehānisma vai funkcionalitātes ziņā līdzīgu testēšanas metožu salīdzināmību. Tajos ietilpst: (i) nepieciešamie testēšanas metodes komponenti; (ii) minimāls tādu references ķīmikāliju saraksts, kuras izraudzītas no citām ķīmikālijām, ko izmanto, lai pierādītu pieņemamu validētās testēšanas metodes veiktspēju; kā arī (iii) uz attiecīgajā validētajā testēšanas metodē iegūto rezultātu pamata — salīdzināmi pareizības un ticamības līmeņi, kā būtu jāiegūst ar ierosināto testēšanas metodi, to izvērtējot ar references ķīmikālijām no minimālā saraksta (9).

PC: pozitīvā kontrole, replikāts, kuram ir visi testēšanas sistēmas komponenti un kurš apstrādāts ar vielu, par ko zināms, ka tā inducē pozitīvu atbildreakciju. Lai būtu iespējams novērtēt pozitīvās kontroles atbildreakcijas mainību laikā, pozitīvās atbildreakcijas intensitāte nedrīkstētu būt pārlietu liela.

Relevantums: parametrs, kas raksturo testa attiecināmību uz interesējošo ietekmi un to, vai testu lietot konkrētam nolūkam ir jēgpilni un noderīgi. Tā ir pakāpe, kādā ar testu var pareizi izmērīt vai prognozēt interesējošo bioloģisko ietekmi. Relevantums ietver arī testēšanas metodes pareizības (konkordantuma) aspektu (9).

Ticamība: parametrs, kas izsaka, kādā pakāpē, izmantojot vienu un to pašu protokolu, kādu testēšanas metodi vienā un tajā pašā laboratorijā vai dažādās laboratorijās ilgākā laika nogrieznī var izmantot reproducējami. To novērtē, aprēķinot iekšlaboratorisko un starplaboratorisko reproducējamību (9).

Aizstājējtests: ikdienā lietota testa aizstāšanai paredzēts tests, kuru pieņemts izmantot bīstamības identificēšanai un/vai riska novērtēšanai, ar pierādītu spēju ekvivalentā vai labākā veidā, salīdzinot ar pieņemto testu, nodrošināt (pēc vajadzības) cilvēka un dzīvnieku veselības vai vides aizsardzību visās iespējamās testēšanas situācijās un ar visām iespējamām ķīmikālijām (9).

Izpildes reize: reize, kurā vienu vai vairākas ķīmikālijas vienlaikus testē ar negatīvu kontroli un pozitīvu kontroli.

Jutība: tā visu pozitīvo/aktīvo testējamo ķīmikāliju daļa, kas ar testu tiek pareizi klasificētas. Tas ir tādas testēšanas metodes pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testēšanas metodes relevantuma izvērtēšanā (9).

Ādas kairinājums *in vivo*: atgriezenisks ādas bojājums, kas rodas, testējamo ķīmikāliju aplicējot uz laiku līdz četrām stundām. Ādas kairinājums ir lokāla skarto ādas audu reakcija, kas parādās neilgi pēc kairinātāja iedarbības (38). To izraisa lokāla iekaisuma reakcija, kas saistīta ar ādas audu dabisko (nespecifisko) imūnsistēmu. Tā svarīgākā iezīme ir procesu atgriezeniskums, kas saistīti ar iekaisuma reakcijām un ar iekaisuma procesu saistītā kairinājuma raksturīgo klīnisko pazīmju (eritēma, tūska, nieze un sāpes) lielāko daļu.

Specifiskums: tas, cik liela daļa no visām negatīvajām/neaktīvajām testējamajām ķīmikālijām ar testu tiek klasificētas pareizi. Tādas testēšanas metodes pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testēšanas metodes relevantuma izvērtēšanā (9).

Viela: ķīmiskais elements un tā dabiski radušies vai ražošanas procesā iegūti savienojumi, ieskaitot to stabilizācijai nepieciešamās piedevas, kā arī izmantotajos procesos radušos piejaukumus, bet izņemot šķīdinātājus, kurus var atdalīt, neietekmējot vielas stabilitāti un nemainot tās sastāvu.

Testējamā ķīmikālija: jebkura viela vai maisījums, kuru testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

UPLC: īpaši augstefektīva šķīdumhromatogrāfija.

UVCB: vielas, kuru sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kompleksi reakcijas produkti vai bioloģiski materiāli.

2. papildinājums

ŠAJĀ TESTĒŠANAS METODĒ IEKĻAUTIE TESTA MODEĻI

Nr.	Testa modeļa nosaukums	Validācijas pētījuma veids	Atsauces
1	EpiSkin™	Pilnīgs provizoriskās validācijas pētījums (2003–2007). Šā modeļa komponenti tika izmantoti, lai noteiktu sākotnējo un atjaunināto <i>ECVAM</i> VS (39) (40) (21)* būtiskos testēšanas metodes komponentus. Turklāt metodes dati, kas saistīti ar neklasificēto/klasificēto vielu identifikāciju, veidoja galveno pamatu sākotnējo VS* specifiskuma un jutības vērtību noteikšanai.	(2) (10) (11) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (23) (32) (39) (40)
2	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	<i>EpiDerm™ (oriģināls)</i> : šim testa modelim, tāpat kā 1. modelim, pilnīga provizoriskā validācija veikta 2003.–2007. gadā. Šā modeļa komponenti tika izmantoti, lai noteiktu sākotnējo un atjaunināto <i>ECVAM</i> VS (39) (40) (21)* būtiskos testēšanas metožu komponentus. EpiDerm™ SIT (EPI-200) : Oriģinālā modeļa <i>EpiDerm™</i> modifikācija validēta, izmantojot sākotnējos <i>ECVAM</i> VS (21) 2008. gadā*.	(2) (10) (12) (13) (15) (16) (17) (18) (20) (21) (23) (33) (39) (40) (2) (21) (22) (23) (33)
3	SkinEthic™ RHE	Validācijas pētījums balstīts uz sākotnējiem <i>ECVAM</i> veikspējas standartiem (21) 2008. gadā*.	(2) (21) (22) (23) (31)
4	LabCyte EPI-MODEL24 SIT	Validācijas pētījums (2011–2012) balstīts uz ESAO TG Nr. 439 (8) veikspējas standartiem (VS), kuri balstīti uz atjauninātajiem <i>ECVAM</i> VS* (39) (40).	(24) (25) (26) (27) (28) (35) (39) (40) un šīs TG (8) veikspējas standarti.

*) Sākotnējie *ECVAM* veikspējas standarti (VS) (21) tika izstrādāti 2007. gadā pēc tam, kad bija pabeigts provizoriskās validācijas pētījums (16), kurā novērtēta 1. un 2. testa modeļa veikspēja, pamatojoties uz klasifikācijas sistēmu, kas aprakstīta ES Bīstamo vielu direktīvas 28. grozījumā (41). 2008. gadā tika ieviesta ANO GHS (1) un ES CLP, un robežvērtība, ko izmanto neklasificētu vielu nošķiršanā no klasificētām vielām, mainīta no 2.0 uz 2.3 *in vivo* punktiem. Lai pielāgotos šīm mainītajām regulatīvajām prasībām, 2009. gadā tika atjauninātas *ECVAM* VS pareizības vērtības un references ķīmikāliju saraksts (2) (39) (40). Tāpat kā sākotnējie VS, arī atjauninātie VS bija lielā mērā balstīti uz 1. un 2. modeļa datiem (16), taču papildus izmantoti 3. modeļa dati par references ķīmikālijām. Atjauninātos *ECVAM* VS 2010. gadā izmantoja ar šo TG (8) saistīto VS noteikšanai. Šajā testēšanas metodē *EpiSkin™* tiek uzskatīts par *VRM*, jo to izmantoja visu VS kritēriju izstrādē. Detalizēta informācija par validācijas pētījumiem, iegūto datu apkopojums un pamatinformācija par VS pielāgojumiem, kas veicami pēc ANO GHS/CLP ieviešanas, atrodama *ECVAM/BfR* paskaidrojošajā pamatdokumentā, kas pievienots atbilstīgajai ESAO TG Nr. 439 (23).

SIT: ādas kairinājuma tests.

RHE: cilvēka epidermas rekonstrukcija.

3. papildinājums

PROTOKOLA PARAMETRI KATRAM ŠAJĀ TESTĒŠANAS METODĒ IEKĻAUTAJAM TESTA MODELIM

RhE modeļiem ir ļoti līdzīgi protokoli, un jo īpaši tiem visiem ir 42 stundu ilgs pēcinkubācijas periods (32) (33) (34) (35). Galvenokārt atšķiras trīs parametri, kas saistīti ar dažādajām testa modeļu barjeras funkcijām, proti, A) pirmsinkubācijas laiks un tilpums, B) testējamo ķīmikāliju aplicēšana un C) pēcinkubācijas tilpums.

	<i>EpiSkinTM</i> (<i>SM</i>)	<i>EpiDermTM</i> <i>SIT (EPI-200)</i>	<i>SkinEthic</i> <i>RHETM</i>	<i>LabCyte</i> <i>EPI-MODEL24 SIT</i>
A) Pirmsinkubācija				
Inkubācijas laiks	18–24 stundas	18–24 stundas	< 2 stundas	15–30 stundas
Vidējs tilpums	2 ml	0,9 ml	0,3 vai 1 ml	0,5 ml
B) TESTĒJAMĀS ĶĪMIKĀLIJAS APLICĒŠANA				
Šķidrumi	10µl (26µl/cm ²)	30µl (47µl/cm ²)	16µl (32µl/cm ²)	25µl (83µl/cm ²)
Cietvielas	10mg (26mg/cm ²) + <i>DW</i> (5µl)	25 mg (39 mg/cm ²) + <i>DPBS</i> (25µl)	16 mg (32 mg/cm ²) + <i>DW</i> (10µl)	25 mg (83 mg/cm ²) + <i>DW</i> (25µl)
Vai izmanto neilona tīkliņu?	Neizmanto	Vajadzības gadījumā izmanto	Izmanto	Neizmanto
Kopējais aplicēšanas laiks	15 minūtes	60 minūtes	42 minūtes	15 minūtes
Aplicēšanas temperatūra	<i>RT</i>	a) <i>RT</i> 25 minūtes b) 37°C 35 minūtes	<i>RT</i>	<i>RT</i>
C) Pēcinkubācijas tilpums				
Vidējs tilpums	2 ml	0,9 ml x 2	2 ml	1 ml
D) Maksimālais pieļaujamais mainīgums				
Standartnovirze (<i>SD</i>) starp audu replikātiem	<i>SD18</i>	<i>SD18</i>	<i>SD18</i>	<i>SD18</i>

RT: istabas temperatūra.

DW: destilēts ūdens.

DPBS: Dulbeko fosfātu fizioloģiskais buferšķīdums

4. papildinājums

GALVENIE PARAMETRI UN PIENEMAMĪBAS KRITERIJI NO *RhE* AUDIEM EKSTRAHETA MTT FORMAZĀNA MERISANAI PAREDZETAS *HPLC/UPLC* SPEKTROFOTOMETRIJAS SISTEMAS KVALIFICESANAI

Parametrs	Protokols saskaņā ar <i>FDA</i> norādījumiem (36) (37)	Pieņemamības kritēriji
Selektivitāte	Izopropanola, dzīva tukšā parauga (izopropanola ekstrakts no neapstrādātiem dzīvjiem <i>RhE</i> audiem), nedzīva tukšā parauga (izopropanola ekstrakts no neapstrādātiem nedzīvjiem <i>RhE</i> audiem) analīze	$Laukums_{interference} \leq 20\%$ no $laukuma_{LLOQ}^1$
Precizitāte	Kvalitātes kontroles (t. i., MTT formazāns koncentrācijā 1,6 µg/ml, 16 µg/ml un 160 µg/ml) izopropanolā (n=5)	$CV \leq 15\%$ vai $\leq 20\%$ attiecībā uz <i>LLOQ</i>
Pareizība	Kvalitātes kontroles izopropanolā (n=5)	$\%Novirze \leq 15\%$ vai $\leq 20\%$ attiecībā uz <i>LLOQ</i>
Matrices efekts	Kvalitātes kontroles dzīvā tukšajā paraugā (n=5)	$85\% \leq \text{matrices efekts} \% \leq 115\%$
Pārnese	Izopropanola analīze pēc <i>ULOQ</i> ² standarta	$Laukums_{interference} \leq 20\%$ no $laukuma_{LLOQ}$
Reproducējamība (tajā pašā dienā)	3 neatkarīgas kalibrēšanas līknes (balsfītas uz 6 secīgiem MTT formazāna 1/3 atšķaidījumiem izopropanolā, sākot no <i>ULOQ</i> , t. i., 200 µg/ml); Kvalitātes kontroles izopropanolā (n=5)	Kalibrēšanas līknes: $\%Novirze \leq 15\%$ vai $\leq 20\%$ attiecībā uz <i>LLOQ</i> Kvalitātes kontroles: $\%Novirze \leq 15\%$ un $CV \leq 15\%$
Reproducējamība (no vienas dienas otrā)	1. diena: 1 kalibrēšanas līkne un kvalitātes kontroles izopropanolā (n=3) 2. diena: 1 kalibrēšanas līkne un kvalitātes kontroles izopropanolā (n=3) 3. diena: 1 kalibrēšanas līkne un kvalitātes kontroles izopropanolā (n=3)	
MTT formazāna īslaicīga stabilitāte <i>RhE</i> audu ekstraktā	Kvalitātes kontroles dzīvā tukšajā paraugā (n=3), kas analizēts sagatavošanas dienā un pēc 24 stundu ilgas glabāšanas istabas temperatūrā	$\%Novirze \leq 15\%$
MTT formazāna ilglaicīga stabilitāte <i>RhE</i> audu ekstraktā (ja vajadzīgs)	Kvalitātes kontroles dzīvā tukšajā paraugā (n=3), kas analizēts sagatavošanas dienā un pēc vairāku dienu ilgas glabāšanas noteiktā temperatūrā (piem., 4 °C, -20 °C, -80 °C)	$\%Novirze \leq 15\%$

¹*LLOQ*: apakšējā kvantitatīvās noteikšanas robeža, kas noteikta tā, lai aptvertu 1–2 % audu dzīvotspēju, proti, 0,8 µg/ml.

²*ULOQ*: augšējā kvantitatīvās noteikšanas robeža, kas ir vismaz divas reizes augstāka par lielāko sagaidāmo MTT formazāna koncentrāciju no negatīvajām kontrolēm iegūtos izopropanola ekstraktos, proti, 200 µg/ml.”

(8) B daļā pievieno šādas nodaļas:

“B.63. REPRODUKTĪVĀS / ONTOĢENĒTISKĀS TOKSICITĀTES SKRĪNINGA TESTS

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir ekvivalenta ESAO testēšanas vadlīnijai (*TG*) Nr. 421 (2016). ESAO vadlīnijas par ķīmikāliju testēšanu periodiski tiek pārskatītas, ņemot vērā zinātnes attīstību. Sākotnējā vadlīnija Nr. 421 par skrīninga testu tika pieņemta 1995. gadā, pamatojoties uz protokolu par “Sākotnējo reproduktīvā toksiskuma skrīninga testu”, kas apspriests divās ekspertu sanāksmēs Londonā 1990. gadā (1) un Tokijā 1992. gadā (2).
2. Pēc tam, kad 1998. gadā ESAO tika sāкта prioritāra darbība ar mērķi pārskatīt esošās testēšanas vadlīnijas un izstrādāt jaunas testēšanas vadlīnijas par endokrīno disruptoru skrīningu un testēšanu (3), šī testēšanas metode tika atjaunināta, iekļaujot tajā endokrīnajiem disruptoriem relevantus beigupunktus. Piemēram, ESAO *TG* Nr. 407 (Atkārtotas devas 28 dienu orālās toksicitātes pētījums ar grauzējiem, šā pielikuma B.7. nodaļa) 2008. gadā tika papildināta ar parametriem, kas piemēroti testējamo ķīmikāliju endokrīnās aktivitātes noteikšanai. *TG* Nr. 421 tika atjaunināta, lai skrīninga *TG*, kur ekspozīcijas periodi aptver dažus jutīgos attīstības periodus (prenatālais vai agrīns postnatālais periods), iekļautu dažus endokrīnajiem disruptoriem relevantus beigupunktus.
3. Izvēlētie endokrīnajiem disruptoriem relevantie papildu beigupunkti, kas ir daļa arī no *TG* Nr. 443 (Paplašinātais vienas paaudzes reproduktīvās toksicitātes pētījums, šā pielikuma B.56. nodaļa), tika iekļauti *TG* Nr. 421, pamatojoties uz priekšizpēti, kurā aplūkoti zinātniski un tehniski jautājumi par minēto beigupunktu iekļaušanu, kā arī iespējamie testēšanas plānojuma pielāgojumi, kas vajadzīgi minēto beigupunktu iekļaušanai (4).
4. Šī testēšanas metode ir izstrādāta, lai iegūtu ierobežotu informāciju par testējamās ķīmikālijas ietekmi uz tēviņu un mātīšu reproduktīvo spēju, piemēram, gonadālo funkciju, pārošanās uzvedību, apaugļošanos, miesas augļa attīstību un dzemdībām. Tā nav nedz alternatīva B.31., B.34., B.35. vai B.56. testēšanas metodei, nedz tās aizstāj.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI

5. Šo skrīninga testa metodi var izmantot, lai iegūtu sākotnējo informāciju par iespējamo ietekmi uz reprodukciju un/vai attīstību vai nu ķīmikāliju toksikoloģisko īpašību novērtēšanas agrīnā posmā, vai par ķīmikālijām, kas rada bažas. To var izmantot arī kā daļu no sākotnējo skrīninga testu kopuma attiecībā uz esošajām ķīmikālijām, par kurām pieejams maz toksikoloģiskās informācijas vai tā nav pieejama vispār, vai kā devu diapazona noteikšanas pētījumu plašākiem reprodukcijas/ontogēnēzes pētījumiem; to var izmantot citos relevantos gadījumos. Veicot pētījumu, ir jāievēro galvenie principi un

apsvērumi, kas noteikti ESAO norādījumu dokumentā Nr. 19 par klīnisko pazīmju atpazīšanu, novērtēšanu un izmantošanu par humānajiem beigupunktiem eksperimenta dzīvniekiem, kurus izmanto drošības novērtējumā (5).

6. Šī testēšanas metode nesniedz pilnīgu informāciju par visiem reprodukcijas un attīstības aspektiem. Konkrētāk, tā piedāvā tikai ierobežotus līdzekļus, ar ko detektēt prenatālās ekspozīcijas postnatālās izpausmes vai ietekmi, kas var rasties postnatālās ekspozīcijas laikā. Ņemot vērā dzīvnieku salīdzinoši mazo skaitu devas grupās, beigupunktu selektivitāti, pētījuma īso ilgumu un citus iemeslus, šī metode nesniedz pierādījumus galīgajiem apgalvojumiem par ietekmes neesību. Turklāt, ja nav datu no citiem reproduktīvās/ontogēnētiskās toksicitātes testiem, pozitīvie rezultāti ir noderīgi sākotnējai bīstamības novērtēšanai un palīdz pieņemt lēmumus par papildu testēšanas nepieciešamību un laiku.
7. Rezultāti, kas iegūti par endokrīnajiem parametriem, ir jāaplūko ESAO endokrīni disruptīvu ķīmikāliju testēšanas un novērtēšanas konceptuālā satvara (6) kontekstā. Atjauninātā ESAO TG Nr. 421 ir iekļauta minētā konceptuālā satvara 4. līmenī, kur ietilpst *in vivo* testi, kas sniedz datus par nelabvēlīgu ietekmi uz endokrīnajiem beigupunktiem. Endokrīnu signālu pašu par sevi tomēr nevar uzskatīt par pietiekamu pierādījumu tam, ka testējamā ķīmikālija ir endokrīnais disruptors.
8. Šajā testēšanas metodē izmanto perorālo testējamās ķīmikālijas ievadīšanu. Citu ekspozīcijas ceļu izmantošanas gadījumā var būt vajadzīgas modifikācijas.
9. Pirms testēšanas metodi attiecībā uz maisījumu izmanto, lai iegūtu datus kādai plānotai regulatīvai vajadzībai, jāapsver, vai un kādēļ tā var sniegt tādām nolūkam piemērotus rezultātus. Šādi apsvērumi nav vajadzīgi, ja pastāv regulatīva prasība maisījumu testēt.
10. Izmantotās definīcijas sniegtas 1. papildinājumā.

TESTA PRINCIPS

11. Testējamo ķīmikāliju pakāpeniski pieaugošās devās saņem vairākas tēviņu un mātīšu grupas. Tēviņiem testējamās ķīmikālijas jādod vismaz četras nedēļas līdz dienai pirms plānotās nonāvēšanas (minēto dienu ieskaitot); minētais laikposms aptver vismaz divas nedēļas pirms pārošanas, pārošanas periodu un aptuveni divas nedēļas pēc pārošanas. Ņemot vērā ierobežoto pirmspārošanas devu došanas periodu tēviņiem, auglība var nebūt precīzs testikulārās toksicitātes rādītājs. Tāpēc būtiska ir sēklinieku detalizēta histopatoloģiska izmeklēšana. Divu nedēļu ilga pirmspārošanas devu došanas periods apvienojumā ar turpmākiem pārošanās/auglības novērojumiem ar kopējo devu došanas periodu vismaz četras nedēļas, kam seko tēviņu gonādu detalizēta histopatoloģija, tiek uzskatīts par pietiekamu, lai varētu noteikt lielāko daļu ietekmes uz tēviņu auglību un spermatogēnēzi.

12. Mātītēm devas dod visu pētījuma laiku, kas aptver divas nedēļas pirms pārošanas (aptverot divus pilnus estrālos ciklus), laiku līdz apaugļošanās brīdim, grūsnības laiku un vismaz trīspadsmit dienas pēc dzemdībām, līdz dienai pirms plānotās nonāvēšanas (minēto dienu ieskaitot).
13. Pētījuma ilgums pēc aklimatizācijas un estrālā cikla izvērtējuma, ko veic pirms devu došanas, ir atkarīgs no mātīšu rādītājiem un ir aptuveni 63 dienas [vismaz 14 dienas pirms pārošanas, (ne vairāk kā) 14 dienas pārošana, 22 dienas gestācija, 13 dienas laktācija].
14. Devu došanas perioda laikā katru dienu rūpīgi novēro, vai dzīvniekiem neparādās toksiskuma pazīmes. Dzīvniekiem, kas testa periodā nobeigušies vai ir nonāvēti, izdara autopsiju, un izdzīvojušos dzīvniekus testa beigās nonāvē un tiem izdara autopsiju.

METODES APRAKSTS

Dzīvnieku sugas izraudzīšanās

15. Šo testēšanas metodi paredzēts izmantot ar žurkām. Ja šajā testēšanas metodē noteiktie parametri tiek pētīti citās grauzēju sugās, tas sīki jāpamato. Starptautiskajā validēšanas programmā endokrīno disruptoru detektēšanai saskaņā ar ESAO TG Nr. 407 (šā pielikuma B.7. nodaļa) tika izmantotas tikai žurkas. Nedrīkst izmantot līnijas ar zemu auglību vai līnijas, par kurām ir labi zināms, ka tām ir bieži sastopami attīstības defekti. Jāizmanto veselīgi iepriekš nepāroti dzīvnieki, kuriem eksperimentālas procedūras iepriekš nav veiktas. Jānorāda testa dzīvnieku suga, līnija, dzimums, masa un vecums. Pētījuma sākumā dzīvnieku masas atšķirībām jābūt minimālām un tās nedrīkst pārsniegt 20 % no vidējās masas, kas noteikta katram dzimumam atsevišķi. Ja pētījumu veic kā sākotnēju pētījumu ilgtermiņa pētījumam vai pētījumam, kas aptver visu paaudzi, vēlams abos pētījumos izmantot vienas līnijas un izcelsmes dzīvniekus.

Turēšana un barošana

16. Visām procedūrām jāatbilst vietējiem laboratorijas dzīvnieku labturības standartiem. Telpā, kurā tur izmēģinājuma dzīvniekus, jābūt 22° C ($\pm$ 3° C) temperatūrai. Lai gan relatīvajam mitrumam jābūt vismaz 30 % un, izņemot telpu uzkopšanas laiku, vēlams nepārsniegt 70 %, jāorientējas uz 50–60 %. Dzīvniekus 12 stundas diennaktī tur mākslīgā apgaismojumā, bet 12 stundas – tumsā. Var izmantot parasto laboratorijas barību ar neierobežotu piekļuvi dzirdināmajam ūdenim. Uztura izvēli var ietekmēt vajadzība tam piemaisīt testējamo ķīmikāliju, ja ķīmikāliju ievada šādā ceļā.
17. Dzīvniekus ieteicams turēt mazās viendzimuma grupās; ja tas zinātniski pamatoti, dzīvniekus var turēt atsevišķi. Ja dzīvniekus tur grupās, dzīvnieku skaits vienā būrī nedrīkstētu pārsniegt 5. Pārošanas procedūras jāveic attiecīgajam nolūkam piemērotos būros. Grūsnas mātītes jātur atsevišķi, un tām jānodrošina migas ierīkošanai vajadzīgie materiāli. Mātītes laktācijas periodā tiks turētas atsevišķi kopā ar to pēcnācēju.

18. Barība regulāri jāanalizē, lai noteiktu kontaminantu klātbūtni. Barības paraugs jāglabā līdz ziņojuma pabeigšanai.

Dzīvnieku sagatavošana

19. Veselīgus jaunus pieaugušus dzīvniekus nejaušināti iedala kontrolgrupās un apstrādes grupās. Būrus izvieto tā, lai būru novietojuma varbūtējā ietekme būtu iespējami maza. Dzīvniekus unikāli identificē un pirms pētījuma sākšanas vismaz piecas dienas tur būros, lai tie aklimatizētos laboratorijas apstākļos.

Devu sagatavošana

20. Testējamo ķīmikāliju ieteicams ievadīt perorāli, ja vien par piemērotākiem netiek uzskatīti citi ievadīšanas ceļi. Ja izvēlēts perorālais ievadīšanas ceļš, testējamo ķīmikāliju parasti ievada ar gavāžu; tomēr testējamo ķīmikāliju var ievadīt arī ar uzturu vai dzirdināmo ūdeni.
21. Ja vajadzīgs, testējamo ķīmikāliju izšķīdina vai suspendē piemērotā nesējā. Kad vien iespējams, ieteicams lietošanai izvēlēties ūdens šķīdumu/suspensiju vai, ja tas nav iespējams, šķīdumu/emulsiju eļļā (piemēram, kukurūzas eļļā), vai, ja arī tas nav iespējams, šķīdumu citos nesējos. Ja nesējs nav ūdens, ir jāzina šā nesēja toksiskās īpašības. Jānosaka testējamās ķīmikālijas stabilitāte un homogenitāte nesējā.

PROCEDŪRA

Dzīvnieku skaits un dzimums

22. Ieteicams, lai katrā grupā sākumā būtu vismaz 10 tēviņi un 12–13 mātītes. Pirms ekspozīcijas izvērtē mātīšu estrālos ciklus, un dzīvniekus, kam nav novērojami tipiski 4–5 dienu cikli, pētījumā neiekļauj; tāpēc ieteicams izmantot lielāku skaitu mātīšu, lai katrā grupā būtu 10 mātītes. Izņemot izteiktas toksiskās ietekmes gadījumus, sagaidāms, ka katrā grupā būs vismaz 8 grūsnas mātītes, kas parasti ir minimālais pieļaujamais grūсно mātīšu skaits grupā. Mērķis ir nodrošināt pietiekamu daudzumu grūсно mātīšu un pietiekamu daudzumu pēcnācēju, lai varētu ticami izvērtēt testējamās ķīmikālijas spēju ietekmēt auglību, grūsnību, mātišķo uzvedību un zīdīšanu, kā arī F_1 pēcnācēju augšanu un attīstību no aizmešanās līdz 13. dienai pēc piedzimšanas.

Devas

23. Parasti jāizmanto vismaz trīs testa grupas un kontrolgrupa. Devu līmeņus var noteikt, pamatojoties uz informāciju, kas iegūta akūta toksiskuma testos, vai atkārtotas devas pētījumu rezultātiem. Ar kontrolgrupas dzīvniekiem jārīkojas tāpat kā ar testa grupu dzīvniekiem, izņemot attiecībā uz testējamās ķīmikālijas ievadīšanu. Ja testējamās ķīmikālijas ievadīšanai izmanto nesēju, kontrolgrupa saņem lielāko izmantoto nesēja daudzumu.

24. Devu līmeņi jāizvēlas, ņemot vērā visus pieejamos toksiskuma un (toksiko)kinētiskos datus. Jāņem vērā arī tas, ka grūsnu un negrūsnu dzīvnieku jutība var atšķirties. Augstākais devas līmenis jāizvēlas tāds, lai tas izraisītu toksisku ietekmi, bet ne nobeigšanos vai smagas ciešanas. Pēc tam jāizvēlas tāda lejupēja devas līmeņu virkne, lai ar to varētu parādīt jebkādas ar devu saistītas atbildreakcijas, kā arī to, ka zemākajā devas līmenī nelabvēlīga ietekme nav novērojama (*NOAEL*). Devu līmeņu noteikšanai to samazinājuma virzienā optimums bieži vien ir divkārti līdz četrkārti intervāli, un bieži vien ir ieteicamāk pievienot ceturto testa grupu, nevis izmantot ļoti plašu devu intervālu (piemēram, vairāk nekā 10 reizes).
25. Ja ir novērota vispārēja toksicitāte (piemēram, ķermeņa masas samazināšanās, ietekme uz aknām, sirdi, plaušām vai nierēm utt.) vai citas pārmaiņas, kas var nebūt toksiskas atbildreakcijas (piemēram, samazināts barības patēriņš, aknas palielināšanās), ir jābūt piesardzīgiem, interpretējot novēroto iedarbību uz jutīgiem endokrīnajiem beigupunktiem.

Robežtests

26. Ja perorālajā pētījumā, kurā izmanto vienu devas līmeni, kas ir vismaz 1000 mg/kg ķermeņa masas dienā, vai – ja testējamo ķīmikāliju ievada ar uzturu vai dzirdināmo ūdeni – līdzvērtīgs procentuālais daudzums uzturā vai dzirdināmajā ūdenī, un kuru veic, ievērojot šajā pētījumā aprakstītās procedūras, novērojama toksiska ietekme nerodas un ja, pamatojoties uz datiem par strukturāli radniecīgām vielām, toksicitāte nav sagaidāma, var uzskatīt, ka pilns pētījums ar vairākiem devu līmeņiem nav vajadzīgs. Robežtestu neizmanto gadījumos, kad cilvēka ekspozīcija norāda uz to, ka ir jāizmanto augstāks perorālās devas līmenis. Ja izmanto citus ievadīšanas veidus, tādus kā ieelpošana vai aplicēšana uz ādas, maksimālā sasniedzamā koncentrācija bieži vien ir atkarīga no testējamo ķīmikāliju fizikālķīmiskajām īpašībām.

Devu došana

27. Dzīvnieki testējamās ķīmikālijas devu saņem katru dienu 7 dienas nedēļā. Ja izmanto gavāžu, dzīvniekiem testējamā ķīmikālija jāsaņem vienreizējā devā, ko ievada ar kuņģa zondi vai piemērotu intubācijas cauruli. Maksimālais šķidruma tilpums, ko vienā paņēmienā var ievadīt, ir atkarīgs no testa dzīvnieka lieluma. Tilpums nedrīkst pārsniegt 1 ml uz 100 g ķermeņa masas, izņemot tādos ūdens šķīdumos, kur var lietot 2 ml uz 100 g ķermeņa masas. Izņemot kairinošas vai kodīgas testējamās ķīmikālijas, kam lielākās koncentrācijās parasti ir saasināta ietekme, testa tilpuma mainība būtu jāsamazina līdz minimumam, koncentrāciju korigējot tā, lai visos devu līmeņos saglabātos konstants tilpums.
28. Ja testējamo ķīmikāliju ievada ar uzturu vai dzirdināmo ūdeni, ir svarīgi nodrošināt, ka testējamās ķīmikālijas daudzums neizjauc normālu uztura vai ūdens līdzsvaru. Ja testējamo ķīmikāliju ievada ar uzturu, var izmantot nemainīgu koncentrāciju uzturā (ppm) vai

nemainīgu devas līmeni attiecībā pret dzīvnieku ķermeņa masu; izmantotā alternatīva ir jānorāda. Ja testējamo ķīmikāliju ievada ar gavāžu, deva jādod katru dienu vienādā laikā un vismaz reizi nedēļā jākorrigē tā, lai uzturētu nemainīgu devas līmeni attiecībā pret dzīvnieka ķermeņa masu.

Eksperimenta grafiks

29. Devas abu dzimumu dzīvniekiem jāsāk dot vismaz 2 nedēļas pirms pārošanas, pēc tam, kad tie vismaz piecas dienas tikuši aklimatizēti un mātītēm ir novēroti normāli estrālie cikli (divu nedēļu ilgā priekšapstrādes periodā). Pētījums jāplāno tā, lai estrālā cikla izvērtēšana sāktos drīz pēc tam, kad dzīvnieki ir sasnieguši pilnīgu dzimumgatavību. Dažādām žurku līnijām pilnīgas dzimumgatavības sasniegšanas vecums dažādās laboratorijās var nedaudz atšķirties, piemēram, *Sprague Dawley* līnijas žurkas to sasniedz 10 nedēļu vecumā, *Wistar* līnijas žurkas — 12 nedēļu vecumā. Mātes ar pēcnācēju jānonāvē 13. pēcdzemdību dienā vai drīz pēc tam. Dzimšanas diena (proti, dienā, kurā dzemdības ir beigušās) ir 0. pēcdzemdību diena. Mātītes, kam nav novērojamas kopulācijas pazīmes, nonāvē 24–26 dienas pēc pēdējās pārošanas perioda dienas. Pārošanas perioda laikā abu dzimumu dzīvniekiem devas turpina dot. Pēc pārošanas perioda tēviņiem devas jāturpina dot vismaz līdz minimālā kopējā devu došanas perioda (28 dienas) beigām. Pēc tam tos vai nu nonāvē, vai arī patur dzīvus un tiem turpina dot devas, lai tos, iespējams, izmantotu otrai pārošanai, ja tāda vajadzīga.
30. Vecākpaudzes mātītēm devas turpina dot katru dienu visu grūsnības laiku un vismaz līdz 13. pēcdzemdību dienai vai dienai pirms nonāvēšanas (minētās dienas ieskaitot). Pētījumos, kuros testējamo ķīmisko vielu ievada inhalācijas ceļā vai caur ādu, devas jāturpina dot vismaz līdz gestācijas 19. dienai (ieskaitot) un jāatsāk dot pēc iespējas drīz, bet ne vēlāk kā 4. dienā pēc dzemdībām.
31. Eksperimenta grafika shēma ir dota 2. papildinājumā.

Pārošanas procedūra

32. Parasti šajā pētījumā jāizmanto pārošanas shēma 1:1 (viens tēviņš uz vienu mātīti). Izņēmumi pieļaujami tēviņu nāves gadījumā. Mātīte jātur kopā ar to pašu tēviņu, līdz tiek novērotas kopulācijas pazīmes vai ir pagājušas divas nedēļas. Katru rītu mātītēm pārbauda spermas vai embola klātbūtni makstī. Grūsnību sāk skaitīt no dienas, kurā ir apstiprinājies kopulācijas fakts (konstatēts maksts embols vai sperma). Ja pārošana ir neveiksmīga, var apsvērt mātīšu atkārtotu pārošanu ar tās pašas grupas tēviņiem.

Metiena lielums

33. Ceturtajā dienā pēc piedzimšanas katra metiena lielumu var koriģēt, nejaušināti izņemot liekos mazulus tā, lai katrā metienā pēc iespējas būtu četri vai pieci katra dzimuma mazuli atkarībā no izmantotās žurku līnijas parastā metiena lieluma. No diviem liekajiem

mazuļiem jāņem asins paraugi, kurus apkopo un izmanto seruma T4 līmeņu noteikšanai. Mazuļu selektīva izņemšana, piemēram, pēc ķermeņa masas vai anoģenitālā attāluma (AGD), nav piemērota. Ja vīrišķā vai sievišķā dzimuma mazuļu skaita dēļ nav iespējams nodrošināt, ka katrā metienā ir četri vai pieci katra dzimuma mazuļi, ir pieļaujama metiena lieluma daļēja korigēšana (piemēram, seši tēviņi un četras mātītes). Ja metiena lielums ir mazāks par korekcijas robežvērtību (8 vai 10 mazuļi vienā metienā), mazuļus no metiena neizņem. Ja korekcijas robežvērtību pārsniedz tikai viens mazulis, izņem tikai vienu mazuli un no tā ņem asins paraugus, ko izmanto iespējamiem seruma T4 novērtējumiem.

34. Ja metiena lielums netiek korigēts, 4. dienā pēc piedzimšanas divus mazuļus no katra metiena nonāvē un no tiem ņem asins paraugus, ko izmanto tiroīdhormona seruma koncentrācijas mērīšanai. Ja iespējams, diviem mazuļiem katrā metienā jābūt sievišķā dzimuma mazuļiem, lai vīrišķā dzimuma mazuļus rezervētu zīdekļu retencijas izvērtējumiem, izņemot gadījumus, kad šo mazuļu izņemšanas rezultātā galējam novērtējumam nepaliek neviena mātīte. Mazuļus no metiena neizņem, ja tā lielums būs mazāks nekā 8 vai 10 mazuļi vienā metienā (atkarībā no izmantotās žurku līnijas parastā metiena lieluma). Ja, pamatojoties uz parasto metiena lielumu, lieks ir tikai viens mazulis, izņem tikai vienu mazuli un no tā ņem asins paraugus, ko izmanto iespējamiem seruma T4 novērtējumiem.

NOVĒROJUMI DZĪVES LAIKĀ

Klīniskie novērojumi

35. Visā testa periodā vismaz reizi dienā jāizdara klīniskie novērojumi; ja ir novērotas toksiskuma pazīmes, tie jāizdara biežāk. Klīniskie novērojumi katru dienu jāizdara, vēlams, vienā un tajā pašā laikā vai laikos, ņemot vērā gaidāmo ietekmju maksimumperiodu pēc devu došanas. Jāreģistrē acīm redzamas izmaiņas uzvedībā, grūtas vai novēlotas atnešanās pazīmes un visas toksiskuma pazīmes, kā arī mirstība. Šajos datos jāiekļauj toksiskuma pazīmju parādīšanās laiks, pakāpe un ilgums.

Ķermeņa masa un barības/ūdens patēriņš

36. Tēviņi un mātītes jānosver pirmajā devas došanas dienā, tad vismaz reizi nedēļā un pētījuma beigās. Grūsnības laikā mātītes jānosver 0., 7., 14. un 20. dienā un 24 stundu laikā pēc atnešanās (0. vai 1. pēcdzemdību diena), kā arī vismaz 4. un 13. pēcdzemdību dienā. Novērojumu rezultāti jāreģistrē atsevišķi par katru pieaugušo dzīvnieku.
37. Pirmspārošanas, grūsnības un laktācijas laikā barības patēriņš jāmēra vismaz reizi nedēļā. Barības patēriņa mērīšana pārošanas laikā ir fakultatīva. Ja testējamo ķimikāliju ievada ar dzirdināmo ūdeni, minētajos laikposmos ir jāmēra arī ūdens patēriņš.

Estrālie cikli

38. Lai pētījumam atlasītu mātītes ar regulāru cikliskumu, pirms apstrādes sākšanas jānovēro estrālie cikli (sk. 22. punktu). No apstrādes perioda sākuma līdz brīdim, kad ir novērotas pārošanās pazīmes, katru dienu jāveic arī vaginālo uztriepju monitorings. Ja pastāv bažas par akūta stresa ietekmi, kas, uzsākot devu došanu, var mainīt estrālos ciklus, laboratorijas var testa dzīvniekus divas nedēļas pakļaut ekspozīcijai un pēc tam reizi dienā ievākt vaginālās uztriepes, lai pirmspārošanas periodā vismaz divas nedēļas veiktu estrālo ciklu novērošanu, ko turpina veikt arī pārošanas periodā, līdz ir iegūti pārošanās pierādījumi. Iegūstot maksts / dzemdes kakla šūnas, jā rūpējas par to, lai nepieļautu gļotādas bojājumus, kas var inducēt viltus grūsnību (7) (8).

Pēcnācēju parametri

39. Jāreģistrē gestācijas ilgums, ko aprēķina no 0. grūsnības dienas. Pēc atnešanās katru metienu iespējami drīz pārbauda, lai noteiktu mazuļu, nedzīvi dzimušo, dzīvi dzimušo un nīkuļu (mazuļi, kas ir ievērojami mazāki nekā atbilstīgie kontrolmazuļi) skaitu un dzimumu un acīmredzamu anomāliju klātbūtni.
40. 24 stundu laikā pēc atnešanās (0. vai 1. diena pēc piedzimšanas) un vismaz 4. un 13. dienā pēc piedzimšanas jāskaita dzīvie mazuļi un jānosaka to dzimums, un jānosver metieni. Papildus 35. punktā aprakstītajiem novērojumiem jāreģistrē pēcnācēju uzvedības anomālijas.
41. Katra mazuļa AGD jāmēra vienā un tajā pašā dienā pēc piedzimšanas no 0. līdz 4. dienai pēc piedzimšanas. Mazulis ir jānosver tajā pašā dienā, kad tiek mērīts AGD, un AGD ir jāpielāgo mazuļa izmēram, priekšroku dodot kvadrātsaknei no ķermeņa svara (9). Kā ieteikts ESAO GD 151 (10), 12. vai 13. dienā pēc piedzimšanas ir jāskaita vīrišķā dzimuma mazuļu zīdekļi/areolas.

Klīniskā bioķīmija

42. Asins paraugus no noteiktas vietas ņem saskaņā ar šādu grafiku:

- 4. dienā pēc piedzimšanas — no vismaz diviem mazuļiem katrā metienā, ja mazuļu skaits to ļauj (sk. 33.–34. punktu),
- pētījuma beigās 13. dienā — no visām mātēm un vismaz diviem mazuļiem katrā metienā, un
- pētījuma beigās — no visiem pieaugušiem tēviņiem.

Visus asins paraugus glabā piemērotos apstākļos. Asins paraugus, kas ņemti no mazuļiem 13. dienā un pieaugušiem tēviņiem, nosaka tiroīdhormonu (T4) seruma līmeņus. Ja vajadzīgs, T4 līmeņus nosaka arī asins paraugos, kas ņemti no mātēm un 4. dienas mazuļiem. Attiecīgā gadījumā var fakultatīvi mērīt citus hormonus. Tiroīdhormona analīžu veikšanai mazuļu asinis var apkopot pa metieniem. Tiroīdhormonus (T4 un TSH) vēlams mērīt kopējā formā (kopējais T4 un kopējais TSH).

43. Noteikto hormonu mainību un absolūto koncentrāciju var ietekmēt šādi faktori:

- nonāvēšanas laiks hormonu koncentrāciju diennakts mainības dēļ,
- nonāvēšanas metode, kurā dzīvniekiem netiek radīts nevajadzīgs stress, kas varētu ietekmēt hormonu koncentrācijas,
- hormonu noteikšanas testa komplekti, kas var atšķirties pēc standartlīknēm.

44. Plazmas paraugi, kas paredzēti tieši hormonu noteikšanai, ir jāiegūst salīdzināmā dienas laikā. Skaitliskās vērtības, ko iegūst, analizējot hormonu koncentrācijas, atšķiras atkarībā no tirdzniecībā pieejamajiem testēšanas komplektiem.

Patoloģija

Makroskopiskā autopsija

45. Tūlīt pēc nonāvēšanas vai nāves, kas iestājusies pētījuma laikā, pieaugušie dzīvnieki makroskopiski jāpārbauda attiecībā uz anomālijām vai patoloģiskām pārmaiņām. Īpaša uzmanība jāpievērš reproduktīvās sistēmas orgāniem. Jāreģistrē implantācijas vietu skaits. Lai noteiktu estrālā cikla fāzi un ļautu to saistīt ar olnīcu histopatoloģiju, vaginālās uztriepes jāizmeklē autopsijas dienas rītā.
46. Visu pieaugušo tēviņu sēklinieki un sēklinieku piedēkļi, kā arī prostata un sēklas pūslīši ar prostatas priekšējām daivām (kopā) pēc vajadzības jāatbrīvo no pieguļošiem audiem, un to slapjais svars jānosaka iespējami drīz pēc disekcijas, lai izvairītos no izžūšanas. Turklāt fakultatīvos orgānu masas mērījumos var ietvert arī tūpļa cēlājmuskuļa un briedumķermeņa muskuļa kompleksu, Kupera dziedzerus un dzimumlocekļa galviņu tēviņiem un abas olnīcas (slapjais svars) un dzemdi (ar dzemdes kaklu) mātītēm; ietveršanas gadījumā minētie masas mērījumi jāveic iespējami drīz pēc disekcijas.
47. Nedzīvi mazuļi un mazuļi, kas nonāvēti 13. dienā pēc piedzimšanas vai drīz pēc tam, vismaz rūpīgi ārēji jāpārbauda, lai konstatētu iespējamās acīmredzamas anomālijas. Īpaša uzmanība jāpievērš ārējām reproduktīvajām ģenitālijām, kuras jāpārbauda, meklējot attīstības izmaiņu pazīmes. 13. dienā jāsaņem vairogdziedzeris, kas izņemts no 1 vīrišķā un 1 sievišķā dzimuma mazuļa katrā metienā.
48. Jāsaņem visu pieaugušo dzīvnieku olnīcas, sēklinieki, iekšējie dzimumorgāni (dzemde un dzemdes kakls, sēklinieku piedēkļi, prostata, sēklas pūslīši un prostatas priekšējās daivas), vairogdziedzeris un visi orgāni, kam ir redzami makroskopiski bojājumi. Sēklinieku un sēklinieku piedēkļu parastai pārbaudei nav ieteicams izmantot formalīna fiksāciju. Attiecībā uz šiem audiem pieņemama metode ir izmantot Buēna fiksatoru vai modificētu Davidsona fiksatoru (11). Lai nodrošinātu fiksatora ātru penetrēšanos, bālgano apvalku (*tunica albuginea*) var abos orgāna polos uzmanīgi un sekli pārdurt ar adatu.

Histopatoloģija

49. Veic lielākās devas grupas dzīvnieku un kontrolgrupas dzīvnieku olnīcu, sēklinieku un sēklinieku piedēkļu detalizētu histopatoloģisku izmeklēšanu (īpašu uzsvāru liekot uz sēklinieku intersticiālo šūnu struktūras spermatogēnēzi un histopatoloģiju). Vajadzības gadījumā var izmeklēt pārējos saglabātos mazuļu un pieaugušo dzīvnieku orgānus, arī vairogdziedzeri. Vairogdziedzera masu var noteikt pēc fiksācijas. Tas jāatbrīvo no piegulošiem audiem ļoti uzmanīgi un tikai pēc fiksācijas, lai izvairītos no audu bojājumiem. Audu bojājumi var apgrūtināt histopatoloģijas analīzi. Ja lielākās devas grupā ir novērotas pārmaiņas, minētās izmeklēšanas jāveic arī citu devu grupu dzīvniekiem. Norādījumos par histopatoloģiju (11) ir sīki izklāstīta papildu informācija par endokrīno audu disekciju, fiksāciju, secēšanu un histopatoloģiju.

DATI UN PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

Dati

50. Jāsniedz dati par atsevišķiem dzīvniekiem. Turklāt visi dati jāapkopo tabulā, kurā redzams testa sākumā katrā testā grupā esošo dzīvnieku skaits, to dzīvnieku skaits, kas atrasti miruši testa laikā vai nonāvēti humānu apsvērumu dēļ, nāves iestāšanās vai humānās nonāvēšanas laiks, auglīgo dzīvnieku skaits, grūsnos mātīšu skaits, to dzīvnieku skaits, kam novērotas toksicitātes pazīmes, novēroto toksicitātes pazīmju apraksts, arī toksiskās darbības sākuma laiks, ilgums un stiprums, histopatoloģisko pārmaiņu veidi un visi relevantie dati par metienu. Tabulas veidā sagatavotā kopsavilkuma ziņojuma paraugs, kas ir ļoti noderīgs ietekmes uz reprodukciju/attīstību izvērtēšanai, ir sniegts 3. papildinājumā.
51. Tā kā pētījuma tvērums ir ierobežots, statistiskajai analīzei, ko veic, lai izvērtētu rezultātu nozīmīgumu, ir ierobežota vērtība attiecībā uz daudziem beigupunktiem, jo īpaši reproduktīvajiem beigupunktiem. Ja tiek izmantota statistiskā analīze, izvēlētajai metodei jābūt atbilstošai pārbaudāmā mainīgā lieluma sadalījumam, un tā jāizvēlas pirms pētījuma sākšanas. AGD un zīdekļu retencijas statistiskajai analīzei jābalstās uz atsevišķu mazuļu datiem, ņemot vērā ietekmi uz metienu. Vajadzības gadījumā analīzes vienība ir metiens. Mazuļu ķermeņa masas statistiskajai analīzei jābalstās uz atsevišķu mazuļu datiem, ņemot vērā metiena lielumu. Ņemot vērā grupu mazo lielumu, pētījuma interpretēšanā par palīg līdzekli var būt lietderīgi izmantot arī vēsturiskos kontroles datus (piemēram, datus par metiena lielumu), ja tādi ir pieejami.

Rezultātu izvērtēšana

52. Šā toksicitātes pētījuma konstatējumi jāizvērtē, ņemot vērā novēroto ietekmi, autopsiju un mikroskopiskos konstatējumus. Vērtējums ietver testējamās ķīmikālijas devas saistību ar anomāliju — to vidū makroskopisko bojājumu, identificēto mērķorgānu, neauglības, klīnisko anomāliju, ietekmes uz reproduktīvajiem un metiena rādītājiem, ķermeņa masas pārmaiņu, ietekmes uz mirstību un citas toksiskās iedarbības – esību vai neesību, incidenci un smagumu.

53. Tēviņu apstrādes periods ir īss, tāpēc, novērtējot ietekmi uz tēviņu reproduktīvo funkciju, papildus auglības datiem jāņem vērā sēklinieku un sēklinieku piedēkļu histopatoloģija. Pētījuma interpretēšanā par palīglīdzekli var būt lietderīgi izmantot arī vēsturiskus kontroles datus par reprodukciju/ontogēnēzi (piemēram, datus par metiena lielumu, *AGD*, zīdekļu retenciju, seruma T4 līmeņiem), ja tādi pieejami.
54. Kvalitātes kontroles vajadzībām ir ierosināts apkopot vēsturiskus kontroldatus un skaitliskajiem datiem, it sevišķi parametriem, kas saistīti ar endokrīnās sistēmas traucējumu izraisītāju noteikšanu, aprēķināt variācijas koeficientus. Šos datus var izmantot salīdzināšanas nolūkos, kad tiek novērtēti faktiskie pētījumi.

Testēšanas pārskats

55. Testēšanas pārskatā norāda šādu informāciju.

Testējamā ķīmikālija:

- avots, sērijas numurs, izmantošanas termiņš, ja pieejams,
- testējamās ķīmikālijas stabilitāte, ja tā zināma;

vienkomponenta viela:

- izskats, šķīdība ūdenī un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības,
- ķīmiskā identifikācija, piemēram, *IUPAC* vai *CAS* nosaukums, *CAS* numurs, *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula, tīrība, attiecīgā gadījumā, ja praktiski iespējams, piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. tml.;

daudzkomponentu viela, *UVCB* un maisījumi:

- iespējami izsmelīgi raksturoti pēc komponentu ķīmiskās identitātes (sk. iepriekš), kvantitatīvās sastopamības un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām.

Nesējs (attiecīgā gadījumā):

- nesēja izvēles pamatojums, ja nesējs nav ūdens.

Testa dzīvnieki:

- izmantotās sugas/līnijas,
- dzīvnieku skaits, vecums un dzimums,
- avots, turēšanas apstākļi, uzturs u. tml.,
- katra dzīvnieka masa testa sākumā,
- sugas izvēles pamatojums, ja tā nav žurka.

Testēšanas nosacījumi:

- devu līmeņa izraudzīšanās pamatojums,
- detalizēta informācija par testējamās ķīmikālijas maisījuma/barības preparāta sagatavošanu, sasniegto preparāta koncentrāciju, stabilitāti un homogenitāti,
- detalizēta informācija par testējamās ķīmikālijas devu došanu,
- attiecīgā gadījumā testējamās ķīmikālijas koncentrācijas (ppm) barībā / dzirdināmajā ūdenī pārrēķins faktiskajā devā (mg uz kg ķermeņa masas dienā),
- detalizēta informācija par barības un ūdens kvalitāti,
- detalizēts apraksts par nejaušināšanas procedūru, kas izmantota, lai atlasītu mazuļus izņemšanai no metiena, ja šāda izņemšana notikusi.

Rezultāti:

- ķermeņa masa / ķermeņa masas izmaiņas,
- barības patēriņš un ūdens patēriņš (ja šādi dati ir pieejami),
- dati par toksiskajām atbildes reakcijām atkarībā no dzimuma un devas, arī dati par auglību, gestāciju un citām toksicitātes pazīmēm,
- gestācijas ilgums,
- toksiska vai cita iedarbība uz reprodukciju, pēcnācējiem, postnatālo augšanu utt.,
- klīnisko novērojumu veids, smagums un ilgums (atgriezenisks vai neatgriezenisks),
- pieaugušu mātīšu skaits ar normālu vai nenormālu estrālo ciklu un cikla ilgums,
- dzīvi dzimušo skaits un pēcimplantācijas zudums,
- mazuļu ķermeņa masas dati,
- visu mazuļu *AGD* (un ķermeņa masa *AGD* mērīšanas dienā),
- zīdēkļu retencija vīrišķā dzimuma mazuļiem,
- vairogdziedzera hormonu līmenis 13 dienu veciem mazuļiem un pieaugušiem tēviņiem (un mātēm un 4 dienas veciem mazuļiem, ja šādi mērījumi veikti),
- to mazuļu skaits, kam ir makroskopiskas anomālijas, ārējo ģenitāliju makroskopisks izvērtējums, nīkuļu skaits,
- nāves iestāšanās laiks testa laikā vai norāde, ka dzīvnieki ir izdzīvojuši līdz pētījuma beigām,
- implantāciju skaits, metiena lielums un masa datu reģistrēšanas laikā,
- ķermeņa masa nonāvēšanas laikā un dati par vecākpaaudzes dzīvnieku orgānu masu,
- autopsijas konstatējumi,

- histopatoloģiskas izmeklēšanas rezultātu detalizēts apraksts,
- absorbcijas dati (ja pieejami),
- rezultātu statistiskā apstrāde (attiecīgā gadījumā).

Rezultātu iztirzājums.

Secinājumi.

Rezultātu interpretēšana

56. Pētījums sniegs izvērtējumu par reproduktīvo/ontoģenētisko toksicitāti, kas saistīta atkārtotu devu došanu (sk. 5. un 6. punktu). Tas varētu norādīt uz nepieciešamību veikt turpmākas izmeklēšanas un sniedz norādījumus turpmāko pētījumu plānošanā. Ar reprodukciju un ontoģenēzi saistīto rezultātu interpretēšanā par palīglīdzekli jāizmanto ESAO norādījumu dokuments Nr. 43 (12). ESAO norādījumu dokumentā Nr. 106 par grauzēju endokrīno un reproduktīvo testu histoloģisko izvērtēšanu (11) sniegta informācija par (endokrīno) orgānu un vaginālo uztriepju sagatavošanu un izvērtēšanu; minētā informācija var būt noderīga saistībā ar šo *TG*.

LITERATŪRA

- (1) OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Available upon request at Organisation for Economic and Cooperation and Development, Paris.
- (2) OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. Available Upon Request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (3) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998. Available Upon Request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (4) OECD (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 217), Organisation 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. papildinājums

DEFINĪCIJAS (SK. ARĪ ESAO *GD 150 (6)*)

Androgenitāte ir ķimikālijas spēja zīdītāja organismā funkcionēt kā dabiskam androgēnu tipa hormonam (piemēram, testosteronam).

Antiandrogenitāte ir ķimikālijas spēja zīdītāja organismā nomākt dabiska androgēnu tipa hormona (piemēram, testosterona) darbību.

Antiestrogenitāte ir ķimikālijas spēja zīdītāja organismā nomākt dabiska estrogēnu tipa hormona (piemēram, estradiola 17β) darbību.

Antitireoidāla iedarbība ir ķimikālijas spēja zīdītāja organismā nomākt dabiska tiroīdhormona (piemēram, T₃) darbību.

Ķimikālija ir viela vai maisījums.

Ontoģenētiskā toksicitāte: reproduktīvās toksicitātes izpausme, kas liecina par pēcnācēju prenatalāliem, perinatāliem, postnatāliem, strukturāliem vai funkcionāliem traucējumiem.

Dozējums ir vispārīgs termins, kas aptver devu, tās ievadīšanas biežumu un ilgumu.

Deva ir ievadītās testējamās ķimikālijas daudzums. Devu izsaka ar testējamās ķimikālijas masu uz testa dzīvnieka ķermeņa masas vienību dienā (piemēram, mg uz kg ķermeņa masas dienā) vai kā nemainīgu koncentrāciju barībā.

Izteikta toksicitāte ir vispārīgs termins, kas apzīmē acīmredzamas toksicitātes pazīmes pēc testējamās ķimikālijas ievadīšanas. Šīm pazīmēm jābūt pietiekamām, lai varētu novērtēt bīstamību, un tādām, lai varētu sagaidīt, ka ievadītās devas palielināšana izraisīs smagas toksicitātes pazīmes un, iespējams, mirstību.

Fertilitātes traucējumi ir tēviņu vai mātīšu reproduktīvās funkcijas vai spējas traucējumi.

Maternālā toksicitāte: nelabvēlīgā ietekme uz gravidām mātītēm, kas ir specifiska (tieša ietekme) vai nespecifiska (netieša ietekme).

NOAEL ir saīsinājums, kas apzīmē nenovērojamās nelabvēlīgās ietekmes līmeni. Tas ir augstākais devas līmenis, kurā netiek konstatētas ar vielas saņemšanu saistītas negatīvas parādības.

Estrogenitāte ir ķimikālijas spēja zīdītāja organismā darboties kā dabiskam estrogēnu tipa hormonam (piemēram, estradiolam 17β).

Reproduktīvā toksicitāte ir kaitīga ietekme uz pēcnācējiem un/vai tēviņu un mātīšu reproduktīvās funkcijas vai spējas traucējumi.

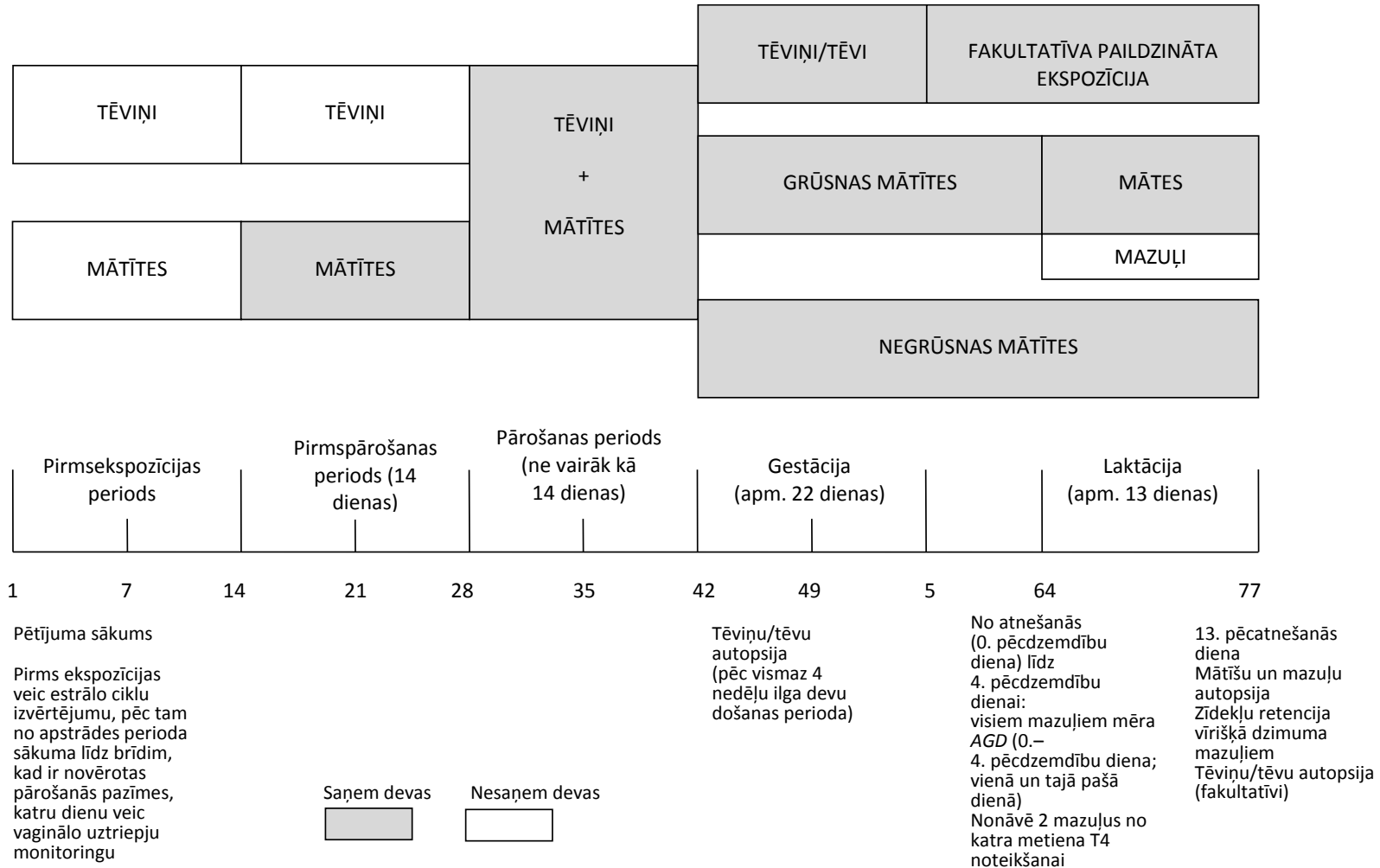
Testējamā ķimikālija ir jebkura viela vai maisījums, ko testē ar šo testēšanas metodi.

Tireoidāla iedarbība ir ķīmikālijas spēja zīdītāja organismā darboties kā dabiskam tiroīdhormonam (piemēram, T₃).

Validācija ir zinātnisks process, kura mērķis ir raksturot testēšanas metodes darbības prasības un ierobežojumus un apliecināt tās ticamību un piemērotību konkrētam nolūkam.

2. papildinājums

EKSPERIMENTA GRAFIKA SHĒMA, KURĀ NORĀDĪTS MAKSIMĀLAIS PĒTĪJUMA ILGUMS, KURA PAMATĀ IR 14 DIENU ILGS PĀROŠANAS PERIODS



3. papildinājums

TABULAS VEIDĀ SAGATAVOTS KOPSAVILKUMA ZIŅOJUMS PAR IETEKMI UZ REPRODUKCIJU/ONTOĢENĒZI

NOVĒROJUMI	VĒRTĪBAS				
Dozējums (vienības)	0 (kontrolē)	.. .	.. .	.. .	.. .
Dzīvnieku pāri (N)					
Estrālais cikls (vismaz vidējais neregulāru ciklu ilgums un biežums)					
Mātītes, kam novērojamas kopulācijas pazīmes (N)					
Grūsnas mātītes (N)					
Apaugļošanās dienas 1–5 (N)					
Apaugļošanās dienas 6– . . . ⁽¹⁾ (N)					
Grūsnība ≤ 21 diena (N)					
Grūsnība = 22 dienas (N)					
Grūsnība ≥ 23 dienas (N)					
Mātes ar dzīviem mazuļiem (N)					
Mātes ar dzīviem mazuļiem 4. dienā pēc dzemdībām (N)					
Implanti vienai mātei (vidēji)					
Dzīvie mazuļi vienai mātei piedzimšanas brīdī (vidēji)					
Dzīvie mazuļi vienai mātei 4. dienā (vidēji)					
Dzimumu attiecība (tēv./māt.) piedzimstot (vidēji)					
Dzimumu attiecība (tēv./māt.) 4. dienā (vidēji)					
Metiena masa piedzimstot (vidēji)					
Metiena masa 4. dienā (vidēji)					

⁽¹⁾ pārošanas perioda pēdējā diena

Mazuļu masa piedzimstot (vidēji)						
Mazuļu masa <i>AGD</i> mērīšanas laikā (tēviņu vidējā masa, mātišu vidējā masa)						
Mazuļu <i>AGD</i> tajā pašā postnatālajā dienā, laikā no dzimšanas līdz 4. dienai (tēviņu vidējā masa, mātišu vidējā masa)						
Metiena masa 4. dienā (vidēji)						
Zīdēkļu retencija vīrišķā dzimuma mazuļiem 13. dienā (vidēji)						
Metiena masa 13. dienā (vidēji)						
MAZUĻI AR ANOMĀLIJĀM						
Mātes, kam nav neviena šāda mazuļa						
Mātes ar 1 šādu mazuli						
Mātes ar ≥ 2 šādiem mazuļiem						
PĒCNĀCĒJU ZUDUMI						
Prenatāli / pēc implantācijām (implantāciju skaits mīnus dzīvi dzimušo skaits)						
Mātītes, kas nav zaudējušas mazuli						
Mātītes ar vienu zaudētu mazuli						
Mātītes ar diviem zaudētiem mazuļiem						
Mātītes ar ≥ 3 zaudētiem mazuļiem						
Postnatāli (dzīvi dzimušo skaits mīnus 13. postnatālajā dienā dzīvo mazuļu skaits)						
Mātītes, kas nav zaudējušas mazuli						
Mātītes ar vienu zaudētu mazuli						
Mātītes ar diviem zaudētiem mazuļiem						
Mātītes ar ≥ 3 zaudētiem mazuļiem						

B.64. KOMBINĒTS ATKĀRTOTAS DEVAS TOKSISKUMA PĒTĪJUMS AR REPRODUKTĪVĀS/ONTOĢENĒTISKĀS TOKSICITĀTES SKRĪNINGA TESTU

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir ekvivalenta ESAO testēšanas vadlīnijai (*TG*) Nr. 422 (2016). ESAO vadlīnijas par ķīmikāliju testēšanu periodiski tiek pārskatītas, ņemot vērā zinātnes attīstību. Sākotnējā vadlīnija Nr. 422 par skrīninga testu tika pieņemta 1996. gadā, pamatojoties uz protokolu par “Kombinēto atkārtotas devas un reproduktīvās/ontogēnētiskās toksicitātes skrīninga testu”, kas apspriests divās ekspertu sanāksmēs Londonā 1990. gadā (1) un Tokijā 1992. gadā (2).
2. Šī testēšanas metode apvieno reproduktīvās/ontogēnētiskās toksicitātes skrīninga daļu, kuras pamatā ir pieredze, kas gūta dalībvalstīs, izmantojot sākotnējo metodi ar lielā apjomā ražotām esošajām ķīmikālijām, un pieredze, kas gūta izpētes testos ar pozitīvās kontroles vielām (3) (4), un atkārtotas devas toksiskuma daļu saskaņā ar ESAO testēšanas vadlīniju Nr. 407 (Atkārtotas devas 28 dienu orālās toksicitātes pētījums ar grauzējiem), kura atbilst šā pielikuma B.7. nodaļai.
3. Pēc tam, kad 1998. gadā ESAO tika sāкта prioritāra darbība ar mērķi pārskatīt esošās testēšanas vadlīnijas un izstrādāt jaunas testēšanas vadlīnijas par endokrīno disruptoru skrīningu un testēšanu (5), šī testēšanas metode tika atjaunināta, iekļaujot tajā endokrīnajiem disruptoriem relevantus beigupunktus. Šajā kontekstā *TG* Nr. 407 (kas atbilst šā pielikuma B.7. nodaļai) 2008. gadā tika papildināta ar parametriem, kas piemēroti testējamo ķīmikāliju endokrīnās aktivitātes noteikšanai. *TG* Nr. 422 tika atjaunināta, lai skrīninga *TG*, kur ekspozīcijas periodi aptver dažus jutīgos attīstības periodus (prenatālais vai agrīns postnatālais periods), iekļautu dažus endokrīnajiem disruptoriem relevantus beigupunktus.
4. Izvēlētie endokrīnajiem disruptoriem relevantie papildu beigupunkti, kas ir daļa arī no *TG* Nr. 443 (Paplašinātais vienas paaudzes reproduktīvās toksicitātes pētījums, šā pielikuma B.56. nodaļa), tika iekļauti *TG* Nr. 422, pamatojoties uz priekšizpēti, kurā aplūkoti zinātniski un tehniski jautājumi par minēto beigupunktu iekļaušanu, kā arī iespējamie testēšanas plānojuma pielāgojumi, kas vajadzīgi minēto beigupunktu iekļaušanai (6).
5. Šī testēšanas metode ir izstrādāta, lai iegūtu ierobežotu informāciju par testējamās ķīmikālijas ietekmi uz tēviņu un mātīšu reproduktīvo spēju, piemēram, gonadālo funkciju, pārošanās uzvedību, apaugļošanos, miesas augļa attīstību un dzemdībām. Tā nav nedz alternatīva B.31., B.34., B.35. vai B.56. testēšanas metodei, nedz tās aizstāj.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI

6. Novērtējot un izvērtējot testējamās ķīmikālijas toksiskās īpašības, orālo toksicitāti ar atkārtotām devām var noteikt pēc tam, kad akūtās toksicitātes testos ir iegūta sākotnējā informācija par toksicitāti. Šis pētījums sniedz informāciju par iespējamajiem veselības apdraudējumiem, kas varētu rasties no atkārtotas ekspozīcijas relatīvi ierobežotā laikposmā. Metodē ietilpst atkārtotas devas toksiskuma pamatpētījums, ko var izmantot attiecībā uz ķīmikālijām, par kurām nav pamatoti veikt 90 dienu pētījumu (piemēram, ja ražošanas apjoms nepārsniedz noteiktas robežvērtības), vai par provizorisku pētījumu ilgtermiņa pētījumam. Veicot pētījumu, ir jāievēro galvenie principi un apsvērumi, kas noteikti ESAO norādījumu dokumentā Nr. 19 par klīnisko pazīmju atpazīšanu, novērtēšanu un izmantošanu par humānajiem beigupunktiem eksperimenta dzīvniekiem, kurus izmanto drošības novērtējumā (7).
7. Šī metode ietver arī reproduktīvās/ontogēnētiskās toksicitātes skrīninga testu, un tāpēc to var izmantot arī, lai sniegtu sākotnējo informāciju par iespējamo ietekmi uz tēviņu un mātīšu reproduktīvo spēju, piemēram, gonadālo funkciju, pārošanās uzvedību, apaugļošanos, miesas augļa attīstību un dzemdībām, vai nu ķīmikāliju toksikoloģisko īpašību novērtēšanas agrīnā posmā, vai par ķīmikālijām, kas rada bažas. Šī testēšanas metode nesniedz pilnīgu informāciju par visiem reprodukcijas un attīstības aspektiem. Konkrētāk, tā piedāvā tikai ierobežotus līdzekļus, ar ko detektēt prenatalās ekspozīcijas postnatālās izpausmes vai ietekmi, kas var rasties postnatālās ekspozīcijas laikā. Beigupunktu selektivitātes, pētījuma īsā ilguma un citu iemeslu dēļ šī metode nesniedz pierādījumus galīgajiem apgalvojumiem par reproduktīvās/ontogēnētiskās ietekmes neesību. Turklāt, ja nav datu no citiem reproduktīvās/ontogēnētiskās toksicitātes testiem, pozitīvie rezultāti ir noderīgi sākotnējai bīstamības novērtēšanai un palīdz pieņemt lēmumus par papildu testēšanas nepieciešamību un laiku.
8. Rezultāti, kas iegūti par endokrīnajiem parametriem, ir jāaplūko ESAO endokrīni disruptīvu ķīmikāliju testēšanas un novērtēšanas konceptuālā satvara (8) kontekstā. Atjauninātā ESAO TG Nr. 422 ir iekļauta minētā konceptuālā satvara 4. līmenī, kur ietilpst *in vivo* testi, kas sniedz datus par nelabvēlīgu ietekmi uz endokrīnajiem beigupunktiem. Endokrīnu signālu pašu par sevi tomēr nevar uzskatīt par pietiekamu pierādījumu tam, ka testējamā ķīmikālija ir endokrīnais disruptors.
9. Šajā testēšanas metodē uzsvars likts arī uz neiroloģisko ietekmi kā īpašu beigupunktu un uzsvērtā vajadzība izdarīt rūpīgus dzīvnieku klīniskos novērojumus, lai iegūtu iespējami daudz informācijas. Ar šo metodi jāidentificē ķīmikālijas ar neirotoksisku potenciālu, saistībā ar kuru varētu būt pamatoti veikt turpmāku padziļinātu izpēti. Turklāt metode var dot arī pamatnorādes uz imunoloģisko ietekmi.
10. Ja nav datu no citiem sistēmiskās toksicitātes, reproduktīvās/ontogēnētiskās toksicitātes, neirotoksicitātes un/vai imūntoksicitātes pētījumiem, pozitīvie rezultāti ir noderīgi sākotnējai bīstamības novērtēšanai un palīdz pieņemt lēmumus par papildu testēšanas

nepieciešamību un laiku. Tests var būt īpaši noderīgs kā daļa no ESAO skrīninga informācijas datu kopas (*SIDS*), lai novērtētu esošās ķīmikālijas, par kurām ir pieejams maz toksikoloģiskās informācijas vai tā nav pieejama vispār, un tas var kalpot par alternatīvu divu atsevišķu testu, proti, atkārtotas devas toksiskuma testa (ESAO *TG* Nr. 407, kas atbilst šā pielikuma B.7. nodaļai) un reproduktīvās/ontogēnētiskās toksicitātes testa (ESAO *TG* Nr. 421, kas atbilst šā pielikuma B.63. nodaļai) veikšanai. To var izmantot arī par devu diapazona noteikšanas pētījumu plašākiem reprodukcijas/ontogēnēzes pētījumiem vai citos relevantos gadījumos.

11. Parasti tiek pieņemts, ka grūsnu un negrūsnu dzīvnieku jutība atšķiras. Tāpēc šajā kombinētajā testā var būt grūti noteikt devu līmeņus, kas ir pietiekami gan vispārējas sistēmiskas toksicitātes, gan specifiskas reproduktīvās/ontogēnētiskās toksicitātes izvērtēšanai; to vieglāk izdarīt, ja individuālos testus veic atsevišķi. Turklāt testa rezultātus attiecībā uz vispārējo sistēmisko toksicitāti var būt sarežģītāk interpretēt nekā tad, ja veic atsevišķu atkārtotas devas pētījumu, jo īpaši gadījumos, kad seruma un histopatoloģijas parametri pētījumā netiek izvērtēti vienlaicīgi. Šo tehnisko sarežģītību dēļ šā kombinētā skrīninga testa veikšanai ir vajadzīga liela pieredze toksicitātes testēšanā. No otras puses, papildus tam, ka testā tiek izmantots mazāks skaits dzīvnieku, kombinētais tests var nodrošināt labāku veidu, kā tiešo ietekmi uz reprodukciju/ontogēnēzi nošķirt no ietekmes, kas ir sekundāra citiem (sistēmiskas) ietekmes veidiem.
12. Šajā testā devu došanas periods ir ilgāks nekā parastā 28 dienu ilgā atkārtotas devas pētījumā. Tomēr salīdzinājumā ar situāciju, kad papildus reproduktīvās/ontogēnētiskās toksicitātes skrīninga testam tiek veikts 28 dienu ilgs atkārtotas devas pētījums, šajā testā katrā grupā tiek izmantots mazāks skaits katra dzimuma dzīvnieku
13. Šajā testēšanas metodē izmanto perorālo testējamās ķīmikālijas ievadīšanu. Citu ekspozīcijas ceļu izmantošanas gadījumā var būt vajadzīgas modifikācijas.
14. Pirms testēšanas metodi attiecībā uz maisījumu izmanto, lai iegūtu datus kādai plānotai regulatīvai vajadzībai, jāapsver, vai un kādēļ tā var sniegt tādām nolūkam piemērotus rezultātus. Šādi apsvērumi nav vajadzīgi, ja pastāv regulatīva prasība maisījumu testēt.
15. Izmantotās definīcijas sniegtas 1. papildinājumā.

TESTA PRINCIPS

16. Testējamo ķīmikāliju pakāpeniski pieaugošās devās saņem vairākas tēviņu un mātīšu grupas. Tēviņiem testējamās ķīmikālijas jādod vismaz četras nedēļas līdz dienai pirms plānotās nonāvēšanas (minēto dienu ieskaitot); minētais laikposms aptver vismaz divas nedēļas pirms pārošanas, pārošanas periodu un aptuveni divas nedēļas pēc pārošanas. Ņemot vērā ierobežoto pirmspārošanas devu došanas periodu tēviņiem, auglība var nebūt īpaši precīzs testikulārās toksicitātes rādītājs. Tāpēc būtiska ir sēklinieku detalizēta

histopatoloģiska izmeklēšana. Divu nedēļu ilgais pirmspārošanas devu došanas periods apvienojumā ar turpmākiem pārošanās/auglības novērojumiem ar kopējo devu došanas periodu vismaz četras nedēļas, kam seko tēviņu gonādu detalizēta histopatoloģija, tiek uzskatīts par pietiekamu, lai varētu noteikt lielāko daļu ietekmes uz tēviņu auglību un spermatogēnēzi.

17. Mātītēm devas dod visu pētījuma laiku, kas aptver divas nedēļas pirms pārošanas (aptverot divus pilnus estrālos ciklus), laiku līdz apaugļošanās brīdim, grūsnības laiku un vismaz trīspadsmit dienas pēc dzemdībām, līdz dienai pirms plānotās nonāvēšanas (minēto dienu ieskaitot).
18. Pētījuma ilgums pēc aklimatizācijas un estrālā cikla izvērtējuma, ko veic pirms devu došanas, ir atkarīgs no mātīšu rādītājiem un ir aptuveni 63 dienas [vismaz 14 dienas pirms pārošanas, (ne vairāk kā) 14 dienas pārošana, 22 dienas gestācija, 13 dienas laktācija].
19. Devu došanas perioda laikā katru dienu rūpīgi novēro, vai dzīvniekiem neparādās toksiskuma pazīmes. Dzīvniekiem, kas testa laikā nobeigušies vai ir nonāvēti, izdara autopsiju, un izdzīvojušos dzīvniekus testa beigās nonāvē un tiem izdara autopsiju.

METODES APRAKSTS

Dzīvnieku sugas izraudzīšanās

20. Šo testēšanas metodi paredzēts izmantot ar žurkām. Ja šajā *TG* Nr. 422 noteiktie parametri tiek pētīti citās grauzēju sugās, tas sīki jāpamato. Starptautiskajā validēšanas programmā endokrīno disruptoru detektēšanai saskaņā ar *TG* Nr. 407 izmantoja tikai žurkas. Nedrīkst izmantot līnijas ar zemu auglību vai līnijas, par kurām ir labi zināms, ka tām ir bieži sastopami attīstības defekti. Jāizmanto veselīgi iepriekš nepāroti dzīvnieki, kuriem eksperimentālas procedūras iepriekš nav veiktas. Jānorāda testa dzīvnieku suga, līnija, dzimums, masa un vecums. Pētījuma sākumā dzīvnieku masas atšķirībām jābūt minimālām un tās nedrīkst pārsniegt $\pm 20 \%$ no vidējās masas, kas noteikta katram dzimumam atsevišķi. Ja pētījumu veic kā sākotnēju pētījumu ilgtermiņa pētījumam vai pētījumam, kas aptver visu paaudzi, vēlams abos pētījumos izmantot vienas līnijas un izcelsmes dzīvniekus.

Turēšana un barošana

21. Visām procedūrām jāatbilst vietējiem laboratorijas dzīvnieku labturības standartiem. Temperatūrai eksperimentālo dzīvnieku turēšanas telpā jābūt 22°C ($\pm 3^{\circ}$). Relatīvajam mitrumam jābūt vismaz 30 % un, vēlams, ne augstākam par 70 %, izņemot telpu uzkopšanas laiku. Dzīvniekus 12 stundas diennaktī tur mākslīgā apgaismojumā, bet 12 stundas – tumsā. Var izmantot parasto laboratorijas barību ar neierobežotu piekļuvi dzirdināmajam ūdenim. Uztura izvēli var ietekmēt vajadzība tam piemaisīt testējamo ķīmikāliju, ja ķīmikāliju ievada šādā ceļā.

22. Dzīvniekus ieteicams turēt mazās viendzimuma grupās; ja tas zinātniski pamatoti, dzīvniekus var turēt atsevišķi. Ja dzīvniekus tur grupās, dzīvnieku skaits vienā būrī nedrīkstētu pārsniegt 5. Pārošanas procedūras jāveic attiecīgajam nolūkam piemērotos būros. Grūsnas mātītes jātur atsevišķi, un tām jānodrošina migas ierīkošanai vajadzīgie materiāli. Mātītes laktācijas periodā tiks turētas atsevišķi kopā ar to pēcnācēju.
23. Barība regulāri jāanalizē, lai noteiktu kontaminantu klātbūtni. Barības paraugs jāglabā līdz ziņojuma pabeigšanai.

Dzīvnieku sagatavošana

24. Veselīgus jaunus pieaugušus dzīvniekus nejaušināti iedala apstrādes grupās un ievieto būros. Būri jāizvieto tā, lai būru novietojuma varbūtējā ietekme būtu iespējami maza. Dzīvniekus unikāli identificē un pirms pētījuma sākšanas vismaz piecas dienas tur būros, lai tie aklimatizētos laboratorijas apstākļos.

Devu sagatavošana

25. Testējamo ķīmikāliju ieteicams ievadīt perorāli, ja vien par piemērotākiem netiek uzskatīti citi ievadīšanas ceļi. Ja izvēlēts perorālais ievadīšanas ceļš, testējamo ķīmikāliju parasti ievada ar gavāžu; tomēr testējamo ķīmikāliju var ievadīt arī ar uzturu vai dzirdināmo ūdeni.
26. Ja vajadzīgs, testējamo ķīmikāliju izšķīdina vai suspendē piemērotā nesējā. Kad vien iespējams, ieteicams lietošanai izvēlēties ūdens šķīdumu/suspensiju vai, ja tas nav iespējams, šķīdumu/suspensiju eļļā (piemēram, kukurūzas eļļā), vai, ja arī tas nav iespējams, šķīdumu citos nesējos. Ja nesējs nav ūdens, ir jāzina šā nesēja toksiskās īpašības. Jānosaka testējamās ķīmikālijas stabilitāte un homogenitāte nesējā.

PROCEDŪRA

Dzīvnieku skaits un dzimums

27. Ieteicams, lai katrā grupā sākumā būtu vismaz 10 tēviņi un 12–13 mātītes. Pirms ekspozīcijas izvērtē mātīšu estrālos ciklus, un dzīvniekus, kam nav novērojami tipiski 4–5 dienu cikli, pētījumā neiekļauj; tāpēc ieteicams izmantot lielāku skaitu mātīšu, lai katrā grupā būtu 10 mātītes. Izņemot izteiktas toksiskās ietekmes gadījumus, sagaidāms, ka katrā grupā būs vismaz 8 grūsnas mātītes, kas parasti ir minimālais pieļaujamais grūsno mātīšu skaits grupā. Mērķis ir nodrošināt pietiekamu daudzumu grūsnu mātīšu un pietiekamu daudzumu pēcnācēju, lai varētu ticami izvērtēt testējamās ķīmikālijas spēju ietekmēt auglību, grūsnību, mātišķo uzvedību un zīdīšanu, kā arī F_1 pēcnācēju augšanu un attīstību no aizmešanās līdz 13. dienai pēc piedzimšanas. Ja ir plānota dzīvnieku nonāvēšana pētījuma gaitā, skaits jāpalielina par dzīvnieku skaitu, ko paredzēts nonāvēt pirms pētījuma pabeigšanas. Jāapsver papildu satelītgrupas (pieci dzīvnieki no katra dzimuma) iekļaušana

kontrolgrupā un lielākās devas grupā, lai vismaz 14 dienas pēc apstrādes novērotu sistēmiskas toksiskās ietekmes atgriezeniskumu, noturību vai vēlīnu parādīšanos. Satelītgrupas dzīvniekus nepāro un līdz ar to neizmanto reproduktīvās/ontogēnētiskās toksicitātes novērtēšanai.

Devas

28. Parasti jāizmanto vismaz trīs testa grupas un kontrolgrupa. Ja piemēroti vispārējās toksicitātes dati nav pieejami, var izdarīt diapazona noteikšanas pētījumu (ar vienas līnijas un izcelsmes dzīvniekiem), kas palīdzētu noteikt izmantojamās devas. Ar kontrolgrupas dzīvniekiem jāīstojas tāpat kā ar testa grupu dzīvniekiem, izņemot attiecībā uz testējamās ķīmikālijas ievadīšanu. Ja testējamās ķīmikālijas ievadīšanai izmanto nesēju, kontrolgrupa saņem lielāko izmantoto nesēja daudzumu.
29. Devu līmeņi jāizvēlas, ņemot vērā visus pieejamos toksiskuma un (toksiko)kinētiskos datus. Jāņem vērā arī tas, ka grūsnu un negrūsnu dzīvnieku jutība var atšķirties. Augstākais devas līmenis jāizvēlas tāds, lai tas izraisītu toksisku ietekmi, bet ne nobeigšanos vai acīmredzamas ciešanas. Pēc tam jāizvēlas tāda lejupēja devas līmeņu virkne, lai ar to varētu parādīt jebkādas ar devu saistītas atbildreakcijas, kā arī to, ka zemākajā devas līmenī nelabvēlīga ietekme nav novērojama. Optimums bieži vien ir divkārti līdz četrkārti intervāli, un bieži vien ir ieteicamāk pievienot ceturto testa grupu, nevis izmantot ļoti plašu devu intervālu (piemēram, vairāk nekā 10 reizes).
30. Ja ir novērota vispārēja toksicitāte (piemēram, ķermeņa masas samazināšanās, ietekme uz aknām, sirdi, plaušām vai nierēm utt.) vai citas pārmaiņas, kas var nebūt toksiskas atbildreakcijas (piemēram, samazināts barības patēriņš, aknas palielināšanās), ir jābūt piesardzīgiem, interpretējot novēroto iedarbību uz jutīgiem endokrīnajiem beigupunktiem.

Robežtests

31. Ja perorālajā pētījumā, kurā izmanto vienu devas līmeni, kas ir vismaz 1000 mg/kg ķermeņa masas dienā, vai – ja testējamo ķīmikāliju ievada ar uzturu – līdzvērtīgs procentuālais daudzums uzturā vai dzirdināmajā ūdenī (aprēķināts pēc ķermeņa masas), un kuru veic, ievērojot šajā pētījumā aprakstītās procedūras, novērojama toksiska ietekme nerodas un ja, pamatojoties uz datiem par strukturāli radniecīgām vielām, toksicitāte nav sagaidāma, var uzskatīt, ka pilns pētījums ar vairākiem devu līmeņiem nav vajadzīgs. Robežtestu neizmanto gadījumos, kad cilvēka ekspozīcija norāda uz to, ka ir jāizmanto augstāks devas līmenis. Ja izmanto citus ievadīšanas veidus, tāds kā ieelpošana vai aplicēšana uz ādas, maksimālā sasniedzamā ekspozīcija bieži vien ir atkarīga no testējamo ķīmikāliju fizikālķīmiskajām īpašībām.

Devu došana

32. Dzīvnieki testējamās ķīmikālijas devu saņem katru dienu 7 dienas nedēļā. Ja izmanto gavāžu, dzīvniekiem testējamā ķīmikālija jāsaņem vienreizējā devā, ko ievada ar kuņģa zondi vai piemērotu intubācijas cauruli. Maksimālais šķidruma tilpums, ko vienā paņēmienā var ievadīt, ir atkarīgs no testa dzīvnieka lieluma. Tilpums nedrīkst pārsniegt 1 ml uz 100 g ķermeņa masas, izņemot tādus ūdens šķīdumus, kur var lietot 2 ml uz 100 g ķermeņa masas. Izņemot kairinošas vai kodīgas testējamās ķīmikālijas, kam lielākās koncentrācijās parasti ir saasināta ietekme, testa tilpuma mainība būtu jāsamazina līdz minimumam, koncentrāciju koriģējot tā, lai visos devu līmeņos saglabātos konstants tilpums.
33. Ja testējamās ķīmikālijas ievada ar uzturu vai dzirdināmo ūdeni, ir svarīgi nodrošināt, ka testējamās ķīmikālijas daudzums neizjauc normālu uztura vai ūdens līdzsvaru. Ja testējamo ķīmikāliju ievada ar uzturu, var izmantot nemainīgu koncentrāciju uzturā (ppm) vai nemainīgu devas līmeni attiecībā pret dzīvnieku ķermeņa masu; izmantotā alternatīva ir jānorāda. Ja testējamo ķīmikāliju ievada ar gavāžu, deva jādod katru dienu vienādā laikā un vismaz reizi nedēļā jākorrigē tā, lai uzturētu nemainīgu devas līmeni attiecībā pret dzīvnieka ķermeņa masu. Ja kombinēto pētījumu izmanto par provizorisku pētījumu ilgtermiņa vai pilnīgam reproduktīvās toksicitātes pētījumam, abos pētījumos jāizmanto līdzīgs uzturs.

Eksperimenta grafiks

34. Devas abu dzimumu dzīvniekiem jāsāk dot 2 nedēļas pirms pārošanas, pēc tam, kad tie vismaz piecas dienas tikuši aklimatizēti un mātītēm ir novēroti normāli estrālie cikli (divu nedēļu ilgā priekšapstrādes periodā). Pētījums jāplāno tā, lai estrālā cikla izvērtēšana sāktos drīz pēc tam, kad dzīvnieki ir sasnieguši pilnīgu dzimumgatavību. Dažādām žurku līnijām pilnīgas dzimumgatavības sasniegšanas vecums dažādās laboratorijās var nedaudz atšķirties, piemēram, *Sprague Dawley* līnijas žurkas to sasniedz 10 nedēļu vecumā, *Wistar* līnijas žurkas — 12 nedēļu vecumā. Mātes ar pēcnācēju jānonāvē 13. pēcdzemdību dienā vai drīz pēc tam. Lai nodrošinātu, ka mātes nakti pirms asins ņemšanas (ja izvēlēts šis variants) nav barojušās, mātes un to pēcnācējs nav obligāti jānogalina tajā pašā dienā. Dzimšanas diena (proti, dienā, kurā dzemdības ir beigušās) ir 0. pēcdzemdību diena. Mātītes, kam nav novērojamas kopulācijas pazīmes, nonāvē 24–26 dienas pēc pēdējās pārošanas perioda dienas. Pārošanas perioda laikā abu dzimumu dzīvniekiem devas turpina dot. Pēc pārošanas perioda tēviņiem devas jāturpina dot vismaz līdz minimālā kopējā devu došanas perioda (28 dienas) beigām. Pēc tam tos vai nu nonāvē, vai arī patur dzīvus un tiem turpina dot devas, lai tos, iespējams, izmantotu otrai pārošanai, ja tāda vajadzīga.
35. Vecākpaaudzes mātītēm devas turpina dot katru dienu visu grūsnības laiku un vismaz līdz 13. pēcdzemdību dienai vai dienai pirms nonāvēšanas (minētās dienas ieskaitot). Pētījumos, kuros testējamo ķīmisko vielu ievada inhalācijas ceļā vai caur ādu, devas

jāturpina dot vismaz līdz gestācijas 19. dienai (ieskaitot) un jāatsāk dot pēc iespējas drīz, bet ne vēlāk kā 4. dienā pēc dzemdībām.

36. Satelītgrupas dzīvniekus (ja tie iekļauti), kas paredzēti papildu novērojumiem, nepāro. Pēc pirmās plānotās mātīšu nonāvēšanas tie jātur vēl vismaz 14 dienas bez apstrādes, lai detektētu toksiskās ietekmes vēlīnu parādīšanos vai noturību, vai atgūšanos no tās.
37. Eksperimenta grafika shēma ir dota 2. papildinājumā.

Estrālie cikli

38. Lai pētījumam atlasītu mātītes ar regulāru cikliskumu, pirms apstrādes sākšanas jānovēro estrālie cikli (sk. 27. punktu). No apstrādes perioda sākuma līdz brīdim, kad ir novērotas pārošanās pazīmes, katru dienu jāveic arī vaginālo uztriepju monitorings. Ja pastāv bažas par akūta stresa ietekmi, kas, uzsākot devu došanu, var mainīt estrālos ciklus, laboratorijas var testa dzīvniekus divas nedēļas pakļaut ekspozīcijai un pēc tam reizi dienā ievākt vaginālās uztriepes, lai pirmspārošanas periodā vismaz divas nedēļas veiktu estrālo ciklu monitoringu, ko turpina veikt arī pārošanas periodā, līdz ir iegūti pārošanās pierādījumi. Iegūstot maksts / dzemdes kakla šūnas, jā rūpējas par to, lai nepieļautu gļotādas bojājumus, kas var inducēt viltus grūsnību (8) (9).

Pārošanas procedūra

39. Parasti šajā pētījumā jāizmanto pārošanas shēma 1:1 (viens tēviņš uz vienu mātīti). Izņēmumi pieļaujami tēviņu nāves gadījumā. Mātīte jātur kopā ar to pašu tēviņu, līdz tiek novērotas kopulācijas pazīmes vai ir pagājušas divas nedēļas. Katru rītu mātītēm pārbauda spermas vai embola klātbūtni makstī. Grūsnību sāk skaitīt no dienas, kurā ir apstiprinājies kopulācijas fakts (konstatēts maksts embols vai sperma). Ja pārošana ir nesekmīga, var apsvērt mātīšu atkārtotu pārošanu ar tās pašas grupas tēviņiem.

Metiena lielums

40. Ceturtajā dienā pēc piedzimšanas katra metiena lielumu var koriģēt, nejaušināti izņemot liekos mazuļus tā, lai katrā metienā pēc iespējas būtu četri vai pieci katra dzimuma mazuli atkarībā no izmantotās žurku līnijas parastā metiena lieluma. No diviem liekajiem mazuļiem jāņem asins paraugi, tie jāapkopo un jāizmanto seruma T4 līmeņu noteikšanai. Mazuļu selektīva izņemšana, piemēram, pēc ķermeņa masas vai anogenitālā attāluma (AGD), nav piemērota. Ja vīrišķā vai sievišķā dzimuma mazuļu skaita dēļ nav iespējams nodrošināt, ka katrā metienā ir četri vai pieci katra dzimuma mazuli, ir pieļaujama metiena lieluma daļēja koriģēšana (piemēram, seši tēviņi un četras mātītes). Ja metiena lielums ir mazāks par korekcijas robežvērtību (8 vai 10 mazuli vienā metienā), mazuļus no metiena neizņem. Ja korekcijas robežvērtību pārsniedz tikai viens mazulis, izņem tikai vienu mazuli un no tā ņem asins paraugus, ko izmanto iespējamiem seruma T4 novērtējumiem.

41. Ja metiena lielums netiek koriģēts, 4. dienā pēc piedzimšanas divus mazuļus no katra metiena nonāvē un no tiem ņem asins paraugus, ko izmanto tiroīdhormona seruma koncentrācijas mērīšanai. Ja iespējams, diviem mazuļiem katrā metienā jābūt sievišķā dzimuma mazuļiem, lai vīrišķā dzimuma mazuļus rezervētu zīdekļu retencijas izvērtējumiem, izņemot gadījumus, kad šo mazuļu izņemšanas rezultātā galējam novērtējumam nepaliek neviena mātīte. Mazuļus no metiena neizņem, ja tā lielums būs mazāks nekā 8 vai 10 mazuļi vienā metienā (atkarībā no izmantotās žurku līnijas parastā metiena lieluma). Ja, pamatojoties uz parasto metiena lielumu, lieks ir tikai viens mazulis, izņem tikai vienu mazuli un no tā ņem asins paraugus, ko izmanto iespējamiem seruma T4 novērtējumiem.

Novērojumi

42. Vismaz reizi dienā, vēlams — vienā un tajā pašā laikā vai laikos un ņemot vērā gaidāmo ietekmju maksimumperiodu pēc devu došanas, jāizdara vispārīgi klīniski novērojumi. Jāreģistrē dzīvnieku veselības stāvoklis. Vismaz divreiz dienā visus dzīvniekus novēro attiecībā uz morbiditāti un mirstību.
43. Vienu reizi pirms pirmās ekspozīcijas (lai varētu izdarīt salīdzinājumus vienam un tam pašam dzīvniekam) un pēc tam vismaz reizi nedēļā jāveic detalizēti klīniskie novērojumi visiem vecākpaaudzes dzīvniekiem. Šie novērojumi jāizdara standartnozogojumā ārpus dzīvnieka turēšanas būra, ieteicams, katru dienu vienā un tajā pašā laikā. Tie rūpīgi jāreģistrē, ieteicams, izmantojot punktu sistēmas, ko skaidri noteikusi testēšanas laboratorija. Jācenšas nodrošināt, lai testēšanas apstākļu mainība būtu minimāla un lai novērojumus izdarītu novērotāji, kas nav informēti par apstrādi. Jāreģistrē šādas pazīmes (neizsmelošs saraksts): izmaiņas ādā, apmatojumā, acīs, gļotādās, sekrētu un ekskretu parādīšanās un veģetatīvās nervu sistēmas reakcijas (piemēram, asarošana, piloerekcija, acs zīlītes diametra pārmaiņas, neraksturīga elpošana). Jāreģistrē arī pārmaiņas gaitā, stājā un atbildes reakcijās uz manipulācijām, kā arī kloniskas vai toniskas kustības, stereotipiska uzvedība (piemēram, pārmērīga apmatojuma laizīšana, atkārtota riņķošana), grūtas vai ilgstošas dzemdības vai savāda uzvedība (piemēram, pašsakropļošanās, staigāšana atmuguriski) (10).
44. Kādā brīdī pētījuma laikā jānovērtē piecu tēviņu un piecu mātīšu, kas nejauši izvēlētas no katras grupas, sensorā reaktivitāte uz dažāda veida kairinājumiem (piemēram, dzirdes, redzes un proprioceptīvajiem kairinājumiem) (8) (9) (11), satvēriena spēks (12) un kustību aktivitāte (13). Papildinformācija par izmantojamajām procedūrām ir atrodamā attiecīgajos atsauces materiālos. Tomēr norādīto procedūru vietā var izmantot arī citas procedūras. Tēviņiem šie funkcionālie novērojumi jāveic, tuvojoties devu došanas perioda beigām, neilgi pirms plānotās nonāvēšanas, bet pirms asins paraugu ņemšanas hematoloģijai vai klīniskās ķīmijas izmeklējumiem (sk. 53.–56. punktu, arī 1. zemspītras piezīmi). Mātītēm šo funkcionālo testu laikā jābūt fizioloģiski līdzīgā stāvoklī, un tās

vēlams testēt vienu reizi pēdējās laktācijas nedēļas laikā (piemēram, 6.–13. laktācijas dienā), neilgi pirms plānotās nonāvēšanas. Māšu un mazuļu atšķiršanas laikiem jābūt pēc iespējas īsākiem.

45. Funkcionālos novērojumus, kas veicami vienu reizi pētījuma beigās, var neveikt, ja pētījums ir provizorisks pētījums turpmākam subhroniskam (90 dienas) vai ilgtermiņa pētījumam. Tādā gadījumā funkcionālie novērojumi ir jāiekļauj minētajā turpmākajā pētījumā. Tomēr šajā atkārtotās devas pētījumā iegūtie funkcionālo novērojumu dati var atvieglot devu līmeņu izvēli turpmākajam subhroniskajam vai ilgtermiņa pētījumam.
46. Izņēmuma kārtā funkcionālos novērojumus var neveikt arī tām grupām, kurām toksicitātes pazīmes izpaužas tādā mērā, kas varētu ievērojami traucēt funkcionālā testa veikšanu.
47. Jāreģistrē gestācijas ilgums, ko aprēķina no 0. grūsnības dienas. Pēc atnešanās katru metienu iespējami drīz pārbauda, lai noteiktu mazuļu, nedzīvi dzimušo, dzīvi dzimušo un nīkuļu (mazuļi, kas ir ievērojami mazāki nekā atbilstīgie kontrolmazuļi) skaitu un dzimumu un acīmredzamu anomāliju klātbūtni.
48. 24 stundu laikā pēc atnešanās (0. vai 1. diena pēc piedzimšanas) un vismaz 4. un 13. dienā pēc piedzimšanas jāskaita dzīvie mazuļi un jānosaka to dzimums, un jānosver metieni. Papildus vecākpaaudzes dzīvnieku novērojumiem (sk. 43. un 44. punktu) jāreģistrē pēcnācēju uzvedības anomālijas.
49. Katra mazuļa *AGD* jāmēra vienā un tajā pašā dienā pēc piedzimšanas no 0. līdz 4. dienai pēc piedzimšanas. Mazulis ir jānosver tajā pašā dienā, kad tiek mērīts *AGD*, un *AGD* ir jāpielāgo mazuļa izmēram, priekšroku dodot kvadrātsaknei no ķermeņa svara (14). Kā ieteikts ESAO *GD* 151 (15), 12. vai 13. dienā pēc piedzimšanas ir jāskaita vīrišķā dzimuma mazuļu zīdekļi/areolas.

Ķermeņa masa un barības/ūdens patēriņš

50. Tēviņi un mātītes jānosver pirmajā devas došanas dienā, tad vismaz reizi nedēļā un pētījuma beigās. Grūsnības laikā mātītes jānosver 0., 7., 14. un 20. dienā un 24 stundu laikā pēc atnešanās (0. vai 1. pēcdzemdību diena), kā arī vismaz 4. un 13. pēcdzemdību dienā. Novērojumu rezultāti jāreģistrē atsevišķi par katru pieaugušo dzīvnieku.
51. Pirmspārošanas, grūsnības un laktācijas laikā barības patēriņš jāmēra vismaz reizi nedēļā. Barības patēriņa mērīšana pārošanas laikā ir fakultatīva. Ja testējamo ķimikāliju ievada ar ūdeni, minētajos laikposmos ir jāmēra arī ūdens patēriņš.

Hematoloģija

52. Pētījuma laikā pieciem tēviņiem un piecām mātītēm, kas nejauši izvēlētas no katras grupas, vienu reizi jāveic šādi hematoloģiski izmeklējumi: hematokrīts, hemoglobīna koncentrācijas, eritrocītu skaits, retikulocīti, leukocītu skaits un leukocitārā formula,

trombocītu skaits un asinsreces laika/potenciāla noteikšana. Ja testējamajai ķimikālijai vai tās iespējamajiem metabolītiem ir oksidējošas īpašības vai pastāv aizdomas, ka tiem tādas varētu būt, jānosaka arī methemoglobīna koncentrācija un Heinca ķermenīši.

53. Asins paraugi jāņem no norādītās vietas. Paraugu ņemšanas laikā mātītēm ir jābūt fizioloģiski līdzīgā stāvoklī. Lai izvairītos no praktiskām grūtībām, kas saistītas ar mainību grūsnības sākumā, asins savākšanu mātītēm var veikt pirms pārošanas perioda beigām kā alternatīvu paraugu ņemšanai tieši pirms dzīvnieku eitanāzijas procedūras vai tās ietvaros. Asins paraugus no tēviņiem vēlams ņemt tieši pirms dzīvnieku eitanāzijas procedūras vai tās ietvaros. Alternatīvi asins savākšanu tēviņiem var veikt arī pārošanas perioda beigās, ja šis brīdis ticis izvēlēts mātītēm.

54. Asins paraugi jāglabā piemērotos apstākļos.

Klīniskā bioķīmija

55. Asins paraugiem, kas iegūti no izvēlētiem pieciem tēviņiem un piecām mātītēm katrā grupā, veic klīniskās bioķīmijas analīzes, lai izpētītu būtisku toksisko ietekmi uz audiem un, konkrēti, uz nierēm un aknām. Ir ieteicams dzīvniekus nakti pirms asins paraugu ņemšanas nebarot¹. Plazmā vai serumā jānosaka nātrijs, kālijs, glikoze, kopējais holesterīns, urīnviela, kreatinīns, kopējais olbaltums un albumīns, vismaz divi fermenti, kas norāda uz hepatocelulāro ietekmi, (piemēram, alanīnaminotransferāze, aspartātaminotransferāze un sorbitoldehidrogenāze) un žultsskābes. Noteiktos apstākļos noderīgu informāciju var sniegt papildu fermentu (aknu fermentu vai citu fermentu) un bilirubīna noteikšana.

56. Asins paraugus no noteiktas vietas ņem saskaņā ar šādu grafiku:

- 4. dienā pēc piedzimšanas — no vismaz diviem mazuļiem katrā metienā, ja mazuļu skaits to ļauj (sk. 40.-41. punktu),

¹ Dažiem mērījumiem serumā un plazmā, jo īpaši glikozes mērījumiem, ir vēlams dzīvniekus nakti pirms asins ņemšanas nebarot. Tas ir vēlams galvenokārt tāpēc, ka barības uzņemšana neizbēgami palielinātu rezultātu mainību, kas varētu maskēt neizteiktāku ietekmi un apgrūtināt interpretēšanu. Tomēr barības nedošana uz nakti var ietekmēt (grūsnos) dzīvnieku vispārējo vielmaiņu, traucēt laktāciju un zīdīšanu un jo īpaši barošanas pētījumos var ierobežot ikdienas eksponētību testējamajai ķimikālijai. Ja tiek izlemts dzīvniekus uz nakti atstāt bez barības, klīniskie bioķīmiskie mērījumi jāveic pēc pētījuma funkcionālo novērojumu izdarīšanas tēviņiem 4. nedēļā. Mātes jāpatur vēl vienu dienu pēc mazuļu izņemšanas, ko veic, piemēram, 13. dienā pēc piedzimšanas. Mātes jāatstāj uz nakti bez barības no 13. vai 14. laktācijas dienas, un pētījuma beigās ņemtie asins paraugi jāizņem klīniskās ķīmijas parametru noteikšanai.

- pētījuma beigās 13. dienā — no visām mātēm un vismaz diviem mazuļiem katrā metienā, un
- pētījuma beigās — no visiem pieaugušiem tēviņiem.

Visus asins paraugus glabā piemērotos apstākļos. Asins paraugos, kas ņemti no mazuļiem 13. dienā un pieaugušiem tēviņiem, nosaka tiroīdhormonu (T4) seruma līmeņus. Ja vajadzīgs, T4 līmeņus nosaka arī asins paraugos, kas ņemti no mātēm un 4. dienas mazuļiem. Attiecīgā gadījumā var fakultatīvi mērīt citus hormonus. Tiroīdhormona analīžu veikšanai mazuļu asinis var apkopot pa metieniem. Tiroīdhormonus (T4 un TSH) vēlams mērīt kopējā formā (kopējais T4 un kopējais TSH).

57. Pēdējā pētījuma nedēļā, izmantojot urīna savākšanu noteiktā laika periodā, pieciem nejauši izvēlētiem tēviņiem katrā grupā pēc izvēles var veikt šādus urīnanalīzes mērījumus: izskats, tilpums, osmolalitāte vai īpatnējais svars, pH, proteīns, glikoze un asinis/ asins šūnas.
58. Turklāt jāapsver iespēja veikt vispārēja audu bojājuma seruma marķieru izpēti. Ja testējamās ķīmikālijas zināmās īpašības var ietekmēt saistītos metaboliskos profilus vai ir aizdomas par šādu ietekmi, jānosaka arī kalcījs, fosfāts, triglicerīdu līmenis tukšā dūšā un glikoze tukšā dūšā, īpaši hormoni, methemoglobīns un holīnesterāze. Tie jānosaka katrā gadījumā atsevišķi.
59. Noteikto hormonu mainību un absolūto koncentrāciju var ietekmēt šādi faktori:
 - nonāvēšanas laiks hormonu koncentrāciju diennakts mainības dēļ,
 - nonāvēšanas metode, kurā dzīvniekiem netiek radīts nevajadzīgs stress, kas varētu ietekmēt hormonu koncentrācijas,
 - hormonu noteikšanas testa komplekti, kas var atšķirties pēc standartlīknēm.
60. Plazmas paraugi, kas paredzēti tieši hormonu noteikšanai, ir jāiegūst salīdzināmā dienas laikā. Skaitliskās vērtības, ko iegūst, analizējot hormonu koncentrācijas, atšķiras atkarībā no tirdzniecībā pieejamajiem testēšanas komplektiem.
61. Ja vēsturiskie bāzlīnijas dati ir nepietiekami, jāapsver iespēja noteikt hematoloģiskos un klīniskās bioķīmijas mainīgos lielumus pirms devu došanas sākšanas vai, vēlams, dzīvniekiem, kas nav ietverti eksperimentālajās grupās. Dati par mātītēm jāiegūst no dzīvniekiem laktācijas periodā.

PATOLOĢIJA

Makroskopiskā autopsija

62. Visiem pētījumā izmantotajiem pieaugušajiem dzīvniekiem jāveic pilna, detalizēta makroskopiska autopsija, kas ietver ķermeņa ārējās virsmas, visu atveru un galvaskausa,

krūšu un vēdera dobumu un to satura rūpīgu izpēti. Īpaša uzmanība jāpievērš reproduktīvās sistēmas orgāniem. Jāreģistrē implantācijas vietu skaits. Autopsijas dienā jāizmeklē vaginālās uztriepes, lai noteiktu estrālā cikla fāzi un ļautu to saistīt ar mātīšu reproduktīvo orgānu histopatoloģiju.

63. Visu pieaugušo tēviņu sēklinieki un sēklinieku piedēkļi, kā arī prostata un sēklas pūslīši ar prostatas priekšējām daivām (kopā) pēc vajadzības jāatbrīvo no pieguļošiem audiem, un to slapjais svars jānosaka iespējami drīz pēc disekcijas, lai izvairītos no izzūšanas. Turklāt fakultatīvos orgānu masas mērījumos var ietvert arī tūpla cēlājmuskuļa un briedumķermeņa muskuļa kompleksu, Kupera dziedzerus un dzimumlocekļa galviņu tēviņiem un abas olnīcas (slapjais svars) un dzemdi (ar dzemdes kaklu) mātītēm; ietveršanas gadījumā minētie masas mērījumi jāveic iespējami drīz pēc disekcijas. Jāsaglabā visu pieaugušo dzīvnieku olnīcas, sēklinieki, sēklinieku piedēkļi, iekšējie dzimumorgāni un visi orgāni, kam ir makroskopiski bojājumi.
64. Vairogdziedzeri, kas ņemti no visiem pieaugušajiem tēviņiem un mātītēm un viena 13 dienas veca vīrišķā dzimuma un sievišķā dzimuma mazuļa katrā metienā, vispiemērotākajā fiksējošajā vidē jāsaglabā paredzētajai turpmākajai histopatoloģiskajai izmeklēšanai. Vairogdziedzera masu var noteikt pēc fiksācijas. Tas jāatbrīvo no pieguļošiem audiem ļoti uzmanīgi un tikai pēc fiksācijas, lai izvairītos no audu bojājumiem. Audu bojājumi var apgrūtināt histopatoloģijas analīzi. Asins paraugi jāņem no precīzi norādītas vietas tieši pirms dzīvnieku eitanāzijas procedūras vai tās laikā un jāglabā piemērotos apstākļos (sk. 56. punktu).
65. Turklāt vismaz piecu pieaugušu tēviņu un mātīšu, kas nejauši izvēlētas no katras grupas (izņemot dzīvniekus, kas ir nāvei tuvā stāvoklī un/vai eitanazēti pirms pētījuma beigām), aknas, nieres, virsnieres, tīms, liesa, smadzenes un sirds pēc vajadzības jāatbrīvo no pieguļošiem audiem un to slapjais svars jānosaka iespējami drīz pēc disekcijas, lai izvairītos no izzūšanas. Šādi audi jāglabā audu tipam un paredzētajai turpmākajai histopatoloģiskajai izmeklēšanai vispiemērotākajā fiksējošajā vidē: visi audi ar makroskopiskiem bojājumiem, smadzenes (reprezentatīvas daļas, tostarp galasmdzenes, smadzenītes un tilts), muguras smadzenes, acis, kuņģis, tievā un resnā zarna (arī Peijera plātnīte), aknas, nieres, virsnieres, liesa, sirds, tīms, traheja un plaušas (saglabātas, piepūšot ar fiksatoru un pēc tam iegremdējot), gonādas (sēklinieki un olnīcas), iekšējie dzimumorgāni (dzemde un dzemdes kakls, sēklinieku piedēkļi, prostata un sēklas pūslīši kopā ar prostatas priekšējo daivu), vagīna, urīnpūslis, limfmezgli (saskaņā ar laboratorijas pieredzi papildus proksimālam drenējošam limfmezglim ir jāņem vēl viens limfmezgls (16)), perifērais nervs (sēžas nervs vai apakšstilba nervs), vēlams, tiešā muskuļa tuvumā, skeleta muskulis un kauls ar kaula smadzenēm (izgriezums vai, alternatīvi, svaigs kaula smadzeņu aspirāts). Sēkliniekus ieteicams fiksēt, iegremdējot tos Buēna fiksatorā vai Davidsona fiksatorā (16) (17) (18); šos audus nav ieteicams fiksēt formalīnā. Lai nodrošinātu fiksatora ātru penetrēšanos, bālgano apvalku (*tunica albuginea*) var abos

orgāna polos uzmanīgi un sekli pārdurt ar adatu. Klīnisko un citu konstatējumu rezultātā var rasties vajadzība papildus izmeklēt citus audus. Jāsauglabā arī orgāni, ko, pamatojoties uz zināmajām testējamās ķīmikālijas īpašībām, uzskata par iespējamiem mērķorgāniem.

66. Vērtīgas norādes par endokrīnu iedarbību var gūt no šādiem audiem: gonādas (olnīcas un sēklinieki), iekšējie dzimumorgāni (dzemde un dzemdes kakls, sēklinieku piedēkļi, sēklas pūslīši ar prostatas priekšējām daivām, dorsolaterālā un ventrālā prostata), vagīna, hipofīze, tēviņu krūts dziedzeris un virsnieru dziedzeris. Tēviņu krūts dziedzeru pārmaiņas nav pietiekami dokumentētas, taču šis parametrs var būt ļoti jutīgs pret vielām ar estrogēnisku iedarbību. To orgānu/audu novērošana, kas nav uzskaitīti 65. punktā, nav obligāta.
67. Nedzīvi mazuļi un mazuļi, kas nonāvēti 13. dienā pēc piedzimšanas vai drīz pēc tam, vismaz rūpīgi ārēji jāpārbauda, lai konstatētu iespējamās acīmredzamas anomālijas. Īpaša uzmanība jāpievērš ārējām reproduktīvajām ģenitālijām, kuras jāpārbauda, meklējot attīstības izmaiņu pazīmes.

Histopatoloģija

68. Saglabātajiem orgāniem un audiem, kas iegūti no atlasītajiem kontrolgrupas un lielākās devas grupas dzīvniekiem, veic pilnu histopatoloģisko izmeklēšanu (īpašu uzsvāru liekot uz spermatogēnēzes posmiem tēviņu gonādās un sēklinieku intersticiālo šūnu struktūras histopatoloģiju). Vajadzības gadījumā var izmeklēt mazuļu un pārējo pieaugušo dzīvnieku vairogdziedzeri. Ja lielākās devas grupā ir novērotas ar apstrādi saistītas pārmaiņas, minētie izmeklējumi jāattiecinā arī uz citu devu grupu dzīvniekiem. Norādījumos par histopatoloģiju (10) ir sīki izklāstīta papildu informācija par endokrīno audu disekciju, fiksāciju, secēšanu un histopatoloģiju.
69. Jāizmeklē visi makroskopiskie bojājumi. Lai palīdzētu noskaidrot *NOAEL*, jāizmeklē mērķorgāni citās devu grupās, jo īpaši grupās, kas uzrāda *NOAEL*.
70. Ja izmanto satelītgrupu, histopatoloģiskā izmeklēšana jāizdara audiem un orgāniem, uz kuriem apstrādātajās grupās ir konstatēta ietekme.

DATI UN PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

Dati

71. Jāsniedz dati par atsevišķiem dzīvniekiem. Turklāt visi dati jāapkopo tabulā, kurā redzams testa sākumā katrā testā grupā esošo dzīvnieku skaits, to dzīvnieku skaits, kas atrasti miruši testa laikā vai eitanazēti humānu apsvērumu dēļ, nāves iestāšanās vai eitanāzijas laiks, auglīgo dzīvnieku skaits, grūsno mātīšu skaits, to dzīvnieku skaits, kam novērotas toksicitātes pazīmes, novēroto toksicitātes pazīmju apraksts, arī toksiskās darbības sākuma laiks, ilgums un stiprums, histopatoloģisko pārmaiņu veidi un visi relevantie dati par

metienu. Tabulas veidā sagatavotā kopsavilkuma ziņojuma paraugs, kas ir ļoti noderīgs ietekmes uz reprodukciju/attīstību izvērtēšanai, ir sniegts 3. papildinājumā.

72. Ja iespējams, skaitliskie rezultāti jāizvērtē ar piemērotu un vispārpieņemtu statistikas metodi. Salīdzinot ietekmi visā devu diapazonā, jāizvairās no vairāku t-testu izmantošanas. Statistikas metodes jāizvēlas pētījuma plānošanas laikā. *AGD* un zīdekļu retencijas statistiskajai analīzei jābalstās uz atsevišķu mazuļu datiem, ņemot vērā ietekmi uz metienu. Vajadzības gadījumā analīzes vienība ir metiens. Mazuļu ķermeņa masas statistiskajai analīzei jābalstās uz atsevišķu mazuļu datiem, ņemot vērā metiena lielumu. Tā kā pētījuma tvērums ir ierobežots, statistiskajai analīzei, ko veic, lai izvērtētu rezultātu nozīmīgumu, ir ierobežota vērtība attiecībā uz daudziem beigupunktiem, jo īpaši reprodutīvajiem beigupunktiem. Dažas no visplašāk izmantotajām metodēm, jo īpaši parametriskie testi centrālās tendences mērīšanai, nav piemērotas. Ja tiek izmantota statistiskā analīze, izvēlētajai metodei jābūt atbilstošai pārbaudāmā mainīgā lieluma sadalījumam, un tā jāizvēlas pirms pētījuma sākšanas.

Rezultātu izvērtēšana

73. Šā toksicitātes pētījuma konstatējumi jāizvērtē, ņemot vērā novēroto ietekmi, autopsiju un mikroskopiskos konstatējumus. Vērtējums ietver testējamās ķimikālijas devas saistību ar anomāliju — to vidū makroskopisko bojājumu, identificēto mērķorgānu, neauglības, klīnisko anomāliju, ietekmes uz reprodutīvajiem un metiena rādītājiem, ķermeņa masas pārmaiņu, ietekmes uz mirstību un citas toksiskās iedarbības – esību vai neesību, incidenci un smagumu.
74. Tēviņu apstrādes periods ir īss, tāpēc, novērtējot ietekmi uz tēviņu reprodutīvo funkciju, papildus auglības datiem jāņem vērā sēklinieku un sēklinieku piedēkļu histopatoloģija. Pētījuma interpretēšanā par palīglīdzekli var būt lietderīgi izmantot arī vēsturiskus kontroles datus par reprodukciju/ontogēzi (piemēram, datus par metiena lielumu, *AGD*, zīdekļu retenciju, seruma T4 līmeņiem), ja tādi pieejami.
75. Kvalitātes kontroles vajadzībām ir ierosināts apkopot vēsturiskus kontroldatus un skaitliskajiem datiem, it sevišķi parametriem, kas saistīti ar endokrīnās sistēmas traucējumu izraisītāju noteikšanu, aprēķināt variācijas koeficientus. Šos datus var izmantot salīdzināšanas nolūkos, kad tiek novērtēti faktiskie pētījumi.

Testēšanas pārskats

76. Testēšanas pārskatā norāda šādu informāciju.

Testējamā ķimikālija:

- avots, sērijas numurs, izmantošanas termiņš, ja pieejams,
- testējamās ķimikālijas stabilitāte, ja tā zināma;

vienkomponenta viela:

- izskats, šķīdība ūdenī un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības,
- ķīmiskā identifikācija, piemēram, *IUPAC* vai *CAS* nosaukums, *CAS* numurs, *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula, tīrība, attiecīgā gadījumā, ja praktiski iespējams, piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. tml.;

daudzkomponentu viela, *UVCB* un maisījumi:

- iespējami izsmeļoši raksturoti pēc komponentu ķīmiskās identitātes (sk. iepriekš), kvantitatīvās sastopamības un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām.

Nesējs (attiecīgā gadījumā):

- nesēja izvēles pamatojums, ja nesējs nav ūdens.

Testa dzīvnieki:

- izmantotās sugas/līnijas,
- dzīvnieku skaits, vecums un dzimums,
- avots, turēšanas apstākļi, uzturs u. tml.,
- katra dzīvnieka masa testa sākumā,
- sugas izvēles pamatojums, ja tā nav žurka.

Testēšanas nosacījumi:

- devu līmeņa izraudzīšanās pamatojums,
- detalizēta informācija par testējamās ķīmikālijas maisījuma/barības preparāta sagatavošanu, sasniegto preparāta koncentrāciju, stabilitāti un homogenitāti,
- detalizēta informācija par testējamās ķīmikālijas devu došanu,
- attiecīgā gadījumā testējamās ķīmikālijas koncentrācijas (ppm) barībā / dzirdināmajā ūdenī pārrēķins faktiskajā devā (mg uz kg ķermeņa masas dienā),
- detalizēta informācija par barības un ūdens kvalitāti,
- detalizēts apraksts par nejaušināšanas procedūru, kas izmantota, lai atlasītu mazuļus izņemšanai no metiena, ja šāda izņemšana notikusi.

Rezultāti:

- ķermeņa masa / ķermeņa masas izmaiņas,
- attiecīgā gadījumā barības patēriņš un ūdens patēriņš,

- dati par toksiskajām atbildes reakcijām atkarībā no dzimuma un devas, arī dati par auglību, gestāciju un citām toksicitātes pazīmēm,
-
- gestācijas ilgums,
- toksiska vai cita iedarbība uz reprodukciju, pēcnācējiem, postnatālo augšanu utt.,
- klīnisko novērojumu veids, smagums un ilgums (atgriezenisks vai neatgriezenisks),
- sensoriskās aktivitātes, satvēriena spēka un kustību aktivitātes novērtējums,
- hematoloģiskie testi ar attiecīgajām bāzes līnijas vērtībām,
- klīniskās bioķīmijas testi ar attiecīgajām bāzes līnijas vērtībām,
- pieaugušu mātīšu skaits ar normālu vai nenormālu estrālo ciklu un cikla ilgums,
- dzīvi dzimušo skaits un pēcimplantācijas zudums,
- to mazuļu skaits, kam ir makroskopiskas anomālijas, ārējo ģenitāliju makroskopisks izvērtējums, nīkuļu skaits,
- nāves iestāšanās laiks testa laikā vai norāde, ka dzīvnieki ir izdzīvojuši līdz pētījuma beigām,
- implantāciju skaits, metiena lielums un masa datu reģistrēšanas laikā,
- mazuļu ķermeņa masas dati,
- visu mazuļu *AGD* (un ķermeņa masa *AGD* mērīšanas dienā),
- zīdekļu retencija vīrišķā dzimuma mazuļiem,
- vairogdziedzera hormonu līmenis 13 dienu veciem mazuļiem un pieaugušiem tēviņiem (un mātēm un 4 dienas veciem mazuļiem, ja šādi mērījumi veikti),
-
- ķermeņa masa nonāvēšanas laikā un dati par vecākpaaudzes dzīvnieku orgānu masu,
- autopsijas konstatējumi,
- histopatoloģiskas izmeklēšanas rezultātu detalizēts apraksts,
- absorbcijas dati (ja pieejami),
- rezultātu statistiskā apstrāde (attiecīgā gadījumā).

Rezultātu iztirzājums.

Secinājumi.

Rezultātu interpretēšana

77. Pētījums sniegs izvērtējumu par reproduktīvo/ontoģenētisko toksicitāti, kas saistīta atkārtotu devu došanu. Konkrētāk, tā kā uzsvars ir likts uz vispārējās toksicitātes un reproduktīvās/ontoģenētiskās toksicitātes beigupunktiem, pētījuma rezultāti ļaus reproduktīvo/ontoģenētisko ietekmi, kas radusies bez vispārējas toksicitātes, atšķirt no ietekmes, kura izpaužas tikai pie līmeņiem, kas ir toksiski arī vecākpaaudzes dzīvniekiem (sk. 7.–11. punktu). Tas varētu norādīt uz nepieciešamību veikt turpmākas izmeklēšanas un sniegt norādījumus turpmāko pētījumu plānošanā. Ar reprodukciju un ontoģenēzi saistīto rezultātu interpretēšanā par palīglīdzekli jāizmanto ESAO norādījumu dokuments Nr. 43 (19). ESAO norādījumu dokumentā Nr. 106 par grauzēju endokrīno un reproduktīvo testu histoloģisko izvērtēšanu (16) sniegta informācija par (endokrīno) orgānu un vaginālo uztriepju sagatavošanu un izvērtēšanu; minētā informācija var būt noderīga saistībā ar šo testēšanas metodi.

LITERATŪRA

- (1) OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Available upon request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris
- (2) OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. . Available upon request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris
- (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, Available upon request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris
- (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. papildinājums

DEFINĪCIJAS (SK. ARĪ (20) ESAO GD 150)

Androgenitāte ir ķīmikālijas spēja zīdītāja organismā funkcionēt kā dabiskam androgēnu tipa hormonam (piemēram, testosteronam).

Antiandrogenitāte ir ķīmikālijas spēja zīdītāja organismā nomākt dabiska androgēnu tipa hormona (piemēram, testosterona) darbību.

Antiestrogenitāte ir ķīmikālijas spēja zīdītāja organismā nomākt dabiska estrogēnu tipa hormona (piemēram, estradiola 17β) darbību.

Antitireoidāla iedarbība ir ķīmikālijas spēja zīdītāja organismā nomākt dabiska tiroīdhormona (piemēram, T₃) darbību.

Ķīmikālija ir viela vai maisījums.

Ontoģenētiskā toksicitāte: reproduktīvās toksicitātes izpausme, kas liecina par pēcnācēju prenataliem, perinatāliem, postnatāliem, strukturāliem vai funkcionāliem traucējumiem.

Deva ir ievadītās testējamās ķīmikālijas daudzums. Devu izsaka ar testējamās ķīmikālijas masu uz testa dzīvnieka ķermeņa masas vienību dienā (piemēram, mg uz kg ķermeņa masas dienā) vai kā nemainīgu koncentrāciju barībā.

Dozējums ir vispārīgs termins, kas aptver devu, tās ievadīšanas biežumu un ilgumu.

Izteikta toksicitāte ir vispārīgs termins, kas apzīmē acīmredzamas toksicitātes pazīmes pēc testējamās ķīmikālijas ievadīšanas. Šīm pazīmēm jābūt pietiekamām, lai varētu novērtēt bīstamību, un tādām, lai varētu sagaidīt, ka ievadītās devas palielināšana izraisīs smagas toksicitātes pazīmes un, iespējams, mirstību.

Fertilitātes traucējumi ir tēviņu vai mātīšu reproduktīvās funkcijas vai spējas traucējumi.

Maternālā toksicitāte: nelabvēlīgā ietekme uz gravidām mātītēm, kas ir specifiska (tieša ietekme) vai nespecifiska (netieša ietekme) un saistīta ar gravidu stāvokli.

NOAEL ir saīsinājums, kas apzīmē nenovērojamās nelabvēlīgās ietekmes līmeni. Tas ir augstākais devas līmenis, kurā netiek konstatētas ar vielas saņemšanu saistītas negatīvas parādības.

Estrogenitāte ir ķīmikālijas spēja zīdītāja organismā darboties kā dabiskam estrogēnu tipa hormonam (piemēram, estradiolam 17β).

Reproduktīvā toksicitāte ir kaitīga ietekme uz pēcnācējiem un/vai tēviņu un mātīšu reproduktīvās funkcijas vai spējas traucējumi.

Testējamā ķīmikālija ir jebkura viela vai maisījums, ko testē, izmantojot šo testēšanas

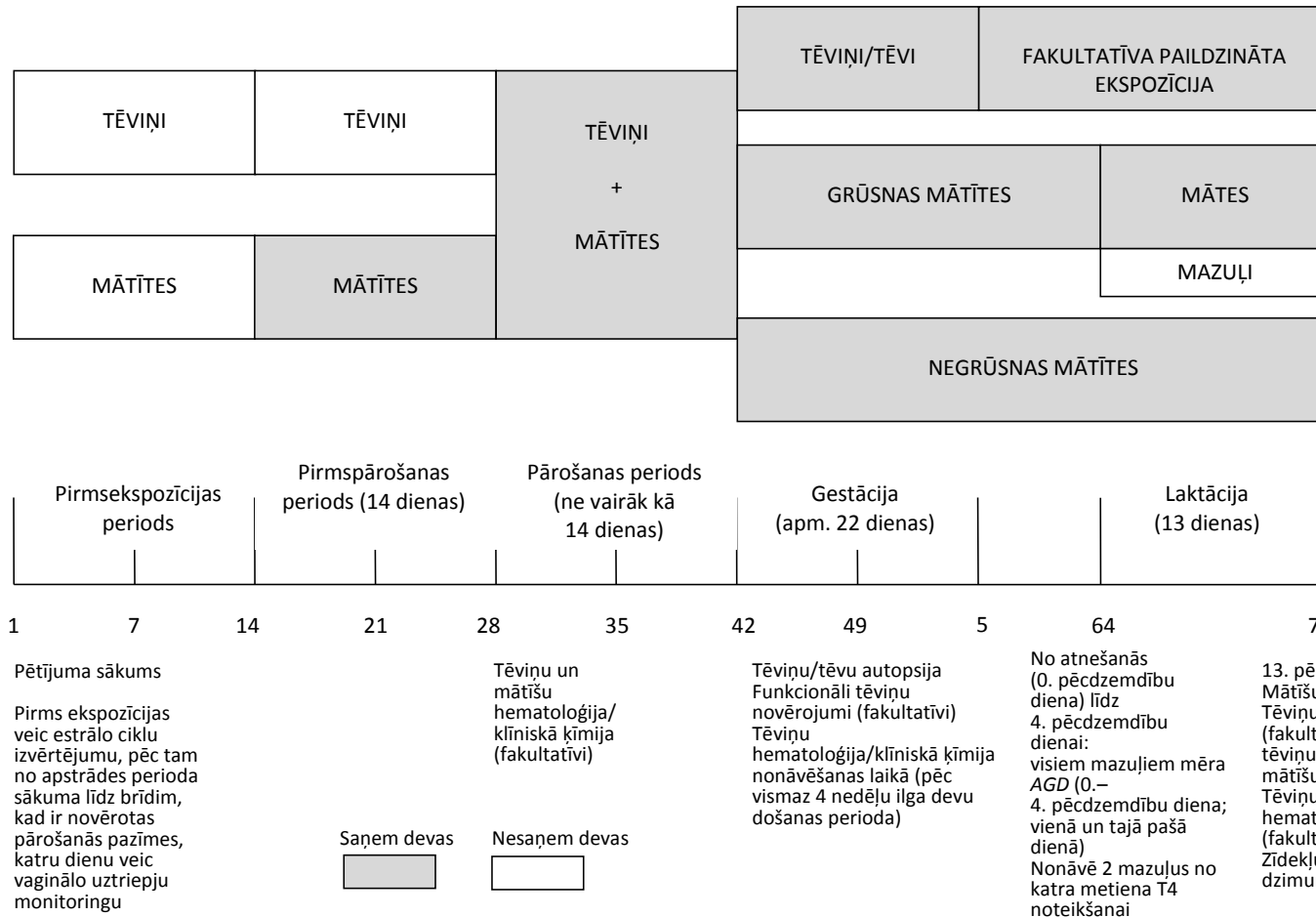
metodi.

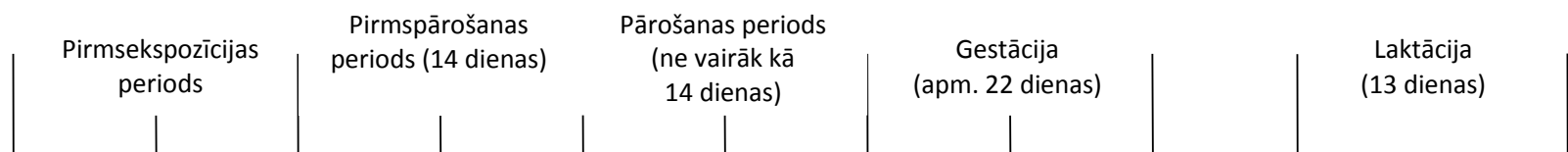
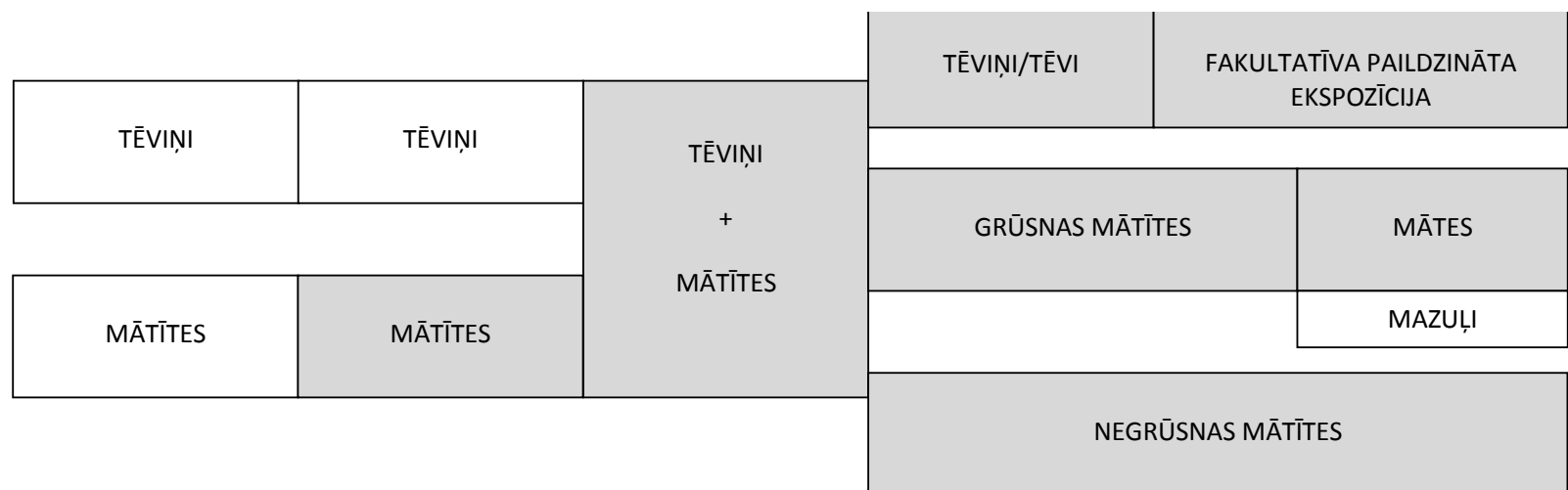
Tireoidāla iedarbība ir ķīmikālijas spēja zīdītāja organismā darboties kā dabiskam tiroīdhormonam (piemēram, T₃).

Validācija ir zinātnisks process, kura mērķis ir raksturot testēšanas metodes darbības prasības un ierobežojumus un apliecināt tās ticamību un piemērotību konkrētam nolūkam.

2. papildinājums

EKSPERIMENTA GRAFIKA SHĒMA, KURĀ NORĀDĪTS MAKSIMĀLAIS PĒTĪJUMA ILGUMS, KURA PAMATĀ IR 14 DIENU ILGS PĀROŠANAS PERIODS





1 7 14 21 28 35 42 49 5 64 77

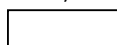
Pētījuma sākums

Pirms ekspozīcijas
veic estrālo ciklu
izvērtējumu, pēc tam
no apstrādes perioda
sākuma līdz brīdim,
kad ir novērotas
pārošanās pazīmes,
katru dienu veic
vaginālo uztriepju
monitoringu

Saņem devas



Nesaņem devas



Tēviņu un
mātišu
hematoloģija/
klīniskā ķīmija
(fakultatīvi)

Tēviņu/tēvu autopsija
Funkcionāli tēviņu
novērojumi (fakultatīvi)
Tēviņu
hematoloģija/klīniskā ķīmija
nonāvēšanas laikā (pēc
vismaz 4 nedēļu ilga devu
došanas perioda)

No atnešanās
(0. pēcdzemdību
diena) līdz
4. pēcdzemdību
dienai:
visiem mazuļiem mēra
AGD (0.–
4. pēcdzemdību diena;
vienā un tajā pašā
dienā)
Nonāvē 2 mazuļus no
katra metiena T4
noteikšanai

13. pēcatnešanās diena
Mātišu un mazuļu autopsija
Tēviņu/tēvu autopsija
(fakultatīvi) Funkcionāli
tēviņu (fakultatīvi) un
mātišu novērojumi
Tēviņu un mātišu
hematoloģija/klīniskā ķīmija
(fakultatīvi)
Zīdekļu retencija vīrišķā
dzimuma mazuļiem

3. papildinājums

TABULAS VEIDĀ SAGATAVOTS KOPSAVILKUMA ZIŅOJUMS PAR IETEKMI UZ REPRODUKCIJU/ONTOĢENĒZI

NOVĒROJUMI	VĒRTĪBAS				
Dozējums (vienības).....	0 (kontrolē)	...	...	...	...
Dzīvnieku pāri (N)					
Estrālais cikls (vismaz vidējais neregulāru ciklu ilgums un biežums)					
Mātītes, kam novērojamas kopulācijas pazīmes (N)					
Grūsnas mātītes (N)					
Apaugļošanās dienas 1–5 (N)					
Apaugļošanās dienas 6– . . . ⁽¹⁾ (N)					
Grūsnība ≤ 21 diena (N)					
Grūsnība = 22 dienas (N)					
Grūsnība ≥ 23 dienas (N)					
Mātes ar dzīvniekiem mazulim (N)					
Mātes ar dzīvniekiem mazulim 4. dienā pēc dzimībām (N)					
Implanti vienai mātei (vidēji)					
Dzīvnieki mazulim vienai mātei piedzimšanas brīdī (vidēji)					
Dzīvnieki mazulim vienai mātei 4. dienā (vidēji)					
Dzimumu attiecība (tēv./māt.) piedzimstot (vidēji)					
Dzimumu attiecība (tēv./māt.) 4. dienā (vidēji)					
Metiena masa piedzimstot (vidēji)					
Metiena masa 4. dienā (vidēji)					
Mazuļu masa piedzimstot (vidēji)					
Mazuļu masa <i>AGD</i> mērīšanas laikā (tēviņu vidējā masa, mātīšu vidējā masa)					
Mazuļu <i>AGD</i> tajā pašā postnatālajā dienā, laikā no dzimšanas līdz 4. dienai (tēviņu vidējā masa, mātīšu vidējā masa)					
Metiena masa 4. dienā (vidēji)					
Metiena masa 13. dienā (vidēji)					
Zīdēkļu retencija vīrišķā dzimuma mazulim 13. dienā (vidēji)					
MAZUĻI AR ANOMĀLIJĀM					

⁽¹⁾ pārošanas perioda pēdējā diena

Mātes, kam nav neviena šāda mazuļa					
Mātes ar 1 šādu mazuli					
Mātes ar ≥ 2 šādiem mazuļiem					
PĒCNĀCĒJU ZUDUMI					
Prenatāli (implantāciju skaits mīnus dzīvi dzimušo skaits)					
Mātītes, kas nav zaudējušas mazuli					
Mātītes ar vienu zaudētu mazuli					
Mātītes ar diviem zaudētiem mazuļiem					
Mātītes ar ≥ 3 zaudētiem mazuļiem					
Postnatāli (dzīvi dzimušo skaits mīnus 13. postnatālajā dienā dzīvo mazuļu skaits)					
Mātītes, kas nav zaudējušas mazuli					
Mātītes ar vienu zaudētu mazuli					
Mātītes ar diviem zaudētiem mazuļiem					
Mātītes ar ≥ 3 zaudētiem mazuļiem					

B.65. *IN VITRO* BARJERMEMBRĀNAS TESTA METODE ATTIECĪBĀ UZ ĀDAS KOROZIJU

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir ekvivalenta ESAO testēšanas vadlīnijai (*TG*) Nr. 435 (2015). Ādas korozija ir nepārejošs ādas bojājums, kas izpaužas kā tāda redzama nekroze visā epidermā, kura ietiecas dermā un radusies pēc tam, kad uz ādas aplicēta testējamā ķīmikālija atbilstoši definīcijai, kas dota Apvienoto Nāciju Organizācijas (ANO) Ķīmikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētajā sistēmā (*GHS*) (1) un Eiropas Savienības (ES) Regulā Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakojšanu (*CLP* regula)¹. Šī testēšanas metode, kas ir ekvivalenta atjauninātajai ESAO testēšanas vadlīnijai Nr. 435, nosaka *in vitro* barjermembrānas testa metodi, ko var izmantot kodīgu ķīmikāliju identificēšanai. Testēšanas metodē izmanto mākslīgu membrānu, kas izstrādāta tā, lai tā reaģētu uz kodīgām ķīmikālijām līdzīgā veidā kā dzīvnieku āda *in situ*.
2. Kodīgumu ādai parasti novērtē, aplicējot testējamo ķīmikāliju uz dzīvu dzīvnieku ādas un nosakot audu bojājumu pakāpi pēc noteikta laika (2). Papildus šai testēšanas metodei ir pieņemtas vairākas citas *in vitro* testēšanas metodes, kas ir alternatīvas (3)(4) *in vivo* standartprocedūrai ar truša ādu (šā pielikuma B.4. nodaļa, ekvivalenta ESAO *TG* Nr. 404), kuru izmanto kodīgu ķīmikāliju identificēšanai (2). ANO *GHS* secīgu pārbaužu un izvērtēšanas stratēģijā kodīguma ādai novērtēšanai un klasificēšanai un ESAO norādījumu dokumentā par integrētu testēšanas un novērtēšanas pieeju (*IATA*) attiecībā uz ādas kairinājumu/koroziju ieteikts izmantot validētas un pieņemtas *in vitro* testēšanas metodes, kas aprakstītas 3. un 4. modulī (1)(5). *IATA* apraksta vairākus modulus, kuros tiek grupēti informācijas avoti un analīzes rīki, un, pirmkārt, sniedz norādījumus par to, kā, novērtējot ķīmikāliju potenciālu radīt ādas kairinājumu un ādas koroziju, integrēt un izmantot jau esošos testēšanā un citādi iegūtos datus, un, otrkārt, ierosina pieeju, ko izmantot, ja vajadzīga turpmāka testēšana, tostarp gadījumos, kad ir iegūti negatīvi rezultāti (5). Atbilstoši šai modulārajai pieejai pozitīvos rezultātus, kas iegūti, īstenojot *in vitro* testēšanas metodi, var izmantot ķīmikāliju klasificēšanai par kodīgām vielām bez nepieciešamības veikt testus ar dzīvniekiem, tādējādi samazinot un pilnveidojot dzīvnieku

¹ Eiropas Parlamenta un Padomes 2008. gada 16. decembra Regula (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakojšanu un ar ko groza un atceļ Direktīvas 67/548/EEK un 1999/45/EK un groza Regulu (EK) Nr. 1907/2006 (OV L 353/1, 31.12.2008.).

izmantošanu un novēršot sāpēs un diskomfortu, ko dzīvniekiem var radīt to izmantošana minētajam mērķim.

3. *In vitro* barjermembrānas modeļa, kas komerciāli pieejams ar nosaukumu *Corrositex*®, validācijas pētījumi ir pabeigti (6)(7)(8), un tie liecina, ka šā modeļa vispārējā pareizība ādas korozijas paredzēšanā ir 79 % (128/163), jutība — 85 % (76/89) un specifiskums — 70 % (52/74), izmantojot 163 vielu un maisījumu datubāzi (7). Šo validēto referencmetodi (VRM), pamatojoties uz tās atzīto derīgumu, ieteicams izmantot par daļu no secīgu pārbaužu stratēģijas ķīmikāliju ādas korozijas briesmu potenciāla novērtēšanai (5)(7). Pirms attiecībā uz ādas koroziju iespējams regulatīvām vajadzībām izmantot kādu *in vitro* barjermembrānas modeli, saskaņā ar iepriekš noteiktiem veikspējas standartiem (VS) (10) būtu jānosaka tā ticamība, relevantums (pareizība) un piedāvātā lietojuma ierobežojumi, lai būtu drošība par tā līdzību VRM (9). ESAO datu savstarpējā atzīšana (*Mutual acceptance of data*) būs garantēta tikai tad, kad jebkāda jauna ierosināta vai atjaunināta VS atbilstoša metode būs izskatīta un iekļauta ekvivalentajā ESAO testēšanas vadlīnijā. Patlaban tikai viena *in vitro* metode ir iekļauta ESAO testēšanas vadlīnijā Nr. 435 un šajā testēšanas metodē, proti, komerciāli pieejamais *Corrositex*® modelis.
4. Citās testēšanas metodēs kodīguma ādai testēšanai izmanto rekonstruētu cilvēka ādu (ESAO TG Nr. 431) (3) un izolētu žurkas ādu (ESAO TG Nr. 430) (4). Šī testēšanas vadlīnija paredz arī kodīgo ķīmikāliju iedalīšanu trīs ANO GHS kodīguma apakškategorijs un trīs ANO transportēšanas iepakojuma grupās attiecībā uz kodīguma risku. Šī testēšanas vadlīnija sākotnēji pieņemta 2006. gadā un 2015. gadā atjaunināta, lai ietvertu atsauci uz IATA norādījumu dokumentu un atjauninātu standartvielu sarakstu.

DEFINĪCIJAS

5. Izmantotās definīcijas sniegtas papildinājumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI

6. Šajā testēšanas metodē aprakstītais tests dod iespēju identificēt kodīgas testējamās ķīmikālijas un ļauj kodīgas testējamās ķīmikālijas iedalīt apakškategorijs saskaņā ar ANO GHS/CLP (1. tabula). Turklāt šādu testēšanas metodi var izmantot, lai konkrētām transportēšanas testu vajadzībām pieņemtu lēmumus par konkrētu ķīmikāliju klašu, piemēram, organisku un neorganisku skābju, skābju atvasinājumu¹ un bāzu, kodīgumu vai

¹ “Skābes atvasinājums” ir nespecifiskas klases apzīmējums, un to plaši definē kā skābi, kas iegūta no ķīmikālijas vai nu tiešā veidā, vai ar modificēšanu vai daļēju aizstāšanu. Šajā klasē ietilpst anhidrīdi, halogēnskābes, sāļi un citi ķīmikāliju veidi.

nekodīgumu (7)(11)(12). Šajā testēšanas metodē aprakstīta vispārēja procedūra, kas ir līdzīga validētajai testēšanas referencmetodei (7). Šī testēšanas metode gan pietiekami neinformē par ādas kairinājumu, taču jānorāda, ka tādai ietekmei uz veselību kā ādas kairinājums *in vitro* īpaši pievēršas TM B.46., kas ir ekvivalenta ESAO TG Nr. 439 (13). Attiecībā uz to, kā pilnīgi izvērtēt lokālo ietekmi uz ādu pēc vienreizējas dermālas ekspozīcijas, jāizmanto ESAO norādījumu dokuments par integrētajām testēšanas un novērtēšanas pieejām (5).

1. tabula. ANO GHS kategorija “Kodīgs ādai” un tās apakškategorijas (1)

Kodīguma kategorija (1. kategorija) (iestādēm, kas neizmanto apakškategorijas)	Iespējamās kodīguma apakškategorijas ¹ (iestādēm, kas izmanto apakškategorijas, tostarp CLP regulu)	Kodīgs ≥ 1 no 3 dzīvniekiem	
		Ekspozīcija	Novērošana
Kodīgs	Kodīguma apakškategorija 1A	≤ 3 minūtes	≤ 1 stunda
	Kodīguma apakškategorija 1B	> 3 minūtes / ≤ 1 stunda	≤ 14 dienas
	Kodīguma apakškategorija 1C	> 1 stunda / ≤ 4 stundas	≤ 14 dienas

7. Validētās referencmetodes (7) ierobežojums ir tāds, ka daudzas nekodīgas ķīmikālijas un dažas kodīgas ķīmikālijas, pamatojoties uz sākotnējā saderības testa rezultātiem (sk. 13. punktu), var netikt atzītas par derīgām testēšanai. Ķīmikālijas uz ūdens bāzes, kuru pH ir diapazonā no 4,5 līdz 8,5, bieži vien nav derīgas testēšanai; tomēr 85 % no testētajām ķīmikālijām, kuru pH ir minētajā diapazonā, nebija kodīgas testos ar dzīvniekiem (7). *In vitro* barjermembrānas metodi var izmantot, lai testētu cietvielas (ūdenī šķīstošas vai nešķīstošas), šķidrumus (ūdens vai neūdens) un emulsijas. Tomēr ar barjermembrānas metodi nevar testēt tādas testējamās ķīmikālijas, kas neizraisa detektējamās izmaiņas saderības testā (piemēram, krāsas maiņu validētās testēšanas referencmetodes ķīmikāliju detektēšanas sistēmā (CDS)); tās jātestē, izmantojot citas testēšanas metodes.

TESTA PRINCIPS

8. Testēšanas sistēmai ir divi komponenti: sintētiska makromolekulāra biobarjera un ķīmikāliju detektēšanas sistēma (CDS); ar šo testēšanas metodi, izmantojot CDS, nosaka

¹ Eiropas Savienībā CLP regula nosaka trīs kodīguma ādai apakškategorijas 1A, 1B un 1C.

barjermembrānas bojājumus, kas rodas pēc kodīgas testējamās ķīmikālijas aplicēšanas uz sintētiskas makromolekulāras barjermembrānas (7) un ko izraisa, domājams, tie paši korozijas mehānismi, kuri iedarbojas uz dzīvu ādu.

9. Barjermembrānas penetrāciju (jeb ķīmikālijas izlaušanos cauri tai) var mērīt, izmantojot vairākas procedūras vai *CDS*; to var mērīt arī pēc pH indikatorkrāsvielas krāsas izmaiņām vai kādu citu zem barjeras esoša indikatoršķīduma īpašību izmaiņām.
10. Jānosaka, vai barjermembrāna ir derīga, t. i., atbilstīga un uzticama, paredzētajam lietojumam. Šajā sakarā ir jāpārlicinās, ka dažādi preparāti nodrošina barjeras īpašības, piemēram, tie spēj saglabāt barjeru pret nekodīgām ķīmikālijām, un tie dod iespēju ķīmikāliju kodīgās īpašības iedalīt dažādajās ANO *GHS* kodīguma apakškategorijs (1). Piešķirtā klasifikācija pamatojas uz laiku, kādā ķīmikālija caur barjermembrānu nokļūst līdz indikatoršķīdumam.

KOMPETENCES PIERĀDĪŠANA

11. Pirms šai testēšanas metodei atbilstošo *in vitro* barjermembrānas metodi sākt izmantot regulāri, laboratorijām jāpierāda tehniskā kompetence, pareizi saklasificējot 2. tabulā ieteiktās 12 standartvielas. Gadījumos, kur kāda sarakstā norādīta viela nav pieejama vai kur tas attaisnojami, var izmantot citu vielu, par kuru pieejami pietiekami *in vivo* un *in vitro* references dati (piem., vielu no references ķīmikāliju saraksta (10)), ja vien tiek izmantoti tie paši 1. tabulā aprakstītie izraudzīšanās kritēriji.

2. tabula. Standartvielas¹

Vielas ²	CAS Nr.	Ķīmikāliju klase	<i>In Vivo</i> ANO <i>GHS</i> apakš kategorija ³	<i>In Vitro</i> ANO <i>GHS</i> apakš kategorija ³
Bora trifluorīddihidrāts	13319-75-0	Neorganiskas skābes	1A	1A
Slāpekļskābe	7697-37-2	Neorganiskas skābes	1A	1A
Fosfora pentahlorīds	10026-13-8	Neorganisko skābju prekursori	1A	1A
Valerilhlorīds	638-29-9	Skābju hlorīdi	1B	1B
Nātrija hidroksīds	1310-73-2	Neorganiskas bāzes	1B	1B
1-(2-aminoetil) piperazīns	140-31-8	Alifātiskie amīni	1B	1B
Benzolsulfonilhlorīds	98-09-9	Skābju hlorīdi	1C	1C
<i>N, N</i> -dimetilbenzilamīns	103-83-3	Anilīni	1C	1C

Tetraetilēnpentamīns	112-57-2	Alifātiskie amīni	1C	1C
Eigenols	97-53-0	Fenoli	NK	NK
Nonilakrilāts	2664-55-3	Akrilāti/metakrilāti	NK	NK
Nātrija bikarbonāts	144-55-8	Neorganiski sāļi	NK	NK

¹Iepriekš sarakstā norādītās divpadsmit vielas ietver trīs vielas no katras no trim ANO *GHS* kodīgo vielu apakškategoriām un trīs nekodīgas vielas, tās ir viegli pieejamas no komerciāliem piegādātājiem un ANO *GHS* apakškatēgorija ir balstīta uz rezultātiem, kas iegūti, veicot kvalitatīvu testēšanu *in vivo*. Šīs vielas izvēlētas no saraksta ar 40 standartvielām, kas iekļautas to ķīmikāliju minimālajā sarakstā, kuras norādītas tādu testēšanas metožu pareizības un ticamības pierādīšanai, kuras ir strukturāli un funkcionāli līdzīgas validētajai testēšanas referencmetodei, un kas atlasītas no 163 standartvielām, ko sākotnēji izmantoja testēšanas referencmetodes (*Corrositex*®) validēšanai (7) (10) (14). Minētās atlases mērķis bija, ciktāl iespējams, iekļaut ķīmikālijas, kas: ir reprezentatīvas attiecībā uz tādu kodīguma atbildreakciju diapazonu (piem., nekodīgas; ANO iepakojuma grupu I, II un III kodīgas vielas), ko iespējams mērit vai paredzēt ar validēto testēšanas referencmetodi; ir reprezentatīvas attiecībā uz validācijas procesos izmantotajām ķīmikāliju klasēm; ir ar labi definētu ķīmisku struktūru; ar validēto testēšanas referencmetodi inducē reproducējamus rezultātus; *in vivo* referencēstā inducē skaidrus rezultātus; ir komerciāli pieejamas un ar tām nesaistās augstas likvidēšanas izmaksas (14).

² Vielās, kas testētas tīrā veidā vai ar tīrību $\geq 90\%$.

³ ANO *GHS* apakškatēgoriju 1A, 1B un 1C attiecīgās ANO iepakojuma grupas ir I, II un III. NK — nekodīgs.

PROCEDŪRA

12. Turpmākajos punktos aprakstīti kodīguma novērtēšanai paredzētās uz pašreizējo VRM, proti, komerciāli pieejamo *Corrositex*®, balstītās mākslīgas barjermembrānas testa metodes (7)(15) komponenti un procedūras. Barjermembrānu un saderības šķīdumus vai indikatoršķīdumus, kā arī šķīdumus, ko izmanto ķīmikāliju kategorizēšanai, var izstrādāt, sagatavot vai iegūt tirdzniecībā, piemēram, VRM *Corrositex*® gadījumā. Validētajai testēšanas referencmetodei ir pieejams parauga testēšanas metodes protokols (7). Testēšana jāveic apkārtējās vides temperatūrā (17–25 °C), un komponentiem jāatbilst šādiem nosacījumiem.

Testējamās ķīmikālijas saderības tests

13. Pirms barjermembrānas testa veikšanas veic saderības testu, lai noteiktu, vai testējamā ķīmikālija ir detektējama ar *CDS*. Ja testējamo ķīmikāliju ar *CDS* nevar detektēt, barjermembrānas testa metode nav piemērota konkrētās testējamās ķīmikālijas iespējamā kodīguma izvērtēšanai un jāizmanto cita testēšanas metode. Saderības testā izmantotajai *CDS* un ekspozīcijas nosacījumiem jāatpoguļo ekspozīcija turpmākajā barjermembrānas testā.

Testējamās ķīmikālijas laika skalas kategorijas tests

14. Ja testēšanas metode to ļauj, testējamai ķīmikālijai, kas ir kvalificēta ar saderības testu, jāveic laika skalas kategorijas tests, proti, skrīninga tests, ko izmanto, lai nošķirtu vājas un

stipras skābes vai bāzes. Piemēram, validētajā testēšanas referencmetodē laika skalas kategorizēšanas testu izmanto, lai atkarībā no tā, vai ir detektēta būtiska skābju vai sārmu rezerve, noteiktu, kura no divām laika skalām būtu jāizmanto. Kodīguma un ANO *GHS* kodīguma ādai apakš kategorijas noteikšanai būtu jāizmanto divas atšķirīgas izlaušanās laika skalas atkarībā no testējamās ķīmikālijas skābju vai sārmu rezerves.

BARJERMEMBRĀNAS TESTA METODES KOMPONENTI

Barjermembrāna

15. Barjermembrāna sastāv no diviem komponentiem: makromolekulāra ūdens proteīngela un caurlaidīgas pamatmembrānas. Proteīngelam jābūt šķidrumu un cietvielas necaurlaidīgam, taču tas var korodēties un kļūt caurlaidīgs. Gatavā barjermembrāna jāuzglabā iepriekš noteiktos apstākļos, kas novērš gela bojāšanos, piemēram, izžūšanu, mikrobu augšanu, tā nobīdi un plaisāšanu, kas varētu pasliktināt tā funkciju. Jānosaka pieļaujamais glabāšanas termiņš un barjermembrānas preparāti, ko pēc minētā termiņa neizmanto.
16. Caurlaidīgā pamatmembrāna nodrošina mehānisku balstu proteīngelam sarecēšanas procesā un eksponētību testējamajai ķīmikālijai. Pamatmembrānai jānovērš gela noslīdēšana vai nobīde, un tai viegli jālaiž cauri visas testējamās ķīmikālijas.
17. Proteīngels, kas sastāv no proteīna, piemēram, keratīna, kolagēna vai proteīnu maisījumiem, kuri veido gela matrici, kalpo par testējamās ķīmikālijas mērķi. Proteīnmateriālu novieto uz pamatmembrānas virsmas, un pirms barjermembrānas novietošanas uz indikatoršķīduma tam ļauj sarecēt. Proteīngelam jābūt viscaur vienādi biežam un blīvam un bez gaisa burbuļiem vai defektiem, kas varētu ietekmēt tā funkcionālo integritāti.

Ķīmikāliju detektēšanas sistēma (CDS)

18. Indikatoršķīdumam, kas ir tas pats šķīdums, ko izmanto saderības testā, būtu jāreaģē uz testējamās ķīmikālijas klātbūtni. Jāizmanto pH indikatorkrāsviela vai krāsvielu kombinācija, piemēram, krezolsarkana un metiloranžais, kas, reaģējot uz testējamās ķīmikālijas klātbūtni, maina savu krāsu. Mērīšanas sistēma var būt vizuāla vai elektroniska.
19. Lai noteiktu detektējamo ķīmikāliju klāstu un detektēšanas kvantitatīvos ierobežojumus, jānovērtē, cik relevantas un ticamas ir detektēšanas sistēmas, kas izstrādātas, lai detektētu testējamās ķīmikālijas iziešanu caur barjermembrānu.

TESTA NORISE

Testēšanas metodes komponentu montāža

20. Barjermembrānu ievieto ar indikatoršķīdumu pildītā mēģenē (vai caurulē) tā, lai pamatmembrāna pilnībā saskartos ar indikatoršķīdumu un nerastos gaisa burbuļi. Jāraugās, lai tiktu saglabāta barjeras integritāte.

Testējamās ķīmikālijas aplicēšana

21. Testējamo ķīmikāliju pietiekamā daudzumā, piemēram, 500 µl šķidruma vai 500 mg smalki saberzta pulverveida cietvielas veidā (7), rūpīgi uzklāj uz barjermembrānas augšējās virsmas un vienmērīgi izklaidē. Katrai testējamajai ķīmikālijai un to atbilstošajām kontrolēm (sk. 23.–25. punktu) sagatavo pietiekamu skaitu replikātu, piemēram, četrus (7). Reģistrē laiku, kad testējamā ķīmikālija aplicēta uz barjermembrānas. Lai nodrošinātu, ka tiek precīzi reģistrēti īsi korozijas laiki, testējamās vielas replikātu mēģenēs aplicē dažādos laikos.

Barjermembrānas penetrācijas mērījumi

22. Katru mēģeni pienācīgi uzrauga, un reģistrē laiku, kad notikušas pirmās izmaiņas indikatoršķīdumā, t. i., barjeras penetrācija, un nosaka laika intervālu no aplicēšanas līdz barjermembrānas penetrācijai.

Kontroles

23. Testos, kuros testējamo ķīmikāliju izmanto kopā ar nesēju vai šķīdinātāju, nesējam vai šķīdinātājam jābūt saderīgam ar barjermembrānas sistēmu, proti, tam nevajadzētu izjaukt barjermembrānas sistēmas integritāti un mainīt testējamās ķīmikālijas kodīgumu. Attiecīgā gadījumā, lai noteiktu šķīdinātāja saderību ar barjermembrānas sistēmu, vienlaikus ar testējamo ķīmikāliju jātestē šķīdinātāja (vai nesēja) kontrole.
24. Lai novērtētu, vai testēšanas sistēma darbojas pieņemami, vienlaikus ar testējamo ķīmikāliju jātestē arī pozitīva (kodīga) kontrole ar vidēju kodīguma aktivitāti, piemēram, 110 ± 15 mg nātrija hidroksīda (ANO *GHS* 1.B kodīguma apakškategorija) (7). Lai izvērtētu kodīgas testējamās ķīmikālijas relatīvo kodīguma potenciālu, var būt lietderīgi izmantot otru pozitīvo kontroli, kas pieder pie tās pašas ķīmikāliju klases kā testējamā ķīmikālija. Jāizvēlas vidēji kodīga pozitīvā kontrole vai kontroles (piemēram, ANO *GHS* 1.B apakškategorija), lai detektētu izmaiņas penetrēšanās laikā, kas var būt nepieņemami ilgāks vai īsāks par noteikto atsauces vērtību un tādējādi norādīt uz to, ka testēšanas sistēma nedarbojas pareizi. Ārkārtīgi kodīgas (ANO *GHS* 1.A apakškategorija) vai nekodīgas ķīmikālijas šim nolūkam nav sevišķi lietderīgas. ANO *GHS* 1.B apakškategorijas ķīmikālija ļautu detektēt pārāk garu vai īsu izlaušanās laiku. Lai noteiktu testēšanas metodes spēju konsekventi atšķirt vāji kodīgas un nekodīgas ķīmikālijas, par pozitīvo kontroli var izmantot vāji kodīgu ķīmikāliju (ANO *GHS* 1.C apakškategorija). Neatkarīgi no izmantotās pieejas jānosaka pieņemams pozitīvās kontroles atbildreakciju intervāls, kas balstīts uz izmantotās pozitīvās kontroles vai kontroļu izlaušanās laiku vēsturisko intervālu, piemēram, vidējās standartnovirzes $\pm 2-3$. Lai varētu detektēt novirzes

ārpus pieņemamā intervāla, katrā pētījumā jānosaka precīzs pozitīvās kontroles izlaušanās laiks.

25. Vienlaikus ar testējamo ķīmikāliju jātestē arī negatīva (nekodīga) kontrole, piemēram, 10 % citronskābe, 6 % propionskābe (7), kas ir vēl viens kvalitātes kontroles līdzeklis, ar ko pierādīt barjeramembrānas funkcionālo integritāti.

Pētījuma pieņemamības kritēriji

26. Testējamās ķīmikālijas kodīguma prognozēšanai izmanto laiku (minūtēs), kas pagājis no testējamās ķīmikālijas aplicēšanas uz barjeramembrānas līdz barjeras penetrācijai, atbilstīgi katrai ANO *GHS* kodīguma apakš kategorijai noteiktajiem laika parametriem. Lai pētījumu uzskatītu par pieņemamu, paralēlajai pozitīvajai kontrolei jāuzrāda sagaidāmais penetrēšanās atbildreakcijas laiks (piemēram, 8–16 minūtes ilgs izlaušanās laiks, ja par pozitīvo kontroli izmanto nātrija hidroksīdu), paralēlā negatīvā kontrole nedrīkst būt kodīga un paralēlā šķīdinātāja kontrole, ja tāda ir iekļauta, nedrīkst būt kodīga un tā nedrīkst mainīt testējamās ķīmikālijas kodīguma potenciālu. Pirms šai testēšanas metodei atbilstošo metodi sākt izmantot regulāri, laboratorijām jāpierāda tehniskā kompetence, izmantojot 2. tabulā ieteiktās 12 vielas. Attiecībā uz jaunām atdarinājuma metodēm, kas izstrādātas saskaņā ar šo testēšanas metodi un ir strukturāli un funkcionāli līdzīgas validētajai referenc metodei (14), pirms jaunās metodes izmantošanas regulatīviem mērķiem ir jāpierāda tās ticamība un pareizība, šim nolūkam izmantojot iepriekš noteiktus veiktspējas standartus (10).

Rezultātu interpretēšana un testējamo ķīmikāliju kodīguma klasifikācija

27. Testējamo ķīmikāliju ANO *GHS* kodīguma apakš kategorijās (1) un attiecīgā gadījumā ANO iekopojuma grupā (16) klasificē atbilstoši laikam (minūtēs), kas pagājis no testējamās ķīmikālijas aplicēšanas barjeramembrānai līdz barjeras penetrācijai. Katrai piedāvātajai testēšanas metodei nosaka laika sliekšņvērtības katrā no trim kodīguma apakš kategorijām. Pieņemot galīgos lēmumus par laika sliekšņvērtībām, jāņem vērā nepieciešamība līdz minimumam samazināt korozijas briesmu pārrāk zemas klasifikācijas (t. i., šķietami negatīvu rezultātu) skaitu. Pašreizējā testēšanās vadlīnijā jāizmanto metodes *Corrositex*® laika sliekšņvērtības, kas norādītās 3. tabulā, jo tā patlaban ir vienīgā testēšanas vadlīnijā ietvertā testēšanas metode (7).

3. tabula. *Corrositex*® prognozes modelis

Vidējais izlaušanās laiks (minūtēs)		ANO <i>GHS</i> prognoze ³
1. kategorijas testējamās ķīmikālijas ¹ (nosaka ar metodē paredzēto kategorizēšanas testu)	1. kategorijas testējamās ķīmikālijas ² (nosaka ar metodē paredzēto kategorizēšanas testu)	

0–3 min	0–3 min	Kodīgs fakultatīvā 1.A apakš kategorija
> 3 līdz 60 min	> 3 līdz 30 min	Kodīgs fakultatīvā 1.B apakš kategorija
> 60 līdz 240 min	> 30 līdz 60 min	Kodīgs fakultatīvā 1.C apakš kategorija
> 240 min	> 60 min	Nekodīgs

¹ Testējamās ķīmikālijas ar lielu skābju/sārmu rezervi (6).

² Testējamās ķīmikālijas ar mazu skābju/sārmu rezervi (6).

³ ANO *GHS* 1.A, 1.B un 1.C apakš kategorija atbilst attiecīgi ANO I, II un III iepakojuma grupai.

DATI UN PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

Dati

28. Laiks (minūtēs), kas pagājis no testējamās ķīmikālijas un pozitīvās kontroles vai kontroļu aplicēšanas līdz barjeras penetrācijai, jānorāda tabulā katram replikātam atsevišķi, kā arī jānorāda katra izmēģinājuma vidējā $\pm$ standartnovirze.

Testēšanas pārskats

29. Testēšanas pārskatā norāda šādu informāciju.

Testējamā ķīmikālija un kontroles vielas:

- vienkomponeņa viela: ķīmiskā identifikācija, piemēram, *IUPAC* vai *CAS* nosaukums, *CAS* numurs, *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula, tīrība, attiecīgā gadījumā un ja praktiski iespējams — piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. c.;
- daudzkomponentu viela, *UVCB* un maisījums: iespējami izsmēļoši raksturoti pēc komponentu ķīmiskās identitātes (sk. iepriekš), kvantitatīvās sastopamības un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām;
- izskats, šķīdība ūdenī un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības;
- avots, sērijas numurs, ja zināms;
- testējamās ķīmikālijas / kontrolvielas pirmstestēšanas apstrāde (piem., sildīšana, sasmalcināšana), ja tāda veikta;
- testējamās ķīmikālijas stabilitāte, izmantošanas termiņš vai atkārtotas analīzes datums, ja tas zināms;

- glabāšanas apstākļi.

Nesējs:

- identifikācija, koncentrācija (attiecīgā gadījumā), izmantotais tilpums;
- nesēja izraudzīšanās pamatojums.

Izmantotais in vitro barjermembrānas modelis un protokols, arī pierādīta pareizība un ticamība

Testēšanas nosacījumi:

- izmantoto iekārtu un sagatavošanas procedūru apraksts;
- izmantotās *in vitro* barjermembrānas izcelsme un sastāvs;
- indikatoršķīduma sastāvs un īpašības;
- detektēšanas metode;
- testējamās ķīmikālijas un kontroles vielas daudzumi;
- replikātu skaits;
- laika skalas kategorijas testa apraksts un pamatojums;
- aplicēšanas metode;
- novērojumu laiki;
- izmantoto izvērtēšanas un klasificēšanas kritēriju apraksts;
- apliecināta kompetence testēšanas metodes veikšanā, kura pirms attiecīgās testēšanas metodes regulāras izmantošanas pierādīta, veicot standartķīmikāliju testēšanu.

Rezultāti:

- tabulā apkopoti individuāli jēldati, kas iegūti no katra replikāta individuāliem testa un kontroles paraugiem;
- citas novērotās ietekmes apraksts;
- atvasinātā klasifikācija ar norādi uz izmantoto prognozes modeli un/vai lēmuma pieņemšanas kritēriju.

Rezultātu iztirzājums

Secinājumi

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. Available at: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.
- (2) Šā pielikuma B.4. nodaļa “Akūts ādas kairinājums/korozija”.
- (3) Šā pielikuma B.40a nodaļa “Ādas korozija *in vitro*: rekonstruētas cilvēka epidermas *RHE* tests”.
- (4) Šā pielikuma B.40. nodaļa “Ādas korozija *in vitro*: transkutānā elektriskā pretestība (TEP).
- (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. Available at: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/PerfStand-TG430-June14.pdf>.

- (11) ECVAM (2001). Statement on the Application of the CORROSITEX® Assay for Skin Corrosivity Testing. 15th Meeting of ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC), Ispira, 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) Chapter B.46 of this Annex, *In Vitro* Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method. ICCVAM (2004). ICCVAM Recommended Performance Standards for *In Vitro* Test Methods for Skin Corrosion. NIEHS, NIH Publication No 04-4510. Available at: http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/dermal_docs/ps/ps044510.pdf.
- (14) U.S. EPA (1996). Method 1120, Dermal Corrosion. Available at: <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. Available at: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/unrec/rev18/English/Rev18_Volume1_Part2.pdf.

Papildinājums

DEFINĪCIJAS

Pareizība: pakāpe, kādā testēšanas metodes rezultāti sakrīt ar pieņemtajām atsaucēs vērtībām. Tas ir testēšanas metodes veikspējas mērs un viens no relevantuma aspektiem. Šo terminu bieži izmanto tādā pat nozīmē kā terminu “konkordantums”, ar to saprotot testēšanas metodes pareizo iznākumu īpatsvaru (9).

Ķimikālija: viela vai maisījums.

Ķimikāliju detektēšanas sistēma (CDS): vizuāla vai elektroniska mērīšanas sistēma, kurā izmanto indikatoršķīdumu, kas reaģē uz testējamās ķimikālijas klātbūtni, piemēram, ar izmaiņām pH indikatorkrāsvielā vai krāsvielu kombinācijā, kam, reaģējot uz testējamās ķimikālijas klātbūtni, mainīsies krāsa, vai ar cita veida ķīmiskām vai elektroķīmiskām reakcijām.

Konkordantums: tādas testēšanas metodes veikspējas mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un viens no relevantuma aspektiem. Šo terminu bieži izmanto tādā pat nozīmē kā terminu “pareizība”, ar to saprotot visu to testēto ķimikāliju īpatsvaru, kas pareizi klasificētas kā pozitīvas vai negatīvas. Konkordantums lielā mērā ir atkarīgs no to pozitīvo rezultātu prevalences, kādi iegūti attiecībā uz pētāmajiem testējamo ķimikāliju veidiem (9).

GHS (Ķimikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētā sistēma): sistēma, kurā ķimikālijas (vielas un maisījumus) klasificē pēc standartizētiem fizisko apdraudējumu, veselības apdraudējumu un vidisko apdraudējumu tipiem un līmeņiem un izmanto tādas attiecīgus komunikācijas elementus kā piktogrammas, signālvārdi, bīstamības apzīmējumi, drošības prasību apzīmējumi un drošības datu lapas, lai sniegtu informāciju par ķimikāliju nelabvēlīgo ietekmi un tādējādi aizsargātu cilvēkus (arī darba devējus un darba ņēmējus, transporta darbiniekus, patērētājus un avārijas dienestu darbiniekus) un vidi (1).

ATA: integrētā testēšanas un novērtēšanas pieeja.

Maisījums: maisījums vai šķīdums, kas sastāv no divām vai vairākām vielām.

Vienkomponenta viela: tāda pēc kvantitatīvā sastāva definēta viela, kurā vismaz 80 % (masa/masa) veido viena galvenā sastāvdaļa.

Daudzkomponentu viela: tāda pēc kvantitatīvā sastāva definēta viela, kurā vairāk nekā viena no galvenajām sastāvdaļām ir koncentrācijā $\geq 10\%$ (masa/masa) un $< 80\%$ (masa/masa). Daudzkomponentu vielas tiek iegūtas ražošanas procesā. Atšķirība starp maisījumu un daudzkomponentu vielu ir tāda, ka maisījumu iegūst, divas vai vairākas vielas sajaucot bez ķīmiskas reakcijas. Daudzkomponentu viela rodas ķīmiskā reakcijā.

NK: nekodīgs.

Veikspējas standarti: uz validētu testēšanas metodi bāzēti standarti, pēc kuriem izvērtē pēc noteikšanas mehānisma vai funkcionalitātes ziņā līdzīgu testēšanas metožu

salīdzināmību. Tajos ietilpst i) nepieciešamie testēšanas metodes komponenti; ii) minimāls tādu references ķīmikāliju saraksts, kuras izraudzītas no citām ķīmikālijām, ko izmanto, lai pierādītu pieņemamu validētās testēšanas metodes veikspēju; kā arī iii), uz attiecīgajā validētajā testēšanas metodē iegūto rezultātu pamata — tādi paši pareizības un ticamības līmeņi, kā būtu jāiegūst ar novērtējamo testēšanas metodi, to izvērtējot ar references vielām no minimālā saraksta (9).

Relevantums: parametrs, kas raksturo testēšanas metodes un interesējošās ietekmes sakarību un to, vai testu lietot konkrētam nolūkam ir jēgpilni un noderīgi. Pakāpe, kādā ar testu var pareizi izmērīt vai prognozēt interesējošo bioloģisko ietekmi. Relevantums ietver arī testēšanas metodes pareizības (konkordantuma) aspektu (9).

Ticamība: parametrs, kas izsaka, kādā pakāpē, izmantojot vienu un to pašu protokolu, kādu testēšanas metodi vienā un tajā pašā laboratorijā vai dažādās laboratorijās ilgākā laika nogrieznī var izmantot reproducējami. To novērtē, aprēķinot iekšlaboratorisko un starplaboratorisko reproducējamību (9).

Jūtība: tas, cik liela daļa visu pozitīvo/aktīvo ķīmikāliju ar šo testēšanas metodi tiek pareizi kvalificētas. Tas ir tādas testēšanas metodes pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testēšanas metodes relevantuma izvērtēšanā (9).

Ādas korozijs *in vivo*: neatgriezenisku ādas bojājumu rašanās; proti, redzama nekroze, kas caur epidermu skar zemādu un rodas, testējamo ķīmikāliju aplicējot uz ādas uz laiku līdz četrām stundām. Tipiskas reakcijas uz kodīgumu ir čūlas, asiņošana, asiņainas kreveles un 14 dienu novērošanas perioda beigās — ādas izbalējuma radīta atkrāsošanās, ādas laukumi, kur izkritis apmatojums, un rētas. Neskaidros gadījumos bojājums jānovērtē histopatoloģiski.

Specifiskums: tas, cik liela daļa no visām negatīvajām/neaktīvajām ķīmikālijām ar testēšanas metodi tiek klasificētas pareizi. Tādas testēšanas metodes pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testēšanas metodes relevantuma izvērtēšanā (9).

Viela: ķīmiskais elements un tā dabiski radušies vai ražošanas procesā iegūti savienojumi, ieskaitot to stabilizācijai nepieciešamās piedevas, kā arī izmantotajos procesos radušos piejaukumus, bet izņemot šķīdinātājus, kurus var atdalīt, neietekmējot vielas stabilitāti un nemainot tās sastāvu.

Testējamā ķīmikālija: jebkura viela vai maisījums, kuru testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

UVCB: vielas, kuru sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kompleksi reakcijas produkti vai bioloģiski materiāli.

B.66 STABILI TRANSFICĒTAS TRANSAKTIVĀCIJAS *IN VITRO* TESTI, AR KO KONSTATĒ ESTROGĒNU RECEPTORU AGONISTUS UN ANTAGONISTUS

VISPĀRĪGS IEVADS

ESAO rezultātbalstītas testēšanas vadlīnijas

1. Šī testēšanas metode ir ekvivalenta ESAO Testēšanas vadlīnijā (TG) Nr. 455 (2016) aprakstītajam. TG 455 ir veikspējā balstītas testēšanas vadlīnija (PBTG), kurā aprakstīta stabili transficētas transaktivācijas *in vitro* testēšanas metodika, ar ko konstatē estrogēnu receptoru agonistus un antagonistus (ER TA testi). Tajā ietilpst vairākas mehānistiski un funkcionāli līdzīgas testēšanas metodes, ko izmanto, lai identificētu estrogēnu receptora (t.i., ER α un/vai ER β) agonistus un antagonistus, un tā varētu atvieglot jaunu līdzīgu vai modificētu testēšanas metožu izstrādi atbilstīgi validēšanas principiem, kas izklāstīti ESAO vadlīniju dokumentā par Bīstamības novērtēšanā izmantojamu jaunu vai atjauninātu testēšanas metožu validēšanu un starptautisku akceptēšanu (1). Pilnībā validētās references testēšanas metodes (2. un 3. papildinājums), kas ir šīs PBTG pamatā, ir šādas:
 - stabili transficētas TA (STTA) tests (2), izmantojot šūnu līniju (h) ER α -HeLa-9903; un
 - VM7Luc ER TA tests (3), izmantojot šūnu līniju VM7Luc4E2¹, kur galvenokārt ir ekspresēta līnija hER α un daļēji hER β (4)(5).

Līdzīgu testu izstrādē, kas vērsti uz to pašu apdraudējumu/iznākumu, ir pieejami un būtu jāizmanto snieguma standarti (PS) (6) (7). Tas dod iespēju savlaicīgi grozīt PBTG 455, proti, atjaunināto PBTG papildināt ar jauniem līdzīgiem testiem; tomēr līdzīgus testus pievienos tikai pēc izskatīšanas un apstiprināšanas ESAO, ka snieguma standarti ir izpildīti. TG 455 iekļautos testus tam, lai izpildītu ESAO valstu prasības pēc estrogēnu receptora transaktivācijas testa rezultātiem, vienlaikus izmantojot ESAO datu savstarpējo atzīšanu, šos testus var izmantot bez izšķirības.

Testēšanas metodē iekļauto testu konteksts un principi

2. ESAO 1998. gadā sāka īstenot prioritārus pasākumus ar mērķi pārskatīt esošās un izstrādāt jaunas testēšanas vadlīnijas par potenciāli endokrīnās sistēmas traucējumus

¹ Līdz 2016. gada jūnijam šo šūnu līniju sauca par BG1Luc šūnu līniju. BG-1 šūnas pirmoreiz aprakstīja Geisinger et al. (1998) (35), un pēc tam tās sīkāk raksturoja Nacionālā Vides veselības zinātņu institūta (NIEHS) pētnieki (36). Salīdzinoši neseno atklāts, ka pētnieki izmanto divus dažādus BG-1 šūnu variantus — BG-1 Fr un BG-1 NIEHS. Li un līdzstrādnieku veiktā padziļinātā analīzē (2014) (37) atklājās, ka BG-1 Fr ir unikāla un ka BG-1 NIEHS, t.i., sākotnējā šūnu līnija, ko izmantoja testa izstrādē, nav vis BG1 cilvēka olnīcu karcinomas šūnu līnija, bet gan MCF7 cilvēka krūts vēža šūnu līnijas variants. Testā izmantoto šūnu līniju, ko sākotnēji sauca par BG1Luc4E2 (38), tagad apzīmēs kā VM7Luc4E2 (“V” = variants; “M7” = MCF7 šūnas). Tāpat testu tagad apzīmēs kā VM7Luc ER TA. Lai gan mainās testa pamatā esošās šūnu līnijas izcelsme, tas neietekmē ne publicētos validācijas pētījumus, ne šā testa izmantošanas lietderību estrogēnisko/antiestrogēnisko ķīmikāliju skrīningā.

izraisošu ķīmikāliju skrīningu un testēšanu. ESAO konceptuālais satvars (KS) potenciāli endokrīnās sistēmas traucējumus izraisošu ķīmikāliju testēšanai un novērtēšanai 2012. gadā tika pārskatīts. Gan sākotnējais, gan pārskatītais KS ir iekļauts pielikumā ESAO Vadlīniju dokumentam par standartizētām testēšanas metodēm ķīmikāliju vērtēšanai attiecībā uz endokrīnajiem disruptoriem (8). KS aptver piecus līmeņus, no kuriem katrs atbilst citam bioloģiskās sarežģītības līmenim. Šajā testēšanas metodē aprakstītie ER transaktivācijas (TA) testi atbilst 2. līmenim, kur ietilpst “*in vitro testi, kas sniedz datus par izvēlētiem endokrīniem mehānismiem/ceļiem*”. Šī testēšanas metode ir paredzēta *in vitro* transaktivācijas testiem, ar ko identificē estrogēnu receptoru (ER) agonistus un antagonistus.

3. Estrogēnu un ER mijiedarbība var ietekmēt estrogēnu regulētos gēnus, un tā rezultātā var tikt inducēti vai inhibēti šūnu procesi, tostarp tie, kas saistīti ar šūnu vairošanos, normālu augļa attīstību un reproduktīvo funkciju (9)(10)(11). Normālu estrogēnisko sistēmu traucējumi var negatīvi ietekmēt normālu attīstību (ontogēnēzi), reproduktīvo veselību un reproduktīvās sistēmas integritāti.
4. *In vitro* TA testu pamatā ir vielu tieša vai netieša mijiedarbība ar specifisku receptoru, kas regulē reportiergēna produkta transkripciju. Šādi testi ir plaši izmantoti, lai izvērtētu gēnu ekspresiju, ko regulē specifiski nukleārie receptori, piem., ER (12) (13) (14) (15) (16). Ir ierosināts, ka tos varētu izmantot, lai detektētu estrogēnisku transaktivāciju, ko regulē ER (17) (18) (19). Pastāv vismaz divi lieli nukleāro ER apakštipi: α un β , un tos kodē atšķirīgi gēni. Attiecīgajiem proteīniem ir atšķirīgas bioloģiskās funkcijas, kā arī atšķirīgs sadalījums audos un atšķirīga ligandu afinitāte (20)(21)(22)(23)(24)(25)(26). Nukleārais ER α mediē klasisko estrogēnisko reakciju (27)(28)(29)(30), tāpēc vairums modeļu, ko pašlaik izstrādā ER aktivācijas vai inhibīcijas mērīšanai, balstās uz ER α . Testus izmanto, lai identificētu ķīmikālijas, kas aktivē (vai inhibē) ER ar liganda piesaisti, pēc kuras receptora-liganda komplekss piesaistās specifiskiem DNS reakcijas elementiem un transaktivē reportiergēnu, kā rezultātā palielinās marķierproteīna ekspresija šūnās. Testos var izmantot dažādas reportiergēnu reakcijas. Uz luciferāzes balstītās sistēmās luciferāzes enzīms luciferīna substrātu pārveido bioluminiscējošā produktā, ko var kvantitatīvi izmērīt ar luminometru. Citi izplatīti marķieri ir fluorescējošais proteīns un *LacZ* gēns, kas kodē β -galaktozidāzi — enzīmu, kas bezkrāsaino substrātu X-gal (5- brom-4-hlor-indolil-galaktopiranozīdu) pārveido zilā produktā, ko var kvantificēt ar spektrofotometru. Šos marķierus var ātri un lēti izvērtēt ar komerciāli pieejamiem testa komplektiem.
5. STTA un VM7Luc TA testu validācijas pētījumi apliecina, ka šie testi ir ticami un relevanti konkrētajam nolūkam (3)(4)(5)(30). Veiktspējas standarti uz luminiscenci balstītiem ER TA testiem, kuros izmanto krūšu šūnas, ir iekļauti ziņojumā "ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL[®] ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals" (3). Šie veiktspējas standarti ir grozīti tā, lai tos varētu izmantot gan STTA, gan VM7Luc TA testiem (2).

6. Šajā testēšanas metodē izmantotās definīcijas un saīsinājumi ir aprakstīti 1. papildinājumā.

TA testu tvērums un ierobežojumi

7. Šos testus ierosināts izmantot skrīninga un prioritizēšanas vajadzībām, tomēr tie var sniegt arī mehānistisku informāciju, ko var izmantot pierādījumu izsvēršanas pieejā. Tie attiecas uz TA, ko inducē ķīmiska piesaiste ER *in vitro* sistēmā. Tāpēc rezultātus nevajadzētu tieši ekstrapolēt uz neskartas endokrīnās sistēmas kompleksajiem signalizēšanas un regulēšanas mehānismiem *in vivo*.
8. Uzskata, ka ER mediēta TA ir viens no nozīmīgākajiem endokrīnās disrupcijas (ED) mehānismiem, lai gan ED izraisa arī citi mehānismi, t. sk. i) mijiedarbība ar citiem endokrīnās sistēmas receptoriem un enzīmu sistēmām, ii) hormonu sintēze, iii) hormonu metaboliskā aktivācija/inaktivācija, iv) hormonu sadalījums mērķaudos un v) hormonu izvadīšana no organisma. Neviena no šīs testēšanas metodes apskatītais tests neattiecas uz šiem darbības modiemi.
9. Šī testēšanas metode attiecas uz ķīmikāliju spēju aktivēt (t. i., darboties kā agonistam) un nomākt (t. i., darboties kā antagonistam) ER regulētu transkripciju. Dažas ķīmikālijas — atkarībā no izmantotajām šūnām — var iedarboties gan kā agonisti, gan kā antagonisti, un tās sauc par selektīvajiem estrogēnu receptora modulatoriem (SERM). Ja ķīmikālijas šajos testos uzrāda negatīvus rezultātus, tad, pirms izdarīt secinājumu, ka tās receptoram nepiesaistās, tās varētu būt lietderīgi novērtēt ER piesaistīšanas testos. Turklāt šie testi sniedz tikai informāciju par vecākmolekulas aktivitāti, ņemot vērā *in vitro* šūnu sistēmu ierobežotās metabolizēšanas spējas. Tā kā validācijas pētījumā tika izmantotas tikai atsevišķas vielas, nav informācijas par testa izmantojamību ar maisījumiem. Tomēr šī testēšanas metode teorētiski ir piemērojama daudzkomponentu vielu, UVCB un maisījumu testēšanai. Pirms datu iegūšanai normatīvām vajadzībām šo testēšanas metodi izmanto attiecībā uz daudzkomponentu vielu, UVCB vai maisījumu, jāapsver, vai un kādēļ tā var sniegt tādām nolūkam piemērotus rezultātus. Šādi apsvērumi nav vajadzīgi, ja attiecībā uz maisījuma testēšanu pastāv regulatīva prasība.
10. Informatīvā nolūkā 1. tabulā ir sniegti agonista testa rezultāti 34 vielām, kas testētas ar abām pilnībā validētajām references testēšanas metodēm, kuras aprakstītas šajā testēšanas metodē. No šīm vielām 26 nešaubīgi klasificētas kā ER agonisti, un, kā iziet no publicētajiem pārskatiem, 8 vielas uzrādīja negatīvus rezultātus, t. sk. *in vitro* ER piesaistes un TA testos un/vai uterotrofiskajā testā (2)(3)(18)(31)(32)(33)(34). 2. tabulā ir sniegti antagonista testa rezultāti 15 vielām, kas testētas ar abām pilnībā validētajām references testēšanas metodēm, kuras aprakstītas šajā testēšanas metodē. No šīm vielām 4 nešaubīgi/potenciāli klasificētas kā ER antagonisti, un, kā iziet no publicētajiem pārskatiem, 10 vielas uzrādīja negatīvus rezultātus, t. sk. *in vitro* ER piesaistes un TA testos (2)(3)(18)(31). Runājot par 1. un 2. tabulā apkopotajiem datiem, abas references testēšanas metodes

ļauj izdarīt 100 % vienādus secinājumus par visu vielu klasifikāciju (izņemot vienu vielu — mifepristonu — antagonista testā), un katra viela ir pareizi klasificēta kā ER agonists/antagonists vai negatīvs rezultāts. Papildu informācija par šo ķīmikāliju grupu un par vēl citām ķīmikālijām, kas validācijas pētījumu gaitā testētas STTA VM7Luc ER TA testos, ir sniegta ERTA veikspējas standartu (6)(7), 2. papildinājumā (1., 2. un 3. tabula).

1. tabula. Pārskats par STTA un VM7Luc ER TA testu rezultātiem attiecībā uz vielām, kas testētas abos agonista testos un klasificētas kā ES agonisti (POS) vai kā negatīvi rezultāti (NEG)

	Viela	CAS Nr.	STTA tests ¹			VM7Luc ER TA tests ²		Klasifikācijas datu avots ⁴		
			ER TA aktivitāte	PC ₁₀ vērtība (M)	PC ₅₀ vērtība ^b (M)	ER TA aktivitāte	EC ₅₀ vērtība ^{b,3} (M)	Citi ER TA testi	ER piesaistes testi	Uterotrofiskie testi
1	17β-estradiols ^a	50-28-2	POZ	<1,00 × 10-11	<1,00 × 10-11	POZ	5,63 × 10-12	POZ (227/227)	POZ	POZ
2	17α-estradiols ^a	57-91-0	POZ	7,24 × 10-11	6,44 × 10-10	POZ	1,40 × 10-9	POZ (11/11)	POZ	POZ
3	17α-etinilestradiols ^a	57-63-6	POZ	<1,00 × 10-11	<1,00 × 10-11	POZ	7,31 × 10-12	POZ (22/22)	POZ	POZ
4	17β-trenbolons	10161-33-8	POZ	1,78 × 10-8	2,73 × 10-7	POZ	4,20 × 10-8	POZ (2/2)	NT	NT
5	19-nortestosterons ^a	434-22-0	POZ	9,64 × 10-9	2,71 × 10-7	POZ	1,80 × 10-6	POZ (4/4)	POZ	POZ
6	4-kumilfenols ^a	599-64-4	POZ	1,49 × 10-7	1,60 × 10-6	POZ	3,20 × 10-7	POZ (5/5)	POZ	NT
7	4-terc-oktilfenols ^a	140-66-9	POZ	1,85 × 10-9	7,37 × 10-8	POZ	3,19 × 10-8	POZ (21/24)	POZ	POZ
8	Apigenīns ^a	520-36-5	POZ	1,31 × 10-7	5,71 × 10-7	POZ	1,60 × 10-6	POZ (26/26)	POZ	NT
9	Atražīns ^a	1912-24-9	NEG	-	-	NEG	-	NEG (30/30)	NEG	NT
10	Bisfenols A ^a	80-05-7	POZ	2,02 × 10-8	2,94 × 10-7	POZ	5,33 × 10-7	POZ (65/65)	POZ	POZ
11	Bisfenols B ^a	77-40-7	POZ	2,36 × 10-8	2,11 × 10-7	POZ	1,95 × 10-7	POZ (6/6)	POZ	POZ
12	Butilbenzilftalāts ^a	85-68-7	POZ	1,14 × 10-6	4,11 × 10-6	POZ	1,98 × 10-6	POZ (12/14)	POZ	NEG
13	Kortikosterons ^a	50-22-6	NEG	-	-	NEG	-	NEG (6/6)	NEG	NT
14	Kumestrols ^a	479-13-0	POZ	1,23 × 10-9	2,00 × 10-8	POZ	1,32 × 10-7	POZ (30/30)	POZ	NT
15	Daidzeīns ^a	486-66-8	POZ	1,76 × 10-8	1,51 × 10-7	POZ	7,95 × 10-7	POZ (39/39)	POZ	POZ
16	Dietilstilbestrols ^a	56-53-1	POZ	<1,00 × 10-11	2,04 × 10-11	POZ	3,34 × 10-11	POZ (42/42)	POZ	NT
17	Di-n-butilftalāts	84-74-2	POZ	4,09 × 10-6		POZ	4,09 × 10-6	POZ (6/11)	POZ	NEG
18	Etilparabēns	120-47-8	POZ	5,00 × 10-6	PC ₅₀ nav	POZ	2,48 × 10-5	POZ		NT
19	Estrons ^a	53-16-7	POZ	3,02 × 10-11	5,88 × 10-10	POZ	2,34 × 10-10	POZ (26/28)	POZ	POZ
20	Genisteīns ^a	446-72-0	POZ	2,24 × 10-9	2,45 × 10-8	POZ	2,71 × 10-7	POZ (100/102)	POZ	POZ
21	Haloperidols	52-86-8	NEG	-	-	NEG	-	NEG (2/2)	NEG	NT
22	Kampferols	520-18-3	POZ	1,36 × 10-7	1,21 × 10-6	POZ	3,99 × 10-6	POZ (23/23)	POZ	NT
23	Kepons ^a	143-50-0	POZ	7,11 × 10-7	7,68 × 10-6	POZ	4,91 × 10-7	POZ (14/18)	POZ	NT
24	Ketokonazols	65277-42-1	NEG	-	-	NEG	-	NEG (2/2)	NEG	NT

25	Linurons ^a	330-55-2	NEG	-	-	NEG	-	NEG (8/8)	NEG	NT
26	mezo-heksestrols ^a	84-16-2	POZ	$<1,00 \times 10^{-11}$	$2,75 \times 10^{-11}$	POZ	$1,65 \times 10^{-11}$	POZ (4/4)	POZ	NT
27	Metiltestosterons ^a	58-18-4	POZ	$1,73 \times 10^{-7}$	$4,11 \times 10^{-6}$	POZ	$2,68 \times 10^{-6}$	POZ (5/6)	POZ	NT
28	Morīns	480-16-0	POZ	$5,43 \times 10^{-7}$	$4,16 \times 10^{-6}$	POZ	$2,37 \times 10^{-6}$	POZ (2/2)	POZ	NT
29	Noretinodrels ^a	68-23-5	POZ	$1,11 \times 10^{-11}$	$1,50 \times 10^{-9}$	POZ	$9,39 \times 10^{-10}$	POZ (5/5)	POZ	NT
30	<i>p,p'</i> -metoksihlors ^a	72-43-5	POZ	$1,23 \times 10^{-6}$	(PC ₅₀ nav) ^b	POZ	$1,92 \times 10^{-6}$	POZ (24/27)	POZ	POZ
31	Fenobarbitāls ^a	57-30-7	NEG	-	-	NEG	-	NEG (2/2)	NEG	NT
32	Rezerpīns	50-55-5	NEG	-	-	NEG	-	NEG (4/4)	NEG	NT
33	Spironolaktons ^a	52-01-7	NEG	-	-	NEG	-	NEG (4/4)	NEG	NT
34	Testosterons	58-22-0	POZ	$2,82 \times 10^{-8}$	$9,78 \times 10^{-6}$	POZ	$1,75 \times 10^{-5}$	POZ (5/10)	POZ	NT

Saīsinājumi: CAS Nr. = *Chemical Abstracts Service* reģistra numurs M = molārs; EC₅₀ = testējamās vielas 50 % efektīvā koncentrācija; NEG = negatīvs; POZ = pozitīvs; NT = nav testēts; PC₁₀ (un PC₅₀) = testējamās vielas koncentrācija, pie kuras aktivitāte ir 10 % (vai 50 % PC₅₀ gadījumā) no aktivitātes, ko izraisa pozitīvs rezultāts (E2, 1nM) katrā platē.

^aIzplatītas vielas, kas testētas STTA un VM7Luc ER TA testos un klasificētas kā ER agonisti vai negatīvi, un izmantotas, lai novērtētu VM7Luc ER TA validācijas pētījuma pareizību (ICCVAM VM7Luc ER TA Evaluation Report, tabula 4-1 (3).

^bMaksimālā koncentrācija, kas testēta bez ierobežojumiem citotoksicitātes vai nešķīdības dēļ, bija 1×10^{-5} M (STTA) un 1×10^{-3} M (VM7Luc ER TA).

^cSkaitļi iekavās norāda pozitīvo (POZ) vai negatīvo (NEG) rezultātu skaitu attiecībā pret kopējo references pētījumu skaitu.

¹Vērtības, par kurām ziņots dokumentā “Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line (2)”.

²ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists (3).

³Vidējās EC₅₀ vērtības aprēķinātas, izmantojot vērtības, ko paziņoja laboratorijas, kas iesaistītas VM7Luc ER TA validācijas pētījumā (*XDS*, *ECVAM* un *Hiyoshi*) (3).

⁴Vielas klasificētas ER agonisti vai negatīvi, pamatojoties uz informāciju dokumentos “ICCVAM Background Review Documents (BRD) for ER Binding and TA test methods” (31), kā arī uz informāciju publikācijās, kas publicētas un recenzētas pēc ICCVAM BRDs (2) (3) (18) (31) (33) (34).

Piezīmes. Pie šīs testēšanas metodes aprakstītajos testos netiek izmantoti tie paši mērījumi. Dažos gadījumos EC₅₀ nav iespējams aprēķināt, jo nav ģenerēta pilna devas-efekta līkne. Lai gan STTA testā galvenais mērījums ir PC10 vērtība, ir iespējami vēl citi gadījumi, kur derīgu informāciju sniedz PCx vērtība.

2. tabula. Salīdzinājums par STTA un VM7Luc ER TA testu rezultātiem attiecībā uz vielām, kas testētas abos antagonista testos un klasificētas kā ES antagonisti (POS) vai kā negatīvi rezultāti (NEG)

	Viela ^a	CAS Nr.	ER STTA tests ¹		VM7Luc ER TA tests ²		ER STTA sagaidāmie rezultāti ⁴	ICCVAM ⁵ saskaņotā klasifikācija	MeSH ⁶ ķīmikāliju klase	Produktu klase ⁷
			ER TA aktivitāte	IC ₅₀ vērtība ^b (M)	ER TA aktivitāte	IC ₅₀ vērtība ^{b,3} (M)				
1	4-hidroksitamoksifēns	68047-06-3	POZ	$3,97 \times 10^{-9}$	POZ	$2,08 \times 10^{-7}$	mēreni POZ	POZ	Ogļūdeņradis (ciklisks)	Farmaceutiskais produkts
2	Dibenz[a,h]antracēns	53-70-3	POZ	Nav IC ₅₀ :	POZ	Nav IC ₅₀ :	POZ	PP	Policikliskais savienojums	Laboratoriju ķīmikālija, dabiskais produkts
3	Mifepristons	84371-65-3	POZ	$5,61 \times 10^{-6}$	NEG	-	vāji POZ	NEG	Steroīds	Farmaceutiskais produkts
4	Raloksifēns HCl	82640-04-8	POZ	$7,86 \times 10^{-10}$	POZ	$1,19 \times 10^{-9}$	mēreni POZ	POZ	Ogļūdeņradis (ciklisks)	Farmaceutiskais produkts
5	Tamoksifēns	10540-29-1	POZ	$4,91 \times 10^{-7}$	POZ	$8,17 \times 10^{-7}$	POZ	POZ	Ogļūdeņradis (ciklisks)	Farmaceutiskais produkts
6	17β-estradiols	50-28-2	NEG	-	NEG	-	PN	PN	Steroīds	Farmaceutiskais un veterinārfarmaceutiskais produkts
7	Apigenīns	520-36-5	NEG	-	NEG	-	NEG	NEG	Heterocikliskais savienojums	Krāsviela, dabiskais produkts, farmaceutiskais starpprodukts
8	Atrazīns	1912-24-9	NEG	-	NEG	-	NEG	PN	Heterocikliskais savienojums	Herbicīds
9	Di-n-butilftalāts	84-74-2	NEG	-	NEG	-	NEG	NEG	Esteris, ftalskābe	Kosmētikas līdzekļu sastāvdaļa, rūpnieciska ķīmikālija, plastifikators
10	Fenarimols	60168-88-9	NEG	-	NEG	-	nav testēts;	PN	Heterocikliskais savienojums, pirimidīns	Fungicīds
11	Flavons	525-82-6	NEG	-	NEG	-	PN	PN	Flavonoīds, heterocikliskais savienojums	Dabiskais produkts, farmaceutiskais produkts
12	Flutamīds	13311-84-7	NEG	-	NEG	-	NEG	PN	Amīds	Farmaceutiskais un veterinārfarmaceutiskais produkts
13	Genisteīns	446-72-0	NEG	-	NEG	-	PN	NEG	Flavonoīds, heterocikliskais savienojums	Dabiskais produkts, farmaceutiskais produkts
14	p-n-nonilfenols	104-40-5	NEG	-	NEG	-	nav testēts	NEG	Fenols	Ķīmikāliju starpprodukts

15	Resveratrols	501-36-0	NEG	-	NEG	-	PN	NEG	Ogļūdeņradis (ciklisks)	Dabisks produkts

Saīsinājumi: CAS Nr. = *Chemical Abstracts Service* reģistra numurs M = molārs; EC₅₀ = testējamās vielas 50 % maksimālā inhibējošā koncentrācija; NEG = negatīvs; PN = pieņem, ka negatīvs; POZ = pozitīvs; PP = pieņem, ka pozitīvs.

^aIzplatītas vielas, kas testētas STTA un VM7Luc ER TA testos un klasificētas kā ER antagonisti vai negatīvi, un izmantotas, lai novērtētu VM7Luc ER TA validācijas pētījuma pareizību (2) (3).

^bMaksimālā koncentrācija, kas testēta bez ierobežojumiem citotoksicitātes vai nešķīdības dēļ, bija 1 x 10⁻³ M (STTA) un 1 x 10⁻⁵ M (VM7Luc ER TA).

¹ The Validation Report of the Stably transfected Transcriptional Activation Assay to Detect ER mediated activity, Part B (2)

² ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists (3).

³Vidējās IC₅₀ vērtības aprēķinātas, izmantojot vērtības, ko paziņoja laboratorijas, kas iesaistītas VM7Luc ER TA validācijas pētījumā (*XDS*, *ECVAM* un *Hiyoshi*) (3).

⁴ ER STTA gaidāmā aktivitāte, pamatojoties uz to zināmo ietekmi, kas secināma no CER1 vēsturiskajiem datiem par ER receptoru testu un uterotrofisko testu un no informācijas, kas apkopota brīvpieejamā literatūrā (2)

⁵Vielas klasificētas ER antagonisti vai negatīvi, pamatojoties uz informāciju dokumentos “ICCVAM Background Review Documents (BRD) for ER Binding and TA assays” (31), kā arī uz informāciju publikācijās, kas publicētas un recenzētas pēc ICCVAM BRDs (2) (3) (18) (31).

⁶ Vielās iedalītas vienā vai vairākās ķīmikāliju klasēs, izmantojot ASV Nacionālās medicīnas bibliotēkas priekšmetu klasifikatoru (*MeSH*), kas ir starptautiski atzīta, standartizēta klasifikācijas sistēma (pieejama <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁷ Vielās iedalītas vienā vai vairākās ķīmikāliju klasēs, izmantojot ASV Nacionālās medicīnas bibliotēkas bīstamo vielu datubāzi (pieejama <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).

ER TA TESTA KOMPONENTI

Nepieciešamie testa komponenti

11. Šo testēšanas metodi piemēro testiem, kuros izmanto stabili transfcētu vai endogēnu ER α receptoru un stabili transfcētu reportiergēnu konstruktu viena vai vairāku estrogēniskas reakcijas elementu kontrolē; tomēr klātesoši var būt arī citi receptori, piemēram, ER β . Tie ir nepieciešamie testa komponenti.

Kontroles

12. Apraksta ierosinātos paralēlos references standartus katram agonista un antagonista testam. Paralēlās kontroles (negatīvs, šķīdinātājs, pozitīvs) vajadzības gadījumā kalpo kā indikators, ka tests funkcionē pie testēšanas nosacījumiem, un ļauj savstarpēji salīdzināt eksperimentus; parasti tie ir daļa no konkrētā eksperimenta pieņemamības kritērijiem (1).

Standarta kvalitātes kontroles procedūras

13. Katram testam veic aprakstītās standarta kvalitātes kontroles procedūras, lai nodrošinātu, ka šūnu līnija vairāku pasāžu gaitā saglabājas stabila, nesatur mikoplazmu (t.i., nav kontaminēta ar baktērijām) un saglabā spēju laika gaitā nodrošināt gaidītās ER mediētās reakcijas. Jāpārbauda arī, vai šūnu līnijas identitāte ir pareiza un vai nav citu kontaminantu (piem., sēnīšu, raugu un vīrusu).

Laboratorijas kvalifikācijas pierādīšana

14. Pirms nezināmu ķīmikāliju testēšanas ar kādu no šajā testa metodē aprakstītajiem testiem katrai laboratorijai ir jāpierāda sava kompetence testa izmantošanā. Kompetences pierādīšanas labad katra laboratorija testē 14 standartvielas, ko izmanto agonistu testēšanā un kas norādītas 3 tabulā, un 10 standartvielas, ko izmanto antagonistu testēšanā un kas norādītas 4. tabulā. Kompetences pierādīšana arī ļauj pārliecināties par testa sistēmas reaģētspēju. Standartvielu testēšanas saraksts ir daļa no references vielām, kas norādītas ER TA testu veikspējas standartos (6). Šīs vielas ir komerciāli pieejamas, tās ir reprezentatīvas tādu ķīmikāliju klasēm, ko parasti saista ar ER agonistu vai antagonistu aktivitāti, tām ir pienācīgs potences diapazons, kas sagaidāms no ER agonistiem/antagonistiem (t.i., no spēcīga līdz vājam) un tās ietver negatīvas vielas. Standartvielas testē vismaz divas reizes dažādās dienās. Kompetence ir pierādīta, ja katra standartviela tiek pareizi klasificēta (pozitīva/negatīva reakcija). Kompetences testēšanu atkārto katrs laborants, kas apgūst testēšanas metodi. Atkarībā no šūnu tipa dažas standartvielas var izpausties kā SERM, proti, gan kā agonisti, gan kā antagonisti. Tomēr standartvielas 3. un 4. tabulā ir klasificētas pēc to zināmās dominējošās aktivitātes, un tieši pēc tās vadās kompetences izvērtēšanā.
15. Kompetences pierādīšanas un kvalitātes kontroles vajadzīgām katra laboratorija izveido agonistu un antagonistu vēsturisko datubāzi ar šādiem datiem: references standartvielas

(piem., 17β -estradiols un tamoksifēns), pozitīvās un negatīvās kontrolķīmikālijas un šķīdinātāja kontrole (piem., DMSO). Sākumā datubāzi ģenerē no vismaz 10 neatkarīgām testa izpildes reizēm ar agonistiem (piem., 17β -estradiolu) un 10 neatkarīgām testa izpildes reizēm ar antagonistiem (piem., tamoksifēnu). Lai datubāzi paplašinātu un tādējādi nodrošinātu laboratorijas konsekventu sniegumu un kompetenci biotestu veikšanā, datubāzi papildina ar vēlāku references standartvielu un šķīdinātāja kontroļu analīžu rezultātiem.

3. tabula. Saraksts ar (14) standartvielām, ko izmanto agonistu testā⁸

Nr. ⁷	Viela	CAS Nr.	Sagaidāmā reakcija ¹	STTA tests			VM7Luc ER TA tests		MeSH ķīmikāliju klase ⁵	Produktu klase ⁶
				PC ₁₀ vērtība (M) ²	PC ₅₀ vērtība (M) ²	Testa koncentrācijas diapazons (M)	VM7Luc EC ₅₀ vērtība (M) ³	Augstākā koncentrācija diapazona noteikšanai (M) ⁴		
14	Dietilstilbestrols	56-53-1	POZ	<1,00 × 10-11	2,04 × 10-11	10-14 – 10-8	3,34 × 10-11	3,73 × 10-4	Ogļūdeņradis (ciklisks)	Farmaceitisks produkts, veterinārfarmaceitisks produkts
12	17α-estradiols	57-91-0	POZ	4,27 × 10-11	6,44 × 10-10	10-11 – 10-5	1,40 × 10-9	3,67 × 10-3	Steroīds	Farmaceitisks un veterinārfarmaceitisks produkts
15	mezo-heksestrols	84-16-2	POZ	<1,00 × 10-11	2,75 × 10-11	10-11 – 10-5	1,65 × 10-11	3,70 × 10-3	Ogļūdeņradis (ciklisks), fenols	Farmaceitisks un veterinārfarmaceitisks produkts
11	4-terc-oktilfenols	140-66-9	POZ	1,85 × 10-9	7,37 × 10-8	10-11 – 10-5	3,19 × 10-8	4,85 × 10-3	Fenols	Ķīmikāliju starpprodukts
9	Genisteīns	446-72-0	POZ	2,24 × 10-9	2,45 × 10-8	10-11 – 10-5	2,71 × 10-7	3,70 × 10-4	Flavonoīds, heterociklisks savienojums	Dabisks produkts, farmaceitisks produkts
6	Bisfenols A	80-05-7	POZ	2,02 × 10-8	2,94 × 10-7	10-11 – 10-5	5,33 × 10-7	4,38 × 10-3	Fenols	Ķīmikāliju starpprodukts
2	Kampferols	520-18-3	POZ	1,36 × 10-7	1,21 × 10-6	10-11 – 10-5	3,99 × 10-6	3,49 × 10-3	Flavonoīds, heterociklisks savienojums	Dabisks produkts
3	Butilbenzilftalāts	85-68-7	POZ	1,14 × 10-6	4,11 × 10-6	10-11 – 10-5	1,98 × 10-6	3,20 × 10-4	Karbonskābe, esteris, ftalskābe	Plastifikators, rūpnieciska ķīmikālija
4	p,p'- metoksihlors	72-43-5	POZ	1,23 × 10-6	-	10-11 – 10-5	1,92 × 10-6	2,89 × 10-3	Ogļūdeņradis (halogenēts)	Pesticīds, veterinārfarmaceitisks produkts
1	Etilparabēns	120-47-8	POZ	5,00 × 10-6	-	10-11 – 10-5	2,48 × 10-5	6,02 × 10-3	Karbonskābe, fenols	Farmaceitisks produkts
17	Atrazīns	1912-24-9	NEG	-	-	10-10 – 10-4	-	4,64 × 10-4	Heterociklisks savienojums	Herbicīds
20	Spironolaktons	52-01-7	NEG	-	-	10-11 – 10-5	-	2,40 × 10-3	Laktons, steroīds	Farmaceitisks produkts
21	Ketokonazols	65277-42-1	NEG	-	-	10-11 – 10-5	-	9,41 × 10-5	Heterociklisks savienojums	Farmaceitisks produkts

22	Rezerpīns	50-55-5	NEG	-	-	10-11 – 10-5	-	1,64 × 10-3	Heterociklisks savienojums, indols	Farmaceitisks un veterinārfarmaceitisks produkts

Saīsinājumi: CAS Nr. = *Chemical Abstracts Service* reģistra numurs EC₅₀ = testējamās vielas 50 % efektīvā koncentrācija; NEG = negatīvs; POZ = pozitīvs; PC₁₀ (un PC₅₀) = testējamās vielas koncentrācija, pie kuras aktivitāte ir 10 % (vai 50 % PC₅₀ gadījumā) no aktivitātes, ko izraisa pozitīvs rezultāts (E2, 1nM) katrā platē.

¹Vielas klasificētas kā pozitīvas vai negatīvas ER agonista aspektā, pamatojoties uz informāciju dokumentos “ICCVAM Background Review Documents (BRD) for ER Binding and TA assays” (31), empīriskiem datiem un informāciju publikācijās, kas publicētas un recenzētas pēc ICCVAM BRDs (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34).

²Vērtības, par kurām ziņots dokumentā “Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line (30)”.

³Vidējās EC₅₀ vērtības aprēķinātas, izmantojot vērtības, ko paziņoja laboratorijas, kas iesaistītas VM7Luc ER TA validācijas pētījumā (*XDS*, *ECVAM* un *Hiyoshi*) (3).

⁴Norādītās koncentrācijas atbilst augstākajām testētajām koncentrācijām (diapazona noteikšanas tests) VM7Luc ER TA testa validēšanas gaitā. Ja dažādās laboratorijās koncentrācijas atšķirās, norādīta augstākā koncentrācija. Sk. tabulu 4-10 dokumentā “ICCVAM Test Method Evaluation Report; The LUMI-Cell®ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals” (3).

⁵Vielas iedalītas vienā vai vairākās ķīmikāliju klasēs, izmantojot ASV Nacionālās medicīnas bibliotēkas priekšmetu klasifikatoru (*MeSH*), kas ir starptautiski atzīta, standartizēta klasifikācijas sistēma (pieejama <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁶Vielas iedalītas vienā vai vairākās ķīmikāliju klasēs, izmantojot ASV Nacionālās medicīnas bibliotēkas bīstamo vielu datubāzi (pieejama <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>)

⁷Saskaņā ar veikspējas standartu (List of Reference Chemicals (22) for Evaluation of ER Agonist Accuracy) 1. tabulu (6).

Ja standartviela vairs nav komerciāli pieejama, var izmantot vielu, kurai ir tāda pati klasifikācija un salīdzināma potence, darbības mods un ķīmiskā klase.

4. tabula. Saraksts ar (10) standartvielām, ko izmanto antagonistu testā

	Viela ^a	CAS Nr.	ER STTA tests ¹			VM7Luc ER TA tests ²			ER STTA ¹ sagaidāmie rezultāti	ICCVAM ⁵ saskaņotā klasifikācija	MeSH ⁶ ķīmikāliju klase	Produktu klase ⁷
			ER TA aktivitāte	IC ₅₀ (M)	Testa koncentrācijas diapazons (M)	ER TA aktivitāte	IC ₅₀ ³ (M)	Augstākā koncentrācija diapazona noteikšanai (M) ⁴				
1	4-hidroksitamoksifēns	68047-06-3	POZ	$3,97 \times 10^{-9}$	$10^{-12} - 10^{-7}$	POZ	$2,08 \times 10^{-7}$	$2,58 \times 10^{-4}$	mēreni POZ	POZ	Ogļūdeņradis (cikliskis)	Farmaceutiskais produkts
2	Raloksifēns HCl	82640-04-8	POZ	$7,86 \times 10^{-10}$	$10^{-12} - 10^{-7}$	POZ	$1,19 \times 10^{-9}$	$1,96 \times 10^{-4}$	mēreni POZ	POZ	Ogļūdeņradis (cikliskis)	Farmaceutiskais produkts
3	Tamoksifēns	10540-29-1	POZ	$4,91 \times 10^{-7}$	$10^{-10} - 10^{-5}$	POZ	$8,17 \times 10^{-7}$	$2,69 \times 10^{-4}$	POZ	POZ	Ogļūdeņradis (cikliskis)	Farmaceutiskais produkts
4	17β-estradiols	50-28-2	NEG	-	$10^{-9} - 10^{-4}$	NEG	-	$3,67 \times 10^{-3}$	potenciāli negatīvs *	PN	Steroīds	Farmaceutiskais un veterinārfarmaceutiskais produkts
5	Apigenīns	520-36-5	NEG	-	$10^{-9} - 10^{-4}$	NEG	-	$3,70 \times 10^{-4}$	NEG	NEG	Heterocikliskais savienojums	Krāsviela, dabiskais produkts, farmaceutiskais starpprodukts
6	Di-n-butilftalāts	84-74-2	NEG	-	$10^{-8} - 10^{-3}$	NEG	-	$3,59 \times 10^{-3}$	NEG	NEG	Esteris, ftāliskābe	Kosmētikas līdzekļu sastāvdaļa, rūpnieciskā ķīmikālija, plastifikators
7	Flavons	525-82-6	NEG	-	$10^{-8} - 10^{-3}$	NEG	-	$4,50 \times 10^{-4}$	potenciāli negatīvs *	PN	Flavonoīds, heterocikliskais savienojums	Dabiskais produkts, farmaceutiskais produkts
8	Genisteīns	446-72-0	NEG	-	$10^{-9} - 10^{-4}$	NEG	-	$3,70 \times 10^{-4}$	potenciāli negatīvs *	NEG	Flavonoīds, heterocikliskais savienojums	Dabiskais produkts, farmaceutiskais produkts
9	p-n-nonilfenols	104-40-5	NEG	-	$10^{-9} - 10^{-4}$	NEG	-	$4,54 \times 10^{-4}$	nav testēts	NEG	Fenols	Ķīmikāliju starpprodukts
10	Resveratrols	501-36-0	NEG	-	$10^{-8} - 10^{-3}$	NEG	-	$4,38 \times 10^{-4}$	potenciāli negatīvs *	NEG	Ogļūdeņradis (cikliskis)	Dabiskais produkts

Saīsinājumi: CAS Nr. = *Chemical Abstracts Service* reģistra numurs M = molārs; EC₅₀ = testējamās vielas 50 % maksimālā inhibējošā koncentrācija; NEG = negatīvs; PN = pieņem, ka negatīvs; POZ = pozitīvs.

* klasificēts kā negatīvs saskaņā ar literatūras apskatu (2).

^a Izplatītas vielas, kas testētas STTA un VM7Luc ER TA testos un klasificētas kā ER antagonisti vai negatīvi, un izmantotas, lai novērtētu VM7Luc ER TA validācijas pētījuma pareizību (2) (3).

¹ The Validation Report of the Stably transfected Transcriptional Activation Assay to Detect ER mediated activity, Part B (2)

² ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists (3).

³ Vidējās IC₅₀ vērtības aprēķinātas, izmantojot vērtības, ko paziņoja laboratorijas, kas iesaistītas VM7Luc ER TA validācijas pētījumā (*XDS*, *ECVAM* un *Hiyoshi*) (3).

⁴ Norādītās koncentrācijas atbilst augstākajām testētajām koncentrācijām (diapazona noteikšanas tests) VM7Luc ER TA testa validēšanas gaitā. Ja dažādās laboratorijās koncentrācijas atšķīrās, norādīta augstākā koncentrācija. Sk. tabulu 4-11 dokumentā "ICCVAM Test Method Evaluation Report; The LUMI-Cell®ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals" (3).

⁵ Vielas klasificētas ER antagonisti vai negatīvi, pamatojoties uz informāciju dokumentos "ICCVAM Background Review Documents (BRD) for ER Binding and test methods" (31), kā arī uz informāciju publikācijās, kas publicētas un recenzētas pēc ICCVAM BRDs (2) (3) (18) (31).

⁶ Vielas iedalītas vienā vai vairākās ķīmikāliju klasēs, izmantojot ASV Nacionālās medicīnas bibliotēkas priekšmetu klasifikatoru (*MeSH*), kas ir starptautiski atzīta, standartizēta klasifikācijas sistēma (pieejama <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁷ Vielas iedalītas vienā vai vairākās ķīmikāliju klasēs, izmantojot ASV Nacionālās medicīnas bibliotēkas bīstamo vielu datubāzi (pieejama <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).

Testa pieņemamības kritēriji

16. Testa pieņemšana vai noraidīšana ir atkarīga no rezultātiem, kas iegūti ar katrā eksperimentā izmantotajiem references standartiem un kontrolēm. References standartvielu vērtībām PC_{50} (EC_{50}) vai IC_{50} būtu jāatbilst pieņemamības kritērijiem, kas paredzēti izvēlētajam testam (par STTA sk. 2. papildinājumu, par VM7Luc ER TA sk. 3. papildinājumu), un visas pozitīvās/negatīvās kontroles būtu pareizi jāklasificē attiecībā uz katru eksperimentu, kas atzīts par pieņemamu. Laboratorija savu spēju pastāvīgi veikt testu pierāda, izveidojot un uzturot datubāzi, kurā apkopoti references standartvielu un kontroļu vēsturiskie rezultāti (sk. 15. punktu). Kā pasākumu, ar ko nodrošina reproducējamību laboratorijas robežās, var izmantot references standartu līknes piemeklēšanas parametru vidējo vērtību standartnovirzes (SN) vai variācijas koeficientus (VK), kas iegūti daudzos eksperimentos. Bez tam attiecībā uz pieņemamības kritērijiem ir jāievēro šādi principi.
 - Datiem jābūt pietiekamiem, lai varētu kvantitatīvi novērtēt ER aktivāciju (agonistu testā) vai inhibīciju (antagonistu testā) (t.i., efektivitāti un potenci).
 - Lai garantētu adekvātu jutību, marķiera vidējai aktivitātei pie references estrogēna references koncentrācijas jābūt vismaz testēšanas metodes paredzētajai minimālajai aktivitātei attiecībā pret nesēja (šķīdinātāja) kontroles marķiera vidējo vērtību. Testos STTA un VM7Luc ER TA šī minimālā vērtība ir četras reizes lielāka par nesēja kontroles vidējo vērtību katrā platē.
 - Testētajām koncentrācijām jā saglabājas testa ķīmikāliju šķīdības diapazonā un tās nedrīkst būt citotoksiskas.

Datu analīze

17. Lai noteiktu, vai reakcija ir pozitīva vai negatīva, izmanto katram testam definēto datu interpretēšanas procedūru.
18. Ja ir izpildīti pieņemamības kritēriji (16. punkts), tas nozīmē, ka tests darbojas pareizi, tomēr tas negarantē, ka konkrētajā izpildes reizē tiks iegūti pareizi dati. Labākais pierādījums iegūto datu pareizībai ir pirmās izpildes reizes rezultātu replicēšana. Ja divās izpildes reizēs tiek iegūti reproducējami rezultāti (piem., rezultāti abās izpildes reizēs liecina, ka testa ķīmikālija ir pozitīva), nav nepieciešams testu izpildīt vēl trešo reizi.
19. Ja divās izpildes reizēs netiek netiek iegūti reproducējami rezultāti (piem., testa ķīmikālija ir pozitīva vienā izpildes reizē, bet negatīva otrā) vai ka ir nepieciešama lielāka pārliecība par šā testa iznākumu, vajadzīgas vismaz trīs neatkarīgas izpildes reizes. Tādā gadījumā klasifikācijas pamatā ir divi sakritīgie rezultāti no trim.

Vispārīgie datu interpretācijas kritēriji

20. Pašlaik nav vispārpieņemtas metodes, kā interpretēt ER TA datus. Tomēr gan kvalitatīvajos (piem., pozitīvs/negatīvs), gan kvantitatīvajos (piem., EC₅₀, PC₅₀, IC₅₀) ER mediētās aktivitātes novērtējumos ir jābalstās uz empīriskiem datiem un pamatotiem zinātniskiem spriedumiem. Ja iespējams, pozitīvie rezultāti jāraksturo gan ar ietekmes intensitāti salīdzinājumā ar nesēja (šķīdinātāja) kontroli vai references estrogēnu, gan ar koncentrāciju, pie kuras novērojama ietekme (piem., EC₅₀, PC₅₀, RPC_{Max}, IC₅₀ u.c.).

Testēšanas pārskats

21. Testēšanas pārskatā norāda šādu informāciju.

Tests:

- izmantotais tests.
- Kontrole/ references standarts/ testējamā ķīmikālija
- avots, sērijas numurs, izmantošanas termiņš, ja pieejams,
- pašas testējamās ķīmikālijas stabilitāte, ja zināma,
- testējamās ķīmikālijas šķīdība un stabilitāte šķīdinātājā, ja tā zināma,
- (attiecīgā gadījumā) pH, osmolalitātes un izgulsnēšanās mērījums kultūras barotnē, kurā testējamā ķīmikālija pievienota.

Vienkomponenta viela.

- izskats, šķīdība ūdenī un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības,
- ķīmiskā identifikācija, piemēram, *IUPAC* vai *CAS* nosaukums, *CAS* numurs, *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula, tīrība, attiecīgā gadījumā, ja praktiski iespējams, piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. tml.

Vairākkomponentu viela, UVCB un maisījumi:

- iespējami izsmēloši raksturoti pēc komponentu ķīmiskās identitātes (sk. iepriekš), kvantitatīvās sastopamības un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām.

Šķīdinātājs/nesējs:

- raksturojums (iedaba, piegādātājs un sērija),
- šķīdinātāja/nesēja izvēles pamatojums,
- testējamās ķīmikālijas šķīdība un stabilitāte šķīdinātājā/nesējā, ja tā zināma.

Šūnas:

- šūnu tips un avots:

- Vai ER ir endogēni ekspresēti? Ja nē, tad kuri receptori tikuši transficēti?
 - Izmantotie reportierģēnu konstrukti (t.sk. avotsugas);
 - Transfekcijas metode;
 - Atlases metode, ko izmanto stabilas transfekcijas uzturēšanai (attiecīgā gadījumā);
 - Vai transfekcijas metode ļauj iegūt stabilas līnijas?
- šūnu pasāžu skaits (pēc atkausēšanas);
 - šūnu pasāžu skaits (atkausēšanas brīdī);
 - šūnu kultūru audzēšanas metodes.

Testēšanas nosacījumi:

- šķīdības ierobežojumi;
- apraksts par izmantotajām dzīvotspējas novērtēšanas metodēm;
- barotnes sastāvs, CO₂ koncentrācija;
- testējamās ķīmikālijas koncentrācija;
- pievienotā nesēja un testējamās ķīmikālijas tilpums;
- inkubācijas temperatūra un mitrums;
- apstrādes ilgums;
- šūnu blīvums apstrādes sākumā un gaitā;
- pozitīvie un negatīvie references standarti;
- marķierreāģenti (produkta nosaukums, piegādātājs, sērija);
- kritēriji, pēc kuriem novērtē, vai testa rezultāts ir pozitīvs, negatīvs vai neskaidrs.

Pieņemamības pārbaude

- indukcija kārtās katrā testa platē un tas, vai tiek izpildīts testā vajadzīgais minimums, pamatojoties uz vēsturiskajiem datiem par kontrolēm;
- pieņemamības kritēriju faktiskās vērtības, piem., log₁₀EC₅₀, log₁₀PC₅₀, logIC₅₀ un Hilla virziena koeficienta vērtības attiecībā uz testā paralēli iekļautajām pozitīvajām kontrolēm/references standartiem.

Rezultāti:

- jēldati un normalizēti dati;
- maksimālais vairākkāršās indukcijas līmenis;

- citotoksiskuma dati;
- zemākā efektīvā koncentrācija (LEC), ja tāda ir;
- attiecīgā gadījumā — RPC_{Max} , PC_{Max} , PC_{50} , IC_{50} un/vai EC_{50} vērtības;
- ja iespējams, koncentrācijas–atbildreakcijas sakarība,
- statistiskās analīzes (ja tādas ir), kā arī kļūdas un ticamības mērs (piem., SEM, SN, VK vai 95% CI) un apraksts par to, kā šīs vērtības iegūtas.

Rezultātu iztirzājums

Secinājumi

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. papildinājums

DEFINĪCIJAS UN SAĪSINĀJUMI

Pieņemamības kritēriji: minimālie standarti, kas attiecas uz eksperimenta kontrolēm un references standartiem. Lai eksperimentu uzskatītu par derīgu, visiem pieņemamības kritērijiem jābūt izpildītiem.

Pareizība (konkordantums): pakāpe, kādā testa rezultāti sakrīt ar pieņemtajām atsauces vērtībām. Tas ir testa veikspējas raksturlielums un viens no tā relevantuma aspektiem. Ar šo terminu, tāpat kā terminu “konkordantums”, bieži vien saprot testa pareizo iznākumu īpatsvaru (1).

Agonists: viela, kas piesaistē konkrētam receptoram rada reakciju, piemēram, transkripciju.

Antagonists: tāda veida receptora ligands vai ķimikālija, kas piesaistē receptoram pats(-i) par sevi neizraisa bioloģisku reakciju, bet gan bloķē vai mīkstina agonista mediētas reakcijas.

Antiestrogēniska aktivitāte: ķimikālijas spēja nomākt 17β-estradiola aktivitāti, ko mediē estrogēnu receptori.

Šūnu morfoloģija: tādu šūnu forma un izskats, kas monoslānī audzētas audu kultūras plates vienā iedobē. Mirstošām šūnām bieži novērojama anormāla šūnu morfoloģija.

KS: ESAO konceptuālais satvars (KS) endokrīnās sistēmas traucējumus izraisošu ķimikāliju testēšanai un novērtēšanai.

Apstrāde ar ogli/dekstrānu: šūnu kultūrā izmantota seruma apstrāde. Apstrāde ar ogli/dekstrānu (bieži vien to sauc arī par “stripingu”) likvidē endogēnos hormonus un hormonus piesaistošus proteīnus.

Ķimikālija: viela vai maisījums.

Citotoksiskums: kaitīga ietekme uz šūnas struktūru vai funkcionalitāti, kas galu galā var novest pie šūnas nāves; to var atspoguļot šūnu skaita samazinājums iedobē ekspozīcijas perioda beigās vai šūnu funkcijas kapacitātes samazinājums salīdzinājumā ar paralēlo nesēja kontroli.

VK: variācijas koeficients.

DCC-FBS: liellopu embriju serums, kas apstrādāts ar dekstrāna pārklātu ogli.

DMEM: Dulbeka modificētā Īgla barotne.

DMSO: dimetilsulfoksīds.

E2: 17β-estradiols.

EC₅₀: testējamās ķīmikālijas 50 % efektīvā koncentrācija.

ED: endokrīnās sistēmas darbības traucējumi.

hERα: cilvēka estrogēnu receptors alfa

hERβ: cilvēka estrogēnu receptors beta

EFM: bezestrogēna barotne. Dulbeko modificētā Īgla barotne (DMEM), kas papildināta ar 4,5 % DCC-FBS, 1,9 % L-glutamīnu un 0,9 % penicilīna un streptomicīna maisījumu.

ER: estrogēnu receptors

ERE: estrogēna atbildreakcijas elements

Estrogēniska aktivitāte: ķīmikālijas spēja imitēt 17β-estradiolu, proti, piesaistīties estrogēnu receptoriem un aktivēt tos. Ar šo testēšanas metodi var konstatēt hERα mediētu estrogēnisku aktivitāti.

ERTA: estrogēnu receptora transaktivācija

FBS: liellopu embriju serums

HeLa: nemirstīga cilvēka dzemdes kakla šūnu līnija

HeLa9903: HeLa šūnu apakšklons, kurā stabili transficēts hERα un luciferāzes reportierģēns

IC₅₀: testējamās inhibējošās ķīmikālijas 50 % efektīvā koncentrācija.

ICCVAM: Alternatīvo metožu validēšanas koordinēšanas starpaģentūru komiteja.

Starplaboratoriju reproducējamība: lielums, kas raksturo, kādā mērā vairākas kvalificētas laboratorijas spēj iegūt kvalitatīvi un kvantitatīvi līdzīgus rezultātus, ja tās izmanto vienu un to pašu protokolu un vienas un tās pašas testējamās vielas. Starplaboratoriju reproducējamību (saukta arī par interlaboratoriju reproducējamību) nosaka prevalidēšanas un validēšanas procesā, un šis lielums rāda, cik lielā mērā testēšanu vienlīdz sekmīgi iespējams veikt dažādās laboratorijās (1).

Iekšlaboratorijas reproducējamība: lielums, kas raksturo, kādā mērā vienā laboratorijā strādājoši kvalificēti darbinieki spēj sekmīgi atkārtot iepriekš iegūtus rezultātus, ja to pašu protokolu izmanto citā laikā. Saukts arī par intralaboratoriju reproducējamību (1).

LEC: zemākā efektīvā koncentrācija, t.i., zemākā koncentrācija, kurā testējamā ķīmikālija izraisa reakciju (t.i., testa ķīmikālijas zemākā koncentrācija, pie kuras indukcija kārtās ir statistiski atšķirīga no paralēlās nesēja kontroles).

Atdarinājuma tests: sadzīvisks apzīmējums testam, kas ir noteikšanas mehānisma vai funkcionalitātes ziņā līdzīgs validētai un pieņemtai testēšanas references metodei. Brīvi

aizstājama ar līdzīgu testēšanas metodi.

MT: metalotionīns

MMTV: peļu piena dziedzeru audzēja vīruss

OHT: 4-hidroksitamoksifēns

PBTG: veikspējā balstītas testēšanas vadlīnijas

(PC) Pozitīvā kontrole: ļoti aktīva viela — vēlams, 17 β -estradiols —, ko iekļauj visos testos un kas palīdz garantēt testa pienācīgu funkcionēšanu.

PC₁₀: testējamās ķimikālijas koncentrācija, pie kuras izmērītā aktivitāte agonista testā ir 10 % no maksimālās aktivitātes, ko inducē PC (testā STTA — E2 pie 1nM) katrā iedobē.

PC₅₀: testējamās ķimikālijas koncentrācija, pie kuras izmērītā aktivitāte agonista testā ir 50 % no maksimālās aktivitātes, ko inducē PC (E2 pie testēšanas metodē norādītās references koncentrācijas) katrā iedobē.

PC_{Max}: testējamās ķimikālijas koncentrēšana, kas inducē RPC_{Max}

Veikspējas standarti: uz validēta testa bāzēti standarti, pēc kuriem izvērtē pēc noteikšanas mehānisma vai funkcionalitātes ziņā līdzīgu testu salīdzināmību. Tie ietver 1) nepieciešamos testa komponentus; 2) minimālo tādu references ķimikāliju sarakstu, kuras izraudzītas no citām ķimikālijām, ko izmanto, lai pierādītu pieņemamu validētās testēšanas metodes veikspēju; kā arī 3) uz attiecīgajā validētajā testēšanas metodē iegūto rezultātu pamata — salīdzināmi pareizības un ticamības līmeņi, kā būtu jāiegūst ar ierosināto testu, to izvērtējot ar references ķimikālijām no minimālā saraksta (1).

Standartvielas: veikspējas standartos iekļauto references vielu apakškopa, ko laboratorijas var izmantot, lai pierādītu savu tehnisko kompetenci ar standartizētu testēšanas metodi. Šādu vielu atlases kritēriji parasti ir, piemēram šādi: viela ir reprezentatīva dažādām reakcijām, ir komerciāli pieejama un un par to pieejami ļoti kvalitatīvi references dati.

Kompetence: vēl pirms nezināmu vielu testēšanas pierādīta spēja testu pienācīgi veikt.

References estrogēns (pozitīvā kontrole, PC): 17 β -estradiols (E2, CAS 50-28-2).

References standarts: references viela, ko izmanto, lai pierādītu testa piemērotību. Testos STTA un VM7Luc ER TA references standarts ir 17 β -estradiols.

References testēšanas metodes: testi, uz kuriem balstās *PBTG* 455.

Relevantums: parametrs, kas raksturo testa attiecināmību uz interesējošo ietekmi un to, vai testu lietot konkrētam nolūkam ir jēgpilni un noderīgi. Tā ir pakāpe, kādā ar testu var pareizi izmērīt vai prognozēt interesējošo bioloģisko ietekmi. Relevantums ietver arī testa pareizības (konkordantuma) aspektu (1).

Ticamība: parametrs, kas izsaka, kādā pakāpē vienā un tajā pašā laboratorijā vai dažādās laboratorijās pēc vienu un tā paša protokola var ilgstoši reproducējami veikt konkrētu testu. To novērtē, aprēķinot reproducējamību vienā laboratorijā un vairākās laboratorijās.

RLU: relatīvās gaismas vienības

RNS: ribonukleīnskābe

RPC_{Max}: testējamās ķimikālijas inducētās atbildreakcijas maksimālais līmenis, ko izsaka kā procentus no 1nM, E2 inducētās atbildreakcijas tajā pašā platē.

RPMI: RPMI 1640 barotne, kas papildināta ar 0,9% penicilīna un streptomicīna maisījumu un 8,0% liellopu embriju serumu (FBS).

Izpildes reize: atsevišķs eksperiments, kurā izvērtē ķīmisko iedarbību uz testa bioloģisko iznākumu. Katra izpildes reize ir pilns eksperiments, ko izdara replikāta iedobēs vienlaikus un ar šūnām no tā paša šūnu krājuma.

Neatkarīga izpildes reize: atsevišķs, neatkarīgs eksperiments, kurā izvērtē ķīmisko iedarbību uz testa bioloģisko iznākumu; izmanto šūnas no dažādiem krājumiem, svaigi atšķaidītas ķimikālijas un testu izdara vai nu dažādās dienās, vai tajā pašā dienā dažādi laboranti.

SN: standartnovirze

Jutība: tas, cik liela daļa no visām pozitīvajām/aktīvajām vielām ar testu tiek klasificētas pareizi. Tas ir tāda testa pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testa relevantuma izvērtēšanā (1).

Specifiskums: tas, cik liela daļa no visām negatīvajām/neaktīvajām vielām ar testu tiek klasificētas pareizi. Tas ir tāda testa pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testa relevantuma izvērtēšanā (1).

Stabila transfekcija: norise, kuras laikā DNS tiek transficēta kultivētajās šūnās tādā veidā, ka tiek stabili integrēta šūnas genomā, kā rezultātā ir iespējama transficēto gēnu stabila ekspresija. Stabili transficētu šūnu klonus atlasa ar stabiliem marķieriem (piem., pretestība G418).

Tests STTA: stabili transficētas transaktivācijas tests, ER α transkripcionālās aktivācijas tests, izmantojot šūnu līniju HeLa 9903.

Pētījums: visi eksperimentālā darba posmi, kas izpildīti, lai specifiskā testā izvērtētu vienu atsevišķu, specifisku vielu. Pētījumā ietilpst visi eksperimenta posmi, tostarp testējamās vielas atšķaidīšana testa barotnē, provizorisks diapazona noteikšanas testi, visi nepieciešamie visaptverošie testi, datu analīze, kvalitātes nodrošināšana, citotoksiskuma novērtēšana utt.

Pētījuma pabeigšana ļauj klasificēt, kā testējamā ķīmikālija iespaido testā novērtēto toksiskumu (t.i., aktīva, neaktīva, neviennozīmīga), un raksturot atbildreakciju attiecībā pret pozitīvo references ķīmikāliju.

Viela: *REACH* regulā¹² viela definēta kā ķīmiskais elements un tā dabiski vai ražošanas procesā iegūti savienojumi, tostarp tās stabilizācijai vajadzīgās piedevas, kā arī izmantotajos procesos radušies piejaukumi, kas nav šķīdinātāji, kurus var atdalīt, neietekmējot vielas stabilitāti un nemainot tās sastāvu. Ļoti līdzīga definīcija tiek izmantota ANO *GHS* (1).

TA (transaktivācija): mRNS sintēzes iniciēšana kā atbildreakcija uz specifisku ķīmisko signālu, piemēram, estrogēna piesaisti estrogēna receptoram.

Tests: šis testēšanas metodes kontekstā tests ir viena no metodikām, kas atzīta par derīgu, proti, kas izpilda norādītos veikspējas kritērijus. Testa komponenti ir, piemēram, specifiska šūnu līnija un attiecīgie augšanas apstākļi, specifiska barotne, kurā veic testu, plašu sagatavošanas nosacījumi, testējamo ķīmikāliju sagatavošana un atšķaidīšana, kā arī visi citi vajadzīgie kvalitātes kontroles pasākumi un saistītie datu izvērtēšanas posmi.

Testējamā ķīmikālija: jebkura viela vai maisījums, kuru testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

Transkripcija mRNS sintēze

UVCB: ķīmiskas vielas, kuru sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kompleksi reakcijas produkti un bioloģiski materiāli.

Validēta testēšanas metode: tests, kura relevantums (ieskaitot pareizību) un ticamība attiecībā uz lietošanu konkrētā nolūkā ir pārbaudīta validācijas pētījumos. Jāievēro, ka validētas testēšanas metodes veikspēja pareizības un ticamības ziņā var nebūt pietiekama, lai to izmantotu paredzētajam nolūkam (1).

Validācija: Process, kurā nosaka, kādā mērā konkrēta pieeja, metode, tests, process vai novērtējums ir ticams un relevants konkrētajam nolūkam (1).

VC (nesēja kontrole): šķīdinātāju, kurā izšķīdina testējamās un kontroles ķīmikālijas, testē tikai kā nesēju bez izšķīdinātas ķīmikālijas.

¹² Eiropas Parlamenta un Padomes 2006. gada 18. decembra Regula (EK) Nr. 1907/2006, kas attiecas uz ķīmikāliju reģistrēšanu, vērtēšanu, licencēšanu un ierobežošanu (REACH) un ar kuru izveido Eiropas Ķīmikāliju aģentūru, groza Direktīvu 1999/45/EK un atceļ Padomes Regulu (EEK) Nr. 793/93 un Komisijas Regulu (EK) Nr. 1488/94, kā arī Padomes Direktīvu 76/769/EEK un Komisijas Direktīvu 91/155/EEK, Direktīvu 93/67/EEK, Direktīvu 93/105/EK un Direktīvu 2000/21/EK (OV L 304, 22.11.2007., 1. lpp.).

VM7: nemirstīga adenokarcinomas šūna, kas endogēni ekspresē estrogēnu receptorus.

VM7Luc4E2: Šūnu līnija VM7Luc4E2 atvasināta no VM7 nemirstīgām cilvēka adenokarcinomas šūnām, kas spēj endogēni ekspresēt abas estrogēnu receptoru formas (ER α and ER β) un ir stabili transficētas ar plazmīdu pGudLuc7.ERE. Plazmīds satur četras kopijas no sintezēta oligonukleotīda, kas satur estrogēna atbildreakcijas elementu virs MMTV promotera un jāntārpiņa luciferāzes gēnu.

Vāji pozitīvā kontrole: vāji aktīva viela, kas izvēlēta no references ķīmikāliju saraksta; to iekļauj visos testos un tā palīdz garantēt testa pienācīgu funkcionēšanu.

2. papildinājums

STABILI TRANSFICĒTAS CILVĒKA ESTROGĒNU RECEPTORU A TRANSAKTIVĀCIJAS TESTS, KURĀ NOSAKA ĶĪMIKĀLIJU AGONISTU UN ANTAGONISTU ESTROGĒNISKO AKTIVITĀTI, IZMANTOJOT ŠŪNU LĪNIJU HERA-HELA-9903

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI (SK. ARĪ VISPĀRĪGO IEVADU)

1. Šajā transaktivācijas (TA) testā šūnu līniju hER α -HeLa-9903 izmanto, lai noteiktu estrogēnisku agonista aktivitāti, ko mediē cilvēku estrogēnu receptors alfa (hER α). Japānas Ķīmikāliju izvērtēšanas un izpētes institūta (*CERI*) veiktajā stabili transficētas transaktivācijas (STTA) validācijas pētījumā, kurā šūnu līniju ER α -HeLa-9903 izmantoja, lai noteiktu estrogēnisku agonista un antagonista aktivitāti, ko mediē cilvēku estrogēnu receptors alfa (hER α), pierādījās, ka tests ir ticams un relevants konkrētajam nolūkam (1).
2. Šis tests ir īpaši paredzēts hER α -mediētas TA noteikšanai, par mērījuma parametru izmantojot hemiluminiscenci. Tomēr pie tādām fitoestrogēnu koncentrācijām, kas pārsniedz 1 μ M, ir novēroti receptoru nemediēti luminiscences signāli, ko izraisa luciferāzes reportierģēna pārmērīga aktivācija. Lai gan devas-efekta līkne liecina, ka patiesa ER sistēmas aktivācija notiek pie zemākām koncentrācijām, ir lietderīgi rūpīgi izpētīt tādu luciferāzes ekspresiju stabili transficētās ER TA testu sistēmās (1. papildinājums), ko iegūst pie augstām fitoestrogēnu koncentrācijām vai tādu savienojumu koncentrācijām, par kuriem ir aizdomas, ka tie līdzīgi kā fitoestrogēni izraisa luciferāzes reportierģēna pārmērīgu aktivāciju.
3. Pirms šā testa izmantošanas regulatīviem mērķiem ir jāizlasa sadaļas “**VISPĀRĪGAIS IEVADS**” un “**ER TA testa KOMPONENTI**”. Šajā testēšanas vadlīnijā izmantotās definīcijas un saīsinājumi ir aprakstīti 2.1. papildinājumā.

TESTA PRINCIPS (SK. ARĪ VISPĀRĪGO IEVADU)

4. Testu izmanto, lai signalizētu, ka estrogēnu receptors ir piesaistījies ligandam. Pēc liganda piesaistes receptora-liganda komplekss translocējas uz kodolu, kur tas piesaistās specifiskiem DNS reakcijas elementiem un transaktivē jāņtārpiņa luciferāzes reportierģēnu, kā rezultātā palielinās luciferāzes fermenta ekspresija šūnās. Luciferīns ir substrāts, kuru luciferāzes enzīms pārveido bioluminiscējošā produktā, ko var kvantitatīvi izmērīt ar luminometru. Luciferāzes aktivitāti var ātri un lēti izvērtēt ar vairākiem komerciāli pieejamiem testa komplektiem.
5. Testa sistēmā izmanto šūnu līniju hER α -HeLa-9903, kas iegūta no cilvēka dzemdes kakla audzēja un kam ir divi stabili insertēti konstrukti: i) hER α ekspersijas konstrukts (kura cilvēka receptors iekodēts pilnībā) un ii) jāņtārpiņa luciferāzes reportierģēna konstrukts, kam ir pieci vitelogenīna estrogēna atbildreakcijas elementa (ERE) tandēmie atkārtojumi, ko regulē

peļu metalotionīna (MT) promoters ar TATA elementu. Peļu MT TATA gēna konstrukts līdz šim izrādījies visrezultatīvākais, tāpēc tieši to parasti izmanto. Tāpēc šī šūnu līnija hER α -HeLa-9903 ļauj izmērīt testējamās ķīmikālijas spēju inducēt luciferāzes gēna ekspresijas hER α mediētu transaktivāciju.

6. ER agonista testā datu interpretācijas pamatā ir tas, vai testējamās ķīmikālijas inducētais maksimālais atbildreakcijas līmenis ir vienāds ar vai lielāks par agonista atbildreakciju, kas ir vienāda ar 10 % no atbildreakcijas, ko izraisa koncentrācija, kura inducē pozitīvās kontroles (PC) (17 β -estradiols (E2)) maksimālo atbildreakciju (1 nM) (t.i., . the PK₁₀). ER antagonista testā datu interpretācijas pamatā ir tas, vai atbildreakcija parāda vismaz 30 % aktivitātes samazinājumu salīdzinājumā ar atbildreakciju, ko inducē ar kontroles pastiprinājumu (25 pM, E2), neizraisot citotoksicitāti. Datu analīze un interpretācija sīkāk iztirzāta 34.–48. punktā.

PROCEDŪRA

Šūnu līnijas

7. Testam izmanto stabili transficēto šūnu līniju hER α -HeLa-9903. Šūnu līniju var iegūt no Japānas Pētniecības bioresursu kolekcijas (JCRB) šūnu bankas¹³, parakstot materiālu nodošanas līgumu.
8. Testēšanā izmanto tikai tādas šūnas, kas nesatur mikoplazmu. Vislabākā un jutīgākā metode, kā noteikt inficēšanos ar mikoplazmu, ir RT-PCR (polimerāzes ķēdes reakcija reāllaikā) (4) (5) (6).

Šūnu līnijas stabilitāte

9. Lai kontrolētu šūnu līnijas stabilitāti, agonista testā par references standartu izmanto E2, 17 α -estradiolu, 17 α -metiltestosteronu un kortikosteronu; tāpat vismaz vienu reizi testa veikšanas laikā mēra visu koncentrācijas–atbildreakcijas līkni pie 1. tabulā norādītajām testa koncentrācijām, un iegūtajiem rezultātiem jābūt saskanīgiem ar 1. tabulā norādītajiem rezultātiem.
10. Antagonista testā vienlaikus paralēli katrai testa izpildes reizei mēra arī divu references standartu — tamoksifēna un flutamīda — pilnas koncentrācijas līknes. Pārlicinās, vai abu ķīmikāliju kvalitatīvā klasifikācija (pozitīvs vai negatīvs) ir pareiza.

¹³ JCRB Cell Bank: National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Asagi Saito, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Japan, fakss: +81-72-641-9812

Šūnu kultivēšanas un uzsēšanas apstākļi

11. Šūnas uztur fenolsarkano nesaturošā Īgla minimālajā barotnē (EMEM), kas papildināta ar 60 mg/l antibiotiku (kanamicīnu) un 10 % liellopu embriju serumu, kurš apstrādāts ar dekstrāna pārklātu ogli (DCC-FBS), CO₂ inkubatorā (5 % CO₂) 37±1°C temperatūrā. Kad sasniegta 75 -90 % konfluence, šūnas var sadalīt 10 ml subkultūrās, kas satur 0,4 x 10⁵ – 1 x 10⁵ šūnas/ml, kultivēšanas trauciņos, kuru diametrs ir 100 mm. Šūnas suspendē 10 % FBS-EMEM barotnē (kas ir līdzvērtīga EMEM un DCC-FBS barotnei) un tad uzsēj mikroplates iedobēs tā, lai blīvums būtu 1 x 10⁴ šūnas/(100 µl x iedobe). Tad pirms eksponēšanas ķimikālijai šūnas 3 stundas preinkubē 5% CO₂ inkubatorā 37±1°C temperatūrā. Plastmasas materiālos nedrīkst notikt nekāda estrogēniska aktivitāte.
12. Lai saglabātu reakcijas integritāti, šūnas audzē vairākās pasāžās no sasaldēta krājuma kondicionētā barotnē, un pasāžu skaits nedrīkst pārsniegt 40. Attiecībā uz šūnu līniju hERα-HeLa-9903 tas būs mazāk par trim mēnešiem. Tomēr, ja šūnas audzē nepienācīgos kultivēšanas apstākļos, šūnu sniegums var pasliktināties.
13. DCC-FBS var vai nu sagatavot tā, kā aprakstīts 2.2. papildinājumā, vai iegūt no komerciāliem avotiem.

Pieņemamības kritēriji

Pozitīvi un negatīvi references standarti ER agonistu testā

14. Pirms pētījuma un tā laikā ir jāverificē testa sistēmas reaģētspēja, izmantojot stipru estrogēnu (E2), vāju estrogēnu (17α-estradiolu), ļoti vāju agonistu (17α-metiltestosteronu) un negatīvu vielu (kortikosteronu) piemērotā koncentrācijā. 1. tabulā sniegts pieņemamo vērtību diapazons, kas sagatavots validācijas pētījuma (1) gaitā. Šos 4 paralēlos references standartus iekļauj katrā eksperimentā, un rezultātiem jāietilpst dotajās pieņemamajās robežās. Ja tā nav, tad jānoskaidro, kāpēc pieņemamības kritēriji nav izpildīti (iemesli var būt, piem., manipulācijas ar šūnām vai seruma un antibiotiku kvalitāte un koncentrācija), un tests jāatkārto. Ja pieņemamības kritēriji ir izpildīti, tad ļoti svarīga ir šūnu kultivēšanas materiālu konsekventa izmantošana, lai nodrošinātu minimālu EC₅₀, PC₅₀ un PC₁₀ vērtību mainību. Četri paralēlie references standarti, kas jāiekļauj katrā eksperimentā (ko veic identiskos apstākļos, tostarp ar tādiem pašiem materiāliem, šūnu pasāžas līmeni un laborantiem), var nodrošināt testa jutību, jo pieņemamā diapazonā jābūt gan trīs pozitīvo references standartu PC₁₀, gan PC₅₀ un EC₅₀ vērtībām, ja tās var aprēķināt (sk. 1. tabulu).

1. tabula. ER agonista testa četru references standartu pieņemamo vērtību diapazons

Nosaukums	logPC ₅₀	logPC ₁₀	logEC ₅₀	Hilla virziena	Testa diapazons
17β-estradiols (E2) CAS Nr.: 50-28-2	-11,4~-10,1	<-11	-11,3~-10,1	0,7~1,5	10 ⁻¹⁴ ~10 ⁻⁸ M
17α-estradiols	-9,6~-8,1	-10,7~-9,3	-9,6~-8,4	0,9~2,0	10 ⁻¹² ~10 ⁻⁶ M

CAS Nr.: 57-91-0					
Kortikosterons CAS Nr.: 50-22-6	–	–	–	–	$10^{-10} \sim 10^{-4} \text{M}$
17 α -metilttestosterons CAS Nr.: 58-18-4	-6,0~-5,1	-8,0~-6,2	–	–	$10^{-11} \sim 10^{-5} \text{M}$

Pozitīvi un negatīvi references standartu ER antagonistu testā

15. Pirms pētījuma un tā laikā ir jāverificē testa sistēmas reaģētspēja, izmantojot pozitīvu vielu (tamoksifēns) un negatīvu vielu (flutamīds) piemērotā koncentrācijā. 2. tabulā sniegts pieņemamo vērtību diapazons, kas sagatavots validācijas pētījuma (1) gaitā. Šos divus paralēlos references standartus iekļauj katrā eksperimentā, un rezultāti ir pareizi jānovērtē atbilstīgi kritērijiem. Ja tā nav, tad jānoskaidro, kāpēc kritēriji nav izpildīti (iemesli var būt, piem., manipulācijas ar šūnām vai seruma un antibiotiku kvalitāte un koncentrācija), un tests jāatkārto. Bez tam jāaprēķina arī pozitīvās vielas (tamoksifēna) IC_{50} vērtības, un rezultātiem ir jāietilpst dotajās pieņemamības robežās. Ja pieņemamības kritēriji ir izpildīti, tad ļoti svarīga ir šūnu kultivēšanas materiālu konsekventa izmantošana, lai nodrošinātu minimālu IC_{50} vērtību mainību. Divi paralēlie references standartu, kas jāiekļauj katrā eksperimentā (ko veic identiskos apstākļos, tostarp ar tādiem pašiem materiāliem, šūnu pasāžas līmeni un laborantiem), var nodrošināt testa jutību (sk. 2. tabulu).

2. tabula. ER antagonista testa divu references standartu pieņemamo vērtību diapazons

Nosaukums	Kritēriji	Log IC_{50}	Testa diapazons
Tamoksifēns CAS Nr.: 10540-29-1	Pozitīva: jāaprēķina IC_{50}	-5,942~-7,596	$10^{-10} \sim 10^{-5} \text{M}$
Flutamīds CAS Nr.: 13311-84-7	Negatīva: nav jāaprēķina IC_{30}	-	$10^{-10} \sim 10^{-5} \text{M}$

Pozitīvās kontroles un nesēja kontroles

16. ER agonista testa (1 nM, E2) un ER antagonista testa (10 μ M TAM) pozitīvās kontrole (PC) katrā platē jātestē vismaz trīskārši. Nesēju, kurā izšķīdina testējamo ķīmikāliju, testē kā nesēja kontroli (VC) katrā platē vismaz trīskārši. Papildus šai VC, ja PC izmanto citu nesēju, nevis testējamo ķīmikāliju, šī cita nesēja kontrole ir jātestē vismaz trīskārši tajā pašā platē kopā ar PC.

ER agonista testa kvalitātes kritēriji

- Pozitīvās kontroles (1 nM, E2) vidējai luciferāzes aktivitātei jābūt vismaz 4 reizes lielākai par vidējo VC katrā platē. Šis kritērijs izvēlēts, pamatojoties uz novērtēšanas parametru uzticamību validācijas pētījumā (vēsturiski 4 līdz 30 reizes).
- Kas attiecas uz testa kvalitātes kontroli, indukcijas palielinājums, kas atbilst paralēlās pozitīvās kontroles (1 nM, E2) PC_{10} vērtībai, par 1+2SN pārsniedz paralēlās nesēja kontroles

indukcijas vērtību (=1). PC_{10} vērtības var izrādīties nozīmīgas prioritizēšanas vajadzībām, proti, lai vienkāršotu vajadzīgo datu analīzi salīdzinājumā ar statistisko analīzi. Statistiskā analīze sniedz informāciju par nozīmību, tomēr tā tā nav kvantitatīvs parametrs attiecībā uz koncentrācijas potenciālu, tāpēc tas prioritizēšanā ir mazāk noderīgs.

ER antagonista testa kvalitātes kritēriji

19. Pastiprinātās kontroles (25 nM, E2) vidējai luciferāzes aktivitātei jābūt vismaz 4 reizes lielākai par vidējo VC katrā platē. Šis kritērijs izvēlēts, pamatojoties uz novērtēšanas parametru uzticamību validācijas pētījumā.
20. Kas attiecas uz testa kvalitātes kontroli, 1 nM, E2 relatīvajai transkripcionālai aktivācijai (RTA) jābūt lielākai par 100%, RTA 1 μ M 4-hidroksitamoksifēna (OHT) RTA jābūt mazākai par 40,6% un 100 μ M digitonīna (Dig) RTA jābūt mazākai par 0%.

Laboratorijas kvalifikācijas pierādīšana (sk. 14. punktu un 3. un 4. tabulu sadaļā “ER TA TESTA KOMPONENTI”).

Nesējs

21. Par paralēlo VC izmanto dimetilsulfoksīdu (DMSO) vai piemērotu šķīdinātāju tādā pašā koncentrācijā, kādu izmanto pozitīvajām un negatīvajām kontrolēm un testējamām ķīmikālijām. Testa ķīmikālijas izšķīdina tādā šķīdinātājā, kurā attiecīgā testējamā ķīmikālija šķīst un kurš ir sajaukams ar šūnu barotni. Piemēroti nesēji ir ūdens, etanols (tīrība 95 -100 %) un DMSO. Ja izmanto DMSO, tā saturs nedrīkst pārsniegt 0,1 % (tilp./tilp.). Par katru nesēju ir jāpierāda, ka maksimālais izmantotais tilpums nav citotoksisks un neietekmē testa veikšanu.

Testējamo ķīmikāliju sagatavošana

22. Parasti testējamās ķīmikālijas izšķīdina DMSO vai citā piemērotā šķīdinātājā; iegūto šķīdumu pēc tam vairākkārt atšķaida ar to pašu šķīdinātāju attiecībā 1:10, un iegūto atšķaidījumu izmanto atšķaidīšanai ar barotni.

Šķīdība un citotoksicitāte Apsvērumi par diapazona noteikšanu

23. Ir jāveic sākotnējais tests, lai noteiktu katras testējamās ķīmikālijas koncentrācijas diapazonu un noteiktu, vai testējamā ķīmikālija varētu uzrādīt kādas šķīdības vai citotoksicitātes problēmas. Sākumā ķīmikālijas testē līdz maksimālajai koncentrācijai 1 μ l/ml, 1 mg/ml vai 1 mM, atkarībā no tā, kura ir viszemākā. Pamatojoties uz sākotnējā testā novēroto citotoksicitāti vai nešķīdību, pirmajā galīgā testa izpildes reizē ķīmikāliju testē sērijveida logaritmiskos atšķaidījumos, sākot ar augstāko pieņemamo koncentrāciju (piem., 1 mM, 100 μ M, 10 μ M utt.), un vēro, kad šķīdums kļūst duļķains vai rada nogulsnes. Koncentrācijas otrajā un, ja vajadzīgs, trešajā izpildes reizē pēc vajadzības pielāgo nolūkā labāk raksturot koncentrācijas-atbildreakcijas līkni un izvairīties no koncentrācijām, pie kurām ķīmikālija izrādījusies nešķīstoša vai pārmērīgu citotoksicitāti izraisoša.

24. Kas attiecas uz ER agonistiem un antagonistiem, datus interpretējot, ņem vērā to, ka pieaugošs citotoksicitātes līmenis var mainīt vai izslēgt tipisku sigmoidālu atbildreakciju. Jāizmanto tādas citotoksicitātes testēšanas metodes, kas var sniegt informāciju par 80 % šūnu dzīvotspēju, izmantojot piemērotu, laboratorijā apstiprinātu testu.
25. Ja citotoksicitātes testa rezultāti liecina, ka testējamās ķīmikālijas koncentrācija ir šūnu skaitu samazinājusi par 20 % vai vairāk, šī koncentrācija ir uzskatāma par citotoksisku, un visas koncentrācijas, kas ir vienādas ar vai lielākas par šo robežvērtību, no novērtējuma izslēdz.

Eksponēšana ķīmikālijai un izkārtojums testa platē

26. Ķīmikāliju atšķaidīšanās (1. un 2. etaps) un šūnu eksponēšanas (3. etaps) procedūra var būt šāda.

1. etaps. Katru testa ķīmikāliju seriāli atšķaida DMSO vai piemērotā šķīdinātājā un ievieto mikrotitrēšanas plātes iedobēs tā, lai sasniegtu tādas galīgās seriālās koncentrācijas, kādas noteiktas sākotnējā diapazona noteikšanas testā (parasti, piemēram, šādās sērijās: 1 mM, 100 μM, 10 μM, 1 μM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM, and 10 pM (10^{-3} - 10^{-11} M)) trīskāršai testēšanai.

2. etaps. Ķīmikāliju atšķaidīšana: Vispirms 1,5 μl testējamās ķīmikālijas atšķaida šķīdinātājā, lai iegūtu 500 μl barotnes.

3. etaps. Šūnu ķīmiskā ekspozīcija: 50 μl no 2. etapā sagatavotā atšķaidījuma ievieto testa iedobē, kas satur 10^4 šūnas/100 μl/iedobē.

Ieteicamais galīgais barotnes tilpums katrā iedobē ir 150 μl. Testa paraugu un references standartu sadalījums var būt tāds, kāds redzams 3. un 4. tabulā.

3. tabula. References standartu koncentrāciju sadalījums ER agonista testa platē

Rinda	17α-metiltestosterons			Kortikosterons			17α-estradiols			E2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 μM)	→	→	100 μM	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→
B	konc. 2 (1 μM)	→	→	10 μM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	konc. 7 (10 pM)	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: nesēja kontrole (0,1% DMSO); PC: pozitīvā kontrole ((1 nM, E2)

27. References standartos (E2, 17α-estradiols, 17-μεтилτεστοστερονσ υν κορτικοστερονσ) τεστ| κατρ® ιζπιλδεσ ρειζ| (3.□ταβυλα). Katrā testa platē iekļauj arī iedobes, kas satur PC, kura apstrādāta ar 1 nM no E2 un spēj izraisīt maksimālu E2 inducēšanu, un iedobes, kas satur VC, kura apstrādāta tikai ar DMSO (vai

piemērotu šķīdinātāju (4. tabula). Ja vienā eksperimentā izmanto šūnas no dažādiem avotiem (piem., atšķirīgs pasāžu skaits vai atšķirīgas partijas utt.), tad references standartus testē ar katru šūnu avotu.

4. tabula. Testējamo ķīmikāliju un plates kontroles ķīmikāliju koncentrāciju sadalījums ER agonista testa platē

Rinda	Testējamā ķīmikālija 1			Testējamā ķīmikālija 2			Testējamā ķīmikālija 3			Testējamā ķīmikālija 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 μ M)	→	→	1 mM	→	→	1 μ M	→	→	10 nM	→	→
B	konc. 2 (1 μ M)	→	→	100 μ M	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	10 μ M	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	1 μ M	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	10 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	konc. 7 (10 pM)	→	→	1 nM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: nesēja kontrole (0,1% DMSO); PC: pozitīvā kontrole ((1 nM, E2)

5. tabula. References standartu koncentrāciju sadalījums ER antagonistu testa platē

Rinda	Tamoksifēns			Flutamīds			Testējamā ķīmikālija 1			Testējamā ķīmikālija 2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 μ M)	→	→	10 μ M	→	→	10 μ M	→	→	10 μ M	→	→
B	konc. 2 (1 μ M)	→	→	1 μ M	→	→	1 μ M	→	→	1 μ M	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1% DMSO	→	→	→	→	→	1 μ M OHT	→	→	100 μ M Dig	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: nesēja kontrole (0,1% DMSO); PC: pozitīvā kontrole (1 nM, E2), OHT :4-hidroksitamoksifēns, Dig: digitonīns.

 = pastiprināts ar 25pM, E2

28. Lai novērtētu ķīmikāliju antagonistisko aktivitāti, iedobēs, kas atrodas A līdz G rindā, pievieno 25pM, E2. References standartus (tamoksifēns un flutamīds) testē katrā izpildes reizē. Katrā testa platē iekļauj arī iedobes ar PC, kas apstrādātas ar 1 nM, E2 un var kalpot par šūnu līnijas hER α -HeLa-9903 kvalitātes kontroli, iedobes ar VC, kas apstrādātas ar DMSO (vai piemērotu šķīdinātāju), iedobes ar 0,1% DMSO, kas apstrādātas ar DMSO, kas pievienots E2 pastiprinātajai koncentrācijai, kura atbilst “pastiprinātajai kontrolei”, iedobes ar 1 μ M OHT galīgajā koncentrācijā un iedobes ar 100 μ M Dig (5. tabula). Pārējās testa platēs izkārtējums ir tāds pats, taču netiek iekļautas references standartu iedobes (6. tabula). Ja vienā

eksperimentā izmanto šūnas no dažādiem avotiem (piem., atšķirīgs pasāžu skaits vai atšķirīgas partijas utt.), tad references standartus testē ar katru šūnu avotu.

6. tabula. Testējamo ķīmikāliju un plates kontroles ķīmikāliju koncentrāciju sadalījums ER antagonista testa platē

Rinda	Testējamā ķīmikālija 1			Testējamā ķīmikālija 2			Testējamā ķīmikālija 3			Testējamā ķīmikālija 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 μ M)	→	→	10 μ M	→	→	10 μ M	→	→	10 μ M	→	→
B	konc. 2 (1 μ M)	→	→	1 μ M	→	→	1 μ M	→	→	1 μ M	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1% DMSO	→	→	→	→	→	1 μ M OHT	→	→	100 μ M Dig	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: nesēja kontrole (0,1% DMSO); PC: pozitīvā kontrole (1 nM, E2); OHT: 4-hidroksitamoksifēns, Dig: digitonīns

 : pastiprināts ar 25pM, E2

29. Pienācīgi jāpārlicinās, ka nav nekādu malas efektu; ja ir aizdomas, ka malas efekti varētu rasties, izkārtojums platē ir jāmaina, lai tos novērstu, piemēram, malās esošās iedobes var atstāt tukšas.
30. Pēc ķīmikāliju pievienošanas testa plates 20-24 h inkubē 5% CO₂ inkubatorā 37±1°C temperatūrā, lai inducētu reportierģēnu produktu veidošanos.
31. Īpaša uzmanība jāpievērš sevišķi gaistošiem savienojumiem. Tādos gadījumos tuvumā esošās kontroliedobes var dot pseidopozitīvus rezultātus, un tie būtu jāsalīdzina ar gaidītajām un vēsturiskajām kontrolvērtībām. Nedaudzajos gadījumos, kad gaistamība var izrādīties problemātiska, ieteicams izmantot iedobju aizlīmes, kas ļauj testēšanas laikā efektīvi izolēt atsevišķas iedobes.
32. Lai nodrošinātu rezultātu neatkarību, galīgos testus ar to pašu ķīmikāliju atkārti dažādās dienās.

Luciferāzes tests

33. Šajā testā var izmantot tirdzniecībā pieejamus luciferāzes testa reaģentus [piem., luciferāzes testa sistēmu Steady-Glo® (Promega, E2510 vai līdzvērtīgs)] vai standarta luciferāzes testa sistēmu (Promega, E1500 vai līdzvērtīgs), ar nosacījumu, ka tiek izpildīti pieņemamības kritēriji. Testa reaģentus izvēlās atkarībā no izmantojamā luminometra jutības. Ja izmanto standarta luciferāzes testa sistēmu, pirms substrāta pievienošanas izmanto šūnu kultūras līzes

reaģentu (piem., Promega, E1531 vai līdzvērtīgs). Luciferāzes reaģentu lieto saskaņā ar ražotāja norādījumiem.

DATU ANALĪZE

ER agonista tests

34. ER agonista testa gadījumā relatīvo transkripcionālo aktivitāti attiecībā pret PC (1 nM, E2) iegūst, analizējot luminiscences signālus tajā pašā platē šādos etapos (ir pieņemamas arī līdzvērtīgas matemātiskās darbības):

1. etaps. Aprēķina VC vidējo vērtību.

2. etaps. Datu normalizācijas nolūkā šo VC vidējo vērtību atskaita no vērtības, kas iegūta attiecībā uz katru iedobi.

3. etaps. Aprēķina normalizētās PC vidējo vērtību.

4. etaps. Plates katras iedobes normalizēto vērtību dala ar normalizētās PC vidējo vērtību (PC=100 %).

Attiecībā uz karu iedobi iegūtā vērtība atbilst šīs iedobes transkripcionālajai aktivitātei salīdzinājumā ar PC atbildreakciju.

5. etaps. Aprēķina testējamās ķimikālijas katras koncentrāciju grupas relatīvās transkripcionālās aktivitātes vidējo vērtību. Iegūtais rezultāts liecina par vidējo transkripcionālo aktivitāti (atbildreakcija) un par to, pie kādas koncentrācijas šī atbildreakcija tiek inducēta (sk. nākamo sadaļu).

EC₅₀, PC₅₀ un PC₁₀ inducēšanas noteikšana

35. Lai aprēķinātu EC₅₀, ir vajadzīga pilnīga koncentrācijas-atbildreakcijas līkne, tomēr tas ne vienmēr ir iespējami vai lietderīgi, jo var pastāvēt zināmi koncentrācijas diapazona ierobežojumi (piemēram, citotoksicitātes vai šķīdības problēmu dēļ). Tomēr, tā kā EC₅₀ un maksimālais inducēšanas līmenis (kas atbilst Hilla vienādojuma maksimālajai vērtībai) ir informatīvi parametri, tie parametri pēc iespējas būtu jānorāda. EC₅₀ un maksimālā inducēšanas līmeņa aprēķinā jāizmanto piemērota statistiskā programmatūra (piem., *Graphpad Prism*). Ja datiem par koncentrāciju un atbildreakciju ir piemērojams Hilla logistiskais vienādojums, EC₅₀ aprēķina ar šādu vienādojumu(7):

$Y = \text{bāzes punkts} + (\text{virsošnes punkts} - \text{bāzes punkts}) / (1 + 10^{\exp((\log EC_{50} - X) \times \text{Hilla virziena koeficients}))}$ kur:

X ir koncentrācijas logaritms; un

Y ir reakcija; to mēra no sigmoidālās līknes bāzes līdz virsotnei. Hilla logistiskajā vienādojumā

bāzes punkts ir nulle.

36. Par katru testējamo ķīmikāliju sniedz šādus datus:

RPC_{Max} , kas ir testa ķīmikālijas inducētās atbildreakcijas maksimālais līmenis un ko izsaka procentos no 1 nM, E2 inducētās atbildreakcijas rajā pašā platē, kā arī PC_{Max} (koncentrācija, kas atbilst RPC_{Max}); un

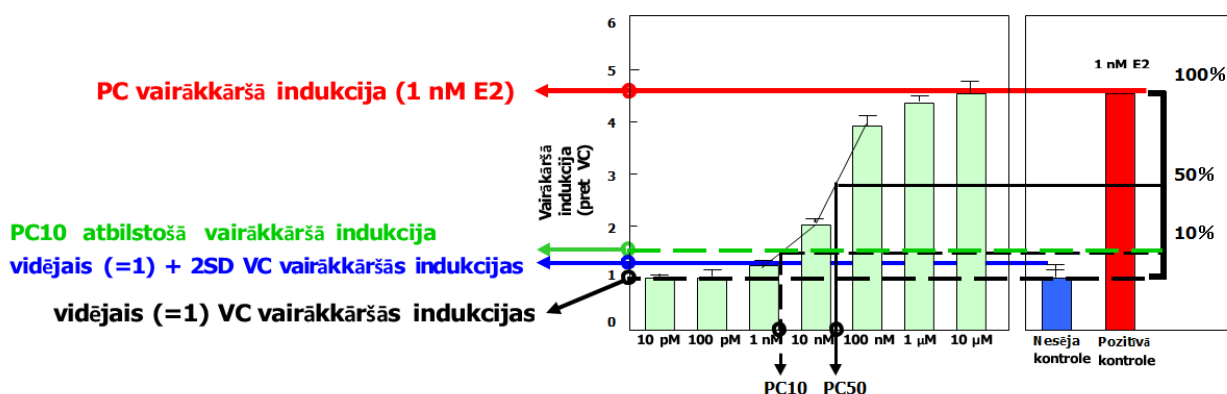
ja ķīmikālijas ir pozitīvas — koncentrācijas, kas inducē PC_{10} un attiecīgā gadījumā PC_{50} .

37. PC_x vērtību var aprēķināt, interpolējot starp 2 punktiem uz X-Y līknes, no kuriem viens atrodas uzreiz virs, bet otrs uzreiz zem PC_x vērtības. Ja datu punktiem, kas atrodas uzreiz virs un uzreiz zem PC_x vērtības, ir koordinātas attiecīgi (a,b) un (c,d), tad PC_x vērtību var aprēķināt ar šādu vienādojumu:

$$\log[PC_x] = \log[c] + (x-d)/(d-b)$$

38. PC vērtību apraksts sniegts 1. attēlā.

1. attēls. PC vērtību atvasināšanas piemērs. PC (1 nM, E2) ir katrā testa platē



ER antagonista tests

39. ER antagonista testa gadījumā relatīvo transkripcionālo aktivitāti (RTA) attiecībā pret pastiprināto kontroli (25 pM, E2) iegūst, analizējot luminiscences signālus tajā pašā platē šādos etapos (ir pieņemamas arī līdzvērtīgas matemātiskās darbības):

1. etaps. Aprēķina VC vidējo vērtību.

2. etaps. Datu normalizācijas nolūkā šo VC vidējo vērtību atskaita no vērtības, kas iegūta attiecībā uz katru iedobi. 3. etaps. Aprēķina normalizētās pastiprinātās kontroles vidējo vērtību.

4. etaps. Plates katras iedobes normalizēto vērtību dala ar normalizētās pastiprinātās kontroles vidējo vērtību (pastiprinātā kontrole=100 %).

Attiecībā uz katru iedobi iegūtā vērtība atbilst šīs iedobes transkripcionālajai aktivitātei salīdzinājumā ar pastiprinātās kontroles atbildreakciju.

5. etaps. Aprēķina katras koncentrāciju grupas relatīvās transkripcionālās aktivitātes vidējo vērtību.

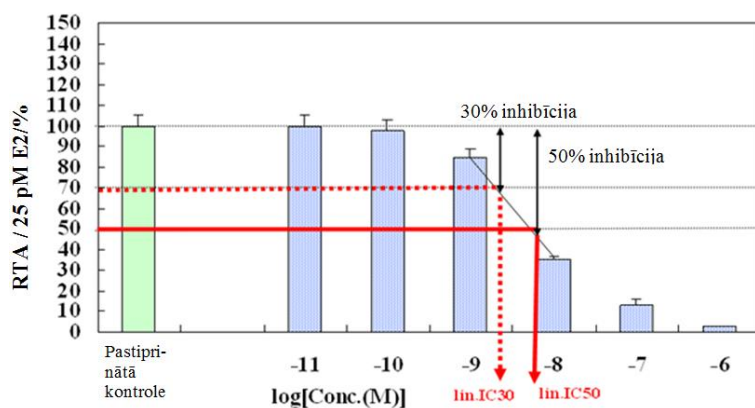
IC₃₀ and IC₅₀ inducēšanas noteikšana

40. Ja ķimikālijas ir pozitīvas — koncentrācijas, kas inducē IC₃₀ un attiecīgā gadījumā IC₅₀.

41. IC_x vērtību var aprēķināt, interpolējot starp 2 punktiem uz X-Y līknes, no kuriem viens atrodas uzreiz virs, bet otrs uzreiz zem IC_x vērtības. Ja datu punktiem, kas atrodas uzreiz virs un uzreiz zem IC_x vērtības, ir koordinātas attiecīgi (c,d) un (a,b), tad IC_x vērtību var aprēķināt ar šādu vienādojumu:

$$\ln IC_x = a - (b - (100 - x)) (a - c) / (b - d)$$

2. attēls. IC vērtību atvasināšanas piemērs. Pastiprinātā kontrole (25 pM, E2) ir katrā testa platē



RTA: relatīvā transkripcionālā aktivitāte

42. Rezultātu pamatā ir divas (vai trīs) neatkarīgas izpildes reizes. Ja divās izpildes reizēs tiek iegūti salīdzināmi un līdz ar to reproducējami rezultāti, nav nepieciešams testu izpildīt vēl trešo reizi. Rezultāti ir pieņemami, ja tie:

- atbilst pieņemamības kritērijiem (sk. sadaļu “Pieņemamības kritēriji”, 14.-20. punkts),
- ir reproducējami.

Datu interpretācijas kritēriji

7. tabula. Pozitīvu un negatīvu rezultātu interpretācijas kritēriji ER agonistu testā

Pozitīvs	Ja ir iegūta tāda RPC_{Max} vērtība, kas ir vienāda ar vai lielāka par 10 % no pozitīvās kontroles atbildreakcijas vismaz divās no divām vai divās no trijām izpildes reizēm.
Negatīvs	Ja RPC_{Max} vērtība nesasniedz vismaz 10 % no pozitīvās kontroles atbildreakcijas vismaz divās no divām vai divās no trijām izpildes reizēm.

8. tabula. Pozitīvu un negatīvu rezultātu interpretācijas kritēriji ER antagonistu testā

Pozitīvs	Ja IC_{30} ir aprēķināta vismaz divās no divām vai divās no trijām izpildes reizēm.
Negatīvs	Ja IC_{30} nav aprēķināta divās no divām vai divās no trijām izpildes reizēm.

43. Datu interpretācijas kritēriji ir redzami 7. un 8. tabulā. Pozitīvos rezultātus raksturo gan ietekmes intensitāte, gan koncentrācija, pie kuras novērojama ietekme. Šo divējādo mērķi iespējams sasniegt, ja rezultātus izsaka kā koncentrāciju, pie kuras agonista testā sasniedz 50 % (PC_{50}) vai 10 % (PC_{10}) no PC vērtībām un antagonistu testā 50 % (IC_{50}) vai 30% (IC_{30}) no pastiprinātās kontroles vērtībām tiek inhibētas. Testējamo ķīmikāliju uzskata par pozitīvu, ka testējamās ķīmikālijas inducētā maksimālā atbildreakcija (RPC_{Max}) ir vienāda ar vai lielāka par 10 % no PC atbildreakcijas vismaz divās no divām vai divās no trijām izpildes reizēm, un par negatīvu, ja RPC_{Max} nesasniedz vismaz 10 % no pozitīvās kontroles atbildreakcijas vismaz divās no divām vai divās no trijām izpildes reizēm.

44. PC_{10} , PC_{50} un PC_{Max} ER agonista testā un IC_{30} un IC_{50} ER antagonistu testā var aprēķināt, izmantojot izklājlapu, kas pieejama kopā ar šīm testēšanas vadlīnijām ESAO publiskajā vietnē¹.

¹ <http://www.oecd.org/env/testguidelines>

45. PC_{10} vai PC_{50} un IC_{30} vai IC_{50} vērtību noteikšanai ir pietiekami testu atkārtot divreiz. Tomēr, ja datu bāzlīnija tajā pašā koncentrāciju diapazonā uzrāda pārlietu augstu variācijas koeficientu (VK, %), šos datus nevar uzskatīt par ticamiem un ir jānoskaidro šādu variāciju iemesls. To triplicēto jēldatu (t.i., luminiscences intensitātes datu) variācijas koeficientam, kurus izmanto kā datu punktus PC_{10} aprēķinā, ir jābūt mazākam par 20 %.
46. Ja ir izpildīti pieņemamības kritēriji, tas nozīmē, ka testa sistēma darbojas pareizi, tomēr tas negarantē, ka konkrētajā izpildes reizē tiks iegūti pareizi dati. Labākais pierādījums iegūto datu pareizībai ir pirmās izpildes reizes rezultātu duplīcēšana.
47. ER agonista testa gadījumā, kur ir nepieciešama plašāka informācija papildus tai, kas vajadzīga šajās vadlīnijās paredzētajam skrīningam un prioritizēšanai attiecībā uz pozitīvām testējamām ķīmikālijām, jo īpaši PC_{10} - PC_{49} ķīmikālijām, kā arī ķīmikālijām, par kurām ir aizdomas, ka tās varētu pārlietu stimulēt luciferāzi, apstiprinājumu tam, ka novērotā luciferāzes aktivitāte ir tikai $ER\alpha$ specifiska atbildreakcija, var gūt, izmantojot $ER\alpha$ antagonistu (sk. 2.1. papildinājumu).

TESTĒŠANAS PĀRSKATS

48. Sk. 20. punktu sadaļā "ER TA TESTA KOMPONENTI".

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. papildinājums

PSEIDOPOZITĪVI REZULTĀTI: NOVĒRTĒJUMS PAR RECEPTORU NEMEDIĒTIEM LUMINISCENCES SIGNĀLIEM

1. ER agonista testā pseidopozitīvus rezultātus var dot vai nu ER nemediēta luciferāzes gēna aktivācija, vai gēna produkta tieša aktivācija, vai nesaistīta fluorescence. Par šādu efektu liecina nepilnīga vai neparasta devas-atbildreakcijas līkne. Ja rodas šādas aizdomas, izvērtē, kāda ietekme uz atbildreakciju ir ER antagonistam (piem., 4-hidroksitamoksifēnam (OHT)) netoksiskās koncentrācijās. Šim nolūkam var nebūt derīgs tīrais antagonists ICI 182780, jo pienācīga ICI 182780 koncentrācija var samazināt VK vērtību, bet tas savukārt ietekmē datu analīzi.
2. Lai garantētu šādas pieejas derīgumu, tajā pašā platē jātestē šādi elementi:
 - nezināmās ķimikālijas agonistiskā aktivitāte ar OHT (10 μ M) un bez tā;
 - VK (trīsreiz)
 - OHT (trīsreiz)
 - 1 nM, E2 (trīsreiz) kā agonista PC
 - 1 nM, E2 + OHT (trīsreiz)

Datu interpretācijas kritēriji

Piezīme. Visās iedobēs nesējs ir tādā pašā koncentrācijā.

- Ja nezināmās ķimikālijas agonistisko aktivitāti NEIETEKMĒ apstrāde ar ER antagonistu, rezultātu uzskata par “negatīvu”.
- Ja nezināmās ķimikālijas agonistiskā aktivitāti ir pilnībā inhibēta, piemēro interpretācijas kritērijus.
- Ja agonistiskā aktivitāte pie zemākās koncentrācijas ir vienāda vai lielāka par PC_{10} , nezināmās ķimikālijas atbildreakcija ir inhibēta tādā pašā vai lielākā mērā kā PC_{10} atbildreakcija. Aprēķina starpību starp atbildreakcijām ar ER antagonistu apstrādātās un neapstrādātās iedobēs; šo starpību uzskata par patieso atbildreakciju un izmanto, lai aprēķinātu parametrus, kas nepieciešami ķimikālijas klasificēšanai.

Datu analīze

Pārbauda veikspējas standartu.

Pārbauda VK starp iedobēm, kas apstrādātas vienādos apstākļos.

1. Aprēķina VK vidējo vērtību.
2. Šo VK vidējo vērtību atskaita no katras ar **OHT** neapstrādātās iedobes vērtības.
3. Aprēķina OHT vidējo vērtību.
4. Šo VK vidējo vērtību atskaita no katras ar OHT apstrādātās iedobes vērtības.
5. Aprēķina PC vidējo vērtību.
6. Aprēķina visu pārējo iedobju relatīvo transkripcionālo aktivitāti attiecībā pret PC.

2.2. papildinājums

AR DCC (AR DEKSTRĀNU PĀRKLĀTA OGLE) APSTRĀDĀTA SERUMA SAGATAVOŠANA

1. Seruma apstrādāšana ar DCC (ar dekstrānu pārklāta ogle) plaši izmantots paņēmiens, kā no seruma atdalīt šūnu barotnei pievienotos estrogēniskos savienojumus, lai izslēgtu, ka atbildreakcija ir nobīdījies, jo serumā ir estrogēnu atliekas. Ar šo paņēmienu var apstrādāt 500 ml liellopu embriju seruma.

Sastāvdaļas

2. Nepieciešamie materiāli un aprīkojums

Materiāli

Aktīvā ogle

Dekstrāns

Magnija hlorīda heksahidrāts ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)

Saharoze

1 M HEPES buferšķīdums (pH 7,4)

Filtrācijas ceļā iegūts ultratīrs ūdens

Aprīkojums

Autoklāvēts stikla trauks (izmēru attiecīgi pielāgo) Parastā laboratorijas centrifūga (temperatūru iespējams iestatīt uz 4°C)

Procedūra

3. Šī procedūra domāta centrifūgas mēģenēm ar tilpumu 50 ml.

[1. diena] Ar dekstrānu pārklāto ogli suspendē 1 l ultratīrā ūdens, kam pievienots 1,5 mM MgCl_2 , 0,25 M saharozes, 2,5 g ogles, 0,25 g dekstrāna un 5 mM HEPES; maisa 4°C visu nakti.

[2. diena] Suspensiju salej 50 ml centrifūgas mēģenēs un 10 minūtes centrifugē ar 10000 apgr./min. 4°C temperatūrā. Atdala supernatantu, un pusi no ogles nogulsnēm atliek 4°C temperatūrā izmantošanai 3. dienā. Atlikušo pusi suspendē FBS, kas ir lēni atkausēts (lai nepieļautu izgulsnēšanos) un pēc tam 30 minūtes 56°C temperatūrā inaktivēts; pārlej autoklāvētā stikla traukā (piem., Erlenmeijera kolbā). Šo suspensiju atstāj uz nakti un lēni maisa 4°C temperatūrā.

[3. diena.] FBS suspensiju salej centrifūgas mēģenēs un 10 minūtes centrifugē ar 10000 apgr./min. 4°C temperatūrā. Savāc FBS un pārlej to 2. dienā sagatavotajās un atliktajās ogles nogulsnēs. Šīs ogles nogulsnes suspendē FBS un uz nakti lēni maisa 4 °C temperatūrā.

[4. diena.] Šo suspensiju salej mēģenēs, 10 min. centrifugē pie 10000 apgr./min. 4°C temperatūrā; supernatantu sterilizē, filtrējot caur 0,2 µm sterilu filtru. Šo ar DCC apstrādāto FBS glabā -20°C temperatūrā, un tas ir jāizmanto gada laikā.

3. PAPILDINĀJUMS

VM7LUC ESTROGĒNA RECEPTORU TRANSAKTIVĀCIJAS TESTS ESTROGĒNA RECEPTORU AGONISTU UN ANTAGONISTU NOTEIKŠANAI

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI (SK. ARĪ VISPĀRĪGO IEVADU)

1. Šajā testā izmanto VM7Luc4E2 šūnu līniju¹. To ir apstiprinājis Alternatīvu toksikoloģisko metožu novērtēšanas nacionālās toksikoloģijas programmas starpaģentūru centrs (National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, NICEATM) un Alternatīvo metožu validēšanas starpaģentūru koordinācijas komiteja (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods, ICCVAM) (1). VM7Luc šūnu līnijas galvenokārt ekspresē endogēnos ER α un nelielu daudzumu endogēno ER β (2) (3) (4).
2. Šis tests ir izmantojams ļoti daudzām vielām, ja vien tās šķīst dimetilsulfoksīdā (DMSO; CAS Nr. 67-68-5), nereaģē ar DMSO vai šūnu kultūru un testējamajā koncentrācijā nav citotoksiskas. Ja DMSO izmantošana nav iespējama, var izmantot citu nesēju, piem., etanolu vai ūdeni (sk. 12. punktu). Pierādītā VM7Luc ER TA (ant)agonistu testa veikspēja liecina, ka ar šo testu iegūtie dati var sniegt informāciju par ER mediētiem darbības mehānismiem, un tos var izmantot, nosakot, kuras vielas testējamas prioritāri.
3. Šis tests ir īpaši paredzēts hER α un hER β mediētas TA noteikšanai, par mērījuma parametru izmantojot hemiluminiscenci. Hemiluminiscence tiek plaši izmantota biotestos, jo luminiscencei ir augsta signāla un fona attiecība (10). Tomēr vielas, kas inhibē luciferāzes fermentu, var radīt maldīgu priekšstatu par jāntārpiņu luciferāzes aktivitāti šūnu testos, proteīnu stabilizācijas dēļ izraisot šķietamu inhibīciju vai pastiprinātu luminiscenci (10). Turklāt dažos uz luciferāzi balstītos ER reportierģēnu testos ir novēroti receptoru nemediēti luminiscences signāli luciferāzes reportierģēna pārmērīgas aktivācijas dēļ, ja fītoestrogēnu koncentrācija ir lielāka par 1 μ M (9) (11). Lai gan devas–atbildreakcijas līkne liecina, ka ER sistēmas patiesā aktivācija rodas pie mazākām koncentrācijām, stabili transfēcētu ER TA

¹ Līdz 2016. gada jūnijam šo šūnu līniju sauca par BG1Luc šūnu līniju. BG-1 šūnas pirmoreiz aprakstīja Geisinger et al. (1998) (12), un pēc tam tās sīkāk raksturoja Nacionālā Vides veselības zinātņu institūta (NIEHS) pētnieki (13). Salīdzinoši nesen atklāts, ka pētnieki izmanto divus dažādus BG-1 šūnu variantus — BG-1 Fr un BG-1 NIEHS. Li un līdzstrādnieku veiktā padziļinātā analīzē (2014) (14) atklājās, ka BG-1 Fr ir unikāla un ka BG-1 NIEHS, t.i., sākotnējā šūnu līnija, ko izmantoja testa izstrādē, nav vis BG1 cilvēka olnīcu karcinomas šūnu līnija, bet gan MCF7 cilvēka krūts vēža šūnu līnijas variants. Testā izmantoto šūnu līniju, ko sākotnēji sauca par BG1Luc4E2 (15), tagad apzīmēs kā VM7Luc4E2 (“V” = variants; “M7” = MCF7 šūnas). Tāpat testu tagad apzīmēs kā VM7Luc ER TA. Lai gan mainās testa pamatā esošās šūnu līnijas izcelsme, tas neietekmē ne publicētos validācijas pētījumus, ne šā testa izmantošanas lietderību estrogēnisko/antiestrogēnisko ķīmikāliju skrīningā.

testu sistēmās rūpīgi jāpārbauda luciferāzes ekspresija, kas iegūta pie fitoestrogēnu vai tādu līdzīgu savienojumu, par kuriem ir aizdomas, ka tie rada fitoestrogēniem līdzīgu pārmērīgu luciferāzes reportiergēna aktivāciju, augstām koncentrācijām (see Appendix 2).

4. Pirms šā testa izmantošanas regulatīviem mērķiem ir jāizlasa sadaļa “VISPĀRĪGAIS IEVADS” un “ER TA TESTA KOMPONENTI”. Šajā testēšanas metodē izmantotās definīcijas un saīsinājumi ir aprakstīti 1. papildinājumā.

TESTA PRINCIPS (SK. ARĪ VISPĀRĪGO IEVADU)

5. Testu izmanto, lai norādītu ER ligandu saistīšanos, kam seko receptoru–ligandu kompleksa translokācija uz kodolu. Kodolā receptoru–ligandu komplekss saistās ar specifiskiem DNS atbildreakcijas elementiem un transaktivē reportiergēnu (*luc*), kā rezultātā veidojas luciferāze un pēc tam izstaro gaismu, kuru var kvantitatīvi noteikt ar luminometru. Luciferāzes aktivitāti var ātri un lēti izvērtēt ar vairākiem komerciāli pieejamiem testa komplektiem. VM7Luc ER TA testā izmanto uz ER reaģējošu cilvēka krūts adenokarcinomas šūnu līniju VM7, kas ir stabili transficēta ar jāntārpiņu *luc* reportiera konstrukt, ko regulē četri estrogēnu atbildreakcijas elementi, kas ievietoti pirms peles krūts audzēja vīrusa promotera (MMTV), lai noteiktu vielas, kas *in vitro* uzrāda ER agonistu vai antagonistu aktivitāti. Šim MMTV promoteram vērojama tikai neliela krusteniskā reakcija ar citiem steroīdajiem un nesteroīdajiem hormoniem (8). Datu interpretācijas kritēriji ir detalizēti aprakstīti 41. punktā. Īsumā, pozitīvu atbildreakciju raksturo tāda koncentrācijas–atbildreakcijas līkne, kurā ir vismaz trīs punkti, kur kļūdu joslas (vidējā vērtība $\pm$ standartnovirze) nepārklājas, kā arī tādas amplitūdas izmaiņas (normalizētā relatīvā gaismas vienība (RLU)), kas ir vismaz 20 % no references standarta maksimālās vērtības (17 β -estradiols [E2; CAS Nr. 50-28-2] agonistu testam, raloksifena HCl [Ral; CAS Nr. 84449-90-1]/E2 antagonistu testam).

PROCEDŪRA

Šūnu līnija

6. Testam izmanto stabili transficēto šūnu līniju VM7Luc4E2. Pašlaik šūnu līnija iegādājama tikai ar tehniskās licences līgumu no Kalifornijas universitātes Deivisā (University of

California, Davis), Kalifornijā, ASV¹, un no Xenobiotic Detection Systems Inc. Daramā, Ziemeļkarolīnā, ASV².

Šūnu līnijas stabilitāte

7. Lai saglabātu šūnu līnijas stabilitāti un integritāti, šūnas audzē vairākās pasāžās no sasaldēta krājuma šūnu uzturēšanas barotnē (sk. 9. punktu). Šūnas nedrīkst kultivēt vairāk nekā 30 pasāžās. VM7Luc4E2 šūnu līnijai 30 pasāžas nozīmē apmēram trīs mēnešus.

Šūnu kultivēšanas un uzsēšanas apstākļi

8. Jāievēro Norādījumos par labu šūnu kultivēšanas praksi (Guidance on Good Cell Culture Practice) (5) (6) norādītās procedūras, lai nodrošinātu visu materiālu un metožu kvalitāti un garantētu visa veiktā darba integritāti, derīgumu un reproducējamību.
9. VM7Luc4E2 šūnas tur RPMI 1640 barotnē, kam pievienots 0,9 % penicilīna–streptomicīna maisījums (Pen-Strep) un 8,0 % liellopu embriju serums (FBS), īpašā audu kultivēšanas inkubatorā 37 °C ± 1 °C temperatūrā, 90 % ± 5 % mitrumā un 5,0 % ± 1 % CO₂/gaisā.
10. Kad sasniegta ~80 % konfluence, VM7Luc4E2 šūnas 48 stundas subkultivē un kondicionē bezestrogēna vidē pirms šūnu uzsēšanas 96 iedobju platēs, lai eksponētu testējamām ķimikālijām un analizētu no estrogēna atkarīgo luciferāzes aktivitātes inducēšanu. Bezestrogēna barotne (EFM) satur Dulbeko modificēto Īgla barotni (DMEM) bez fenolsarkanā, kas papildināta ar 4,5 % ar ogli/dekstrānu apstrādātu FBS, 1,9 % L-glutamīnu un 0,9 % Pen-Strep. Nevienam plastmasas izstrādājumam nedrīkst būt estrogēniskas aktivitātes [sk. detalizēto protokolu (7)].

Pieņemamības kritēriji

11. Testa apstiprināšanas vai noraidīšanas pamatā ir novērtējums par rezultātiem, kas katrā 96 iedobju platē iegūti ar references standartiem un kontroli. Katru references standartu testē vairākās koncentrācijās, un ir vairāki katras references standarta un kontroles koncentrācijas paraugi. Rezultātus salīdzina ar kvalitātes kontrolēm (KK) šiem parametriem, kas iegūti no agonistu un antagonistu vēsturiskajām datubāzēm, ko katra laboratorija izveidojusi kompetences pierādīšanas laikā. Vēsturiskajās datubāzēs pastāvīgi tiek atjauninātas

¹ Michael S. Denison, Ph.D. Professor, Dept. of Environmental Toxicology, 4241 Meyer Hall, One Shields Ave, University of California, Davis, CA 95616, E: msdenison@ucdavis.edu, (530) 754-8649

² Xenobiotic Detection Systems Inc. 1601 East Geer Street, Suite S, Durham NC, 27704 USA, email: info@dioxins.com, Telephone: 919-688-4804, fakss: 919-688-4404

references standartu un kontroles vērtības. Ja mainās aprīkojums vai laboratorijas apstākļi, var būt nepieciešams izveidot atjauninātas vēsturiskās datubāzes.

Agonistu tests

Diapazona noteikšanas tests

- Inducēšana: nosaka inducēšanu platē, , vidējo augstāko E2 references standarta relatīvās gaismas vienības (RLU) vērtību dalot ar vidējo DMSO kontroles RLU vērtību. Parasti iegūst pieckāršu indukciju, taču eksperimentu uzskata par pieņemamu, ja indukcija ir vismaz četrkārtā vai lielāka.
- DMSO kontroles rezultāti: šķīdinātāja kontroles RLU vērtībām jābūt ne vairāk kā 2,5 reizes lielākām par vēsturiskās šķīdinātāja kontroles vidējās RLU vērtības standartnovirzi.
- Eksperiments, kas neatbilst kādam no pieņemamības kritērijiem, jāatmet un jāatkārto.

Visaptverošs tests

Te ietilpst pieņemamības kritēriji no agonistu diapazona noteikšanas testa un tālāk norādītie kritēriji.

- References standarta rezultāti. E2 references standarta koncentrācijas–atbildreakcijas līknei jābūt sigmoidālai un ar vismaz trim vērtībām koncentrācijas–atbildreakcijas līknes lineārajā daļā.
- Pozitīvās kontroles rezultāti. Metoksihlora kontroles RLU vērtībām jābūt lielākām par DMSO vidējo vērtību plus trīskāršu standartnovirzi no DMSO vidējās vērtības.
- Eksperiments, kas neatbilst pat vienam pieņemamības kritērijam, jāatmet un jāatkārto.

Antagonistu tests

Diapazona noteikšanas tests

- Samazinājums Samazinājumu platē nosaka, vidējo augstāko Ral/E2 references standarta RLU vērtību dalot ar vidējo DMSO kontroles RLU vērtību. Parasti iegūst pieckāršu samazinājumu, taču eksperimentu uzskata par pieņemamu, ja samazinājums ir vismaz trīskāršs.
- E2 kontroles rezultāti. E2 kontroles RLU vērtībām jābūt ne vairāk kā 2,5 reizes lielākām par vēsturiskās E2 kontroles vidējās RLU vērtības standartnovirzi.
- DMSO kontroles rezultāti: DMSO kontroles RLU vērtībām jābūt ne vairāk kā 2,5 reizes lielākām par vēsturiskās šķīdinātāja kontroles vidējās RLU vērtības standartnovirzi.
- Eksperiments, kas neatbilst pat vienam pieņemamības kritērijam, jāatmet un jāatkārto.

Visaptverošs tests

Te ietilpst pieņemamības kritēriji no antagonistu diapazona noteikšanas testa un tālāk norādītie kritēriji.

- References standarta rezultāti. Ral/E2 references standarta koncentrācijas–atbildreakcijas līknei jābūt sigmoidālai un ar vismaz trim vērtībām koncentrācijas–atbildreakcijas līknes lineārajā daļā.
- Pozitīvās kontroles rezultāti. Tamoksifēna/E2 kontroles RLU vērtībām jābūt mazākām par E2 kontroles vidējo vērtību mīnus trīskāršu standartnovirzi no E2 kontroles vidējās vērtības.
- Eksperiments, kas neatbilst pat vienam pieņemamības kritērijam, jāatmet un jāatkārto.

References standarti, pozitīvās un nesēja kontroles

Nesēja kontrole (agonistu un antagonistu testi)

12. Nesēju, kurā izšķīdina testējamo ķimikāliju, testē kā nesēja kontroli (VC). VM7Luc ER TA testa validēšanā izmantotais nesējs bija 1 % (tilpumkoncentrācija) dimetilsulfoksīds (DMSO, CAS Nr. 67-68-5) (sk. 24. punktu). Ja izmanto citu nesēju, nevis DMSO, visi references standarti, kontroles un testējamās ķimikālijas vajadzības gadījumā jātestē tajā pašā nesējā.

References standarts (agonistu diapazona noteikšana)

13. References standarts ir E2 (CAS Nr. 50-28-2). Diapazona noteikšanas testēšanā references standarts nozīmē, ka četras E2 koncentrācijas ($1,84 \times 10^{-10}$, $4,59 \times 10^{-11}$, $1,15 \times 10^{-11}$ un $2,87 \times 10^{-12}$ M) sērijveidā atšķaida, katru koncentrāciju testējot dubultiedobēs.

References standarts (agonistu visaptverošs tests)

14. Visaptverošā testēšanā E2 sērijveidā atšķaida attiecībā 1:2, līdz iegūst 11 E2 koncentrācijas (diapazonā no $3,67 \times 10^{-10}$ līdz $3,59 \times 10^{-13}$ M) dubultiedobēs.

References standarts (antagonistu diapazona noteikšana)

15. References standarts ir Ral (CAS Nr. 84449-90-1) un E2 (CAS Nr. 50-28-2) maisījums. Diapazona noteikšanas testēšanā Ral/E2 maisījumu sērijveidā atšķaida, līdz iegūst trīs Ral koncentrācijas ($3,06 \times 10^{-9}$; $7,67 \times 10^{-10}$ un $1,92 \times 10^{-10}$ M) ar E2 konstantā koncentrācijā ($9,18 \times 10^{-11}$ M) dubultiedobēs.

References standarts (antagonistu visaptverošs tests)

16. Visaptverošā testēšanā Ral (diapazonā no $2,45 \times 10^{-8}$ līdz $9,57 \times 10^{-11}$ M) sērijveidā atšķaida attiecībā 1:2 ar E2 konstantā koncentrācijā ($9,18 \times 10^{-11}$ M), līdz iegūst deviņas Ral/E2 koncentrācijas dubultiedobēs.

Vāji pozitīvā kontrole (agonisti)

17. Vāji pozitīvā kontrole ir $9,06 \times 10^{-6}$ M p,p'-metoksihlors (metoksihlors; CAS Nr. 72-43-5) EFM barotnē.

Vāji pozitīvā kontrole (antagonisti)

18. Vāji pozitīvā kontrole ir tamoksifēns (CAS Nr. 10540-29-1) $3,36 \times 10^{-6}$ M ar E2 $9,18 \times 10^{-11}$ M EFM barotnē.

E2 kontrole (tikai antagonistu tests)

19. E2 kontrole ir E2 $9,18 \times 10^{-11}$ MEFM barotnē, un to izmanto kā bāzlīnijas negatīvo kontroli.

Vairākkāršā indukcija (agonisti)

20. References standarta (E2) luciferāzes aktivitātes indukciju nosaka, vidējo augstāko E2 references standarta RLU vērtību dalot ar vidējo DMSO kontroles RLU vērtību, un rezultātam jābūt vairāk nekā četras reizes lielākam.

Vairākkāršais samazinājums (antagonisti)

21. References standarta (Ral/E2) luciferāzes aktivitātes vidējo vērtību nosaka, vidējo augstāko Ral/E2 references standarta RLU vērtību dalot ar vidējo DMSO kontroles RLU vērtību, tai jābūt vairāk nekā trīs reizes lielākai.

Laboratorijas kompetences pierādīšana (sk. 14. punktu un 3. un 4. tabulu šīs testēšanas metodes sadaļā "ER TA TESTA KOMPONENTI")

Nesējs

22. Testa ķimikālijas izšķīdina tādā šķīdinātājā, kurā attiecīgā testējamā ķimikālija šķīst un kurš ir sajaucams ar šūnu barotni. Piemēroti nesēji ir ūdens, etanols (tīrība 95 -100 %) un DMSO. Ja izmanto DMSO, tā saturs nedrīkst pārsniegt 1 % (tilp./tilp.). Par katru nesēju ir jāpierāda, ka maksimālais izmantotais tilpums nav citotoksisks un neietekmē testa veikšanu. References standartus un kontroles izšķīdina 100 % šķīdinātājā un pēc tam EFM barotnē atšķaida līdz atbilstīgām koncentrācijām.

Testējamo ķimikāliju sagatavošana

23. Testējamās ķimikālijas izšķīdina 100 % DMSO (vai piemērotā šķīdinātājā) un pēc tam EFM barotnē atšķaida līdz atbilstīgām koncentrācijām. Pirms izšķīdināšanas un atšķaidīšanas jānogaida, līdz visas testējamās ķimikālijas sasilst līdz istabas temperatūrai. Katram eksperimentam jāgatavo svaigi testējamo ķimikāliju šķīdumi. Šķīdumos nedrīkst būt redzamas nogulsnes vai duļķes. References standartu un kontroļu izejšķīdumus var sagatavot lielā apjomā, taču galīgais references standarts, kontroles atšķaidījumi un testējamās ķimikālijas katram eksperimentam jāgatavo svaigas un jāizmanto 24 stundās pēc sagatavošanas.

Šķīdība un citotoksicitāte Apsvērumi par diapazona noteikšanu

24. Diapazona noteikšanas pamatā ir septiņi sērijveida atšķaidījumi attiecībā 1:10 divos atkārtojumos. Sākumā testējamās ķimikālijas testē pie maksimālās koncentrācijas 1 mg/ml

(~1 mM) agonistu testēšanā un 20 µg/ml (~10 µM) antagonistu testēšanā. Diapazona noteikšanas eksperimentus izmanto, lai noteiktu:

- testējamās ķīmikālijas sākuma koncentrācijas, kas izmantojamas visaptverošā testēšanā;
- testējamās ķīmikālijas atšķaidījumus (1:2 vai 1:5), kas izmantojami visaptverošā testēšanā.

25. Šūnu dzīvotspējas/citotoksicitātes novērtējums ir ietverts agonistu un antagonistu testu protokolos (7) un iekļauts diapazona noteikšanas un visaptverošajā testēšanā. Citotoksicitātes metode, ko izmantoja šūnu dzīvotspējas novērtēšanai VM7Luc ER TA testa (1) validēšanas laikā, bija mērogota kvalitatīvā vizuālās novērošanas metode, tomēr citotoksicitātes noteikšanai var izmantot kvantitatīvu metodi (skatīt protokolu (7)). Nevar izmantot datus par testējamās ķīmikālijas koncentrācijām, kas izraisa dzīvotspējas samazināšanos par vairāk nekā 20 %.

Ekspozīcija ķīmikālijai un izkārtojums testa platē

26. Šūnas saskaita un uzsēj audu kultūras 96 iedobju platēs (2×10^5 šūnas vienā iedobē) EFM barotnē, un inkubē 24 stundas, lai šūnas varētu piestiprināties pie plates. EFM atdala un aizstāj ar testējamajām un references ķīmikālijām EFM barotnē, un inkubē 19–24 stundas. Īpaša uzmanība jāpievērš ļoti gaistošām vielām, jo tuvējās kontroliedobes var dot pseidopozitīvus rezultātus. Šādos gadījumos ieteicams izmantot iedobju aizlīmes, kas ļauj testēšanas laikā efektīvi izolēt atsevišķas iedobes.

Diapazona noteikšanas tests

27. Diapazona noteikšanas testēšanā izmanto visas 96 iedobju plates iedobes; testē līdz pat sešām testējamajām ķīmikālijām septiņās dažādās koncentrācijās, ko iegūst sērijveida atšķaidīšanā attiecībā 1:10 divos atkārtojumos (sk. 1. un 2. attēlu).

- *Agonistu* diapazona noteikšanas testēšanā izmanto četras E2 koncentrācijas divos atkārtojumos kā references standartu un četras DMSO kontroles replikāta iedobes.
- *Antagonistu* diapazona noteikšanas testēšanā izmanto trīs Ral/E2 maisījuma koncentrācijas (E2 ir konstants $9,18 \times 10^{-11}$ M) divos atkārtojumos kā references standartu un trīs replikātu iedobes, kas paredzētas E2 un DMSO kontrolēm.

1. attēls. Agonistu diapazona noteikšanas testa 96 iedobju plates izkārtojums

	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

Saīsinājumi: no E2-1 līdz E2-4 = E2 references standarta koncentrācijas (no augstas līdz zema); no TC1-1 līdz TC1-7 = 1. testējamās ķimikālijas (TC1) koncentrācijas (no augstas līdz zema); no TC2-1 līdz TC2-7 = 2. testējamās ķimikālijas (TC2) koncentrācijas (no augstas līdz zema); no TC3-1 līdz TC3-7 = 3. testējamās ķimikālijas (TC3) koncentrācijas (no augstas līdz zema); no TC4-1 līdz TC4-7 = 4. testējamās ķimikālijas (TC4) koncentrācijas (no augstas līdz zema); no TC5-1 līdz TC5-7 = 5. testējamās ķimikālijas (TC5) koncentrācijas (no augstas līdz zema); no TC6-1 līdz TC6-7 = 6. testējamās ķimikālijas (TC6) koncentrācijas (no augstas līdz zema); VC = nesēja kontrole (DMSO [1 % tilpumkoncentrācijas EFM]).

2. attēls. Antagonistu diapazona noteikšanas testa 96 iedobju plates izkārtojums

	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

Saīsinājumi: E2 = E2 kontrole; no Ral-1 līdz Ral-3 = raloksifēna/E2 references standarta koncentrācijas (no augstas līdz zema); no TC1-1 līdz TC1-7 = 1. testējamās ķimikālijas (TC1) koncentrācijas (no augstas līdz zema); no TC2-1 līdz TC2-7 = 2. testējamās ķimikālijas (TC2) koncentrācijas (no augstas līdz zema); no TC3-1 līdz TC3-7 = 3. testējamās ķimikālijas (TC3) koncentrācijas (no augstas līdz zema); no TC4-1 līdz TC4-7 = 4. testējamās ķimikālijas (TC4) koncentrācijas (no augstas līdz zema); no TC5-1 līdz TC5-7 = 5. testējamās ķimikālijas (TC5) koncentrācijas (no augstas līdz zema); no TC6-1 līdz TC6-7 = 6. testējamās ķimikālijas (TC6) koncentrācijas (no augstas līdz zema); VC = nesēja kontrole (DMSO [1 % tilpumkoncentrācijas EFM]).

Piezīme. Visas testējamās ķimikālijas testē E2 klātbūtnē ($9,18 \times 10^{-11}$ M).

28. Ieteicamais galīgais barotnes tilpums katrā iedobē ir 200 μ l. Izmanto tikai tādas testa plates, kurās šūnām visās iedobēs dzīvotspēja ir 80 % un lielāka.

29. Sākuma koncentrāciju noteikšana visaptverošai *agonistu* testēšanai ir detalizēti aprakstīta agonistu protokolā (7). Īsumā, tiek izmantoti tālāk aprakstītie kritēriji.

- Ja testējamās ķīmikālijas koncentrācijas līknē neviens punkts nav lielāks par DMSO kontroles rezultātu vidējo vērtību plus trīskāršu standartnovirzi, visaptverošai testēšanai izmanto 11 atšķaidījumu sēriju attiecībā 1:2, sākot ar maksimālo šķīstošo koncentrāciju.
- Ja testējamās ķīmikālijas koncentrācijas līknē ir punkti, kas ir lielāki par DMSO kontroles rezultātu vidējo vērtību plus trīskāršu standartnovirzi, visaptverošā testēšanā izmanto 11 secīgus atšķaidījumus, un sākuma koncentrācijai jābūt par vienu logaritmu augstākai nekā koncentrācijai, kas diapazona noteikšanā dod augstāko koriģēto RLU vērtību. 11 atšķaidījumu sērijas pamatā ir atšķaidījumi attiecībā 1:2 vai 1:5 atbilstīgi tālāk aprakstītajiem kritērijiem.

11 punktu atšķaidījumu sērija attiecībā 1:2 jāizmanto, ja šādi iegūtais koncentrāciju diapazons ļauj novērot atbildreakciju pilnu diapazonu, pamatojoties uz koncentrācijas–atbildreakcijas līkni, kas iegūta diapazona noteikšanas testā. Pretējā gadījumā izmanto atšķaidījumu attiecībā 1:5.

- Ja diapazona noteikšanas testā testējamā ķīmikālija uzrāda vielai divfāzu koncentrācijas–atbildreakcijas līkni, arī visaptverošajā testēšanā ir jāapskata abas fāzes.

30. Sākuma koncentrāciju noteikšana visaptverošai antagonistu testēšanai ir detalizēti aprakstīta antagonistu protokolā (7). Īsumā, tiek izmantoti tālāk aprakstītie kritēriji.

- Ja testējamās ķīmikālijas koncentrācijas līknē neviens punkts nav mazāks par E2 kontroles rezultātu vidējo vērtību mīnus trīskāršu standartnovirzi, visaptverošai testēšanai izmanto 11 punktu atšķaidījumu sēriju attiecībā 1:2, sākot ar maksimālo šķīstošo koncentrāciju.
- Ja testējamās ķīmikālijas koncentrācijas līknē ir punkti, kas ir mazāki par E2 kontroles rezultātu vidējo vērtību mīnus trīskāršu standartnovirzi, visaptverošā testēšanā izmanto 11 secīgus atšķaidījumus, un sākuma koncentrācijai jābūt vienai no šādām:
 - koncentrācija, kas diapazona noteikšanā dod zemāko koriģēto RLU vērtību;
 - maksimālā šķīstošā koncentrācija (sk. 14-2. attēlu antagonistu protokolā (7));
 - zemākā citotoksiskā koncentrācija (attiecīgu piemēru sk. 14-3. attēlā antagonistu protokolā (7)).
- 11 atšķaidījumu sērijas pamatā ir atšķaidījumi attiecībā 1:2 vai 1:5 atbilstīgi tālāk aprakstītajiem kritērijiem.

11 punktu atšķaidījumu sērija attiecībā 1:2 jāizmanto, ja šādi iegūtais koncentrāciju diapazons ļauj novērot atbildreakciju pilnu diapazonu, pamatojoties uz koncentrācijas–atbildreakcijas līkni, kas iegūta diapazona noteikšanas testā. Pretējā gadījumā jāizmanto atšķaidījums attiecībā 1:5.

Visaptverošie testi

31. Visaptveroša testēšana sastāv no 11 punktu atšķaidījumu sērijas (atšķaidījumu sērija attiecībā 1:2 vai 1:5 atbilstīgi visaptverošas testēšanas kritēriju sākuma koncentrācijai), katru koncentrāciju testējot trīs replikāta iedobēs 96 iedobju platē (sk. 3. un 4. attēlu).
- *Agonistu* visaptverošā testēšanā par references standartu izmanto 11 E2 koncentrācijas divos atkārtojumos. Katrā platē ir četras replikāta iedobes DMSO kontrolei un četras replikāta iedobes metoksihlorā kontrolei ($9,06 \times 10^{-6}$ M).
 - *Antagonistu* visaptverošā testēšanā par references standartu izmanto deviņas Ral/E2 koncentrācijas (E2 ir konstants ar $9,18 \times 10^{-11}$ M) divos atkārtojumos, četras replikāta iedobes domātas E2 $9,18 \times 10^{-11}$ M kontrolei, četras replikāta iedobes domātas DMSO kontrolēm un vēl četras —tamoksifēnam $3,36 \times 10^{-6}$ M.

3. attēls. Agonistu visaptveroša testa 96 iedobju plates izkārtojums

	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

Saīsinājumi: no TC11-1 līdz TC1-11 = 1. testējamās ķīmikālijas koncentrācijas (no augstas līdz zema); no TC2-1 līdz TC2-11 = 2. testējamās ķīmikālijas koncentrācijas (no augstas līdz zema); no E2-1 līdz E2-11 = E2 references standarta koncentrācijas (no augstas līdz zema); Meth = p,p' metoksihlora vāji pozitīvā kontrole; VC = DMSO (1 % tilpumkoncentrācija) EFM nesēja kontrole.

4. attēls. Antagonistu visaptveroša testa 96 iedobju plates izkārtojums

	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

Saīsinājumi: E2 = E2 kontrole; no Ral-1 līdz Ral-9 = raloksifēna/E2 references standarta koncentrācijas (no augstas līdz zema); Tam = tamoksifēna/E2 vāji pozitīvā kontrole; no TC1-1 līdz TC1-11 = 1. testējamās ķīmikālijas (TC1) koncentrācijas (no augstas līdz zema); no TC2-1 līdz TC2-11 = 2. testējamās ķīmikālijas (TC2) koncentrācijas (no augstas līdz zema); VC = nesēja kontrole (DMSO [1 % tilpumkoncentrācijas EFM]).

Piezīme. Kā norādīts iepriekš, visās iedobēs, kas satur references standartu un testējamo ķīmikāliju, E2 ir konstantā koncentrācijā ($9,18 \times 10^{-11} \text{M}$).

32. Lai nodrošinātu rezultātu neatkarību, visaptverošos testus ar to pašu ķīmikāliju atkārtoti veic dažādās dienās. Jāveic vismaz divi visaptveroši testi. Ja testu rezultāti ir savstarpējā pretrunā (piem., viens tests ir pozitīvs, otrs negatīvs) vai ja viens tests ir neadekvāts, jāveic trešais papildu tests.

Luminiscences mērišana

33. Luminiscenci mēra diapazonā no 300 līdz 650 nm ar inžekcijas luminometru un programmatūru, kas kontrolē inžekcijas tilpumu un mērījumu intervālu (7). Gaismas emisiju no katras iedobes izsaka kā RLU uz katru iedobi.

DATU ANALĪZE

EC₅₀/IC₅₀ noteikšana

34. EC₅₀ vērtību (puse no testējamās ķimikālijas maksimālās efektīvās koncentrācijas [agonisti]) un IC₅₀ vērtību (puse no testējamās ķimikālijas maksimālās inhibējošās koncentrācijas [antagonisti]) nosaka, pamatojoties uz koncentrācijas–atbildreakcijas datiem. Testējamajām ķimikālijām, kas ir pozitīvas vienā vai vairākās koncentrācijās, testējamās ķimikālijas koncentrāciju, kas izraisa pusi no maksimālās atbildreakcijas (IC₅₀ vai EC₅₀), aprēķina, izmantojot Hilla funkciju vai piemērotu alternatīvu. Hilla funkcija ir četru parametru logistisks matemātisks modelis, kas testējamās ķimikālijas koncentrāciju saista ar atbildreakciju (parasti pēc sigmoidālās līknes), izmantojot tālāk norādīto vienādojumu.

$$Y = bāze + \frac{(virсотne - bāze)}{1 + 10^{(lgEC_{50} - X)Hilla\ virziena\ koef.}}$$

kur:

Y = atbildreakcija (t. i., RLU);

X = koncentrācijas logaritms;

Bāze = minimālā atbildreakcija;

Virсотne = maksimālā atbildreakcija;

lg EC₅₀ (vai lg IC₅₀) = X logaritms, kas atbilst atbildreakcijai, kura atrodas pa vidu starp bāzi un virсотni

Hilla virziena koeficients = līknes stāvums.

Ar šo modeli aprēķina rezultātus, kas ir vissaderīgākie ar vērtībām “Virсотne”, “Bāze”, “Hilla virziena koeficients”, IC₅₀ un EC₅₀. EC₅₀ un IC₅₀ vērtību aprēķināšanai jāizmanto atbilstoša statistiskā programmatūra (piem., Graphpad Prism^R).

Izlecošo vērtību noteikšana

35. Lai izdarītu kvalitatīvus statistiskus secinājumus, būtu lietderīgi veikt arī (bet ne tikai) Q-testu (sk. agonistu un antagonistu protokolus (7)), lai noteiktu “nederīgās” iedobes, kas izslēdzamas no datu analīzes.
36. Attiecībā uz E2 references standarta replikātiem (paraugā ir divas iedobes) jebkuru replikāta koriģēto RLU vērtību konkrētā E2 koncentrācijā uzskata par izlecošo vērtību, ja vēsturiskajā

datubāzē tās vērtība par vairāk nekā 20 % atšķiras no koriģētās RLU vērtības šai koncentrācijai.

Luminometra datu apkopošana un koriģēšana diapazona noteikšanas testēšanai

37. Neapstrādātie dati no luminometra jāpārsūta uz testam īpaši izveidotu izklājlapas veidni. Jānosaka, vai ir izlecošo vērtību datu punkti, kas jāizslēdz. (Analīzē noteiktos parametrus sk. sadaļā “Testa pieņemamības kritēriji”.) Veic šādus aprēķinus.

Agonists:

1. etaps. Aprēķina DMSO nesēja kontroles (VC) vidējo vērtību.
2. etaps. Datu normalizācijas nolūkā šo DMSO VC vidējo vērtību atskaita no vērtības, kas iegūta attiecībā uz katru iedobi.
3. etaps. Aprēķina references standarta (E2) vidējo vairākkāršo indukciju.
4. etaps. Aprēķina testējamo ķīmikāliju vidējo EC₅₀ vērtību.

Antagonists:

1. etaps. Aprēķina DMSO VC vidējo vērtību.
2. etaps. Datu normalizācijas nolūkā šo DMSO VC vidējo vērtību atskaita no vērtības, kas iegūta attiecībā uz katru iedobi.
3. etaps. Aprēķina references standarta (Ral/E2) vidējo vairākkāršo samazinājumu.
4. etaps. Aprēķina E2 references standarta vidējo vērtību.
5. etaps. Aprēķina testējamo ķīmikāliju vidējo IC₅₀ vērtību.

Luminometra datu apkopošana un koriģēšana visaptverošai testēšanai

38. Neapstrādātie dati no luminometra jāpārsūta uz testam īpaši izveidotu izklājlapas veidni. Jānosaka, vai ir izlecošo vērtību datu punkti, kas jāizslēdz. (Analīzē noteiktos parametrus sk. sadaļā “Testa pieņemamības kritēriji”.) Veic tālāk aprakstītos aprēķinus.

Agonists:

1. etaps. Aprēķina DMSO VC vidējo vērtību.
2. etaps. Datu normalizācijas nolūkā šo DMSO VC vidējo vērtību atskaita no vērtības, kas iegūta attiecībā uz katru iedobi.
3. etaps. Aprēķina references standarta (E2) vidējo vairākkāršo indukciju.
4. etaps. Aprēķina E2 un testējamo ķīmikāliju vidējo EC₅₀ vērtību.
5. etaps. Aprēķina metoksihlora vidējo koriģēto RLU vērtību.

Antagonists:

1. etaps. Aprēķina DMSO VC vidējo vērtību.
2. etaps. Datu normalizācijas nolūkā šo DMSO VC vidējo vērtību atskaita no vērtības, kas iegūta attiecībā uz katru iedobi.
3. etaps. Aprēķina references standarta (Ral/E2) vidējo vairākkāršo indukciju.

4. etaps. Aprēķina Ral/E2 un testējamo ķīmikāliju vidējo IC₅₀ vērtību.
5. etaps. Aprēķina tamoksifēna vidējo koriģēto RLU vērtību.
6. etaps. Aprēķina E2 references standarta vidējo vērtību.

Datu interpretācijas kritēriji

39. VM7Luc ER TA tests ir viens no rīkiem, ko izmanto pierādījumu izsvēršanas pieejā un kas palīdz noteikt, kuras vielas ir prioritāri jātestē ED *in vivo* testos. Šajā prioritizēšanas procedūrā ietilpst testējamās ķīmikālijas klasificēšana par pozitīvu vai negatīvu attiecībā uz ER agonistu vai antagonistu aktivitāti. VM7Luc ER TA testa validēšanas pētījumā izmantotie pozitīvu un negatīvu rezultātu interpretācijas kritēriji ir aprakstīti 1. tabulā.

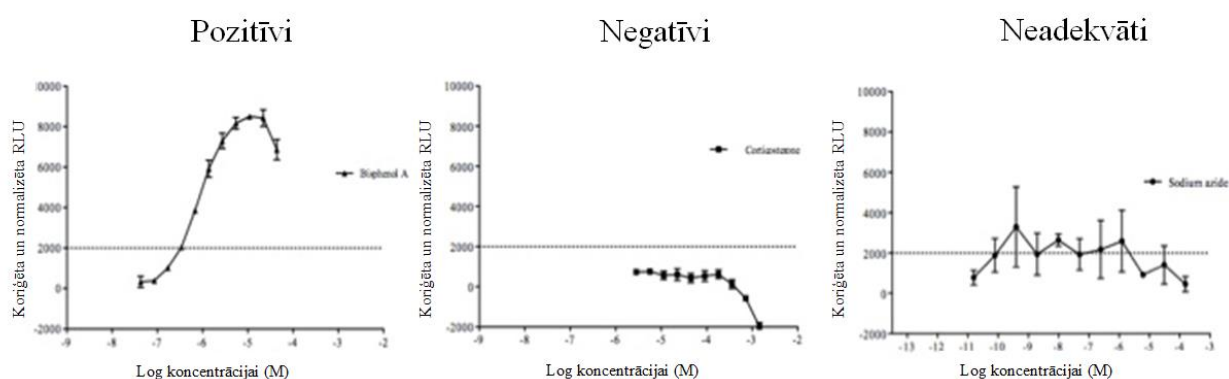
1. tabula. Pozitīvu un negatīvu rezultātu interpretācijas kritēriji

AGONISTU AKTIVITĀTE	
Pozitīvs	- Visas testējamās ķīmikālijas, kas klasificētas kā pozitīvas attiecībā uz ER agonistu aktivitāti, ir ar šādu koncentrācijas–atbildreakcijas līkni: bāzlīnija, pozitīvs slīpums un plato vai virsotne. Dažos gadījumos var būt definēti tikai divi no šiem raksturlielumiem (bāzlīnija –slīpums vai slīpums –virsotne). - Uz pozitīvā slīpuma līnijas ir vismaz trīs punkti, kur kļūdu joslas ar nepārklājas (vidējais ± SN). Bāzlīniju veidojošos punktus izslēdz, savukārt līknes lineārā daļa var ietvert virsotnes punktu vai plato pirmo punktu. - Lai ķīmikāliju klasificētu par pozitīvu, atbildreakcijas amplitūdai (starpībai starp bāzlīniju un virsotni) — jābūt vismaz 20 % no references standarta E2 maksimālās vērtības (t. i., 2000 RLU vai vairāk, ja references standarta [E2] maksimālo atbildreakcijas vērtību koriģē uz 10 000 RLU). - Ja iespējams, EC₅₀ vērtība jāaprēķina katrai pozitīvai testējamai ķīmikālijai.
Negatīvs	Vidējā koriģētā RLU konkrētai koncentrācijai ir vienāda ar vai mazāka par DMSO kontroles RLU vidējo vērtību plus trīskārša DMSO RLU standartnovirze.
Neadekvāts	Datus, kurus nozīmīgu kvalitatīvu vai kvantitatīvu ierobežojumu dēļ uzskata par nederīgiem aktivitātes esības vai neesības pierādīšanai, uzskata par neadekvātiem, un tos nevar izmantot, lai noteiktu, vai testējamā ķīmikālija ir pozitīva vai negatīva. Tāpēc ķīmikālijas jātestē atkārtoti.
ANTAGONISTU AKTIVITĀTE	

Pozitīvs	- No testējamās datiem iegūst šādu koncentrācijas–atbildreakcijas līkni: bāzlīnija un negatīvs slīpums. - Uz negatīvā slīpuma līnijas ir vismaz trīs punkti, kur kļūdu joslas ar nepārklājas; bāzlīniju veidojošos punktus izslēdz, savukārt līknes lineārā daļa var ietvert plato pirmo punktu. - Aktivitātes samazinājumam jābūt vismaz 20 % no references standarta Ral/E2 maksimālās vērtības (t. i., 8000 RLU vai mazāk, ja references standarta [Ral/E2] maksimālo atbildreakcijas vērtību koriģē uz 10 000 RLU). - Testējamās ķimikālijas augstākajai necitotoksiskajai koncentrācijai jābūt mazākai par vai vienāgai ar 1×10^{-5} M. - Ja iespējams, IC_{50} vērtība jāaprēķina katrai pozitīvai testējamai ķimikālijai.
Negatīvs	Koncentrācijā, kas mazāka par $1,0 \times 10^{-5}$ M, visi datu punkti ir virs ED_{80} vērtības (80 % no E2 atbildreakcijas jeb 8000 RLU).
Neadekvāts	Datus, kurus nozīmīgu kvalitatīvu vai kvantitatīvu ierobežojumu dēļ uzskata par nederīgiem aktivitātes esības vai neesības pierādīšanai, uzskata par neadekvātiem, un tos nevar izmantot, lai noteiktu, vai testējamā ķimikālija ir pozitīva vai negatīva. Tāpēc ķimikālija jātestē atkārtoti.

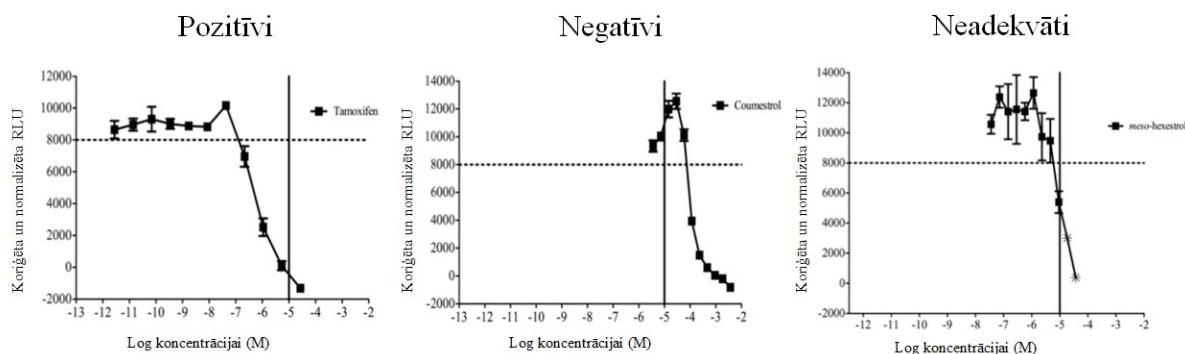
40. Pozitīvos rezultātus raksturo gan ietekmes intensitāte, gan koncentrācija, pie kuras novērojama ietekme, ja iespējams. Pozitīvu, negatīvu un neadekvātu rezultātu piemēri sniegti 5. un 6. attēlā.

5. attēls. Agonisti: pozitīvi, negatīvi un neadekvāti rezultāti



Punktētā līnija norāda 20 % no E2 atbildreakcijas, resp. 2000 RLU (koriģētas un normalizēta vērtība).

6. attēls. Antagonisti: pozitīvi, negatīvi un neadekvāti rezultāti



Punktētā līnija norāda 80 % no Ral/E2 atbildreakcijas, resp. 8000 RLU (koriģētas un normalizēta vērtība).

Nepārtrauktā līnija atbilst $1,00 \times 10^{-5}$ M. Lai atbildreakciju uzskatītu par pozitīvu, tai jābūt zem 8000 RLU līnijas un koncentrācijā, kas mazāka par $1,00 \times 10^{-5}$ M.

Ar zvaigznīti atzīmētās koncentrācijas mezoheksestrola grafikā norāda, ka dzīvotspējas rādītāji ir "2" vai lielāki.

Mezoheksestrola testa rezultātus uzskata par neadekvātiem, jo vienīgā atbildreakcija, kas ir mazāka par 8000 RLU, ir koncentrācijā $1,00 \times 10^{-5}$ M.

41. EC_{50} un IC_{50} var aprēķināt, izmantojot četru parametru Hilla funkciju (papildinformāciju sk. agonistu protokolā un antagonistu protokolā (7)). Ja ir izpildīti pieņemamības kritēriji, tas nozīmē, ka testa sistēma darbojas pareizi, tomēr tas negarantē, ka konkrētajā izpildes reizē tiks iegūti pareizi dati. Labākais pierādījums iegūto datu pareizībai ir pirmās izpildes reizes rezultātu duplīcēšana (sk. 19. punktu sadaļā "ER TA TESTA KOMPONENTI").

TESTĒŠANAS PĀRSKATS

42. Sk. 20. punktu sadaļā "ER TA TESTA KOMPONENTI".

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) (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. PAPILDINĀJUMS

STABILI TRANSFICETU CILVEKA ESTROGENA A RECEPTORU TRANSAKTIVACIJAS TESTS KIMIKALIJU ESTROGENISKAS AGONISTU UN ANTAGONISTU AKTIVITĀTES NOTEIKŠANAI, IZMANTOJOT ERA CALUX ŠUNU LĪNIJU

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI (SK. ARĪ VISPĀRĪGO IEVADU)

1. ER α CALUX transaktivācijas testā izmanto cilvēka U2OS šūnu līniju, lai noteiktu estrogēnu agonistu un antagonistu aktivitāti, ko mediē cilvēka estrogēna alfa receptors (hER α). Stabili transficētu ER α CALUX biotesta, ko piedāvā BioDetection Systems BV (Amsterdam, Nīderlande), validēšanas pētījumā pierādīja testa relevantumu un ticamību paredzētajam nolūkam (1). ER α CALUX šūnu līnija ekspresē tikai stabili transficētus cilvēka ER α (2) (3).
2. Šis tests ir īpaši paredzēts hER α mediētas transaktivācijas noteikšanai, par mērījuma parametru izmantojot bioluminiscenci. Augstās signāla un trokšņa attiecības dēļ bioluminiscenci plaši izmanto biotestos (4).
3. Novērots, ka fitoestrogēni koncentrācijā, kas ir lielāka par 1 μ M, pārmērīgi aktivē luciferāzes reportiergēnu, tā izraisot receptoru nemediētu luminiscenci (5) (6) (7). Tāpēc stabili transficētu ER transaktivācijas testos rūpīgi jāpārbauda fitoestrogēnu vai citu līdzīgu savienojumu, kas var pārmērīgi aktivēt luciferāzes ekspresiju, augstākas koncentrācijas (sk. 2. papildinājumu).
4. Pirms šā testa izmantošanas regulatīviem mērķiem ir jāizlasa sadaļa “VISPĀRĪGAIS IEVADS” un “ER TA TESTA KOMPONENTI”. Šajā testēšanas metodē izmantotās definīcijas un saīsinājumi ir aprakstīti 1. papildinājumā.

TESTA PRINCIPS (SK. ARĪ VISPĀRĪGO IEVADU)

5. Biotestu izmanto, lai novērtētu ER ligandu saistīšanos un receptoru–ligandu kompleksa sekojošu translokāciju uz kodolu. Kodolā receptoru–ligandu komplekss saista īpašus DNS atbildreakcijas elementus un transaktivē jāņtārpiņu luciferāzes reportiergēnu, kā rezultātā palielinās luciferāzes fermenta šūnu ekspresija. Pēc luciferāzes substrāta luciferīna pievienošanas luciferīns pārvēršas par bioluminiscējošu produktu. Radīto gaismu var viegli uztvert un kvantitatīvi noteikt ar luminometru.
6. Testa sistēmā izmanto stabili transficētu ER α CALUX šūnas. ER α CALUX šūnas izveidotas no cilvēka osteoblastiskas osteosarkomas U2OS šūnu līnijas. Cilvēka U2OS šūnas stabili transficēja ar 3xHRE-TATA-Luc un pSG5-neo-hER α , izmantojot kalcija fosfāta līdznogulsnesības metodi. U2OS šūnu līnija tika izvēlēta kā labākais variants, ko izmantot kā reportieršūnu līniju, kas reaģē uz estrogēnu (un citiem steroīdajiem hormoniem), un tā

pamatā ir novērojums, ka U2OS šūnu līnijā endogēno receptoru aktivitāte bija neliela vai tās nebija vispār. Endogēno receptoru neesamību novērtēja tikai ar luciferāzes reportierplazmīdām, un pēc receptoru ligandu pievienošanas netika konstatēta nekāda aktivitāte. Turklāt pēc radniecīgu receptoru pagaidu pievienošanas šī šūnu līnija uzturēja spēcīgas hormonu mediētas atbildreakcijas (2) (3) (8).

7. Ķīmikāliju testēšanā ar ER α CALUX šūnu līniju, lai noteiktu estrogēnisku vai antiestrogēnisku aktivitāti, ietilpst priekšskrīnings un visaptveroši testi. Priekšskrīninga laikā visaptverošās testēšanas vajadzībām nosaka testējamo ķīmikāliju šķīdību, citotoksicitāti un precīzāku koncentrāciju diapazonu. Visaptverošajos testos testējamo ķīmikāliju precīzāko koncentrāciju diapazonu testē ER α CALUX biotestos, un pēc tam testējamās ķīmikālijas klasificē pēc agonisma vai antagonisma.
8. Datu interpretācijas kritēriji ir detalizēti aprakstīti 59. punktā. Īsumā, testējamo ķīmikāliju uzskata par pozitīvu attiecībā uz agonismu, ja vismaz divu secīgu testējamās ķīmikālijas koncentrāciju atbildreakcija ir vienāda ar vai lielāka par 10 % no references standarta (17 β -estradiola) maksimālās atbildreakcijas (PC₁₀). Testējamo ķīmikāliju uzskata par pozitīvu attiecībā uz antagonismu, ja vismaz divu secīgu testējamās ķīmikālijas koncentrāciju atbildreakcija ir vienāda ar vai mazāka par 80 % no references standarta (tamoksifēna) maksimālās atbildreakcijas (PC₈₀).

PROCEDŪRA

Šūnu līnija

9. Testam jāizmanto stabili transficēta U2OS ER α CALUX šūnu līnija. Šūnu līniju var iegādāties ar tehniskās licences līgumu no BioDetection Systems BV, Amsterdamā, Nīderlande.
10. Drīkst izmantot tikai šūnu kultūras bez mikoplazmas. Jābūt apliecinājumam, ka izmantojamajās šūnu partijās nav mikoplazmas piesārņojuma, vai arī pirms lietošanas jāveic mikoplazmas tests. Precīzai mikoplazmas infekcijas noteikšanai jāizmanto RT-PCR (polimerāzes ķēdes reakcija reāllaikā) (9).

Šūnu līnijas stabilitāte

11. Lai saglabātu CALUX šūnu stabilitāti un integritāti, šūnas jāglabā šķidrajā slāpekļī (–80°C). Pēc šūnu atkausēšanas jaunas kultūras aizsākšanai šūnas jāsubkultivē vismaz divreiz, tikai pēc tam tās drīkst izmantot ķīmikāliju estrogēniskas agonistu un antagonistu aktivitātes novērtēšanai. Šūnas nedrīkst subkultivēt vairāk nekā 30 pasāžās.
12. Lai kontrolētu šūnu līnijas stabilitāti laika gaitā, agonistu un antagonistu testa sistēmas reaģētspēju verificē, novērtējot references standarta EC₅₀ vai IC₅₀. Tāpat jākontrolē arī

pozitīvās kontroles parauga (PC) un negatīvās kontroles parauga (NC) relatīvā indukcija. Rezultātiem jāatbilst agonistu (3.C tabula) vai antagonistu ER α CALUX biotesta (4.C tabula) pieņemamības kritērijiem. References standarti, pozitīvās un negatīvās kontroles ir norādītas 1. tabulā (agonisms) un 2. tabulā (antagonisms).

Šūnu kultivēšanas un uzsēšanas apstākļi

13. U2OS šūnas jākultivē barotnē (DMEM/F12 (1:1) barotne ar fenolsarkano kā pH indikatoru, kam pievienots liellopu embriju serums (7,5 %), aizvietojamās aminoskābes (1 %), 10 vienības/ml penicilīna, streptomicīna un geneticīna (G-418) kā atlases marķieris). Šūnas jāievieto CO₂ inkubatorā (5 % CO₂) 37 °C temperatūrā un 100 % mitrumā. Kad šūnas sasniedz 85–95 % konfluenci, tās jāsubkultivē vai jāgatavo uzsēšanai 96 iedobju mikrotitrēšanas platēs. Ja šūnas gatavo uzsēšanai, tās atkārtoti jāsuspendē 1 x 10⁵ šūnas/ml bezestrogēna testa barotnē (DMEM/F12 (1:1) barotne bez fenolsarkanā, kam pievienots liellopu embriju serums (5 % tilpumkoncentrācija), kas apstrādāts ar dekstrāna pārklātu ogli, aizvietojamās aminoskābes (1 % tilpumkoncentrācija), 10 vienības/ml penicilīna un streptomicīna) un jāuzsēj 96 iedobju mikrotitrēšanas plates iedobēs (100 μ l homogenizētas šūnu suspensijas). Pirms ekspozīcijas šūnas 24 stundas vispirms jāinkubē CO₂ inkubatorā (5 % CO₂, 37 °C, 100 % mitrums). Plastmasas izstrādājumi nedrīkst saturēt estrogēnu.

Pieņemamības kritēriji

14. Testējamās(-o) ķīmikālijas(-u) agonistisko un antagonistisko aktivitāti testē testu sērijā. Testu sērijā ietilpst ne vairāk kā 6 mikrotitrēšanas plates. Katrā testu sērijā ietilpst references standarta, pozitīvās kontroles parauga, negatīvās kontroles parauga un šķīdinātāja kontroļu vismaz 1 pilna atšķaidījumu sērija. 1. un 2. attēlā parādīta plašu sagatavošana agonistu un antagonistu testu sērijai.
15. Katrs references standarts, testējamo ķīmikāliju, visu šķīdinātāja kontroļu un pozitīvo un negatīvo kontroļu atšķaidījums jāanalizē trīs atkārtojumos. Katras trīs atkārtojumos veiktās analīzes rezultātiem jāatbilst 3.A un 4.A tabulā norādītajām prasībām.
16. References standarta (17 β -estradiols agonisma noteikšanai; tamoksifēns antagonisma noteikšanai) pilnu atšķaidījumu sēriju mēra katras testu sērijas pirmajā platē. Lai atlikušo 5 mikrotitrēšanas plašu analīzes rezultātus varētu salīdzināt ar pirmās mikrotitrēšanas plates rezultātiem, kas satur references standarta pilnu koncentrācijas–atbildreakcijas līkni, visās platēs jābūt 3 kontroles paraugiem: šķīdinātāja kontrolei, testētajam references standartam visaugstākajā koncentrācijā un references standarta aptuvenās EC₅₀ (agonisms) vai IC₅₀ (antagonisms) koncentrācijas. Vidējo kontroles paraugu attiecībai pirmajā platē un pārējās 5 platēs jāatbilst 3.C tabulā (agonisms) vai 4.C tabulā (antagonisms) norādītajām prasībām.
17. Katrai mikrotitrēšanas platei testu sērijā aprēķina z faktoru (10). Z faktors jāaprēķina pēc atbildreakcijām pie references standarta augstākajām un zemākajām koncentrācijām.

Mikrotitrēšanas plati uzskata par derīgu, ja tā atbilst 3.C tabulā (agonisms) vai 4.C tabulā (antagonisms) norādītajām prasībām.

18. References standarta devas–atbildreakcijas liknei jābūt sigmoidālai. EC₅₀ vai IC₅₀, kas iegūta references standarta atšķaidījumu sērijā, ir jāatbilst 3.C tabulā (agonisms) vai 4.C tabulā (antagonisms) norādītajām prasībām.
19. Katrā testu sērijā jābūt pozitīvās kontroles un negatīvās kontroles paraugam. Relatīvajai indukcijai, kas aprēķināta, pamatojoties uz pozitīvās kontroles paraugu un negatīvās kontroles paraugu, jāatbilst 3.C tabulā (agonisms) vai 4.C tabulā (antagonisms) norādītajām prasībām.
20. Visā mērījumu laikā jānosaka, kāds ir references standarta augstākās koncentrācijas indukcijas koeficients, proti, vidējo augstāko 17β-estradiola references standarta relatīvās gaismas vienības (RLU) atbildreakciju daļa ar vidējo references šķīdinātāja kontroles RLU atbildreakciju. Šim indukcijas koeficientam jāatbilst 3.C tabulā (agonisms) vai 4.C tabulā (antagonisms) norādītajām minimālajām prasībām par vairākkāršo indukciju.
21. Tikai tās mikrotitrēšanas plates, kas atbilst visiem iepriekš minētajiem apstiprināšanas kritērijiem, uzskatāmas par derīgām un izmantojamas testējamo ķīmikāliju atbildreakcijas novērtēšanai.
22. Pieņemamības kritērijus piemēro gan priekšskrīningam, gan visaptverošiem testiem.

1. tabula. References standarta, pozitīvās kontroles (PC) un negatīvās kontroles (NC) koncentrācijas agonistu CALUX biotestam

	Vielā	CAS reģ. nr.	Testa diapazons (M)
References standarts	17β-estradiols	50-28-2	1,0*10 ⁻¹³ - 1,0*10 ⁻¹⁰
Pozitīvā kontrole (PC)	17α-metiltestosterons	58-18-4	3,0*10 ⁻⁰⁶
Negatīvā kontrole (NC)	kortikosterons	50-22-6	1,0*10 ⁻⁰⁸

2. tabula. References standarta, pozitīvās kontroles (PC) un negatīvās kontroles (NC) koncentrācijas antagonistu CALUX biotestam

	Vielā	CAS reģ. nr.	Testa diapazons (M)
References standarts	tamoksifēns	10540-29-1	3,0*10 ⁻⁰⁹ - 1,0*10 ⁻⁰⁵
Pozitīvā kontrole (PC)	4-hidroksitamoksifēns	68047-06-3	1,0*10 ⁻⁰⁹

Negatīvā kontrole (NC)	resveratrols	501-36-0	1,0*10-05

3. tabula. Pieņemamības kritēriji agonistu ERα CALUX biotestam

A — atsevišķi paraugi platē		Kritērijs
1	Trīs atkārtojumu iedobju maksimālā %SN (NC, PC, katram testējamās ķimikālijas un references standarta atšķaidījumam, izņemot C0)	< 15 %
2	Trīs atkārtojumu iedobju maksimālā %SN (references standartam un testējamās ķimikālijas šķīdinātāja kontrolēm (C0, SC))	< 30 %
3	LDH maksimālā noplūde kā citotoksicitātes mērījums	< 120 %
B — vienā mikrotitrēšanas platē		
4	Attiecība starp references standarta šķīdinātāja kontroli (C0; 1. plate) un testējamās ķimikālijas šķīdinātāja kontroli (SC; 2.–x. plate)	no 0,5 līdz 2,0
5	Attiecība starp apt. EC ₅₀ un references standarta augstāko koncentrāciju 1. platē un apt. EC ₅₀ un references standarta augstāko koncentrāciju 2.–x. platē (C4, C8)	no 0,70 līdz 1,30
6	Z faktors katrai platei	>0,6
C — analīžu vienā sērijā (visas plates vienā sērijā)		
7	References standarta sigmoidāla līkne	Jā (17β-estradiols)
8	References standarta (17β-estradiols) EC ₅₀ diapazons	4 * 10 ⁻¹² –4 * 10 ⁻¹¹ M
9	Augstākās 17β-estradiola koncentrācijas minimālā vairākkāršā indukcija attiecībā uz references standarta šķīdinātāja kontroli	5
10	Relatīvā indukcija (%) PC	> 30 %
11	Relatīvā indukcija (%) NC	<10%

Apt.: aptuveni; PC: pozitīvā kontrole; NC: negatīvā kontrole; SC: testējamās ķimikālijas šķīdinātāja kontrole; C0: references standarta šķīdinātāja kontrole; SD: standartnovirze LDH: laktātdehidrogenāze.

4. tabula. Pieņemamības kritēriji antagonistu ERα CALUX biotestam

A — atsevišķi paraugi platē		Kritērijs
1	Trīs atkārtojumu iedobju maksimālā %SN (NC, PC, katram testējamās ķimikālijas un references standarta atšķaidījumam, šķīdinātāja kontrolei (C0))	< 15 %

2	Trīs atkārtojumu iedobju maksimālā %SN (nesēja kontrolei (VC) un references standarta augstākajai koncentrācijai (C8))	< 30 %
3	LDH maksimālā noplūde kā citotoksicitātes mērījums	< 120 %

B — vienā mikrotitrēšanas platē

4	Attiecība starp references standarta šķīdinātāja kontroli (C0; 1. plate) un testējamās ķimikālijas šķīdinātāja kontroli (SC; 2.-x. plate)	no 0,70 līdz 1,30
5	Attiecība starp apt. IC ₅₀ references standarta koncentrāciju 1. platē un apt. IC ₅₀ references standarta koncentrāciju 2.-x. platē (C4)	no 0,70 līdz 1,30
6	Attiecība starp references standarta augstāko koncentrāciju 1. platē un references standarta augstāko koncentrāciju 2.-x. platē (C8)	no 0,50 līdz 2,0
7	Z faktors katrai platei	>0,6

C — analīžu vienā sērijā (visas plates vienā sērijā)

8	References standarta sigmoidāla līkne	Jā (tamoksifēns)
9	References standarta (tamoksifēns) IC ₅₀ diapazons	1*10 ⁻⁸ - 1*10 ⁻⁷ M
10	References standarta šķīdinātāja kontroles minimālā vairākkāršā indukcija attiecībā uz tamoksifēna augstāko koncentrāciju	2,5
11	Relatīvā indukcija (%) PC	<70 %
12	Relatīvā indukcija (%) NC	>85%

Apt.: aptuveni; PC: pozitīvā kontrole; NC: negatīvā kontrole; VC: nesēja kontrole (šķīdinātāja kontrole bez agonistu references standarta konstantas koncentrācijas); SC: testējamās ķimikālijas šķīdinātāja kontrole; C0: references standarta šķīdinātāja kontrole; SD: standartnovirze LDH: laktātdehidrogenāze.

Šķīdinātāja/nesēja kontrole, references standarti, pozitīvās kontroles, negatīvās kontroles

23. Gan priekšskrīningā, gan visaptverošā testā jāizmanto viena un tā pati šķīdinātāja/nesēja kontrole, references standarti, pozitīvās kontroles un negatīvās kontroles. Arī references standartu, pozitīvo kontroļu un negatīvo kontroļu koncentrācijai jābūt tādai pašai.

Šķīdinātāja kontrole

24. Šķīdinātāju, kurā izšķīdina testējamo ķīmikāliju, testē kā šķīdinātāja kontroli. ER α CALUX biotesta validēšanai kā nesēju izmantoja dimetilsulfoksīdu (DMSO, 1 % (tilpumkoncentrācija); CAS Nr. 67-68-5). Ja izmanto citu šķīdinātāju, nevis DMSO, visi references standarti, kontroles un testējamās ķīmikālijas jātestē tajā pašā nesējā. Jāievēro, ka šķīdinātāja kontrole antagonistu pētījumiem satur noteiktas koncentrācijas agonistu references standartu 17 β -estradiolu (aptuveni EC₅₀ koncentrācija). Lai testētu antagonistu pētījumiem izmantojamo šķīdinātāju, jā sagatavo un jātestē nesēja kontrole.

Nesēja kontrole (antagonisms)

25. Lai testētu antagonismu, testa barotnei pievieno agonistu references standartu (17 β -estradiolu) konstantā koncentrācijā (aptuveni EC₅₀ koncentrācija). Lai noteiktu testējamo ķīmikāliju izšķīdināšanai izmantojamā šķīdinātāja antagonismu, jā sagatavo testa barotne, kas nesatur agonistu references standartu (17 β -estradiola) konstantā koncentrācijā. Šīs kontroles paraugs paredzēts kā nesēja kontrole. Dimetilsulfoksīds (DMSO, 1% (tilp./tilp.); ER α CALUX biotesta validēšanai kā nesēju izmantoja dimetilsulfoksīdu (DMSO, 1 % (tilpumkoncentrācija); CAS Nr. 67-68-5). Ja izmanto citu šķīdinātāju, nevis DMSO, visi references standarti, kontroles un testējamās ķīmikālijas jātestē tajā pašā nesējā.

Izmantojamie standarti

26. Agonistu references standarts ir 17 β -estradiols (1. tabula). References standarts nozīmē 17 β -estradiola astoņu koncentrāciju atšķaidījumu sēriju ($1,0 \cdot 10^{-13}$, $3,0 \cdot 10^{-13}$, $1,0 \cdot 10^{-12}$, $3,0 \cdot 10^{-12}$, $6,0 \cdot 10^{-12}$, $1,0 \cdot 10^{-11}$, $3,0 \cdot 10^{-11}$, $1,0 \cdot 10^{-10}$ M).
27. Antagonistu references standarts ir tamoksifēns (2. tabula). References standarts nozīmē tamoksifēna astoņu koncentrāciju atšķaidījumu sēriju ($3,0 \cdot 10^{-09}$, $1,0 \cdot 10^{-08}$, $3,0 \cdot 10^{-08}$, $1,0 \cdot 10^{-07}$, $3,0 \cdot 10^{-07}$, $1,0 \cdot 10^{-06}$, $3,0 \cdot 10^{-06}$, $1,0 \cdot 10^{-05}$ M). Antagonistu references standarta katru koncentrāciju inkubē kopā ar agonistu references standartu 17 β -estradiolu konstantā koncentrācijā ($3,0 \cdot 10^{-12}$ M).

Pozitīvā kontrole

28. Pozitīvā kontrole agonistu pētījumiem ir 17 α -metiltestosterons (1. tabula).
29. Pozitīvā kontrole antagonistu pētījumiem ir 4-hidroksitamoksifēns (2. tabula). Antagonistu pozitīvo kontroli inkubē kopā ar agonistu references standartu 17 β -estradiolu konstantā koncentrācijā ($3,0 \cdot 10^{-12}$ M).

Negatīvā kontrole

30. Negatīvā kontrole agonistu pētījumiem ir kortikosterons (1. tabula).
31. Negatīvā kontrole antagonistu pētījumiem ir resveratrols (2. tabula). Antagonistu negatīvo kontroli inkubē kopā ar agonistu references standartu 17β -estradiolu konstantā koncentrācijā ($3,0 \cdot 10^{-12}$ M).

Laboratorijas kompetences pierādīšana (sk. 14. punktu un 3. un 4. tabulu šīs testēšanas metodes sadaļā "ER TA TESTA KOMPONENTI")

Nesējs

32. Testējamo ķīmikāliju izšķīdināšanai izmantojamajam šķīdinātājam pilnībā jāizšķīdina testējamā ķīmikālija, un tam jābūt sajaucamam ar šūnu barotni. Piemēroti šķīdinātāji ir DMSO, ūdens un etanols (tīrība no 95 % līdz 100 %). Ja kā šķīdinātāju izmanto DMSO, inkubēšanas laikā DMSO maksimālā koncentrācija nedrīkst pārsniegt 1 % (tilpumkoncentrācija). Pirms lietošanas jāpārbauda, vai šķīdinātājs nav citotoksisks un neietekmē testa veikšanu.

References standartu, pozitīvo kontroļu, negatīvo kontroļu un testējamo ķīmikāliju sagatavošana

33. References standartus, pozitīvās kontroles, negatīvās kontroles un testējamās ķīmikālijas izšķīdina 100 % DMSO (vai piemērotā šķīdinātājā). Pēc tam tajā pašā šķīdinātājā sagatavo attiecīgus (sērijveida) atšķaidījumus. Pirms izšķīdināšanas jānogaida, līdz visas vielas sasilst līdz istabas temperatūrai. Svaigi sagatavotos references standartu, pozitīvo kontroļu, negatīvo kontroļu un testējamo ķīmikāliju izejšķīdumos nedrīkst būt redzamas nogulsnes vai duļķes. References standartu un kontroļu izejšķīdumus var sagatavot lielā apjomā. Pirms katra eksperimenta jā sagatavo svaigi testējamo ķīmikāliju izejšķīdumi. References standartu, pozitīvo kontroļu, negatīvo kontroļu un testējamo ķīmikāliju galīgie atšķaidījumi katram eksperimentam jā sagatavo svaigi un jāizmanto 24 stundās pēc sagatavošanas.

Šķīdība, citotoksicitāte un diapazona noteikšana

34. Priekšskrīningā nosaka testējamo ķīmikāliju šķīdību izvēlētajā šķīdinātājā. Sagatavo izejšķīdumu ar maksimālo koncentrāciju 0,1 M. Ja šādā koncentrācijā ir šķīdības problēmas, jā sagatavo mazākas koncentrācijas izejšķīdumi, līdz testējamās ķīmikālijas izšķīst pilnībā. Priekšskrīningā testē testējamo ķīmikāliju 1:10 sērijveida atšķaidījumus. Agonistu vai antagonistu testēšanā maksimālā testa koncentrācija ir 1 mM. Pēc priekšskrīninga iegūst precīzāku testējamo ķīmikāliju koncentrāciju diapazonu, kas jātestē visaptverošajā testā. Visaptverošā testēšanā izmantojamajiem atšķaidījumiem jābūt 1x, 3x, 10x, 30x, 100x, 300x, 1000x un 3000x.

35. Agonistu un antagonistu testu protokolos ir ietverta citotoksicitātes testēšana (11). Citotoksicitātes testēšana ir iekļauta gan priekšskrīningā, gan visaptverošajā testā. ERα CALUX biotesta validēšanas laikā citotoksicitātes novērtēšanai izmantotā metode bija laktātdehidrogenāzes (LDH) noplūdes tests kombinācijā ar šūnu kvalitatīvu vizuālu pārbaudi (sk. 4.1. papildinājumu) pēc eksponēšanas testējamām ķīmikālijām. Tomēr citotoksicitātes noteikšanai var izmantot citas kvantitatīvas metodes (piem., uz tetrazolu balstītu kolorimetrisko (MTT) testu vai citotoksicitātes CALUX biotestu). Parasti testējamo ķīmikāliju koncentrācijas, pie kādām šūnu dzīvotspēja samazinās par vairāk nekā 20 %, uzskatāmas par citotoksiskām, tāpēc tās nav izmantojamas datu novērtēšanai. Attiecībā uz LDH noplūdes testu testējamās ķīmikālijas koncentrācija uzskatāma par citotoksisku, ja LDH noplūdes procents ir lielāks par 120 %.

Eksponēšana testējamai ķīmikālijai un izkārtojums testa platē

36. Pēc saplūdušu kultivētu šūnu kolbas tripsinizācijas šūnas atkārtoti suspendē 1×10^5 šūnas/ml bezestrogēna testa barotnē. Simts μ l atkārtoti suspendētu šūnu uzsēj 96 iedobju mikrotitrēšanas plates iekšējās iedobēs. Ārējās iedobēs iepilda 200 μ l fosfātu fizioloģiskā buferšķīduma (PBS) (sk. 1. un 2. attēlu). Uzsētās šūnas 24 stundas vispirms inkubē CO₂ inkubatorā (5 % CO₂, 37 °C, 100 % mitrums).

37. Pēc preinkubācijas plates vizuāli pārbauda, lai noteiktu citotoksicitāti (sk. 4.1. papildinājumu), kontamināciju un konfluenci. Testēšanai izmanto tikai tās plates, kurās nav redzamas citotoksicitātes un kontaminācijas un ir vismaz 85 % konfluences. No iekšējām iedobēm uzmanīgi izvada barotni, ko aizstāj ar 200 μ l bezestrogēna testa barotnes, kas satur references standartu, testējamo ķīmikāliju, pozitīvo kontroli, negatīvo kontroli un šķīdinātāja kontroli attiecīgo atšķaidījumu sēriju (5. tabula: agonistu pētījumi; 6. tabula: antagonistu pētījumi). Visus references standartus, testējamās ķīmikālijas, pozitīvās kontroles, negatīvās kontroles un šķīdinātāja kontroles testē trīs atkārtojumos. 1. attēlā redzams plates izkārtojums agonistu testēšanai. 2. attēlā redzams plates izkārtojums antagonistu testēšanai. Plates izkārtojums priekšskrīningā un visaptverošajā testēšanā ir vienāds. Antagonistu testēšanā visās iekšējās iedobēs, izņemot nesēja kontroles (VC) iedobes, ir arī agonistu references standarts (17 β -estradiols) konstantā koncentrācijā ($3,0 \times 10^{-12}$ M). Jāievēro, ka katrā TC platē jāpievieno references standarti C8 un C4.

38. Pēc šūnu eksponēšanas visām ķīmikālijām 96 iedobju mikrotitrēšanas plates jāinkubē vēl 24 stundas CO₂ inkubatorā (5 % CO₂, 37 °C, 100 % mitrums).

1. attēls. Izkārtojums 96 iedobju mikrotitrēšanas platēs priekšskrīningā un agonistiskās iedarbības novērtēšanā

1. plate

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	

C	C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
D	C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
E	SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
F	SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
G	SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
H											

Nākamās plates

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
F		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
G		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
H												

C0 = references standartšķīdinātājs.

C(1-8) = references standarta atšķaidījumu sērija (1–8, no zemas līdz augstai koncentrācijai).

PC = pozitīvā kontrole.

NC: = negatīvā kontrole.

TCx-(1–8) = testējamās ķimikālijas atšķaidījumi (1–8, no zemas līdz augstai koncentrācijai), ko izmanto testējamās ķimikālijas priekšskrīningā un agonistiskās iedarbības novērtēšanā.

SC = testējamās ķimikālijas šķīdinātāja kontrole (optimāli tas pats šķīdinātājs, kas ir C0, taču, iespējams, no citas partijās).

Pelēkās šūnas: = ārējās iedobes, kurās iepilda 200 µl PBS.

2. attēls. Izkārtojums 96 iedobju mikrotitrēšanas platēs priekšskrīningā un antagonistiskās iedarbības novērtēšanā

1. plate

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
E		NC:	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
F		NC:	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
G		NC:	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
H												

Nākamās plates

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
F		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
G		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	

H 

- C0 = references standartšķīdinātājs.
- C(1-8) = references standarta atšķaidījumu sērija (1–8, no zemas līdz augstai koncentrācijai).
- NC: = negatīvā kontrole.
- PC = pozitīvā kontrole.
- TCx-(1–8) = testējamās ķimikālijas atšķaidījumi (1–8, no zemas līdz augstai koncentrācijai), ko izmanto testējamās ķimikālijas priekšskrīningā un agonistiskās iedarbības novērtēšanā.
- SC = testējamās ķimikālijas šķīdinātāja kontrole (optimāli tas pats šķīdinātājs, kas ir C0, taču, iespējams, no citas partijas).
- VC = nesēja kontrole (šķīdinātāja kontrole bez agonistu references standarta (17β-estradiola) konstantā koncentrācijā).
- Pelēkās šūnas: = ārējās iedobes, kurās iepilda 200 μl PBS.
- Piezīme. Visās iekšējās iedobēs, izņemot nesēja kontroles (VC) iedobes, ir arī agonistu references standarts (17β-estradiols) konstantā koncentrācijā ($3,0 \cdot 10^{-12}$ M).

Luminiscences mērīšana

39. Luminiscences mērīšana ir detalizēti aprakstīta agonistu un antagonistu testu protokolā (10). Barotne no iedobēm jāizvada, bet šūnas pēc 24 stundu inkubēšanas jāizizē, lai atvērtu šūnas membrānu un varētu izmērīt luciferāzes aktivitāti.
40. Luminiscences izmērīšanai šajā procedūrā nepieciešams luminometrs ar 2 inžektoriem. Luciferāzes reakciju sāk, inžektējot substrāta luciferīnu. Reakciju pārtrauc, pievienojot 0,2 M NaOH. Reakciju pārtrauc, lai nepieļautu luminiscences pārnesanu no vienas iedobes citā.
41. No katras iedobes izstaroto gaismu izsaka kā relatīvās gaismas vienības (RLU) uz katru iedobi.

Priekšskrīnings

42. Priekšskrīninga analīzes rezultātus izmanto, lai noteiktu visaptverošajā testēšanā testējamo ķimikāliju precīzāku koncentrāciju diapazonu. Priekšskrīninga analīzes rezultātu novērtēšana un visaptverošajā testēšanā testējamo ķimikāliju precīzāka koncentrāciju diapazona noteikšana ir detalizēti aprakstīta agonistu un antagonistu testu protokolā (10). Šeit ir sniegts īss kopsavilkums par testējamo ķimikāliju precīzāka koncentrāciju diapazona noteikšanu agonistu un antagonistu testēšanā. Norādījumus par sērijveida atšķaidījumiem sk. 5. un 6. tabulā.

Koncentrāciju izvēle agonistiskās iedarbības novērtēšanai

43. Priekšskrīningā testējamās ķimikālijas jātestē, izmantojot 5. tabulā (agonisms) un 6. tabulā (antagonisms) norādītās atšķaidījumu sērijas. Visas koncentrācijas jātestē trīs atkārtojumu iedobēs atbilstoši 1. attēlā (agonisms) vai 2. attēlā (antagonisms) norādītajam plašu izkārtojumam.

44. Tikai pieņemamības kritērijiem atbilstoši analīzes rezultāti (3. tabula) uzskatāmi par derīgiem un izmantojami testējamo ķīmikāliju atbildreakcijas novērtēšanai. Ja viena vai vairākas mikrotitrēšanas plates analīzes sērijā neatbilst pieņemamības kritērijiem, attiecīgās mikrotitrēšanas plates jāanalizē atkārtoti. Ja pirmā plate, kura satur visu references standarta atšķaidījumu sēriju, neatbilst pieņemamības kritērijiem, visa testa sērija (6 plates) jāanalizē atkārtoti.
45. Testējamo ķīmikāliju sākotnējie koncentrāciju diapazoni jākoriģē un priekšskrīnings jāatkārto, ja:
- novēro citotoksicitāti. Priekšskrīninga procedūra jāatkārto ar testējamās ķīmikālijas mazākām, necitotoksiskām koncentrācijām;
 - testējamās ķīmikālijas priekšskrīningā neiegūst pilnu devas–atbildreakcijas līkni, jo testētās koncentrācijas rada maksimālu indukciju. Priekšskrīnings jāatkārto ar mazākām testējamās ķīmikālijas koncentrācijām.
46. Ja novēro derīgu, no devas atkarīgu atbildreakciju, jāizvēlas (mazākā) koncentrācija, kādā novēro maksimālo indukciju un nenovēro citotoksicitāti. Testējamās ķīmikālijas augstākajai koncentrācijai, kas jātestē visaptverošajā testā, jābūt 3 reizes lielākai par šo izvēlēto koncentrāciju.
47. Testējamās ķīmikālijas visa precīzāku atšķaidījumu sērija jāpagatavo atbilstoši 5. tabulā norādītajiem atšķaidīšanas etapiem, sākot ar minēto augstāko koncentrāciju.
48. Testējamā ķīmikālija, kas neizraisa nekādu agonistisku iedarbību, jātestē visaptverošajos testos, sākot ar augstāko necitotoksisko koncentrāciju, kas konstatēta priekšskrīningā.

Koncentrāciju izvēle antagonistiskās iedarbības novērtēšanai

49. Tikai pieņemamības kritērijiem atbilstoši analīzes rezultāti (4. tabula) uzskatāmi par derīgiem un izmantojami testējamo ķīmikāliju atbildreakcijas novērtēšanai. Ja viena vai vairākas mikrotitrēšanas plates analīzes sērijā neatbilst pieņemamības kritērijiem, attiecīgās mikrotitrēšanas plates jāanalizē atkārtoti. Ja pirmā plate, kura satur visu references standarta atšķaidījumu sēriju, neatbilst pieņemamības kritērijiem, visa testa sērija (6 plates) jāanalizē atkārtoti.
50. Testējamo ķīmikāliju sākotnējie koncentrāciju diapazoni jākoriģē un priekšskrīnings jāatkārto, ja:
- novēro citotoksicitāti. Priekšskrīninga procedūra jāatkārto ar testējamās ķīmikālijas mazākām, necitotoksiskām koncentrācijām;

- testējamās ķīmikālijas priekšskrīningā neiegūst pilnu devas–atbildreakcijas līkni, jo testētās koncentrācijas rada maksimālu inhibīciju. Priekšskrīnings jāatkārto ar mazākām testējamās ķīmikālijas koncentrācijām.

- Ja novēro derīgu, no devas atkarīgu atbildreakciju, jāizvēlas (mazākā) koncentrācija, kādā novēro maksimālo inhibīciju un nenovēro citotoksicitāti. Testējamās ķīmikālijas augstākajai koncentrācijai, kas jātestē visaptverošajā testā, jābūt 3 reizes lielākai par šo izvēlēto koncentrāciju.
- Testējamās ķīmikālijas visa precīzāku atšķaidījumu sērija jā sagatavo atbilstoši 6. tabulā norādītajiem atšķaidīšanas etapiem, sākot ar minēto augstāko koncentrāciju.
- Testējamā ķīmikālija, kas neizraisa nekādu antagonistisku iedarbību, jātestē visaptverošajos testos, sākot ar augstāko necitotoksisko koncentrāciju, kas konstatēta priekšskrīningā..

Visaptverošie testi

- Kad noteikts precīzākais koncentrāciju diapazons, testējamās ķīmikālijas jātestē visaptverošajā testā, izmantojot 5. tabulā (agonisms) un 6. tabulā (antagonisms) norādītās atšķaidījumu sērijas. Visas koncentrācijas jātestē trīs atkārtojumu iedobēs atbilstoši 1. attēlā (agonisms) vai 2. attēlā (antagonisms) norādītajam plašu izkārtojumam.
- Tikai pieņemamības kritērijiem atbilstoši analīzes rezultāti (3. un 4. tabula) uzskatāmi par derīgiem un izmantojami testējamo ķīmikāliju atbildreakcijas novērtēšanai. Ja viena vai vairākas mikrotitrēšanas plates analīzes sērijā neatbilst pieņemamības kritērijiem, attiecīgās mikrotitrēšanas plates jāanalizē atkārtoti. Ja pirmā plate, kura satur visu references standarta atšķaidījumu sēriju, neatbilst pieņemamības kritērijiem, visa testa sērija (6 plates) jāanalizē atkārtoti.

5. tabula. References standartu, kontroļu un testējamo ķīmikāliju koncentrācija un atšķaidījumi, ko izmanto agonistu testēšanā

References standarts 17β-estradiols konc. (M)		TCx — priekšskrīnings atšķaidījums		TCx — visaptverošais tests atšķaidījums		Kontroles konc. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	PC	3,0*10 ⁻⁰⁶
C1	1,0*10 ⁻¹³	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1000 x	NC:	1,0*10 ⁻⁰⁸
C2	3,0*10 ⁻¹³	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	1,0*10 ⁻¹²	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	3,0*10 ⁻¹²	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x		
C5	6,0*10 ⁻¹²	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x		
C6	1,0*10 ⁻¹¹	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x		
C7	3,0*10 ⁻¹¹	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x		
C8	1,0*10 ⁻¹⁰						

TCx — testējamā ķīmikālija x.

PC — pozitīvā kontrole (17 α -metiltestosterons).
 NC — negatīvā kontrole (kortikosterons).
 C0 — references standarta šķīdinātāja kontrole
 SC — testējamās ķīmikālijas šķīdinātāja kontrole

6. tabula. References standartu, kontroļu un testējamo ķīmikāliju koncentrācija un atšķaidījumi, ko izmanto antagonistu testēšanā

References standarts tamoksifēns konc. (M)		TCx — priekšskrinings atšķaidījums		TCx — visaptverošais tests atšķaidījums		Kontroles konc. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	PC	1,0*10 ⁻⁰⁹
C1	3,0*10 ⁻⁰⁹	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	NC:	1,0*10 ⁻⁰⁵
C2	1,0*10 ⁻⁰⁸	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	3,0*10 ⁻⁰⁸	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	1,0*10 ⁻⁰⁷	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x	Pievienotais agonists konc. (M)	
C5	3,0*10 ⁻⁰⁷	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x		
C6	1,0*10 ⁻⁰⁶	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x		
C7	3,0*10 ⁻⁰⁶	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x	17 β - estradiols	3,0*10 ⁻¹²
C8	1,0*10 ⁻⁰⁵						

TCx — testējamā ķīmikālija x.

PC — pozitīvā kontrole (4-hidroksitamoksifēns)

NC — negatīvā kontrole (resveratrols).

C0 — references standarta šķīdinātāja kontrole

SC — testējamās ķīmikālijas šķīdinātāja kontrole

VC — nesēja kontrole (nesatur agonistu references standartu 17 β -estradiolu konstantā koncentrācijā (3,0 * 10⁻¹² M)

Datu apkopošana un datu analīze

56. Agonistu testēšana: [pēc priekšskrinings un visaptverošajiem testiem nosaka testējamās ķīmikālijas EC₁₀, EC₅₀, PC₁₀, PC₅₀ un maksimālo indukciju (TCx_{max}). Antagonistu testēšana: aprēķina IC₂₀, IC₅₀, PC₈₀, PC₅₀ un minimālo indukciju (TCx_{min}). 3. attēlā (agonisms) un 4. attēlā (antagonisms) šie parametri attēloti grafiski. Nepieciešamos parametrus aprēķina, pamatojoties uz katras testējamās ķīmikālijas relatīvo indukciju (attiecībā pret references standarta maksimālo indukciju (= 100 %)). Datu novērtēšanai jāizmanto nelineārā regresija (mainīgs slīpums, 4 parametri) atbilstoši šim vienādojumam:

$$Y = b_{\text{āze}} + \frac{(v_{\text{irsotne}} - b_{\text{āze}})}{(1 + 10^{((\lg EC_{50} - X) * \text{Hilla koef.}))}}$$

kur:

X = devas vai koncentrācijas logaritms;

Y = atbildreakcija (relatīvā indukcija (%));
 $Virsothne$ = maksimālā indukcija (%)
 $Bāze$ = minimālā indukcija (%);
 $LogEC_{50}$ = koncentrācijas, pie kuras novēro 50 % no maksimālās atbildreakcijas, logaritms
 $Hilla\ virziena\ koeficients$ = Hilla virziena koeficients.

57. Neapstrādātie dati no luminometra, kas izteikti kā relatīvās gaismas vienības (RLU), jāpārsūta uz priekšskrīningam un visaptverošajam testam īpaši izveidotu izklājlapas veidni. Neapstrādātajiem datiem jāatbilst 3.A un 3.B tabulā (agonisms) vai 4.A un 4.B tabulā (antagonisms) norādītajiem pieņemamības kritērijiem. Ja neapstrādātie dati atbilst pieņemamības kritērijiem, nepieciešamo parametru noteikšanai veic tālāk aprakstītos aprēķinus.

Agonisms

- References standarta šķīdinātāja kontroles vidējo RLU atņem no neapstrādātajiem atsauces datiem par references standartiem.
- Testējamās ķīmikālijas šķīdinātāja kontroles vidējo RLU atņem no neapstrādātajiem datiem par testējamo ķīmikāliju.
- Aprēķina references standarta katras koncentrācijas relatīvo indukciju. References standarta augstākās koncentrācijas indukcija ir 100 %.
- Aprēķina testējamās ķīmikālijas katras koncentrācijas relatīvo indukciju salīdzinājumā ar references standarta augstāko koncentrāciju 100 %.
- Pēc nelineārās regresijas (mainīgs slīpums, 4 parametri) novērtē analīzes rezultātus.
- Nosaka references standarta EC_{50} un EC_{10} .
- Nosaka testējamo ķīmikāliju EC_{50} un EC_{10} .
- Nosaka testējamās ķīmikālijas maksimālo relatīvo indukciju (TC_{max}).
- Nosaka testējamo ķīmikāliju PC_{10} un PC_{50} .

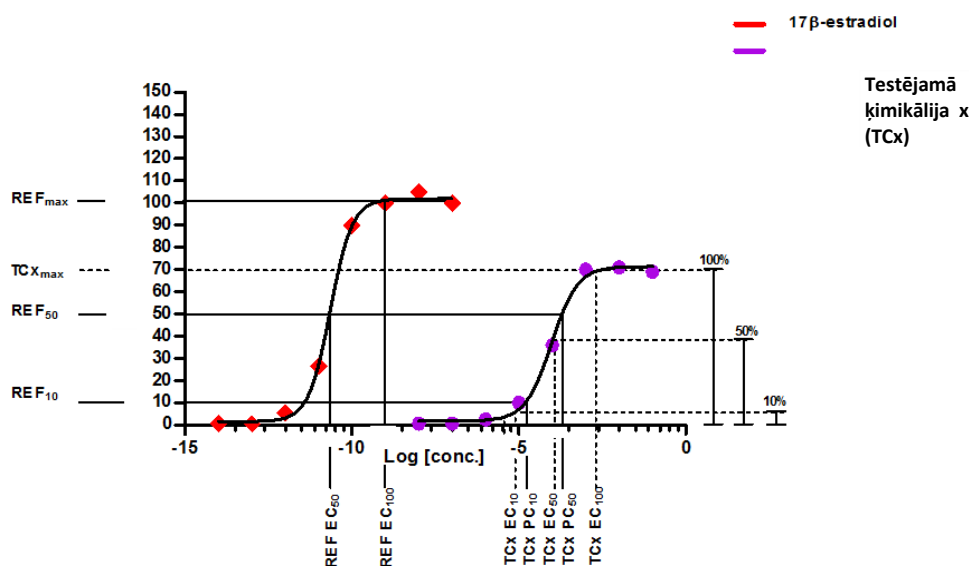
Testējamām ķīmikālijām ne vienmēr var iegūt pilnu devas–atbildreakcijas līkni, piem., citotoksicitātes vai šķīdības problēmu dēļ. Tad nav iespējams noteikt arī EC_{50} , EC_{10} un PC_{50} . Tādos gadījumos iespējams noteikt tikai PC_{10} un TC_{max} .

Antagonisms

- References standarta augstākās koncentrācijas vidējo RLU atņem no neapstrādātajiem atsauces datiem par references standartiem.
- References standarta augstākās koncentrācijas vidējo RLU atņem no neapstrādātajiem atsauces datiem par testējamām ķīmikālijām.

- Aprēķina references standarta katras koncentrācijas relatīvo indukciju. References standarta zemākās koncentrācijas indukcija ir 100 %.
- Aprēķina testējamās ķimikālijas katras koncentrācijas relatīvo indukciju salīdzinājumā ar references standarta zemāko koncentrāciju 100 %.
- Pēc nelineārās regresijas (mainīgs slīpums, 4 parametri) novērtē analīzes rezultātus.
- Nosaka references standarta IC_{50} un IC_{20} .
- Nosaka testējamo ķimikāliju IC_{50} un IC_{20} .
- Nosaka testējamās ķimikālijas minimālo relatīvo indukciju (TC_{min}).
- Nosaka testējamo ķimikāliju PC_{80} un PC_{50} .

3. attēls. Pārskats par agonistu testā noteiktajiem parametriem



EC_{10} = vielas koncentrācija, pie kuras novēro 10 % no tās maksimālās atbildreakcijas.

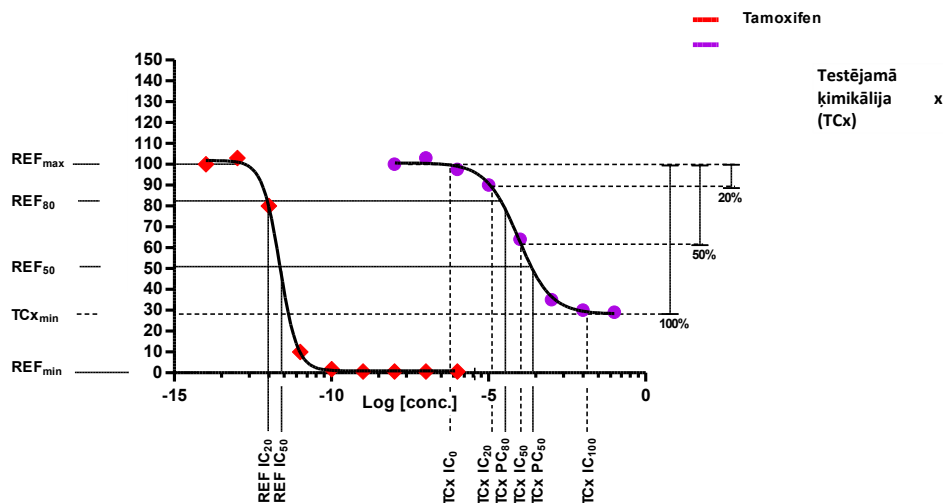
EC_{50} = vielas koncentrācija, pie kuras novēro 50 % no tās maksimālās atbildreakcijas.

PC_{10} = testējamās ķimikālijas koncentrācija, pie kuras tās atbildreakcija ir vienāda ar references standarta EC_{10} .

PC_{50} = testējamās ķimikālijas koncentrācija, pie kuras tās atbildreakcija ir vienāda ar references standarta EC_{50} .

TCx_{max} = testējamās ķimikālijas maksimālā relatīvā indukcija.

4. attēls. Pārskats par antagonistu testā noteiktajiem parametriem



IC₂₀ = vielas koncentrācija, pie kuras novēro 80 % no tās maksimālās atbildreakcijas (20 % inhibīcija).

IC₅₀ = vielas koncentrācija, pie kuras novēro 50 % no tās maksimālās atbildreakcijas (50 % inhibīcija).

PC₈₀ = testējamās ķimikālijas koncentrācija, pie kuras tās atbildreakcija ir vienāda ar references standarta IC₂₀.

PC₅₀ = testējamās ķimikālijas koncentrācija, pie kuras tās atbildreakcija ir vienāda ar references standarta IC₅₀.

TC_{xmin} = testējamās ķimikālijas minimālā relatīvā indukcija.

Testējamām ķimikālijām ne vienmēr var iegūt pilnu devas–atbildreakcijas līkni, piem., citotoksicitātes vai šķīdības problēmu dēļ. Tad nav iespējams noteikt arī IC₅₀, IC₂₀ un PC₅₀. Tādos gadījumos iespējams noteikt tikai PC₂₀ un TC_{min}.

58. Rezultātu pamatā ir divas (vai trīs) neatkarīgas izpildes reizes. Ja divās izpildes reizēs tiek iegūti salīdzināmi un līdz ar to reproducējami rezultāti, nav nepieciešams testu izpildīt vēl trešo reizi. Rezultāti ir pieņemami, ja tie:

- atbilst pieņemamības kritērijiem (sk. 14.–22. punktu sadaļā “Pieņemamības kritēriji”);
- ir reproducējami.

Datu interpretācijas kritēriji

59. Interpretējot datus un lemjot, vai testējamā ķimikālija ir pozitīva vai negatīva, jāizmanto tālāk aprakstītie kritēriji.

Agonisms

Katrā visaptverošajā testā testējamo ķimikāliju uzskata par **pozitīvu**, ja:

- 1 TC_{max} ir vienāda ar vai lielāka par 10 % no references standarta maksimālās atbildreakcijas (REF_{10}).
- 2 Vismaz 2 secīgas testējamās ķīmikālijas koncentrācijas ir vienādas ar vai lielākas par REF_{10} .

Katrā visaptverošajā testā testējamo ķīmikāliju uzskata par **negatīvu**, ja:

- 1 TC_{max} nepārsniedz 10 % no references standarta maksimālās atbildreakcijas (REF_{10});
- 2 mazāk nekā 2 testējamās ķīmikālijas koncentrācijas ir vienādas ar vai lielākas par REF_{10} .

Antagonisms

Katrā visaptverošajā testā testējamo ķīmikāliju uzskata par **pozitīvu**, ja:

- 1 TC_{min} ir vienāda ar vai mazāka par 80% no references standarta maksimālās atbildreakcijas ($REF_{80} = 20\%$ inhibīcija).
- 2 Vismaz 2 secīgas testējamās ķīmikālijas koncentrācijas ir vienādas ar vai mazākas par REF_{80} .

Katrā visaptverošajā testā testējamo ķīmikāliju uzskata par **negatīvu**, ja:

- 1 TC_{min} pārsniedz 80% no references standarta maksimālās atbildreakcijas ($REF_{80} = 20\%$ inhibīcija).
- 2 Mazāk nekā 2 testējamās ķīmikālijas koncentrācijas ir vienādas ar vai lielākas par REF_{80} .

60. Lai raksturotu testējamās ķīmikālijas pozitīvās atbildreakcijas potenci, apskata šādus parametrus: ietekmes intensitāte (agonisms: TC_{max} ; antagonisms: TC_{min}) un koncentrācija, pie kuras novērojama ietekme (agonisms: EC_{10} , EC_{50} , PC_{10} , PC_{50} ; antagonisms: IC_{20} , IC_{50} , PC_{80} , PC_{50}).

TESTĒŠANAS PĀRSKATS

61. Sk. 20. punktu sadaļā "ER TA TESTA KOMPONENTI".

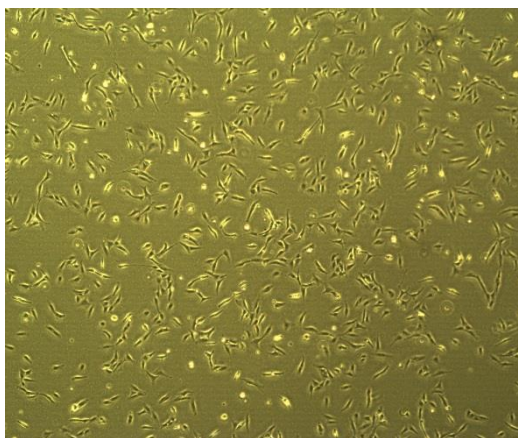
LITERATŪRA

- (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

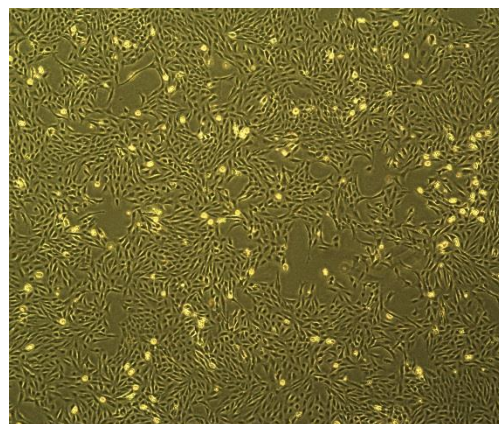
contamination in cell cultures by enzymatic detection of polymerase chain reaction (PCR) products. *J. Vet. Med. Sci.*, 57(4), 769-771.

- (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. papildinājums. Šūnu dzīvotspējas vizuāla pārbaude

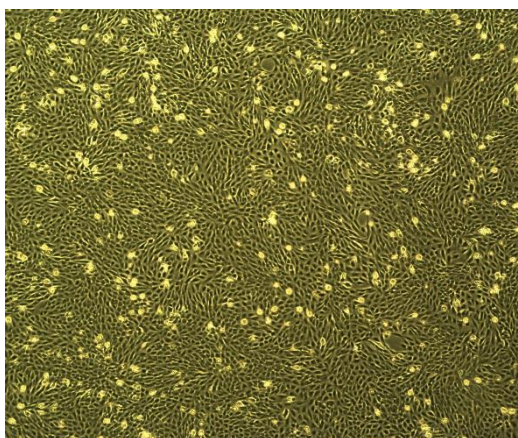


< 5 % konfluences. Šūnas ir tikko uzsētas. 100 % šūnu dzīvotspēja.
Klasifikācija “nav citotoksicitātes”.



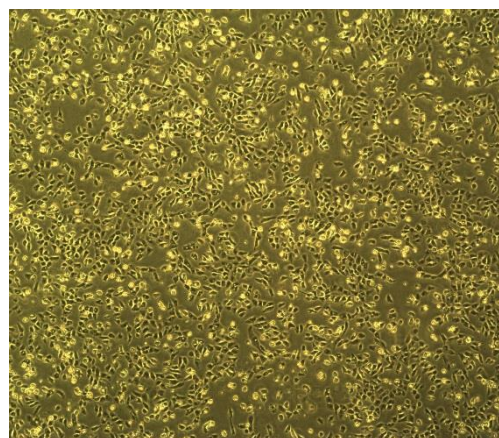
> 85 % konfluences. Šajā posmā šūnas ir eksponētas testējamām ķīmikālijām. 95 % šūnu dzīvotspēja.

Klasifikācija “nav citotoksicitātes”.

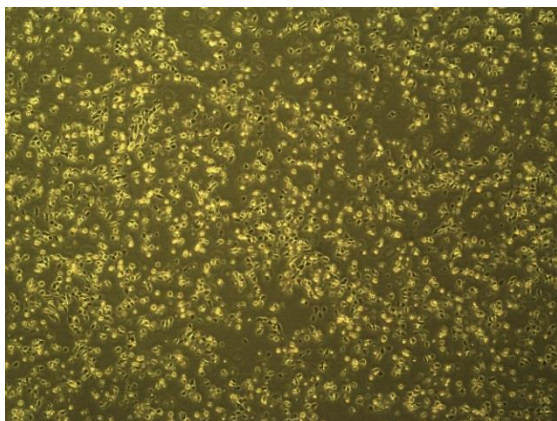


> 95 % konfluences. Šūnas ir blīvi saspiedušās un sāk pāraugt. 95 % šūnu dzīvotspēja.

Klasifikācija “nav citotoksicitātes”.



25 % šūnu dzīvotspēja. Šūnas atdalās, un saskare starp šūnām samazinās. Šūnas ir noapaļotas. Klasifikācija “citotoksicitāte”.



5 % šūnu dzīvotspēja. Šūnas ir pavisam atdalījušās, un nav saskares starp šūnām. Šūnas ir noapaļotas. Klasifikācija "citotoksicitāte".

B.67. ZĪDĪTĀJU ŠŪNU GĒNU MUTĀCIJU *IN VITRO* TESTI AR TIMIDĪNKINĀZES GĒNU

IEVADS

1. Šī testēšanas metode (TM) ir ekvivalenta ESAO Testēšanas vadlīnijā (TG) Nr. 490 (2016) aprakstītajam. Testēšanas metodes tiek pastāvīgi pārskatītas zinātnes sasniegumu, normatīvo prasību un dzīvnieku labturības apsvērumu gaismā. Peļu limfomas ķīmiskā analīze (MLA) un TK6 tests ar timidīnkināzes (TK) lokusu sākotnēji bija iekļauti B.17. testēšanas metodē. Vēlāk Genotoksiskuma testēšanas starptautiskā darbsemināra (IWGT) MLA ekspertu darbgrupa sagatavoja starptautiski saskaņotus ieteikumus par MLA ķīmiskās analīzes pieņemamības kritērijiem un datu interpretēšanu (1)(2)(3)(4)(5), un minētie ieteikumi ir iestrādāti šajā jaunajā, B.67. testēšanas metodē. Šī testēšanas metode ir paredzēta MLA un – tā kā tajā izmanto TK lokusu – arī TK6 testam. MLA jau iepriekš plaši izmantota normatīvām vajadzībām, bet TK6 lietots daudz retāk. Lai gan abu šūnu līniju beigupunkti ir līdzīgi, tās nav savstarpēji aizstājamas, un normatīvajās programmās var būt pamatoti dota priekšroka vienas vai otras līnijas izmantošanai kādai konkrētai normatīvai vajadzībai. Piemēram, MLA validācijā pierādījās, ka tā ir piemērota, lai detektētu ne tikai gēnu mutāciju, bet arī testējamās ķimikālijas spēju inducēt strukturālus hromosomu bojājumus. Šī testēšanas metode pieder pie ģenētiski toksikoloģiskās testēšanas metožu sērijas. ESAO nesen izstrādājusi dokumentu, kas īsi informē par ģenētiski toksikoloģisko testēšanu un sniedz pārskatu par neseniem ESAO ģenētiskā toksiskuma testēšanas vadlīniju grozījumiem (6).
2. Šā zīdītāju šūnu gēnu mutāciju *in vitro* testa nolūks ir detektēt ķimikāliju izraisītas gēnu mutācijas. Ar šajos testos izmantotajām šūnu līnijām mēra turpvērstas reportiergēnu mutācijas endogēniskajā timidīnkināzes gēnā (cilvēka šūnu *TK* un graužēju šūnu *Tk*; šajā testēšanas metodē abi dēvēti par *TK*). Šo testēšanas metodi paredzēts izmantot ar divām šūnu līnijām, proti, L5178Y $TK^{+/-}$ -3.7.2C peļu limfomas šūnu līniju (vispārīgais nosaukums L5178Y) un TK6 cilvēka limfoblastoīdo šūnu līniju (vispārīgais nosaukums TK6). Kaut arī abas šūnu līnijas atšķiras izcelsmes, šūnu augšanas, p53 statusa un citādā ziņā, *TK* gēnu mutācijas testēšanu abu tipu šūnās ir iespējams veikt līdzīgā veidā, kas aprakstīts šajā testēšanas metodē.
3. Timidīnkināzes gēna autosomālā un heterozigotiskā iedaba ļauj detektēt dzīvotspējīgas kolonijas, kuru šūnās pēc mutācijas no $TK^{+/-}$ uz $TK^{-/-}$ timidīnkināzes ferments vairs neizpaužas. Šo neesību var radīt *TK* gēnu ietekmējoši ģenētiski notikumi, un to vidū var būt kā gēnu mutācijas (punktveida mutācijas, nolasīšanas fāzes nobīdes mutācijas, sīkas delēcijas u. c.), tā hromosomāli notikumi (plašas delēcijas, strukturālas hromosomu aberācijas un mitotiskā rekombinācija). Pēdējie

minētie notikumi izpaužas kā heterozigotitātes zudums, un cilvēka kanceroģenēzē tā ir parasta ģenētiska tumorsupresorgēnu pārmaiņa. Teorētiski ar MLA ir iespējams detektēt pilnīgu *TK* nesējas hromosomas zudumu dalīšanās vārpstas traucējumu un/vai mitotiskas neizšķiršanās ietekmē. Citoģenētiskā un molekulārā analīze, izmantotas kopā, skaidri parāda, ka daļa MLA *TK* mutantu ir neizšķiršanās rezultāts. Tomēr pierādījumu svars rāda, ka, piemērojot citotoksicitātes standartkritērijus (aprakstīti šajā testēšanas metodē), ar *TK* gēnu mutācijas testiem nav iespējams uzticami detektēt aneigēnus, un tāpēc šie testi aneigēnu detektēšanai nav piemēroti (7)(8)(9).

4. *TK* gēnu mutācijas testos tiek ģenerēti divām atšķirīgām fenotipiskajām klasēm piederīgi *TK* mutanti: normāli augošie mutanti, kas aug tikpat ātri kā *TK* heterozigotiskās šūnas, un lēnaudzīgie mutanti, kuru augšanu raksturo pagarināts dubultošanās laiks. Normāli augošie un lēnaudzīgie mutanti MLA tiek saukti attiecīgi par lielo un mazo koloniju mutantiem, bet *TK6* – par agrīno un vēlīno koloniju mutantiem. Lielo un mazo koloniju MLA mutantu molekulārās un citoģenētiskās īpašības ir sīki izpētītas (8)(10)(11)(12)(13). Visnotaļ sīki pētītas arī agrīno un vēlīno *TK6* mutantu molekulārās un citoģenētiskās īpašības (14)(15)(16)(17). Abu šūnu tipu lēnaudzīgos mutantus ietekmējuši ģenētiski bojājumi, kuri izpaužas ar augšanu regulējošu varbūtīgu gēnu vai gēniem *TK* lokusa tuvumā un kuru rezultāts ir ilgāks dubultošanās laiks un vēlīno jeb mazo koloniju veidošanās (18). Lēnaudzīgo mutantu inducēšana tiek saistīta ar ķīmikālijām, kas inducē plašas strukturālas izmaiņas hromosomālā līmenī. Šūnas, kuru bojājumi neizpaužas ar augšanu regulējošu varbūtīgu gēnu vai gēniem *TK* lokusa tuvumā, aug līdzīgā ātrumā kā vecāksūnas un kļūst par normāli augošiem mutantiem. Tādu mutantu inducēšana, kuri aug galvenokārt normāli, tiek saistīta ar ķīmikālijām, kas iedarbojas galvenokārt kā punktveida mutagēni. Tāpēc ir svarīgi pieskaņot gan lēnaudzīgos, gan normāli augošos mutantus, lai tādā veidā apzinātu tos visus un iegūtu priekšstatu par testējamās ķīmikālijas inducēto bojājumu tipu vai tipiem (mutagēni / klastogēni) (10)(12)(18)(19).
5. Šajā testēšanas vadlīnijā testēšanas metodes apraksts strukturēts tā, lai dotu vispārīgu informāciju, kas attiecas gan uz MLA, gan uz *TK6*, un pēc tam sīkākas vadlīnijas par katru atsevišķo testu.
6. Izmantotās definīcijas sniegtas 1. pielikumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI

7. *In vitro* testos metaboliskai aktivācijai parasti jāizmanto eksogēniskais avots. Eksogēnā metaboliskās aktivācijas sistēma *in vivo* apstākļus atdarina nepilnīgi.

8. Būtu jāraugās, lai nerodas tādi apstākļi (proti, varbūtēja mijiedarbība ar testa sistēmu), kas noved pie artefaktuāli pozitīviem rezultātiem, kurus nerada testējamās ķīmikālijas un šūnas ģenētiskā materiāla mijiedarbība; pie tādiem apstākļiem pieder arī pH vai osmolalitātes pārmaiņas, mijiedarbība ar barotnes sastāvdaļām (20)(21) vai pārāk augsti citotoksiskuma līmeņi (22)(23)(24). MLA un TK6 testā par pārāk augstiem uzskata līmeņus, kas pārsniedz 28. punktā definētos ieteicamos augšējos citotoksiskuma līmeņus. Turklāt jāatzīmē, ka testējamās vielas, kuras ir timidīna analogi vai iedarbojas kā timidīna analogi, šūnu apstrādes laikā var izraisīt spontānu fona mutantu selektīvu augšanu un tādējādi palielināt mutantu biežumu, tāpēc šo vielu adekvātas izvērtēšanas labad jāizmanto papildu testēšanas metodes (25).
9. Attiecībā uz nanomateriāliem, kas iegūti ar inženierijas paņēmieniem, šo testēšanas metodi var būt vajadzīgs pielāgot, taču tas šeit nav konkrēti aprakstīts.
10. Pirms šo testēšanas metodi izmantot maisījuma testēšanai nolūkā iegūt datus kādam normatīvam mērķim, jāapsver, vai un kādā veidā tā varētu dot minētajam mērķim piemērotus rezultātus. Ja pastāv normatīva prasība maisījumu testēt, šāda apsvērsana nav vajadzīga.
11. Mutantšūnas, kurās pēc mutācijas no $TK^{+/-}$ uz $TK^{-/-}$ vairs neizpaužas timidīnkināzes fermentatīvā darbība, ir rezistentas pret pirimidīna analoga trifluortimidīna (TFT) citostatisko iedarbību. TK standartšūnas ir jutīgas pret TFT, kas izraisa šūnu metabolisma inhibēšanu un aptur šūnu turpmāko dalīšanos. Tātad mutantšūnas TFT klātbūtnē spēj proliferēt un veidot redzamas kolonijas, turpretī TK fermentu saturošās šūnas to nespēj.

TESTA PRINCIPS

12. Šūnas, kas ir suspensijā, uz piemērotu laiku (sk. 33. punktu) gan ar eksogēnisku metaboliskas aktivācijas avotu, gan bez tā (sk. 19. punktu) eksponē testējamajai ķīmikālijai un pēc tam subkulturē, lai noteiktu citotoksiskumu un lai pirms mutantu atlasīšanas varētu notikt fenotipiskā ekspresija. Citotoksicitāti nosaka pēc relatīvā kopējā pieauguma (RTG; sk. 25. punktu) MLA gadījumā un pēc relatīvās izdzīvotības (RS; sk. 26. punktu) TK6 gadījumā. Lai inducēto mutāciju fenotipiskā ekspresija varētu izpausties gandrīz optimāli, apstrādātās kultūras barotnē tur pietiekami ilgu laiku, kas ir raksturīgs katram izvēlētajam šūnu tipam (sk. 37. punktu). Kad notikusi fenotipiskā ekspresija, nosaka mutantu biežumu, noteiktu skaitu šūnu izsējot barotnē, kas satur selektīvo aģentu, ar kuru detektē mutantkolonijas, un barotnē bez selektīvā aģenta, pēc kuras nosaka klonēšanās efektivitāti (dzīvotspēju). Pēc piemērota inkubēšanas laika kolonijas saskaita. Mutantu biežumu aprēķina pēc mutantkoloniju skaita, ko koriģē ar klonēšanās efektivitāti mutantu atlasīšanas brīdī.

METODES APRAKSTS

Preparāti

Šūnas

13. Attiecībā uz MLA: tā kā MLA ir izstrādāta un aprakstīta, izmantojot L5178Y šūnu $TK^{+/-}$ -3.7.2C apakšlīniju, jāņem šī konkrētā apakšlīnija. L5178Y šūnu līnija tikusi atvasināta no DBA-2 peļu timīnās limfomas, kas inducēta ar metilholantrēnu (26). *Clive* un līdzstrādnieki L5178Y šūnas (*Clive* klasificētas kā $TK^{+/+}$ -3) apstrādāja ar etilmetāna sulfonātu un izolēja $TK^{-/-}$ (klasificēta kā $TK^{-/-}$ -3.7) klonu, par selektīvo aģentu izmantojot bromdeoksiuridīnu. No $TK^{-/-}$ tika izolēts un izmantošanai MLA aprakstīts spontāns $TK^{+/-}$ klons (klasificēts kā $TK^{+/-}$ -3.7.2.) un apakšklons (klasificēts kā $TK^{+/-}$ -3.7.2C) (27). Šīs šūnu līnijas kariotips tika publicēts (28)(29)(30)(31). Tā modālais hromosomu skaits ir 40. Ir viena metacentriskā hromosoma (t12 13), kas būtu jāpieskaita kā viena hromosoma. Peļu *TK* lokuss atrodas 11. hromosomas distālajā galā. L5178Y $TK^{+/-}$ -3.7.2C šūnu līnijai mutācijas ir abās p53 alēlēs, un tā rada p53 mutantproteīnu (32)(33). Visdrīzāk $TK^{+/-}$ -3.7.2C šūnu līnijas p53 statuss ir tas, kas nosaka, cik labi tests spēj detektēt plašus bojājumus (17).
14. Attiecībā uz TK6: TK6 ir cilvēka limfoblastoīdo šūnu līnija. Vecākšūnu līnija ir *Epstein-Barr* vīrusa transformēta šūnu līnija, WI-L2, sākotnēji iegūta no piecgadīga zēna, kurš sirga ar pārmantotu sferocitozi. Pirmo izolēto klonu, HH4, mutagenizēja ar ICR191, un rezultātā ieguva *TK* heterozigotisku šūnu līniju, TK6 (34). TK6 šūnas ir gandrīz diploīdas, un reprezentatīvais kariotips ir 47, XY, 13+, t(14; 20), t(3; 21) (35). Cilvēka *TK* lokuss atrodas 17. hromosomas garajā plecā. TK6 ir p53 ziņā kompetenta šūnu līnija, jo tai abās alēlēs ir savvaļas tipa p53 sekvenca un ekspresijā – tikai savvaļas tipa p53 proteīns (53).
15. Kad testēšanas laboratorija veic izejkultūras veidošanu vai papildināšanu, gan MLA, gan TK6 gadījumā ieteicams nodrošināt, ka nav kontaminācijas ar *Mycoplasma*, noteikt šūnu kariotipu vai iekrāsot *TK* lokusu nesošās hromosomas un pārbaudīt populāciju dubultošanās laikus. Jānosaka, kāds ir testēšanas laboratorijā izmantoto šūnu normālais šūnas cikla ilgums, un tam jāsakrīt ar publicētajiem šūnu raksturlielumiem (16)(19)(37). Šī izejkultūra jāglabā -150 °C vai zemākā temperatūrā, un no tās gatavojamas visas šūnu darbkultūras.
16. Pirms ar krioprezervācijas palīdzību lielā skaitā veidot darbkultūras vai vienkārši pirms kultūras izmantošanas eksperimentā tā var būt jāattīra no iepriekš pastāvošajām mutantšūnām [izņemot tad, ja šķīdinātāja kontrolē mutantu biežums (MF) jau tolaik ir pieņemamā diapazonā (attiecībā uz MLA sk. 2. tabulu)]. Tas darāms, izmantojot metotreksātu (amīnopterīnu), lai šūnas, kurās *TK* neizpaužas, tiktu negatīvi atlasītas, un pievienojot kultūrai timidīnu, hipoksantīnu un glicīnu (L5178Y) vai 2'-deoksicitidīnu (TK6), lai tādā veidā nodrošinātu *TK* ziņā kompetento šūnu optimālu

augšanu (19)(38)(39), TK6 gadījumā (40). Vispārīgus ieteikumus par labu praksi šūnu kultūru uzturēšanā, kā arī ieteikumus konkrēti par L5178Y un TK6 šūnām skatīt (19)(31)(37)(39)(41). Laboratorijām, kam šūnu izejkultūras vajadzīgas MLA vai TK6 iniciēšanas nolūkiem vai kam vajadzīgas jaunas šūnu izejkultūras, ir pieejams labi aprakstītu šūnu repozitorijs (37).

Barotne un kultivēšanas apstākļi

17. Abos testos kultūru uzturēšanai jāizmanto attiecīgas barotnes un attiecīgi inkubācijas apstākļi (piem., kultivēšanas trauki, mitrināta atmosfēra ar CO₂ koncentrāciju 5 %, inkubācijas temperatūra 37 °C). Šūnu kultūras vienmēr jātur tādos apstākļos, lai būtu nodrošināts, ka augšana notiek eksponenciālā fāzē. Īpaši svarīgi ir izraudzīties tādu barotni un tādas kultivēšanas apstākļus, kuri nodrošina šūnu optimālu augšanu ekspresijas periodā un gan mutantšūnu, gan nemutējušo šūnu klonēšanas. Gan MLA, gan TK6 gadījumā svarīgi ir arī tas, lai kultivēšanas apstākļi nodrošinātu optimālu augšanu kā lielo/agrīno, tā mazo/vēlīno koloniju TK mutantiem. Vairāk par kultivēšanu, arī par vajadzību pienācīgi termiski inaktivēt zirgu serumu, ja mutantu atlasē tiek izmantota RPMI barotne, skatīt (19)(31)(38)(39)(40)(42).

Kultūru sagatavošana

18. No izejkultūrām tiek pavairotas šūnas, tās iesētas kultūras barotnē tādā blīvumā, lai apstrādes periodā un ekspresijas periodā kultūras suspensijās joprojām augtu eksponenciāli.

Metaboliskā aktivācija

19. Ja strādā ar L5178Y un TK6 šūnām – to endogēniskā metaboliskā kapacitāte nav pietiekama –, jāizmanto eksogēniskas metaboliskās aktivācijas sistēmas. Visplašāk izmantotā sistēma, kuru iesaka izmantot pēc noklusējuma, ja vien nav pamata izmantot citu, ir ar kofaktoru papildināta postmitohondriālā frakcija (S9) no graužēju (parasti žurku) aknām, kas apstrādātas ar fermentus inducējošām vielām, piemēram, Aroclor 1254 (43)(44)(45) vai fenobarbitālu kombinācijā ar β-naftoflavonu (46)(47)(48)(49)(50)(51). Pēdējā minētā kombinācija nav pretrunā ar Stokholmas Konvenciju par noturīgajiem organiskajiem piesārņotājiem (52) un jauktas funkcijas oksidāžu inducēšanā izrādījusies tikpat efektīva kā Aroclor 1254 (45)(46)(47)(48)(49). S9 frakciju parasti izmanto 1–2 % tilpumkoncentrācijā, bet galīgajā testa barotnē tilpumkoncentrāciju var palielināt līdz 10 %. Eksogēnās metaboliskās aktivācijas sistēmas vai metaboliskā inducētāja veida un koncentrācijas izvēli var ietekmēt testējamo ķīmikāliju klase.

Testējamās ķīmikālijas sagatavošana

20. Cietas testējamās ķīmikālijas jāsatavo attiecīgos šķīdinātājos un attiecīgā gadījumā pirms šūnu apstrādes jāatšķaida (sk. 21. punktu). Šķīdros testējamās ķīmikālijas var

testa sistēmai pievienot tieši un/vai pirms testa sistēmas apstrādes atšķaidīt. Gāzveida vai gaistošas testējamās ķīmikālijas jātestē pēc attiecīgām standarta protokolu modifikācijām, piemēram, apstrādi veicot hermētiski noslēgtos kultivēšanas traukos (53)(54)(55). Testējamās ķīmikālijas preparāti jāpagatavo tieši pirms apstrādes, ja vien dati par stabilitāti neliecina, ka tos var glabāt.

TESTĒŠANAS NOSACĪJUMI

Šķīdinātāji

21. Šķīdinātājs jāizvēlas tā, lai optimizētu testējamās ķīmikālijas šķīdību, šķīdinātājam negatīvi neietekmējot testa norisi, piemēram, nemainot šūnu augšanu, neskarot testējamās ķīmikālijas integritāti, nereaģējot ar kultivēšanas traukiem, nepasliktinot metaboliskās aktivācijas sistēmu. Ja vien iespējams, ieteicams vispirms apsvērt, vai neizmantot šķīdinātāju (vai kultūras barotni) uz ūdens bāzes. Plaši atzīti šķīdinātāji ir ūdens vai dimetilsulfoksīds. Galīgajā apstrādes barotnē organisko šķīdinātāju tilpumkoncentrācijai parasti nevajadzētu pārsniegt 1 %, bet uz (sālsūdens vai saldūdens) bāzes pagatavotu šķīdinātāju tilpumkoncentrācijai – 10 %. Ja tiek izmantoti ne tik plaši atzīti šķīdinātāji (piem., etanols vai acetons), to izmantošana jāpamato ar datiem, kas apliecina to saderību ar testējamajām ķīmikālijām, izmantoto testa sistēmu un ģenētiskās toksicitātes neesību izmantotajā koncentrācijā. Ja šādu apliecināšanu nav, svarīgi ir izmantot arī neapstrādātas kontroles (sk. definīciju 1. papildinājumā), lai ar tām pierādītu, ka izraudzītajam šķīdinātājam nav deletējošas vai mutagēniskas ietekmes.

CITOTOKSISKUMA MĒRĪŠANA UN APSTRĀDES KONCENTRĀCIJU IZRAUDZĪŠANĀS

22. Nosakot augstāko testējamās ķīmikālijas koncentrāciju, neizraugās koncentrācijas, kas spēj izraisīt tādas artefaktuāli pozitīvas atbildreakcijas kā pārmērīgs citotoksiskums (sk. 28. punktu), izgulsnēšanās (sk. 29. punktu) kultūras barotnē vai manāmas pH vai osmolalitātes pārmaiņas (sk. 8. punktu). Lai nepieļautu artefaktuāli pozitīvus rezultātus un uzturētu pienācīgus kultivēšanas apstākļus gadījumā, ja testējamā ķīmikālija pievienošanas brīdī manāmi maina barotnes pH, to var koriģēt, galīgajā apstrādes barotnē pievienojot buferšķīdumu.
23. Koncentrācijas izraugās pēc citotoksiskuma un citiem apsvērumiem (sk. 27.–30. punktu). Kaut arī citotoksiskuma izvērtēšana sākotnējā testā var noderēt, lai sekmīgāk noteiktu galvenajā eksperimentā izmantojamās koncentrācijas, sākotnējais tests nav jāveic obligāti. Pat ja citotoksiskums izvērtēts jau no sākuma, galvenajā eksperimentā tas joprojām jānosaka katrai kultūrai. Ja eksperimentā nosaka diapazonu, būtu jāaptver plašs koncentrāciju spektrs un eksperiments jābeidz vai nu pirmajā dienā pēc

apstrādes, vai (ja izmantotās koncentrācijas izrādās piemērotas) tas jāturpina divu dienu ilgajā ekspresijas laikā līdz mutantu atlasei.

24. Citotoksicitāte jānosaka katrā individuālā testa kultūrā un kontrolkultūrā: MLA (2) un TK6 (15) atbilstošās metodes ir definētas ar starptautiski saskaņotu praksi.
25. Abās (agara un mikroiedobju) MLA versijās citotoksicitāte jāizvērtē, izmantojot relatīvo kopējo pieaugumu (RTG), kuru 1975. gadā sākotnēji definējuši *Clive* un *Spektor* (2). Tas ietver relatīvo suspensijas pieaugumu (RSG: testa kultūra / šķīdinātāja kontrole) šūnu apstrādes laikā, ekspresijas laiku un relatīvo klonēšanās efektivitāti (RCE: testa kultūra / šķīdinātāja kontrole) mutantu atlasīšanas brīdī (2). Jāatzīmē, ka ar RSG ir ņemts vērā arī apstrādes laikā novērojama šūnu zudums testa kultūrā (sk. formulas 2. papildinājumā).
26. Attiecībā uz TK6 citotoksicitāte jāizvērtē pēc relatīvās izdzīvotības (RS), proti, pēc to šūnu klonēšanās efektivitātes (CE), kuras tūlīt pēc apstrādes uzsētas uz platēm, CE koriģējot atkarībā no šūnu zuduma apstrādes laikā salīdzinājumā ar šūnu skaitu negatīvajā kontrolē (kurā izdzīvotību pieņem par 100 %), sk. formulu 2. papildinājumā.
27. Jāizvērtē vismaz četras testējamās koncentrācijas (nerēķinot šķīdinātāja un pozitīvās kontroles), kas atbilst pieņemamības kritērijiem (attiecīga citotoksicitāte, šūnu skaits u. c.). Lai gan ir ieteicams izmantot duplikatīvas kultūras, ar katru testējamo koncentrāciju var izmantot vai nu replikatīvas, vai atsevišķas apstrādātas kultūras. Ar replikatīvajām kultūrām pie kādas konkrētas koncentrācijas iegūtie rezultāti pārskatā būtu jāatspoguļo atsevišķi, bet datu analīzes vajadzībām tos drīkst apvienot (55). Attiecībā uz testējamajām ķīmikālijām, kas uzrāda nelielu vai neuzrāda nekādu citotoksicitāti, parasti noderēs divkārtšotas līdz trīskārtšotas koncentrācijas intervāli. Ja citotoksicitāte ir novērojama, koncentrācijas jāizraugās tā, lai citotoksitātes diapazons aptvertu gan koncentrācijas, pie kurām citotoksicitāte ir tāda, kāda aprakstīta 28. punktā, gan koncentrācijas, pie kurām citotoksicitāte ir vidēji liela vai maza, vai arī tās nav. Daudzām testējamajām ķīmikālijām ir novērojama stāva koncentrācijatkarīgās atbildreakcijas līkne, un, lai aptvertu visu citotoksitātes diapazonu vai lai detalizēti izpētītu devas un atbildreakcijas sakarību, var būt nepieciešams izmantot koncentrācijas ar tuvākiem intervāliem un vairāk nekā četras koncentrācijas, jo īpaši situācijās, kur eksperiments jāatkārto (sk. 70. punktu). Vairāk nekā 4 koncentrācijas var būt īpaši vajadzīgas, ja jāizmanto atsevišķas kultūras.
28. Ja maksimālo koncentrāciju izraugās pēc citotoksitātes, ar augstāko koncentrāciju MLA gadījumā būtu jācenšas panākt līdz 10 % lielu RTG, bet TK6 gadījumā – 20 līdz 10 % lielu RS (67. punkts).

29. Mazšķīstošu testējamo ķīmikāliju gadījumā, kuras pie koncentrācijām, kas zemākas par zemāko nešķīstošās frakcijas koncentrāciju, nav citotoksiskas, pie augstākās analizētās koncentrācijas pēc apstrādes ar testējamo ķīmikāliju jārodas ar neapbruņotu aci vai ar invertēto mikroskopu redzamai duļķainībai vai nogulsnēm. Pat ja citotoksicitāte novērojama pie koncentrācijas, kas augstāka par zemāko nešķīstošās frakcijas koncentrāciju, ieteicams testēt tikai vienu koncentrāciju, kas rada acīmredzamu duļķainību vai nogulsnes, jo nogulsnes var artefaktiski ietekmēt rezultātus. Tā kā MLA un TK6 tiek izmantotas suspensijas kultūras, īpaši būtu jāraugās, lai nogulsnes netraucētu testa izdarīšanā. Turklāt var būt lietderīgi pirms eksperimenta noteikt šķīdību kultūras barotnē.
30. Ja nogulsnes vai ierobežojoša citotoksicitāte netiek novēroti, augstākajai testējamajai koncentrācijai jāatbilst 10 mM, 2 mg/ml vai 2 µl/ml atkarībā no tā, kura ir zemāka (57)(58). Ja testējamās ķīmikālijas sastāvs nav noteikts, piem., tā ir viela, kuras sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, tā ir komplekss reakcijas produkts vai bioloģisks materiāls [t. i., ķīmiska viela, kuras sastāvs nav zināms vai ir mainīgs (*UVCB*)], vidiski ekstrakti u. tml., gadījumos, kur netiek novērota pietiekama citotoksicitāte, augstākā koncentrācija var būt jāpalielina (piem., līdz 5 mg/ml), lai būtu panākta augstāka katras sastāvdaļas koncentrācija. Tomēr jāpiebilst, ka attiecībā uz cilvēkiem paredzētajām zālēm šīs prasības var būt citādas (59).

Kontroles

31. Ikvienā eksperimentā jāiekļauj paralēlas negatīvās kontroles (sk. 21. punktu), proti, tikai šķīdinātāju apstrādes barotnē, ar ko rīkojas tieši tāpat kā ar apstrādātajām kultūrām.
32. Paralēlās pozitīvās kontroles ir nepieciešamas, lai pierādītu laboratorijas spēju identificēt mutagēnus izmantotā testēšanas protokola apstākļos, (attiecīgā gadījumā) eksogēnās metaboliskās aktivācijas sistēmas efektivitāti un to, ka tiek adekvāti detektēti kā mazo/vēlīno, tā lielo/agrīno koloniju TK mutanti. Pozitīvo kontroļu piemēri sniegti zemāk 1. tabulā. Var izmantot alternatīvas pozitīvās kontrolvielas, ja tas ir pamatoti. Tā kā zīdītāju šūnu ģenētiskās toksicitātes *in vitro* testi ir pietiekami standartizēti īslaicīgām (3–4 stundu ilgām) apstrādēm, kas tiek veiktas paralēli ar tikpat ilgu metabolisko aktivāciju un bez tās, ir iespēja pozitīvās kontroles izmantot tik vien kā attiecībā uz mutagēnu, kam nepieciešama metaboliskā aktivācija. Šajā gadījumā viena vienīga pozitīva kontroles atbildreakcija apliecinās gan metaboliskās aktivācijas sistēmas darbību, gan testa sistēmas reaģētspēju. Ilglaičīgas (piem., 24 stundas bez S9) apstrādes gadījumā tomēr vajadzīga atsevišķa pozitīvā kontrole, jo apstrādes ilgums atšķirsies no tā, ko izmanto testā ar metabolisko aktivāciju. Lai varētu pierādīt testa sistēmas jutību, katra pozitīvā kontrole būtu jāizmanto ar vienu vai vairākām tādām koncentrācijām, ar kurām gaidāma reproducējama un detektējama

palielināšanās salīdzinājumā ar fonu, turklāt atbildreakciju nedrīkstētu kompromitēt citotoksicitāte, kas pārsniedz šai testēšanas metodei specificētās robežas (sk. 28. punktu).

1. tabula. References vielas, ko ieteicams izmantot laboratorijas kompetences novērtēšanai un pozitīvo kontroļu izraudzīšanās vajadzībām

Kategorija	Vielas	CAS Nr.
1. Mutagēni, kuriem metaboliskā aktivācija nav vajadzīga		
Metilmetānsulfonāts	66-27-3	
Mitomicīns C	50-07-7	
4-Nitrohinolīn- <i>N</i> -oksīds	56-57-5	
2. Mutagēni, kuriem metaboliskā aktivācija ir vajadzīga		
Benz(a)pirēns	50-32-8	
Ciklofosfamīds (monohidrāts)	50-18-0 (6055-19-2)	
7,12-Dimetilbenzantracēns	57-97-6	
3-Metilholantrēns	56-49-5	

PROCEDŪRA

Apstrāde ar testējamo ķīmikāliju

33. Proliferējošas šūnas ar testējamo ķīmikāliju apstrādā gan metaboliskās aktivācijas sistēmas klātbūtnē, gan bez tās. Ekspozīcijai jāilgst attiecīgu laiku (parasti pietiek ar 3–4 stundām). Tomēr jāpiebilst, ka attiecībā uz cilvēkiem paredzētajām zālēm šīs prasības var būt citādas (59). MLA gadījumā, ja īslaicīga apstrāde dod negatīvus rezultātus un ir informācija, kas liecina, ka var būt vajadzīga ilgāka apstrāde [piem., nukleozīda analogiem, mazšķīstošām ķīmikālijām (5)(59)], jāapsver testa izdarīšana, izmantojot ilglaicīgāku apstrādi, piem., 24 stundas bez S9.
34. Minimālais šūnu skaits, ko izmanto katrai testa kultūrai (gan kontrolkultūrai, gan apstrādātai kultūrai), katrā testa posmā jābalsta uz spontāno mutantu biežumu. Vispārīgs princips ir šūnas apstrādāt un pasāzām ņemt tādā skaitā, lai visās testa fāzēs (apstrādē, fenotipiskajā ekspresijā un mutantu atlasē) katrā eksperimentālajā kultūrā saglabātos vismaz 10, bet ideālā gadījumā 100 spontāno mutantu (56).
35. MLA gadījumā ieteicamais pieņemamais spontāno mutantu biežums ir $35\text{--}140 \times 10^{-6}$ (agars versijā) un $50\text{--}170 \times 10^{-6}$ (mikroiedobju versijā) (sk. 2. tabulu). Lai katrā testa kultūrā pēc apstrādes paliktu vismaz 10 un ideāli 100 spontāno mutantu, ir jāapstrādā vismaz 6×10^6 šūnu. Šāda skaita apstrāde un pietiekama šūnu skaita uzturēšana ekspresijas un mutantu atlasei vajadzīgās klonēšanas laikā visās eksperimenta fāzēs

nodrošina pietiekami daudz (10 vai vairāk) spontāno mutantu, arī kultūrās, kas apstrādātas ar koncentrācijām, kuras rada 90 % citotoksicitāti (izmērīta ar 10 % RGT) (19)(38)(39).

36. TK6 gadījumā spontāno mutantu biežums parasti ir $2-10 \times 10^{-6}$. Lai katrā kultūrā pēc apstrādes paliktu vismaz 10 spontāno mutantu, ir jāapstrādā vismaz 20×10^6 šūnu. Šāda šūnu skaita apstrāde nodrošina pietiekami daudz (10 vai vairāk) spontāno mutantu, arī kultūrās, kas apstrādātas ar koncentrācijām, kuras rada 90 % citotoksicitāti (10 % RS). Turklāt pietiekamā skaitā jābūt arī šūnām, ko kultivē ekspresijas periodā un mutantu atlasīšanas nolūkā uzsēj uz platēm (60).

Fenotipiskās ekspresijas laiks un citotoksiskuma un mutantu biežuma mērīšana

37. Lai jauninducēto mutantu fenotipiskā ekspresija varētu izpausties gandrīz optimāli, pēc apstrādes šūnas vēl kultivē noteiktu laiku, kas ir katrai šūnu līnijai specifisks. MLA gadījumā fenotipiskās ekspresijas periods ilgst 2 dienas. TK6 gadījumā fenotipiskās ekspresijas periods ir 3–4 dienas. Ja veic 24 stundu ilgu apstrādi, ekspresijas periodu sāk skaitīt no apstrādes beigu brīža.
38. Fenotipiskās ekspresijas perioda laikā šūnas katru dienu tiek saskaitītas. MLA gadījumā šūnu skaitīšanas rezultātu izmanto, lai aprēķinātu dienišķo suspensijas pieaugumu (SG). Kad beidzies 2 dienu ilga ekspresijas periods, barotnē ar selektīvo aģentu un bez tā šūnas tiek suspendētas, lai noteiktu attiecīgi mutantu skaitu (selekcijas plates) un klonēšanās efektivitāti (dzīvotspējas plates). Ir divas vienādi pieņemamas metodes, ar kurām MLA tiek klonēti atlasīšanai vajadzīgie mutanti: vienā metodē izmanto mīksto agaru, bet otrā – šķidru barotni 96 iedobju mikrotitrēšanas platēs (19)(38)(39). TK6 gadījumā klonēšana notiek, izmantojot šķidras barotnes un 96 iedobju mikrotitrēšanas plates (16).
39. Vienīgais ieteicamais selektīvais aģents TK mutantiem ir trifluortimidīns (TFT).
40. MLA gadījumā agara platēm un mikroiedobju platēm skaitīšanu veic pēc 10–12 dienu ilgas inkubācijas. TK6 gadījumā agrīnos mutantus nosaka, kolonijas uz mikroiedobju platēm pieskaitot pēc 10–14 dienām. Lai parādītos lēnaudzīgie (vēlīnie) TK6 mutanti, pēc agrīno mutantu pieskaitīšanas šūnām no jauna jāpievieno barotne un TFT, un tad plates jāinkubē vēl 7–10 dienas (62). Vairāk par lēnaudzīgo un normāli augošo TK mutantu pieskaitīšanu skatīt 42. un 44. punktā.
41. Attiecīgās aprēķina formulas abiem testiem, arī abām MLA (agara un mikroiedobju) metodēm skatīt 2. papildinājumā. Pēc MLA agara metodes pieskaita kolonijas, atbilstoši klonēšanās efektivitātei koriģē mutantu koloniju skaitu un tad aprēķina MF. MLA un TK6 mikroiedobju versijā klonēšanās efektivitāti gan selekcijas platēm, gan klonēšanās efektivitātes platēm nosaka pēc t. s. Puasona sadalījuma (63). MF aprēķina, vadoties pēc šīm divām klonēšanās efektivitātes vērtībām.

Mutantkoloniju raksturošana

42. MLA gadījumā, ja testējamā ķimikālija ir pozitīva (sk. 62.–63. punktu), koloniju lielums vai augšana jāraksturo vismaz vienā no testa kultūrām (parasti pie augstākās pieņemamās pozitīvās koncentrācijas) un negatīvajā un pozitīvajā kontrolē. Ja testējamā ķimikālija ir negatīva (sk. 64. punktu), mutantkoloniju raksturošana jāveic negatīvajā un pozitīvajā kontrolē. Pēc MLA mikroiedobju metodes mazo koloniju mutantus definē kā tādus, kuri klāj mazāk nekā 25 % no iedobes platības, mērot pēc diametra, bet lielo koloniju mutantus – kā tādus, kuri klāj vairāk nekā 25 % no iedobes platības, mērot pēc diametra. Pēc agara metodes mutantkolonijas skaita un to lielumu nosaka automātiski, izmantojot koloniju skaitītāju. Koloniju lieluma noteikšanā iespējamās pieejas sīkāk aprakstītas literatūrā (19)(38)(40). Koloniju raksturošana negatīvajā un pozitīvajā kontrolē vajadzīga tādēļ, lai pierādītu, ka pētījums izdarīts adekvāti.
43. Testējamo ķimikāliju nevar noteikt par negatīvu, ja pozitīvajā kontrolē nav adekvāti detektēti kā lielo, tā mazo koloniju mutantu. Koloniju raksturošanu var izmantot, lai sniegtu vispārīgu informāciju par testējamās ķimikālijas spēju izraisīt punktveida mutācijas un/vai hromosomālus notikumus (4. punkts).
44. TK6: normāli augošos un lēnaudzīgos mutantus diferencē pēc inkubācijas laika atšķirības (sk. 40. punktu). TK6 gadījumā parasti saskaita gan agrīnos, gan vēlīnos mutantus visās kultūrās, arī negatīvajā un pozitīvajā kontrolē. Koloniju raksturošana negatīvajā un pozitīvajā kontrolē vajadzīga tādēļ, lai pierādītu, ka pētījums izdarīts adekvāti. Testējamo ķimikāliju nevar noteikt par negatīvu, ja pozitīvajā kontrolē nav adekvāti detektēti kā agrīnie, tā vēlīnie mutantu. Koloniju raksturošanu var izmantot, lai sniegtu vispārīgu informāciju par testējamās ķimikālijas spēju izraisīt punktveida mutācijas un/vai hromosomālus notikumus (4. punkts).

Laboratorijas kompetence

45. Lai pirms testa pastāvīgas izmantošanas demonstrētu pietiekamu vajadzīgo pieredzi, laboratorijai jābūt veikušai eksperimentu sēriju ar pozitīvās kontroles references vielām, kam ir dažādi iedarbības mehānismi (tās izraugās no 1. tabulas saraksta un vismaz vienai no tām aktīvai jābūt ar metabolisku aktivāciju un vienai — bez tās), un ar dažādām negatīvajām kontrolēm (neapstrādātām kultūrām un dažādiem šķīdinātājiem/nesējiem). Šo pozitīvo un negatīvo kontroļu atbildreakcijām jāsapas ar literatūras datiem. Šī prasība neattiecas uz laboratorijām, kurām ir pieredze, t. i., kuru rīcībā ir vēsturisko datu bāze, kas aprakstīta 47.–50. punktā. MLA gadījumā pozitīvās un negatīvās kontroles vērtībām jābūt saskaņā ar *IWGT* ieteikumiem (sk. 2. tabulu).
46. Lai varētu pierādīt, ka laboratorija ir kompetenta detektēt mutagēniskas ķimikālijas, noteikt metaboliskās aktivācijas sistēmas efektivitāti un pierādīt, ka šūnu augšanas apstākļi apstrādes laikā, fenotipiskā ekspresija un mutantu atlase, kā arī skaitīšanas

procedūras atbilst vajadzīgajam, pozitīvas kontroles vielu (sk. 1. tabulu) izlase jāpēta gan pie īslaicīgas un ilglaicīgas (ja izmanto) apstrādes bez metaboliskas aktivācijas, gan pie īslaicīgas apstrādes metaboliskas aktivācijas apstākļos. Lai varētu pierādīt testa sistēmas jutību un dinamisko diapazonu, jāizraugās tāds izlases ķīmikāliju koncentrāciju diapazons, kurā palielinājumi virs fona līmeņa būs reproducējami un koncentrācijatkarīgi.

Vēsturisko kontroļu dati

47. Laboratorijai jānosaka:

- vēsturisks pozitīvo kontroļu diapazons un sadalījums,
- vēsturisks negatīvo (neapstrādātu, ar šķīdinātāju) kontroļu diapazons un sadalījums.

48. Pirmoreiz iegūstot datus par vēsturisko negatīvo kontroļu sadalījumu, paralēlajām negatīvajām kontrolēm jāatbilst publicētajiem datiem par negatīvajām kontrolēm. Kontroļu sadalījumam tiekot papildinātam ar jauniem eksperimentu datiem, paralēlajām negatīvajām kontrolēm ideālā gadījumā jābūt minētā sadalījuma 95 % kontrolrobežās (64)(65).

49. Laboratorijas vēsturiskā negatīvo kontroļu datubāze sākotnēji jāveido ar vismaz 10 eksperimentiem, bet vēlams, lai tajā būtu vismaz 20 eksperimenti, kas veikti salīdzināmos eksperimentēšanas apstākļos. Lai varētu noteikt, cik mainīgi ir laboratorijas pozitīvo un negatīvo kontroļu dati, un parādīt, ka laboratorijā šī metodika “tiek kontrolēta” (66), laboratorijām jāizmanto tādas kvalitātes kontroles metodes kā kontroldiagrammas (piem., C diagrammas vai X joslu diagrammas (65)). Papildu ieteikumi par vēsturisko datu izveidi un izmantošanu atrodami literatūrā (64).

50. Negatīvo kontroļu datiem vajadzētu būt mutantu biežumam atsevišķās vai, ieteicams, replikatīvajās kultūrās; sk. aprakstu 27. punktā. Paralēlajām negatīvajām kontrolēm ideālā gadījumā jābūt laboratorijas vēsturisko negatīvo kontroļu datubāzes sadalījuma 95 % kontrolrobežās. Tādus negatīvo kontroļu datus, kas ir ārpus 95 % kontrolrobežas, iekļaušanai vēsturiskajā kontroļu sadalījumā var pieņemt tikai tad, ja šie dati nav pārmērīgi anomālas vērtības un ja ir pierādījumi, ka testa sistēma “tiek kontrolēta” (sk. 49. punktu) un nav gadījies ne tehniska kļūme, ne cilvēka kļūda.

51. Jebkādas izmaiņas eksperimenta protokolā jāapsver, ņemot vērā attiecīgo datu atbilstību laboratorijas esošajai vēsturisko kontroļu datubāzei. Būtisku neatbilstību gadījumā jāveido jauna vēsturisko kontroļu datubāze.

DATI UN PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

Rezultātu izklāsts

52. Datu izklāstā gan MLA, gan TK6 gadījumā jāiekļauj zemāk aprakstītie dati, kas vajadzīgi, lai aprēķinātu citotoksicitāti (attiecīgi RTG vai RS) un mutantu biežumu apstrādātajās un kontroles kultūrās.
53. MLA gadījumā jānorāda individuālu kultūru dati par RSG, RTG, klonēšanās efektivitāti mutantu atlasīšanas brīdī un mutantkoloniju skaits (agara versijā) vai tukšo iedobju skaits (mikroiedobju versijā). Mutantu biežums (MF) jāizteic ar mutantšūnu skaitu uz miljonu izdzīvojušo šūnu. Ja atbildreakcija ir pozitīva, vismaz pie vienas no testējamās ķīmikālijas koncentrācijām (parasti pie augstākās pozitīvās koncentrācijas) un negatīvajā un pozitīvajā kontrolē jānorāda mazo un lielo koloniju MF (un/vai to īpatsvars kopējā MF). Ja atbildreakcija ir negatīva, mazo un lielo koloniju MF jānorāda negatīvajā kontrolē un pozitīvajā kontrolē.
54. TK6 gadījumā jānorāda individuālu kultūru dati par RS, klonēšanās efektivitāti mutantu atlasīšanas brīdī un tukšo iedobju skaits attiecībā uz agrīnajiem un vēlīnajiem mutantiem. MF jāizteic ar mutantšūnu skaitu uz izdzīvojušo šūnu skaitu un jānorāda gan kopējais MF, gan agrīno un vēlīno mutantu MF (un/vai to īpatsvars kopējā MF).

Pieņemamības kritēriji

55. Lai varētu noteikt konkrētas ķīmikālijas testēšanas koprezultātus, gan MLA, gan TK6 gadījumā jābūt izpildītiem šādiem kritērijiem:
- testēšana notikusi ar diviem eksperimentēšanas nosacījumiem (īslaicīga apstrāde ar metabolisko aktivāciju un bez tās, sk. 33. punktu), ja vien vienā no tiem rezultāti nav bijuši pozitīvi;
 - pietiekams šūnu un koncentrāciju skaits ir analizēšanai derīgs (sk. 27. punktu un 34.–36. punktu);
 - augstākās koncentrācijas izvēles kritēriji atbilst 28.–30. punktā aprakstītajiem.

Negatīvo un pozitīvo kontroļu pieņemamības kritēriji

56. *IWGT* izveidotā MLA ekspertu darbgrupa ir analizējusi lielu daudzumu MLA datu, un rezultātā ir panākta starptautiska vienprātība par konkrētiem MLA pieņemamības kritērijiem (1)(2)(3)(4)(5). Tāpēc šajā testēšanas metodē sniegti konkrēti ieteikumi par to, kā MLA gadījumā nosakāma negatīvās un pozitīvās kontroles pieņemamība un izvērtējami individuālu vielu rezultāti. TK6 datubāze ir daudz mazāka un nav tikusi izvērtēta darbgrupā.
57. MLA gadījumā ikviens eksperiments jāizvērtē to tāda viedokļa, vai neapstrādātā/šķīdinātāja kontrole atbilst *IWGT* izveidotās MLA darbgrupas noteiktajiem pieņemamības kritērijiem (sk. (4) un zemāk 2. tabulu) attiecībā uz: 1) MF (turklāt MLA agara un mikroiedobju versijās *IWGT* pieņemamie MF ir

atšķirīgi); 2) klonēšanās efektivitāti (CE) mutantu atlasīšanas brīdī un 3) suspensijas pieaugumu (SG) šķīdinātāja kontrolē (formulas sk. 2. papildinājumā).

2. tabula. MLA pieņemamības kritēriji

Parametrs	Mīkstā agara metode	Mikroiedobju metode
Mutantu biežums	35–140 x 10 ⁻⁶	50–170 x 10 ⁻⁶
Klonēšanās efektivitāte	65–120%	65–120%
Suspensijas pieaugums	8 līdz 32-kārtīgs (3–4 stundu apstrādē) 32 līdz 180-kārtīgs (24 stundu apstrādē, ja tādu veic)	8 līdz 32-kārtīgs (3–4 stundu apstrādē) 32 līdz 180-kārtīgs (24 stundu apstrādē, ja tādu veic)

58. MLA gadījumā ikviens tests jāizvērtē arī no tā viedokļa, vai pozitīvā kontrole (kontroles) atbilst vismaz vienam no šādiem diviem *IWGT* darbgrupas izstrādātiem pieņemamības kritērijiem:

- pozitīvajai kontrolei jāuzrāda absolūts kopējā MF palielinājums, t. i., palielinājums, kas pārsniedz vismaz 300 x 10⁻⁶ lielo spontāno fona MF [inducēto MF jeb IMF]. Vismaz 40 % no IMF jābūt mazo koloniju MF;
- pozitīvajā kontrolē mazo koloniju MF palielinājumam vismaz par 150 x 10⁻⁶ jāpārsniedz tas, kas ir paralēlajā neapstrādātajā/šķīdinātāja kontrolē (150 x 10⁻⁶ liels mazo koloniju IMF).

59. TK6 gadījumā tests ir pieņemams, ja paralēlā negatīvā kontrole tiek uzskatīta par pieņemamu iekļaušanai laboratorijas vēsturisko negatīvo kontroļu datubāzē saskaņā ar 48.–49. punktu. Turklāt paralēlajām pozitīvajām kontrolēm (sk. 32. punktu) jāinducē atbildreakcijas, kas atbilst tām, kuras ģenerētas vēsturiskajā pozitīvo kontroļu datubāzē iekļautajās kontrolēs, un jāizsaka statistiski ievērojams palielinājums salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli.

60. Abos testos pozitīvajā kontroles kultūrā novērotās citotoksicitātes augšējai robežvērtībai jābūt tādai pašai kā eksperimentālajās kultūrās. Tas nozīmē, ka RTG/RS jābūt ne mazākam par 10 %. Lai pierādītu, ka pozitīvās kontroles pieņemamības kritēriji ir izpildīti, pietiek ar vienu koncentrāciju (vai pietiek izmantot vienu no pozitīvās kontroles kultūras koncentrācijām, ja tādas ir vairākas). Turklāt pozitīvās kontroles MF jābūt laboratorijas noteiktā pieņemamā diapazona robežās.

Rezultātu izvērtēšana un interpretēšana

61. *IWGT* Peļu limfomas ekspertu darbgrupa ir daudz izdarījusi MLA bioloģiskā relevanta un pozitīvas atbildreakcijas kritēriju jomā (4). Tāpēc šajā testēšanas metodē sniegti konkrēti ieteikumi par to, kā interpretēt ar MLA testēto ķīmikāliju

rezultātus (sk. 62.–64. punktu). TK6 datubāze ir daudz mazāka un nav tikusi izvērtēta darbgрупā. Tāpēc ieteikumi par TK6 datu interpretēšanu ir vispārīgāki (sk. 65.–66. punktu). Papildus doti daži ieteikumi, kas attiecas uz abiem testiem (sk. 67.–71. punktu).

Tikai MLA

62. Lai nodrošinātu MF palielinājuma bioloģisko relevantumu, ieteicama šāda pieeja pozitīvas un negatīvas atbildreakcijas noteikšanā. Tajā neizmanto statistisko analīzi kā vairumā pārējo testu, bet gan iepriekš noteiktu inducēto mutantu biežumu (t. i., MF palielinājumu, kas pārsniedz paralēlās kontroles uzrādīto), ko apzīmē ar vispārējo izvērtējuma koeficientu (GEF), kurš noteikts, analizējot līdzdalīgo laboratoriju iegūto negatīvās kontroles MF datu sadalījumu (4). MLA agara versijā GEF ir 90×10^{-6} , un MLA mikroiedobju versijā GEF ir 126×10^{-6} .
63. Ja ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķimikāliju uzskata par viennozīmīgi pozitīvu, kad pie kāda no vērtētajiem eksperimenta nosacījumiem (sk. 33. punktu) MF palielinājums, kas pārsniedz paralēlās kontroles uzrādīto, ir lielāks par GEF un palielinājums ir koncentrācijatkarīgs (piem., ar dinamikas rindas trenda testu noteikts). Tādā gadījumā šajā testa sistēmā uzskata, ka testējamā ķimikālija spēj inducēt mutācijas.
64. Ja ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķimikāliju uzskata par viennozīmīgi negatīvu, kad ne pie viena no vērtētajiem eksperimenta nosacījumiem (sk. 33. punktu) nav koncentrācijatkarīgas atbildreakcijas vai, ja MF palielinājums ir, tas nepārsniedz GEF. Tādā gadījumā šajā testa sistēmā uzskata, ka testējamā ķimikālija nespēj inducēt mutācijas.

Tikai TK6

65. Ja ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķimikāliju uzskata par viennozīmīgi pozitīvu, kad pie kāda no vērtētajiem eksperimenta nosacījumiem (sk. 33. punktu):
- vismaz vienā no testa koncentrācijām salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli novērojams statistiski nozīmīgs palielinājums,
 - šo palielinājumu izvērtējot ar attiecīgu dinamikas rindas trenda testu, konstatējams, ka tas ir koncentrācijatkarīgs,
 - kāds no rezultātiem ir ārpus vēsturisko negatīvo kontroļu datu sadalījuma (piem., ārpus 95 % kontrolrobežām Puasona sadalījumā; sk. 48. punktu).

Ja visi šie kritēriji izpildīti, šajā testēšanas sistēmā uzskata, ka testējamā ķimikālija spēj inducēt mutācijas. Ieteikumi par piemērotākajām statistiskajām metodēm atrodami literatūrā (66)(67).

66. Ja ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķīmikāliju uzskata par viennozīmīgi negatīvu, kad ne pie viena no vērtētajiem eksperimenta nosacījumiem (sk. 33. punktu):

- nevienā testa koncentrācijā nav statistiski nozīmīga palielinājuma salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli,
- ar attiecīgu dinamikas rindas trenda testu nav konstatējams palielinājuma koncentrācijatkarīgums,
- visi rezultāti ir vēsturisko negatīvo kontroļu datu sadalījuma robežās (piem., 95 % kontrolrobežās Puasona sadalījumā); sk. 48. punktu).

Tādā gadījumā šajā testa sistēmā uzskata, ka testējamā ķīmikālija nespēj inducēt mutācijas.

Kopīgi MLA un TK6

67. Ja maksimālo koncentrāciju izraugās pēc citotoksicitātes, ar augstāko koncentrāciju būtu jācenšas panākt 20 līdz 10 % lielu RTG/RS. Pastāv vienprātība par to, ka jābūt piesardzīgiem, interpretējot vienīgi 20 līdz 10 % RTG/RS robežās esošos pozitīvos rezultātus, un rezultāts nebūtu jāuzskata par pozitīvu, ja MF palielinājums (ja vērtēts) ir tik tikko 10 % RTG/RS līmenī vai mazāks par to (2)(59).

68. Ja nav kultūras, kas uzrādītu 10–20 % lielu RGT/RS, noteikt, vai testējamā ķīmikālija ir mutagēna, zināmos apstākļos var palīdzēt papildu informācija. Šīs situācijas ir šādas: 1) datu punktu rindas no 100 % līdz 20 % RTG/RS robežās nedod mutagenitātes pierādījumus (t. i., nav konstatējama atbildreakcijas atkarība no devas, mutantu biežums nav lielāks kā paralēlajā negatīvajā kontrolē vai vēsturiskajos fona diapazonos u. c.), un vismaz viens datu punkts atrodas 20 līdz 25 % RTG/RS robežās; 2) datu punktu rindas no 100 % līdz 25 % RTG/RS robežās nedod mutagenitātes pierādījumus (t. i., nav konstatējama atbildreakcijas atkarība no devas, mutantu biežums nav lielāks kā paralēlajā negatīvajā kontrolē vai vēsturiskajos fona diapazonos u. c.), un ir arī viens negatīvs datu punkts nedaudz zem 10 % RTG/RS līmeņa. Abās šajās situācijās var secināt, ka testējamā ķīmikālija ir negatīva.

69. Nepārprotami pozitīva vai negatīva atbildreakcija nav obligāti jāverificē.

70. Ja atbildreakcija nav atbilstoši iepriekš rakstītajam nedz nepārprotami negatīva, nedz nepārprotami pozitīva un/vai lai rezultāta bioloģiskais relevantums būtu labāk nosakāms, šie dati jāizvērtē ekspertam un/vai jāturpina pētīt. Var būt lietderīgi izdarīt atkārtotu eksperimentu ar modificētiem nosacījumiem [piem., koncentrācijas intervāliem, kas palielinātu varbūtību iegūt datu punktus 10–20 % RTG/RS diapazonā, atšķirīgi metaboliskās aktivācijas nosacījumi (proti, S9 koncentrācija vai S9 avots) un apstrādes ilgums].

71. Retos gadījumos pat pēc sīkākas izpētes datu kopums neļauj izdarīt slēdzienu par pozitīviem vai negatīviem rezultātiem. Tāpēc būtu jāsecina, ka testējamās ķīmikālijas atbildreakcija bijusi neskaidra (to vienlīdz varbūtīgi ir interpretēt gan kā pozitīvu, gan kā negatīvu).

TESTĒŠANAS PĀRSKATS

72. Testēšanas pārskatā norāda šādu informāciju.

Testējamā ķīmikālija:

- avots, sērijas numurs, izmantošanas termiņš, ja pieejams,
- pašas testējamās ķīmikālijas stabilitāte, ja zināma,
- testējamās ķīmikālijas šķīdība un stabilitāte šķīdinātājā, ja zināma,
- (attiecīgā gadījumā) pH, osmolalitātes un izgulsnēšanās mērījums kultūras barotnē, kurā testējamā ķīmikālija pievienota.

Vienkomponenta viela:

- izskats, šķīdība ūdenī un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības,
- ķīmiskā identifikācija, piemēram, *IUPAC* vai *CAS* nosaukums, *CAS* numurs, *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula, tīrība, attiecīgā gadījumā, ja praktiski iespējams, piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. tml.

Vairākkomponentu viela, UVCB un maisījumi:

- iespējami izsmeļoši raksturoti pēc komponentu ķīmiskās identitātes (sk. iepriekš), kvantitatīvās sastopamības un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām.

Šķīdinātājs:

- šķīdinātāja izraudzīšanās pamatojums,
- šķīdinātāja īpatsvars galīgajā kultūras barotnē.

Šūnas:

Laboratorijas izejkultūru gadījumā:

- šūnu tips un avots un to vēsture testēšanas laboratorijā,
- kariotipiskās īpašības un/vai modālais hromosomu skaits,
- šūnu kultūru uzturēšanas metodes,
- mikoplazmas neesība,
- šūnu dubultošanās laiks.

Testēšanas nosacījumi:

- koncentrāciju izvēles un šūnu kultūru skaita izraudzīšanās pamatojums, piem., citotoksiskuma dati un šķīdības ierobežojumi,
- barotnes sastāvs, CO₂ koncentrācija, mitruma līmenis,
- testējamās ķimikālijas koncentrācija, izteikta kā galīgā koncentrācija kultūras barotnē (piem., kultūras barotnes µg vai mg/ml vai mM),
- kultūras barotnē pievienotā šķīdinātāja un testējamās ķimikālijas koncentrācija (un/vai tilpums),
- inkubācijas temperatūra,
- inkubācijas laiks,
- apstrādes ilgums,
- šūnu blīvums apstrādes laikā,
- metaboliskās aktivācijas sistēmas veids un sastāvs (S9 avots, S9 maisījuma sagatavošanas metode, S9 maisījuma koncentrācija vai tilpums un S9 koncentrācija vai tilpums galīgajā kultūras barotnē, S9 kvalitātes kontroles),
- attiecībā uz katru no apstrādes nosacījumiem — pozitīvās un negatīvās kontroles vielas, galīgās koncentrācijas,
- fenotipiskās ekspresijas periods (norādot uzsēto šūnu skaitu, subkultūras un attiecīgā gadījumā barošanas grafiku),
- selektīvā aģenta identitāte un koncentrācija,
- MLA gadījumā norāda izmantoto versiju (agars vai mikroiedobes),
- testu pieņemamības kritēriji,
- dzīvotspējīgo šūnu un mutantšūnu skaitīšanas metodes,
- citotoksiskuma mērīšanas metodes,
- jebkāda citotoksiskumam un izmantotajai metodei relevanta papildinformācija,
- inkubācijas laiks pēc uzsēšanas,
- uzskaitīto koloniju lielums un veids (attiecīgā gadījumā norādot kritērijus, pēc kuriem kolonijas definē kā “mazas” vai “lielas”),
- kritēriji, pēc kuriem novērtē, vai pētījuma rezultāts ir pozitīvs, negatīvs vai neskaidrs,
- (attiecīgā gadījumā) pH, osmolalitātes un izgulsnēšanās noteikšanai izmantotās metodes.

Rezultāti:

- par katru kultūru — apstrādāto šūnu un apakškultūrām izmantoto šūnu skaits,
- toksicitātes parametri (MLA gadījumā RTG, un TK6 gadījumā RS),
- izgulsnēšanās pazīmes un noteikšanas laiks,
- selektīvā un neselektīvā barotnē uzsēto šūnu skaits,
- koloniju skaits neselektīvajā barotnē un rezistentu koloniju skaits selektīvajā barotnē, saistītais mutantu biežums,
- koloniju lielums negatīvajā un pozitīvajā kontrolē un (ja testējamā ķimikālija ir pozitīva) vismaz pie vienas koncentrācijas un saistītais mutantu biežums,
- ja iespējams, koncentrācijas–atbildreakcijas sakarība,
- paralēlo negatīvo (šķīdinātājs) un pozitīvo kontroļu dati (koncentrācijas un šķīdinātāji),
- vēsturisko negatīvo (šķīdinātājs) un pozitīvo kontroļu dati (koncentrācijas un šķīdinātāji), norādot diapazonus, vidējās vērtības un standartnovirzes, vēsturisko kontroļu pamatā esošo testu skaits,
- statistiskās analīzes (par atsevišķām kultūrām un attiecīgā gadījumā par apkopotiem replikātiem) un p-vērtības, ja tādas ir. MLA gadījumā – arī GEF izvērtējums.

Rezultātu iztirzājums

Secinājumi

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) UNEP (2001). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP).
- (53) Krahn D.F., Barsky F.C. and McCooey K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: *Genotoxic Effects of Airborne Agents* Tice R.R., Costa D.L. and Schaich K.M. (Eds.). New York, Plenum, pp. 91-103.
- (54) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. *Environ. Mutagen.*, 5 (6): 795-801.
- (55) Asakura M., Sasaki T., Sugiyama T., Arito H., Fukushima, S. and Matsushima, T. (2008). An Improved System for Exposure of Cultured Mammalian Cells to Gaseous Compounds in the Chromosomal Aberration Assay. *Mutation Res.*, 652 (2): 122-130.

- (56) Arlett C.F., *et al.* (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Ed.), Cambridge University Press, pp. 66-101.
- (57) Morita T., Honma M. and Morikawa K. (2012). Effect of Reducing the Top Concentration Used in the *In Vitro* Chromosomal Aberration Test in CHL Cells on the Evaluation of Industrial Chemical Genotoxicity. *Mutation Res.*, 741 (1-2): 32-56.
- (58) Brookmire L., Chen J.J. and Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay. *Environ. Mol. Mutagen.*, 54 (1): 36-43.
- (59) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Available at: [<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. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Aneigēns: ķimikālija vai process, kas mijiedarbībā ar mitotiskā un meiotiskā šūnu dalīšanās cikla komponentiem izraisa šūnu vai organismu aneiploīdiju.

Aneiploīdija: novirze no normālā diploīdā (vai haploīdā) hromosomu skaita par vienu vai vairākām atsevišķām hromosomām, bet ne par veselu hromosomu komplektu vai komplektiem (poliploīdija).

Bāzu pāru maiņas mutagēni: ķimikālijas, kas izraisa DNS bāzu pāru maiņu.

Ķimikālija: viela vai maisījums.

Klonēšanās efektivitāte: to zemā blīvumā uzsēto šūnu procents, no kurām var izaugt pieskaitāma kolonija.

Klastogēns: ķimikālija vai process, kas šūnu vai organismu populācijās izraisa strukturālas hromosomu aberācijas.

Citotoksiskums: attiecībā uz šīs testēšanas metodes aptverto ķīmisko analīzi citotoksiskums ir relatīvā kopējā pieauguma (RTG) samazinājums MLA gadījumā vai relatīvās izdzīvotības (RS) samazinājums TK6 gadījumā.

Tieša mutācija: tāda gēna mutācija no vecāktipa uz mutantformu, kura maina vai izdzēš iekodētā proteīna fermentatīvo darbību vai tā funkciju.

Nolasīšanas fāzes nobīdes mutagēni: ķimikālijas, kas DNS molekulā izraisa viena vai vairāku bāzu pāru pievienošanu vai izņemšanu.

Genotoksisks: vispārīgs termins, kas aptver visu veidu bojājumus DNS vai hromosomās, tostarp DNS pārrāvumus, aduktus, pārkārtojumus, mutācijas, hromosomu aberācijas un aneiploīdiju. Ne visas genotoksiskās ietekmes rada mutācijas vai noturīgus hromosomu bojājumus.

Mitotiskā rekombinācija: mitozes laikā notiekoša homologisku hromatīdu rekombinācija, kuras rezultātā var inducēties DNS dubultpavedienu pārrāvumi vai zust heterozigotāte.

Mutagēnisks: tāds, kas pārmantojami maina vienu vai vairākas DNS bāzu pāru sekvences gēnos vai hromosomu struktūru (hromosomu aberācijas).

Mutantu biežums (MF): novēroto mutantšūnu skaita attiecība pret dzīvotspējīgo šūnu skaitu.

Fenotipiskās ekspresijas laiks: pēcapstrādes laiks, kad ģenētiskā pārmaiņa nostiprinās genomā un jebkādi līdzšinējā gēna produkti izsīkst tiktāl, ka mainās arī fenotipiskā

pazīme.

Relatīvā izdzīvotība (RS): RS attiecībā uz TK6 izmanto par apstrādes radīta citotoksiskuma mēru. Tā ir tūlīt pēc apstrādes uz platēm uzsētu šūnu relatīvā klonēšanās efektivitāte (CE) salīdzinājumā ar negatīvās kontroles klonēšanās efektivitāti.

Relatīvais suspensijas pieaugums (RSG): MLA gadījumā tas ir relatīvais kopējais suspensijas divdienu pieaugums testa kultūrā attiecībā pret kopējo suspensijas divdienu pieaugumu negatīvajā/šķīdinātāja kontrolē (Clive and Spector, 1975). Ar RSG būtu jāizsaka testa kultūras un negatīvās/šķīdinātāja kontroles relatīvā pieauguma salīdzinājums apstrādes periodā.

Relatīvais kopējais pieaugums (RTG): RTG attiecībā uz MLA izmanto par apstrādes radīta citotoksiskuma mēru. Tas ir testa kultūru relatīvā pieauguma mērs (salīdzinājumā ar nesēja kontroli) noteiktās testa fāzēs, proti, apstrādē, divu dienu ilgajā ekspresijas laikā un atlasīšanai vajadzīgo mutantu klonēšanā. Katras testa kultūras RSG tiek reizināts ar testa kultūras relatīvo klonēšanas efektivitāti mutantu atlasīšanas laikā un izteikts attiecībā pret klonēšanas efektivitāti negatīvajā/šķīdinātāja kontrolē (Clive and Spector, 1975).

Aknu S9 frakcijas: aknu homogenāta supernatants pēc centrifugēšanas pie 9000 g, t. i., jēlu aknu ekstrakts.

S9 maisījums: aknu S9 frakcijas un metaboliskajai fermentatīvajai darbībai nepieciešamo kofaktoru maisījums.

Suspensijas pieaugums (SG): MLA apstrādes un ekspresijas fāzes laikā konstatētā šūnu skaita palielinājuma reižu skaits. Īslaicīgā (3–4 stundu ilgā) apstrādē SG tiek aprēķināts, reizinot palielinājuma reižu skaitu 1. dienā un palielinājuma reižu skaitu 2. dienā. Ja izmanto 24 stundu ilgu apstrādi, SG ir 24 stundu apstrādes laikā notikušā palielinājuma reižu skaits, reizināts ar ekspresijas 1. un 2. dienā notikušā palielinājuma reižu skaitu.

Šķīdinātāja kontrole: vispārīgs termins, ar ko definē kontroles kultūras, kuras saņem vienīgi testējamās ķīmikālijas šķīdināšanai izmantoto šķīdinātāju.

Testējamā ķīmikālija: viela vai maisījums, kuru testē ar šo testēšanas metodi.

Neapstrādātās kontroles: kultūras, kuras neapstrādā (t. i., ne ar testējamo ķīmikāliju, ne ar šķīdinātāju), bet ar kurām izdara tādas pašas manipulācijas kā ar kultūrām, kuras apstrādā ar testējamo ķīmikāliju.

2. papildinājums

FORMULAS

Citotoksiskums

Abām (agara un mikroiedobju) MLA versijām

Citotoksiskumu definē kā relatīvo kopējo pieaugumu (RTG), un tas ietver relatīvo suspensijas pieaugumu (RSG) divu dienu ilgajā ekspresijas periodā un relatīvo klonēšanās efektivitāti (RCE), kuru nosaka mutantu atlasē brīdī. Gan RTG, gan RSG un RCE izsaka procentuāli.

RSG aprēķināšana. Suspensijas pieaugums viens (SG_1) ir pieauguma temps laikā no 0. dienas līdz 1. dienai (šūnu koncentrācija 1. dienā, dalīta ar šūnu koncentrāciju 0. dienā), un suspensijas pieaugums divi (SG_2) ir pieauguma temps laikā no 1. dienas līdz 2. dienai (šūnu koncentrācija 2. dienā, dalīta ar šūnu koncentrāciju 1. dienā). RSG ir apstrādātās kultūras kopējais SG ($SG_1 \times SG_2$) salīdzinājumā ar neapstrādāto/šķīdinātāja kontroli. Tas ir: $RSG = [SG_{1(test)} \times SG_{2(test)}] / [SG_{1(control)} \times SG_{2(control)}]$. SG_1 aprēķināms no sākotnējās šūnu koncentrācijas, kas izmantota šūnu apstrādes sākumā. Tiek ņemts vērā šūnu apstrādes laikā testa kultūrās izveidojies diferenciālais citotoksiskums, ja tāds ir.

RCE ir testa kultūras relatīvā klonēšanās efektivitāte mutantu atlasīšanas brīdī attiecībā pret klonēšanās efektivitāti negatīvajā/šķīdinātāja kontrolē.

Relatīvais kopējais pieaugums (RTG): $RTG = RSG \times RCE$

TK6

Relatīvā izdzīvotība (RS)

Citotoksiskumu vērtē pēc relatīvās izdzīvotības, t. i., pēc tā, kāda ir tūlīt pēc apstrādes uzsētu šūnu klonēšanās efektivitāte (CE), kas koriģēta pēc jebkāda šūnu zuduma apstrādes laikā, salīdzinājumā ar klonēšanās efektivitāti negatīvajās kontrolēs (tajās konstatēto izdzīvotību pieņem par 100 %). Ar apstrādes laikā radušos šūnu zudumu saistīto korekciju var aprēķināt šādi:

$$\text{Koriģētā CE} = CE \times \frac{\text{Šūnu skaits apstrādes beigās}}{\text{Šūnu skaits apstrādes sākumā}}$$

RS ar testējamo ķimikāliju apstrādātai kultūrai aprēķina šādi:

$$RS = \frac{\text{Koriģētā CE (apstrādātajā kultūrā)}}{\text{Koriģētā CE (šķīdinātāja kontrolē)}} \times 100$$

Mutantu biežums attiecībā uz MLA un uz TK6

Mutantu biežums (MF) ir mutantkoloniju klonēšanās efektivitāte selektīvā barotnē (CE_M), kas koriģēta pēc klonēšanās efektivitātes neselektīvā barotnē mutantu atlasīšanas brīdī (CE_V), respektīvi, $MF = CE_M / CE_V$. Zemāk aprakstīts, kā šīs divas klonēšanās efektivitātes aprēķināmas agara un mikroiedobju metodes gadījumā.

MLA agara versija. MLA mīkstā agara versijā koloniju skaitu uz mutantu atlasīšanas plates (C_M) un koloniju skaitu uz atlasīšanai neparedzētās jeb klonēšanās efektivitātes (dzīvotspējas uzskaites) plates (C_V) nosaka, tiešā veidā saskaitot klonus. Ja klonēšanās efektivitātes (CE) vajadzībai uz mutantu atlasīšanas (CE_M) platēm un uz atlasīšanai neparedzētām jeb klonēšanas efektivitātes (dzīvotspējas uzskaites) platēm (CE_V) uzsēj 600 šūnas un mutantu atlasīšanai izmanto 3×10^6 šūnas,

$$CE_M = C_M / (3 \times 10^6) = (C_M / 3) \times 10^{-6}$$

$$CE_V = C_V / 600$$

MLA un TK6 mikroiedobju versija. MLA mikroiedobju versijā C_M un C_V tiek noteikta, reizinot mikroiedobju kopskaitu (TW) un to koloniju varbūtīgo skaitu, kas ir katrā mikroiedobju plates iedobē (P).

$$C_M = P_M \times TW_M$$

$$C_V = P_V \times TW_V$$

Pēc Puasona sadalījuma (Furth et al., 1981) nulles terma P iegūst šādi:

$$P = - \ln (EW / TW),$$

kur EW ir tukšās iedobes un TW ir iedobju kopskaits. Tādējādi

$$CE_M = C_M / T_M = (P_M \times TW_M) / T_M$$

$$CE_V = C_V / T_V = (P_V \times TW_V) / T_V$$

Mazo un lielo koloniju mutantu biežumu MLA mikroiedobju versijā aprēķina tieši tāpat, tukšo iedobju skaitu attiecinot uz mazajām un lielajām kolonijām.

TK6 gadījumā mazo un lielo koloniju mutantu biežumu nosaka, pamatojoties uz agrīnajiem un vēlīnajiem mutantiem.

B.68. ĪSA EKSPOZĪCIJAS LAIKA *IN VITRO* TESTĒŠANAS METODE, AR KURU IDENTIFICĒT i) ĶIMIKĀLIJAS, KAS IZRAISA NOPIETNUS ACU BOJĀJUMUS, UN ii) ĶIMIKĀLIJAS, KURAS NAV JĀKLASIFICĒ KĀ ACU KAIRINĀJUMA VAI NOPIETNU ACU BOJĀJUMU IZRAISĪTĀJAS

IEVADS

1. Šī testēšanas metode (TM) ir ekvivalenta ESAO testēšanas vadlīnijā (TG) Nr. 491 (2017) aprakstītajam. Īsa ekspozīcijas laika (*STE*) testēšanas metode ir *in vitro* metode, kuru noteiktos apstākļos un ar zināmiem ierobežojumiem var lietot tādu ķīmikāliju (vielu un maisījumu) bīstamības klasificēšanai un marķēšanai, kas izraisa nopietnus acu bojājumus vai kuras nav jāklasificē kā nopietnu acu bojājumu vai acu kairinājuma izraisītājas, atbilstoši definīcijai, kas dota Apvienoto Nāciju Organizācijas (ANO) Ķīmikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētajā sistēmā (GHS) (1) un Eiropas Savienības (ES) Regulā Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakojšanu (*CLP* regula)¹.
2. Ilgus gadus ķīmikāliju potenciālā bīstamība acīm tikusi vērtēta galvenokārt ar truša acu *in vivo* testu (TM B.5 (8), ekvivalents OECD TG 405). Ir vispārpieņemts, ka pārskatāmā nākotnē neviens atsevišķs alternatīvs *in vitro* tests nespēs pilnībā aizstāt truša acu *in vivo* testu, ar kuru var prognozēt pilnu nopietnu acu bojājumu / acu kairinājuma atbildreakciju spektru un vienlaikus aptvert dažādas ķīmisko vielu klases. Tomēr truša acu testu varētu būt iespējams pilnībā aizstāt, (pakāpjveida) testēšanā stratēģiski kombinējot alternatīvas testēšanas metodes (2). Ar lejupēju pieeju tiktu testētas ķīmikālijas, par kurām ir informācija, ka tās ir potenciāli ļoti kairinošas acīm vai izraisa nopietnus acu bojājumus. Ar augšupēju pieeju turpretim testētu ķīmikālijas, par kurām ir informācija, ka tās acīm nav tik kairinošas, lai būtu jāklasificē. Kaut arī *STE* testēšanas metodi nevar uzskatīt par pilnīgu truša acu *in vivo* testa aizstājēju, normatīvām vajadzībām veiktas klasificēšanas un marķēšanas kontekstā tā ir piemērota izmantošanai tādā pakāpjveida testēšanas stratēģijā kā augšupējā/lejupējā pieeja un ļauj bez turpmākas testēšanas identificēt i) ķīmikālijas, kas izraisa nopietnus acu bojājumus (ANO GHS / *CLP* 1. kategorija), un ii) ķīmikālijas (izņemot ļoti gaistošas vielas un visas cietās ķīmikālijas, kas nav virsmaktīvās vielas), kuras nav jāklasificē kā acu kairinājuma vai nopietnu acu bojājumu izraisītājas (ANO GHS / *CLP* neklasificētas ķīmikālijas) (1)(2). Tomēr, ja

¹ Eiropas Parlamenta un Padomes 2008. gada 16. decembra Regula (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakojšanu un ar ko groza un atceļ Direktīvas 67/548/EEK un 1999/45/EK un groza Regulu (EK) Nr. 1907/2006 (OV L 353/1, 31.12.2008.).

ar *STE* testēšanas metodi ķīmikālija netiek klasificēta kā nopietnu acu bojājumu izraisītāja (ANO GHS / *CLP* 1. kategorija) vai kā ANO GHS / *CLP* nekategorizēta ķīmikālija (neizraisa nopietnus acu bojājumus vai acu kairinājumu), būs vajadzīga papildu testēšana, lai noteiktu galīgo klasifikāciju. Turklāt, pirms ar augšupēju pieeju *STE* testēšanas metodi izmantot klasifikācijas shēmā, kas nav ANO GHS / *CLP*, jākonsultējas ar attiecīgajām regulatīvajām iestādēm. Piemērotākās testēšanas metodes izvēle un šīs testēšanas metodes izmantošana jāskata kontekstā ar ESAO Norādījumu dokumentu par integrētu pieeju nopietnu acu bojājumu un acu kairinājuma testēšanā un novērtēšanā [*OECD Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation*] (14).

3. Šajā testēšanas metodē aprakstītas procedūras, ko izmanto, lai testējamās ķīmikālijas potenciālo bīstamību acīm izvērtētu pēc tās spējas inducēt citotoksicitāti, ja pielieto īsa ekspozīcijas laika testēšanas metodi. Ķīmikāliju citotoksiskā iedarbība uz radzenes epitēlijšūnām ir nozīmīga veida iedarbība (*MOA*), kas izraisa radzenes epitēlijšūnu bojājumus un acu kairinājumu. Šūnu dzīvotspēju ar *STE* testēšanas metodi novērtē pēc tā, cik lielā mērā vitālo krāsvielu MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijbromīds, saukts arī par tiazolilzilo tetrazolijbromīdu) dzīvās šūnas fermentatīvi pārvērš par zilas krāsas formazāna sāli, kura daudzumu šūnu ekstraktā nosaka kvantitatīvi (3). Iegūto šūnu dzīvotspēju salīdzina ar šķīdinātāja kontroli (relatīvā dzīvotspēja) un izmanto, lai aplēstu testējamās ķīmikālijas potenciālo bīstamību acīm. Ja gan ar 5 %, gan ar 0,05 % koncentrāciju iegūtā šūnu dzīvotspēja ir mazāka par vai vienāda ar ($\leq$) 70 %, testējamo ķīmikāliju klasificē ANO GHS / *CLP* 1. kategorijā. Ja turpretim gan ar 5 %, gan ar 0,05 % koncentrāciju iegūtā šūnu dzīvotspēja ir lielāka par ($>$) 70 %, pieņem, ka testējamo ķīmikāliju nav vajadzības kategorizēt ANO GHS / *CLP* sistēmā.
4. Terminu “testējamā ķīmikālija” šajā testēšanas metodē izmanto, lai apzīmētu to, kas tiek testēts, bez sasaistes ar *STE* testēšanas metodes pielietojamību vielu un/vai maisījumu testēšanā. Definīcijas dotas papildinājumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI

5. Šīs testēšanas metodes pamatā ir Kao korporācijas izstrādātais protokols (4), kas izvērtēts divos dažādos validācijas pētījumos: vienu no tiem veikusi Japānas Dzīvniektestēšanas alternatīvu sabiedrība (*JSAAE*) (5), bet otru – Japānas Alternatīvo metožu validācijas centrs (*JaCVAM*) (6). Pamatojoties uz šo validācijas pētījumu pārskatiem un citiem testēšanas metodi pamatojošiem dokumentiem, zinātnisko recenzēšanu veica *NICEATM/ICCVAM* (7).

6. Kad *STE* testēšanas metodi izmantoja, lai identificētu ķīmikālijas (vielas un maisījumus), kas izraisa nopietnus acu bojājumus (ANO GHS / *CLP* 1. kategorija) (1), iegūtie dati par 125 ķīmikālijām (gan vielām, gan maisījumiem) salīdzinājumā ar truša acu *in vivo* testu uzrādīja kopējo pareizību 83 % (104/125), pseidopozitīvu īpatsvaru 1 % (1/86) un pseidonegatīvu īpatsvaru 51 % (20/39) (7). Uztādītais pseidonegatīvu īpatsvars šajā kontekstā nav kritiski svarīgs, jo visas testējamās ķīmikālijas, kuru inducētā šūnu dzīvotspēja pie 5 % koncentrācijas ir $\leq 70\%$ un pie 0,05 % koncentrācijas $> 70\%$, vēlāk tiks testētas ar citām pienācīgi validētām *in vitro* testēšanas metodēm vai – kritiskā gadījumā – ar truša acu *in vivo* testu, izvēli izdarot atkarībā no normatīvajām prasībām un saskaņā ar patlaban ieteiktajām secīgas testēšanas stratēģijas un pierādījumu izsvēršanas pieejām (1) (8). Testētas tika galvenokārt vienkomponta vielas, bet ir arī ierobežots daudzums datu par maisījumu testēšanu. Daudzkomponentu vielu un maisījumu testēšanā šī testēšanas metode ir tehniski piemērojama. Tomēr pirms tās izmantošanas maisījuma testēšanai, lai iegūtu datus kādam normatīvajam mērķim, jāapsver, vai un kādēļ tā varētu sniegt minētajam mērķim piemērotus rezultātus. Ja pastāv normatīva prasība maisījumu testēt, tāda apsvēršana nav vajadzīga. Kad *STE* testēšanas metodi izmantoja ANO GHS / *CLP* 1. kategorijā klasificējamu testējamo ķīmikāliju identificēšanai, nekādas citus īpašus trūkumus tā neuzrādīja. Pētnieki var apsvērt šīs testēšanas metodes izmantošanu ar testējamajām ķīmikālijām, un tā tiktu pieņemts, ka šūnu dzīvotspēja $\leq 70\%$ gan pie 5 %, gan pie 0,05 % koncentrācijas uzrāda nopietnus acu bojājumus inducējošu atbildreakciju, un ķīmikālija bez turpmākas testēšanas būtu jāklasificē ANO GHS / *CLP* 1. kategorijā.
7. Kad *STE* testēšanas metodi izmantoja, lai identificētu ķīmikālijas (vielas un maisījumus), kuras nav jāklasificē kā acu kairinājuma vai nopietnu acu bojājumu izraisītājas (t. i., ANO GHS / *CLP* neklasificētas ķīmikālijas), iegūtie dati par 130 ķīmikālijām (gan vielām, gan maisījumiem) salīdzinājumā ar truša acu *in vivo* testu uzrādīja kopējo pareizību 85 % (110/130), pseidonegatīvu īpatsvaru 12 % (9/73) un pseidopozitīvu īpatsvaru 19 % (11/57) (7). Ja no datu kopas izslēdz ļoti gaistošas vielas un cietas vietas, kas nav virsmaktīvās vielas, kopējā pareizība pieaug līdz 90 % (92/102), pseidonegatīvu īpatsvars sarūk līdz 2 % (1/54) un pseidopozitīvu īpatsvars saglabājas 19 % (9/48) (7). Sekas ir tādas, ka tad, ja *STE* tiek izmantota, lai identificētu testējamās ķīmikālijas, kuras nav jāklasificē kā acu kairinājuma vai nopietnu acu bojājumu izraisītājas (ANO GHS / *CLP* neklasificētas ķīmikālijas), metodes potenciālie trūkumi ir liels pseidonegatīvu īpatsvars i) ļoti gaistošām vielām ar tvaika spiedienu virs 6 kPa un ii) cietām ķīmikālijām (vielām un maisījumiem), kas nav virsmaktīvās vielas un maisījumi, kuru sastāvā ir vienīgi virsmaktīvās vielas. Šādas ķīmikālijas ir izslēgtas no *STE* testēšanas metodes piemērojamības jomas (7).

8. Papildus 6. un 7. punktā minētajām ķīmikālijām ar *STE* testēšanas metodi ģenerētajā datu kopā ietilpst arī pašmāju dati par 40 maisījumiem. Šie dati, kad tos salīdzināja ar Dreiza [*Draize*] *in vivo* acu testa spēju paredzēt, kuri maisījumi nav jāklasificē ANO GHS / *CLP* klasifikācijas sistēmā, uzrādīja pareizību 88 % (35/40), pseidopozitīvu īpatsvaru 50 % (5/10) un pseidonegatīvu īpatsvaru 0 % (0/30) (9). Tāpēc *STE* metodi var izmantot, lai ar augšupēju pieeju identificētu identificētu maisījumus kā ANO GHS / *CLP* nekategorizētas ķīmikālijas. Tāpat kā cieto vielu gadījumā, izņēmums ir cietie maisījumi, ja vien tie pilnībā nesastāv no virsmaktīvajām vielām. Turklāt, lai nepieļautu to, ka ķīmikālijas kaitīgums tiek paredzēts nepietiekami, ar sevišķu rūpību jāvērtē maisījumi, kuru sastāvā ir vielas ar tvaika spiedienu virs 6 kPa, un iegūtie rezultāti jāpamato katrā atsevišķā gadījumā.
9. Tā kā ar *STE* testēšanas metodi daudzas ANO GHS / *CLP* 1. kategorijas ķīmikālijas tiek nepietiekami stingri novērtētas, ierindojo tās 2., 2A vai 2B kategorijā, savukārt daudzas ANO GHS / *CLP* nekategorizētas ķīmikālijas tiek novērtētas pārlietu stingri, tāpat ierindojo tās 2., 2A vai 2B kategorijā, *STE* testēšanas metodi nevar izmantot, lai testējamās ķīmikālijas identificētu kā tādas, kas ietilpst ANO GHS / *CLP* 2.kategorijā vai ANO GHS / *CLP* 2A kategorijā (acu kairinājums) vai 2B kategorijā (viegls acu kairinājums) (7). Tālab var būt nepieciešams veikt turpmāku testēšanu ar citu piemērotu metodi.
10. *STE* testēšanas metode ir derīga testējamajām ķīmikālijām, kuras izšķīdinātas vai vismaz 5 minūšu ilgumā vienmērīgi suspendētas fizioloģiskajā šķīdumā, 5 % dimetilsulfoksīda (DMSO), kas izšķīdināts fizioloģiskajā šķīdumā, vai minerāleļļā. *STE* testēšanas metode nav derīga testējamajām ķīmikālijām, kuras ir nešķīstošas vai kuras nevar vismaz 5 minūšu ilgumā vienmērīgi suspendēt fizioloģiskajā šķīdumā, 5 % DMSO, kas izšķīdināts fizioloģiskajā šķīdumā, vai minerāleļļā. Minerāleļļu *STE* testēšanas metodē ir iespējams izmantot tāpēc, ka ekspozīcijas laiks ir īss. Tāpēc *STE* testēšanas metode ir piemērota, lai paredzētu ūdenī nešķīstošu testējamo ķīmikāliju (piem., garķēdes alifātisko spirtu vai ketonu) potenciālo bīstamību acīm, ja vien šīs ķīmikālijas ir iespējams iejaukt kādā no trijiem iepriekš nosauktajiem šķīdinātājiem.
11. Terminu “testējamā ķīmikālija” šajā testēšanas metodē izmanto, lai apzīmētu to, kas tiek testēts¹¹, bez saistes ar *STE* testēšanas metodes pielietojamību vielu un/vai maisījumu testēšanā.

¹ 2013. gada jūnijā kopīgajā sanāksmē tika panākta vienošanās jaunajās un atjauninātajās testēšanas metodēs, kur iespējams, testa objekta apzīmēšanai turpmāk konsekvētāk lietot apzīmējumu “testējamā ķīmikālija”.

TESTA PRINCIPS

12. *STE* testēšanas metode ir uz citotoksicitātes principa pamatota *in vitro* ķīmiskā analīze, kuru veic uz saplūstoša *SIRC* (*Statens Seruminstitut Rabbit Cornea*) šūnu monoslāņa, kas kultivēts uz 96 mikroiebobju polikarbonāta platēm (4). Testējamajai ķimikālijai ļauj iedarboties piecas minūtes, un tad, izmantojot MTT ķīmisko analīzi, citotoksicitāti kvantitatīvi izmēra *SIRC* šūnu relatīvās dzīvotspējas izteiksmē (4). Pēc konstatētā šūnu dzīvotspējas samazinājuma paredz potenciālo nelabvēlīgo ietekmi, kas var izraisīt acs bojājumus.
13. Ir zināms, ka 80 % no truša acī iepilinātā šķīduma trīs līdz četru minūšu laikā tiek izvadīti caur konjunktīvas maisu, bet cilvēka gadījumā vienas līdz divu minūšu laikā šādā veidā tiek izvadīti vairāk nekā 80 % iepilinātā šķīduma (10). Ar *STE* testēšanas metodi ir mēģināts tuvināties šiem ekspozīcijas laikiem, un citotoksicitāte tiek izmantota par beigupunktu, lai novērtētu kaitējumu, kas *SIRC* šūnām nodarīts piecās minūtēs, kuru laikā uz tām iedarbojusies testējamā ķimikālija.

KOMPETENCES PIERĀDĪŠANA

14. Pirms šeit aprakstīto *STE* testēšanas metodi sākt izmantot regulāri, laboratorijām jāpierāda tehniskā kompetence, pareizi saklasificējot 1. tabulā ieteiktās 11 vielas. Šīs vielas izraudzītas tā, lai būtu pārstāvēts pilns nopietnu acu bojājumu un acu kairinājuma atbildreakciju spektrs, kas noteikts ar truša acu *in vivo* testiem (TG-405) un atbilst ANO GHS / CLP klasifikācijas sistēmai (1). Citi atlases kritēriji bija vielu komerciālā pieejamība, kvalitatīvu *in vivo* references datu pieejamība un kvalitatīvu ar *STE* testēšanas metodi iegūtu *in vitro* datu pieejamība (3). Gadījumos, kur kāda sarakstā norādīta viela nav pieejama vai kur tas attaisnojami, var izmantot citu vielu, par kuru pieejami pietiekami *in vivo* un *in vitro* references dati, ja vien tiek izmantoti šeit aprakstītie kritēriji.

1. tabula. Standartvielu saraksts

Vielā	CAS Nr.	Ķimikāliju klase ¹	Agregātstāvoklis	<i>In vivo</i> ANO GHS / CLP Kat. ²	Šķīdinātājs <i>STE</i> testā	<i>STE</i> ANO GHS / CLP Kat.
Benzalkonija hlorīds (10%, ūdens šķīdums)	8001-54-5	Onijsavienojums	Šķidr	1. kategorija	Fizioloģiskais šķīdums	1.kategorija
<i>Triton</i> X-100 (100 %)	9002-93-1	Ēteris	Šķidr	1. kategorija	Fizioloģiskais šķīdums	1.kategorija
<i>Acid Red</i> 92	18472-87-2	Heterocikliskais savienojums; bromīnsavienojums;	Ciets	1. kategorija	Fizioloģiskais šķīdums	1.kategorija

		hlorīnsavienojums				
Nātrija hidroksīds	1310-73-2	Sārms; neorganiska ķīmiska viela	Ciets	1.kategorija ³	Fizioloģiskais šķīdums	1.kategorija
Butirolaktons	96-48-0	Laktons; heterocikliskais savienojums	Šķidr	2A kategorija (CLP 2.kategorija)	Fizioloģiskais šķīdums	Nav iespējams prognozēt
1-Oktanols	111-87-5	Spirts	Šķidr	2A/B kategorija ⁴ (CLP 2.kategorija)	Minerāleļļa	Nav iespējams prognozēt
Ciklopentanols	96-41-3	Spirts; ogļūdeņradis, cikliskais	Šķidr	2A/B kategorija ⁵ (CLP 2.kategorija)	Fizioloģiskais šķīdums	Nav iespējams prognozēt
2-Etoksietilacetāts	111-15-9	Spirts; ēteris	Šķidr	Nekategorizēts	Fizioloģiskais šķīdums	Nekategorizēts
Dodekāns	112-40-3	Ogļūdeņradis, acikliskais	Šķidr	Nekategorizēts	Minerāleļļa	Nekategorizēts
Metilizobutylketons	108-10-1	Ketons	Šķidr	Nekategorizēts	Minerāleļļa	Nekategorizēts
<i>n,n</i> -Dimetilguanidīnsulfāts	598-65-2	Amidīns; sēra savienojums	Ciets	Nekategorizēts	Fizioloģiskais šķīdums	Nekategorizēts

Saīsinājumi: CAS Nr. — *Chemical Abstracts Service* reģistra numurs.

¹ Ķīmiskās klases piešķirtas, vadoties pēc informācijas no agrākajām *NICEATM* publikācijām un, ja tādas nebija pieejamas, vadoties pēc ASV Nacionālās medicīnas bibliotēkas priekšmetu klasifikatora (MeSH®) (ar ChemIDplus® [Nacionālās medicīnas bibliotēkas] starpniecību; pieejama <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>) un pēc *NICEATM* noteiktajām struktūrām.

² Pamatojoties uz truša acu *in vivo* testa (ESAO TG 405) rezultātiem un izmantojot ANO GHS / CLP sistēmu (1).

³ Klasificēšana 1. kategorijā izdarīta, pamatojoties uz 100 % nātrija hidroksīda (ESAO TG 435 norādīts kā ādas koroziju izraisītspējīga standartviela) korozīvo potenciālu ādai un uz kritēriju iekļaušanai ANO GHS / CLP 1. kategorijā (1).

⁴ Klasificēšana 2A vai 2B kategorijā ir atkarīga no tā, kā interpretē ANO GHS kritēriju, ar ko šīs divas kategorijas nošķir, t. i., lai ķīmikāliju klasificētu 2A kategorijā, 7. dienā ietekmei jābūt novērojama 2 no 6 dzīvniekiem vai 4 no 6 dzīvniekiem. *In vivo* datu kopa aptvēra 2 pētījumus ar 3 dzīvniekiem katrā. Vienā pētījumā 7. dienā ietekme bija novērojama 2 no 3 dzīvniekiem, un tas dod pamatu klasificēšanai 2A kategorijā (11), bet otrā pētījumā visi beigupunkti visiem 3 dzīvniekiem līdz 7. dienai no jauna atradās kaitējuma nulles līmenī, un tas dod pamatu klasificēšanai 2B kategorijā (12).

⁵ Klasificēšana 2A vai 2B kategorijā ir atkarīga no tā, kā interpretē ANO GHS kritēriju, ar ko šīs divas kategorijas nošķir, t. i., lai ķīmikāliju klasificētu 2A kategorijā, 7. dienā ietekmei jābūt novērojama 1 no 3 dzīvniekiem vai 2 no 3 dzīvniekiem. *In vivo* pētījums aptvēra 3 dzīvniekus. Visi beigupunkti, izņemot radzenes apduļķojumu un konjunktīvas apsārtumu vienam dzīvniekam, līdz 7. dienai vai agrāk atgriezās kaitējuma nulles līmenī. Dzīvniekam, kurš līdz 7. dienai nebija pilnībā atlabis, 7. dienā radzenes apduļķojuma rādītājs bija 1 un konjunktīvas apsārtuma rādītājs bija 1, taču ietekme pilnībā pazuda 11. dienā.

PROCEDŪRA

Šūnu monoslāņa sagatavošana

15. *STE* testēšanas metodē jāizmanto truša radzenes (*SIRC*) šūnu līnija. *SIRC* šūnas ieteicams sagādāt no kvalificētas šūnu bankas, piem., Amerikas tipveida kultūru kolekcijas *CCL60*.
16. *SIRC* šūnas kultivē 37 °C pie 5 % CO₂ un mitrinātā atmosfērā kultivēšanas kolbā ar kultūras barotni, kura sastāv no Īgla minimālās barotnes (*MEM*), kas papildināta ar 10 % liellopu embriju seruma jeb govju fetālā seruma (*FBS*), 2 mM *L*-glutamīna, 50–100 vienībām/ml penicilīna un 50–100 µg/ml streptomicīna. Kultivēšanas kolbā kofluējušās šūnas jāatdala, izmantojot tripsīna-etilēndiamīntetraetiķskābes šķīdumu. Atdalīšanai var lietot šūnu skrāpi. Pirms šūnas izmantot rutīnas testiem, kultivēšanas kolbā tās jāpavairo (piem., 2–3 pārsējumos). Pēc atkausēšanas šūnas nebūtu jāpavairo vairāk kā 25 pārsējumos.
17. Pēc tam izmantošanai *STE* testā gatavās šūnas sagatavo attiecīgā šūnu slāņa biezumā un uzsēj uz 96 iedobju mikrotitrēšanas plates. Ieteicamais šūnu uzsēšanas blīvums ir $6,0 \times 10^3$ šūnas uz vienu iedobi, ja šūnas lieto četras dienas pēc uzsēšanas, vai $3,0 \times 10^3$ šūnas uz vienu iedobi, ja šūnas lieto piecas dienas pēc uzsēšanas, pie kultivēšanas tilpuma 200 µl. *STE* testā izmantojamās šūnas, kas kultūras barotnē uzsētas atbilstošā biezumā, līdz testēšanas brīdim, t. i., četrās vai piecās dienās pēc uzsēšanas, sasniegs vairāk nekā 80 % kofluenci.

Testējamās ķīmikālijas un kontroles vielu aplicēšana

18. Vēlamākais šķīdinātājs, kurā izšķīdināt vai suspendēt testējamo ķīmikāliju, ir fizioloģiskais šķīdums. Ja testējamā ķīmikālija ir mazšķīstoša vai vismaz uz piecām minūtēm nevar tikt vienmērīgi izšķīdināta vai suspendēta fizioloģiskajā šķīdumā, otrā labākā izvēle ir 5 % DMSO (CAS Nr. 67-68-5), kas izšķīdināts fizioloģiskajā šķīdumā. Ja testējamā ķīmikālija vismaz uz piecām minūtēm nevar tikt vienmērīgi izšķīdināta vai suspendēta ne fizioloģiskajā šķīdumā, ne 5 % DMSO, kas izšķīdināts fizioloģiskajā šķīdumā, nākamā izvēle ir minerāleļļa (CAS Nr. 8042-47-5).
19. Izvēlētajā šķīdinātājā testējamo ķīmikāliju vienmērīgi izšķīdina vai suspendē 5 % (masa/masa) koncentrācijā un pēc tam, izmantojot sērijveida 10-kārtēju atšķaidījumu, atšķaida līdz 0,5 % un 0,05 % koncentrācijai. Katra testējamā ķīmikālija jātestē gan 5%, gan 0,05 % koncentrācijā. Uz 96 iedobju plates kultivētās šūnas katrā iedobē piecas minūtes istabas temperatūrā eksponē 200 mikrolitriem (µl) testējamās ķīmikālijas šķīduma (vai suspensijas), kuras koncentrācija ir 5 % vai 0,05 %. Testējamās ķīmikālijas (vienkomponenta vielas, daudzkomponentu vielas vai maisījumus) uzskata par tīrām vielām un neatkarīgi no to patiesās tīrības atšķaida vai suspendē saskaņā ar aprakstīto metodi.
20. Katrā atkārtojumā uz katras plates par barotnes kontroli izmanto 16. punktā aprakstīto kultūras barotni. Turklāt katrā atkārtojumā uz katras plates šūnas jāeksponē arī

šķīdinātāja kontroles paraugiem. Ir pierādīts, ka 18. punktā aprakstītajiem šķīdinātājiem nav kaitīgas ietekmes uz *SIRC* šūnu dzīvotspēju.

21. *STE* testēšanas metodē par pozitīvo kontroli katrā atkārtojumā uz katras plates jāizmanto 0,01 % nātrija laurilsulfāts (SLS), kas izšķīdināts fizioloģiskajā šķīdumā. Lai varētu aprēķināt šūnu dzīvotspēju pozitīvajā kontrolē, katrā atkārtojumā uz katras plates jāiekļauj arī fizioloģiskā šķīduma kontrole.
22. Lai noteiktu, kā kompensēt optisko blīvumu, būs vajadzīgs tukšais paraugs, un to pielieto iedobēm, kurās ir tikai fosfātu fizioloģiskais buferšķīdums, kas nesatur kalciju un magniju (PBS-) vai šūnas.
23. Ikviens paraugs (testējamā ķīmikālija 5 % un 0,05 % koncentrācijā, barotnes kontrole, šķīdinātāja kontrole un pozitīvā kontrole) jātestē trīs reizes katrā atkārtojumā, uz piecām minūtēm istabas temperatūrā šūnas eksponējot 200 mikrolitriem attiecīgās testējamās vai kontroles ķīmikālijas.
24. Etalonvielas ir lietderīgi izmantot, lai novērtētu kādai konkrētai ķīmikāliju vai produktu klasei piederīgas nezināmas ķīmikālijas spēju izraisīt acu kairinājumu vai arī lai novērtētu kāda acu kairinātāja relatīvo spēju izsaukt noteiktas intensitātes atbildreakciju uz kairinājumu.

Šūnu dzīvotspējas mērīšana

25. Pēc eksponēšanas šūnas divreiz mazgā ar 200 μ l PBS un tad pievieno 200 μ l MTT šķīduma (0,5 mg MTT uz mililitru kultūras barotnes). Pēc divu stundu ilga reakcijas laika inkubatorā (37°C, 5% CO₂) dekantē MTT šķīdumu, tad MTT formazānu ekstrahē, uz 60 minūtēm istabas temperatūrā tumsā pievienojot 200 mikrolitrus (μ l) 0,04 N sālsskābes ar izopropanolu, un pie 570 nm ar mikroplāšu lasītāju izmēra MTT formazāna šķīduma absorbciju. Testējamo ķīmikāliju interference ar MTT ķīmisko analīzi (ar krāsvielām vai tiešiem MTT reducētājiem) rodas tikai tad, ja pēceksponēcijas skalošanas laikā no testa sistēmas paliek neizvadīts ievērojams daudzums testējamās ķīmikālijas. Tas ir aktuāli gadījumā ar trīsdimensionālajiem rekonstruētas cilvēka radzenes vai rekonstruētas cilvēka epidermas audiem, bet neattiecas uz divdimensionālajām šūnu kultūrām, kuras izmanto *STE* testēšanas metodē.

Rezultātu interpretēšana un prognostiskais modelis

26. Par katru testējamo ķīmikāliju iegūtās optiskā blīvuma (OB) vērtības izmanto, lai aprēķinātu šūnu dzīvotspēju salīdzinājumā ar šķīdinātāja kontroli, kurai to pieņem par 100 %. Šūnu relatīvo dzīvotspēju izsaka ar procentuālo īpatsvaru, testējamās ķīmikālijas OB dalot ar šķīdinātāja kontroles OB (iepriekš no abām vērtībām atņem tukšā parauga OB).

$$\text{Šūnu dzīvotspēja (\%)} = \frac{(\text{test. ķīmikālijas } OB_{570}) - (\text{tukšā par. } OB_{570})}{(\text{šķīdin. kontroles } OB_{570}) - (\text{tukšā par. } OB_{570})} \times 100$$

Līdzīgā veidā šūnu relatīvo dzīvotspēju procentuāli izsaka katrai šķīdinātāja kontrolei, tās OB dalot ar barotnes kontroles OB (iepriekš no abām vērtībām atņem tukšā parauga OB).

27. Jāizdara trīs neatkarīgi atkārtojumi, katrs no tiem ar trijām replikāta iedobēm (t. i., n=9). Ar katras testējamās ķīmikālijas un šķīdinātāja kontroles trijām iedobēm iegūto vidējo aritmētisko katrā neatkarīgajā atkārtojumā izmanto, lai aprēķinātu šūnu relatīvās dzīvotspējas vidējo aritmētisko vērtību. Šūnu dzīvotspējas galīgo vidējo aritmētisko vērtību aprēķina no visiem trijiem neatkarīgajiem atkārtojumiem.
28. Tālāk norādītas šūnu dzīvotspējas robežvērtības tādu testējamo ķīmikāliju identificēšanai, kuras inducē nopietnus acu bojājumus (ANO GHS / CLP 1. kategorija), un arī tādu testējamo ķīmikāliju identificēšanai, kuras nav jāklasificē kā acīm kairinošas vai nopietnus acu bojājumus izraisošas (ANO GHS / CLP nekategorizētās ķīmikālijas).

2. tabula. STE testēšanas metodes prognostiskais modelis

Šūnu dzīvotspēja		ANO GHS / CLP klasifikācija	Piemērojamība
Pie 5 %	Pie 0,05 %		
> 70%	> 70%	Nekategorizēta	Vielas un maisījumi, izņemot: i) ļoti gaistošas vielas, kuru tvaika spiediens pārsniedz 6 kPa ¹ , un ii) cietas ķīmikālijas (vielas un maisījumus), kas nav virsmaktīvās vielas vai maisījumi, kuri pilnībā sastāv no virsmaktīvām vielām
≤ 70%	> 70%	Nav iespējams prognozēt	Nepiemēro
≤ 70%	≤ 70%	1. kategorija	Vielas un maisījumi ²

¹ Maisījumus, kas satur vielas, kuru tvaika spiediens pārsniedz 6 kPa, jāizvērtē piesardzīgi, lai nepieļautu potenciālas bīstamības neprognozēšanu, un pamatojums jādod par katru atsevišķu gadījumu.

² Pamatojoties uz rezultātiem, kas iegūti pamatā ar vienkomponta vielām, lai gan pastāv arī ierobežots daudzums datu par maisījumu testēšanu. Tomēr šī testēšanas metode ir tehniski piemērojama daudzkomponentu vielu un maisījumu testēšanai. Ja šo testēšanas metodi izmanto, lai testētu maisījumu, un testēšanas nolūks ir iegūt datus kādam normatīvajam mērķim, vispirms jāapsver, vai un kādēļ tā varētu sniegt minētajam mērķim piemērotus rezultātus. Šādi apsvērumi nav vajadzīgi, ja pastāv regulatīva prasība maisījumu testēt.

Pieņemamības kritēriji

29. Testēšanas rezultātus uzskata par pieņemamiem, ja ir izpildīti visi zemāk nosauktie kritēriji.

- a) (Kultūras barotnei eksponētās) barotnes kontroles optiskajam blīvumam, no kura atņemts tukšā parauga optiskais blīvums, jābūt 0,3 vai lielākam.
- b) Šķīdinātāja kontroles dzīvotspējai attiecībā pret barotnes kontroli jābūt 80 % vai lielākai. Ja katrā atkārtojumā izmanto vairāku šķīdinātāju kontroles: lai ar šiem šķīdinātajiem testētās ķīmikālijas būtu kvalificējamas, ikvienā no minētajām kontrolēm šūnu dzīvotspējai jābūt lielākai par 80 %.
- c) Ar pozitīvo kontroli (0,01 % SLS) iegūtajai šūnu dzīvotspējai jābūt vēsturiskās vidējās vērtības divu standartnoviržu robežās. Pozitīvās kontroles augšējās un apakšējās pieņemamības robežvērtības būtu jāatjaunina regulāri, t. i., reizi trijos mēnešos vai ikreiz, kad tests ar pieņemamu rezultātu izdarīts laboratorijā, kur testēšana notiek neregulāri (t. i., retāk nekā reizi mēnesī). Ja laboratorijas veikto eksperimentu nav pietiekami daudz, lai iegūtu statistiski robustu pozitīvo kontroļu sadalījumu, ir pieņemami izmantot metodes izstrādātāja noteiktās augšējās un apakšējās pieņemamības robežvērtības, t. i., vērtības intervālā no 21,1 % līdz 62,3 % atkarībā no izstrādātāja laboratorijas vēsturiskajiem datiem, un pašiem savu sadalījumu izveidot pirmo rutīnas testu laikā.
- d) Testējamās ķīmikālijas 5 % un 0,05 % koncentrācijā trijos neatkarīgos atkārtojumos iegūtas galīgās šūnu dzīvotspējas standartnovirzei jābūt mazākai nekā 15 %.

Ja viens vai vairāki no šiem kritērijiem nav izpildīti, rezultātus atmet un izdara trīs citus neatkarīgus atkārtojumus.

DATI UN PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

Dati

30. Pārskatā jāiekļauj dati par katru individuālo mikroiebobu (piem., šūnu dzīvotspējas vērtības) visos atkārtojumos, kā arī jānorāda kopējā vidējā vērtība, standartnovirze un klasifikācija.

Testēšanas pārskats

31. Testēšanas pārskatā norāda šādu informāciju.

Testējamā ķīmikālija un kontroles vielas

- Vienkomponenta viela: ķīmiskā identifikācija, piem., *IUPAC* vai *CAS* nosaukums(-i), *CAS* numurs(-i), *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula un/vai citi identifikācijas dati
- Vairākkomponentu viela, *UVCB* un maisījums: iespējami izsmēlošs raksturojums ar, piem., sastāvdaļu ķīmisko identitāti (sk. iepriekš), tīrību, kvantitatīvo saturu un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām

- Agregātvoklis, gaistamība, pH, LogP, molekulmasa, ķīmiskā klase un citas pētījuma veikšanai relevantas fizikālķīmiskās īpašības, ciktāl šī informācija ir pieejama
- Tīrība, piemaisījumu ķīmiskā identitāte (attiecīgā gadījumā, ja šī informācija ir pieejama) utt.
- Pirmstestēšanas apstrāde, ja tāda veikta (piem., sildīšana, smalcināšana)
- Glabāšanas apstākļi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama

Testēšanas metodes nosacījumi un procedūras

- Sponsora, testējošās iestādes, pētījuma vadītāja vārds/nosaukums un adrese
- Izmantotās testēšanas metodes apraksts
- Izmantotā šūnu līnija, tās avots, pasāžas numurs un testēšanā izmantoto šūnu konfluence
- Sīkas ziņas par izmantoto testēšanas procedūru
- Izmantoto atkārtojumu un replikātu skaits
- Izmantotās testējamās ķimikālijas koncentrācijas (ja atšķiras no rekomendētajām)
- Katras testējamās ķimikālijas šķīdinātāja izraudzīšanās pamatojums
- Ar testējamo ķimikāliju saistītās ekspozīcijas ilgums (ja atšķiras no rekomendētā)
- Testēšanas procedūras modifikāciju apraksts, ja tādas bijušas
- Izmantoto izvērtēšanas un lēmumpieņemšanas kritēriju apraksts
- Atsauce uz vēsturisko pozitīvo kontroles vidējo vērtību un standartnovirzi (SD)
- Apliecināta laboratorijas kompetence izmantot šo testēšanas metodi (piem., testējot standartvielas) vai apliecināta testēšanas metodes ilgstoša reproducējamība

Rezultāti

- Par katru testējamo ķimikāliju un kontroles vielu un par katru testēto koncentrāciju tabulā jānorāda individuālās OD vērtības katrā replikāta mikroiedobē, OD vidējās aritmētiskās vērtības katrā neatkarīgā atkārtojumā, procentuālā šūnu dzīvotspēja katrā neatkarīgā atkārtojumā un procentuālās šūnu dzīvotspējas galīgā vidējā aritmētiskā vērtība un SD, kas aptver trīs atkārtojumus
- Barotnes, šķīdinātāja un pozitīvās kontroles rezultāti pēc piemērotiem pētījuma pieņemamības kritērijiem
- Jebkādas citas novērotās ietekmes apraksts

- Kopējā atvasinātā klasifikācija ar norādi uz izmantoto prognostisko modeli un/vai lēmumpieņemšanas kritēriju

Rezultātu iztirzājums

Secinājumi

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. Available at: 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. Available at: [http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf].
- (8) Šā pielikuma B.5. nodaļa “Akūts acu kairinājums/korozija”.
- (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.

Papildinājums

DEFINĪCIJAS

Pareizība: pakāpe, kādā ar testēšanas metodi iegūto mērījumu rezultāti sakrīt ar pieņemtajām atsaucēs vērtībām. Tas ir testēšanas metodes veikspējas raksturlielums un viens no relevantuma aspektiem. Šo terminu bieži izmanto tādā pat nozīmē kā terminu “konkordantums”, ar to saprotot testēšanas metodes pareizo iznākumu īpatsvaru (13).

Etalonķimikālija: ķimikālija, ko salīdzināšanā ar testējamo ķimikāliju izmanto par standartu. Etalonķimikālijai jāpiemīt šādām īpašībām: i) konsekvents un uzticams avots vai avoti; ii) strukturāla un funkcionāla līdzība ar testējamās vielas klases vielām; iii) labi zināmas fizikālās un ķīmiskās īpašības; iv) apliecināti dati par zināmajām ietekmēm un v) vielas zināmajai potencei jāatbilst vēlamās atbildreakcijas diapazonam.

Augšupēja pieeja: pakāpeniska pieeja, ko izmanto ķimikālijai, par kuru ir aizdomas, ka tā nav jāklasificē kā acu kairinājuma vai nopietnu acu bojājumu izraisītāja, un kas sākas ar to ķimikāliju nošķiršanu, kuras nav jāklasificē (negatīvs iznākums), no citām ķimikālijām (pozitīvs iznākums).

Ķimikālija: viela vai maisījums.

Acu kairinājums: izmaiņas acī, kas rodas pēc testējamās ķimikālijas aplicēšanas uz acs priekšējās virsmas un kas 21 dienas laikā pēc aplicēšanas ir pilnībā atgriezeniskas. Nozīmē to pašu, ko “atgriezeniska ietekme uz acīm” un ANO GHS / CLP 2. kategorija.

Pseudonegatīvu īpatsvars: pozitīvā iznākuma ķimikāliju proporcija, kuras ar testēšanas metodi aplami noteiktas par negatīvām. Tas ir viens no testēšanas metodes veikspējas raksturlielumiem.

Pseudopozitīvu īpatsvars: negatīvā iznākuma ķimikāliju proporcija, kuras ar testēšanas metodi aplami noteiktas par pozitīvām. Tas ir viens no testēšanas metodes veikspējas raksturlielumiem.

Bīstamība: tāda aģenta vai situācijas iedabiska īpašība, kam piemīt potenciāls atstāt nelabvēlīgu ietekmi uz šim aģentam eksponētu organismu, sistēmu vai (sub)populāciju.

Barotnes kontrole: neapstrādāts replikāts, kurā ir visi testa sistēmas komponenti. Ar šo paraugu izdara tādas pašas manipulācijas kā ar paraugiem, kas apstrādāti ar testējamo ķimikāliju, un citiem kontrolparaugiem, lai tādējādi noteiktu, vai šķīdinātājs un testa sistēma mijiedarbojas.

Maisījums: maisījums vai šķīdums, kas sastāv no divām vai vairāk vielām.

Vienkomponenta viela: viela, definēta ar tās kvantitatīvo sastāvu, kurā viena galvenā sastāvdaļa veido vismaz 80 % (masa/masa).

MTT: 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijs bromīds; tiazolilzilais tetrazolijs bromīds.

Daudzkomponentu viela: viela, definēta ar tās kvantitatīvo sastāvu, kurā vairāk nekā viena no galvenajām sastāvdaļām ir koncentrācijā $\geq 10\%$ (masa/masa) un $< 80\%$ (masa/masa). Daudzkomponentu viela tiek iegūta ražošanas procesā. Atšķirība starp maisījumu un daudzkomponentu vielu ir tāda, ka maisījumu iegūst, divas vai vairākas vielas sajaucot bez ķīmiskas reakcijas. Daudzkomponentu viela rodas ķīmiskā reakcijā.

OB: optiskais blīvums.

Pozitīvā kontrole: replikāts, kurā ir visi testa sistēmas komponenti un kurš apstrādāts ar vielu, par ko ir zināms, ka tā inducē pozitīvu atbildreakciju. Lai būtu iespēja novērtēt pozitīvās kontroles atbildreakcijas mainību laikā, pozitīvās atbildreakcijas intensitāte nedrīkstētu būt pārlietu liela.

Relevantums: parametrs, kas raksturo testa attiecināmību uz interesējošo ietekmi un to, vai testu lietot konkrētam nolūkam ir jēgpilni un noderīgi. Tā ir pakāpe, kādā ar testu var pareizi izmērīt vai prognozēt interesējošo bioloģisko ietekmi. Relevantums ietver arī testēšanas metodes pareizības (konkordantuma) aspektu (10).

Ticamība: pakāpe, kādā vienā un tajā pašā laboratorijā vai dažādās laboratorijās pēc viena un tā paša protokola var ilgāku laiku reproducējami izmantot konkrētu testēšanas metodi. To novērtē, aprēķinot metodes intralaboratorisko un interlaboratorisko reproducējamību un intralaboratorisko atkārtojamību (13).

Jūtība: tas, cik liela proporcija no visām pozitīvajām/aktīvajām ķīmikālijām ar testu tiek klasificētas pareizi. Tas ir pareizības mērs testēšanas metodei, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testēšanas metodes relevantuma izvērtēšanā (10).

Nopietni acu bojājumi: acs audu bojājumi vai nopietna fiziska redzes pasliktināšanās, kas rodas pēc testējamās ķīmikālijas aplicēšanas uz acs priekšējās virsmas un kas 21 dienas laikā pēc aplicēšanas nav pilnībā atgriezeniska. Nozīmē to pašu, ko “neatgriezeniska ietekme uz acīm” un ANO GHS / CLP 1. kategorija.

Šķīdinātāja/nesēja kontrole: neapstrādāts paraugs, kurā ir visi testa sistēmas komponenti, to vidū šķīdinātājs vai nesējs, ko izmanto ar testējamo ķīmikāliju apstrādātajos paraugos un citos kontrolparaugos, un kuru izmanto, lai noteiktu bāzlīnijas atbildreakciju paraugiem, kas apstrādāti ar attiecīgajā šķīdinātājā vai nesējā izšķīdinātu testējamo ķīmikāliju. Ja testā izmanto arī paralēlu barotnes kontroli, šis paraugs parāda arī to, vai šķīdinātājs vai nesējs mijiedarbojas ar testa sistēmu.

Specifiskums: tas, cik liela daļa no visām negatīvajām/neaktīvajām ķīmikālijām ar testu tiek klasificētas pareizi. Tādas testēšanas metodes pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testēšanas metodes relevantuma izvērtēšanā (13).

Vielā: ķīmiskais elements un tā dabiski radušies vai ražošanas procesā iegūti savienojumi, ieskaitot to stabilizācijai nepieciešamās piedevas, kā arī izmantotajos procesos radušos piejaukumus, bet izņemot šķīdinātājus, kurus var atdalīt, neietekmējot vielas stabilitāti un nemainot tās sastāvu.

Virsmaktīvā viela: viela, piem., deterģents, kas spēj samazināt šķidrums virsmas spraigumu un tādējādi ļauj tam putot vai penetrēt cietvielās; to dēvē arī par mitrinātāju.

Testējamā ķimikālija: jebkura viela vai maisījums, ko testē ar šo testēšanas metodi.

Secīgas testēšanas stratēģija: pakāpeniskas testēšanas stratēģija, kurā noteiktā secībā pārskata visu esošo informāciju par testējamo ķimikāliju, katrā pakāpē izmantojot pierādījumu izsvēršanu, lai pirms pārejas uz nākamo pakāpi noteiktu, vai ir pieejams pietiekami daudz informācijas, lai pieņemtu lēmumu par bīstamības klasifikāciju. Ja testējamās ķimikālijas kairinātājpotenciālu var noteikt, pamatojoties uz esošo informāciju, papildu testēšana nav jāveic. Ja, pamatojoties uz esošo informāciju, testējamās ķimikālijas kairinātājpotenciālu noteikt nevar, ievēro pakāpenisku secīgu procedūru testēšanai ar dzīvniekiem, un to dara tik ilgi, līdz var viennozīmīgi pieņemt lēmumu par klasifikāciju.

Lejupēja pieeja: pakāpeniska pieeja, ko izmanto testējamai ķimikālijai, par kuru ir aizdomas, ka tā izraisa nopietnus acu bojājumus, un kas sākas ar to ķimikāliju nošķiršanu, kuras inducē nopietnus acu bojājumus (pozitīvs rezultāts), no citām ķimikālijām (negatīvs rezultāts).

Apvienoto Nāciju Organizācijas Ķimikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētā sistēma (ANO GHS): sistēma, kurā ķimikālijas (vielas un maisījumus) klasificē pēc standartizētiem fizisko apdraudējumu, veselības apdraudējumu un vidisko apdraudējumu tipiem un līmeņiem un kura paredz atbilstošus saziņas elementus, piem., piktogrammas, signālvārdus, bīstamības apzīmējumus, drošības prasību apzīmējumus un drošības datu lapas, ar mērķi sniegt informāciju par ķimikāliju nelabvēlīgo ietekmi, lai aizsargātu cilvēkus (viņu vidū darba devējus, darba ņēmējus, transporta darbiniekus, patērētājus un avārijas dienestu darbiniekus) un vidi (1).

ANO GHS / CLP 1. kategorija: sk. "Nopietnu acu bojājumu" definīciju.

ANO GHS / CLP 2. kategorija: sk. "Acu kairinājuma" definīciju.

ANO GHS / CLP nekategorizētas ķimikālijas: Ķimikālijas, kas nav klasificētas ANO GHS / CLP 1. vai 2. kategorijā (vai ANO GHS 2A vai 2B kategorijā).

UVCB: vielas, kuru sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kompleksi reakcijas produkti vai bioloģiski materiāli.

B.69 REKONSTRUĒTA, CILVĒKA RADZENEI LĪDZĪGA EPITĒLIJA (*RhCE*) TESTĒŠANAS METODE, KURĀ IDENTIFICĒ ĶĪMIKĀLIJAS, KURAS NAV JĀKLASIFICĒ UN JĀMARKĒ KĀ TĀDAS, KAS IZRAISA ACU KAIRINĀJUMU VAI NOPIETNUS ACU BOJĀJUMUS

IEVADS

1. Šī testēšanas metode (TM) ir ekvivalenta ESAO testēšanas vadlīnijā (TG) Nr. 492 (2017) aprakstītajam. *Nopietni acu bojājumi* ir acs audu bojājumi vai nopietna fiziska redzes pasliktināšanās, kas rodas pēc testējamās ķīmikālijas aplicēšanas uz acs priekšējās virsmas un kas 21 dienas laikā pēc aplicēšanas nav pilnībā atgriezeniska, saskaņā ar Apvienoto Nāciju Organizācijas Ķīmisko vielu klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizēto sistēmu (ANO GHS) (1) un Eiropas Savienības (ES) Regulu (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakojumu (*CLP*)¹. Saskaņā ar ANO GHS un *CLP acu kairinājums* ir izmaiņas acī, kas rodas pēc testējamās ķīmikālijas aplicēšanas uz acs priekšējās virsmas un kas 21 dienas laikā pēc aplicēšanas ir pilnībā atgriezeniskas. Testējamās ķīmikālijas, kas izraisa nopietnus acu bojājumus, klasificē ANO GHS un *CLP* 1. kategorijā, bet testējamās ķīmikālijas, kas izraisa acu kairinājumu, klasificē ANO GHS un *CLP* 2. kategorijā. Testējamās ķīmikālijas, kuras nav klasificētas par tādām, kas izraisa acu kairinājumu vai nopietnus acu bojājumus, saskaņā ar definīciju ir ķīmiskās vielas, kuras neatbilst priekšnosacījumiem klasificēšanai ANO GHS un *CLP* 1. vai 2. kategorijā (2A vai 2B), t. i., tās tiek uzskatītas par ANO GHS un *CLP* nekategorizētām ķīmikālijām.
2. Nopietnu acu bojājumu / acu kairinājuma novērtēšanai parasti izmantoti laboratorijas dzīvnieki (TM B.5 (2)). Vispiemērotākās testēšanas metodes izvēle un šīs testēšanas metodes izmantošana jāskata ESAO Vadlīniju par integrētu pieeju nopietnu acu bojājumu un acu kairinājuma testēšanai un novērtēšanai (39) kontekstā.
3. Šajā testēšanas metodē aprakstīta *in vitro* procedūra, pēc kuras var noteikt ķīmikālijas (vielas un maisījumus), kuras nav jāklasificē un jāmarķē kā tādas, kas saskaņā ar ANO GHS un *CLP* izraisa acu kairinājumu vai nopietnus acu bojājumus. Tajā izmanto rekonstruētu cilvēka radzenei līdzīgu epitēliju (*RhCE*), kura īpašības ļoti līdzinās cilvēka radzenes epitēlija histoloģiskajām, morfoloģiskajām, bioķīmiskajām

¹ Eiropas Parlamenta un Padomes 2008. gada 16. decembra Regula (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakojumu un ar ko groza un atceļ Direktīvas 67/548/EEK un 1999/45/EK un groza Regulu (EK) Nr. 1907/2006 (OV L 353/1, 31.12.2008.).

un fizioloģiskajām īpašībām. Vēl četras *in vitro* testēšanas metodes ir apstiprinātas, uzskatāmas par zinātniski derīgām un pieņemtas kā TM B.47 (3), B.48 (4), B.61 (5) un B.68 (6), lai noteiktu cilvēka veselības beigupunktam atbilstošos nopietnos acu bojājumus / acu kairinājumu.

4. Šajā testēšanas metodē iekļauti divi apstiprināti testi, kuros izmanto komerciāli pieejamus *RhCE* modeļus. Validācijas pētījumi acu kairinājuma / nopietnu acu bojājumu novērtēšanai veikti (7)(8)(9)(10)(11)(12)(13) ar EpiOcular™ acu kairinājuma testu (*EIT*) un SkinEthic™ cilvēka radzenes epitēlija (*HCE*) acu kairinājuma testu (*EIT*). Katrā no šiem testiem par testa sistēmu izmanto komerciāli pieejamas *RhCE* audu konstrukcijas, tālāk tekstā tās sauktas par validētām references metodēm: attiecīgi *VRM1* un *VRM2*. No šiem validācijas pētījumiem un to neatkarīgajiem salīdzinošajiem izvērtējumiem (9)(12) secināja, ka ar EpiOcular™ *EIT* un SkinEthic™ *HCE EIT* iespējams pareizi identificēt ķīmikālijas (vielas un maisījumus), kuras nav jāklasificē un jāmarķē kā tādas, kas izraisa acu kairinājumu vai nopietnus acu bojājumus saskaņā ar ANO GHS, un testus ieteica kā zinātniski derīgus šim nolūkam (13).
5. Patlaban ir vispārpieņemts, ka tuvākajā nākotnē neviena atsevišķa *in vitro* testēšanas metode nevarēs pilnībā aizstāt Dreiza [*Draize*] *in vivo* acu testu (2)(14) un prognozēt visas nopietnu acu bojājumu / acu kairinājuma atbildreakcijas dažādām ķīmikāliju klasēm. Tomēr Dreiza acu testu varētu būt iespējams pilnībā aizstāt, (pakāpjveida) testēšanas stratēģijā stratēģiski kombinējot vairākas alternatīvas testēšanas metodes, piem., augšupēju/lejupēju pieeju (15). Augšupējā pieeja (15) ir izstrādāta gadījumiem, kad, pamatojoties uz esošo informāciju, paredzams, ka ķīmikālija neizraisīs tādu acu kairinājumu, ka tā būtu jāklasificē, savukārt lejupējā pieeja (15) ir izstrādāta gadījumiem, kad, pamatojoties uz esošo informāciju, ķīmikālija izraisīs nopietnus acu bojājumus. EpiOcular™ *EIT* un SkinEthic™ *HCE EIT* ieteicams izmantot tādā testēšanas stratēģijā kā *Scott et al.* ierosinātā augšupējā/lejupējā pieeja, piemēram, par sākotnējo posmu augšupējā pieejā vai kā vienu no pēdējiem posmiem lejupējā pieejā, tādu ķīmikāliju identificēšanai, kuras saskaņā ar ANO GHS / *CLP* (nekatēgorizētas ķīmiskās vielas) bez papildu testēšanas nav jāklasificē kā tādas, kas izraisa acu kairinājumu vai nopietnus acu bojājumus (15). Taču EpiOcular™ *EIT* un SkinEthic™ *HCE EIT* nav paredzēti ANO GHS / *CLP* 1. kategorijas (nopietni acu bojājumi) un ANO GHS / *CLP* 2. kategorijas (acu kairinājums) atšķiršanai. Šī diferenciācija būs jānosaka citā testēšanas stratēģijas pakāpē (15). Tāpēc testējamā ķīmikālija, kura ar EpiOcular™ *EIT* vai SkinEthic™ *HCE EIT* identificēta par tādu, kas jāklasificē kā acu kairinājumu / nopietnus acu bojājumus izraisīša, jātestē papildus (*in vitro* un/vai *in vivo*), lai nonāktu pie galīgā secinājuma (ANO GHS / *CLP* nekatēgorizēta, 2. kategorijas vai 1. kategorijas ķīmikālija), izmantojot, piem., TM B.47, B.48, B.61 vai B.68.

6. Šajā testēšanas metodē aprakstīta procedūra, ko izmanto, lai izvērtētu testējamās ķīmikālijas potenciālo bīstamību acīm, pamatojoties uz tās spēju izraisīt citotoksicitāti *RhCE* audu konstrukcijā, ko nosaka ar MTT ķīmisko analīzi (16) (sk. 21. punktu). *RhCE* audu dzīvotspēju pēc eksponēšanas testējamai ķīmikālijai nosaka salīdzinājumā ar audiem, kas apstrādāti ar negatīvās kontroles vielu (% dzīvotspējas), pēc tam to izmanto, lai prognozētu testējamās ķīmikālijas potenciālo bīstamību acīm.
7. Lai saskaņā ar ESAO Vadlīniju Nr. 34 (18) principiem būtu vieglāk validēt jaunus vai grozītus *in vitro RhCE* testus, kas līdzinās EpiOcular™ *EIT* un SkinEthic™ *HCE EIT*, un lai ESAO TG 492 būtu iespējams savlaicīgi grozīt ar mērķi tajā iekļaut šos testus, ir pieejami veikspējas standarti (17). Attiecībā uz testiem, kas validēti saskaņā ar veikspējas standartiem, datu savstarpējā atzīšana (*MAD*) saskaņā ar ESAO nolīgumu būs garantēta tikai tad, ja ESAO šos testus būs izskatījusi un iekļāvusi attiecīgajā testēšanas vadlīnijā.

DEFINĪCIJAS

8. Definīcijas ir sniegtas 1. papildinājumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI

9. Šīs testēšanas metodes pamatā ir komerciālas trīsdimensiju *RhCE* audu konstrukcijas, ko ražo, izmantojot primāros cilvēka epidermas keratinocītus (t. i., EpiOcular™ *OCL-200*) vai imortalizētas cilvēka radzenes epitēlija šūnas (t. i., SkinEthic™ *HCE/S*). EpiOcular™ *OCL-200* un SkinEthic™ *HCE/S RhCE* audu konstrukcijas ir līdzīgas *in vivo* radzenes epitēlija trīsdimensiju struktūrai, un tās ražo no pētāmās sugas šūnām (19)(20). Turklāt ar testiem tieši nosaka citotoksicitāti, ko izraisa ķīmikālijas iekļūšana cauri radzenei un šūnu un audu bojājumu rašanās, pēc tam citotoksiskā atbildreakcija nosaka nopietnu acu bojājumu / acu kairinājuma vispārējo iznākumu *in vivo*. Šūnu bojājumus var izraisīt vairāki iedarbības veidi (sk. 20. punktu), taču citotoksicitātei ir svarīga vai pat primāra mehānistiska nozīme ķīmikālijas izraisītas nopietnu acu bojājumu / acu kairinājuma vispārējās atbildreakcijas noteikšanā, kas neatkarīgi no audu bojājumu pamatā esošiem fizikāli ķīmiskajiem procesiem *in vivo* izpaužas galvenokārt kā radzenes apduļķošanās, irīts, konjunktīvas apsārtums un/vai konjunktīvas hemoze.
10. Šīs testēšanas metodes pamatā esošajā validēšanas pētījumā testētas ļoti daudzas ķīmikālijas, aptverot ļoti dažādus ķīmisko vielu veidus, ķīmisko vielu klases, molekulmasas, LogP, ķīmiskās struktūras utt. EpiOcular™ *EIT* validēšanas datubāzē kopumā bija ietvertas 113 ķīmikālijas, saskaņā ar ESAO *QSAR* instrumentu kopuma analīzi aptverot 95 dažādas organiskās funkcionālās grupas (8). Vairākums šo ķīmikāliju bija vienkomponeņu vielas, taču pētījumā bija iekļautas arī vairākas

daudzkomponentu vielas (tostarp 3 homopolimēri, 5 kopolimēri un 10 kvazipolimēri). 113 testēto ķīmikāliju sadalījums pēc agregārstāvokļa un ANO GHS / CLP kategorijām bija šāds: 13 1. kategorijas šķidrumi, 15 1. kategorijas cietvielas, 6 2A kategorijas šķidrumi, 10 2A kategorijas cietvielas, 7 2B kategorijas šķidrumi, 7 2B kategorijas cietvielas, 27 nekategorizēti šķidrumi un 28 nekategorizētas cietvielas (8). SkinEthic™ HCE EIT validēšanas datubāzē kopumā bija ietvertas 200 ķīmikālijas, aptverot 165 dažādas organiskās funkcionālās grupas (8)(10)(11). Vairākums šo ķīmikāliju bija vienkomenta vielas, taču pētījumā bija iekļautas arī vairākas daudzkomponentu vielas (tostarp 10 polimēri). 200 testēto ķīmikāliju sadalījums pēc agregārstāvokļa un ANO GHS / CLP kategorijām bija šāds: 27 1. kategorijas šķidrumi, 24 1. kategorijas cietvielas, 19 2A kategorijas šķidrumi, 10 2A kategorijas cietvielas, 9 2B kategorijas šķidrumi, 8 2B kategorijas cietvielas, 50 nekategorizēti šķidrumi un 53 nekategorizētas cietvielas (10)(11).

11. Šī testēšanas metode attiecas uz vielām un maisījumiem, kā arī uz cietām vielām, šķidrumiem, puscietaisnām vielām un vaskiem. Šķidrumi var būt ūdens vai neūdens šķīdumi; cietas vielas var būt gan ūdenī šķīstošas, gan nešķīstošas. Ja iespējams, cietas vielas pirms aplicēšanas jāsamal smalkā pulverī; nekāda cita priekšapstrāde paraugam nav vajadzīga. Validēšanas pētījumā nav novērtētas gāzes un aerosoli. Kaut arī domājams, ka vispār ir iespējams tos testēt ar RhCE tehnoloģiju, ar pašreizējo testēšanas metodi gāzes un aerosolus testēt nevar.
12. Testējamās ķīmikālijas, kas absorbē gaismu tādā pašā diapazonā kā MTT formazāns (dabiski vai pēc apstrādes), un testējamās ķīmikālijas, kas spēj tiešā veidā reducēt vitālo krāsvielu MTT (par MTT formazānu), var traucēt audu dzīvotspējas mērījumiem, un korekcijai jāizmanto pielāgotas kontroles. Iespējami nepieciešamo pielāgoto kontroļu veids atšķirsies atkarībā no testējamās ķīmikālijas radītās interferences veida un MTT formazāna kvantitatīvai noteikšanai izmantotās procedūras (sk. 36.–42. punktu).
13. Pirmsvalidēšanas (21)(22) un pilnās validēšanas (8)(10)(11) pētījumos iegūtie rezultāti pierādījuši, ka EpiOcular™ EIT un SkinEthic™ HCE EIT ir izmantojams laboratorijās, kurās iepriekš nav veikta ķīmiskā analīze, un tie ir reproducējami tajā pašā un citās laboratorijās. Pamatojoties uz šiem pētījumiem, prognozu konkordantuma reproducējamības līmenis, ko var sagaidīt no EpiOcular™ EIT no iegūtajiem datiem par 113 ķīmikālijām, ir aptuveni 95 % tajā pašā laboratorijā un 93 % citās laboratorijās. Prognozu konkordantuma reproducējamības līmenis, ko var sagaidīt no SkinEthic™ HCE EIT iegūtajiem datiem par 120 ķīmikālijām, ir aptuveni 92 % tajā pašā laboratorijā un 95 % citās laboratorijās.
14. EpiOcular™ EIT var izmantot tādu ķīmikāliju identificēšanai, kuras saskaņā ar ANO GHS un CLP klasifikācijas sistēmu nav jāklasificē kā tādas, kas izraisa acu

kairinājumu vai nopietnus acu bojājumus. Ņemot vērā validēšanas pētījumā (8) iegūtos datus, EpiOcular™ *EIT* vispārējā pareizība ir 80 % (no datiem par 112 ķīmikālijām), jutība ir 96 % (no datiem par 57 ķīmikālijām), pseidonegatīvu īpatsvars ir 4 % (no datiem par 57 ķīmikālijām), specifiskums ir 63 % (no datiem par 55 ķīmikālijām) un pseidopozitīvu īpatsvars ir 37 % (no datiem par 55 ķīmikālijām), salīdzinot ar truša acu *in vivo* references testa datiem (TM B.5) (2)(14), kas klasificēti saskaņā ar ANO GHS un *CLP* klasifikācijas sistēmu. Pētījumā, kurā ar EpiOcular™ *EIT* testēja 97 šķidrus agroķīmijas preparātus, pierādīja, ka šā veida maisījumu testēšanas metodes veikspēja ir līdzīga validēšanas pētījuma veikspējai (23). 97 preparātu sadalījums bija šāds: 21 1. kategorijas, 19 2A kategorijas, 14 2B kategorijas un 43 nekategorizēti, kas klasificēti saskaņā ar ANO GHS klasifikācijas sistēmu atbilstoši truša acu *in vivo* references testa datiem (TM B.5) (2)(14). Ieguva vispārējo pareizību 82 % (no datiem par 97 preparātiem), jutību 91 % (no datiem par 54 preparātiem), pseidonegatīvu īpatsvaru 9 % (no datiem par 54 preparātiem), specifiskumu 72 % (no datiem par 43 preparātiem) un pseidopozitīvu īpatsvaru 28 % (no datiem par 43 preparātiem) (23).

15. SkinEthic™ *HCE EIT* var izmantot tādu ķīmikāliju identificēšanai, kuras saskaņā ar ANO GHS un *CLP* klasifikācijas sistēmu nav jāklasificē kā tādas, kas izraisa acu kairinājumu vai nopietnus acu bojājumus. Ņemot vērā validēšanas pētījumā (10)(11) iegūtos datus, SkinEthic™ *HCE EIT* vispārējā pareizība ir 84 % (no datiem par 200 ķīmikālijām), jutība ir 95 % (no datiem par 97 ķīmikālijām), pseidonegatīvu īpatsvars ir 5 % (no datiem par 97 ķīmikālijām), specifiskums ir 72 % (no datiem par 103 ķīmikālijām) un pseidopozitīvu īpatsvars ir 28 % (no datiem par 103 ķīmikālijām), salīdzinot ar truša acu *in vivo* references testa datiem (TM B.5) (2)(14), kas klasificēti saskaņā ar ANO GHS un *CLP* klasifikācijas sistēmu.
16. Ar abiem *RhCE* testiem vielām vai maisījumiem iegūtais pseidonegatīvu īpatsvars atbilst 12 % kopējās varbūtības, ka atkārtotā testēšanā ar *in vivo* Dreiza acu testu ķīmikālijas tiek identificētas kā ANO GHS un *CLP* 2. kategorijas vai ANO GHS un *CLP* nekategorizētas ķīmikālijas; tā iemesls ir metodei raksturīgā mainība viena testa ietvaros (24). Ar abām *RhCE* testēšanas metodēm vielām vai maisījumiem iegūtajam pseidopozitīvu īpatsvaram šīs testēšanas metodes kontekstā nav būtiskas nozīmes, jo, izmantojot pierādījumu izsvēršanu pakāpjveida testēšanas stratēģijā, visas testējamās ķīmikālijas, kuras rada audu dzīvotspēju, kas atbilst noteiktajām robežvērtībām vai ir mazāka par tām (sk. 44. punktu), atkarībā no regulatīvajām prasībām būs jātestē papildus ar citām *in vitro* testēšanas metodēm vai, ja citas iespējas nebūtu, ar trušiem. Šīs testēšanas metodes var izmantot visu veidu ķīmikālijām, negatīvu rezultātu pieņemot par norādi, ka ķīmikālija nav jāklasificē kā tāda, kas izraisa acu kairinājumu vai nopietnus acu bojājumus (ANO GHS un *CLP* nekategorizēta). Pirms EpiOcular™

EIT un *SkinEthic™ HCE EIT* izmantošanas klasificēšanas shēmās, kas nav ANO GHS / *CLP*, jākonsultējas ar attiecīgajām regulatīvajām iestādēm.

17. Šīs testēšanas metodes ierobežojums ir tāds, ka ar to nevar atšķirt acu kairinājumu / atgriezenisku ietekmi uz acīm (2. kategorija) no nopietniem acu bojājumiem / neatgriezeniskas ietekmes uz acīm (1. kategorija), kā noteikts ANO GHS un *CLP*, nedz arī acu kairinātājus (fakultatīvā 2A kategorija) no viegliem acu kairinātājiem (fakultatīvā 2B kategorija), kā noteikts ANO GHS (1). Šiem nolūkiem nepieciešama papildu testēšana ar citām *in vitro* testēšanas metodēm.
18. Terminu “testējamā ķīmikālija” šajā testēšanas metodē izmanto, lai apzīmētu to, kas tiek testēts¹, bez sasaistes ar *RhCE* testēšanas metodes pielietojamību vielu un/vai maisījumu testēšanā.

TESTA PRINCIPS

19. Testējamo ķīmikāliju vietēji aplicē uz vismaz divām trīsdimensiju *RhCE* audu konstrukcijām, un audu dzīvotspēju mēra pēc ekspozīcijas un pēcekspozīcijas inkubēšanas laika. *RhCE* audus rekonstruē no primāriem cilvēka epidermas keratinocītiem vai imortalizētām cilvēka radzenes epitēlija šūnām, kas kultivētas vairākas dienas, tā lai veidotos stratificēts, labi diferencēts plakans epitēlijs, kas ir morfoloģiski līdzīgs epitēlijam cilvēka radzenē. EpiOcular™ *RhCE* audu konstrukciju veido vismaz 3 dzīvotspējīgi šūnu slāņi un nekeratinizēta virsma, un tai piemīt radzenei līdzīga struktūra, kas ir analoga struktūrai *in vivo*. *SkinEthic™ HCE RhCE* audu konstrukciju līdzīgi normālam cilvēka radzenes epitēlijam veido vismaz 4 dzīvotspējīgi šūnu slāņi, to vidū cilindriskās bazālās šūnas, pārejas spārnveida šūnas un virspusējās plakanās šūnas (20)(26).
20. Ķīmikālijas izraisīti nopietni acu bojājumi / acu kairinājums, kas *in vivo* izpaužas galvenokārt kā radzenes apduļķošanās, irīts, konjunktīvas apsārtums un/vai konjunktīvas hemoze, ir rezultāts virknei notikumu, kas sākas ar ķīmikālijas iekļūšanu cauri radzenei un/vai konjunktīvai un šūnu bojājumu rašanos. Šūnu bojājumus var izraisīt vairāki iedarbības veidi: šūnas membrānas līze (piem., virsmaktīvo vielu, organisku šķīdinātāju izraisīta); makromolekulu (īpaši proteīnu) koagulācija (piem., virsmaktīvo vielu, organisku šķīdinātāju, sārmu un skābju izraisīta); lipīdu pārzielošanās (piem., sārmu izraisīta); alkilēšana vai cita kovalenta mijiedarbība ar

¹ 2013. gada jūnijā ESAO kopīgajā sanāksmē vienojās jaunajās un atjauninātajās ESAO testēšanas vadlīnijās, kur iespējams, testa objekta apzīmēšanai konsekventāk lietot apzīmējumu “testējamā ķīmikālija”.

makromolekulām (piem., balināšanas līdzekļu, peroksīdu un alkilētāju izraisīta) (15)(27)(28). Tomēr pierādīts, ka citotoksicitātei ir svarīga vai pat primāra mehānistiska nozīme ķīmikālijas izraisītas nopietnu acu bojājumu / acu kairinājuma vispārējās atbildreakcijas noteikšanā neatkarīgi no audu bojājumu pamatā esošiem fizikāli ķīmiskajiem procesiem (29)(30). Turklāt ķīmikālijas potenciālu izraisīt nopietnus acu bojājumus / acu kairinājumu galvenokārt nosaka sākotnējā bojājuma apjoms (31), kas korelē ar šūnu mirstības apjomu (29) un sekojošo atbildreakciju un iespējamo iznākumu apjomu (32). Tādējādi pavisam viegli kairinātāji parasti ietekmē tikai virspusējo radzenes epitēliju, viegli un vidēji smagi kairinātāji bojā galvenokārt epitēliju un virspusējo stromu, bet smagi kairinātāji bojā epitēliju, dziļo stromu un reizēm radzenes endotēliju (30)(33). *RhCE* audu konstrukcijas dzīvotspējas mērīšana, ko pēc vietējas eksponēšanas testējamai ķīmikālijai veic, lai noteiktu ķīmikālijas, kuras nav jāklasificē kā tādas, kas izraisa nopietnus acu bojājumus / acu kairinājumu (ANO GHS un *CLP* nekategorizētas ķīmikālijas), pamatojas uz pieņēmumu, ka visas ķīmikālijas, kas izraisa nopietnus acu bojājumus vai acu kairinājumu, radzenes epitēlijā un/vai konjunktīvā izraisīs citotoksicitāti.

21. *RhCE* audu dzīvotspēju ierasts mērīt pēc audu dzīvotspējīgo šūnu ierosinātas vitālās krāsvielas MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolija bromīds; tiazolilzilais tetrazolija bromīds; CAS Nr. 298-93-1] fermentatīvās pārvēršanās par zilas krāsas MTT formazāna sāli, kura daudzumu kvantitatīvi nosaka audu ekstraktā (16). Par ķīmikālijām, kuras nav jāklasificē un jāmarķē saskaņā ar ANO GHS / *CLP* (nekategorizētas ķīmikālijas), nosaka tādas ķīmikālijas, kas nesamazina audu dzīvotspēju zem noteiktas robežvērtības (t. i., audu dzīvotspēja > 60 % EpiOcular™ *EIT* un SkinEthic™ *HCE EITL* testā¹ vai > 50 % SkinEthic™ *HCE EITS* testā²) (sk. 44. punktu).

KOMPETENCES PIERĀDĪŠANA

22. Pirms *RhCE* testu regulāras izmantošanas normatīviem mērķiem laboratorijām jāpierāda sava tehniskā kompetence, pareizi prognozējot 1. tabulā norādītās piecpadsmi standartķīmikālijas. Šīs ķīmikālijas atlasītas no *VRM* validēšanas pētījumos izmantotajām ķīmikālijām (8)(10)(11). Atlasē iespējamajā apjomā iekļautas ķīmikālijas: i) ar atšķirīgu agregātstāvokli; ii) kas aptver visas nopietnu acu

¹ *EITL*: *EIT* šķidrumiem, ja izmanto SkinEthic™ *HCE*.

² *EITS*: *EIT* cietvielām, ja izmanto SkinEthic™ *HCE*.

bojājumu / acu kairinājuma atbildreakcijas *in vivo* atbilstoši augstas kvalitātes rezultātiem, kas iegūti truša acu *in vivo* references testā (TM B.5) (2)(14) un ANO GHS klasifikācijas sistēmā (t. i., 1., 2A, 2B kategorijas vai nekategorizētas ķimikālijas) (1) un CLP klasifikācijas sistēmā (t. i., 1., 2. kategorijas vai nekategorizētas ķimikālijas); iii) kas aptver klasifikācijas atšķirīgos faktorus *in vivo* (24)(25); iv) kas atbilst validēšanas pētījumā izmantotajām ķimikāliju klasēm (8)(10)(11); v) kas plaši aptver organiskās funkcionālās grupas (8)(10)(11); vi) kuru ķīmiskā struktūra ir precīzi noteikta (8)(10)(11); vii) kurām ir krāsa un/vai kas ir tiešas MTT reducētājas; viii) ar kurām to validēšanas laikā ar *RhCE* testēšanas metodēm ieguva reproducējamus rezultātus; ix) kuras to validēšanas pētījumu laikā tika pareizi prognozētas ar *RhCE* testēšanas metodēm; x) kas aptver visas atbildreakcijas *in vitro* atbilstoši augstas kvalitātes *RhCE* testēšanas metožu datiem (dzīvotspēja no 0 līdz 100 %); xi) kas ir komerciāli pieejamas; xii) kuru lietošana nav saistīta ar pārlietu augstām iegādes un/vai atkritumu apsaimniekošanas izmaksām. Gadījumos, kad kāda no norādītajām ķimikālijām nav pieejama vai nav izmantojama citu pamatotu iemeslu dēļ, var izmantot citu ķimikāliju, kas atbilst iepriekš aprakstītajiem kritērijiem, piem., ķimikāliju, kas izmantota *VRM* validēšanai. Šādas atkāpes jāpamato.

1. tabula. Standartķīmikāliju saraksts

Ķīmiskais nosaukums	CAS Nr.	Organiskā funkcionālā grupa ¹	Agregātvoklis	VRM1 dzīvotspēja (%) ²	VRM2 dzīvotspēja (%) ³	VRM prognoze	MTT reducētājs	Krāsas interf.
<i>In vivo 1. kategorija⁴</i>								
Metiltioglikolāts	2365-48-2	Karbonskābes esteris; tiopirts	Šķidr	10,9±6,4	5,5±7,4	Nav iespējams prognozēt	Jā (spēcīgs)	Nē
Hidroksietilakrilāts	818-61-1	Akrlāts; spirts	Šķidr	7,5±4,7 ⁵	1,6±1,0	Nav iespējams prognozēt	Nē	Nē
2,5-Dimetil-2,5-heksāndiols	110-03-2	Spirts	Ciets	2,3±0,2	0,2±0,1	Nav iespējams prognozēt	Nē	Nē
Nātrija oksalāts	62-76-0	Oksokarbonskābe	Ciets	29,0±1,2	5,3±4,1	Nav iespējams prognozēt	Nē	Nē
<i>In vivo 2A kategorija⁴</i>								
2,4,11,13-Tetraazatetradekāndiimidamīds, <i>N,N'</i> -bis(4-hlorfenil)-3,12-diimino-, di- <i>D</i> -glikonāts (20 %, ūdens) ⁶	18472-51-0	Aromātiskais heterocikliskais halogenīds; arilhalogenīds; dihidroksilgrupa; guanidīns	Šķidr	4,0±1,1	1,3±0,6	Nav iespējams prognozēt	Nē	Jā (vājš)
Nātrija benzoāts	532-32-1	Arils; karbonskābe	Ciets	3,5±2,6	0,6±0,1	Nav iespējams prognozēt	Nē	Nē
<i>In vivo 2B kategorija⁴</i>								
Dietiltoluamīds	134-62-3	Benzamīds	Šķidr	15,6±6,3	2,8±0,9	Nav iespējams prognozēt	Nē	Nē
2,2-Dimetil-3-metilēnbiciklo [2.2.1] heptāns	79-92-5	Alkāns, sazarots ar trešējo oglekli; alkēns; bicikloheptāns; karbocikli ar tilpiņu saturošu gredzenu; cikloalkāns	Ciets	4,7±1,5	15,8±1,1	Nav iespējams prognozēt	Nē	Nē

Kīmiskais nosaukums	CAS Nr.	Organiskā funkcionālā grupa ¹	Agregātvoklis	VRM1 dzīvotspēja (%) ²	VRM2 dzīvotspēja (%) ³	VRM prognoze	MTT reducētājs	Krāsas interf.
<i>In vivo</i> nekategorizētas⁴								
1-Etil-3-metilimidazolijs etilsulfāts	342573-75-5	Alkoksils; amonija sāls; arils; imidazols; sulfāts	Šķidr	79,9±6,4	79,4±6,2	Nekategor.	Nē	Nē
Dikapriliēteris	629-82-3	Alkoksils; ēteris	Šķidr	97,8±4,3	95,2±3,0	Nekategor.	Nē	Nē
Piperoniāls butoksīds	51-03-6	Alkoksils; benzdioksols; benzils; ēteris	Šķidr	104,2±4,2	96,5±3,5	Nekategor.	Nē	Nē
Polietilēnglikola (PEG-40) hidroģenēta rīcinēļa	61788-85-0	Acilāls; spirts; alils; ēteris	Viskozs	77,6±5,4	89,1±2,9	Nekategor.	Nē	Nē
1-(4-Hlorfenil)-3-(3,4-dihlorfenil)urīnviela	101-20-2	Aromātiskais heterocikliskais halogēnīds; arilhalogēnīds; urīnvielas atvasinājumi	Ciets	106,7±5,3	101,9±6,6	Nekategor.	Nē	Nē
2,2'-Metilēn-bis-(6-(2H-benzotriazol-2-il)-4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenols)	103597-45-1	Alkāns, sazarots ar četrāzvētoto oglekli; saplūduši karbocikliskā aromātviela; saplūduši piesātinātie heterocikli; prekursoru hinoīdu savienojumi; <i>terc</i> -butils	Ciets	102,7±13,4	97,7±5,6	Nekategor.	Nē	Nē
Kālija tetrafluorborāts	14075-53-7	Neorganiskā sāls	Ciets	88,6±3,3	92,9±5,1	Nekategor.	Nē	Nē

Saīsinājumi: CAS Nr. = *Chemical Abstracts Service* reģistra numurs; AMO GHS = Apvienoto Nāciju Organizācijas Kīmikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētā sistēma (1); VRM1 = validēta referenču metode, EpiOcular™ EIT; VRM2 = validēta referenču metode, SkinEthic™ HCE EIT; Krāsas interf. = krāsas interferenču ar MTT formazāna standartabsorbēcijas (optiskā blīvuma jeb OB) mērījumu.

¹ Organiskā funkcionālā grupa piešķirta atbilstoši ESAO instrumentu kopuma 3.1. versijas ielīgdotai analīzei (8).

² Pamatojoties uz rezultātiem, kas ar EpiOcular™ EIT iegūti EURL ECVAM / *Cosmetics Europe* acu kairinājuma validēšanas pētījumā (EIVS) (8).

³ Pamatojoties uz rezultātiem, kas ar SkinEthic™ HCE EIT iegūti validēšanas pētījumā (10)(11).

⁴ Pamatojoties uz trūša acu *in vivo* testa (TM B.5 / ESAO TG 405) (2)(14) rezultātiem un izmantojot ANO GHS sistēmu.

⁵ Pamatojoties uz rezultātiem, kas iegūti CEFIC konsorcijs *in vitro* acu kairinājuma testēšanas stratēģijas (CON4EI) pētījumā.

⁶ Klasificēšana 2A vai 2B kategorijā ir atkarīga no tā, kā interpretēt ANO GHS kritēriju, ar ko šīs divas kategorijas nošķir, t. i., lai kīmikāliju klasificētu 2A kategorijā, 7. dienā ietekmei jābūt novērojama 1 no 3 dzīvniekiem vai 2 no 3 dzīvniekiem. *In vivo* pētījums aptvēra 3 dzīvniekus. Visi beigupunkti, izņemot radzenes apduļķojumu vienam dzīvniekam, līdz 7. dienai vai agrāk atgriezās kaitējuma nulles līmenī. Dzīvniekam, kurš līdz 7. dienai nebija pilnībā atlabis, 7. dienā radzenes apduļķojuma rādītājs bija 1, taču ietekme pilnībā pazuda 9. dienā.

23. Ieteicams, lai kompetences testēšanas ietvaros lietotāji pēc audu saņemšanas verificētu šo audu barjerfunkcijas, kā precizējis *RhCE* audu konstrukcijas ražotājs (sk. 25., 27. un 30. punktu). Īpaši svarīgi tas ir tad, ja audi sūtīti no tālienes / sūtīšana aizņēmusi ilgu laiku. Kad tests ir sekmīgi ieviests un apgūts un tā izmantošanas prasme pierādīta, šādu verifikāciju vairs nav nepieciešams veikt katru reizi. Tomēr, ja testu izmanto parastajā praksē, barjerfunkciju novērtēšanu ieteicams turpināt regulāri.

PROCEDŪRA

24. Testi, uz kuriem pašlaik attiecas šī testēšanas metode, ir zinātniski derīgie EpiOcular™ *EIT* un SkinEthic™ *HCE EIT* (9)(12)(13), ko dēvē par validēto references metodi (attiecīgi *VRM1* un *VRM2*). *RhCE* testēšanas metodēm ir pieejamas standartprocedūras, kas jāizmanto, ieviešot un izmantojot testēšanas metodes laboratorijā (34)(35). Nākamajos punktos un 2. papildinājumā aprakstītas *RhCE* testu galvenās sastāvdaļas un procedūras.

RHCE TESTĒŠANAS METODES KOMPONENTI

Vispārīgi nosacījumi

25. Lai rekonstruētu radzenei līdzīga epitēlija trīsdimensiju audus, jāizmanto attiecīgas cilvēka šūnas, kam jā sastāv no pieaugoši stratificētām, bet ne pārragotām šūnām. *RhCE* audu konstrukciju gatavo insertos ar porainu sintētisku membrānu, caur kuru šūnām var piekļūt barības vielas. Rekonstruētajā radzenei līdzīgajā epitēlijā jābūt vairākiem dzīvotspējīgu, nekeratinizētu epitēlija šūnu slāņiem. *RhCE* audu konstrukcijas epitēlija virsmai jābūt tiešā saskarē ar gaisu, lai būtu iespējama tieša vietēja eksponēšana testējamajām ķīmikālīgām līdzīgi tam, kā *in vivo* tiktu eksponēts radzenes epitēlijs. *RhCE* audu konstrukcijai jāveido pietiekami spēcīga funkcionāla barjera, lai aizturētu citotoksisko etalonvielu, piem., *Triton X-100* vai nātrija dodecilsulfāta (SDS), ātru penetrāciju. Barjerfunkcija būtu uzskatāmi jāpierāda, un šo funkciju iespējams novērtēt, vai nu nosakot, kāds ekspozīcijas laiks vajadzīgs, lai pēc tam, kad konkrētā noteiktā koncentrācijā aplicēta etalonviela (piem., 100 µl 0,3% (tilp./tilp.) *Triton X-100*), par 50 % samazinātos audu dzīvotspēja (ET_{50}), vai nosakot, pie kādas koncentrācijas etalonviela pēc noteikta ekspozīcijas laika (piem., 30 minūšu ilgas apstrādes ar 50 µl SDS) par 50 % samazina audu dzīvotspēju (IC_{50}) (sk. 30. punktu). *RhCE* audu konstrukcijas aizturošajām īpašībām jānovērš testējamās ķīmikālijas nokļūšana pāri dzīvotspējīgo audu malai, jo tā dēļ var tikt nepareizi modelēta faktiskā iedarbība uz radzeni. *RhCE* audu konstrukcijas izveidē izmantotās cilvēka šūnas nedrīkst būt kontaminētas ar baktērijām, vīrusiem, mikoplazmu vai sēnītēm. Piegādātājam jāpārbauda audu konstrukcijas sterilitāte, lai pārliecinātos, ka nav kontaminācijas ar sēnītēm un baktērijām.

Funkcionāli nosacījumi

Dzīvotspēja

26. Audu dzīvotspējas kvantitatīvai noteikšanai izmanto MTT ķīmisko analīzi (16). *RhCE* audu konstrukcijas dzīvotspējīgās šūnas vitālo krāsvielu MTT reducē par zilas krāsas MTT formazāna nogulsni, ko pēc tam no audiem ekstrahē ar izopropanolu (vai līdzīgu šķīdinātāju). Ekstrahēto MTT formazānu var kvantitatīvi noteikt ar standarta absorbcijas (optiskā blīvuma jeb OB) mērījumu vai *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas procedūru (36). Tīra ekstrakcijas šķīdinātāja OB jābūt pietiekami zēmam, t. i., $OB < 0,1$. *RhCE* audu konstrukcijas lietotājiem jānodrošina, ka katra izmantotā *RhCE* audu konstrukcijas partija atbilst negatīvajai kontrolei definētajiem kritērijiem. Negatīvās kontroles OB vērtību pieņemamības diapazoni attiecīgajām *VRM* ir norādīti 2. tabulā. *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas lietotājam par negatīvās kontroles apstiprināšanas kritēriju jāizmanto 2. tabulā norādītie negatīvās kontroles OB diapazoni. Testēšanas pārskatā jābūt dokumentētam, ka ar negatīvās kontroles vielu apstrādātie audi kultūrā ir stabili (nodrošina līdzīgus audu dzīvotspējas mērījumus) visas testa ekspozīcijas laikā. Audu ražotājam audu partijas izlaides kvalitātes kontroles ietvaros jāveic līdzīga procedūra, taču šajā gadījumā var būt spēkā no 2. tabulā norādītajiem atšķirīgi apstiprināšanas kritēriji. *RhCE* audu konstrukcijas izstrādātājam/piegādātājam jānosaka negatīvās kontroles OB vērtību pieņemamības diapazons (augšējā un apakšējā robežvērtība) (*QC* testēšanas metodes apstākļos).

2. tabula. Testa lietotājiem paredzētie negatīvās kontroles optiskā blīvuma vērtību pieņemamības diapazoni

Tests	Apakšējā pieņemamības robežvērtība	Augšējā pieņemamības robežvērtība
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM1 (gan šķidru, gan cietu vielu protokoliem)	$> 0,8^1$	$< 2,5$
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM2 (gan šķidru, gan cietu vielu protokoliem)	$> 1,0$	$\leq 2,5$

¹ Šajā pieņemamības robežvērtībā ņemta vērā iespēja, ka nosūtīšana/glabāšana bijusi ilgstoša (piemēram, > 4 dienas), un pierādīts, ka tas nav ietekmējis testēšanas metodes veiktspēju (37).

Barjerfunkcija

27. *RhCE* audu konstrukcijai jābūt pietiekami biežai un noturīgai, lai aizturētu citotoksisku etalonvielu ātru penetrāciju, ko nosaka pēc ET_{50} (*Triton X-100*) vai pēc IC_{50} (*SDS*) (3. tabula). *RhCE* audu konstrukcijas izstrādātājam/pārdevējam, kad tas piegādā audus gala lietotājam, jāpierāda katras izmantojamās *RhCE* audu konstrukcijas partijas barjerfunkcija (sk. 30. punktu).

Morfoloģija

28. *RhCE* audu konstrukcijas histoloģiskā izmeklējumā jāpierāda līdzība cilvēka radzenes epitēlija struktūrai (jābūt vismaz 3 slāņiem dzīvotspējīgu epitēlija šūnu un nekeratinizētai virsmai). Attiecīgajām *VRM* izstrādātājs/piegādātājs ir izveidojis atbilstošu morfoloģiju, tāpēc testēšanas metodes lietotājam tā nav atkārtoti jāpierāda katrai izmantojamajai audu partijai.

Reproducējamība

29. Testēšanas metodes pozitīvās un negatīvās kontroles rezultātiem uzskatāmi jāparāda to reproducējamība laika gaitā.

Kvalitātes kontrole (QC)

30. *RhCE* audu konstrukciju drīkst izmantot tikai tad, ja izstrādātājs/piegādātājs pierāda, ka ikviena izmantojamās *RhCE* audu konstrukcijas partija atbilst definētajiem produkcijas izlaides kritērijiem, no kuriem svarīgākie ir dzīvotspēja (26. punkts) un barjerfunkcija (27. punkts). *RhCE* audu konstrukcijas izstrādātājam/piegādātājam jānosaka ar ET_{50} vai IC_{50} mērītas (sk. 25. un 26. punktu) barjerfunkcijas pieņemamības diapazons (augšējā un apakšējā robežvērtība). ET_{50} un IC_{50} pieņemamības diapazons, ko *RhCE* audu konstrukciju izstrādātājs/piegādātājs izmanto kā *QC* partijas izlaides kritēriju (izmanto *VRM*), ir norādīts 3. tabulā. *RhCE* audu konstrukcijas izstrādātājam/piegādātājam dati, kas pierāda atbilstību visiem produkcijas izlaides kritērijiem, jā dara pieejami testēšanas metodes lietotājiem, lai tie šo informāciju varētu iekļaut testēšanas pārskatā. Tikai ar visiem šiem produkcijas izlaides kritērijiem atbilstošiem audiem iegūti rezultāti. Ir pieņemami tādu ķīmikāliju ticamai prognozēšanai, kuras saskaņā ar ANO GHS / CLP nav jāklasificē un jāmarķē kā acu kairinājuma vai nopietnu acu bojājumu izraisītājas.

3. tabula. Partiju izlaides *QC* kritērijs

Tests	Apakšējā pieņemamības robežvērtība	Augšējā pieņemamības robežvērtība
EpiOcular™ <i>EIT</i> (OCL-200) – <i>VRM1</i> (100 µl 0,3% (tilpums/tilpums) Triton X-100)	$ET_{50} = 12,2$ min	$ET_{50} = 37,5$ min
SkinEthic™ <i>HCE EIT</i> (HCE/S) – <i>VRM2</i> (30 minūšu ilga apstrāde ar 50 µl SDS)	$IC_{50} = 1$ mg/ml	$IC_{50} = 3,2$ mg/ml

Testējamās ķīmikālijas un kontroles vielu aplicēšana

31. Katrai testējamai ķīmikālijai un katrai kontroles vielai katrā izpildes reizē vajadzīgi vismaz divi audu replikāti. Izmanto divus atšķirīgus apstrādes protokolus: vienu šķidrām testējamajām ķīmikālijām un vienu cietām testējamajām ķīmikālijām (34)(35). Atbilstoši abām metodēm un protokoliem pirms testējamo ķīmikāliju aplicēšanas audu konstrukcijas virsma jāsamitrina ar kalciju un magniju nesaturošu

Dulbeko fosfātu fizioloģisko buferšķīdumu ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ nesaturošs DPBS), lai atdarinātu cilvēka acs mitruma apstākļus. Audu apstrādi sāk, tos eksponējot testējamai ķīmikālijai (ķīmikālijām) un kontroles vielām. Atbilstoši abiem apstrādes protokoliem abās *VRM* testējamā ķīmikālija vai kontroles viela uz epitēlija virsmas vienmērīgā slānī jāaplicē pietiekamā daudzumā, taču izvairoties no pārmērīgas devas (sk 32. un 33. punktu) (2. papildinājums).

32. Testējamās ķīmikālijas, kas 37 °C vai zemākā temperatūrā ir pilināmas ar pipeti (ja nepieciešams, izmantojot pozitīvo maināmo uzgaļu virzulpipeti), saskaņā ar *VRM* uzskata par šķīdumiem, pārējos gadījumos tās uzskatāmas par cietām vielām (sk 33. punktu). Saskaņā ar *VRM* šķidrās testējamās ķīmikālijas vienmērīgi uzklāj audu virsmai (t. i., aplicē vismaz 60 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$) (sk. 2. papildinājumu, (33)(34)). Lai nodrošinātu audu pareizu devu, ciktāl iespējams, jāizvairās no kapilārās iedarbības (virsmas spraiguma efekta), kas var rasties insertam (uz audu virsmas) aplicētā nelielā tilpuma dēļ. Ar šķidrām testējamajām ķīmikālijām apstrādātos audus 30 minūtes inkubē standarta kultivēšanas apstākļos (37 $\pm$ 2 °C, 5 $\pm$ 1 % CO_2 , $\geq$ 95 % RM). Ekspozīcijas laika beigās šķidrā testējamā ķīmikālija un kontroles vielas no audu virsmas rūpīgi jānoņem, istabas temperatūrā intensīvi skalojot ar $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ nesaturošu DPBS. Nākamā darbība pēc skalošanas ir pēcekspozīcijas iegremdēšana svaigā istabas temperatūras barotnē (lai atbrīvotos no audos absorbējušās testējamās ķīmikālijas) uz iepriekš noteiktu laiku, kas atšķiras atkarībā no izmantotās *VRM*. Tikai saskaņā ar *VMRI* pēcekspozīcijas inkubēšanai svaigā barotnē standarta kultivēšanas apstākļos jānotiek pirms MTT ķīmiskās analīzes (sk. 2. papildinājumu, (34)(35)).
33. Testējamās ķīmikālijas, kas līdz 37 °C temperatūrā nav pilināmas ar pipeti, saskaņā ar *VRM* uzskata par cietām vielām. Aplicējamajam testējamās ķīmikālijas daudzumam jābūt pietiekamam, lai pilnībā nosegtu audu virsmu, t. i., jāaplicē vismaz 60 mg/cm^2 (2. papildinājums). Ja iespējams, cietas vielas jātestē smalka pulvera veidā. Ar cietām testējamajām ķīmikālijām apstrādātos audus iepriekš noteiktu laiku (atkarībā no izmantotās *VRM*) inkubē standarta kultivēšanas apstākļos (sk. 2. papildinājumu, (34)(35)). Ekspozīcijas laika beigās cietā testējamā ķīmikālija un kontroles vielas no audu virsmas rūpīgi jānoņem, istabas temperatūrā intensīvi skalojot ar $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ nesaturošu DPBS. Nākamā darbība pēc skalošanas un pirms MTT ķīmiskās analīzes ir pēcekspozīcijas iegremdēšana svaigā istabas temperatūras barotnē (lai atbrīvotos no audos absorbējušās testējamās ķīmikālijas) uz iepriekš noteiktu laiku, kas atšķiras atkarībā no izmantotās *VRM*, un pēcekspozīcijas inkubēšana svaigā barotnē standarta kultivēšanas apstākļos (sk. 2. papildinājumu, (34)(35)).
34. Katrā izpildes reizē jāiekļauj paralēlas negatīvās un pozitīvās kontroles, lai pierādītu, ka audu dzīvotspēja (kas noteikta ar negatīvo kontroli) un jutība (kas noteikta ar pozitīvo kontroli) atbilst pēc vēsturiskajiem datiem noteiktajiem pieņemamības diapazoniem. Paralēlā negatīvā kontrole arī nodrošina pamatdatus (100 % audu

dzīvotspēja), lai aprēķinātu ar testējamo ķīmikāliju apstrādāto audu relatīvo dzīvotspēju procentos ($\%Viability_{test}$). Ar *VRM* lietojamā ieteicamā pozitīvās kontroles viela ir neatšķaidīts metilacetāts (*CAS* Nr. 79-20-9, komerciāli pieejams, piem., no *Sigma-Aldrich*, kat. Nr. 45997; šķidrums). Ar *VRM1* un *VRM2* lietojamās ieteicamās negatīvās kontroles vielas ir attiecīgi ultratīrs H_2O un Ca^{2+}/Mg^{2+} nesaturošs DPBS. Šīs ir *VRM* validēšanas pētījumos izmantotās kontroles vielas, un par tām ir visvairāk vēsturisko datu. Piemērotu alternatīvu pozitīvās vai negatīvās kontroles vielu izmantošana zinātniski un pienācīgi jāpamato. Negatīvās un pozitīvās kontroles jātestē pēc tiem pašiem protokoliem, ko izmanto izpildes reizē iekļautajām testējamajām ķīmikālijām (t. i., šķidrumiem un/vai cietām vielām). Nākamā darbība pēc aplicēšanas un pirms MTT ķīmiskās analīzes attiecīgā gadījumā ir apstrādājamā parauga ekspozīcija, skalošana, pēcekspozīcijas iegremdēšana un pēcekspozīcijas inkubēšana, kā paredzēts kontrolēm, kuras izpilda paralēli šķidrām testējamajām ķīmikālijām (sk. 32. punktu), vai kontrolēm, kuras izpilda paralēli cietām testējamajām ķīmikālijām (sk. 33. punktu) (sk. 35. punktu) (34)(35). Ar vienu negatīvās un pozitīvās kontroles komplektu pietiek visām vienāda agregātvokļa (šķidrumiem vai cietām vielām) testējamajām ķīmikālijām vienā un tajā pašā izpildes reizē.

Audu dzīvotspējas mērījumi

35. Audu dzīvotspējas mērīšanai ar šo testēšanas metodi izmantojamā standartizētā kvantitatīvā metode (16) ir MTT ķīmiskā analīze. Tā ir audu trīsdimensiju konstrukcijai piemērota metode. MTT ķīmisko analīzi veic tūlīt pēc pēcekspozīcijas inkubēšanas perioda. Saskaņā ar *VRM RhCE* audu konstrukcijas paraugu uz 180 ± 15 minūtēm ievieto 0,3 ml MTT šķīduma koncentrācijā 1 mg/ml standarta kultivēšanas apstākļos. *RhCE* audu konstrukcijas dzīvotspējīgās šūnas vitālo krāsvielu MTT reducē par zilas krāsas MTT formazāna nogulsni. Pēc tam izgulsnēto zilās krāsas MTT formazāna produktu no audiem ekstrahē, piemērotā tilpumā izmantojot izopropanolu (vai līdzīgu šķīdinātāju) (34)(35). Ar šķidrām testējamajām ķīmikālijām testētie audi jāekstrahē gan no audu augšpusēs, gan apakšpusēs, bet ar cietām testējamajām ķīmikālijām un krāsainiem šķidrumiem testētos audus pietiek ekstrahēt no audu apakšpusēs (lai mazinātu izopropanola ekstrakcijas šķīduma iespējamo kontaminēšanu ar testējamo ķīmikāliju, kas varētu būt palikusi uz audiem). Arī ar šķidrām testējamajām ķīmiskajām vielām, kas nav viegli noskalojamas, testētos audus pietiek ekstrahēt tikai no audu apakšpusēs. Paralēli testētās negatīvās un pozitīvās kontroles vielas jāapstrādā līdzīgi testējamajai ķīmikālijai. Ekstrahēto MTT formazānu var kvantitatīvi noteikt ar standarta absorbcijas (OB) mērījumu pie viļņa garuma 570 nm, izmantojot frekvenču joslas filtru, kas nepārsniedz ± 30 nm, vai ar *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas procedūru (sk. 42. punktu) (11)(36).
36. Testējamās ķīmikālijas optiskās īpašības vai ķīmiskās reakcijas ar MTT var traucēt MTT formazāna noteikšanu, un tāpēc dzīvotspēja var būt noteikta nepareizi.

Testējamās ķimikālijas var ietekmēt MTT formazāna noteikšanu, MTT tieši reducējot par zilas krāsas MTT formazānu un/vai krāsas interferences dēļ, ja testējamā ķimikālija dabiski vai apstrādes procedūru rezultātā absorbējas tādā pašā OB diapazonā kā MTT formazāns (t. i., apmēram 570 nm). Pirms testēšanas jāveic priekšpārbaudes, lai varētu identificēt potenciālus tiešos MTT reducētājus un/vai krāsu interferējošas ķimikālijas, un šādu testējamo ķimikāliju radītās iespējamās interferences noteikšanai un korekcijām jāizmanto papildu kontroles (sk. 37.–41. punktu). Īpaši svarīgi tas ir tad, ja kādu konkrētu testējamo ķimikāliju pilnībā nenoskalo no *RhCE* audu konstrukcijas vai ja tā iespiežas radzenei līdzīgajā epitēlijā un tāpēc MTT ķīmiskās analīzes laikā atrodas *RhCE* audu konstrukcijās. Testējamām ķimikālijām, kas absorbē gaismu tādā pašā diapazonā kā MTT formazāns (dabiski vai pēc apstrādes) un kurām pārāk lielas interferences, t. i., lielas absorbcijas pie viļņa garuma 570 ± 30 nm, dēļ nav izmantojams MTT formazāna standarta absorbcijas (OB) mērījums, MTT formazāna noteikšanai var izmantot *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas procedūru (sk. 41. un 42. punktu) (11)(36). *VRM* standartprocedūrās ir pieejams plašs apraksts par to, kā noteikt un koriģēt tiešo MTT redukciju un krāsvielu interferenci (34)(35). III un IV papildinājumā sniegtas arī ilustratīvas diagrammas ar norādījumiem par to, kā identificēt tiešos MTT reducētājus un/vai krāsu interferējošas ķimikālijas un kā ar tām rīkoties attiecīgi *VRM1* un *VRM2* gadījumā.

37. Lai noteiktu iespējamo interferenci, ko rada testējamās ķimikālijas, kas absorbē gaismu tādā pašā diapazonā kā MTT formazāns (dabiski vai pēc apstrādes), un lemtu par papildu kontroli nepieciešamību, testējamo ķimikāliju pievieno ūdenim un/vai izopropanolam un attiecīgo laiku inkubē istabas temperatūrā (sk. 2. papildinājumu, (34)(35)). Ja ar *VRM1* testējamā ķimikālija ūdenī un/vai izopropanolā absorbē pietiekamu gaismu diapazonā 570 ± 20 nm (sk. 3. papildinājumu) vai ja ar *VRM2*, sajaucot testējamo ķimikāliju ar ūdeni, iegūst krāsainu šķīdumu (sk. 4. papildinājumu), pieņem, ka testējamā ķimikālija interferē ar MTT formazāna standarta absorbcijas (OB) mērīšanu, un tad jāizpilda papildu kontroles ar krāsvielu vai arī jāizmanto *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas procedūra; minētās kontroles šādā gadījumā nav vajadzīgas (sk. 41. un 42. punktu un III un IV papildinājumu) (34)(35). Mērot standartabsorbciju (OB), katru interferējošo testējamo ķimikāliju aplicē uz vismaz diviem dzīvotspējīgu audu replikātiem, ar kuriem veic visu testēšanas procedūru, taču, lai iegūtu *NSC_{living}* kontroli (nespecifiska krāsa dzīvos audos), MTT inkubācijas posmā tos inkubē barotnē, nevis MTT šķīdumā (34)(35). Ņemot vērā dzīvajiem audiem raksturīgo bioloģisko mainību, *NSC_{living}* kontrole jāveic paralēli iekrāsotās ķimikālijas testēšanai un vairākkārtējas testēšanas gadījumā katram veiktajam testam (katrā izpildes reizē) jāveic neatkarīga *NSC_{living}* kontrole. Faktisko audu dzīvotspēju tad aprēķina, no audu dzīvotspējas procentiem, kas iegūti ar interferējošajai testējamajai ķimikālijai eksponētiem un MTT šķīdumā inkubētiem

dzīviem audiem ($\%Viability_{test}$), atņemot nespecifiskas krāsas procentus, kas iegūti ar interferējošajai testējamajai ķimikālijai eksponētiem dzīviem audiem, kuri paralēli koriģējamajam testam inkubēti barotnē bez MTT ($\%NSC_{living}$). Tātad faktiskā audu dzīvotspēja = $[\%Viability_{test}] - [\%NSC_{living}]$.

38. Lai identificētu tiešos MTT reducētājus, katra testējamā ķimikālija jāpievieno svaigi pagatavotam MTT šķīdumam. MTT šķīdumam pievieno attiecīgu daudzumu testējamās ķimikālijas un maisījumu apmēram 3 stundas inkubē standarta kultivēšanas apstākļos (skatīt III un IV papildinājumu) (34)(35). Ja MTT maisījums, kas satur testējamo ķimikāliju (nešķīstošas testējamās ķimikālijas gadījumā, tās suspensiju), kļūst zils/violets, pieņem, ka testējamā ķimikālija tieši reducē MTT, un neatkarīgi no standarta absorbcijas (OB) mērījuma vai *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas procedūras izmantošanas dzīvotnespējīgu *RhCE* audu konstrukcijām jāveic papildu funkcionāla pārbaude. Šajā papildu funkcionālajā pārbaudē izmanto nonāvētus audus, kuriem piemīt vairs tikai atlikusī metaboliskā aktivitāte, taču kuri testējamo ķimikāliju absorbē un saglabā tāpat kā dzīvotspējīgie audi. *VRM1* nonāvētos audus sagatavo, tos eksponējot zema temperatūrai ("nonāvēti aukstumapstrādāti"). *VRM2* nedzīvos audus sagatavo, tos ilgstoši (piem., vismaz 24 stundas $\pm$ 1 stundu) inkubējot ūdenī un pēc tam glabājot zemā temperatūrā ("nonāvēti ūdensapstrādāti"). Katru MTT reducējošo testējamo ķimikāliju aplicē uz vismaz diviem nonāvētu audu replikātiem, ar kuriem veic visu testēšanas procedūru, lai iegūtu nespecifisku MTT redukcijas (*NSMTT*) kontroli (34)(35). Ar vienu *NSMTT* kontroli pietiek vienai testējamai ķimikālijai neatkarīgi no veikto neatkarīgo testu / izpildes reižu skaita. Audu faktisko dzīvotspēju tad aprēķina, no procentuālās audu dzīvotspējas, kas iegūta ar MTT reducētājam eksponētiem dzīviem audiem ($\%Viability_{test}$), atņemot procentuālo nespecifisko MTT redukciju, kas iegūta ar tam pašam MTT reducētājam eksponētiem nonāvētiem audiem un aprēķināta attiecībā pret negatīvo kontroli, kura izpildīta paralēli koriģējamam testam ($\%NSMTT$). Tātad faktiskā audu dzīvotspēja = $[\%Viability_{test}] - [\%NSMTT]$.
39. Testējamām ķimikālijām, kas identificētas kā krāsu interferējošas (sk. 37. punktu) un tiešu MTT redukciju izraisošas (sk. 38. punktu), standarta absorbcijas (OB) mērījumu veikšanai papildus iepriekšējos punktos aprakstītajām *NSMTT* un *NSC_{living}* kontrolēm būs nepieciešams arī trešais kontroļu komplekts. Parasti tā ir tumšas krāsas testējamajām ķimikālijām, kas gaismu absorbē 570 ± 30 nm diapazonā (piemēram, zilām, violetām, melnām), jo to sākotnējā krāsa traucē novērtēt to spēju tieši reducēt MTT, kā aprakstīts 38. punktā. Tāpēc pēc noklusējuma jālieto *NSMTT* kontroles kopā ar *NSC_{living}* kontrolēm. Testējamās ķimikālijas, kuras tiek pārbaudītas ar abām – *NSMTT* un *NSC_{living}* – kontrolēm, var absorbēt un saglabāt gan dzīvie, gan nonāvētie audi. Tāpēc šajā gadījumā *NSMTT* kontrole var koriģēt ne tikai testējamās ķimikālijas izraisīto iespējamo tiešo MTT redukciju, bet arī krāsas interferenci, kas rodas no tā,

ka testējamo ķīmikāliju absorbē un saglabā nonāvētie audi. Šādi kļūst iespējama dubulta krāsas interferences koriģēšana, jo NSC_{living} kontrole jau koriģē krāsas interferenci, kas rodas no tā, ka testējamo ķīmikāliju absorbē un saglabā dzīvie audi. Lai novērstu iespējamo dubulto krāsas interferences koriģēšanu, jāveic trešā kontrole attiecībā uz nespecifisku krāsu nedzīvus audos (NSC_{killed}) (sk. III un IV papildinājumu) (34)(35). Pārbaudē ar šo papildu kontroli testējamo ķīmikāliju izmanto vismaz diviem nonāvētu audu replikātiem, ar kuriem veic visu testēšanas procedūru, taču MTT inkubācijas posmā tos inkubē barotnē, nevis MTT šķīdumā. Ar vienu NSC_{killed} kontroli pietiek vienai testējamai ķīmikālijai neatkarīgi no veikto neatkarīgo testu / izpildes reižu skaita, taču tā jāizdara paralēli $NSMTT$ kontrolei un ar to pašu audu partiju. Audu faktisko dzīvotspēju tad aprēķina, no procentuālās audu dzīvotspējas, kas iegūta ar testējamajai ķīmikālijai eksponētiem dzīviem audiem ($\%Viability_{\text{test}}$), atņemot $\%NSMTT$ un atņemot $\%NSC_{\text{living}}$, un pieskaitot procentuālo nespecifisko krāsu, kas iegūta ar interferējošai testējamajai ķīmikālijai eksponētiem un barotnē bez MTT inkubētiem nonāvētajiem audiem un aprēķināta attiecībā pret negatīvo kontroli, kura izpildīta paralēli koriģējamam testam ($\%NSC_{\text{killed}}$). Tātad faktiskā audu dzīvotspēja = $[\%Viability_{\text{test}}] - [\%NSMTT] - [\%NSC_{\text{living}}] + [\%NSC_{\text{killed}}]$.

40. Svarīgi ievērot, ka (tad, kad veic standarta absorbcijas mērījumus) nespecifiskā MTT redukcija un nespecifiskā krāsas interference var palielināt audu ekstrakta OB virs spektrofotometra linearitātes diapazona un ka (tad, kad veic $HPLC/UPLC$ spektrofotometrijas mērījumus) nespecifiskā MTT redukcija var palielināt arī audu ekstrakta MTT formazāna smailes laukumu virs spektrofotometra linearitātes diapazona. Pamatojoties uz to, ir svarīgi, lai pirms normatīviem mērķiem veiktas ķīmikāliju testēšanas sākuma katra laboratorija noteiktu sava spektrofotometra OB/smailes laukuma linearitātes diapazonu, piem., ar MTT formazānu (CAS Nr. 57360-69-7), kas komerciāli pieejams, piem., no *Sigma-Aldrich* (kat. Nr. M2003).
41. Standarta absorbcijas (OB) noteikšana ar spektrofotometru ir piemērota tiešu MTT reducētāju un krāsu interferējošu testējamo ķīmikāliju novērtēšanai, ja novērotā interference MTT formazāna noteikšanā nav pārāk spēcīga (t. i., ar testējamo ķīmikāliju iegūtie audu ekstrakta OB, nekoriģējot tiešu MTT redukciju un/vai krāsas interferenci, atbilst spektrofotometra lineārajam diapazonam). Tomēr par testējamajām ķīmikālijām iegūtie rezultāti, kuriem negatīvās kontroles $\%NSMTT$ un/vai $\%NSC_{\text{living}}$ ir $\geq 60\%$ ($VRM1$ un $VRM2$ šķidrumu protokolam) vai 50% ($VRM2$ cietu vielu protokolam), būtu jāuztver piesardzīgi, jo tā ir robežvērtība, ko VRM izmanto, lai nošķirtu klasificējamās ķīmikālijas no neklasificējamām ķīmikālijām (sk. 44. punktu). Standarta absorbciju (OB) tomēr nevar noteikt, ja interference MTT formazāna noteikšanā ir pārāk liela (t. i., izraisa to, ka nekoriģētie testējamo audu ekstrakta OB ir ārpus spektrofotometra lineārā diapazona). Ja krāsainas testējamās ķīmikālijas vai testējamās ķīmikālijas, kam krāsa izveidojas saskarē ar ūdeni vai

izopropanolu, pārāk stipri interferē ar MTT formazāna standarta absorbcijas (OB) mērīšanu, tās tomēr var novērtēt ar *HPLC/UPLC* spektrofotometriju (sk. III un IV papildinājumu). Tas ir tāpēc, ka ar *HPLC/UPLC* sistēmu MTT formazānu no ķimikālijas var atdalīt pirms kvantitatīvās noteikšanas (36). Tāpēc neatkarīgi no testējamās ķimikālijas, ja tiek izmantota *HPLC/UPLC* spektrofotometrija, *NSC_{living}* vai *NSC_{killed}* kontroles nav jāveic. Ja ir aizdomas, ka testējamā ķimikālija tieši reducē MTT, *NSMTT* kontroles tomēr jāizmanto (atbilstoši 38. punktā aprakstītajai procedūrai). *NSMTT* kontroles jāizmanto arī testējamām ķimikālijām, kurām ir krāsa (jau sākotnēji vai parādās, kad viela ir ūdenī), kas traucē novērtēt to spēju tieši reducēt MTT, kā aprakstīts 38. punktā. MTT formazāna mērīšanai izmantojot *HPLC/UPLC* spektrofotometriju, kā MTT formazāna smailes laukuma, kas iegūts ar testējamajai ķimikālijai eksponētiem dzīvjiem audiem, procentuālo attiecību pret MTT formazāna smailes laukumu, kas iegūts ar paralēlo negatīvo kontroli, aprēķina audu procentuālo dzīvotspēju. Testējamām ķimikālijām, kas spēj tieši reducēt MTT, audu faktisko dzīvotspēju aprēķina, no $\%Viability_{test}$ atņemot $\%NSMTT$, kā aprakstīts 38. punkta pēdējā teikumā. Visbeidzot jāņem vērā, ka tādus tiešus MTT reducētājus vai tiešus MTT reducētājus, kas turklāt ir krāsu interferējoši, kuri pēc apstrādes saglabājas audos un reducē MTT tik spēcīgi, ka testējamo audu ekstraktu OB (noteikti ar standarta OB mērījumu) vai smaiļu laukumi (noteikti ar *UPLC/HPLC* spektrofotometriju) ir ārpus spektrofotometra lineārā diapazona, nav iespējams novērtēt ar *RhCE* testēšanas metodēm, lai gan tas sagaidāms tikai ļoti retās situācijās.

42. *HPLC/UPLC* spektrofotometriju MTT formazāna mērīšanai var izmantot ar visa veida testējamajām ķimikālijām (ar krāsu, bez krāsas, MTT reducētāji un MTT nereducētāji) (11) (36). *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas sistēmas ir dažādas, tāpēc katram lietotājam nav praktiski iespējams noteikt pilnīgi vienādus sistēmas darbības apstākļus. Tāpēc, pirms *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas sistēmu izmantot, lai kvantificētu no audu ekstraktiem iegūtu MTT formazānu, būtu jāpierāda minētās sistēmas kvalifikācijas atbilstība pieņemamības kritērijiem, kas noteikti kvalifikācijas standartparametru kopumam, kuru pamatā ir parametri, kas aprakstīti ASV Pārtikas un zāļu pārvaldes izstrādātājās nozares vadlīnijās par bioanalītisko metožu validēšanu (36)(38). Šie galvenie parametri un to pieņemamības kritēriji ir norādīti 5. papildinājumā. Kad 5. papildinājumā noteiktie pieņemamības kritēriji izpildīti, *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas sistēmu uzskata par kvalificētu un gatavu tam, lai noteiktu MTT formazāna daudzumu, ievērojot šīs testēšanas metodes aprakstā sniegtos eksperimentēšanas nosacījumus.

Pieņemamības kritēriji

43. Katrā testēšanas reizē, kad izmanto *RhCE* audu partijas, kas atbilst kvalitātes kontroles prasībām (sk. 30. punktu), ar negatīvās kontroles vielu apstrādāto audu OB jābūt tādām, kas atspoguļo to audu kvalitāti, kuriem ievērotas prasības sūtīšanas,

saņemšanas posmiem un visiem protokola procesiem, un to rezultāti nedrīkst būt ārpus 2. tabulā aprakstītajām vēsturiski noteiktajām robežām (sk. 26. punktu). Tāpat ar pozitīvās kontroles vielu, t. i., metilacetātu, apstrādāto audu vidējai dzīvotspējai jābūt $< 50 \%$ attiecībā pret negatīvo kontroli *VRM1* šķidrumu vai cietu vielu protokoliem un $\leq 30 \%$ (šķidrumu protokolam) vai $\leq 20 \%$ (cietu vielu protokolam) attiecībā pret negatīvo kontroli *VRM2*, tādējādi atspoguļojot audu spēju reaģēt uz kairinošu testējamo ķīmikāliju šīs testēšanas metodes apstākļos (34)(35). Testējamo ķīmikāliju un kontroles vielu audu replikātu mainībai jāatbilst pieņemtajām robežām (t. i., dzīvotspējas atšķirībai starp diviem audu replikātiem jābūt mazākai par 20% vai arī standartnovirze (SD) starp trim audu replikātiem nedrīkst pārsniegt 18%). Ja izpildes reizē iekļautā negatīvā kontrole vai pozitīvā kontrole neatbilst pieņemtajiem diapazoniem, izpildes reizi uzskata par “nekvalificētu”, un tā jāatkārto. Ja testējamās ķīmikālijas audu replikātu mainība neatbilst pieņemtajam diapazonam, tests jāuzskata par “nekvalificētu”, un testējamā ķīmikālija jātestē atkārtoti.

Rezultātu interpretēšana un prognostiskais modelis

44. Katras testējamās ķīmikālijas audu replikātu ekstraktiem iegūtās OB vērtības / smailes laukumi jāizmanto vidējās audu dzīvotspējas procentos (vidējā vērtība starp audu replikātiem) aprēķināšanai salīdzinājumā ar negatīvo kontroli, kas noteikta kā 100% . Audu procentuālās dzīvotspējas robežvērtības, pēc kurām nosaka, kuras testējamās ķīmikālijas nav jāklasificē kā tādas, kas izraisa acu kairinājumu vai nopietnus acu bojājumus (ANO GHS un *CLP* nekategorizētas ķīmikālijas), norādītas 4. tabulā. Tādējādi rezultāti jāinterpretē, kā aprakstīts tālāk tekstā.

- Testējamo ķīmikāliju nosaka par tādu, kas nav jāklasificē un jāmarķē saskaņā ar ANO GHS / *CLP* (nekategorizētas ķīmikālijas), ja audu vidējā procentuālā dzīvotspēja pēc ekspozīcijas un pēcekspozīcijas inkubēšanas perioda ir lielāka par ($>$) audu procentuālajai dzīvotspējai noteikto robežvērtību, kas norādīta 4. tabulā. Šādā gadījumā nav nepieciešama papildu testēšana ar citām testēšanas metodēm.
- Ja audu vidējā procentuālā dzīvotspēja pēc ekspozīcijas un pēcekspozīcijas inkubēšanas perioda ir mazāka par vai vienāda ar ($\leq$) audu procentuālajai dzīvotspējai noteikto robežvērtību, prognozēšana nav iespējama (norādīts 4. tabulā). Šādā gadījumā būs nepieciešama papildu testēšana ar citām testēšanas metodēm, jo *RhCE* testēšanas metodes uzrāda zināmu skaitu pseidopozitīvu rezultātu (sk. 14.–15. punktu), un nav iespējams izšķirties starp ANO GHS un *CLP* 1. un 2. kategoriju (sk. 17. punktu).

4. tabula. Prognostiskie modeļi sakaņā ar ANO GHS / *CLP* klasifikāciju

<i>VRM</i>	Nekategorizēta	Nav iespējams prognozēt

<i>VRM1</i> — EpiOcular™ <i>EIT</i> (abiem protokolam)	Audu vidējā dzīvotspēja > 60 %	Audu vidējā dzīvotspēja ≤ 60 %
<i>VRM2</i> — SkinEthic™ <i>HCE EIT</i> (šķidrumu protokolam)	Audu vidējā dzīvotspēja > 60 %	Audu vidējā dzīvotspēja ≤ 60 %
<i>VRM2</i> — SkinEthic™ <i>HCE EIT</i> (cietvielu protokolam)	Audu vidējā dzīvotspēja > 50 %	Audu vidējā dzīvotspēja ≤ 50 %

45. Vienam testam ar vismaz diviem audu replikātiem jābūt pietiekamam gadījumos, kad testējamās ķīmikālijas uzrādītais rezultāts ir nepārprotams. Tomēr, kad rezultāti ir neskaidri, piem., nesakritīgi mērījumu rezultāti atkārtojumos un/vai vidējā audu dzīvotspēja procentos ir $60 \pm 5 \%$ (*VRM1*, kā arī *VRM2* šķidrumu protokolam) vai $50 \pm 5 \%$ (*VRM2* cietvielu protokolam), jāapsver vajadzība pēc otrā vai pat pēc trešā testa, ja nesakrīt pirmo divu testu rezultāti.
46. Īpašu veidu maisījumiem, ja tas ir piemēroti un pamatoti, var apsvērt atšķirīgas audu dzīvotspējas procentos robežvērtības, pēc kā klasificējamās ķīmikālijas nošķir no neklasificējamām ķīmikālijām, lai palielinātu testēšanas metodes vispārējo veiktspēju šādu veidu maisījumiem (sk. 14. punktu). Etalonķīmikālijas var noderēt, lai novērtētu nezināmu testējamo ķīmikāliju vai produktu klases spēju izraisīt nopietnus acu bojājumus / acu kairinājumu vai novērtētu klasificētas ķīmikālijas relatīvo spēju izraisīt acu toksicitāti konkrētā pozitīvu atbildreakciju diapazonā.

DATI UN PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

Dati

47. Datus par atsevišķiem audu replikātiem katrā izpildes reizē, arī par atkārtotiem testiem, ja tos veic, (piem., OB vērtības / MTT formazāna smailes laukumus un aprēķinātās audu procentuālās dzīvotspējas datus par testējamo ķīmikāliju un kontrolēm, kā arī galīgo *RhCE* testēšanas metodes prognozi) tabulas veidā apkopo par katru testējamo ķīmikāliju. Pārskatā jāiekļauj arī vidējā audu dzīvotspēja procentos un dzīvotspējas atšķirība starp diviem audu replikātiem (ja $n = 2$ audu replikāti) vai SN (ja $n \geq 3$ audu replikāti) par katru atsevišķu testējamo ķīmikāliju un kontroli. Pārskatā jāiekļauj visas katrai testējamai ķīmikālijai novērotās interferences MTT formazāna mērīšanā, kuras izpaužas kā tieša MTT redukcija un/vai krāsas interference.

Testēšanas pārskats

48. Testēšanas pārskatā norāda šādu informāciju.

Testējamā ķīmikālija

Vienkomponenta viela

- Ķīmiskā identifikācija, piem., *IUPAC* vai *CAS* nosaukums(-i), *CAS* numurs(-i), *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula un/vai citi identifikācijas dati.
- Agregātstāvoklis, gaistamība, pH, LogP, molekulmasa, ķīmisko vielu klase un papildu attiecīgās fizikāli ķīmiskās īpašības saistībā ar pētījuma veikšanu, ciktāl šī informācija ir pieejama.
- Tīrība, piemaisījumu ķīmiskā identitāte (attiecīgā gadījumā un ja šī informācija ir pieejama) utt.
- Apstrāde pirms testēšanas, ja tāda veikta (piem., sildīšana, smalcināšana).
- Glabāšanas apstākļi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama.

Daudzkomponentu viela, *UVCB* un maisījumi

- Iespējami izsmelošs raksturojums ar, piem., sastāvdaļu ķīmisko identitāti (sk. iepriekš), tīrību, kvantitatīvo saturu un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām.
- Agregātstāvoklis un papildu attiecīgās fizikāli ķīmiskās īpašības saistībā ar pētījuma veikšanu, ciktāl šī informācija ir pieejama.
- Tīrība, piemaisījumu ķīmiskā identitāte (attiecīgā gadījumā, ja šī informācija ir pieejama) utt.
- Pirmtestēšanas apstrāde, ja tāda veikta (piem., sildīšana, smalcināšana).
- Glabāšanas apstākļi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama.

Pozitīvās un negatīvās kontroles vielas

- Ķīmiskā identifikācija, piem., *IUPAC* vai *CAS* nosaukums(-i), *CAS* numurs(-i), *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula un/vai citi identifikācijas dati.
- Agregātstāvoklis, gaistamība, molekulmasa, ķīmisko vielu klase un papildu attiecīgās fizikāli ķīmiskās īpašības saistībā ar pētījuma veikšanu, ciktāl šī informācija ir pieejama.
- Tīrība, piemaisījumu ķīmiskā identitāte (attiecīgā gadījumā, ja šī informācija ir pieejama) utt.
- Pirmtestēšanas apstrāde, ja tāda veikta (piem., sildīšana, smalcināšana).
- Glabāšanas apstākļi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama.
- Pamatojums citas tādas negatīvās kontroles izmantošanai, kas nav ultratīrs H₂O vai Ca₂₊/Mg₂₊ nesaturošs DPBS, ja tāda izmantota.
- Pamatojums citas tādas pozitīvās kontroles izmantošanai, kas nav neatšķaidīts metilacetāts, ja tāda izmantota.

- Norāde uz vēsturiskajiem pozitīvo un negatīvo kontroļu rezultātiem, kas apliecina atbilstību testa izpildes pieņemamības kritērijiem.

Informācija par sponsoru un testējošo iestādi

- Sponsora, testējošās iestādes, pētījuma vadītāja vārds/nosaukums un adrese.

RhCE audu konstrukcija un izmantotais protokols (attiecīgā gadījumā ar izvēles pamatojumu)

Testēšanas metodes apstākļi

- Izmantotā *RhCE* audu konstrukcija, arī partijas numurs.
- MTT formazāna noteikšanai izmantotais viļņa garums un frekvenču josla (attiecīgā gadījumā), kā arī mērierīces (piem., spektrofotometra) linearitātes diapazons.
- MTT formazāna noteikšanai izmantotās metodes apraksts.
- Izmantotās *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas sistēmas apraksts (attiecīgā gadījumā).
- Pilnīga papildinformācija par konkrēto izmantoto *RhCE* audu konstrukciju, arī tās veikspējas raksturlielumi. No tiem jānorāda vismaz:
 - i) dzīvotspējas kvalitātes kontrole (piegādātājs);
 - ii) dzīvotspēja testēšanas metodes apstākļos (lietotājs);
 - iii) barjerfunkcijas kvalitātes kontrole;
 - iv) morfoloģija, ja ir pieejama informācija;
 - v) reproducējamība un prognozētspēja;
 - vi) *RhCE* audu konstrukcijas citas kvalitātes kontroles (*QC*), ja ir pieejama informācija.
- Norāde uz *RhCE* audu konstrukcijas vēsturiskajiem datiem. No tiem jānorāda vismaz: *QC* datu pieņemamība saskaņā ar vēsturiskajiem datiem par partiju kontroles rezultātiem.
- Paziņojums, ka pirms regulāras izmantošanas testējošā iestāde ir pierādījusi kompetenci testēšanas metodes izmantošanā, testējot standartķīmikālijas.

Izpildes reizes un testa pieņemamības kritēriji

- Pozitīvās un negatīvās kontroles vidējās vērtības un pieņemamības diapazoni, kas balstīti uz vēsturiskajiem datiem.
- Pieņemamā mainība pozitīvām un negatīvām kontrolēm izmantojamiem audu replikātiem.
- Pieņemamā mainība testējamai ķīmikālijai izmantojamiem audu replikātiem.

Testa procedūra

- Informācija par izmantoto testēšanas procedūru.

- Izmantotās testējamās ķīmikālijas un kontroles vielu devas.
- Ekspozīcijas, pēcekspozīcijas iegremdēšanas un pēcekspozīcijas inkubēšanas periodu ilgums un temperatūra (attiecīgā gadījumā).
- Testa procedūras modifikāciju apraksts, ja tādas bijušas.
- Kontroles, kas izmantotas tiešajiem MTT reducētājiem un/vai testējamajām ķīmikālijām, kurām ir krāsa (attiecīgā gadījumā).
- Katrai testējamai ķīmikālijai un kontrolēm (pozitīvā kontrole, negatīvā kontrole, *NSMTT*, *NSC_{living}* un *NSC_{killed}*, ja tādas izmantotas) izmantoto audu replikātu skaits.

Rezultāti

- Datu apkopojums tabulā par atsevišķām testējamajām ķīmikālijām un kontroles vielām par katru izpildes reizi (arī par atkārtotiem eksperimentiem, ja tādi veikti) un par katru replikāta mērījumu, arī OB vērtība vai MTT formazāna smailes laukums, audu dzīvotspēja procentos, vidējā audu dzīvotspēja procentos, atšķirība starp audu replikātiem vai SN un galīgā prognoze.
- Attiecīgā gadījumā tiešiem MTT reducētājiem un/vai krāsainām testējamajām ķīmikālijām izmantoto kontroļu rezultāti, arī OB vērtība vai MTT formazāna smailes laukums, %*NSMTT*, %*NSC_{living}*, %*NSC_{killed}*, atšķirība starp audu replikātiem vai SN, galīgā pareizā audu dzīvotspēja procentos un galīgā prognoze.
- Rezultāti, kas iegūti ar testējamo ķīmikāliju (ķīmikālijām) un kontrolķīmikālijām, salīdzinājumā ar noteiktajiem izpildes reizes un testa pieņemamības kritērijiem.
- Citas novērotās ietekmes, piem., krāsainas testējamās ķīmikālijas izraisītas audu iekrāsošanās, apraksts.

Rezultātu iztirzājums

Secinājumi

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. Available at: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.
- (2) Šā pielikuma B.5. nodaļa "Akūts acu kairinājums/korozija".
- (3) Šā pielikuma B.47. nodaļa "Liellopu radzenes apduļķošanās un caurlaidības testēšanas metode, kurā identificē i) nopietnu acu bojājumu inducētās ķīmikālijas un ii) ķīmikālijas, kuras nav jāklasificē kā tādas, kas izraisa acu kairinājumu vai nopietnus acu bojājumus".
- (4) Šā pielikuma B.48. nodaļa "Izolētas vistas acs testēšanas metode, kurā identificē i) nopietnu acu bojājumu inducētās ķīmikālijas un ii) ķīmikālijas, kuras nav jāklasificē".
- (5) Šā pielikuma B.61. nodaļa "Fluoresceīna caurplūdes testēšanas metode acu korozijas vai nopietna kairinājuma izraisītāju identificēšanai".
- (6) Šā pielikuma B.68. nodaļa "Īsa ekspozīcijas laika *in vitro* testēšanas metode, ar kuru identificēt i) ķīmikālijas, kas izraisa nopietnus acu bojājumus, un ii) ķīmikālijas, kuras nav jāklasificē kā acu kairinājuma vai nopietnu acu bojājumu izraisītājas".
- (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. Available at: <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. Available at: <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. Available at: <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. Available at:

[<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. Available at: <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. Available at: <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. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Pareizība: pakāpe, kādā ar testēšanas metodi iegūto mērījumu rezultāti sakrīt ar pieņemtajām atsaucēs vērtībām. Tas ir testēšanas metodes veikspējas mērs un viens no relevantuma aspektiem. Šo terminu bieži izmanto ar nozīmi “konkordantums”, ar to domājot testēšanas metodes pareizo rezultātu īpatsvaru (18).

Etalonķimikālija: ķimikālija, ko izmanto par standartu salīdzināšanā ar testējamo ķimikāliju. Etalonķimikālijai jāpiemīt šādām īpašībām: i) konsekvents un uzticams avots vai avoti tās identificēšanas un raksturošanas vajadzībām; ii) strukturāla, funkcionāla un/vai ķīmiska un produktklases līdzība ar testējamo ķimikāliju; iii) labi zināmas fizikālķīmiskās īpašības; iv) papildu dati par zināmajiem iedarbības veidiem; v) vielas zināmais iedarbības stiprums atbilst vēlamās atbildreakcijas diapazonam.

Augšupēja pieeja: pakāpeniska pieeja, ko izmanto testējamai ķimikālijai, par kuru ir aizdomas, ka tā nav jāklasificē vai jāmarķē kā acu kairinājuma vai nopietnu acu bojājumu izraisītāja, un kas sākas ar to ķimikāliju nošķiršanu, kuras nav jāklasificē vai jāmarķē (negatīvs iznākums), no citām ķimikālijām (pozitīvs iznākums).

Ķimikālija: viela vai maisījums.

Konkordantums: sk. “Pareizības” definīciju.

Radzene: acābola priekšējā caurspīdīgā daļa, kas pārklāj varavīksneni un zīlīti un ielaiž acī gaismu.

VK: variācijas koeficients.

Nov.: novirze.

EIT: acu kairinājuma tests.

EURL-ECVAM: Eiropas Savienības References laboratorija dzīvniektestēšanas alternatīvu jomā.

Acu kairinājums: izmaiņas acī, kas rodas pēc testējamās ķimikālijas aplicēšanas uz acs priekšējās virsmas un kas 21 dienas laikā pēc aplicēšanas ir pilnīgi atgriezeniskas. Nozīmē to pašu, ko “atgriezeniska ietekme uz acīm” un ANO GHS / CLP 2. kategorija.

ET50: ekspozīcijas laiks, kas pēc noteiktas koncentrācijas etalonķimikālijas aplicēšanas nepieciešams audu dzīvotspējas samazināšanai par 50 %.

Pseidonegatīvu īpatsvars: visu to vielu daļu, kurām ir attiecīgā veida iedarbība, bet kuras ar konkrēto testēšanas metodi tiek kļūdaini identificētas par vielām bez attiecīgā veida iedarbības. Tas ir viens no testēšanas metodes veikspējas raksturlielumiem.

Pseudopozitīvu īpatsvars: visu to vielu daļa, kurām nav attiecīgā veida iedarbības, bet kuras ar konkrēto testēšanas metodi tiek kļūdaini identificētas par vielām ar attiecīgā veida iedarbību. Tas ir viens no testēšanas metodes veikspējas raksturlielumiem.

Bīstamība: tāda aģenta vai situācijas iedabiska īpašība, kam piemīt potenciāls atstāt nelabvēlīgu ietekmi uz šim aģentam eksponētu organismu, sistēmu vai (sub)populāciju.

HCE: SkinEthic™ cilvēka radzenes epitēlijs.

HPLC: augstefektīva šķidrumhromatogrāfija.

IC₅₀: koncentrācija, kādā etalonķimikālija pēc noteikta ekspozīcijas laika (piem., 30 minūšu apstrādes ar SDS) audu dzīvotspēju samazina par 50 %.

Pārmērīga deva: uz *RhCE* audu konstrukcijas aplicētās testējamās ķimikālijas daudzums, kas ir lielāks par epitēlija virsmas pilnīgai un vienmērīgai pārklāšanai nepieciešamo daudzumu.

Neatgriezeniska ietekme uz acīm: sk. “Nopietnu acu bojājumu” definīciju.

LLOQ: kvantitatīvās noteikšanas apakšējā robeža.

LogP: oktanola-ūdens sadalījuma koeficienta logaritms.

Maisījums: maisījums vai šķīdums, kas sastāv no divām vai vairāk vielām.

Vienkomponenta viela: viela, definēta ar tās kvantitatīvo sastāvu, kurā viena galvenā sastāvdaļa veido vismaz 80 % (masa/masa).

Daudzkomponentu viela: viela, definēta ar tās kvantitatīvo sastāvu, kurā vairāk nekā viena no galvenajām sastāvdaļām ir koncentrācijā ≥ 10 % (masa/masa) un < 80 % (masa/masa). Daudzkomponentu viela tiek iegūta ražošanas procesā. Atšķirība starp maisījumu un daudzkomponentu vielu ir tāda, ka maisījumu iegūst, divas vai vairākas vielas sajaucot bez ķīmiskas reakcijas. Daudzkomponentu viela rodas ķīmiskā reakcijā.

MTT: 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijs bromīds; tiazolilzilais tetrazolijs bromīds.

Negatīvā kontrole: paraugs, kurā ir visi testa sistēmas komponenti un kurš apstrādāts ar vielu, par ko ir zināms, ka konkrētajā testa sistēmā tā neinducē pozitīvu atbildreakciju. Ar šo paraugu izdara tādas pašas manipulācijas kā ar paraugiem, kas apstrādāti ar testējamo ķimikāliju, un citiem kontrolparaugiem, un to izmanto, lai noteiktu 100 % audu dzīvotspēju.

Neklasificētas ķimikālijas: ķimikālijas, kuras nav klasificētas kā acu kairinājuma (ANO GHS / CLP 2. kategorija, ANO GHS 2A vai 2B kategorija) vai nopietnu acu bojājumu (ANO GHS / CLP 1. kategorija) izraisītājas. Nozīmē to pašu, ko “ANO GHS / CLP nekategorizētas ķimikālijas”.

NSC_{killed}: nespecifiska krāsa nedzīvos audos.

NSC_{living}: nespecifiska krāsa dzīvos audos.

NSMTT: nespecifiskā MTT redukcija.

OB: optiskais blīvums.

Veiktspējas standarti: uz validētu testēšanas metodi (tādu, kura tiek uzskatīta par zinātniski validētu) bāzēti standarti, pēc kuriem izvērtē pēc noteikšanas mehānisma vai funkcionalitātes ziņā līdzīgu testēšanas metožu salīdzināmību. Šeit iekļauti: (i) nepieciešamie testēšanas metodes komponenti; (ii) minimāls tādu references ķīmikāliju saraksts, kuras izraudzītas no citām ķīmikālijām, ko izmanto, lai pierādītu pieņemamu validētās testēšanas metodes veiktspēju; (iii) uz attiecīgajā validētajā testēšanas metodē iegūto rezultātu pamata — salīdzināmi pareizības un ticamības līmeņi, kā būtu jāiegūst ar ierosināto testēšanas metodi, to izvērtējot ar references ķīmikālijām no minimālā saraksta (18).

Pozitīvā kontrole: paraugs, kurā ir visi testa sistēmas komponenti un kurš apstrādāts ar vielu, par ko ir zināms, ka konkrētajā testa sistēmā tā inducē pozitīvu atbildreakciju. Ar šo paraugu izdara tādas pašas manipulācijas kā ar paraugiem, kas apstrādāti ar testējamo ķīmikāliju, un citiem kontrolparaugiem. Lai būtu iespēja novērtēt pozitīvās kontroles atbildreakcijas mainību laikā, pozitīvās atbildreakcijas intensitāte nedrīkstētu būt pārlieku liela.

Relevantums: parametrs, kas raksturo testa attiecināmību uz interesējošo ietekmi un to, vai testu lietot konkrētam nolūkam ir jēgpilni un noderīgi. Tā ir pakāpe, kādā ar testu var pareizi izmērīt vai prognozēt interesējošo bioloģisko ietekmi. Relevantums ietver arī testēšanas metodes pareizības (konkordantuma) aspektu (18).

Ticamība: pakāpe, kādā vienā un tajā pašā laboratorijā vai dažādās laboratorijās pēc viena un tā paša protokola var ilgāku laiku reproducējami izmantot konkrētu testēšanas metodi. To novērtē, aprēķinot metodes intralaboratorisko un interlaboratorisko reproducējamību un intralaboratorisko atkārtojamību (18).

Aizstājējtests: ikdienā lietota testa aizstāšanai paredzēts tests, kuru pieņemts izmantot bīstamības identificēšanai un/vai riska novērtēšanai, ar pierādītu spēju ekvivalentā vai labākā veidā, salīdzinot ar pieņemto testu, nodrošināt (pēc vajadzības) cilvēka un dzīvnieku veselības vai vides aizsardzību visās iespējamās testēšanas situācijās un ar visām iespējamām ķīmikālijām (18).

Reproducējamība: tādu rezultātu savstarpējā atbilstība, kas iegūti, ar vienu un to pašu testa protokolu testējot vienu to pašu ķīmikāliju (sk. "Ticamības" definīciju) (18).

Atgriezeniska ietekme uz acīm: sk. "Acu kairinājuma" definīciju.

RhCE: rekonstruēts cilvēka radzenei līdzīgs epitēlijs.

Izpildes reize: reize, kurā vienu vai vairākas ķīmikālijas testē paralēli negatīvai kontrolei un pozitīvai kontrolei.

SD: standartnovirze.

Jutība: tā visu pozitīvo/aktīvo testējamo ķīmikāliju daļa, kas ar testu tiek pareizi klasificētas. Tas ir pareizības mērs testēšanas metodei, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testēšanas metodes relevantuma izvērtēšanā (18).

Nopietni acu bojājumi: acs audu bojājumi vai nopietna fiziska redzes pasliktināšanās, kas rodas pēc testējamās vielas aplicēšanas uz acs priekšējās virsmas un kas 21 dienas laikā pēc aplicēšanas nav pilnībā atgriezeniska. Nozīmē to pašu, ko “neatgriezeniska ietekme uz acīm” un ANO GHS / CLP 1. kategorija.

Darbības standartprocedūras (SOP): oficiālas, rakstiskas procedūras, kas detalizēti apraksta, kā veicamas konkrētas rutīnas un konkrētam testam specifiskas laboratorijas darbības. Tās ir nepieciešamas saskaņā ar labu laboratorijas praksi (GLP).

Specifiskums: tas, cik liela daļa no visām negatīvajām/neaktīvajām testējamajām ķīmikālijām ar testu tiek klasificētas pareizi. Tādas testēšanas metodes pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testēšanas metodes relevantuma izvērtēšanā (18).

Viela: ķīmiskais elements un tā dabiski radušies vai ražošanas procesā iegūti savienojumi, ieskaitot to stabilizācijai nepieciešamās piedevas, kā arī izmantotajos procesos radušos piejaukumus, bet izņemot šķīdinātājus, kurus var atdalīt, neietekmējot vielas stabilitāti un nemainot tās sastāvu.

Tests: atsevišķas testējamās ķīmikālijas paralēla testēšana ar vismaz diviem audu replikātiem, kā noteikts attiecīgajā SOP.

Audu dzīvotspēja: parametrs, ar ko šūnu populācijas kopējo aktivitāti rekonstruētos audos mēra kā to spēju reducēt vitālo krāsvielu MTT, kas atkarībā no nosakāmā beigupunkta un izmantotās testēšanas shēmas korelē ar dzīvo šūnu kopskaitu un/vai dzīvotspēju.

Lejupēja pieeja: pakāpeniska pieeja, ko izmanto ķīmikālijai, par kuru ir aizdomas, ka tā izraisa nopietnus acu bojājumus, un kas sākas ar to ķīmikāliju nošķiršanu, kuras inducē nopietnus acu bojājumus (pozitīvs rezultāts), no citām ķīmikālijām (negatīvs rezultāts).

Testējamā ķīmikālija: viela vai maisījums, kuru testē ar šo testēšanas metodi.

Secīgas testēšanas stratēģija: pakāpeniskas testēšanas stratēģija, kurā testēšanas metodes pielieto noteiktā secībā. Izmantojot pierādījumu izsvēršanu, visu esošo informāciju par testējamo ķīmikāliju pārskata, lai pirms pārejas uz nākamo stratēģijas pakāpi noteiktu, vai pieejamās informācijas apjoms ir pietiekams, lai pieņemtu lēmumu par bīstamības klasifikāciju. Ja testējamās ķīmikālijas bīstamības potenciālu/potenci var noteikt, pamatojoties uz konkrētajā pakāpē pieejamo informāciju, papildu testēšana nav jāveic (18).

ULOQ: kvantitatīvās noteikšanas augšējā robeža.

Apvienoto Nāciju Organizācijas Ķīmikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli

harmonizētā sistēma (ANO GHS): sistēma, kurā ķīmikālijas (vielas un maisījumus) klasificē pēc standartizētiem fizisko apdraudējumu, veselības apdraudējumu un vides apdraudējumu tipiem un līmeņiem un izmanto tādas attiecīgus komunikācijas elementus kā piktogrammas, signālvārdi, bīstamības apzīmējumi, drošības prasību apzīmējumi un drošības datu lapas, lai sniegtu informāciju par ķīmikāliju nelabvēlīgo ietekmi un tādējādi aizsargātu cilvēkus (arī darba devējus un darba ņēmējus, transporta darbiniekus, patērētājus un avārijas dienestu darbiniekus) un vidi (1).

ANO GHS un CLP 1. kategorija: sk. “Nopietnu acu bojājumu” definīciju.

ANO GHS un CLP 2. kategorija: sk. “Acu kairinājuma” definīciju.

ANO GHS un CLP neklasificētas ķīmikālijas: Ķīmikālijas, kas neatbilst prasībām klasificēšanai ANO GHS / CLP 1. vai 2. kategorijā (vai ANO GHS 2A vai 2B kategorijā). Nozīmē to pašu, ko “neklasificētas ķīmikālijas”.

UPLC: īpaši augstefektīva šķidrumhromatogrāfija.

UVCB: vielas, kuru sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kompleksi reakcijas produkti vai bioloģiski materiāli.

Derīga testēšanas metode: testēšanas metode, kas tiek uzskatīta par pietiekami relevantu un ticamu konkrētam nolūkam un kas ir balstīta uz zinātniskiem principiem. Testēšanas metode nekad nav derīga absolūtā izteiksmē; tā vienmēr ir derīga tikai kādam konkrētam nolūkam (18).

Validēta testēšanas metode: testēšanas metode, kuras relevantums (ieskaitot pareizību) un ticamība attiecībā uz lietošanu konkrētā nolūkā ir pārbaudīta validācijas pētījumos. Jāievēro, ka validētas testēšanas metodes veikspēja pareizības un ticamības ziņā var nebūt pietiekama, lai to izmantotu paredzētajam nolūkam (18).

VRM: validēta references metode.

VRM1: EpiOcular™ EIT dēvē par 1. validēto references metodi.

VRM2: SkinEthic™ HCE EIT dēvē par 2. validēto references metodi.

Pierādījumu izsvēršana: process, kurā izsver dažādu informācijas elementu stiprās un vājās puses, cenšoties izdarīt un pamatot secinājumu par testējamās vielas bīstamības potenciālu.

2. papildinājums

ĶĪMIKĀLIJU, KURAS NAV JĀKLASIFICĒ UN JĀMARĶĒ KĀ TĀDAS, KAS IZRAISA ACU KAIRINĀJUMU VAI NOPIETNUS ACU BOJĀJUMUS, IDENTIFICĒŠANAI VALIDĒTO *RhCE* TESTU GALVENĀS SASTĀVDAĻAS

Testa sastāvdaļas	EpiOcular™ <i>EIT</i> (<i>VRM1</i>)		SkinEthic™ <i>HCE EIT</i> (<i>VRM2</i>)	
Protokoli	Šķidrumi (pilināmi ar pipeti 37 ± 1 °C vai zemākā temperatūrā 15 min)	Cietas vielas (nav pilināmas ar pipeti)	Šķidrumi un viskozas vielas (pilināmi ar pipeti)	Cietas vielas (nav pilināmas ar pipeti)
Modeļa virsma	0,6 cm ²	0,6 cm ²	0,5 cm ²	0,5 cm ²
Audu replikātu skaits	Vismaz 2	Vismaz 2	Vismaz 2	Vismaz 2
Priekšpārbaude attiecībā uz krāsas interferenci	50 µl + 1 ml H₂O 60 min 37 ± 2 °C temperatūrā, 5 ± 1 % CO₂, ≥ 95 % RM (bezkrāsainas testējamās ķīmikālijas), vai 50 µl + 2 ml izopropanola, maisa 2–3 h RT (krāsainas testējamās ķīmikālijas) → ja testējamās ķīmikālijas OB pie 570±20 nm pēc izopropanola vai ūdens OB atņemšanas ir > 0,08 (tas atbilst apmēram 5% no negatīvās kontroles vidējā OB), jāpielieto dzīvas pielāgotas kontroles	50 mg + 1 ml H₂O 60 min 37 ± 2 °C temperatūrā, 5 ± 1 % CO₂, ≥ 95 % RM (bezkrāsainas testējamās ķīmikālijas) un/vai 50 mg + 2 ml izopropanola, maisa 2–3 h pie RT (krāsainas un bezkrāsainas testējamās ķīmikālijas) → ja testējamās ķīmikālijas OB pie 570±20 nm pēc izopropanola vai ūdens OB atņemšanas ir > 0,08 (tas atbilst apmēram 5% no negatīvās kontroles vidējā OB), jāpielieto dzīvas pielāgotas kontroles	10 mg + 90 µl H₂O maisa 30 ± 2 min pie istabas temperatūras (RT, 18-28°C) → ja testējamā ķīmikālija ir krāsaina, jāpielieto pielāgotas kontroles ar dzīviem audiem	10 mg + 90 µl H₂O maisa 30 ± 2 min pie RT → ja testējamā ķīmikālija ir krāsaina, jāpielieto pielāgotas kontroles ar dzīviem audiem

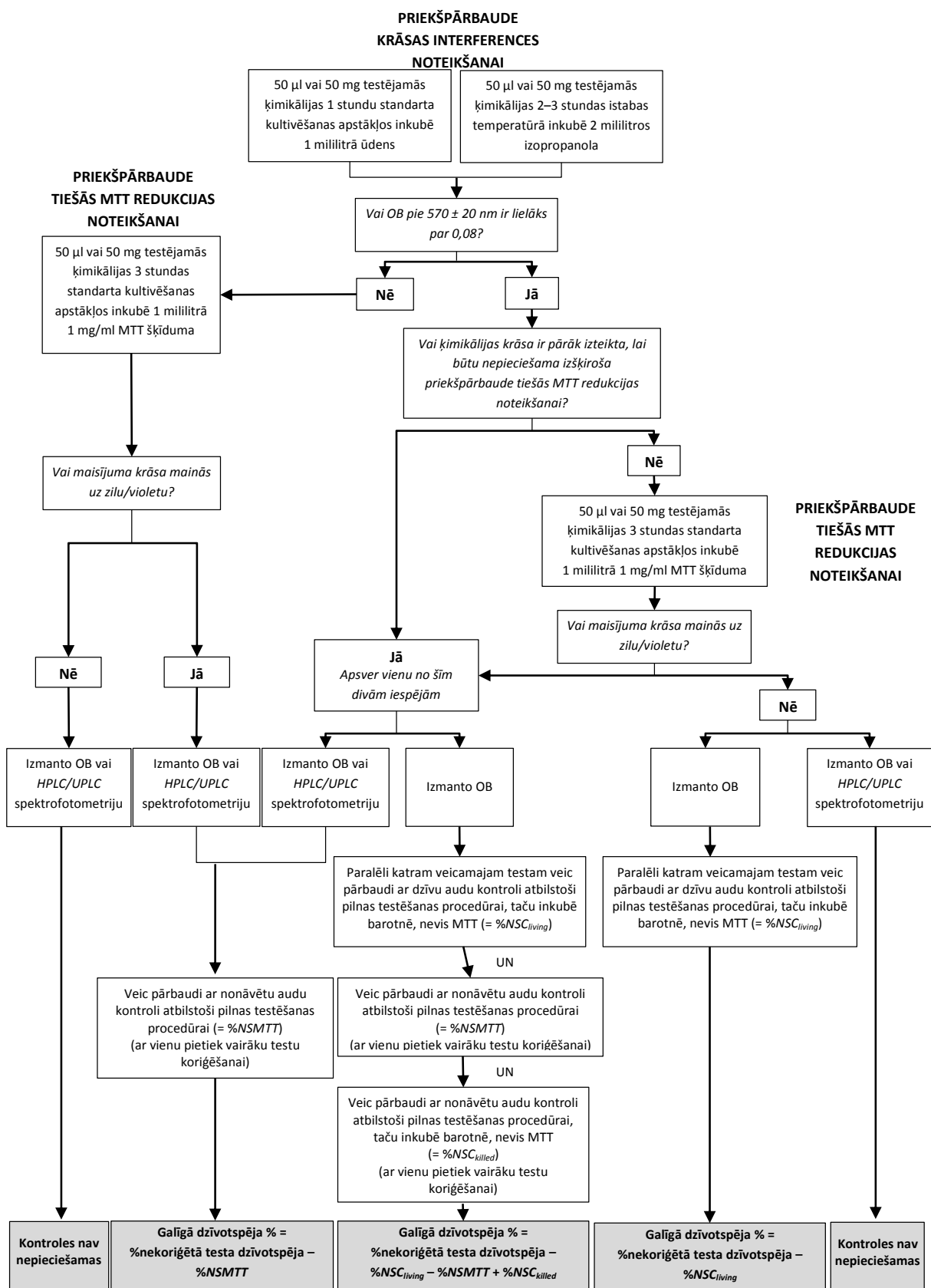
Testa sastāvdaļas	EpiOcular™ EIT (VRM1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM2)	
Priekšpārbaude attiecībā uz tiešo MTT reducēšanos	50 µl + 1 ml MTT 1 mg/ml šķīduma 180 ± 15 min 37 ± 2 °C temperatūrā, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % RM → ja šķīdums iekrāsojas zils vai violets, jāizdara pielāgotas kontroles ar nonāvētiem aukstumapstrādātiem audiem (par negatīvo kontroli izmanto 50 µl sterila dejonizēta ūdens MTT šķīdumā)	50 mg + 1 ml MTT 1 mg/ml šķīduma 180 ± 15 min 37 ± 2 °C temperatūrā, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % RM → ja šķīdums iekrāsojas zils vai violets, jāizdara pielāgotas kontroles ar nonāvētiem aukstumapstrādātiem audiem (par negatīvo kontroli izmanto 50 µl sterila dejonizēta ūdens MTT šķīdumā)	30 µl + 300 µl MTT 1 mg/ml šķīduma 180 ± 15 min 37 ± 2 °C temperatūrā, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % RM → ja šķīdums iekrāsojas zils vai violets, jāizdara pielāgotas kontroles ar nonāvētiem ūdensapstrādātiem audiem (par negatīvo kontroli izmanto 30 µl sterila dejonizēta ūdens MTT šķīdumā)	30 mg + 300 µl MTT 1 mg/ml šķīduma 180 ± 15 min 37 ± 2 °C temperatūrā, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % RM → ja šķīdums iekrāsojas zils vai violets, jāizdara pielāgotas kontroles ar nonāvētiem ūdensapstrādātiem audiem (par negatīvo kontroli izmanto 30 µl sterila dejonizēta ūdens MTT šķīdumā)
Priekšapstrāde	20 µl Ca ²⁺ /Mg ²⁺ nesaturošs DPBS 30 ± 2 min 37 ± 2 °C temperatūrā, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % RM, sargājot no gaismas	20 µl Ca ²⁺ /Mg ²⁺ nesaturošs DPBS 30 ± 2 min 37 ± 2 °C temperatūrā, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % RM, sargājot no gaismas	-	-
Apstrādes devas un aplicēšana	50 µl (83,3 µl/cm ²)	50 mg (83,3 mg/cm ²) ar kalibrētu instrumentu (piem., pilna karote bez kaudzes, kas kalibrēta 50 mg nātrija hlorīda ietveršanai).	10 µl Ca ²⁺ /Mg ²⁺ nesaturošs DPBS + 30 ± 2 µl (60 µl/cm ²) viskozām vielām izmanto neilona sietu	30 µl Ca ²⁺ /Mg ²⁺ nesaturošs DPBS + 30 ± 2 mg (60 mg/cm ²)
Ekspozīcijas ilgums un temperatūra	30 min (± 2 min) kultūras barotnē: 37 ± 2 °C temperatūrā, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % RM	6 stundas (± 0,25 h) kultūras barotnē: 37 ± 2 °C temperatūrā, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % RM	30 min (± 2 min) kultūras barotnē: 37 ± 2 °C temperatūrā, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % RM	4 stundas (± 0,1 h) kultūras barotnē: 37 ± 2 °C temperatūrā, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % RM
Skalošana istabas temperatūrā	3 reizes 100 ml Ca ²⁺ /Mg ²⁺ nesaturošā DPBS	3 reizes 100 ml Ca ²⁺ /Mg ²⁺ nesaturošā DPBS	20 ml Ca ²⁺ /Mg ²⁺ nesaturoša DPBS	25 ml Ca ²⁺ /Mg ²⁺ nesaturoša DPBS
Pēcekspozīcijas iegremdēšana	12 min (± 2 min) pie RT, kultūras barotnē	25 min (± 2 min) pie RT, kultūras barotnē	30 min (± 2 min) 37 °C temperatūrā, 5 % CO ₂ , 95 % RM, kultūras barotnē	30 min (± 2 min) pie RT, kultūras barotnē

Testa sastāvdaļas	EpiOcular™ EIT (VRM1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM2)	
Pēcekspozīcijas inkubēšana	120 min (± 15 min) kultūras barotnē 37 ± 2 °C temperatūrā, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % RM	18 h (± 0,25 h) kultūras barotnē 37 ± 2 °C temperatūrā, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % RM	nav	18 h (± 0,5 h) kultūras barotnē 37 ± 2 °C temperatūrā, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % RM
Negatīvā kontrole	50 µl H ₂ O Testē paralēli	50 µl H ₂ O Testē paralēli	30 ± 2 µl Ca ²⁺ /Mg ²⁺ nesaturoša DPBS Testē paralēli	30 ± 2 µl Ca ²⁺ /Mg ²⁺ nesaturoša DPBS Testē paralēli
Pozitīvā kontrole	50 µl metilacetāta Testē paralēli	50 µl metilacetāta Testē paralēli	30 ± 2 µl metilacetāta Testē paralēli	30 ± 2 µl metilacetāta Testē paralēli
MTT šķīdums	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
MTT inkubācijas ilgums un temperatūra	180 min (± 15 min) 37 ± 2 °C temperatūrā, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % RM	180 min (± 15 min) 37 ± 2 °C temperatūrā, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % RM	180 min (± 15 min) 37 ± 2 °C temperatūrā, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % RM	180 min (± 15 min) 37 ± 2 °C temperatūrā, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % RM
Ekstrakcijas šķīdinātājs	2 ml izopropanola (ekstrakcija no inserta augšas un apakšas, caurdurot audus)	2 ml izopropanola (ekstrakcija no inserta apakšas, caurdurot audus)	1,5 ml izopropanola (ekstrakcija no inserta augšas un apakšas)	1,5 ml izopropanola (ekstrakcija no inserta apakšas)
Ekstrakcijas ilgums un temperatūra	2–3 h ar kratīšanu (~120 apgr./min) pie RT vai pa nakti 4–10 °C temperatūrā	2–3 h ar kratīšanu (~120 apgr./min) pie RT vai pa nakti 4–10 °C temperatūrā	4 h ar kratīšanu (~120 apgr./min) pie RT vai vismaz pa nakti bez kratīšanas 4–10 °C temperatūrā	Vismaz 2 h ar kratīšanu (~120 apgr./min) pie RT
OB rādījums	570 nm (550–590 nm) bez references filtra	570 nm (550–590 nm) bez references filtra	570 nm (540–600 nm) bez references filtra	570 nm (540–600 nm) bez references filtra
Audu kvalitātes kontrole	Apstrāde ar 100 µl 0,3 % (tilpums/tipums) Triton X-100 12,2 min ≤ ET ₅₀ ≤ 37,5 min	Apstrāde ar 100 µl 0,3 % (tilpums/tipums) Triton X-100 12,2 min ≤ ET ₅₀ ≤ 37,5 min	30 min apstrāde ar SDS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC ₅₀ ≤ 3,5 mg/ml	30 min apstrāde ar SDS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC ₅₀ ≤ 3,2 mg/ml

Testa sastāvdaļas	EpiOcular™ EIT (VRM1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM2)	
Pieņemamības kritēriji	1. Ar negatīvo kontroli apstrādāto audu replikātu vidējam OB jābūt $> 0,8$ un $< 2,5$. 2. Ar pozitīvo kontroli 30 min eksponēto audu replikātu vidējai dzīvotspējai, kas izteikta kā % no negatīvās kontroles, jābūt < 50 %. 3. Divu audu replikātu dzīvotspējas atšķirībai jābūt mazākai par 20 %.	1. Ar negatīvo kontroli apstrādāto audu replikātu vidējam OB jābūt $> 0,8$ un $< 2,5$. 2. Ar pozitīvo kontroli 6 stundas eksponēto audu replikātu vidējai dzīvotspējai, kas izteikta kā % no negatīvās kontroles, jābūt < 50 %. 3. Divu audu replikātu dzīvotspējas atšķirībai jābūt mazākai par 20 %.	1. Ar negatīvo kontroli apstrādāto audu replikātu vidējam OB jābūt $> 1,0$ un $\leq 2,5$. 2. Ar pozitīvo kontroli 30 min eksponēto audu replikātu vidējai dzīvotspējai, kas izteikta kā % no negatīvās kontroles, jābūt ≤ 30 %. 3. Divu audu replikātu dzīvotspējas atšķirībai jābūt mazākai par 20 %.	1. Ar negatīvo kontroli apstrādāto audu replikātu vidējam OB jābūt $> 1,0$ un $\leq 2,5$. 2. Ar pozitīvo kontroli 4 stundas eksponēto audu replikātu vidējai dzīvotspējai, kas izteikta kā % no negatīvās kontroles, jābūt ≤ 20 %. 3. Divu audu replikātu dzīvotspējas atšķirībai jābūt mazākai par 20 %.

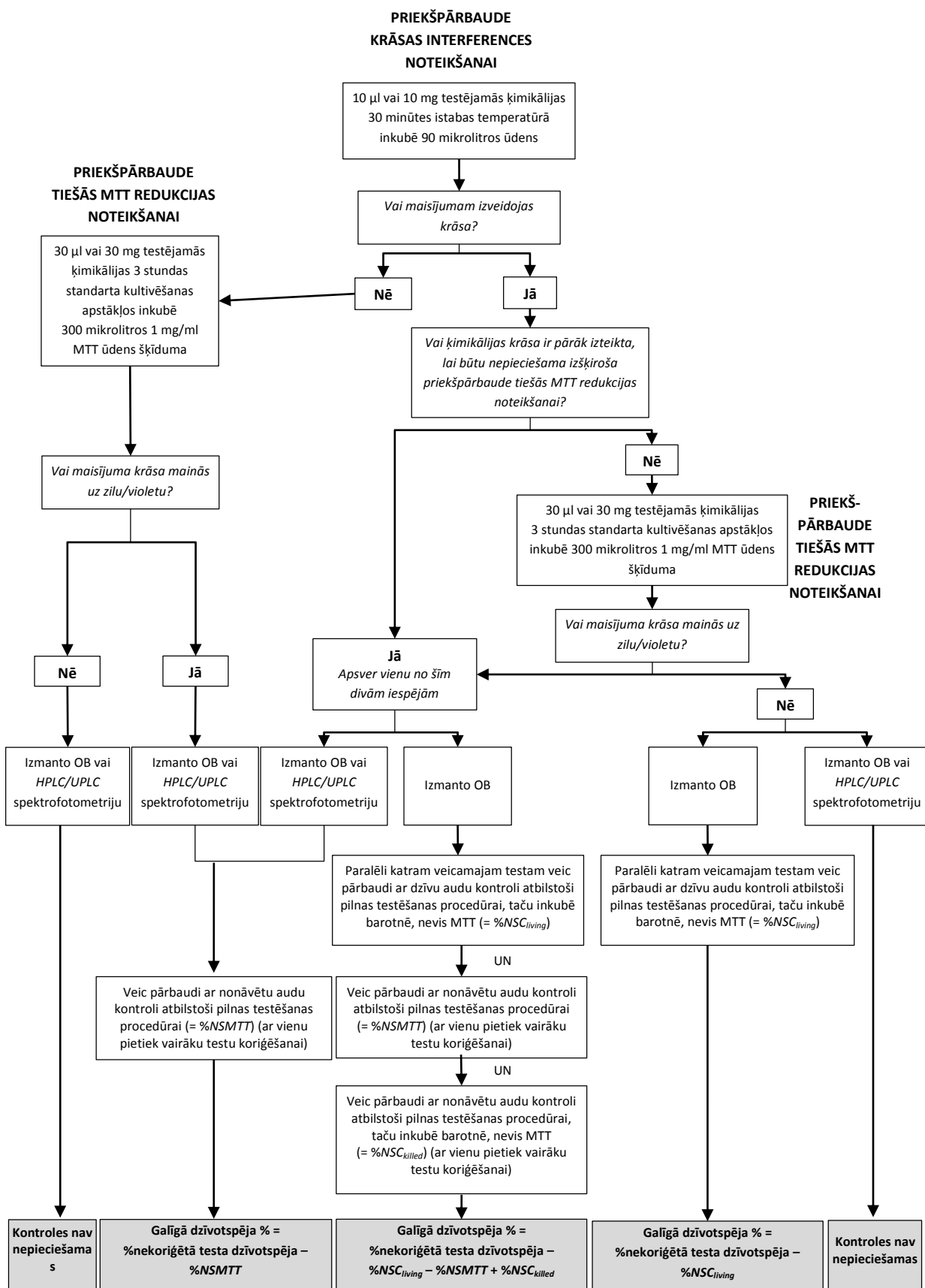
3. papildinājums

**ILUSTRATĪVA DIAGRAMMA AR NORĀDĪJUMIEM PAR TO, KĀ IDENTIFICĒT
TIEŠOS MTT REDUCĒTĀJUS UN/VAI KRĀSU INTERFERĒJOŠAS ĶĪMIKĀLIJAS UN
KĀ AR TĀM RĪKOTIES ATBILSTOŠI *VRM* STANDARTPROCEDŪRAI**



4. papildinājums

**ILUSTRATĪVA DIAGRAMMA AR NORĀDĪJUMIEM PAR TO, KĀ IDENTIFICĒT
TIEŠOS MTT REDUCĒTĀJUS UN/VAI KRĀSU INTERFERĒJOŠAS ĶĪMIKĀLIJAS UN
KĀ AR TĀM RĪKOTIES ATBILSTOŠI VRM2 STANDARTPROCEDŪRAI**



5. papildinājums

GALVENIE PARAMETRI UN PIEŅEMAMĪBAS KRITĒRIJI NO *RhCE* AUDU KONSTRUKCIJĀM EKSTRAHĒTA MTT FORMAZĀNA MĒRĪŠANAI PAREDZĒTAS *HPLC/UPLC* SPEKTROFOTOMETRIJAS SISTĒMAS KVALIFICĒŠANAI

Parametrs	Saskaņā ar <i>FDA</i> norādījumiem izstrādāts protokols (36)(38)	Pieņemamības kritēriji
Selektivitāte	Izopropanola, dzīva tukšā parauga (izopropanola ekstrakts no neapstrādātu dzīvu <i>RhCE</i> audu konstrukcijām), nedzīva tukšā parauga (izopropanola ekstrakts no neapstrādātu nonāvē <i>RhCE</i> audu konstrukcijām) un krāsas (piem., metilēnzilā) analīze	$Laukums_{interference} \leq 20\%$ no $laukuma_{LLOQ}^1$
Precizitāte	Kvalitātes kontroles (t. i., MTT formazāns koncentrācijā 1,6 $\mu\text{g/ml}$, 16 $\mu\text{g/ml}$ un 160 $\mu\text{g/ml}$) izopropanolā ($n=5$)	$CV \leq 15\%$ vai attiecībā uz $LLOQ \leq 20\%$
Pareizība	Kvalitātes kontroles izopropanolā ($n=5$)	% nov. $\leq 15\%$ vai attiecībā uz $LLOQ \leq 20\%$
Matrices efekts	Kvalitātes kontroles dzīvā tukšajā paraugā ($n=5$)	$85\% \leq \text{matrices efekts} \leq 115\%$
Pārnesums	Izopropanola analīze pēc $ULOQ^2$ standarta	$Laukums_{interference} \leq 20\%$ no $laukuma_{LLOQ}$
Reproducējamība (tajā pašā dienā)	3 neatkarīgas kalibrēšanas līknes (balstītas uz 6 secīgiem MTT formazāna 1/3 atšķaidījumiem izopropanolā, sākot no $ULOQ$, t. i., 200 $\mu\text{g/ml}$); Kvalitātes kontroles izopropanolā ($n=5$)	Kalibrēšanas līknes: % nov. $\leq 15\%$ vai attiecībā uz $LLOQ \leq 20\%$ Kvalitātes kontroles: % nov. $\leq 15\%$ un $CV \leq 15\%$
Reproducējamība (no vienas dienas otrā)	1. diena: 1 kalibrēšanas līkne un kvalitātes kontroles izopropanolā ($n=3$) 2. diena: 1 kalibrēšanas līkne un kvalitātes kontroles izopropanolā ($n=3$) 3. diena: 1 kalibrēšanas līkne un kvalitātes kontroles izopropanolā ($n=3$)	
MTT formazāna īslaicīgā stabilitāte <i>RhCE</i> audu ekstraktā	Kvalitātes kontroles dzīvā tukšajā paraugā ($n=3$), kas analizēts sagatavošanas dienā un pēc 24 stundu ilgas glabāšanas istabas temperatūrā	% nov. $\leq 15\%$
MTT formazāna ilglaicīgā stabilitāte <i>RhCE</i> audu ekstraktā (ja vajadzīgs)	Kvalitātes kontroles dzīvā tukšajā paraugā ($n=3$), kas analizēts sagatavošanas dienā un pēc vairāku dienu ilgas glabāšanas -20°C temperatūrā	% nov. $\leq 15\%$

¹ *LLOQ*: apakšējā kvantitatīvās noteikšanas robeža, kas noteikta tā, lai aptvertu audu dzīvotspēju 1–2 %, proti, 0,8 $\mu\text{g/ml}$.

² *ULOQ*: augšējā kvantitatīvās noteikšanas robeža, kas saskaņā ar definīciju vismaz divreiz pārsniedz augstāko gaidāmo MTT formazāna koncentrāciju no negatīvajām kontrolēm iegūtos izopropanola ekstraktos (~70 $\mu\text{g/ml}$ ar *VRM*), proti, 200 $\mu\text{g/ml}$.

B.70. CILVĒKA REKOMBINANTIE ESTROGĒNRECEPTORU (*hrER*) *IN VITRO* TESTI TĀDU ĶĪMIKĀLIJU NOTEIKŠANAI, KAM PIEMĪT ER AFINITĀTE

VISPĀRĪGS IEVADS

Veikspējā balstītas testēšanas ESAO vadlīnija

1. Šī testēšanas metode ir ekvivalenta ESAO testēšanas vadlīnijai (*TG*) Nr. 493 (2015). Minētā *TG* Nr. 493 ir veikspējā balstītas testēšanas vadlīnija (*PBTG*), kas apraksta cilvēka rekombinantās *in vitro* testēšanas metodiku tādu vielu noteikšanai, kam piemīt estrogēnreceptoru afinitāte (*hrER* saistīšanās testi). Tajā ietilpst divas mehānistiski un funkcionāli līdzīgas testēšanas metodes, ko izmanto, lai identificētu vielas, kas saistās ar estrogēnreceptoru (t. i., ER α), un tā varētu atvieglot jaunu līdzīgu vai modificētu testēšanas metožu izstrādi atbilstīgi validēšanas principiem, kas izklāstīti ESAO vadlīniju dokumentā *Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment* (1). Šīs *PBTG* pamatā ir divas pilnībā validētas references testēšanas metodes (sk. 2. un 3. papildinājumu):

- Freibergera–Vilsona (*Freyberger–Wilson*; turpmāk *FW*) estrogēnreceptoru (ER) saistīšanās *in vitro* tests, kurā izmanto pilnu cilvēka rekombinanto ER α (2), un
- Ķīmiskās izvērtēšanas un pētniecības institūta (*Chemical Evaluation and Research Institute and Research Institute*; turpmāk “*CERP*”) estrogēnreceptoru saistīšanās *in vitro* tests, kurā izmanto cilvēka rekombinanto liganda saistīšanās domēna proteīnu (2).

Ir izstrādāti veikspējas standarti (VS) (3), kas sekmē līdzīgu testēšanas metožu izstrādi un validēšanu attiecībā uz to pašu bīstamības beigupunktu un dod iespēju savlaicīgi grozīt *PBTG* Nr. 493, atjaunināto *PBTG* ļaujot papildināt ar jauniem līdzīgiem testiem. Tomēr līdzīgus testus pievieno tikai pēc to izskatīšanas un ESAO apstiprinājuma, ka ir izpildīti veikspējas standarti. Izmantojot ESAO datu savstarpējo atzīšanu, *TG* Nr. 493 iekļautos testus bez izšķirības var izmantot, lai nodrošinātu ESAO dalībvalstu prasības pēc testēšanas rezultātiem attiecībā uz estrogēnreceptora saistīšanos.

Testēšanas metodē iekļauto testu konteksts un principi

2. ESAO 1998. gadā sāka īstenot prioritārus pasākumus ar mērķi pārskatīt esošās un izstrādāt jaunas testēšanas vadlīnijas potenciālo endokrīno disruptoru skrīningam un testēšanai. 2012. gadā tika pārskatīts ESAO potenciālo endokrīno disruptoru testēšanas un novērtēšanas konceptuālais satvars (KS). Gan sākotnējais, gan pārskatītais KS ir iekļauts pielikumā Vadlīniju dokumentam par standartizētām testēšanas metodēm ķīmikāliju vērtēšanai attiecībā uz potenciālu endokrīni disruptīvu iedarbību (4). KS aptver piecus līmeņus, no kuriem katrs atbilst citam bioloģiskās sarežģītības līmenim. Šajā testēšanas metodē aprakstītie ER saistīšanās testi atbilst 2. līmenim, kas ietver “*in vitro* testus, kas sniedz datus par izvēlētiem endokrīniem mehānismiem/ceļiem”. Testēšanas metode

paredzēta *in vitro* receptoru saistīšanās testiem, ar ko identificē cilvēka estrogēnreceptora alfa (ER α) ligandus.

3. Ir skaidri pierādīts *in vitro* ER saistīšanās testa relevantums attiecībā uz bioloģiskajām funkcijām. ER saistīšanās testi izstrādāti, lai identificētu ķimikālijas, kam piemīt disruptīvs potenciāls attiecībā uz estrogēnu tipa hormonu ceļu, un pēdējo divdesmit gadu laikā tie plaši izmantoti, lai raksturotu ER audu izkliedi, kā arī identificētu ER agonistus/antagonistus. Šie testi atspoguļo ligandu–receptoru mijiedarbību, kas attiecībā uz reproduktīvo funkciju visiem mugurkaulniekiem ir estrogēnu signālceļa sākumpunkts.
4. Estrogēnu–ER mijiedarbība var ietekmēt estrogēnu regulēto gēnu transkripciju un inducēt negenomisku ietekmi, un tā rezultātā var tikt inducēti vai inhibēti šūnu procesi, tostarp tādi, kas saistīti ar šūnu vairošanos, normālu augļa attīstību un reproduktīvo funkciju (5)(6)(7). Normālu estrogēnisko sistēmu traucējumi var negatīvi ietekmēt normālu attīstību (ontogēnēzi), reproduktīvo veselību un reproduktīvās sistēmas integritāti. Neatbilstoši ER signāli var radīt, piemēram, palielinātu hormonatkarīgu audzēju risku, pasliktinātu auglību un mainītu augļa augšanas un attīstības gaitu (8).
5. *In vitro* saistīšanās testu pamatā ir vielu tieša vai netieša mijiedarbība ar specifisku receptoru liganda saistīšanās domēnu, kas regulē gēnu transkripciju. Cilvēka rekombinantā estrogēnreceptora alfa (*hrER* α) saistīšanās testa galvenais komponents mēra radioaktīvi iezīmēta liganda ([³H]17 β -estradiola) spēju saistīties ar ER arvien pieaugošu testējamās ķimikālijas (t. i., konkurenta) koncentrāciju klātbūtnē. Testējamās ķimikālijas, kam piemīt augsta ER afinitāte, konkurē ar radioaktīvi iezīmēto ligandu pie zemākas koncentrācijas nekā ķimikālijas ar zemāku receptora afinitāti. Šis tests sastāv no diviem svarīgākajiem komponentiem: piesātinājuma–saistīšanās eksperimenta, kas raksturo receptora–liganda mijiedarbības parametrus un dokumentē ER specifiskumu, un konkurējošās saistīšanās eksperimenta, kas attiecībā uz saistīšanos ar ER raksturo konkurenci starp testējamo ķimikāliju un radioaktīvi marķēto ligandu.
6. *CERI* validējošie pētījumi un *FW* saistīšanās testi ir pierādījuši, ka minētie komponenti ir relevanti un ticami paredzētajam nolūkam (2).
7. Šajā testēšanas metodē izmantotās definīcijas un saīsinājumi ir aprakstīti 1. papildinājumā.

Receptora saistīšanās testu tvērums un ierobežojumi

8. Šie testi paredzēti skrīninga un prioritizēšanas vajadzībām, tomēr tie var sniegt arī informāciju par molekulāro iniciācijas notikumu (*MIE*), ko var izmantot pierādījumu svara pieejā. Šie testi *in vitro* sistēmā aplūko ķīmisko saistīšanos ar ER α liganda saistīšanās domēnu. Tāpēc rezultātus nevajadzētu tieši ekstrapolēt uz neskartas endokrīnās sistēmas kompleksajiem signalizēšanas un regulēšanas mehānismiem *in vivo*.

9. Dabīgā liganda (17 β -estradiola) saistīšanās ir sākumpunkts molekulāru notikumu sērijā, kas aktivizē mērķa gēnu transkripciju un galu galā kulminē ar fizioloģiskām pārmaiņām (9). Tādējādi saistīšanās ar ER α liganda saistīšanās domēnu tiek uzskatīta par vienu no svarīgākajiem ER mediētiem endokrīnās disrupcijas (ED) mehānismiem, lai gan pastāv arī citi ED izraisoši mehānismi, t. sk.: i) mijiedarbība ar citiem ER α domēniem, ne tikai ar liganda saistīšanās kabatu; ii) mijiedarbība ar citiem estrogēnu signalizēšanā būtiskiem receptoriem, ar ER β un estrogēnreceptoru, kas sasaistīts ar G proteīnu, ar citiem endokrīnās sistēmas receptoriem un fermentu sistēmām; iii) hormonu sintēze; iv) metaboliska hormonu aktivācija un/vai inaktivācija; v) hormonu izkliede mērķaudos un vi) hormonu izvadīšana no organisma. Neviena šajā testēšanas metodē iekļautais tests neattiecas uz uzskaitītajiem iedarbības veidiem.
10. Šī testēšanas metode aplūko vielu spēju saistīties ar cilvēka ER α , un tā neizšķir ER α agonistus un antagonistus. Šajos testos netiek aplūkoti tādi tālāki lejupēji notikumi kā gēnu transkripcija vai fizioloģiskas pārmaiņas. Tā kā validācijā tika izmantotas tikai vienkomenta vielas, nav informācijas par testa izmantojamību ar maisījumiem. Tomēr teorētiski šie testi ir izmantojami daudzkomponentu vielu un maisījumu testēšanai. Pirms testēšanas metodi attiecībā uz maisījumu izmanto, lai iegūtu datus kādai plānotai regulatīvai vajadzībai, jāapsver, vai un kādēļ tā var sniegt tādām nolūkam piemērotus rezultātus. Šādi apsvērumi nav vajadzīgi, ja pastāv regulatīva prasība maisījumu testēt.
11. Šūnas nesaturošām receptoru sistēmām nepiemīt iekšēja metaboliskā spēja, un tās nav validētas kombinācijā ar metaboliskām fermentu sistēmām. Pētījumu plānā gan varētu iekļaut metabolisku aktivitāti, bet tam būtu vajadzīga papildu validācija.
12. Nedrīkst testēt tādas ķīmikālijas, kas varētu atņemt proteīna, proti, receptorproteīna, dabiskās īpašības (piem., virsmaktīvie aģenti) vai mainīt testa buferšķīduma pH, vai arī tās drīkst testēt tikai koncentrācijās, kas šādu mijiedarbību nepieļauj. Visos pārējos gadījumos testā izmantojamās testējamās ķīmikālijas koncentrācijas diapazons ir atkarīgs no tās šķīdības testa buferšķīdumā.
13. Informatīvā nolūkā 1. tabulā ir sniegti testa rezultāti par 24 vielām, kas testētas ar abiem pilnībā validētajiem references testiem, kas aprakstīti šajā testēšanas metodē. No publicētajiem testēšanas pārskatiem t. sk. no *in vitro* testiem uz ER transkripcionālo aktivāciju un/vai uterotrofiskā testa izriet, ka 17 no šīm vielām klasificētas kā tādas, kas saistās ar ER, bet 6 vielas ir nesaistās ar ER (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). Runājot par 1. tabulā apkopotajiem datiem, abu testu rezultāti gandrīz 100 % sakrīt attiecībā uz visu vielu klasifikāciju līdz pat 10⁻⁴M, un visas vielas bija pareizi klasificētas kā saistīgas vai nesaistīgas ar ER. Papildu informācija par šo vielu grupu un par citām vielām, kas validācijas pētījumu gaitā testētas ER saistīšanās testos, ir sniegta *hrER* saistīšanās testa veikspējas standartos (3), 2. papildinājumā (1., 2. un 3. tabulā).

1. tabula. Vielu klasifikācija pēc to saistīšanās vai nesaistīšanās ar ER, testējot tās ar *FW* un *CERI hrER* saistīšanās testiem, un salīdzinājums ar sagaidāmo rezultātu

	Vielas nosaukums	CAS reģ. Nr.	Sagaidāmais rezultāts	<i>FW</i> tests		<i>CERI</i> tests		Klase pēc <i>MeSH</i> klasifikācijas	Produkta klase
				Koncentrācijas diapazons (M)	Klasifikācija	Koncentrācijas diapazons (M)	Klasifikācija		
1	17β-estradiols	50-28-2	saisteklis	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	saisteklis	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	saisteklis	steroīds	farmaceitisk un veterinārfarmaceitisk produkts
2	Noretinodrels	68-23-5	saisteklis	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-4}$	saisteklis	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-4}$	saisteklis	steroīds	farmaceitisk un veterinārfarmaceitisk produkts
3	Noretindrons	68-22-4	saisteklis	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-4}$	saisteklis	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-4}$	saisteklis	steroīds	farmaceitisk un veterinārfarmaceitisk produkts
4	Di- <i>n</i> -butilftalāts	84-74-2	nesaisteklis*	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	nesaisteklis* †	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	nesaisteklis* †	ogļūdeņradis (ciklisk), esteris	plastifikators, ķīmikāliju starpprodukts
5	DES	56-53-1	saisteklis	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	saisteklis	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	saisteklis	ogļūdeņradis (ciklisk), fenols	farmaceitisk un veterinārfarmaceitisk produkts
6	17α-etinilestradiols	57-63-6	saisteklis	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	saisteklis	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	saisteklis	steroīds	farmaceitisk un veterinārfarmaceitisk produkts
7	Mezo-heksestrols	84-16-2	saisteklis	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	saisteklis	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	saisteklis	ogļūdeņradis (ciklisk), fenols	farmaceitisk un veterinārfarmaceitisk produkts
8	Genisteīns	446-72-0	saisteklis	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	saisteklis	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	saisteklis	ogļūdeņradis (heterociklisk), flavonoīds	dabisk produkts
9	Ekvols	531-95-3	saisteklis	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	saisteklis	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	saisteklis	fitoestrogēna metabolīts	dabisk produkts
10	Butilparabēns (<i>n</i> -butil-4-hidroksibenzoāts)	94-26-8	saisteklis	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	saisteklis	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	saisteklis	parabēns	konservants
11	Nonilfenols (maisījums)	84852-15-3	saisteklis	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	saisteklis	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	saisteklis	alkilfenols	starpproduktu savienojums
12	<i>o,p'</i> -DDT	789-02-6	saisteklis	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	saisteklis	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	saisteklis	hlorganiska viela	insekticīds
13	Kortikosterons	50-22-6	nesaisteklis*	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	nesaisteklis	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	nesaisteklis	steroīds	dabisk produkts
14	Zearalenons	17924-92-4	saisteklis	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	saisteklis	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	saisteklis	ogļūdeņradis (heterociklisk), laktons	dabisk produkts
15	Tamoksifēns	10540-29-1	saisteklis	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	saisteklis	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	saisteklis	ogļūdeņradis (ciklisk)	farmaceitisk un veterinārfarmaceitisk produkts
16	5α-dihidrotestosterons	521-18-6	saisteklis	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	saisteklis	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	saisteklis	nefenolisk steroīds	dabisk produkts
17	Bisfenols A	80-05-7	saisteklis	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	saisteklis	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	saisteklis	fenols	ķīmikāliju starpprodukts
18	4- <i>n</i> -heptilfenols	1987-50-4	saisteklis	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	neskaitra ^a	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	saisteklis	alkilfenols	starpprodukts
19	Kepons (hlordekons)	143-50-0	saisteklis	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	saisteklis	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	saisteklis	ogļūdeņradis (halogenēts)	pesticīds

20	Benz(a)antracēns	56-55-3	nesaisteklis	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	nesaisteklis ^b	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	nesaisteklis ^b	aromātiskais ogļūdeņradis	starpprodukts
21	Enterolaktons	78473-71-9	saisteklis	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	saisteklis	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	saisteklis	fitoestrogēns	dabisks produkts
22	Progesterons	57-83-0	nesaisteklis*	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	nesaisteklis	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	nesaisteklis	steroīds	dabisks produkts
23	Oktiltrietoksisilāns	2943-75-1	nesaisteklis	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	nesaisteklis	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	nesaisteklis	silāns	virsmas modifikators
24	Atrazīns	1912-24-9	nesaisteklis*	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	nesaisteklis	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	nesaisteklis	heterocikliskais savienojums	herbicīds

*Šķīdības robeža $< 1 \times 10^{-4}$ M.

*Di-*n*-butilftalāts (DBP) tiek lietots un klasificēts kā nesaisteklis, balstoties uz testēšanu koncentrācijā līdz 10^{-4} M, tāpēc ka pirmsvalidācijas pētījumos dažās laboratorijās pie 10^{-3} M koncentrācijas tika novērota vielas nešķīdība (t. i., tā kļuva duļķaina).

† Validēšanas pētījumā di-*n*-butilftalāts (DBP) tika testēts kā kodēta testējamā viela koncentrācijās līdz 10^{-3} M. Šādos testa apstākļos dažas laboratorijas novēroja vai nu radioaktīvi marķētā liganda saistīšanās samazinājumu pie augstākās koncentrācijas (10^{-3} M), vai/un neviennozīmīgi interpretējamu likni. Šajās testēšanas reizēs DBP klasifikācija bija “neskaitāma” vai tas tika klasificēts kā “saisteklis” trijās no piecām laboratorijām, kuras izmantoja *CERI* testu, un piecās no sešām laboratorijām, kuras izmantoja *FW* testu (sk. (2) atsaucē IV.B.3a.,b. un VI.A. iedaļu).

^a Klasifikācija atšķiras no sagaidāmā rezultāta. Ņemot vērā, ka trijās no piecām laboratorijām 4-*n*-heptilfenola klasifikācija bija “neskaitāma” vai tas tika klasificēts kā “nesaitēklis”, tā klasifikāciju definēja kā neskaitāmu. Sīkāka izpēte atklāja, ka šādu rezultātu izraisīja ķīmiskās šķīdības ierobežojums, kas neļāva izveidot pilnu saistīšanās likni.

^b Validēšanas pētījuma gaitā, balstoties uz publicēto literatūru, kas pierāda, ka šai vielai paziņotā *in vitro* estrogēnu aktivitāte (16) primāri ir atkarīga no tās metaboliskās aktivitātes (17)(18), benz(a)antracēns tika pārvalificēts par nesaistekli (t.i. negatīvs rezultāts). Šūnas nesaturējošos *hrER* saistīšanās testos, kādi izmantoti šajā starplaboratoriju validēšanas pētījumā, nav sagaidāma vielas fermentatīva metaboliskā aktivitāte. Tādējādi šī viela būtu pareizi klasificējama kā nesaistīga, ja to eksperimentālos apstākļos lietot *FW* un *CERI* testos.

HRER SAISTĪŠANĀS TESTA KOMPONENTI

Nepieciešamie testa komponenti

- Šī testēšanas metode attiecas uz testiem, kuru galvenais elements ir estrogēnreceptors (ER) un atbilstoša stipruma ligands, ko testā var izmantot kā marķieri / iezīmēto elementu un kas, palielinoties testējamās ķīmikālijas koncentrācijai, var tikt pārvietots. Saistīšanās testu divi galvenie komponenti ir šādi: 1) piesātinājuma-saistīšanās tests un 2) konkurējošā saistīšanās. Piesātinājuma-saistīšanās testu izmanto, lai apstiprinātu receptoru preparātu specifiskumu un aktivitāti, savukārt konkurējošās saistīšanās eksperimenta mērķis ir izvērtēt testējamās ķīmikālijas spēju saistīties ar *hrER*.

Kontroles

- Apraksta ierosinātos paralēlos references estrogēnus un kontroles. Paralēlās kontroles — šķīdinātājs (nesējs), pozitīvā kontrole (saistīgs ar ER; stipra un vāja afinitāte), negatīvā kontrole (nesaitēklis) — vajadzības gadījumā kalpo kā indikators, ka tests pie konkrētajiem testēšanas nosacījumiem funkcionē un ļauj savstarpēji salīdzināt eksperimentus; parasti paralēlās kontroles ir daļa no konkrētā eksperimenta pieņemamības kritērijiem (1). Katrā testa izpildes reizē vienā platē ir jābūt atsaucē estrogēna un kontroļu (t.i. vāja saistēkļa un nesaistēkļa) pilnai koncentrāciju līknei. Visās pārējās platēs jāiekļauj: 1) katra E2 un vāja

saistekļa augstas koncentrācijas (aptuveni tāda, pie kuras radioaktīvi marķētais ligands tiek pilnībā pārvietots) un vidējas koncentrācijas (aptuveni IC_{50}) triplikāti; 2) šķīdinātāja kontroles un nespecifiskās saistīšanās triplikāti.

Standarta kvalitātes kontroles procedūras

16. Katram testam veic aprakstītās standarta kvalitātes kontroles procedūras, lai nodrošinātu, ka aktīvie receptori, pareizas ķīmiskās koncentrācijas un tolerances intervāli saglabājas stabili vairākkārtējās replikācijās un nezaudē spēju laika gaitā nodrošināt gaidītās ER saistīšanās reakcijas.

Laboratorijas kvalifikācijas pierādīšana

17. Visām laboratorijām pirms nezināmu ķīmikāliju testēšanas ar jebkuru no šīs testēšanas metodes testiem jāpierāda sava kvalifikācija konkrētā testa izmantošanā, veicot piesātinājuma testus, lai apstiprinātu ER preparāta specifiskumu un aktivitāti, un konkurējošās saistīšanās testus ar references estrogēniem un kontrolēm (vājiem saistekļiem un nesaistekļiem). Laboratorijai jāizveido vēsturiska datubāze, kurā apkopti trīs līdz piecu neatkarīgu, dažādās dienās veiktu eksperimentu rezultāti, kas gūti ar references estrogēnu un kontrolēm. Šie eksperimenti būs pamats laboratorijas references estrogēnam un vēsturiskajām kontrolēm, un turpmākās testēšanas reizēs tos izmantos kā testu pieņemamības novērtējuma daļu.
18. Jāapstiprina arī testa sistēmas reaģētspēja, veicot 2. tabulā iekļauto standartvielu testēšanu. Standartvielu saraksts ir ER saistīšanās testu veikspējas standartos norādīto references vielu apakškopa (3). Šīs vielas ir komerciāli pieejamas un ir reprezentatīvas tādu ķīmikāliju klasēm, ko parasti asociē ar ER afinitāti (t. i., tām ir pienācīgs ER afinitātes (no spēcīgas līdz vājai) diapazons, kāds no tām būtu sagaidāms), un ko parasti asociē ar nesaistekļiem (t. i., negatīvajiem rezultātiem). Attiecībā uz katru standartvielu testētajām koncentrācijām būtu jāaptver 2. tabulā norādītais diapazons. Ar katru vielu jāveic vismaz trīs eksperimenti, un rezultātiem jāatbilst sagaidāmajai ķīmiskajai aktivitātei. Katrs eksperimentu veic neatkarīgi (t. i., ar jauniem receptora atšķaidījumiem, ķīmikālijām un reaģentu), katrai koncentrācijai izmantojot trīs replikātus. Kompetence ir pierādīta, ja katra standartviela tiek pareizi klasificēta (pozitīva/negatīva reakcija). Kompetences testēšanu atkārto katrs laborants, kas apgūst testēšanas metodi.

2. tabula. HrER konkurējošās saistīšanās testu kontroļu un standartvielu saraksts¹

Nr.	Vielas nosaukums	CAS reģ. Nr. ²	Sagaidāmais rezultāts ^{3,4}	Testa koncentrācijas diapazons (M)	MeSH ķīmikāliju klase ⁵	Produkta klase ⁶
Kontroles (references estrogēns, vājš saisteklis, nesaisteklis)						
1	17β–estradiols	50-28-2	saisteklis	1x10 ⁻¹¹ – 1x10 ⁻⁶	steroīds	farmaceitisks un veterinārfarmaceitisks produkts
2	Noretinodrels (vai) Noretindrons	68-23-5 (vai) 68-22-4	saisteklis	3x10 ⁻⁹ – 30x10 ⁻⁶	steroīds	farmaceitisks un veterinārfarmaceitisks produkts
3	Oktiltrietoksisilāns	2943-75-1	nesaisteklis	1x10 ⁻¹⁰ – 1x10 ⁻³	silāns	virsmas modifikators
Standartvielas⁶						
4	Dietilstilbestrols	56-53-1	saisteklis	1x10 ⁻¹¹ – 1x10 ⁻⁶	ogļūdeņradis (ciklisks), fenols	farmaceitisks un veterinārfarmaceitisks produkts
5	17α-etinilestradiols	57-63-6	saisteklis	1x10 ⁻¹¹ – 1x10 ⁻⁶	steroīds	farmaceitisks un veterinārfarmaceitisks produkts
6	Mezo-heksestrols	84-16-2	saisteklis	1x10 ⁻¹¹ – 1x10 ⁻⁶	ogļūdeņradis (ciklisks), fenols	farmaceitisks un veterinārfarmaceitisks produkts
7	Tamoksifēns	10540-29-1	saisteklis	1x10 ⁻¹¹ – 1x10 ⁻⁶	ogļūdeņradis (ciklisks)	farmaceitisks un veterinārfarmaceitisks produkts
8	Genisteīns	446-72-0	saisteklis	1x10 ⁻¹⁰ – 1x10 ⁻³	heterociklisks savienojums, flavonoīds	dabisks produkts
9	Bisfenols A	80-05-7	saisteklis	1x10 ⁻¹⁰ – 1x10 ⁻³	fenols	ķīmikāliju starpprodukts
10	Zearalonons	17924-92-4	saisteklis	1x10 ⁻¹¹ – 1x10 ⁻³	heterociklisks savienojums, laktons	dabisks produkts

11	Butilparabēns	94-26-8	saisteklis	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-3}$	Karbonskābe, fenols	konservants
12	Atrazīns	1912-24-9	nesaisteklis	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	heterociklisks savienojums	herbicīds
13	Di- <i>n</i> -butilftalāts (DBP) ⁷	84-74-2	nesaisteklis ⁸	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	ogļūdeņradis (ciklisks), esteris	plastifikators, ķīmikāliju starpprodukts
14	Kortikosterons	50-22-6	nesaisteklis	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-4}$	steroīds	dabisks produkts

¹ Ja standartviela vairs nav komerciāli pieejama, var izmantot vielu, kurai ir tāda pati ER saistīšanās klasifikācija, salīdzināma potence un ķīmiskā klase.

² Saīsinājumi: CAS Nr. — *Chemical Abstracts Service* reģistra numurs.

³ *CERI* un *FW hrER* saistīšanās testu validēšanas pētījumā klasificēts kā saistīgs ar ER α vai kā nesaisteklis (2).

⁴ ER saistīšanās aktivitāte ir balstīta uz “ICCVAM Background Review Documents (BRD) for ER Binding and TA assays” (9), kā arī uz empīriskiem datiem un citu informāciju, kas iegūta no publicētajiem un recenzētajiem atsauces pētījumiem (10) (11) (12) (13) (14) (15).

⁵ Vielas iedalītas vienā vai vairākās ķīmikāliju klasēs, izmantojot ASV Nacionālās medicīnas bibliotēkas priekšmetu klasifikatoru (*MeSH*), kas ir starptautiski atzīta, standartizēta klasifikācijas sistēma (pieejama <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁶ Vielas iedalītas vienā vai vairākās ķīmikāliju klasēs, izmantojot ASV Nacionālās medicīnas bibliotēkas bīstamo vielu datubāzi (pieejama <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).

⁷ Alternatīvi par nesaistekļa kontroli var izmantot DBP, ja testu veic ar maksimālo koncentrāciju 10^{-4} M.

⁸ Šīs vielas šķīdības robeža ir 10^{-4} M. Di-*n*-butilftalāts (DBP) tiek lietots un klasificēts kā nesaisteklis, balstoties uz testēšanu koncentrācijā līdz 10^{-4} M, tāpēc ka pirmsvalidācijas pētījumos dažās laboratorijās pie 10^{-3} M koncentrācijas tika novērota vielas nešķīdība (t. i., tā kļuva duļķaina).

Testējamo ķīmikāliju šķīdības un koncentrācijas diapazona noteikšana

19. Ir jāveic sagatavošanās tests, lai noteiktu katras testējamās ķīmikālijas šķīdības robežu un identificētu piemērotu koncentrācijas diapazonu, kas tiks izmantots testā. Sākotnēji katras testējamās ķīmikālijas šķīdības robežu nosaka šķīdinātājā un pēc tam apstiprina testēšanas apstākļos. Galīgā testā izmantojamā koncentrācija nepārsniedz 1 mM. Diapazona noteikšanas testēšanā ietilpst šķīdinātāja kontrole; paralēli tai testē astoņus sērijveida logaritmiskus atšķaidījumus, sākot ar augstāko pieņemamo koncentrāciju (piem., 1 mM vai zemāku, balstoties uz šķīdības robežu), un vēro, kad šķīdums kļūst duļķains vai rada nogulsnes. Trešā un ceturtā eksperimenta koncentrācijas būtu jāpielāgo pēc vajadzības, lai labāk raksturotu koncentrācijas—atbildreakcijas līkni.

Pieņemamības kritēriji katrai testēšanas reizei

20. Konkrēta eksperimenta pieņemšana vai noraidīšana notiek, izvērtējot rezultātus, kas iegūti ar references estrogēnu un kontroli. Pirmkārt, — attiecībā uz 1. plati — pilnām koncentrāciju līknēm, kas iegūtas ar katra eksperimenta references kontroli, jāatbilst līknei atbilstošajiem veikspējas mērījumu parametriem (piem., IC_{50} un Hilla virziena koeficientam), balstoties uz rezultātiem, kas paziņoti attiecīgajos *CERI* un *FW* testu protokolos (2. un 3. papildinājums), un vēsturiskajiem kontroles datiem, ko apkopojusi testa veicēja laboratorija. Katrā eksperimentā jābūt pareizi klasificētām visām kontrolēm (references estrogēni, vāji saistekļi un nesaistekļi). Otrkārt, visās turpmākajās platēs ir jāvērtē kontroles konsekvēnts attiecībā pret 1. plati. Testā jāizmanto pietiekams testējamās ķīmikālijas koncentrāciju diapazons, lai skaidri definētu konkurējošās saistīšanās līknes augšējo punktu. Rezultātu mainībai starp katras testējamās ķīmikālijas koncentrācijas replikātiem, kā arī starp trim neatkarīgajām testēšanas reizēm jābūt saprātīgi pieļaujamās robežās un zinātniski pamatojamai. Laboratorija savu spēju konsekvēnti veikt testu pierāda, izveidojot un uzturot vēsturisku datubāzi, kurā apkopoti references estrogēnu un kontroļu rezultāti. Lai nodrošinātu reproducējamību laboratorijas ietvaros, var izmantot references estrogēna un vāja saistekļa kontroles līknēm atbilstošo parametru vidējo vērtību standartnovirzes (SN) vai variācijas koeficientus (VK), kas iegūti daudzos eksperimentos. Katrā testēšanas reizē iegūtos plates kontroļu rezultātus, kā arī ar katru testējamo ķīmikāliju iegūtos rezultātus ir jāizvērtē speciālistam.

Bez tam attiecībā uz pieņemamības kritērijiem ir jāievēro šādi principi:

- datiem jābūt pietiekamiem, lai varētu kvantitatīvi novērtēt ER saistīšanos;
- testētajām koncentrācijām jā saglabājas testējamās ķīmikālijas šķīdības diapazonā.

Datu analīze

21. Definētajai datu analīzes procedūrai attiecībā uz piesātinājuma un konkurējošās saistīšanās datiem jāatbilst pamatprincipiem, ko izmanto receptora–liganda mijiedarbības raksturošanai. Parasti piesātinājuma–saistīšanās datus analizē, izmantojot nelineāru regresijas modeli, kas atspoguļo gan kopējo, gan nespecifisko saistīšanos. Iespējams, ka, nosakot B_{max} un K_d ,

vajadzēs izmantot liganda noplicināšanās korekciju (piem., *Swillens*, 1995 (19)). Datus no konkurējošās saistīšanās testiem parasti transformē (piem., procentuālā specifiskā saistīšanās un testējamās ķīmikālijas koncentrācija ($\log M$)). Katras testējamās ķīmikālijas aplēstais $\log (IC_{50})$ ir jānosaka, izmantojot piemērotu nelineāras līknes piemēklēšanas programmatūru, lai panāktu atbilstību Hilla vienādojumam ar četriem parametriem. Pēc sākotnējās analīzes jāpārbauda, vai līkne atbilst parametriem, un vizuāli jānosaka, cik precīzi saistīšanās dati atbilst ģenerētajai konkurējošās saistīšanās līknei. Dažos gadījumos, lai panāktu precīzāko atbilstību līknei, var būt jāveic papildu analīze (piem., ierobežojot līknes augšējo un/vai apakšējo punktu, izmantojot 10 % kritēriju, sk. 4. papildinājumu un 2. atsauci (III.A.2. iedaļa)).

22. Ja ir izpildīti pieņemamības kritēriji (20. punkts), tas nozīmē, ka testa sistēma darbojas pareizi, tomēr tas negarantē, ka konkrētajā testā tiks iegūti pareizi dati. Labākais pierādījums iegūto datu pareizībai ir pareizu pirmā izpildītā testa rezultātu replicēšana.

Vispārīgie datu interpretācijas kritēriji

23. Pašlaik nav vispārpieņemtas metodes, kā interpretēt ER saistīšanās datus. Tomēr visi *hrER*-mediētas aktivitātes kvalitatīvie (piem., saisteklis/nesaisteklis) un/vai kvantitatīvie (piem., $\log IC_{50}$, relatīvā afinitāte (*relative binding affinity* — *RBA*), utt.) novērtējumi jābalsta uz empīriskiem datiem un pamatotiem zinātniskiem spriedumiem.

Testēšanas pārskats

24. Testēšanas pārskatā norāda šādas ziņas.

Tests:

- izmantotais tests.

Kontroles/references/testējamā ķīmikālija:

- avots, sērijas numurs, izmantošanas termiņš, ja pieejams;
- pašas testējamās ķīmikālijas stabilitāte, ja zināma;
- testējamās ķīmikālijas šķīdība un stabilitāte šķīdinātājā, ja zināma;
- (attiecīgā gadījumā) pH, osmolalitātes un nogulsnešanās mērījums kultūras barotnē, kurā testējamā ķīmikālija pievienota.

Vienkomponenta viela:

- izskats, šķīdība ūdenī un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības;
- ķīmiskā identifikācija, piem., *IUPAC* vai *CAS* nosaukums, *CAS* numurs, *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula, tīrība, piemaisījumu ķīmiskā identitāte (attiecīgā gadījumā, ja šī informācija ir pieejama) utt.

Vairākkomponentu viela, *UVCB* un maisījumi:

- iespējami izsmeļošs raksturojums, norādot sastāvdaļu ķīmisko identitāti (sk. iepriekš), kvantitatīvo saturu un relevantās fizikālķīmiskās īpašības.

Šķīdinātājs/nesējs:

- raksturojums (veids, piegādātājs un sērija);
- šķīdinātāja/nesēja izvēles pamatojums;
- testējamās ķīmikālijas šķīdība un stabilitāte šķīdinātājā/nesējā, ja zināma.

Receptori:

- receptoru avots (piegādātājs, kataloga Nr., sērija, receptora suga, piegādātāja nodrošinātā aktīvo receptoru koncentrācija, piegādātāja sertifikāts);
- receptoru raksturojums (ieskaitot piesātinājuma–saistīšanās rezultātus): K_d , B_{max} ;
- receptoru uzglabāšana;
- radioaktīvi marķētais ligands:
- piegādātājs, kataloga Nr., sērija, specifiskā aktivitāte.

Testēšanas apstākļi:

- šķīdības ierobežojums konkrētā testa apstākļos;
- saistīšanās buferšķīduma sastāvs;
- receptora koncentrācija;
- iezīmētā elementa (t. i., radioaktīvi marķētā liganda) koncentrācija;
- testējamās ķīmikālijas koncentrācijas;
- nesēja saturs (procentuāli) galīgajā testā;
- inkubācijas temperatūra un ilgums;
- metode ar kuru nosaka, vai saistīts/brīvs;
- pozitīvās un negatīvās kontroles/references vielas;
- kritēriji, pēc kuriem novērtē, vai testa rezultāts ir pozitīvs, negatīvs vai neskaidrs.

Pieņemamības pārbaude

- faktiskās IC_{50} un Hilla virziena koeficienta vērtības paralēlajām pozitīvajām kontroles/references vielām.

Rezultāti:

- jēldati un saistītie/brīvie dati;
- denaturēta apstiprinoša pārbaude (attiecīgā gadījumā);

- zemākā efektīvā koncentrācija (*LEC*), ja tāda ir;
- RBA un/vai IC_{50} vērtība (attiecīgā gadījumā);
- ja iespējams, koncentrācijas–atbildreakcijas sakarība;
- statistiskās analīzes (attiecīgā gadījumā), kā arī kļūdas un ticamības mērs (piem., vidējās vērtības standartnovirze (*SEM*), standartnovirze (SN), variācijas koeficients (VK) vai 95% ticamības intervāls (*CI*)) un apraksts, kā šīs vērtības iegūtas.

Rezultātu iztirzājums:

- 10% kritērija piemērošana.

Secinājums

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; Zraly, Z; Neca, J; Simeckova, P; Vondracek, J; Machala, M. (2008). Estrogenic Activity of Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Uterus of Immature Wistar Rats. *Toxicol. Letters*, 180: 213-221.
- (17) Gozgit, JM; Nestor, KM; Fasco, MJ; Pentecost, BT; Arcaro, KF. (2004). Differential Action of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Endogenous Estrogen-Responsive Genes and on a Transfected Estrogen-Responsive Reporter in MCF-7 Cells. *Toxicol. and Applied Pharmacol.*, 196: 58-67.
- (18) Santodonato, J. (1997). Review of the Estrogenic and Antiestrogenic Activity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Relationship to Carcinogenicity. *Chemosphere*, 34: 835-848.
- (19) Swillens S (1995). Interpretation of Binding Curves Obtained with High Receptor Concentrations: Practical Aid for Computer Analysis, *Mol Pharmacol* 47(6):1197-1203.

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS UN SAĪSINĀJUMI

10 % kritērijs: izvēle no analīzes izslēgt tādus datu punktus, kuros ar replikātiem iegūtā [^3H]17 β -estradiola specifiskās saistīšanās procentuālā vidējā vērtība par 10 % vai vairāk pārsniedz pie zemākas koncentrācijas iegūto vidējo vērtību (sk. 4. papildinājumu).

Pieņemamības kritēriji: minimālie standarti, kas attiecas uz eksperimenta kontrolēm un references standartiem. Lai eksperimentu uzskatītu par derīgu, visiem pieņemamības kritērijiem jābūt izpildītiem.

Pareizība (konkordantums): pakāpe, kādā testa rezultāti sakrīt ar pieņemtajām atsauces vērtībām. Tas ir testa veikspējas raksturlielums un viens no tā relevantuma aspektiem. Ar šo terminu, tāpat kā terminu “konkordantums”, bieži vien saprot testa pareizo iznākumu īpatsvaru (1).

KS: ESAO konceptuālais satvars (KS) endokrīno disruptoru testēšanai un izvērtēšanai.

Ķimikālija: viela vai maisījums.

VK: variācijas koeficients.

E2: 17 β -estradiols.

ED: endokrīnā disrupcija.

hER α : cilvēka estrogēnreceptors alfa.

ER: estrogēnreceptors.

Estrogēniskā aktivitāte: ķimikālijas spēja imitēt 17 β -estradiolu, proti, saistīties ar estrogēnreceptoriem. Ar šo testēšanas metodi var konstatēt saistīšanos ar hER α .

IC₅₀: testējamās inhibējošās ķimikālijas 50 % efektīvā koncentrācija.

ICCVAM: Alternatīvo metožu validēšanas koordinēšanas starpāģentūru komiteja.

Starplaboratoriju reproducējamība: lielums, kas raksturo, kādā mērā vairākas kvalificētas laboratorijas spēj iegūt kvalitatīvi un kvantitatīvi līdzīgus rezultātus, ja tās izmanto vienu un to pašu protokolu un vienas un tās pašas testējamās vielas. Starplaboratoriju reproducējamību (saukta arī par “interlaboratoriju reproducējamību”) nosaka prevalidēšanas un validēšanas procesā, un šis lielums rāda, cik lielā mērā testēšanu vienlīdz sekmīgi iespējams veikt dažādās laboratorijās (1).

Iekšlaboratorijas reproducējamība: lielums, kas raksturo, kādā mērā vienā laboratorijā strādājoši kvalificēti darbinieki spēj sekmīgi atkārtot iepriekš iegūtus rezultātus, ja to pašu protokolu izmanto citā laikā. Saukts arī par “intralaboratoriju reproducējamību” (1).

LEC: zemākā efektīvā koncentrācija ir zemākā koncentrācija, kurā testējamā ķīmikālija izraisa reakciju (t. i., testējamās ķimikālijas zemākā koncentrācija, pie kuras indukcijas reizinājums ir statistiski atšķirīgs no paralēlās nesēja kontroles).

Atdarinājuma tests: sadzīvisks apzīmējums testam, kas ir noteikšanas mehānisma vai funkcionalitātes ziņā līdzīgs validētai un pieņemtai testēšanas references metodei. Brīvi aizstājams ar līdzīgu testēšanas metodi.

PBTG: veikspējā balstītas testēšanas vadlīnijas.

Veikspējas standarti: uz validētu testēšanas metodi bāzēti standarti, pēc kuriem izvērtē noteikšanas mehānisma vai funkcionalitātes ziņā līdzīgu testu salīdzināmību. Tie ietver: 1) nepieciešamos testa komponentus; 2) minimālo tādu references ķīmikāliju sarakstu, kuras izraudzītas no citām ķīmikālijām, ko izmanto, lai pierādītu pieņemamu validētās testēšanas metodes veikspēju; kā arī 3) uz attiecīgajā validētajā testēšanas metodē iegūto rezultātu pamata — salīdzināmus pareizības un ticamības līmeņus, kādi būtu jāiegūst ar ierosināto testu, to izvērtējot ar references ķīmikālijām no minimālā saraksta (1).

Standartvielas: veikspējas standartos iekļauto references vielu apakškopa, ko laboratorijas var izmantot, lai pierādītu savu tehnisko kompetenci ar standartizētu testu. Šādu vielu atlases kritēriji parasti ir, piemēram šādi: viela ir reprezentatīva dažādām reakcijām, ir komerciāli pieejama un par to pieejami ļoti kvalitatīvi references dati.

Kompetence: vēl pirms nezināmu vielu testēšanas pierādīta spēja pienācīgi veikt testu.

References estrogēns: 17β-estradiols (E2, CAS 50-28-2).

References testēšanas metodes: testi, uz kuriem balstās PBTG Nr. 493.

RBA: relatīvā afinitāte. Vielas RBA aprēķina kā procentuālu vērtību no vielas log (IC₅₀) attiecībā pret 17β-estradiola log (IC₅₀).

Relevantums: parametrs, kas raksturo testa attiecināmību uz interesējošo ietekmi un to, vai testu lietot konkrētam nolūkam ir jēgpilni un noderīgi. Tā ir pakāpe, kādā ar testu var pareizi izmērīt vai prognozēt interesējošo bioloģisko ietekmi. Relevantums ietver arī testa pareizības (konkordantuma) aspektu (1).

Ticamība: parametrs, kas izsaka, kādā pakāpē vienā un tajā pašā laboratorijā vai dažādās laboratorijās pēc vienu un tā paša protokola var ilgstoši reproducējami veikt konkrētu testu. To novērtē, aprēķinot reproducējamību vienā laboratorijā un vairākās laboratorijās.

SN: standartnovirze.

Testējamā ķīmikālija: viela vai maisījums, kuru testē ar šo testēšanas metodi.

Validēta testēšanas metode: tests, kura relevantums (ieskaitot pareizību) un ticamība attiecībā uz lietošanu konkrētā nolūkā ir pārbaudīta validācijas pētījumos. Jāievēro, ka validētas testēšanas metodes veikspēja pareizības un ticamības ziņā var nebūt pietiekama, lai to izmantotu paredzētajam nolūkam (1).

Validācija: Process, kurā nosaka, kādā mērā konkrēta pieeja, metode, tests, process vai novērtējums ir ticams un relevants konkrētajam nolūkam (1).

2. papildinājums

FREIBERGERA–VILSONA *IN VITRO* TESTI, KAS BALSTĀS UZ PIESĀTINĀJUMU UN KONKURĒJOŠO SAISTĪŠANOS AR ESTROGĒNRECEPTORU ($ER\alpha$) UN KUROS IZMANTO PILNU REKOMBINANTO $ER\alpha$

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI (SK. ARĪ VISPĀRĪGO IEVADU)

1. Šis *in vitro* piesātinājuma un konkurējošās saistīšanās ar estrogēnreceptoriem ($ER\alpha$) tests izmanto pilnu cilvēka receptoru — $ER\alpha$ (*hrER* α) —, iegūtu un izolētu no insektu šūnām, kuras inficētas ar bakulovīrusu. Freibergera un Vilsona izstrādātajam protokolam veikts starptautisks daudzlaboratoriju validēšanas pētījums (2), kas pierādīja testa relevanci un ticamību paredzētajam nolūkam.
2. Šis tests ir skrīninga procedūra, ar ko identificē vielas, kas spēj saistīties ar pilnu *hrER* α . To izmanto, lai noteiktu testējamās ķīmikālijas spēju konkurēt ar 17β -estradiolu attiecībā uz saistīšanos ar *hrER* α . Kvantitatīvie testa rezultāti var ietvert IC_{50} (mērs, kas rāda testējamās ķīmikālijas koncentrāciju, kas vajadzīga, lai no *hrER* α pārvietotu pusi no [^3H]- 17β -estradiola) un testējamo ķīmikāliju relatīvo afinitāti attiecībā uz *hrER* α salīdzinājumā ar 17β -estradiolu. Ķīmiskā skrīninga vajadzībām pieņemami kvalitatīvie testa rezultāti var ietvert testējamo ķīmikāliju klasificēšanu saistīgās vai nesaistīgās ar *hrER* α vai tādās, kuru saistīgums ir neskaidrs, uz to kritēriju pamata, kas aprakstīti attiecībā uz saistīšanās līknēm.
3. Testā izmanto radioaktīvi marķētu ligandu, tāpēc laboratorijai būs vajadzīga radioaktīvo materiālu licence. Visas procedūras ar radioaktīvajiem izotopiem un bīstamām ķīmikālijām jāveic, ievērojot nacionālajos tiesību aktos paredzētos noteikumus un procedūras.
4. Pirms šā testa izmantošanas regulatīviem mērķiem jāizlasa sadaļas “**VISPĀRĪGAIS IEVADS**” un “***HrER* SAISTĪŠANĀS TESTA KOMPONENTI**”. Šajā testēšanas vadlīnijā izmantotās definīcijas un saīsinājumi ir aprakstīti 1. papildinājumā.

TESTA PRINCIPI (SK. ARĪ VISPĀRĪGO IEVADU)

5. *HrER* α saistīšanās tests mēra radioaktīvi iezīmēta liganda ([^3H] 17β -estradiola) spēju saistīties ar *ER* arvien pieaugošu testējamās ķīmikālijas (t. i., konkurenta) koncentrāciju klātbūtnē. Testējamās ķīmikālijas, kam piemīt augsta *ER* afinitāte, konkurē ar radioaktīvi iezīmēto ligandu pie zemākas koncentrācijas nekā ķīmikālijas ar zemāku receptora afinitāti.
6. Šis tests sastāv no diviem svarīgākajiem komponentiem: piesātinājuma–saistīšanās eksperimenta, kas raksturo receptora–liganda mijiedarbības parametrus, un konkurējošās saistīšanās eksperimenta, kas attiecībā uz saistīšanos ar *ER* raksturo konkurenci starp testējamo ķīmikāliju un radioaktīvi marķēto ligandu.

7. Piesātinājuma–saistīšanās eksperimenta mērķis ir raksturot konkrētas receptoru partijas afinitāti un konkurējošās saistīšanās eksperimentā — to skaitu preparātā. Piesātinājuma–saistīšanās eksperiments līdzsvara apstākļos mēra fiksētas estrogēnreceptora koncentrācijas afinitāti tā dabīgajam ligandam (to izsaka disociācijas konstante, K_d), un aktīvo receptoru domēnu koncentrāciju (B_{max}).
8. Konkurējošās saistīšanās eksperiments mēra tādas vielas afinitāti, kura attiecībā uz saistīšanos ar ER konkurē ar $[^3\text{H}]17\beta$ -estradiolu. Afinitāti kvantitatīvi izsaka kā testējamās ķīmikālijas koncentrāciju, kas līdzsvara apstākļos inhibē 50 % $[^3\text{H}]17\beta$ -estradiola specifiskās saistīšanās (apzīmē kā “50 % inhibējošo koncentrāciju” vai IC_{50}). To var izvērtēt arī, izmantojot relatīvo afinitāti (RBA , relatīvā salīdzinājumā ar estradiola IC_{50} , ko atsevišķi mēra tajā pašā izpildes reizē). Konkurējošās saistīšanās eksperiments mēra fiksētas koncentrācijas $[^3\text{H}]17\beta$ -estradiola spēju saistīties ar ER plaša testējamās ķīmikālijas koncentrāciju diapazona (astoņas intensitātes pakāpes) klātbūtnē. Pēc tam, ja iespējams, datus pārveido Hilla vienādojuma (A. Hills, 1910) formā, kas apraksta radioaktīvi marķētā liganda pārvietošanu, ko izraisa viena domēna konkurējošais saisteklis. Radioaktīvi marķētā estradiola pārvietošanas pakāpe līdzsvara apstākļos tiek izmantota, lai testējamo ķīmikāliju raksturotu kā saistīgu, nesaistīgu vai tādu, kam ir neskaidra reakcija.

PROCEDŪRA

Pieņemamas *hrERα* proteīna veikspējas pierādīšana

9. Pirms piesātinājuma un konkurējošās saistīšanās testu ieviešanas laboratorijas ikdienas praksē attiecībā uz katru jaunu *hrERα* partiju ir jāpierāda to veikspējas pareizība laboratorijā, kurā to izmantos. Veikspēju pierāda ar divu etapu procedūru. Proti,
 - veic $[^3\text{H}]$ -17β-estradiola saistīšanās–piesātinājuma testu, lai pierādītu *hrERα* specifiskumu un piesātinājumu. Ar iegūto datu nelineāras regresijas analīzi (piem., *BioSoft*; *McPherson*, 1985; *Motulsky*, 1995) un no tiem izveidotu Skačārda (*Scatchard*) diagrammu dokumentē *hrERα* spēju saistīt $[^3\text{H}]$ -17β-estradiolu (K_d) un katras partijas receptoru skaitu (B_{max});
 - veic konkurējošās saistīšanas testu, izmantojot kontroles vielas (references estrogēnu (17β-estradiolu), vāji saistīgu vielu (piem., noretinodrelu vai noretindronu) un nesaistīgu vielu (oktiltrietoksilānu (OTES))). Katra laboratorija izveido un uztur vēsturisku datubāzi, kurā dokumentē IC_{50} konsekvencu un citas būtiskas references estrogēna un vāja saistekļa vērtības, kas iegūtas dažādos eksperimentos un ar atšķirīgām *hrERα* partijām. Ar kontroles vielām iegūto konkurējošās saistīšanās līkņu parametriem jābūt 95 % ticamības intervāla robežās (sk. 1. tabulu); tas izstrādāts, izmantojot to laboratoriju datus, kuras piedalījās šā testa validēšanas pētījumā (2).

1. tabula. References estrogēna un vāja saistekļa veiktspējas kritēriji, kas izstrādāti *FW hrER* saistīšanās testam.

Viela	Parametrs	Vidējā vērtība ^a	Standartnovirze (n)	95 % ticamības intervāli ^b	
				apakšējā robeža	augšējā robeža
17β-estradiols	augstākais (%)	100,44	10,84 (67)	97,8	103,1
	zemākais (%)	0,29	1,25 (67)	-0,01	0,60
	Hilla virziena koeficients	-1,06	0,20 (67)	-1,11	-1,02
	LogIC ₅₀ (M)	-8,92 ^c	0,18 (67)	-8,97	-8,88
Noretinodrels	augstākais (%)	99,42	8,90 (68)	97,27	101,60
	zemākais (%)	2,02	3,42 (68)	1,19	2,84
	Hilla virziena koeficients	-1,01	0,38 (68)	-1,10	-0,92
	Log IC ₅₀ (M)	-6,39	0,27 (68)	-6,46	-6,33
Noretindrons^c	augstākais (%)	96,14	8,44 (27)	92,80	99,48
	zemākais (%)	2,38	5,02 (27)	0,40	4,37
	Hilla virziena koeficients	-1,41	0,32 (27)	-1,53	-1,28
	LogIC ₅₀ (M)	-5,73	0,27 (27)	-5,84	-5,62

^aVidējā vērtība (n) ± standartnovirze (SN) kontroles testu izpildes reizēm, ko validēšanas pētījuma gaitā veica četras laboratorijas, tika aprēķināta, izmantojot liknei atbilstošo parametru aplēses (Hilla vienādojumu ar četriem parametriem) (sk. 2. atsauci N pielikumu).

^b95 % ticamības intervāli sniegti kā paraugs pieņemamības kritērijiem.

^cValidēšanas pētījuma 4. apakšuzdevumā noretindrona testēšana nebija obligāta (sk. 2. atsauci, sk. 4. apakšuzdevumu). Tādējādi vidējā vērtība ± SN (n) kontroles testu veikšanas reizēm, ko īstenoja divas laboratorijas, tika aprēķināta, izmantojot liknei atbilstošo parametru aplēses (Hilla vienādojumu ar četriem parametriem).

IC₅₀ diapazons būs atkarīgs no receptoru preparāta Kd un katrā konkrētajā laboratorijā izmantotās radioaktīvi marķētā liganda koncentrācijas. Ir pieņemama IC₅₀ diapazona atbilstoša pielāgošana, ņemot vērā to, kādos apstākļos tests ir veikts.

Laboratorijas kvalifikācijas pierādīšana

10. Sk. šīs testēšanas metodes sadaļas “**hrER SAISTĪŠANĀS TESTA KOMPONENTI**” 17. un 18. punktu un 2. tabulu. Katrā (piesātinājuma un konkurējošās saistīšanās) testā īsteno trīs neatkarīgas testa izpildes reizes (t. i., ar jauniem receptora atšķaidījumiem, ķimikālijām un reaģentiem), tās veic dažādās dienās un katrā izpildes reizē izmanto trīs replikātus.

Receptora (*hrERα*) koncentrācijas noteikšana

11. Aktīvā receptora koncentrācija katrā atsevišķā partijā un atkarībā no uzglabāšanas apstākļiem var būt nedaudz atšķirīga. Tāpēc ir jānosaka no piegādātāja saņemtā aktīvā receptora koncentrācija. Tas ļaus panākt atbilstošu aktīvā receptora koncentrāciju testa veikšanas laikā.

12. Apstākļos, kas atbilst konkurējošās saistīšanās apstākļiem (proti, ar 1 nM [³H]-estradiola), nominālas receptora koncentrācijas — 0,25, 0,5, 0,75 un 1 nM — inkubē bez estradiola (kopējā saistīšanās) un ar 1 μM nemarķēta estradiola (nespecifiskā saistīšanās). Grafiski attēlo sakarību starp specifisko saistīšanos (starpību starp kopējo saistīšanos un nespecifisko saistīšanos) un receptora nominālo koncentrāciju. Receptora koncentrācija, pie kuras iegūst tādas specifiskās saistīšanās vērtības, kas atbilst 40 % pievienotā radioaktīvā marķējuma, ļauj noteikt atbilstošo nominālo receptora koncentrāciju, kuru attiecīgi izmanto piesātinājuma un konkurējošās saistīšanās eksperimentiem. Samērā bieži galīgā *hrER* koncentrācija, kas atbilst šim nosacījumam, ir 0,5 nM.
13. Ja pēc atkārtotiem mēģinājumiem neizdodas sasniegt 20 % kritēriju, eksperimenta uzstādījumus pārbauda attiecībā uz iespējamām kļūdām. Nespēja sasniegt 20 % kritēriju var norādīt, ka rekombinantajā partijā ir ļoti maz aktīvā receptora; šādos gadījumos jāapsver iespēja izmantot citu receptora partiju.

Piesātinājuma tests

14. [³H]17β-estradiola astoņu augoša stipruma koncentrāciju triplikātus vērtē, pie šādiem trim turpmāk uzskaitītajiem nosacījumiem (sk. 2. tabulu):
- testu veic bez nemarķēta 17β-estradiola un ER klātbūtnē. Šādi, mērot radioaktivitāti iedobēs, kurās ir tikai [³H]17β-estradiols, nosaka kopējo saistīšanos;
 - testu veic ar nemarķēta 17β-estradiola koncentrāciju, kas tūkstoškārt pārsniedz marķētā 17β-estradiola koncentrāciju, un ER klātbūtnē. Šāda nosacījuma mērķis ir piesātināt aktīvos saistīšanās domēnus ar nemarķētu 17β-estradiolu un, mērot radioaktivitāti iedobēs, noteikt nespecifisko saistīšanos. Visu pārējo karsto estradiolu, kas spēj saistīties ar receptoru, uzskata par nespecifiskā domēnā saistīgu, jo aukstajam estradiolam jābūt tik lielā koncentrācijā, ka tas saistās ar visiem uz receptora pieejamajiem specifiskajiem domēniem;
 - testu veic bez nemarķēta 17β-estradiola un bez ER (kopējās radioaktivitātes noteikšana).

[³H]-17β-estradiola un nemarķēta 17β-estradiola šķīdumu sagatavošana

15. Buferšķīdumam pievienojot 12 nM [³H]-17β-estradiola izejšķīduma, sagatavo [³H]-17β-estradiola atšķaidījumus, kuru sākotnējās koncentrācijas ir 0,12 nM–12 nM. Galīgā testa koncentrācijas diapazonā no 0,03 līdz 3,0 nM iegūst, 40 μl šādi sagatavoto šķīdumu iepilnot attiecīgajās 96 iedobju mikrotitrēšanas plates iedobēs (beigu tilpums 160 μl). Testa buferšķīduma, [³H]-17β-estradiola izejšķīduma un atšķaidījumu sagatavošana, kā arī koncentrāciju noteikšana ir sīki izskaidrota *FW* testa protokolā (2).
16. Atšķaidījumus no etanolu saturoša 17β-estradiola šķīduma sagatavo, pievienojot tam testa buferšķīdumu, lai iegūtu astoņas augoša stipruma koncentrācijas, kas sākotnēji ir diapazonā no 0,06 μM līdz 6 μM. Galīgā testa koncentrācijas diapazonā no 0,03 μM līdz 3 μM iegūst, 80 μl šādi sagatavoto šķīdumu iepilnot attiecīgajās 96 iedobju mikrotitrēšanas plates

iedobēs (beigu tilpums 160 μ l). Nemarkētā 17 β -estradiola galīgajai koncentrācijai atsevišķās nespecifiskās saistīšanās testa iedobēs jābūt tūkstoškārt lielākai par marķētā [³H]-17 β - estradiola koncentrāciju. Nemarkēta 17 β -estradiola atšķaidījumu sagatavošana ir sīki izskaidrota *FW* testa protokolā (2).

17. Izmanto receptora nominālo koncentrāciju, pie kuras specifiskā saistīšanās ir 20 $\pm$ 5 % (sk. 12.-13. punktu). *hrER α* šķīdumu jāsgatavo tieši pirms lietošanas.

18. 96 iedobju mikrotitrēšanas plates sagatavo saskaņā ar 2. tabulas norādījumiem, katrai koncentrācijai sagatavojot trīs replikātus. 2.2. papildinājumā sniegts piemērs [³H]-17 β -estradiola, nemarkēta 17 β -estradiola, buferšķīduma un receptora koncentrācijām un tilpumiem testa platē.

2. tabula. Piesātinājuma–saistīšanās testa mikrotitrēšanas plates izkārtojums

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [³ H] E ₂ + ER			0,06 nM [³ H] E ₂ + ER			0,08 nM [³ H] E ₂ + ER			0,10 nM [³ H] E ₂ + ER			Kopējā saistīšanās (šķīdinātājs)
B	0,30 nM [³ H] E ₂ + ER			0,60 nM [³ H] E ₂ + ER			1,0 nM [³ H] E ₂ + ER			3,0 nM [³ H] E ₂ + ER			
C													
D	0,03 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,03 μM E ₂			0,06 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,06 μM E ₂			0,08 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,08 μM E ₂			0,10 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,10 μM E ₂			Nespecifis kā saistīšanās
E	0,30 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,30 μM E ₂			0,60 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,60 μM E ₂			1,0 nM [³ H] E ₂ + ER + 1,0 μM E ₂			3,0 nM [³ H] E ₂ + ER + 3,0 μM E ₂			
F													
G													
H													

[³H] E₂: [³H]-17 β -estradiols

ER: estrogēnreceptors

E₂: nemarkēts 17 β -estradiols

19. Testa mikrotitrēšanas plates 16 līdz 20 stundas inkubē 2° līdz 8°C temperatūrā un inkubācijas periodā novieto rotatora.

Ar hrER α saistītā [³H]-17 β -estradiola mērīšana

20. [³H]-17 β -estradiolu, kas piesaistījies *hrER α* , no brīvā [³H]-17 β -estradiola atdala, katrā iedobē pievienojot 80 μ l aukstas DCC suspensijas, tad 10 minūtes kratot mikrotitrēšanas plates un 10 minūtes centrifugējot ar aptuveni 2500 apgr./min. Lai procedūras gaitā nepieļautu [³H]-17 β -estradiola atdalīšanos no *hrER α* , kam tas piesaistījies, ir ļoti svarīgi buferšķīdumus un testa iedobes turēt 2 līdz 8°C temperatūrā un katru testa soli veikt ātri. Lai plates varētu apstrādāt ātri un efektīvi, ir vajadzīgs mikrotitrēšanas plašu kratītājs.

21. Ņem 50 µl supernatanta, kas satur ar *hrERα* saistīto [³H]-17β-estradiolu, un novieto uz otras mikrotitrēšanas plates; to dara ar īpašu piesardzību, lai nepieļautu iedobju kontamināciju, saskaroties DCC.

22. Pēc tam katrai iedobei (A1–B12 un D1–E12) pievieno 200 µl scintilācijas šķidruma, kas kodolemisiju kinētisko enerģiju spēj pārveidot gaismas enerģijā. Katrā no G1–H12 (kopējam *dpm* atbilstošajām) iedobēm iepilina 40 µl [³H]-17β-estradiola sērijveida atšķaidījuma; tam jānokļūst tieši scintilācijas šķīdumā mērījumu plates iedobēs atbilstoši 3. tabulas norādījumiem, proti, šajās iedobēs jābūt tikai 200 µl scintilācijas šķidruma un atbilstošam [³H]-17β-estradiola atšķaidījumam. Ar šiem mērījumiem pierāda, cik daudz [³H]-17β-estradiola (izteikta *dpm*) pievienots katrā iedobju kopumā, kas demonstrē kopējo saistīšanos un nespecifisko saistīšanos.

3. tabula. Piesātinājuma–saistīšanās testa mikrotitrēšanas plates izkārtojums, radioaktivitātes mērījums

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [³ H] E ₂ + ER			0,06 nM [³ H] E ₂ + ER			0,08 nM [³ H] E ₂ + ER			0,10 nM [³ H] E ₂ + ER			Kopējā saistīšanās (šķīdinātājs)
B	0,30 nM [³ H] E ₂ + ER			0,60 nM [³ H] E ₂ + ER			1,0 nM [³ H] E ₂ + ER			3,0 nM [³ H] E ₂ + ER			
C													
D	0,03 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,03 μM E ₂			0,06 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,06 μM E ₂			0,08 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,08 μM E ₂			0,10 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,10 μM E ₂			Nespecifiskā saistīšanās
E	0,30 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,30 μM E ₂			0,60 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,60 μM E ₂			1,0 nM [³ H] E ₂ + ER + 1,0 μM E ₂			3,0 nM [³ H] E ₂ + ER + 3,0 μM E ₂			
F													
G	0,03 nM [³ H] E ₂ (kopējais <i>dpm</i>)			0,06 nM [³ H] E ₂			0,08 nM [³ H] E ₂			0,10 nM [³ H] E ₂			(kopējais <i>dpm</i>)
H	0,30 nM [³ H] E ₂			0,60 nM [³ H] E ₂			1,0 nM [³ H] E ₂			3,0 nM [³ H] E ₂			

[³H] E₂: [³H]-17β-estradiols

ER: estrogēnreceptors

E₂: nemarkēts 17β-estradiols

dpm: sabrukumu skaits minūtē

*Šeit karstie marķētā [³H]-estradiola sērijveida atšķaidījumi tieši jāpievieno 200 µl scintilācijas šķīduma G1–H12 iedobēs.

23. Mērījumu sāk ne mazāk kāpēc divu stundu ilgas nogaidīšanas, un skaitīšanas laiks katrai iedobei ir 40 minūtes. Nosakot *dpm* uz iedobi un piemērojot slāpēšanas korekciju, izmanto mikrotitrēšanas plates scintilāciju skaitītāju. Ja mikrotitrēšanas plates scintilāciju skaitītājs nav pieejams, paraugu skaitīšanai var izmantot parasto skaitītāju. Šādā gadījumā var apsvērt skaitīšanas laika samazināšanu.

Konkurējošās saistīšanās tests

24. Konkurējošās saistīšanās tests mēra vienas konkrētas [^3H]-17 β - estradiola koncentrācijas saistīšanos arvien pieaugošu testējamās ķīmikālijas koncentrāciju klātbūtnē. Katrā testa veikšanas reizē izmanto trīs paralēlus katras koncentrācijas replikātus. Papildus tam attiecībā uz katru testējamo ķīmikāliju testu izpilda trīs reizes, un tas nenotiek paralēli, bet dažādos laikos. Testu veic vienā vai vairākās 96 iedobju mikrotitrēšanas platēs.

Kontroles

25. Veicot testu, katrā eksperimentā jāiekļauj paralēlais šķīdinātājs un kontroles (t. i., references estrogēns, vājš saisteklis un nesaisteklis). Katrā testa izpildes reizē vienā plātē ir jābūt atsaucē estrogēna un kontroļu (t.i. vāja saistekļa un nesaistekļa) pilnai koncentrāciju līknei. Visās pārējās platēs ir jābūt: i) katra E2 un vāja saistekļa triplikātiem augstā koncentrācijā (maksimāla pārvietošana) un vidējā koncentrācijā (aptuveni IC_{50}); ii) šķīdinātāja kontroles un nespecifiskās saistīšanās triplikātiem. Testa buferšķīduma, kontroļu, [^3H]-17 β -estradiola, *hrER* α un testējamo ķīmikāliju šķīdumu sagatavošanas procedūras ir aprakstītas 2. atsaucē (sk. *FW* testa protokolu K pielikumā).

Šķīdinātāja kontrole

26. Šķīdinātāja kontrole rāda, vai nenotiek šķīdinātāja mijiedarbība ar testa sistēmu, kā arī mēra kopējo saistīšanos (apzīmē ar “TB” — *total binding*). Ieteicamais šķīdinātājs ir etanols. Ja testējamās ķīmikālijas visaugstākā koncentrācija etanolā nešķīst, kā alternatīvu var izmantot dimetilsulfoksīdu (“DMSO”). Galīgajā testā etanola vai attiecīgā gadījumā DMSO koncentrācijai iedobēs jābūt 1,5 % un ne vairāk kā 2 %.

Buferšķīduma kontrole

27. Buferšķīduma kontrole (“BC”) nedrīkst saturēt ne šķīdinātāju, ne testējamo ķīmikāliju, bet tā satur visus citus testa komponentus. Buferšķīduma kontroles rezultātus salīdzina ar šķīdinātāja kontroli, lai verificētu, ka izmantotais šķīdinātājs neietekmē testa sistēmu.

Stiprs saisteklis (references estrogēns)

28. 17 β -estradiols (*CAS* 50-28-2) ir endogēns ligands ar augstu afinitāti (alfa apakštipa) ER. Katram *hrER* α konkurējošās saistīšanās testam sagatavo standarta līkni ar nemarķētu 17 β -estradiolu, lai varētu novērtēt, kāda ir mainība laika gaitā, veicot testu tajā pašā laboratorijā. Sagatavo astoņus nemarķēta 17 β -estradiola šķīdumus etanolā tā, lai testa iedobēs šķīdumu koncentrācija būtu no 100 nM–10 pM (-7[logM] līdz -11[logM]), ar šādiem intervāliem: (-7[logM], -8[logM], -8.5[logM], -9[logM], -9.5[logM], -10[logM], -11[logM]). Nemarķēta 17 β -estradiola (1 μM) augstākā koncentrācija kalpo arī kā nespecifiskās saistīšanās (*NSB*) indikators. 4. tabulā šo koncentrāciju apzīmē ar kodu “NSB”, lai gan tā ir arī standarta līknes daļa.

Vājš saisteklis

29. Lai demonstrētu katra eksperimenta jutīgumu un ļautu novērtēt, kāda ir rezultātu mainība, veicot testu laika gaitā, tajā iekļauj vāju saistekli (noretinodrelu (*CAS* 68-23-5) vai noretindronu (*CAS* 68-22-4). Sagatavo astoņus vāja saistekļa šķīdumus etanolā tā, lai testa iedobēs šķīdumu koncentrācija būtu 3 nM–30 pM (no -8,5[logM] līdz -4,5[logM]), ar šādiem intervāliem: -4,5[logM], -5[logM], -5,5[logM], -6[logM], -6,5[logM], -7[logM], -7,5[logM], -8,5[logM].

Nesaisteklis

30. Kā negatīvo kontroli (nesaistekli) izmanto oktiltrietoksisilānu (OTES, *CAS* 2943-75-1). Tas apstiprinās, ka tests spēs noteikt ķīmikālijas, kas nesaistās ar *hrERα*. Sagatavo astoņus vāja saistekļa šķīdumus etanolā tā, lai testa iedobēs šķīdumu koncentrācija būtu 0,1 nM–1000 μM (no -10[logM] līdz -3[logM]), ar logaritmisku palielinājumu. Alternatīvi par nesaistekļa kontroli var izmantot di-*n*-butilftalātu (DBP). Ir pierādīts, ka tā maksimālā šķīdība testā ir -4[logM].

HrERα koncentrācija

31. Izmanto receptora daudzumu, pie kura specifiskā saistīšanās ir 20±5 % no 1 nM radioaktīvi marķētā liganda (sk. 2. papildinājuma 12.-13. punktu). *HrERα* šķīdumu jāsagatavo tieši pirms lietošanas.

[³H]-17β-estradiols

32. [³H]-17β-estradiola koncentrācija testa iedobēs ir 1,0 nM.

Testējamās ķīmikālijas

33. Vispirms ir jāveic šķīdības tests, lai noteiktu katras testējamās ķīmikālijas šķīdības robežu un identificētu piemērotu koncentrācijas diapazonu, kas tiks izmantots testa protokolā. Sākotnēji katras testējamās ķīmikālijas šķīdības robežu nosaka šķīdinātājā un pēc tam apstiprina testēšanas apstākļos. Galīgā testā izmantojamā koncentrācija nepārsniedz 1 mM. Diapazona noteikšanas testēšanā ietilpst šķīdinātāja kontrole; paralēli tai testē astoņus sērijveida logaritmiskus atšķaidījumus, sākot ar augstāko pieņemamo koncentrāciju (piem., 1 mM vai zemāku, balstoties uz šķīdības robežu), un vēro, kad šķīdums kļūst duļķains vai rada nogulsnes (sk. arī 35. punktu). Testējamo ķīmikāliju testē, izmantojot līkni ar astoņām log koncentrācijām un diapazona noteikšanas testā identificētajiem intervāliem. Trešā un ceturtā eksperimenta koncentrācijas būtu jāpielāgo pēc vajadzības, lai labāk raksturotu koncentrācijas–atbildreakcijas līkni.
34. Testējamās ķīmikālijas atšķaidījumus sagatavo atbilstošā šķīdinātājā (sk. 2. papildinājuma 26. punktu). Ja testējamās ķīmikālijas augstākā koncentrācija nešķīst ne etanolā, ne DMSO un lielāka šķīdinātāja daudzuma pievienošana galīgajā testa stobriņā novestu pie pieņemamās robežas pārsniegšanas, augstāko koncentrāciju var samazināt par vienu intervālu uz leju. Šādā gadījumā sērijveida koncentrācijas var papildināt ar vienu papildkoncentrāciju diapazona apakšā. Visas pārējas sērijveida koncentrācijas paliek nemainīgas.

35. Pievienojot testējamās ķīmikālijas šķīdumus testa iedobēs, tos rūpīgi vēro, jo pievienošanas laikā var rasties nogulsnes. Datus par tām iedobēm, kurās konstatē nogulsnes, neņem vērā, pielāgojot datus līknei, un testa pārskatā norāda izslēgšanas iemeslu.
36. Ja no citiem avotiem jau ir pieejama informācija par testējamās ķīmikālijas log (IC_{50}), atšķaidījumus var būt lietderīgi ģeometriski izkārtot (t. i., pa 0,5 log vienībām ap paredzamo log (IC_{50})). Galīgajam rezultātam būtu jāatspoguļo pietiekama koncentrāciju izkliede abās log (IC_{50}) pusēs, arī līknes augšējā un apakšējā punktā, un koncentrācijām jābūt pietiekami raksturojošām attiecībā uz saistīšanās līkni.

Testa plates izkārtojums

37. Sagatavo marķētas mikrotitrēšanas plates, kurās ir pa sešiem šādiem kodētiem inkubētiem replikātiem: šķīdinātāja kontrole un references estrogēns visaugstākajā koncentrācijā, kas kalpo arī par nespecifiskās saistīšanās (NSB) rādītāju; un pa trim šādiem kodētiem inkubētiem replikātiem: astoņas nesaistīgās kontroles (oktiltrietoksisilāna) koncentrācijas, septiņas references estrogēna zemākās koncentrācijas, astoņas vāja saistekļa devas līmeņa koncentrācijas un astoņas koncentrācijas no katras testējamās ķīmikālijas (TC). Mikrotitrēšanas plates izkārtojuma diagrammas paraugs pilnām references estrogēna un kontroļu koncentrāciju līknēm ir sniegts 4. tabulā. Atsevišķas mikrotitrēšanas plates izmanto testējamām ķīmikālijām, un tajās jāiekļauj testa plates kontroles, t. i., 1) E2 un vāja saistekļa triplikāti augstā koncentrācijā (maksimāla pārvietošana) un vidējā koncentrācijā (aptuveni IC_{50}); 2) šķīdinātāja kontrole un nespecifiskā saistīšanās, no katra pa sešiem replikātiem (5. tabula). Konkurējošās saistīšanās testa mikrotitrēšanas plates izkārtojuma darblapas paraugs ar trijām nezināmām testējamajām ķīmikālijām ir dots 2.3. papildinājumā. 4. un 5. tabulā norādītās koncentrācijas ir galīgās testa koncentrācijas. Maksimālā E2 koncentrācija ir 1×10^{-7} M, un attiecībā uz vāju saistekli jāizmanto augstākā koncentrācija, kas 1. mikrotitrēšanas platē izmantota vājam saisteklī. IC_{50} koncentrāciju nosaka laboratorija, balstoties uz savu vēsturisko kontroles datubāzi. Tiek sagaidīts, ka šī vērtība būs līdzīga validācijas pētījumos konstatētajai vērtībai (sk. 1. tabulu).

4. tabula. Konkurējošās saistīšanās testa mikrotitrēšanas plates izkārtojums, pilnas atsauces estrogēnu un kontroļu koncentrāciju līknes (1. plate).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (tikai šķīdinātājs)			TB (tikai šķīdinātājs)			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})			Tukša iedobe*		
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	tukša iedobe (karsta)**	tukša iedobe (karsta)**	Buferšķīduma kontrole	Buferšķīduma kontrole

Šajā piemērā vājšais saisteklis ir noretinodrels (apzīmēts "NE").

* Reāli tukša iedobe, netiek izmantota.

** Tukša iedobe, netiek izmantota inkubācijas laikā, bet to izmanto, lai apstiprinātu kopējo pievienoto radioaktivitāti.

5. tabula. Konkurējošās saistīšanās testa mikrotitrēšanas plates izkārtojums, pilnas testējamo ķīmikāliju un plates kontroļu koncentrāciju līknes.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (tikai šķīdinātājs)			TB (tikai šķīdinātājs)			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 (1×10 ^{-4,5})			E2 (IC ₅₀)			E2 (1×10 ⁻⁷)		

Šajā piemērā vājšais saisteklis ir noretinodrels (apzīmēts "NE").

Konkurējošās saistīšanās testa izpilde

38. Kā parādīts 6. tabulā, katrā testēšanas iedobē pievieno 80 µl šķīdinātāja kontroles, testa buferšķīduma kontroles, references estrogēna, vāja saistekļa, nesaistekļa un testa buferšķīdumā sagatavotas testējamās ķīmikālijas. Pēc tam katrā iedobē pievieno 40 µl 4 nM [³H]-17β-estradiola šķīduma. 10 līdz 15 minūtes viegli rotē 2–8°C temperatūrā, pēc tam pievieno 40 µl hrERα šķīduma. Testa mikrotitrēšanas plates 16 līdz 20 stundas inkubē 2° līdz 8°C temperatūrā un inkubācijas periodā novieto rotatora.

6. tabula. HrER konkurējošās saistīšanās testa komponentu tilpums mikrotitrēšanas platēs

Tilpums (µl)	Komponents
80	Nemarķēts 17β-estradiols, noretinodrels, OTES, testējamās ķīmikālijas, šķīdinātājs vai buferšķīdums
40	4 nM [³ H]-17β-estradiola šķīduma
40	hrERα šķīdums ar noteiktu koncentrāciju
160	Kopējais tilpums katrā testa plates iedobē

39. Pēc tam (saskaņā ar piesātinājuma–saistīšanās testa apraksta 20.–23. punktu) kvantificē ar *hrERα* saistīto [³H]-17β-estradiolu, taču pirms tam, katrā iedobē pievienojot 80 μl aukstas DCC suspensijas, no brīvā [³H]-17β-estradiola atdala ar *hrERα* saistīto [³H]-17β-estradiolu/
40. Iedobes H1–6 (sk. aili “Tukša iedobe (karsta)” 4. tabulā) raksturo marķēta [³H]-estradiola *dpm* 40 μl. 40 μl alikvotu pārnes tieši scintilācijas šķīdumā iedobēs H1–H6.

Pieņemamības kritēriji

Piesātinājuma–saistīšanās tests

41. Ja tiek izmantotas pieaugošas [³H]-17β-estradiola koncentrācijas, specifiskās saistīšanās līknei ir jāsasniedz atslābuma periods, kas norāda uz *hrERα* piesātinājumu ar ligandu.
42. Pieņemamības diapazons attiecībā uz specifisko saistīšanos pie 1 nM [³H]-17β-estradiola koncentrācijas ir 15–25% no kopējās pievienotās radioaktivitātes vidējās vērtības, kas mērīta visās izpildes reizēs. Ir pieļaujamas atsevišķas nelielas novirzes no minētā diapazona, tomēr, ja izpildes reizēs pastāvīgi iegūst rezultātus ārpus minētā diapazona vai ja konkrētā izpildes reizē novirze ir ļoti būtiska, ir jāpielāgo proteīnu koncentrācija un piesātinājuma tests jāatkārto.
43. Datiem jābūt attēlojamiem lineāras Skačārda diagrammas veidā.
44. Nespecifiskā saistīšanās nedrīkst būt pārmērīga. Nespecifiskās saistīšanās vērtība parasti ir <35 % no kopējās saistīšanās. Tomēr minētā procentuālā attiecība dažkārt šo limitu var pārsniegt, ja testā tiek mērīts ļoti zems *dpm* pie zemākās radioaktīvi marķētā 17β-estradiola koncentrācijas.

Konkurējošās saistīšanās tests

45. Pie pieaugošām nemarķēta 17β-estradiola koncentrācijām [³H]-17β-estradiolu pakāpeniski pārvieto no receptora tādā veidā, kas līdzinās viena domēna konkurējošajai saistīšanai.
46. References estrogēna (t. i., 17β-estradiola) IC₅₀ vērtībai jābūt aptuveni vienādai ar [³H]-17β-estradiola molāro koncentrāciju, kam pieskaitīta piesātinājuma–saistīšanās testā noteiktā diasociācijas konstante (*K_d*).
47. Visās testa izpildes reizēs kopējās specifiskās saistīšanās vērtībai pastāvīgi jābūt pieņemamības diapazonā (20 ± 5 %), pie nosacījuma, ka kopējās pievienotās radioaktivitātes vidējā mērītā koncentrācija katrā iedobē ir 1 nM. Ir pieļaujamas atsevišķas nelielas novirzes no minētā diapazona, tomēr, ja izpildes reizēs pastāvīgi iegūst rezultātus ārpus minētā diapazona vai ja konkrētā izpildes reizē novirze ir ļoti būtiska, ir jāpielāgo proteīnu koncentrācija.
48. Šķīdinātājs nedrīkst mainīt testa jutīgumu vai reproducējamību. Šķīdinātāja kontroles rezultātus (TB iedobes) salīdzina ar buferšķīduma kontroli, lai verificētu, ka izmantotais

šķīdinātājs neietekmē testa sistēmu. Ja šķīdinātājs neietekmē testa gaitu, TB un buferšķīduma kontrolēm jābūt salīdzināmām.

49. Testējot ar koncentrācijām, kas nepārsniedz 10^{-3} M (OTES) vai 10^{-4} M (DBP), nesaisteklīm nevajadzētu no *hrERα* pārvietot vairāk nekā 25 % [^3H]-17β-estradiola.
50. Izmantojot *FW hrER* saistīšanās testa validēšanas pētījuma datus (2. atsaucē N pielikums), tika izstrādāti references estrogēna un divu vāju saistekļu (piem., noretinodrels, noretindrons) veikspējas kritēriji. Ir sniegti 95 % ticamības intervāli vidējām vērtībām (n) $\pm$ SN; tās tika iegūtas no visiem kontroles testiem, ko izpildīja laboratorijas, kuras piedalījās validēšanas pētījumā. 95 % ticamības intervālus aprēķināja references estrogēna un vāju saistekļu līknes pielāgošanas parametriem (t. i., augšējam un apakšējam punktam, Hilla virziena koeficientam un $\log \text{IC}_{50}$) un vāju saistekļu $\log_{10} \text{RBA}$ attiecībā pret references estrogēnu; tos izmanto par pozitīvās kontroles veikspējas kritērijiem. 1. tabulā sniegti līknes pielāgošanas parametru paredzamie diapazoni, kurus var izmantot kā veikspējas kritērijus. Praksē IC_{50} diapazons var būt nedaudz atšķirīgs atkarībā no receptora preparāta *Kd* un liganda koncentrācijas.
51. Testējamo ķīmikāliju līknes pielāgošanas parametriem veikspējas kritēriji izstrādāti netika, jo pastāv pārāk plašs esošu potenciāli testējamu ķīmikāliju spektrs un potenciālās afinitātes un rezultātu mainīgums (piem., pilna līkne, daļēja līkne, neatbilstība līknei). Tomēr katrā testēšanas reizē un ar katru testējamo ķīmikāliju iegūtos rezultātus būtu jāizvērtē speciālistam. Testā jāizmanto pietiekams testējamās ķīmikālijas koncentrāciju diapazons, lai skaidri definētu konkurējošās saistīšanās līknes augšējo punktu (t. i., 90–100 % saistīšanās). Rezultātu mainībai starp katras testējamās ķīmikālijas koncentrācijas replikātiem, kā arī starp trim neatkarīgajām izpildes reizēm jābūt saprātīgi pieļaujamās robežās un zinātniski pamatojamai. Izpildot kontroles testus attiecībā uz katru testējamo ķīmikāliju, mērījumiem būtu jāatbilst veikspējas parametriem, kas paziņoti attiecībā uz šo *FW* testu, un tiem jābūt saskanīgiem ar attiecīgās laboratorijas vēsturiskajiem kontroldatiem.

DATU ANALĪZE

Piesātinājuma–saistīšanās tests

52. Tiek mērīta gan kopējā, gan nespecifiskā saistīšanās. No šīm vērtībām, nespecifisko saistīšanos atņemot no kopējās saistīšanās, tiek aprēķināta pieaugošu [^3H]-17β-estradiola koncentrāciju specifiskā saistīšanās līdzsvara apstākļos. Grafikā, kurā specifisko saistīšanos attēlo attiecībā pret [^3H]-17β-estradiola koncentrāciju, attiecībā uz maksimālo specifisko saistīšanos ir jāsasniedz atslābuma periods, kas norāda uz *hrERα* piesātinājumu ar [^3H]-17β-estradiolu. Turklāt datu analīzē būtu jākonstatē [^3H]-17β-estradiola saistīšanās ar vienu augstas afinitātes saistīšanās domēnu. Piesātinājuma–saistīšanās līknē attēlo nespecifisko, kopējo un specifisko saistīšanos. Šo datu turpmākai analīzei izmanto

nelineārās regresijas analīzi (piem., *BioSoft*; *McPherson*, 1985; *Motulsky*, 1995), un galīgos datus attēlo ar Skačārda diagrammu.

53. Analizējot datus, *Bmax* un *Kd* nosaka no kopējās saistīšanās datiem vien, izmantojot pieņēmumu, ka nespecifiskā saistīšanās ir lineāra, ja vien nav pamatota iemesla izmantot citu metodi. Turklāt, meklējot labāko atbilstību līknei, izmanto robustu regresiju, ja vien nav pamatota iemesla rīkoties citādi. Pārskatā norāda izvēlēto robustas regresijas metodi. Nosakot *Bmax* un *Kd* no piesātinājuma–saistīšanās datiem, vienmēr jāizmanto liganda noplicināšanās korekcija (piem., *Swillens* (1995) metode).

Konkurējošās saistīšanās tests

54. Konkurējošās saistīšanās līkni grafiski attēlo kā specifisko [³H]-17β-estradiola saistīšanos attiecībā pret konkurenta koncentrāciju (log₁₀ vienībās). Testējamās ķīmikālijas koncentrācija, kas inhibē 50 % [³H]17β-estradiola maksimālās specifiskās saistīšanās, ir IC₅₀ vērtība.
55. Pozitīvo kontroļu (t. i., references estrogēna un vāja saistekļa) log (IC₅₀) vērtību aplēses nosaka, izmantojot atbilstošu nelineāru līknes piemeklēšanas programmatūru, lai panāktu atbilstību Hilla vienādojumam ar četriem parametriem (piem., *BioSoft*; *McPherson*, 1985; *Motulsky*, 1995). Veicot pielāgošanu līknei, augšējo un apakšējo punktu, virziena koeficientu un log (IC₅₀) parasti neierobežo. Meklējot labāko atbilstību līknei, izmanto robustu regresiju, ja vien nav pamatota iemesla rīkoties citādi. Liganda noplicināšanās korekciju neizmanto. Pēc sākotnējās analīzes katru saistīšanās līkni pārskata, lai nodrošinātu pienācīgu atbilstību paraugam. Vāja saistekļa relatīvo afinitāti (*RBA*) aprēķina kā procentuālu vērtību no vāja saistekļa log (IC₅₀) attiecībā pret 17β-estradiola log (IC₅₀). Ar pozitīvajām kontrolēm un nesaistekļu kontrolēm iegūtos rezultātus izvērtē, sekojot testa veikšanas norādēm 2. papildinājuma 45.–50. punktā.
56. Datus par visām testējamajām ķīmikālijām būtu jāanalizē, izmantojot pakāpenisku pieeju, kas nodrošina datu pienācīgu analīzi un to, ka katra konkurējošās saistīšanās līkne tiek klasificēta pareizi. Pirms katras testa veikšanas reizes testējamās ķīmikālijas datus sākotnēji analizē standartizētā veidā, identiski tam, kā tiek analizēti references estrogēns un vāja saistekļa kontroles (sk. 55. punktu iepriekš tekstā). Pēc tam katrā testa veikšanas reizē tehniski pārskata, vai līkne atbilst parametriem, un vizuāli nosaka, cik precīzi dati atbilst ģenerētajai konkurējošās saistīšanās līknei. Ja šīs tehniskās pārbaudes laikā novēro, ka [³H]-17β-estradiola specifiskā saistīšanās atkarībā no koncentrācijas procentuāli samazinās, rezultātu mainība tehnisko replikātu starpā pie katras ķīmiskās koncentrācijas ir neliela un līknes atbilstība parametriem trīs testa veikšanas reizēs ir konsekventa, tas ir pietiekami uzticams rādītājs, ka tests un datu analīze ir veikti pareizi.

Datu interpretācija

57. Pie nosacījuma, ka ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķīmikāliju uzskata par saistīgu ar $hrER\alpha$, ja saistīšanās līkne ir pielāgojama un zemākais atbildreakcijas līknes punkts datu diapazonā ir mazāks par 50 % (1. attēls).

58. Pie nosacījuma, ka ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķīmikāliju uzskata par nesaistīgu ar $hrER\alpha$, ja:

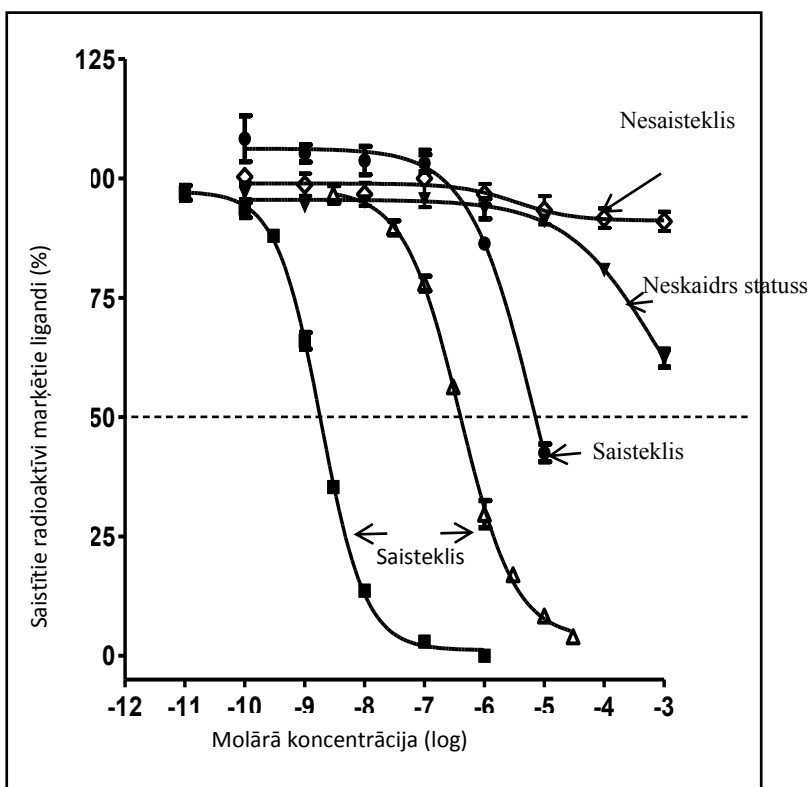
- saistīšanās līkne ir pielāgojama un pielāgotās atbildreakcijas līknes zemākais punkts datu diapazonā ir lielāks par 75 % vai
- saistīšanās līkni pielāgot nevar un visu koncentrāciju grupu vidējā zemākā nenoapaļotā procentuālā saistīšanās pēc datiem pārsniedz 75 %.

59. Testējamās ķīmikālijas klasifikāciju uzskata par neskaidru, ja nav izpildīts neviens no iepriekšminētajiem nosacījumiem (t. i., zemākais pielāgotās atbildreakcijas līknes punkts ir robežās no 76 – 51 %).

7. tabula. Kritēriji, pēc kuriem klasificē testējamās ķīmikālijas, izmantojot konkurējošās saistīšanās līkni.

Klasifikācija	Kritēriji
Saisteklis ^a	Saistīšanās līkni var pielāgot. Zemākais atbildreakcijas līknes punkts datu diapazonā ir mazāks par 50 %.
Nesaisteklis ^b	Ja saistīšanās līkni var pielāgot, pielāgotās atbildreakcijas līknes zemākais punkts datu diapazonā ir virs 75 %. Ja saistīšanās līkni nevar pielāgot, visu koncentrāciju grupu vidējā zemākā nenoapaļotā procentuālā saistīšanās pēc datiem pārsniedz 75 %.
Neskaidra ^c	Jebkura testa izpildes reize, kas neuzrāda testējamās ķīmikālijas saistīgumu vai nesaistīgumu (piem., pielāgotās atbildreakcijas līknes zemākais punkts ir robežās no 76–51 %).

1. attēls. Piemēri, kā klasificē testējamās ķīmikālijas, izmantojot konkurējošās saistīšanās līkni.



60. Laboratorijā attiecībā uz katru testējamo ķīmikāliju testu veic vairākas izpildes reizes, un katrai izpildes reizei atkarībā no rezultāta piešķir ciparisku vērtību, no kuras pēc tam aprēķina vidējo vērtību atbilstoši 8. tabulā sniegtajam paraugam. Vidējos rezultātus, kas apkopoti konkrētajā laboratorijā, salīdzina ar gaidīto katras testējamās ķīmikālijas klasifikāciju.

8. tabula. Metode, pēc kuras klasificē testējamo ķīmikāliju, izmantojot vairākas testēšanas reizes vienā laboratorijā.

Katrai izpildes reizei piešķir ciparisku vērtību:	
Klasifikācija	Cipariska vērtība
Saisteklis	2
Neskaidrs	1
Nesaisteklis	0
Izpildes reizēs iegūto ciparisko vērtību vidējās vērtības klasificēšana:	
Klasifikācija	Cipariska vērtība
Saisteklis	Vidēji $\geq 1,5$
Neskaidrs	$0,5 \leq \text{Vidējā vērtība} < 1,5$
Nesaisteklis	Vidēji $< 0,5$

TESTĒŠANAS PĀRSKATS

61. Sk. šīs testēšanas metodes sadaļas “*Hr*ER SAISTĪŠANĀS TESTA KOMPONENTI”
24. punktu.

2.1. papildinājums

TERMINU SARAKSTS

[³H]E2: 17β-estradiols, radioaktīvi marķēts ar tritiju.

DCC: ar dekstrānu pārklāta ogle.

E2: nemarķēts 17β-estradiols (inerts).

Testa buferšķīdums: 10 mM tris, 10 mg liellopu seruma albumīna/ml, 2 mM DTT, 10 % glicerīna, 0,2 mM leupeptīna (pH 7,5).

hrERα: cilvēka rekombinantais estrogēnreceptors alfa.

Replikāts: viena no vairākām vienāda satura un vienādas koncentrācijas iedobēm, kuras paralēli testē vienā testēšanas reizē. Pēc šī protokola katru testējamās ķīmikālijas koncentrāciju testē ar trim replikātiem (triplikātiem); proti, pie katras testējamās ķīmikālijas koncentrācijas ir trīs replikāti, kurus testē vienlaicīgi.

Izpildes reize: viss paralēli testēto miktotitrēšanas plates testa iedobju kopums, kas nodrošina visu informāciju, kura vajadzīga, lai raksturotu testējamās ķīmikālijas saistīšanos ar hrERα, (t. i., kopējais testa iedobei pievienotais [³H]-17β-estradiols, maksimālā [³H]-17β-estradiola saistīšanās ar hrERα, nespecifiskā saistīšanās un kopējā saistīšanās pie dažādām testējamās ķīmikālijas koncentrācijām). Izpildes reize var nozīmēt pat tikai vienas testēšanas iedobes (t. i., replikāta) testēšanu pie katras koncentrācijas, tomēr šajā konkrētajā gadījumā protokols pieprasa testēt ar triplikātiem, un viena izpildes reize nozīmē trīs testēšanas iedobes pie katras koncentrācijas. Papildus minētajam šis protokols prasa ar katru ķīmikāliju veikt trīs neatkarīgas (proti, neveicot paralēli) izpildes reizes.

2.2. papildinājums

TIPISKS [³H]-17B-ESTRADIOLA PIESĀTINĀJUMA TESTS AR TRIJĀM REPLIKĀTA IEDOBĒM

Tipisks [³ H]-17β-estradiola piesātinājuma tests ar trijām replikāta iedobēm											
Pozīcija	Replikāts	Iedobes tipa kods	Karsta E2 sākotnējā koncentrācija (nM)	Karsta E2 tilpums (μl)	Karsta E2 beigu koncentrācija (nM)	Auksta E2 sākotnējā koncentrācija (nM)	Auksta E2 tilpums (μl)	Auksta E2 beigu koncentrācija (nM)	Bufēršķiduma tilpums (μl)	Receptora tilpums (μl)	Kopējais tilpums iedobēs
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

Tipisks [³ H]-17β-estradiola piesātinājuma tests ar trijām replikāta iedobēm											
Pozīcija	Replikāts	Iedobes tipa kods	Karsta E2 sākotnējā koncentrācija (nM)	Karsta E2 tilpums (μl)	Karsta E2 beigu koncentrācija (nM)	Auksta E2 sākotnējā koncentrācija (nM)	Auksta E2 tilpums (μl)	Auksta E2 beigu koncentrācija (nM)	Buferšķīduma tilpums (μl)	Receptora tilpums (μl)	Kopējais tilpums iedobēs
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	Karsta	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G2	2	Karsta	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G3	3	Karsta	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G4	1	Karsta	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G5	2	Karsta	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G6	3	Karsta	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G7	1	Karsta	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G8	2	Karsta	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G9	3	Karsta	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G10	1	Karsta	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G11	2	Karsta	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G12	3	Karsta	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
H1	1	Karsta	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H2	2	Karsta	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H3	3	Karsta	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H4	1	Karsta	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H5	2	Karsta	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H6	3	Karsta	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H7	1	Karsta	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H8	2	Karsta	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H9	3	Karsta	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H10	1	Karsta	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H11	2	Karsta	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H12	3	Karsta	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40

Piezīme: "karstās" iedobes inkubācijas laikā ir tukšas. 40 μl pievieno tikai scintilāciju skaitīšanai.

2.3. papildinājums Konkurējošās saistīšanās testa iedobju izkārtojums

Plate	Pozīcija	Replikāts	Iedobes tips	Iedobes kods	Koncentrācijas kods	Konkurenta sākotnējā koncentrācija (M)	hrER izejšķārdums (μl)	Bufēršķiduma tilpums (μl)	Iezīmētā elementa (karsta E2) tilpums (μl)	Tilpums atšķaidījuma platē (μL)	Beigu tilpums (μl)	Konkurenta beigu koncentrācija (M)
S	A1	1	kopējā saistīšanās	TB	TB1	-	40		40	80	160	-
S	A2	2	kopējā saistīšanās	TB	TB2	-	40		40	80	160	-
S	A3	3	kopējā saistīšanās	TB	TB3	-	40		40	80	160	-
S	A4	1	kopējā saistīšanās	TB	TB4	-	40		40	80	160	-
S	A5	2	kopējā saistīšanās	TB	TB5	-	40		40	80	160	-
S	A6	3	kopējā saistīšanās	TB	TB6	-	40		40	80	160	-
S	A7	1	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	A8	2	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	A9	3	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	A10	1	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	A11	2	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	A12	3	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	B1	1	auksts E2	S	S1	2,00E-07	40	-	40	80	160	1,0E-07
S	B2	2	auksts E2	S	S1	2,00E-07	40	-	40	80	160	1,0E-07
S	B3	3	auksts E2	S	S1	2,00E-07	40	-	40	80	160	1,0E-07
S	B4	1	auksts E2	S	S2	2,00E-08	40	-	40	80	160	1,0E-08
S	B5	2	auksts E2	S	S2	2,00E-08	40	-	40	80	160	1,0E-08
S	B6	3	auksts E2	S	S2	2,00E-08	40	-	40	80	160	1,0E-08
S	B7	1	auksts E2	S	S3	6,00E-09	40	-	40	80	160	3,0E-09
S	B8	2	auksts E2	S	S3	6,00E-09	40	-	40	80	160	3,0E-09
S	B9	3	auksts E2	S	S3	6,00E-09	40	-	40	80	160	3,0E-09
S	B10	1	auksts E2	S	S4	2,00E-09	40	-	40	80	160	1,0E-09
S	B11	2	auksts E2	S	S4	2,00E-09	40	-	40	80	160	1,0E-09
S	B12	3	auksts E2	S	S4	2,00E-09	40	-	40	80	160	1,0E-09
S	C1	1	auksts E2	S	S5	6,00E-10	40	-	40	80	160	3,0E-10
S	C2	2	auksts E2	S	S5	6,00E-10	40	-	40	80	160	3,0E-10
S	C3	3	auksts E2	S	S5	6,00E-10	40	-	40	80	160	3,0E-10
S	C4	1	auksts E2	S	S6	2,00E-10	40	-	40	80	160	1,0E-10
S	C5	2	auksts E2	S	S6	2,00E-10	40	-	40	80	160	1,0E-10
S	C6	3	auksts E2	S	S6	2,00E-10	40	-	40	80	160	1,0E-10
S	C7	1	auksts E2	S	S7	2,00E-11	40	-	40	80	160	1,0E-11
S	C8	2	auksts E2	S	S7	2,00E-11	40	-	40	80	160	1,0E-11
S	C9	3	auksts E2	S	S7	2,00E-11	40	-	40	80	160	1,0E-11
S	C10	1	tukša	tukša	B1	-	-	160	-	-	160	-
S	C11	2	tukša	tukša	B2	-	-	160	-	-	160	-
S	C12	3	tukša	tukša	B3	-	-	160	-	-	160	-
S	D1	1	noretinodrels	NE	WP1	6,00E-05	40	-	40	80	160	3,0E-05
S	D2	1	noretinodrels	NE	WP1	6,00E-05	40	-	40	80	160	3,0E-05
S	D3	1	noretinodrels	NE	WP1	6,00E-05	40	-	40	80	160	3,0E-05
S	D4	1	noretinodrels	NE	WP2	2,00E-05	40	-	40	80	160	1,0E-05
S	D5	1	noretinodrels	NE	WP2	2,00E-05	40	-	40	80	160	1,0E-05
S	D6	1	noretinodrels	NE	WP2	2,00E-05	40	-	40	80	160	1,0E-05
S	D7	1	noretinodrels	NE	WP3	6,00E-06	40	-	40	80	160	3,0E-06
S	D8	1	noretinodrels	NE	WP3	6,00E-06	40	-	40	80	160	3,0E-06
S	D9	1	noretinodrels	NE	WP3	6,00E-06	40	-	40	80	160	3,0E-06

S	D10	1	noretinodrels	NE	WP4	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	D11	1	noretinodrels	NE	WP4	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	D12	1	noretinodrels	NE	WP4	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06

Konkurējošās saistīšanās testa iedobju izkārtojums												
Plate	Pozīcija	Replikāts	Iedobes tips	Iedobes kods	Koncentrācijas kods	Konkurenta sākotnējā koncentrācija (M)	hr-ER izejšķārdums (μl)	Bufēršķārduma tilpums (μl)	Iezīmēta elementa (karsta E2) tilpums (μL)	Tilpums atšķaidījuma platē (μL)	Beigu tilpums (μl)	Konkurenta beigu koncentrācija (M)
S	E1	1	noretinodrels	NE	WP	6,00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E2	2	noretinodrels	NE	WP	6,00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E3	3	noretinodrels	NE	WP	6,00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E4	1	noretinodrels	NE	WP	2,00E-07-	40		40	80	160	1,0E-07
S	E5	2	noretinodrels	NE	WP	2,00E-07-	40		40	80	160	1,0E-07
S	E6	3	noretinodrels	NE	WP	2,00E-07-	40		40	80	160	1,0E-07
S	E7	1	noretinodrels	NE	WP	6,00E-08	40	-	40	80	160	3,0E-08
S	E8	2	noretinodrels	NE	WP	6,00E-08	40	-	40	80	160	3,0E-08
S	E9	3	noretinodrels	NE	WP	6,00E-08	40	-	40	80	160	3,0E-08
S	E10	1	noretinodrels	NE	WP	6,00E-09	40	-	40	80	160	3,0E-09
S	E11	2	noretinodrels	NE	WP	6,00E-09	40	-	40	80	160	3,0E-09
S	E12	3	noretinodrels	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	karsta	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H2	1	karsta	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H3	1	karsta	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H4	1	karsta	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H5	1	karsta	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H6	1	karsta	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H7	1	bufēršķārduma kontrole	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H8	1	bufēršķārduma kontrole	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H9	1	bufēršķārduma kontrole	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H10	1	bufēršķārduma kontrole	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H11	1	bufēršķārduma kontrole	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H12	1	bufēršķārduma kontrole	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-

Piezīme: "karstās" iedobes inkubācijas laikā ir tukšas. 40 μl pievieno tikai scintilācijas skaitīšanai.

Konkurējošās saistīšanās testa iedobju izkārtojums													
Plate	Pozīcija	Replikāts	Iedobes tips	Iedobes kods	Koncentrācijas kods	Konkurenta sākotnējā koncentrācija (M)	IrER	Izejšķāpums (nL)	Bufersšķiduma tilpums (μL) Iezīmētā	elementa (karsta F2) tilpums (nL)	atšķaidījuma platē (nL)	Beigu tilpums (μl)	Konkurenta beigu koncentrācija (M)
P1	A1	1	kopējā saistīšanās	TB	TBB1B1	-		40	-	40	80	160	-
P1	A2	2	kopējā saistīšanās	TB	TB2	-		40	-	40	80	160	-
P1	A3	3	kopējā saistīšanās	TB	TB3	-		40	-	40	80	160	-
P1	A4	1	kopējā saistīšanās	TB	TB4	-		40	-	40	80	160	-
P1	A5	2	kopējā saistīšanās	TB	TB5	-		40	-	40	80	160	-
P1	A6	3	kopējā saistīšanās	TB	TB6	-		40	-	40	80	160	-
P1	A7	1	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S0	2,00E-06		40	-	40	80	160	1,0E-06
P1	A8	2	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S0	2,00E-06		40	-	40	80	160	1,0E-06
P1	A9	3	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S0	2,00E-06		40	-	40	80	160	1,0E-06
P1	A10	1	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S0	2,00E-06		40	-	40	80	160	1,0E-06
P1	A11	2	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S0	2,00E-06		40	-	40	80	160	1,0E-06
P1	A12	3	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S0	2,00E-06		40	-	40	80	160	1,0E-06
P1	B1	1	testējamā ķīmikālija 1	TC1	1	2,00E-03		40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B2	2	testējamā ķīmikālija 1	TC1	1	2,00E-03		40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B3	3	testējamā ķīmikālija 1	TC1	1	2,00E-03		40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B4	1	testējamā ķīmikālija 1	TC1	2	2,00E-04		40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B5	2	testējamā ķīmikālija 1	TC1	2	2,00E-04		40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B6	3	testējamā ķīmikālija 1	TC1	2	2,00E-04		40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B7	1	testējamā ķīmikālija 1	TC1	3	2,00E-05		40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B8	2	testējamā ķīmikālija 1	TC1	3	2,00E-05		40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B9	3	testējamā ķīmikālija 1	TC1	3	2,00E-05		40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B10	1	testējamā ķīmikālija 1	TC1	4	2,00E-06		40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	B11	2	testējamā ķīmikālija 1	TC1	4	2,00E-06		40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	B12	3	testējamā ķīmikālija 1	TC1	4	2,00E-06		40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	C1	1	testējamā ķīmikālija 1	TC1	5	2,00E-07		40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C2	2	testējamā ķīmikālija 1	TC1	5	2,00E-07		40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C3	3	testējamā ķīmikālija 1	TC1	5	2,00E-07		40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C4	1	testējamā ķīmikālija 1	TC1	6	2,00E-08		40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C5	2	testējamā ķīmikālija 1	TC1	6	2,00E-08		40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C6	3	testējamā ķīmikālija 1	TC1	6	2,00E-08		40	0	40	80	160	1,0E-08

P1	C7	1	testējamā ķīmikālija 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C8	2	testējamā ķīmikālija 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C9	3	testējamā ķīmikālija 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C10	1	testējamā ķīmikālija 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	C11	2	testējamā ķīmikālija 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	C12	3	testējamā ķīmikālija 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	D1	1	testējamā ķīmikālija 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D2	2	testējamā ķīmikālija 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D3	3	testējamā ķīmikālija 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D4	1	testējamā ķīmikālija 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D5	2	testējamā ķīmikālija 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D6	3	testējamā ķīmikālija 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D7	1	testējamā ķīmikālija 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D8	2	testējamā ķīmikālija 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D9	3	testējamā ķīmikālija 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D10	1	testējamā ķīmikālija 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	D11	2	testējamā ķīmikālija 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	D12	3	testējamā ķīmikālija 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	E1	1	testējamā ķīmikālija 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E2	2	testējamā ķīmikālija 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E3	3	testējamā ķīmikālija 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07

Konkurējošās saistīšanās testa iedobju izkārtojums													
Plate	Pozīcija	Replikāts	Iedobes tips	Iedobes kods	Koncentrācijas kods	Konkurenta sākotnējā koncentrācija (M)	h/rER	Izejšķidums (μL)	Bufēršķiduma tilpums (μL)	Iezīmētā elementa (karsta F2) tilpums (μL)	atšķaidījuma platē (μL)	Beigu tilpums (μl)	Konkurenta beigu koncentrācija (M)
P1	E4	1	testējamā ķīmikālija 2	TC2	6	-		40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E5	2	testējamā ķīmikālija 2	TC2	6	-		40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E6	3	testējamā ķīmikālija 2	TC2	6	-		40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E7	1	testējamā ķīmikālija 2	TC2	7	2,00E-06		40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E8	2	testējamā ķīmikālija 2	TC2	7	2,00E-06		40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E9	3	testējamā ķīmikālija 2	TC2	7	2,00E-06		40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E10	1	testējamā ķīmikālija 2	TC2	8	2,00E-06		40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	E11	2	testējamā ķīmikālija 2	TC2	8	2,00E-06		40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	E12	3	testējamā ķīmikālija 2	TC2	8	2,00E-06		40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	F1	1	testējamā ķīmikālija 3	TC3	1	2,00E-03		40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F2	2	testējamā ķīmikālija 3	TC3	1	2,00E-03		40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F3	3	testējamā ķīmikālija 3	TC3	1	2,00E-03		40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F4	1	testējamā ķīmikālija 3	TC3	2	2,00E-04		40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F5	2	testējamā ķīmikālija 3	TC3	2	2,00E-04		40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F6	3	testējamā ķīmikālija 3	TC3	2	2,00E-04		40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F7	1	testējamā ķīmikālija 3	TC3	3	2,00E-05		40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F8	2	testējamā ķīmikālija 3	TC3	3	2,00E-05		40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F9	3	testējamā ķīmikālija 3	TC3	3	2,00E-05		40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F10	1	testējamā ķīmikālija 3	TC3	4	2,00E-06		40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	F11	2	testējamā ķīmikālija 3	TC3	4	2,00E-06		40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	F12	3	testējamā ķīmikālija 3	TC3	4	2,00E-06		40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	G1	1	testējamā ķīmikālija 3	TC3	5	2,00E-07		40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G2	2	testējamā ķīmikālija 3	TC3	5	2,00E-07		40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G3	3	testējamā ķīmikālija 3	TC3	5	2,00E-07		40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G4	1	testējamā ķīmikālija 3	TC3	6	2,00E-08		40	0	40	80	160	1,0E-08

P1	G5	2	testējamā ķīmikālija 3	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G6	3	testējamā ķīmikālija 3	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G7	1	testējamā ķīmikālija 3	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G8	2	testējamā ķīmikālija 3	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G9	3	testējamā ķīmikālija 3	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G10	1	testējamā ķīmikālija 3	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	G11	2	testējamā ķīmikālija 3	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	G12	3	testējamā ķīmikālija 3	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	H1	1	noretinodrels	NE		IC ₅₀	40	0	40	80	160	
P1	H2	2	noretinodrels	NE		IC ₅₀	40	0	40	80	160	
P1	H3	3	noretinodrels	NE		IC ₅₀	40	0	40	80	160	
P1	H4	1	noretinodrels	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H5	2	noretinodrels	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H6	3	noretinodrels	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H7	1	auksts E2 S			IC ₅₀	40	0	40	80	160	
P1	H8	2	auksts E2 S			IC ₅₀	40	0	40	80	160	
P1	H9	3	auksts E2 S			IC ₅₀	40	0	40	80	160	
P1	H10	1	auksts E2 S			1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H11	2	auksts E2 S			1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H12	3	auksts E2 S			1,00E-7	40	0	40	80	160	

3. papildinājums

ĶĪMISKĀS IZVĒRTĒŠANAS UN PĒTNIECĪBAS INSTITŪTA (CERI) ESTROGĒNRECEPTORU SAISTĪŠANĀS *IN VITRO* TESTS, KURĀ IZMANTO CILVĒKA REKOMBINANTO ER α LIGANDA SAISTĪŠANĀS DOMĒNA PROTEĪNU

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI (SK. ARĪ VISPĀRĪGO IEVADU)

1. Šis estrogēnreceptora (ER α) piesātinājuma un konkurējošās saistīšanās *in vitro* tests izmanto cilvēka ER α liganda saistīšanās domēnu (*LBD*). Šo proteīnu modeli izstrādājis Ķīmiskās izvērtēšanas un pētniecības institūts (*CERI*) Japānā, un tas eksistē kā glutathione-S-transferāzes (GST) jauktais proteīns, kuru ekspresē *E. coli*. *CERI* protokolam veikts starptautisks daudzlaboratoriju validēšanas pētījums (2), kas pierādīja testa relevanci un ticamību paredzētajam nolūkam.
2. Šis tests ir skrīninga procedūra, ar ko identificē vielas, kas spēj saistīties ar *hrER α* . To izmanto, lai noteiktu testējamās ķimikālijas spēju konkurēt ar 17 β -estradiolu attiecībā uz saistīšanos ar *hrER α -LBD*. Kvantitatīvie testa rezultāti var ietvert IC₅₀ (mērs, kas rāda testējamās ķimikālijas koncentrāciju, kas vajadzīga, lai no *hrER α* pārvietotu pusi no [³H]-17 β -estradiola) un testējamo ķimikāliju relatīvo afinitāti attiecībā uz *hrER α* salīdzinājumā ar 17 β -estradiolu. Ķīmiskā skrīninga vajadzībām pieņemami kvalitatīvie testa rezultāti var ietvert testējamo ķimikāliju klasificēšanu saistīgās vai nesaistīgās ar *hrER α* vai tādās, kuru saistīgums ir neskaidrs, uz to kritēriju pamata, kas aprakstīti attiecībā uz saistīšanās līknēm.
3. Testā izmanto radioaktīvi marķētu ligandu, tāpēc laboratorijai būs vajadzīga radioaktīvo materiālu licence. Visas procedūras ar radioaktīvajiem izotopiem un bīstamām ķimikālijām jāveic, ievērojot nacionālajos tiesību aktos paredzētos noteikumus un procedūras.
4. Pirms šā testa izmantošanas regulatīviem mērķiem jāizlasa sadaļas “**VISPĀRĪGAIS IEVADS**” un “***HrER* SAISTĪŠANĀS TESTA KOMPONENTI**”. Šajā testēšanas vadlīnijā izmantotās definīcijas un saīsinājumi ir aprakstīti 1. papildinājumā.

TESTA PRINCIPI (SK. ARĪ VISPĀRĪGO IEVADU)

5. *HrER α* saistīšanās tests mēra radioaktīvi iezīmēta liganda ([³H]17 β -estradiola) spēju saistīties ar ER arvien pieaugošu testējamās ķimikālijas (t.i. konkurenta) koncentrāciju klātbūtnē. Testējamās ķimikālijas, kam piemīt augsta ER afinitāte, konkurē ar radioaktīvi iezīmēto ligandu pie zemākas koncentrācijas nekā ķimikālijas ar zemāku receptora afinitāti.
6. Šis tests sastāv no diviem svarīgākajiem komponentiem: piesātinājuma–saistīšanās eksperimenta, kas raksturo receptora–liganda mijiedarbības parametrus, un konkurējošās saistīšanās eksperimenta, kas attiecībā uz saistīšanos ar ER raksturo konkurenci starp testējamo ķimikāliju un radioaktīvi marķēto ligandu.

7. Piesātinājuma–saistīšanās eksperimenta mērķis ir raksturot konkrētas receptoru partijas afinitāti un konkurējošās saistīšanās eksperimentā — to skaitu preparātā. Piesātinājuma–saistīšanās eksperiments līdzsvara apstākļos mēra fiksētas estrogēnreceptora koncentrācijas afinitāti tā dabīgajam ligandam (to izsaka disociācijas konstante, K_d) un aktīvo receptoru domēnu koncentrāciju (B_{max}).
8. Konkurējošās saistīšanās eksperiments mēra tādas vielas afinitāti, kura attiecībā uz saistīšanos ar ER konkurē ar $[^3\text{H}]17\beta$ -estradiolu. Afinitāti kvantitatīvi izsaka kā testējamās ķimikālijas koncentrāciju, kas līdzsvara apstākļos inhibē 50 % $[^3\text{H}]17\beta$ -estradiola specifiskās saistīšanās (apzīmē kā “50 % inhibējošo koncentrāciju” vai IC_{50}). To var izvērtēt arī, izmantojot relatīvo afinitāti (RBA , relatīvā salīdzinājumā ar estradiola IC_{50} , ko atsevišķi mēra tajā pašā izpildes reizē). Konkurējošās saistīšanās eksperiments mēra fiksētas koncentrācijas $[^3\text{H}]17\beta$ -estradiola spēju saistīties ar ER plaša testējamās ķimikālijas koncentrāciju diapazona (astoņas intensitātes pakāpes) klātbūtnē. Pēc tam, ja iespējams, datus pārveido Hilla vienādojuma (A. Hills, 1910) formā, kas apraksta radioaktīvi marķētā liganda pārvietošanu, ko izraisa viena domēna konkurējošais saisteklis. Radioaktīvi marķētā estradiola pārvietošanas pakāpe līdzsvara apstākļos tiek izmantota, lai testējamo ķimikāliju raksturotu kā saistīgu, nesaistīgu vai tādu, kam ir neskaidra reakcija.

PROCEDŪRA

Pieņemamas *hrERα* proteīna veikspējas pierādīšana

9. Pirms piesātinājuma un konkurējošās saistīšanās testu ieviešanas laboratorijas ikdienas praksē attiecībā uz katru jaunu *hrERα* partiju ir jāpierāda to veikspējas pareizība laboratorijā, kurā to izmantos. Veikspēju pierāda ar divu etapu procedūru. Proti,
 - veic $[^3\text{H}]$ -17β-estradiola saistīšanās piesātinājuma testu, lai pierādītu *hrERα* specifiskumu un piesātinājumu. Ar iegūto datu nelineāras regresijas analīzi (piem., *BioSoft*; *McPherson*, 1985; *Motulsky*, 1995) un no tiem izveidotu Skačārda diagrammu dokumentē *hrERα* spēju saistīt $[^3\text{H}]$ -17β-estradiolu (K_d) un katras partijas receptoru skaitu (B_{max});
 - veic konkurējošās saistīšanas testu, izmantojot kontroles vielas (references estrogēnu (17β-estradiolu), vāji saistīgu vielu (piem., noretinodrelu vai noretindronu) un nesaistīgu vielu (oktiltrietoksisilānu, apzīmē ar “OTES”). Katra laboratorija izveido un uztur vēsturisku datubāzi, kurā dokumentē IC_{50} konsekvētumu un citas būtiskas references estrogēna un vāja saistekļa vērtības, kas iegūtas dažādos eksperimentos un ar atšķirīgām *hrERα* partijām. Turklāt ar kontroles vielām iegūto konkurējošās saistīšanās līkņu parametriem jābūt 95 % ticamības intervāla robežās (sk. 1. tabulu); tas izstrādāts, izmantojot to laboratoriju datus, kuras piedalījās šā testa validēšanas pētījumā (2).

1. tabula. References estrogēna un vāja saistekļa veikspējas kritēriji, kas izstrādāti *CERI hrER* saistīšanās testam.

Viela	Parametrs	Vidējā vērtība ^a	Standartnovirze (n)	95 % ticamības intervāli ^b	
				apakšējā robeža	augšējā robeža
17β-estradiols	Augšējais	104,74	13,12 (70)	101,6	107,9
	Apakšējais	0,85	2,41 (70)	0,28	1,43
	Hilla virziena koeficients	-1,22	0,20 (70)	-1,27	-1,17
	LogIC ₅₀	-8,93	0,23 (70)	-8,98	-8,87
Noretinodrels	Augšējais	101,31	10,55 (68)	98,76	103,90
	Apakšējais	2,39	5,01 (68)	1,18	3,60
	Hilla virziena koeficients	-1,04	0,21 (68)	-1,09	-0,99
	LogIC ₅₀	-6,19	0,40 (68)	-6,29	-6,10
Noretindrons^c	Augšējais	92,27	7,79 (23)	88,90	95,63
	Apakšējais	16,52	10,59 (23)	11,94	21,10
	Hilla virziena koeficients	-1,18	0,32 (23)	-1,31	-1,04
	LogIC ₅₀	-6,01	0,54 (23)	-6,25	-5,78

^aVidējā vērtība ± standartnovirze (SN) (n) lieluma paraugam kontroles testu izpildes reizēm, ko validēšanas pētījuma gaitā veica četras laboratorijas, tika aprēķināta, izmantojot liknei atbilstošo parametru aplēses (Hilla vienādojumu ar četriem parametriem) (sk. 2. atsauci N pielikumu).

^b95 % ticamības intervāli sniegti kā paraugs pieņemamības kritērijiem.

^cValidēšanas pētījuma 4. apakšuzdevumā noretindrona testēšana nebija obligāta (sk. 2. atsauci, sk. 4. apakšuzdevumu). Tādējādi vidējā vērtība ± SN (n) kontroles testu izpildes reizēm, ko īstenoja divas laboratorijas, tika aprēķināta, izmantojot liknei atbilstošo parametru aplēses (Hilla vienādojumu ar četriem parametriem).

IC₅₀ diapazons būs atkarīgs no receptoru preparāta *Kd* un katrā konkrētajā laboratorijā izmantotās radioaktīvi marķētā liganda koncentrācijas. Ir pieņemama IC₅₀ diapazona atbilstoša pielāgošana, ņemot vērā to, kādos apstākļos tests ir veikts.

Laboratorijas kvalifikācijas pierādīšana

10. Sk. šīs testēšanas metodes sadaļas “**hrER SAISTĪŠANĀS TESTA KOMPONENTI**” 17. un 18. punktu un 2. tabulu. Katrā (piesātinājuma un konkurējošās saistīšanās) testā īsteno trīs neatkarīgas testa izpildes reizes (t. i., ar jauniem receptora atšķaidījumiem, ķimikālijām un reaģentiem), tās veic dažādās dienās un katrā izpildes reizē izmanto trīs replikātus.

Receptora (*hrERα*) koncentrācijas noteikšana

11. Aktīvā receptora koncentrācija katrā atsevišķā partijā un atkarībā no uzglabāšanas apstākļiem var būt nedaudz atšķirīga. Tāpēc ir jānosaka no piegādātāja saņemtā aktīvā receptora koncentrācija. Tas ļaus panākt atbilstošu aktīvā receptora koncentrāciju testa veikšanas laikā.
12. Apstākļos, kas atbilst konkurējošās saistīšanās apstākļiem (proti, ar 0,5 nM [³H]-estradiola), nominālas receptora koncentrācijas — 0,1, 0,2, 0,4 un 0,6 nM — inkubē bez estradiola (kopējā saistīšanās) un ar 1 μM nemarkēta estradiola (nespecifiskā saistīšanās). Grafiski

attēlo sakarību starp specifisko saistīšanos (starpību starp kopējo saistīšanos un nespecifisko saistīšanos) un receptora nominālo koncentrāciju. Receptora koncentrācija, pie kuras iegūst tādas specifiskās saistīšanās vērtības, kas atbilst 40 % pievienotā radioaktīvā marķējuma, ļauj noteikt atbilstošo receptora koncentrāciju, kuru attiecīgi izmanto piesātinājuma un konkurējošās saistīšanās eksperimentiem. Samērā bieži galīgā *hrER* koncentrācija, kas atbilst šim nosacījumam, ir 0,2 nM.

13. Ja pēc atkārtotiem mēģinājumiem neizdodas sasniegt 40 % kritēriju, eksperimenta uzstādījumus pārbauda attiecībā uz iespējamām kļūdām. Nespēja sasniegt 40 % kritēriju var norādīt, ka rekombinantajā partijā ir ļoti maz aktīvā receptora; šādos gadījumos jāapsver iespēja izmantot citu receptora partiju.

Piesātinājuma tests

14. [³H]17β-estradiola astoņu augoša stipruma koncentrāciju triplikātus vērtē, pie šādiem trim turpmāk uzskaitītajiem nosacījumiem (sk. 2. tabulu):
- testu veic bez nemarķēta 17β-estradiola un ER klātbūtnē. Šādi, mērot radioaktivitāti iedobēs, kurās ir tikai [³H]17β-estradiols, nosaka kopējo saistīšanos;
 - testu veic ar nemarķēta 17β-estradiola koncentrāciju, kas 2000 reižu pārsniedz marķētā 17β-estradiola koncentrāciju, un ER klātbūtnē. Šāda nosacījuma mērķis ir piesātināt aktīvos saistīšanās domēnus ar nemarķētu 17β-estradiolu un, mērot radioaktivitāti iedobēs, noteikt nespecifisko saistīšanos. Visu pārējo karsto estradiolu, kas spēj saistīties ar receptoru, uzskata par nespecifiskā domēnā saistīgu, jo aukstajam estradiolam jābūt tik lielā koncentrācijā, ka tas saistās ar visiem uz receptora pieejamajiem specifiskajiem domēniem;
 - testu veic bez nemarķēta 17β-estradiola un bez ER (kopējās radioaktivitātes noteikšana).

[³H]-17β-estradiola un nemarķēta 17β-estradiola šķīdumu un hrERa sagatavošana

15. Lai sagatavotu 40 nM [³H]-17β-estradiola šķīduma, ņem 1 μM izejšķīduma — [³H]-17β-estradiola šķīdums dimetilsulfoksīdā (DMSO) —, kam pievieno DMSO (iegūstot 200 nM) un pēc tam testa buferšķīdumu istabas temperatūrā (iegūstot 40 nM). No šiem 40 nM šķīduma, izmantojot testa buferšķīdumu istabas temperatūrā, sagatavo virkni [³H]-17β-estradiola atšķaidījumu koncentrācijās no 0,313 nM līdz 40 nM (sk. paraugu 2. tabulas 12. ailē). Galīgā testa koncentrācijas diapazonā no 0,0313 līdz 4,0 nM iegūst, 10 μl šādi sagatavoto šķīdumu iepilnot attiecīgajās 96 iedobju mikrotitrēšanas plates iedobēs (sk. 2. un 3. tabulu). Testa buferšķīduma sagatavošana un [³H]-17β-estradiola oriģinālā izejšķīduma aprēķināšanas metode, balstoties uz specifisko aktivitāti, kā arī atšķaidījumu sagatavošana un koncentrāciju noteikšana ir sīki izskaidrota *CERI* testa protokolā (2).
16. Atšķaidījumus no nemarķēta 17β-estradiola šķīduma sagatavo, 1 nM 17β-estradiola izejšķīduma pievienojot testa buferšķīdumu, lai iegūtu astoņas augoša stipruma

koncentrācijas, kas sākotnēji ir diapazonā no 0,625 μM līdz 80 μM . Galīgā testa koncentrācijas diapazonā 0,0625–8 μM iegūst, 10 μl šādi sagatavoto šķīdumu iepilinojot attiecīgajās 96 iedobju mikrotitrēšanas plates iedobēs, kurās paredzēts mērīt nespecifisko saistīšanos (sk. 2. un 3. tabulu). Nemarķēta 17 β -estradiola atšķaidījumu sagatavošana ir sīki izskaidrota *CERI* testa protokolā (2).

17. Izmanto receptora koncentrāciju, pie kuras specifiskā saistīšanās ir 40 $\pm$ 10 % (sk. 12.–13. punktu). *HrER α* šķīdumu sagatavo ar ledusaukstu testa buferšķīdumu un tieši pirms izmantošanas, t. i., pēc tam, kad ir jau sagatavotas visas pārējās iedobes, kas paredzētas kopējās saistīšanās un nespecifiskās saistīšanās noteikšanai un tikai karstajam ligandam paredzētās iedobes.
18. 96 iedobju mikrotitrēšanas plates sagatavo saskaņā ar 2. tabulas norādījumiem, katrai [^3H]-17 β -estradiola koncentrācijai sagatavojot trīs replikātus. 3. tabulā sniegti testa protokolā paredzētie [^3H]-17 β -estradiola, nemarķēta 17 β -estradiola, buferšķīduma un receptora tilpumi.

2. tabula. Piesātinājuma–saistīšanās testa mikrotitrēšanas plates izkārtojums

	1*	2*	3*	4*	5*	6*	7*	8*	9*	10	11**	12**
	TB mērīšanai			NSB mērīšanai			Tikai karstā liganda noteikšanai				Nemarķēta E2 atšķaidījumi plates 4.– 6. kolonnai	[^3H]E2 atšķaidījumi plates 1.– 9. kolonnai
A	0,0313 nM [^3H] E ₂ + ER			0,0313 nM [^3H] E ₂ + 0,0625 μM E ₂ + ER			0,0313 nM				0,625 μM	0,313 nM
B	0,0625 nM [^3H] E ₂ + ER			0,0625 nM [^3H] E ₂ + 0,125 μM E ₂ + ER			0,0625 nM				1,25 μM	0,625 nM
C	0,125 nM [^3H] E ₂ + ER			0,125 nM [^3H] E ₂ + 0,25 μM E ₂ + ER			0,125 nM				2,5 μM	1,25 nM
D	0,250 nM [^3H] E ₂ + ER			0,250 nM [^3H] E ₂ + 0,5 μM E ₂ + ER			0,250 nM				5 μM	2,5 nM
E	0,50 nM [^3H] E ₂ + ER			0,50 nM [^3H] E ₂ + 1 μM E ₂ + ER			0,50 nM				10 μM	5 nM
F	1,00 nM [^3H] E ₂ + ER			1,00 nM [^3H] E ₂ + 2 μM E ₂ + ER			1,00 nM				20 μM	10 nM
G	2,00 nM [^3H] E ₂ + ER			2,00 nM [^3H] E ₂ + 4 μM E ₂ + ER			2,00 nM				40 μM	20 nM

H	4,00 nM [³ H] E ₂ + ER	4,00 nM [³ H] E ₂ + 8 μM E ₂ + ER	4,00 nM	80 μM	40 nM

TB: kopējā saistīšanās

NSB: nespecifiskā saistīšanās

[³H] E₂: [³H]17β-estradiols

E₂: nemarkēts 17β-estradiols

*Šeit norādītās koncentrācijas ir galīgās koncentrācijas attiecīgajā mikrotitrēšanas plates iedobē.

**Nemarkēta E₂ un [³H]E₂ atšķaidījumus var sagatavot atsevišķā mikrotitrēšanas platē.

3. tabula. Reāģenta tilpumi piesātinājuma testa mikrotitrēšanas platē

Ailes numurs		1	2	3	4	5	6	7*	8*	9*
Sagatavošanas soļi		TB iedobes			NSB iedobes			Tikai karstais		
Komponentu tilpums minētajām reakcijas iedobēm un pievienošanas kārtība	Buferšķīdums	60 µl			50 µl			90 µl		
	nemarkēts E2 (2. tabulas 11. aile)	-			10 µl			-		
	[³ H]E2 (2. tabulas 12. josla)	10 µl			10 µl			10 µl		
	hrERα	30 µl			30 µl			-		
Kopējais reaģenta tilpums		100 µl			100 µl			100 µl		
Inkubācija		REAKCIJA PĒC 2 STUNDU INKUBĀCIJAS						Radioaktivitātes kvantificēšana uzreiz pēc sagatavošanas. Neinkubē		
Apstrāde ar 0,4 % DCC		Jā			Jā			Nē		
0,4 % DCC tilpums		100 µl			100 µl			-		
Filtrēšana		Jā			Jā			Nē		
DPM MĒRĪŠANA										
Scintilācijas kokteilm pievienotais kvantificēšanas tilpums		100 µl**			100 µl**			50 µl		

* Ja *dpm* noteikšanai mikrotitrēšanas platēs izmanto šķidrums scintilāciju skaitīšanu (*LSC*), nav ieteicams tajā pašā testa platē, kurā mēra TB un NSB, sagatavot iedobes ar karsto ligandu vienu pašu. Iedobes tikai ar karsto ligandu sagatavo citā testa platē.

** Ja DCC tiek atdalīts ar centrifugēšanu, tad, lai nepieļautu kontaminēšanos ar DCC, ar *LSC* metodi mērījumus veic 50 μl supernatanta.

19. Kopējas saistīšanās un nespecifiskās saistīšanās noteikšanai paredzētās mikrotitrēšanas testa plates divas stundas inkubē istabas temperatūrā (22–28°C).

Ar hrERα saistītā [³H]-17β-estradiola mērīšana

20. Pēc divu stundu inkubācijas perioda ar *hrERα* saistītais [³H]-17β-estradiols ir jāatdala no [³H]-17β-estradiola, iedobēm pievienojot 100 μl ledusaukstas 0,4% DCC suspensijas. Pēc

tam testa plates uz 10 minūtēm novieto uz ledus, un reakcijas maisījumu un DCC suspensiju filtrē, pārnesot uz mikrotitrēšanas plates filtra, kā rezultātā tiek atdalīts DCC. Pēc tam *LSC* mēģenēs esošajam scintilācijas šķīdumam pievieno 100 µl filtrāta, lai ar šķidruma scintilāciju skaitīšanas metodi noteiktu sabrukumu skaitu minūtē (*dpm*) uz mēģeni.

21. Ja mikrotitrēšanas plates filtrs nav pieejams, alternatīvs veids DCC atdalīšanai ir centrifugēšana. Ņem 50 µl supernatanta, kas satur ar *hrERα* saistīto [³H]-17β-estradiolu, un izmanto to scintilāciju skaitīšanai; to dara ar īpašu piesardzību, lai nepieļautu iedobju kontamināciju, saskaroties DCC.
22. Iedobes ar karsto ligandu vienu pašu izmanto, lai noteiktu testa iedobēm pievienotā [³H]-17β-estradiola sabrukumu skaitu minūtē (*dpm*). Radioaktivitāti kvantificē uzreiz pēc sagatavošanas. Šīs iedobes neinkubē un neapstrādā ar DCC suspensiju, bet to saturu pārnes tieši scintilācijas šķīdumā. Ar šiem mērījumi pierāda, cik daudz [³H]-17β-estradiola (izteikta *dpm*) pievienots katrā iedobju kopumā, kas demonstrē kopējo saistīšanos un nespecifisko saistīšanos.

Konkurējošās saistīšanās tests

23. Konkurējošās saistīšanās tests mēra vienas konkrētas [³H]-17β-estradiola koncentrācijas saistīšanos arvien pieaugošu testējamās ķimikālijas koncentrāciju klātbūtnē. Katrā testa veikšanas reizē izmanto trīs paralēlus katras koncentrācijas replikātus. Papildus tam attiecībā uz katru testējamo ķimikāliju testu izpilda trīs reizes, un tas nenotiek paralēli, bet dažādos laikos. Testu veic vienā vai vairākās 96 iedobju mikrotitrēšanas platēs.

Kontroles

24. Veicot testu, katrā eksperimentā jāiekļauj paralēlais šķīdinātājs un kontroles (t. i., references estrogēns, vājš saisteklis un nesaisteklis). Katrā testa izpildes reizē vienā platē ir jābūt atsauces estrogēna un kontroļu (t. i. vāja saistekļa un nesaistekļa) pilnai koncentrāciju līknei. Visās pārējās platēs ir jābūt: i) E2 un vāja saistekļa triplikātiem augstā koncentrācijā (maksimāla pārvietošana, t. i., gandrīz pilnīga radioaktīvi marķētā liganda pārvietošana) un vidējā koncentrācijā (aptuveni IC₅₀); ii) šķīdinātāja kontroļu un nespecifiskās saistīšanās triplikātiem. Testa buferšķīduma, kontroļu, [³H]-17β-estradiola, *hrERα* un testējamo ķimikāliju šķīdumu sagatavošanas procedūras ir sīki aprakstītas *CERI* testa protokolā (2).

Šķīdinātāja kontrole

25. Šķīdinātāja kontrole rāda, vai nenotiek šķīdinātāja mijiedarbība ar testa sistēmu, kā arī mēra kopējo saistīšanos (apzīmē ar “TB” — *total binding*). Ieteicamais šķīdinātājs ir DMSO. Ja testējamās ķimikālijas visaugstākā koncentrācija dimetilsulfoksīdā nešķīst, kā alternatīvu var izmantot etanolu. Galīgajā testā DMSO koncentrācija iedobēs ir 2,05 %, un to var palielināt līdz 2,5 % gadījumos, kad testējamā ķimikālija slikti šķīst. Nevajadzētu izmantot DMSO koncentrācijās, kas pārsniedz 2,5 %, jo augstākas koncentrācijas šķīdinātājs var izraisīt interferenci uz testu. Testējamajām ķimikālijām, kas nešķīst DMSO, bet ir šķīstošas etanolā, bez interferences uz testu var izmantot ne vairāk kā 2 % etanola šķīdumu.

Buferšķīduma kontrole

26. Buferšķīduma kontrole ("BC") nedrīkst saturēt ne šķīdinātāju, ne testējamo ķīmikāliju, bet tā satur visus citus testa komponentus. Buferšķīduma kontroles rezultātus salīdzina ar šķīdinātāja kontroli, lai verificētu, ka izmantotais šķīdinātājs neietekmē testa sistēmu.

Stiprs saisteklis (references estrogēns)

27. 17 β -estradiols (CAS 50-28-2) ir endogēns ligands ar augstu afinitāti (alfa apakštipa) ER. Katram *hrER α* konkurējošās saistīšanās testam sagatavo standarta līkni ar nemarķētu 17 β -estradiolu, lai varētu novērtēt, kāda ir mainība laika gaitā, veicot testu tajā pašā laboratorijā. Sagatavo astoņus nemarķēta 17 β -estradiola šķīdumus dimetilsulfoksīdā (DMSO) tā, lai testa iedobēs, kuras izmantos standarta līknei, šķīdumu galīgā koncentrācija būtu ar šādiem intervāliem: 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸, 10^{-8,5}, 10⁻⁹, 10^{-9,5}, 10⁻¹⁰, 10⁻¹¹ M. Nemarķēta 17 β -estradiola (1 μ M) augstākā koncentrācija kalpo kā nespecifiskās saistīšanās indikators. 4. tabulā šo koncentrāciju apzīmē ar kodu "NSB", lai gan tā ir arī standarta līknes daļa.

Vājš saisteklis

28. Lai demonstrētu katra eksperimenta jutīgumu un ļautu novērtēt, kāda ir rezultātu mainība, veicot testu laika gaitā, tajā iekļauj vāju saistekli (noretinodrelu (CAS 68-23-5) vai — alternatīvi — noretindronu (CAS 68-22-4). Sagatavo astoņus vāja saistekļa šķīdumus dimetilsulfoksīdā (DMSO) un testa buferšķīdumā ar šādām galīgajām koncentrācijām testa iedobēs: 10^{-4,5}, 10^{-5,5}, 10⁻⁶, 10^{-6,5}, 10⁻⁷, 10^{-7,5}, 10⁻⁸ un 10⁻⁹ M.

Nesaisteklis

29. Kā negatīvo kontroli (nesaistekli) izmanto oktiltrietoksisilānu (OTES, CAS 2943-75-1). Tas apstiprinās, ka tests spēs noteikt ķīmikālijas, kas nesaistās ar *hrER α* . Sagatavo astoņus nesaistekļa šķīdumus dimetilsulfoksīdā (DMSO) un testa buferšķīdumā ar šādām galīgajām koncentrācijām testa iedobēs: 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸, 10⁻⁹, 10⁻¹⁰ M. Alternatīvi par nesaistekļa kontroli var izmantot di-*n*-butilftalātu (DBP, CAS 84-72-2), bet to testē tikai līdz koncentrācijai 10⁻⁴M. Ir pierādīts, ka DBP maksimālā šķīdība testā ir 10⁻⁴M.

HrER α koncentrācija

30. Izmanto receptora daudzumu, pie kura specifiskā saistīšanās ir 40 $\pm$ 10 % (sk. 3. papildinājuma 12.-13. punktu). *HrER α* šķīdumu sagatavo, tieši pirms izmantošanas funkcionālo *hrER α* atšķaidot ar ledusaukstu testa buferšķīdumu.

[³H]17 β -estradiols

31. [³H]-17 β -estradiola galīgā koncentrācija testa iedobēs ir 0,5 nM.

Testējamās ķīmikālijas

32. Vispirms ir jāveic šķīdības tests, lai noteiktu katras testējamās ķīmikālijas šķīdības robežu un identificētu piemērotu koncentrācijas diapazonu, kas tiks izmantots testa protokolā. Sākotnēji katras testējamās ķīmikālijas šķīdības robežu nosaka šķīdinātājā un pēc tam apstiprina testēšanas apstākļos. Galīgā testā izmantojamā koncentrācija nepārsniedz 1 mM. Diapazona noteikšanas testēšanā ietilpst šķīdinātāja kontrole; paralēli tai testē vismaz

astoņus sērijveida logaritmiskus atšķaidījumus, sākot ar augstāko pieņemamo koncentrāciju (piem., 1 mM vai zemāku, balstoties uz šķīdības robežu), un vēro, kad šķīdums kļūst duļķains vai rada nogulsnes (sk. arī 3.papildinājuma 35. punktu). Kad testa koncentrāciju diapazons ir noteikts, testējamo ķīmikāliju testē, izmantojot astoņas diapazona noteikšanas testā identificētās log koncentrācijas ar attiecīgajiem intervāliem. Otrajā un trešajā eksperimentā izmantotās koncentrācijas pielāgo pēc vajadzības, lai labāk raksturotu koncentrācijas–atbildreakcijas līkni.

33. Testējamās ķīmikālijas atšķaidījumus sagatavo atbilstošā šķīdinātājā (sk. 3.papildinājuma 25. punktu). Ja testējamās ķīmikālijas augstākā koncentrācija nešķīst ne DMSO, ne etanolā un lielāka šķīdinātāja daudzuma pievienošana galīgajā testa stobriņā novestu pie pieņemamās robežas pārsniegšanas, augstāko koncentrāciju var samazināt par vienu intervālu uz leju. Šādā gadījumā sērijveida koncentrācijas var papildināt ar vienu papildkoncentrāciju amplitūdas apakšā. Visas pārējās sērijveida koncentrācijas paliek nemainīgas.
34. Pievienojot testējamās ķīmikālijas šķīdumus testa iedobēs, tos rūpīgi vēro, jo pievienošanas laikā var rasties nogulsnes. Datus par tām iedobēm, kurās konstatē nogulsnes, neņem vērā, pielāgojot datus līknei, un testa pārskatā norāda izslēgšanas iemeslu.
35. Ja no citiem avotiem jau ir pieejama informācija par testējamās ķīmikālijas $\log(\text{IC}_{50})$, atšķaidījumus var būt lietderīgi ģeometriski izkārtot ciešāk ap paredzamo $\log(\text{IC}_{50})$ (t. i., pa 0,5 log vienībām). Galīgajiem rezultātiem būtu jāatspoguļo pietiekama koncentrāciju izkliede abās log (IC_{50}) pusēs, arī līknes augšējā un apakšējā punktā, un koncentrācijām jābūt pietiekami raksturojošām attiecībā uz saistīšanās līkni.

Testa plates izkārtojums

36. Sagatavo marķētas mikrotitrēšanas plates, kurās ir pa sešiem šādiem inkubētiem replikātiem: šķīdinātāja kontrole, references estrogēns (E2) visaugstākajā koncentrācijā, kas kalpo arī par nespecifiskās saistīšanās (NSB) rādītāju, buferšķīduma kontrole, astoņas nesaistīgās kontroles (oktiltrietoksisilāna) koncentrācijas, septiņas zemākās references estrogēna (E2) koncentrācijas, astoņas vāja saistekļa (noretinodrela vai noretindrona) koncentrācijas un astoņas koncentrācijas no katras testējamās ķīmikālijas (TC). Mikrotitrēšanas plates izkārtojuma diagrammas paraugs pilnām references estrogēna un kontroļu koncentrāciju līknēm ir sniegts 4. tabulā. Atsevišķas mikrotitrēšanas plates izmanto testējamai ķīmikālijai, un ir vajadzīgas testa plates kontroles, t. i., i) E2 un vāja saistekļa triplikāti augstā koncentrācijā (maksimāla pārvietošana) un vidējā koncentrācijā (aptuveni IC_{50}); ii) šķīdinātāja kontrole (kopējā saistīšanās) un nespecifiskā saistīšanās, no katra pa sešiem replikātiem (5. tabula). Konkurējošās saistīšanās testa mikrotitrēšanas plates izkārtojuma paraugs ar trijām nezināmām testējamajām ķīmikālijām ir dots 3.3. papildinājumā. Darblapā, kā arī 4. un 5. tabulā norādītās koncentrācijas attiecas uz galīgajām koncentrācijām, ko izmanto katrā testēšanas iedobē. Maksimālā E2 koncentrācija ir 1×10^{-7} M, un attiecībā uz vāju saistekli jāizmanto augstākā koncentrācija, kas 1. mikrotitrēšanas platē izmantota vājam saisteklim. IC_{50} koncentrāciju nosaka laboratorija,

balstoties uz savu vēsturisko kontroles datubāzi. Tiek sagaidīts, ka šī vērtība būs līdzīga validācijas pētījumos konstatētajai vērtībai (sk. 1. tabulu).

4. tabula. Konkurējošās saistīšanās testa mikrotitrēšanas plates izkārtojums^{1,2}, pilnas atsauces estrogēnu un kontroļu koncentrāciju līknes (1. plate).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Buferšķīduma kontrole un pozitīvā kontrole (E2)			Vāji pozitīva kontrole (noretinodrels)			Negatīvā kontrole (OTES)			TB un NSB		
A	Tukša iedobe*			1×10 ⁻⁹ M			1×10 ⁻¹⁰ M			TB (šķīdinātāja kontrole) (2,05 % DMSO)		
B	E2 (1×10 ⁻¹¹ M)			1×10 ⁻⁸ M			1×10 ⁻⁹ M					
C	E2 (1×10 ⁻¹⁰ M)			1×10 ^{-7,5} M			1×10 ⁻⁸ M			NSB (10 ⁻⁶ M E2)		
D	E2 (1×10 ^{-9,5} M)			1×10 ⁻⁷ M			1×10 ⁻⁷ M					
E	E2 (1×10 ⁻⁹ M)			1×10 ^{-6,5} M			1×10 ⁻⁶ M			Buferšķīduma kontrole		
F	E2 (1×10 ^{-8,5} M)			1×10 ⁻⁶ M			1×10 ⁻⁵ M					
G	E2 (1×10 ⁻⁸ M)			1×10 ^{-5,5} M			1×10 ⁻⁴ M			Tukša iedobe (karsta)**		
H	E2 (1×10 ⁻⁷ M)			1×10 ^{-4,5} M			1×10 ⁻³ M					

¹ Izkārtojuma paraugs standarta mikrotitrēšanas platei, ko izmanto katrā testa izpildes reizē.

² Ņemiet vērā, ka šajā mikrotitrēšanas platē izmantoti atšķaidījumi, kas attiecībā uz standarta mikrotitrēšanas plati aprakstīti iepriekšējās nodaļās.

Šajā piemērā vājšais saisteklis ir noretinodrels (apzīmēts "NE").

* Reāli tukša iedobe, netiek izmantota.

** Tukša iedobe, netiek izmantota inkubācijas laikā, bet to izmanto, lai apstiprinātu kopējo pievienoto radioaktivitāti.

5. tabula. Konkurējošās saistīšanās testa mikrotitrēšanas plates izkārtojums, papildu plates testējamajām ķīmikālijām (TC) un plates kontrolēm.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Testējamā ķīmikālija Nr. 1 (TC-1)			Testējamā ķīmikālija Nr. 2 (TC-2)			Testējamā ķīmikālija Nr. 3 (TC-3)			Kontroles		
A	TC-1 (1×10^{-10} M)			TC-2 (1×10^{-10} M)			TC-3 (1×10^{-10} M)			E_2 (1×10^{-7} M)		
B	TC-1 (1×10^{-9} M)			TC-2 (1×10^{-9} M)			TC-3 (1×10^{-9} M)			E_2 (IC_{50})		
C	TC-1 (1×10^{-8} M)			TC-2 (1×10^{-8} M)			TC-3 (1×10^{-8} M)			NE ($1 \times 10^{-4,5}$ M)		
D	TC-1 (1×10^{-7} M)			TC-2 (1×10^{-7} M)			TC-3 (1×10^{-7} M)			NE (IC_{50})		

E	TC-1 (1×10^{-6} M)	TC-2 (1×10^{-6} M)	TC-3 (1×10^{-6} M)	NSB (10^{-6} M E2)
F	TC-1 (1×10^{-5} M)	TC-2 (1×10^{-5} M)	TC-3 (1×10^{-5} M)	
G	TC-1 (1×10^{-4} M)	TC-2 (1×10^{-4} M)	TC-3 (1×10^{-4} M)	TB (šķīdinātāja kontrole)
H	TC-1 (1×10^{-3} M)	TC-2 (1×10^{-3} M)	TC-3 (1×10^{-3} M)	

Šajā piemērā vājšais saisteklis ir noretinodrels (apzīmēts "NE").

Konkurējošās saistīšanās testa izpilde

37. Katrā testēšanas plates iedobē (izņemot iedobes, kas attiecas uz kopējo saistīšanos, un tukšās, karstās iedobes, kā parādīts 6. tabulā) iepilina 50 μ l testa buferšķīduma, tad samaisa ar 10 μ l attiecīgi šķīdinātāja kontroles, references estrogēna (E2), vāja saistekļa, nesaistekļa un testējamās ķīmikālijas un 10 μ l 5 nM [^{3} H]-17 β -estradiola šķīduma. Pēc tam katrā platē pievieno 30 μ l ledusauksta receptora šķīduma, un uzmanīgi samaisa. Kā pēdējo reaģentu pievieno *hrER α* šķīdumu. Testa mikrotitrēšanas plates divas stundas inkubē istabas temperatūrā (22–28°C).

6. tabula. *hrER* konkurējošās saistīšanās testa komponentu tilpums mikrotitrēšanas platēs

Sagatavošanas soļi pa ailēm		Visas iedobes, izņemot TB	TB iedobes	Tukšās iedobes (karstas)
[^{3} H]-17 β -estradiols pietiekamā daudzumā, lai panāktu galīgo koncentrāciju 0,5 nM (t. i., 5 nM) Noteiktā <i>hrERα</i> koncentrācija (sk. 12.–13. punktu)	Testa buferšķīdums istabas temperatūrā	50 μ l	60 μ l	90 μ l
	Nemārkēts E2, vājš saisteklis, nesaisteklis, šķīdinātājs un testējamās ķīmikālijas*	10 μ l	-	-
		10 μ l	10 μ l	10 μ l
		30 μ l	30 μ l	-
Kopējais tilpums katrā testa plates iedobē		100 μ l	100 μ l	100 μ l

*Sagatavoti tā, lai galīgā koncentrācijā netiktu pārsniegta pieņemamā šķīdinātāja koncentrācija.

38. Saskaņā ar aprakstu 3. papildinājuma 21.–23. punktā (attiecas uz piesātinājuma–saistīšanās testu) kvantificē ar *hrER α* saistīto [^{3} H]-17 β -estradiolu, taču pirms tam, katrā iedobē pievienojot 100 μ l ledusauksta DCC suspensijas, no brīvā [^{3} H]-17 β -estradiola jābūt atdalītam ar *hrER α* saistītajam [^{3} H]-17 β -estradiolam.

39. Iedobes G10–12 un H10–12 (sk. 4. tabulas aili "Tukša iedobe (karsta)") raksturo marķēta [^{3} H]-estradiola *dpm* 10 μ l. 10 μ l alikvotu pārnes tieši scintilācijas šķīdumā.

Pieņemamības kritēriji

Piesātinājuma–saistīšanās tests

40. Ja tiek izmantotas pieaugošas [^{3} H]-17 β -estradiola koncentrācijas, specifiskās saistīšanās līknei ir jāsasniedz atslābuma periods, kas norāda uz *hrER α* piesātinājumu ar ligandu.

41. Pieņemamības diapazons attiecībā uz specifisko saistīšanos pie 0,5 nM [³H]-17β-estradiola koncentrācijas ir 30–50% no kopējās pievienotās radioaktivitātes vidējās vērtības, kas mērīta visās izpildes reizēs. Ir pieļaujamas atsevišķas nelielas novirzes no minētā diapazona, tomēr, ja izpildes reizēs pastāvīgi iegūst rezultātus ārpus minētā diapazona vai ja konkrētā izpildes reizē novirze ir ļoti būtiska, ir jāpielāgo proteīnu koncentrācija un piesātinājuma tests jāatkārto.
42. Datiem jābūt attēlojamiem lineāras Skačārda diagrammas veidā.
43. Nespecifiskā saistīšanās nedrīkst būt pārmērīga. Nespecifiskās saistīšanās vērtība parasti ir <35 % no kopējās saistīšanās. Tomēr minētā procentuālā attiecība dažkārt šo limitu var pārsniegt, ja testā tiek mērīts ļoti zems *dpm* pie zemākās radioaktīvi marķētā 17β-estradiola koncentrācijas.

Konkurējošās saistīšanās tests

44. Pie pieaugošām nemarķētā 17β-estradiola koncentrācijām [³H]-17β-estradiolu pakāpeniski pārvieto no receptora tādā veidā, kas līdzinās viena domēna konkurējošajai saistīšanai.
45. References estrogēna (t. i., 17β-estradiola) IC₅₀ vērtībai jābūt aptuveni vienāgai ar [³H]-17β-estradiola molāro koncentrāciju, kam pieskaitīta piesātinājuma–saistīšanās testā noteiktā diasociācijas konstante (*K_d*).
46. Visās testa izpildes reizēs kopējās specifiskās saistīšanās vērtībai pastāvīgi jābūt pieņemamības diapazonā (40 ± 10 %), pie nosacījuma, ka kopējās pievienotās radioaktivitātes vidējā mērītā koncentrācija katrā iedobē ir 0,5 nM. Ir pieļaujamas atsevišķas nelielas novirzes no minētā diapazona, tomēr, ja izpildes reizēs pastāvīgi iegūst rezultātus ārpus minētā diapazona vai ja konkrētā izpildes reizē novirze ir ļoti būtiska, ir jāpielāgo proteīnu koncentrācija.
47. Šķīdinātājs nedrīkst mainīt testa jutīgumu vai reproducējamību. Šķīdinātāja kontroles rezultātus (TB iedobes) salīdzina ar buferšķīduma kontroli, lai verificētu, ka izmantotais šķīdinātājs neietekmē testa sistēmu. Ja šķīdinātājs neietekmē testa gaitu, TB un buferšķīduma kontrolēm jābūt salīdzināmām.
48. Testējot ar koncentrācijām, kas nepārsniedz 10⁻³ M (OTES) vai 10⁻⁴ M (DBP), nesaisteklīm nevajadzētu no *hrERα* pārvietot vairāk nekā 25 % [³H]-17β-estradiola.
49. Izmantojot *CERI hrER* saistīšanās testa validēšanas pētījuma datus (2. atsaucis N pielikums), tika izstrādāti references estrogēna un divu vāju saistekļu (piem., noretinodrels, noretindrons) veikspējas kritēriji. Ir sniegti 95 % ticamības intervāli vidējām vērtībām ± SN (n), kas tika iegūtas no visiem kontroles testiem, ko izpildīja četras laboratorijas, kuras piedalījās validēšanas pētījumā. 95 % ticamības intervālus aprēķināja references estrogēna un vāju saistekļu līknes pielāgošanas parametriem (t. i., augšējam un apakšējam punktam, Hilla virziena koeficientam un log IC₅₀) un vāju saistekļu log₁₀*RBA* attiecībā pret references estrogēnu. 1. tabulā sniegti līknes pielāgošanas parametru

paredzamie diapazoni, kurus var izmantot kā veikspējas kritērijus. Praksē IC_{50} diapazons var būt nedaudz atšķirīgs atkarībā no eksperimentāli iegūtā receptora preparāta K_d un testā izmantotās liganda koncentrācijas.

50. Testējamo ķīmikāliju līknes pielāgošanas parametriem veikspējas kritēriji izstrādāti netika, jo pastāv pārāk plašs esošu potenciāli testējamu ķīmikāliju spektrs un potenciālās afinitātes un rezultātu mainīgums (piem., pilna līkne, daļēja līkne, neatbilstība līknei). Tomēr katrā testēšanas reizē un ar katru testējamo ķīmikāliju iegūtos rezultātus būtu jāizvērtē speciālistam. Testā jāizmanto pietiekams testējamās ķīmikālijas koncentrāciju diapazons, lai skaidri definētu konkurējošās saistīšanās līknes augšējo punktu (t. i., 90–100 % saistīšanās). Rezultātu mainībai starp katras testējamās ķīmikālijas koncentrācijas replikātiem, kā arī starp trim neatkarīgajām izpildes reizēm jābūt saprātīgi pieļaujamās robežās un zinātniski pamatojamai. Izpildot kontroles testus attiecībā uz katru testējamo ķīmikāliju, mērījumiem būtu jāatbilst veikspējas parametriem, kas paziņoti attiecībā uz šo *CERI* testu, un tiem jābūt saskanīgiem ar attiecīgās laboratorijas vēsturiskajiem kontroldatiem.

DATU ANALĪZE

Piesātinājuma–saistīšanās tests

51. Tiek mērīta gan kopējā, gan nespecifiskā saistīšanās. No šīm vērtībām, nespecifisko saistīšanos atņemot no kopējās saistīšanās, tiek aprēķināta pieaugošu $[^3H]$ -17 β -estradiola koncentrāciju specifiskā saistīšanās līdzsvara apstākļos. Grafikā, kurā specifisko saistīšanos attēlo attiecībā pret $[^3H]$ -17 β -estradiola koncentrāciju, attiecībā uz maksimālo specifisko saistīšanos ir jāsasniedz atslābuma periods, kas norāda uz *hrER α* piesātinājumu ar $[^3H]$ -17 β -estradiolu. Turklāt datu analīzē būtu jākonstatē $[^3H]$ -17 β -estradiola saistīšanās ar vienu augstas afinitātes saistīšanās domēnu. Piesātinājuma–saistīšanās līknē attēlo nespecifisko, kopējo un specifisko saistīšanos. Šo datu turpmākai analīzei izmanto nelineārās regresijas analīzi (piem., *BioSoft*; *McPherson*, 1985; *Motulsky*, 1995), un galīgos datus attēlo ar Skačārda diagrammu.
52. Analizējot datus, B_{max} un K_d nosaka no kopējās saistīšanās datiem vien, izmantojot pieņēmumu, ka nespecifiskā saistīšanās ir lineāra, ja vien nav pamatota iemesla izmantot citu metodi. Turklāt, meklējot labāko atbilstību līknei, izmanto robustu regresiju, ja vien nav pamatota iemesla rīkoties citādi. Pārskatā norāda izvēlēto robustas regresijas metodi. Nosakot B_{max} un K_d no piesātinājuma–saistīšanās datiem, vienmēr jāizmanto liganda noplicināšanās korekcija (piem., *Swillens* (1995) metode).

Konkurējošās saistīšanās tests

53. Konkurējošās saistīšanās līkni grafiski attēlo kā specifisko $[^3H]$ -17 β -estradiola saistīšanos attiecībā pret konkurenta koncentrāciju (log₁₀ vienībās). Testējamās ķīmikālijas koncentrācija, kas inhibē 50 % $[^3H]$ -17 β -estradiola maksimālās specifiskās saistīšanās, ir IC_{50} vērtība.

54. Pozitīvo kontroļu (t. i., references estrogēna un vāja saistekļa) log (IC_{50}) vērtību aplēses nosaka, izmantojot atbilstošu nelineāru līknes piemeklēšanas programmatūru, lai panāktu atbilstību Hilla vienādojumam ar četriem parametriem (piem., *BioSoft*; *McPherson*, 1985; *Motulsky*, 1995). Veicot pielāgošanu līknei, augšējo un apakšējo punktu, virziena koeficientu un log (IC_{50}) parasti neierobežo. Meklējot labāko atbilstību līknei, izmanto robustu regresiju, ja vien nav pamatota iemesla rīkoties citādi. Liganda noplicināšanās korekciju neizmanto. Pēc sākotnējās analīzes katru saistīšanās līkni pārskata, lai nodrošinātu pienācīgu atbilstību paraugam. Vāja saistekļa relatīvo afinitāti (*RBA*) aprēķina kā procentuālu vērtību no vāja saistekļa log (IC_{50}) attiecībā pret 17β -estradiola log (IC_{50}). Ar pozitīvajām kontrolēm un nesaistekļu kontrolēm iegūtos rezultātus izvērtē, sekojot testa veikšanas norādēm 23. papildinājuma 44.–49. punktā.
55. Datus par visām testējamajām ķīmikālijām būtu jāanalizē, izmantojot pakāpenisku pieeju, kas nodrošina datu pienācīgu analīzi un to, ka katra konkurējošās saistīšanās līkne tiek klasificēta pareizi. Pirms katras testa izpildes reizes testējamās ķīmikālijas ieteicams sākotnēji analizēt standartizētā veidā, identiski tam, kā tiek analizēti references estrogēns un vāja saistekļa kontroles (sk. 3. papildinājuma 54.punktu). Pēc tam katrā testa veikšanas reizē tehniski pārskata, vai līkne atbilst parametriem, un vizuāli nosaka, cik precīzi dati atbilst ģenerētajai konkurējošās saistīšanās līknei. Ja šīs tehniskās pārbaudes laikā novēro, ka [^3H]- 17β -estradiola specifiskā saistīšanās atkarībā no koncentrācijas procentuāli samazinās, rezultātu mainība tehnisko replikātu starpā pie katras testējamās ķīmiskās koncentrācijas ir neliela un līknes atbilstība parametriem trīs testa veikšanas reizēs ir konsekventa, tas ir pietiekami uzticams rādītājs, ka tests un datu analīze ir veikti pareizi.

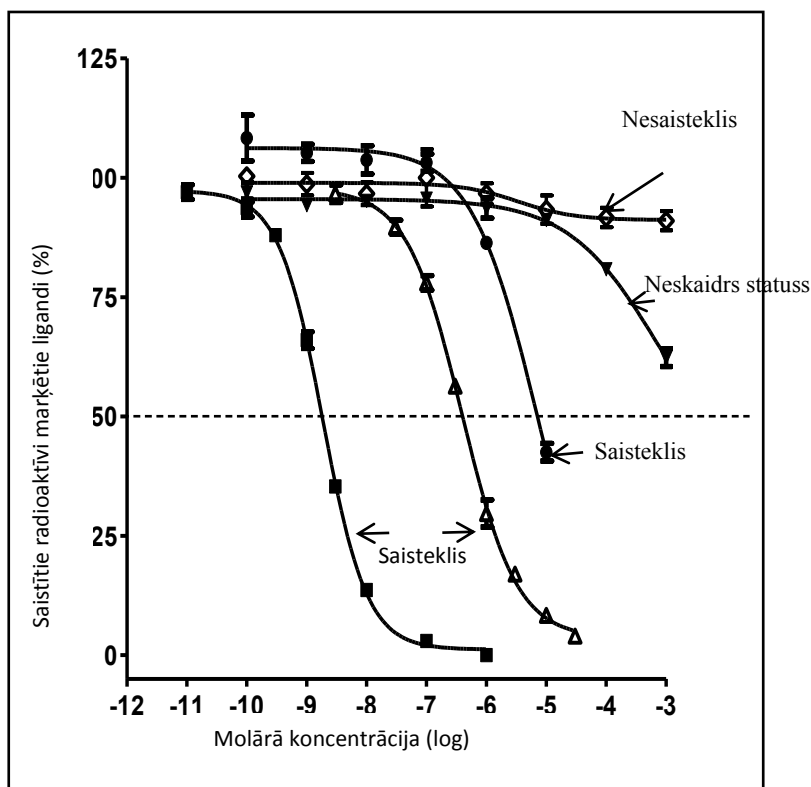
Datu interpretācija

56. Pie nosacījuma, ka ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķīmikāliju uzskata par saistīgu ar *hrERα*, ja saistīšanās līkne ir pielāgojama un zemākais atbildreakcijas līknes punkts datu diapazonā ir mazāks par 50 % (1. attēls).
57. Pie nosacījuma, ka ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķīmikāliju uzskata par nesaistīgu ar *hrERα*, ja:
- saistīšanās līkne ir pielāgojama un pielāgotās atbildreakcijas līknes zemākais punkts datu diapazonā ir lielāks par 75 % vai
 - saistīšanās līkni pielāgot nevar un visu koncentrāciju grupu vidējā zemākā nenoapaļotā procentuālā saistīšanās pēc datiem pārsniedz 75 %.
58. Testējamās ķīmikālijas klasifikāciju uzskata par neskaidru, ja nav izpildīts neviens no iepriekšminētajiem nosacījumiem (t. i., zemākais pielāgotās atbildreakcijas līknes punkts ir robežās no 76 – 51 %).

7. tabula. Kritēriji, pēc kuriem klasificē testējamās ķīmikālijas, izmantojot konkurējošās saistīšanās līkni.

Klasifikācija	Kritēriji
Saisteklis ^a	Saistīšanās līkni var pielāgot. Zemākais atbildreakcijas līknes punkts datu diapazonā ir mazāks par 50 %.
Nesaisteklis ^b	Ja saistīšanās līkni var pielāgot, pielāgotās atbildreakcijas līknes zemākais punkts datu diapazonā ir virs 75 %. Ja saistīšanās līkni nevar pielāgot, visu koncentrāciju grupu vidējā zemākā nenoapaļotā procentuālā saistīšanās pēc datiem pārsniedz 75 %.
Neskaidra ^c	Jebkura testa izpildes reize, kas neuzrāda testējamās ķīmikālijas saistīgumu vai nesaistīgumu (piem., pielāgotās atbildreakcijas līknes zemākais punkts ir robežās no 76–51 %).

1. attēls. Piemēri, kā klasificē testējamās ķīmikālijas, izmantojot konkurējošās saistīšanās līkni.



59. Laboratorijā attiecībā uz katru testējamo ķīmikāliju testu veic vairākas izpildes reizes, un katrai izpildes reizei atkarībā no rezultāta piešķir ciparisku vērtību, no kuras pēc tam aprēķina vidējo vērtību atbilstoši 8. tabulā sniegtajam paraugam. Vidējos rezultātus, kas

apkopoti konkrētajā laboratorijā, salīdzina ar gaidīto katras testējamās ķīmikālijas klasifikāciju.

8. tabula. Metode, pēc kuras klasificē testējamo ķīmikāliju, izmantojot vairākas testēšanas reizes vienā laboratorijā.

Katrai izpildes reizei piešķir ciparisku vērtību:	
Klasifikācija	Cipariska vērtība
Saisteklis	2
Neskaidrs	1
Nesaisteklis	0
Izpildes reizēs iegūto ciparisko vērtību vidējās vērtības klasificēšana:	
Klasifikācija	Cipariska vērtība
Saisteklis	Vidēji $\geq 1,5$
Neskaidrs	$0,5 \leq \text{Vidējā vērtība} < 1,5$
Nesaisteklis	Vidēji $< 0,5$

TESTĒŠANAS PĀRSKATS

60. Sk. šīs testēšanas metodes sadaļas “HrER SAISTĪŠANĀS TESTA KOMPONENTI” 24. punktu.

3.1. papildinājums

TERMINU SARAKSTS

[³H]E2: 17β-estradiols, kas radioaktīvi marķēts ar tritiju.

DCC: ar dekstrānu pārklāta ogle.

E2: nemarķēts 17β-estradiols (inerts).

Testa buferšķīdums: 10 mM tris-HCl (pH 7,4), kas satur 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaVO₃, 10 % glicerīna, 0,2 mM leupeptīna, 1 mM ditiotreitola un 10 mg/ml liellopu seruma albumīna.

hrERα: cilvēka rekombinantais estrogēnreceptors alfa (liganda saistīšanās domēns).

Replikāts: viena no vairākām vienāda satura un vienādas koncentrācijas iedobēm, kuras paralēli testē vienā testēšanas reizē. Pēc šī protokola katru testējamās ķīmikālijas koncentrāciju testē ar trim replikātiem (triplikātiem); proti, pie katras testējamās ķīmikālijas koncentrācijas ir trīs replikāti, kurus testē vienlaicīgi.

Izpildes reize: viss paralēli testēto mikrotitrēšanas plates testa iedobju kopums, kas nodrošina visu informāciju, kura vajadzīga, lai raksturotu testējamās ķīmikālijas saistīšanos ar hrERα, (t. i., kopējais testa iedobei pievienotais [³H]-17β-estradiols, maksimālā [³H]-17β-estradiola saistīšanās ar hrERα, nespecifiskā saistīšanās un kopējā saistīšanās pie dažādām testējamās ķīmikālijas koncentrācijām). Izpildes reize var nozīmēt pat tikai vienas testēšanas iedobes (t. i., replikāta) testēšanu pie katras koncentrācijas, tomēr šajā konkrētajā gadījumā protokols pieprasa testēt ar triplikātiem, un viena izpildes reize nozīmē trīs testēšanas iedobes pie katras koncentrācijas. Papildus minētajam šis protokols prasa veikt trīs neatkarīgas (proti, neveicot paralēli) izpildes reizes ar katru ķīmikāliju.

3.2. papildinājums

KONKURĒJOŠĀS SAISTĪŠANĀS TESTA IEDOBJU IZKĀRTOJUMS

Plate	Pozīcija	Replikāts	Iedobes tips	Iedobes kods	Koncentrācijas kods	Konkurenta sākotnējā koncentrācija (M)	hrER izejīgums (μl)	Bufēršķiduma tilpums (μl)	Iezīmētā elementa (karsta E2) tilpums (μL)	Tilpums atšķaidījuma platē (μL)	Beigu tilpums (μl)	Konkurenta beigu koncentrācija (M)
S	A1	1	tukša	BK	BK1	—	—	—	—	—	—	—
S	A2	2	tukša	BK	BK2	—	—	—	—	—	—	—
S	A3	3	tukša	BK	BK3	—	—	—	—	—	—	—
S	B1	1	auksts E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	B2	2	auksts E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	B3	3	auksts E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	C1	1	auksts E2	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	C2	2	auksts E2	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	C3	3	auksts E2	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	D1	1	auksts E2	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	D2	2	auksts E2	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	D3	3	auksts E2	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	E1	1	auksts E2	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	E2	2	auksts E2	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	E3	3	auksts E2	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	F1	1	auksts E2	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	F2	2	auksts E2	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	F3	3	auksts E2	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	G1	1	auksts E2	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	G2	2	auksts E2	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	G3	3	auksts E2	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	H1	1	auksts E2	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	H2	2	auksts E2	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	H3	3	auksts E2	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	A4	1	noretinodrels	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	A5	2	noretinodrels	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	A6	3	noretinodrels	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B4	1	noretinodrels	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	B5	2	noretinodrels	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	B6	3	noretinodrels	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C4	1	noretinodrels	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	C5	2	noretinodrels	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	C6	3	noretinodrels	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	D4	1	noretinodrels	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D5	2	noretinodrels	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D6	3	noretinodrels	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	E4	1	noretinodrels	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07
S	E5	2	noretinodrels	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07
S	E6	3	noretinodrels	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07
S	F4	1	noretinodrels	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F5	2	noretinodrels	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F6	3	noretinodrels	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	G4	1	noretinodrels	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	G5	2	noretinodrels	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	G6	3	noretinodrels	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06

Konkurējošās saistīšanās testa iedobju izkārtojums

Plate	Pozīcija	Replikāts	Iedobes tips	Iedobes kods	Koncentrācijas kods	Konkurenta sākotnējā koncentrācija (M)	IrER izejšķārdums (μl)	Bufēršķārduma tilpums (μl)	Iezīmētā elementa (karsta E2) tilpums (μL)	Tilpums atšķaidījuma platē (μL)	Beigu tilpums (μl)	Konkurenta beigu koncentrācija (M)
S	H4	1	noretinodrels	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	H5	2	noretinodrels	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	H6	3	noretinodrels	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	kopējā saistīšanās	TB	TB1	-	30	60	10	-	100	-
S	A11	2	kopējā saistīšanās	TB	TB2	-	30	60	10	-	100	-
S	A12	3	kopējā saistīšanās	TB	TB3	-	30	60	10	-	100	-
S	B10	4	kopējā saistīšanās	TB	TB4	-	30	60	10	-	100	-
S	B11	5	kopējā saistīšanās	TB	TB5	-	30	60	10	-	100	-
S	B12	6	kopējā saistīšanās	TB	TB6	-	30	60	10	-	100	-
S	C10	1	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S1	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	C11	2	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S2	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	C12	3	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S3	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D10	4	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S4	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D11	5	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D12	6	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	E10	1	bufēršķārduma kontrole	BC	BC1	-	-	100	-	-	100	-
S	E11	2	bufēršķārduma kontrole	BC	BC2	-	-	100	-	-	100	-
S	E12	3	bufēršķārduma kontrole	BC	BC3	-	-	100	-	-	100	-
S	F10	4	bufēršķārduma kontrole	BC	BC4	-	-	100	-	-	100	-
S	F11	5	bufēršķārduma kontrole	BC	BC5	-	-	100	-	-	100	-

S	F12	6	buferšķīduma kontrolē	BC	BC6	-	-	100	-	-	100	-
S	G10*	1	tukša iedobe	karsta	H1	-	90	-	10	-	100	-
S	G11*	2	tukša iedobe	karsta	H2	-	90	-	10	-	100	-
S	G12*	3	tukša iedobe	karsta	H3	-	90	-	10	-	100	-
S	H10*	4	tukša iedobe	karsta	H4	-	90	-	10	-	100	-
S	H11*	5	tukša iedobe	karsta	H5	-	90	-	10	-	100	-
S	H12	6	tukša iedobe	karsta	H6	-	90	-	10	-	100	-

*: Piezīme: “karstās” iedobes inkubācijas laikā ir tukšas. 10 µl pievieno tikai scintilāciju skaitīšanai.

Konkurējošās saistīšanās testa iedobju izkārtojums												
Plate	Pozīcija	Replikāts	Iedobes tips	Iedobes kods	Koncentrācijas kods	Konkurenta sākotnējā koncentrācija (M)	IrER izejšķūdens (μl)	Bufēršķūdma tilpums (μl)	Iezīmētā elementa (karsta E2) tilpums (μL)	Tilpums atšķaidījuma platē (μL)	Beigu tilpums (μl)	Konkurenta beigu koncentrācija (M)
P1	A1	1	nezināms 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A2	2	nezināms 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A3	3	nezināms 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B1	1	nezināms 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B2	2	nezināms 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B3	3	nezināms 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C1	1	nezināms 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C2	2	nezināms 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C3	3	nezināms 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D1	1	nezināms 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D2	2	nezināms 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D3	3	nezināms 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E1	1	nezināms 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E2	2	nezināms 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E3	3	nezināms 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F1	1	nezināms 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F2	2	nezināms 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F3	3	nezināms 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G1	1	nezināms 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G2	2	nezināms 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G3	3	nezināms 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H1	1	nezināms 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H2	2	nezināms 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H3	3	nezināms 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A4	1	nezināms 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A5	2	nezināms 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A6	3	nezināms 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B4	1	nezināms 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B5	2	nezināms 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B6	3	nezināms 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C4	1	nezināms 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C5	2	nezināms 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C6	3	nezināms 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D4	1	nezināms 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D5	2	nezināms 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D6	3	nezināms 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E4	1	nezināms 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E5	2	nezināms 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E6	3	nezināms 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F4	1	nezināms 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F5	2	nezināms 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F6	3	nezināms 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G4	1	nezināms 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G5	2	nezināms 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G6	3	nezināms 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H4	1	nezināms 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H5	2	nezināms 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H6	3	nezināms 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03

Konkurējošās saistīšanās testa iedobju izkārtojums

Plate	Pozīcija	Replikāts	Iedobes tips	Iedobes kods	Koncentrācijas kods	Konkurenta sākotnējā koncentrācija (M)	I/ER izejšķidums (μl)	Bufēršķiduma tilpums (μl)	Iezīmētā elementa (karsta E2) tilpums (μL)	Tilpums atšķaidījuma platē (μL)	Beigu tilpums (μl)	Konkurenta beigu koncentrācija (M)
P1	A7	1	nezināms 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A8	2	nezināms 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A9	3	nezināms 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B7	1	nezināms 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B8	2	nezināms 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B9	3	nezināms 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C7	1	nezināms 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C8	2	nezināms 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C9	3	nezināms 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D7	1	nezināms 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D8	2	nezināms 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D9	3	nezināms 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E7	1	nezināms 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E8	2	nezināms 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E9	3	nezināms 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F7	1	nezināms 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F8	2	nezināms 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F9	3	nezināms 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G7	1	nezināms 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G8	2	nezināms 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G9	3	nezināms 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H7	1	nezināms 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H8	2	nezināms 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H9	3	nezināms 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A10	1	E2 kontrole (max)	S	E2max1	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	A11	2	E2 kontrole (max)	S	E2max2	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	A12	3	E2 kontrole (max)	S	E2max3	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	B10	1	E2 kontrole (IC ₅₀)	S	E2IC ₅₀ 1	E2IC ₅₀ x10	30	50	10	10	100	E2IC ₅₀
P1	B11	2	E2 kontrole (IC ₅₀)	S	E2IC ₅₀ 2	E2IC ₅₀ x10	30	50	10	10	100	E2IC ₅₀
P1	B12	3	E2 kontrole (IC ₅₀)	S	E2IC ₅₀ 3	E2IC ₅₀ x10	30	50	10	10	100	E2IC ₅₀
P1	C10	1	NE kontrole	S	Nemax1	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	C11	2	NE kontrole	S	Nemax2	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	C12	3	NE kontrole	S	Nemax3	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	D10	1	NE kontrole	S	NEIC ₅₀ 1	NEIC ₅₀ x10	30	50	10	10	100	NEIC ₅₀
P1	D11	2	NE kontrole	S	NEIC ₅₀ 2	NEIC ₅₀ x10	30	50	10	10	100	NEIC ₅₀
P1	D12	3	NE kontrole	S	NEIC ₅₀ 3	NEIC ₅₀ x10	30	50	10	10	100	NEIC ₅₀
P1	E10	1	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S1	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E11	2	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S2	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E12	3	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S3	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F10	4	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S4	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F11	5	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F12	6	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	G10	1	kopējā saistīšanās	TB	TB1	-	30	60	10	-	100	-
P1	G11	2	kopējā saistīšanās	TB	TB2	-	30	60	10	-	100	-
P1	G12	3	kopējā saistīšanās	TB	TB3	-	30	60	10	-	100	-
P1	H10	4	kopējā saistīšanās	TB	TB4	-	30	60	10	-	100	-

P1	H11	5	kopējā saistīšanās	TB	TB5	-	30	60	10	-	100	-
P1	H12	6	kopējā saistīšanās	TB	TB6	-	30	60	10	-	100	-

4. papildinājums

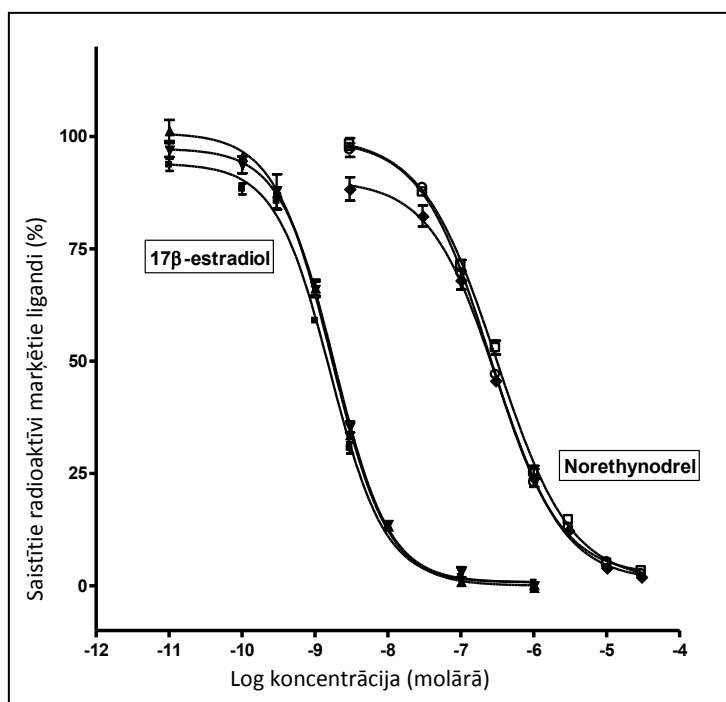
APSVĒRUMI, KAS JĀŅEM VĒRĀ, ANALIZĒJOT *hrER* KONKURĒJOŠĀS SAISTĪŠANĀS TESTA DATUS

1. *hrERα* konkurējošās saistīšanās tests mēra vienas konkrētas [³H]-17β- estradiola koncentrācijas saistīšanos arvien pieaugošu testējamās ķimikālijas koncentrāciju klātbūtnē. Konkurējošās saistīšanās līkni grafiski attēlo kā specifisko [³H]-17β-estradiola saistīšanos attiecībā pret konkurenta koncentrāciju (log10 vienībās). Testējamās ķimikālijas koncentrācija, kas inhibē 50 % [³H]17β-estradiola maksimālās specifiskās saistīšanās, ir IC₅₀ vērtība.

References estrogēna un vāja saistekļa ģenerēto datu analīze (1)

2. Kontroles testēšanas reizēs iegūtos datus transformē turpmākai analizēšanai (t. i., procentuālā [³H]-17β-estradiola specifiskā saistīšanās un kontroles ķimikālijas log koncentrācija). Pozitīvo kontroļu (t. i., references estrogēna un vāja saistekļa) log (IC₅₀) vērtību aplēses nosaka, izmantojot atbilstošu nelineāru līknes piemeklēšanas programmatūru, lai panāktu atbilstību Hilla vienādojumam ar četriem parametriem, piem., *BioSoft*; *GraphPad Prism*) (2). Veicot pielāgošanu līknei, augšējo un apakšējo punktu, virziena koeficientu un log (IC₅₀) ierobežot parasti nav vajadzīgs. Meklējot labāko atbilstību līknei, izmanto robustu regresiju, ja vien nav pamatota iemesla rīkoties citādi. Pārskatā norāda izvēlēto robustas regresijas metodi. *FW* vai *CERI hrER* testiem liganda noplicināšanās korekcija nav vajadzīga, bet attiecīgā gadījumā var apsvērt tās lietošanu. Pēc sākotnējās analīzes katru saistīšanās līkni pārskata, lai nodrošinātu pienācīgu atbilstību paraugam. Vāja saistekļa relatīvo afinitāti (*RBA*) var aprēķināt kā procentuālu vērtību no vāja saistekļa log (IC₅₀) attiecībā pret 17β-estradiola log (IC₅₀). Ar pozitīvajām kontrolēm un nesaistīgām kontrolēm iegūtos rezultātus izvērtē, izmantojot testa veikspējas un pieņemamības kritērijus, kas aprakstīti šajā testa metodē (20. punkts), 2.papildinājumā (*FW* testa 41.–51. punkts) un 3. papildinājumā (*CERI* tests, 41.–51. punkts). 1. attēlā sniegti references estrogēna un vāja saistekļa piemēri, testu veicot trīs reizes.

1. attēls. Konkurējošās saistīšanās līknes piemēri ar references estrogēnu un vāja saistekļa kontroli.

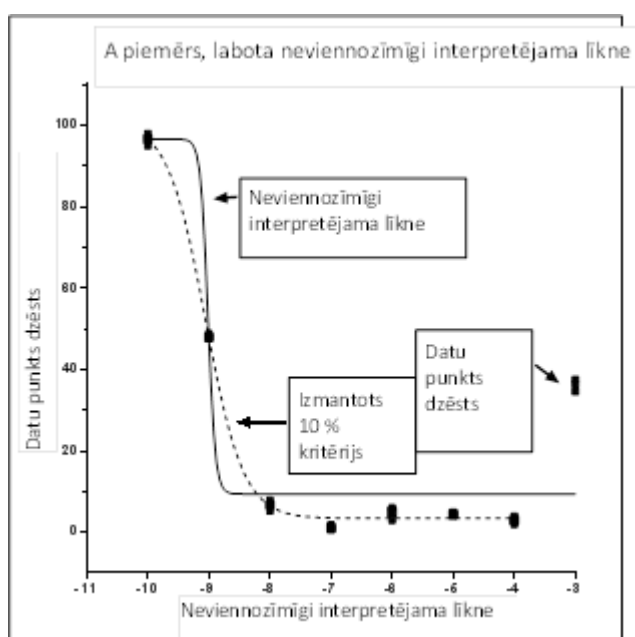


Testējamo ķīmikāliju ģenerēto datu analīze

3. Datus par visām testējamajām ķīmikālijām būtu jāanalizē, izmantojot pakāpenisku pieeju, kas nodrošina datu pienācīgu analīzi un to, ka katra konkurējošās saistīšanās līkne tiek klasificēta pareizi. Pirms katras testa veikšanas reizes testējamās ķīmikālijas datus sākotnēji analizē standartizētā veidā, identiski tam, kā tiek analizēti references estrogēns un vāja saistekļa kontroles. Pēc tam katrā testa veikšanas reizē tehniski pārskata, vai līkne atbilst parametriem, un vizuāli nosaka, cik precīzi dati atbilst ģenerētajai konkurējošās saistīšanās līknei. Ja šīs tehniskās pārbaudes laikā novēro, ka [³H]-17β-estradiola specifiskā saistīšanās atkarībā no koncentrācijas procentuāli samazinās, rezultātu mainība tehnisko replikātu starpā pie katras ķīmiskās koncentrācijas ir neliela un līknes atbilstība parametriem trīs testa veikšanas reizēs ir konsekventa, tas ir pietiekami uzticams rādītājs, ka tests un datu analīze ir veikti pareizi. Katrā testēšanas reizē attiecībā uz testējamo ķīmikāliju iegūtos rezultātus ir jāizvērtē speciālistam, un datiem, pēc kuriem katru testējamo ķīmikāliju klasificē kā saistīgu vai nesaistīgu, jābūt zinātniski pamatojamiem.
4. Dažkārt var būt situācijas, kad *h*rER saistīšanās datu pienācīgas analizēšanas un interpretēšanas vajadzībām datiem ir jāveic zināmas korekcijas. Agrākos pētījumos ir novēroti gadījumi, kad receptora konkurējošās saistīšanās datu analīzi un interpretāciju apgrūtināja procentuālās specifiskās saistīšanās pieaugums, ja ķīmikālijas testē augstākā koncentrācijā (2. attēls). Šī problēma ir plaši zināma dažādu receptora konkurējošās saistīšanās testu protokolu lietotājiem (3). Šādos gadījumos no koncentrācijas atkarīgā

atbildreakcija tiek novērota pie zemākām koncentrācijām, bet, kad testējamās ķīmikālijas koncentrācija tuvojas šķīdības robežai, [^3H]17 β -estradiola pārvietošana vairs nesamazinās. Šādos gadījumos pie augstākajām koncentrācijām iegūtie dati norāda uz to, ka ir sasniegta testa bioloģiskā robeža. Piemēram, šis fenomens daudzkārt tiek saistīts ar ķīmisko nešķīdību un izgulsnēšanos pie augstākām koncentrācijām vai arī var atspoguļot to, ka pie visaugstākajām ķīmiskajām koncentrācijām ir pārsniegta ar dekstrānu pārklātas ogles spēja uztvert nesaistītu radioaktīvi marķētu ligandu atdalīšanās procedūras laikā. Ja, veicot konkurējošās saistīšanās datu pielāgošanu divvirzienu līknei, šādus datu punktus saglabā, tas dažkārt var novest pie nepareizas ER saistīšanās potenciāla klasificēšanas attiecībā uz testējamo ķīmikāliju (2. attēls). Lai no tā izvairītos, *FW* un *CERI hrER* saistīšanās testu protokoli ietver izvēli no analīzes izslēgt tādus datu punktus, kuros ar replikātiem iegūtā [^3H]17 β -estradiola specifiskās saistīšanās procentuālā vidējā vērtība par 10 % vai vairāk pārsniedz pie zemākas koncentrācijas iegūto vidējo vērtību (to dēvē par 10 % kritēriju). Šo kritēriju attiecībā uz konkrēto līkni var izmantot tikai vienu reizi, un, lai līkni varētu pareizi klasificēt, tajā ir jābūt saglabātiem datiem vismaz par sešām koncentrācijām.

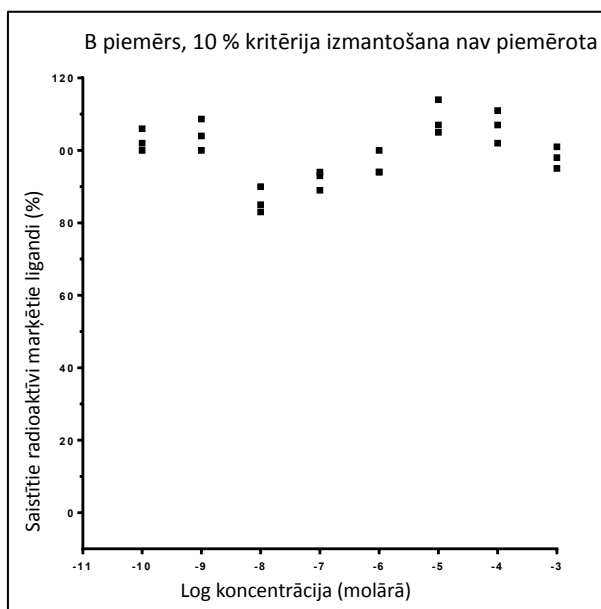
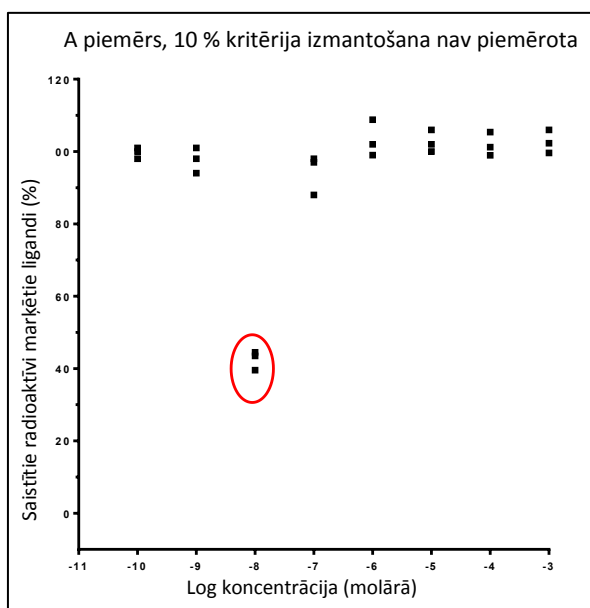
2. attēls. Piemēri: konkurējošās saistīšanās līknes, izmantojot 10 % kritēriju un bez tā.



5. To, vai ir atbilstoši izmantot 10 % kritēriju, lai labotu šīs līknes, ir rūpīgi jāizsver, un to izmanto vien gadījumos, kad dati stingri norāda uz *hrER* saistekli. Kad *FW hrER* saistīšanās testa validācijas pētījuma laikā veica eksperimentus, tika novērots, ka dažkārt 10 % kritērija piemērošana izraisa neplānotas un neparedzamas sekas. Attiecībā uz ķīmikālijām, kas nemijedarbojās ar receptoru *r* (t. i., faktiskie nesaistekļi), pie aptuveni 100 % radioaktīvi marķēto ligandu saistīšanās bieži bija vērojama mainība, kas visā testēto koncentrāciju diapazonā pārsniedza 10 %. Ja viszemākā vērtība tika konstatēta pie zemas

koncentrācijas, datus par visām augstākajām koncentrācijām potenciāli varētu izņemt no analizējamajiem datiem, izmantojot 10 % kritēriju, lai gan šīs koncentrācijas var izrādīties noderīgas, nosakot, vai attiecīgā ķīmikālija ir nesaisteklis. 3. attēlā sniegtie piemēri ilustrē gadījumus, kad 10 % kritērija izmantošana nav piemērota.

3. attēls. Piemēri: konkurējošās saistīšanās dati gadījumos, kad nepiemēro 10 % kritēriju.



Atsauces

- (1) OECD (2015). *Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrER α)*, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), 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
- (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.