



Kunsill  
tal-Unjoni Ewropea

Brussell, 25 ta' Frar 2019  
(OR. en)

6800/19  
ADD 1

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

#### NOTA TA' TRASMISSJONI

|                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| minn:             | Kummissjoni Ewropea                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| data meta waslet: | 22 ta' Frar 2019                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| lil:              | Segretarjat Ġenerali tal-Kunsill                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Nru. dok. preċ.:  | Anness tar D060575/02                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Suġġett:          | Anness tar-REGOLAMENT TAL-KUMMISSJONI (UE) .../... ta' XXX li jemenda, għall-finijiet tal-adattament tiegħu għall-progress tekniku, l-Anness tar-Regolament (KE) Nru 440/2008 li jistabbilixxi metodi ta' ttestjar skont ir-Regolament (KE) Nru 1907/2006 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill dwar ir-reġistrazzjoni, il-valutazzjoni, l-awtorizzazzjoni u r-restrizzjoni ta' sustanzi kimiċi (REACH) |

Id-delegazzjonijiet għandhom isibu mehmuz id-dokument Anness tar D060575/02

Mehmuz: Anness tar D060575/022

## Anness – Parti 1/2

MT

## ANNEX

L-Anness tar-Regolament (KE) Nru 440/2008 hu emendat kif ġej:

(1) Fil-Parti B, il-Kapitolu B.4 hu sostitwit b'dan li ġej:

### “B.4 IRRITAZZJONI DERMALI AKUTA/KORRUŻJONI

#### INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar hu ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 404 tal-OECD (2015). Il-linji gwida tal-OECD għall-ittestjar tas-Sustanzi Kimiċi jiġu rieżaminati kull ċertu żmien biex jiġi żgurat li dawn jirriflettu l-aħjar xjenza disponibbli. Fir-rieżami tat-TG 404 tal-OECD, ingħatat attenzjoni speċjali għat-titjib possibbli b'rabta ma' dak li jikkonċerna l-benessri tal-annimali u għall-evalwazzjoni tal-informazzjoni eżistenti kollha dwar is-sustanza kimika tat-test biex ikunu evitati testijiet mingħajr hteġa fuq l-annimali tal-laboratorju. Il-verżjoni aġġornata tat-TG 404 tal-OECD (originarjament adottata fl-1981, riveduta fl-1992, fl-2002 u fl-2015) tinkludi referenza għad-Dokument ta' Gwida dwar l-Approċċi Integrati għall-Ittestjar u għall-Valutazzjoni (IATA) għall-Irritazzjoni/Korrużjoni tal-Ġilda (1), filwaqt li tipproponi approċċ modulari għall-ittestjar tal-irritazzjoni tal-ġilda u għall-korrużjoni tal-ġilda. L-IATA jiddeskrivi diversi moduli li jiġbru fihom sorsi ta' informazzjoni u għodod ta' valutazzjoni, u jipprovdi gwida dwar (i) kif tintegra u tuża d-*data* eżistenti dwar l-ittestjar u mhux tal-ittestjar għall-valutazzjoni tal-potenzjali ta' irritazzjoni tal-ġilda u ta' korrużjoni tal-ġilda tas-sustanzi kimiċi u (ii) jipproponi approċċ fejn ikun meħtieġ ittestjar ulterjuri (1). Barra minn dan, il-Linja Gwida tirrakkomanda, meta tkun meħtieġa, l-applikazzjoni suċċessiva, minflok simultanja, tat-tliet kumpressi tat-test għall-annimal fit-test inizjali *in vivo*.
2. Id-definizzjonijiet ta' irritazzjoni u ta' korrużjoni dermali huma stabbiliti fl-Appendiċi ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

#### KUNSIDERAZZJONIJIET TAL-BIDU

3. Fl-interess kemm tax-xjenza solida kif ukoll tat-trattament xieraq tal-annimali, l-ittestjar *in vivo* ma għandux isir qabel ma d-*data* disponibbli kollha rilevanti għall-

korrużività/irritazzjoni dermali potenzjali tas-sustanza kimika tat-test tkun giet evalwata f'analizi tal-piż tal-evidenza (WoE) kif ippreżentata fid-Dokument ta' Gwida dwar l-Approċċi Integrati għall-Ittestjar u għall-Valutazzjoni għall-Korrużjoni u għall-Irritazzjoni tal-Ġilda, jiġifieri fuq it-tliet Partijiet ta' din il-gwida u l-moduli korrispondenti tagħhom (1). Fil-qosor, fil-Parti 1 id-*data* eżistenti tiġi indirizzata fuq seba' moduli li jkopru d-*data* umana, id-*data in vivo*, id-*data in vitro*, id-*data* dwar il-proprietajiet fiżikokimiċi (eż. pH, b'mod partikolari aċidità jew alkalinità b'saħħitha) u metodi mhux ta' ttestjar. Fil-Parti 2 issir l-analizi tad-WoE. Jekk din l-analizi tad-WoE tibqa' inkonklużiva, il-Parti 3 għandha ssir permezz ta' ttestjar addizzjonali, l-ewwel b'metodi *in vitro*, u bl-ittestjar *in vivo* li jintuża bħala l-aħħar istanza. Għaldaqstant, din l-analizi għandha tnaqqas il-ħtieġa għall-ittestjar *in vivo* għall-korrużività/irritazzjoni dermali ta' sustanza kimika tat-test li għalihom diġà jkun hemm biżżejjed evidenza minn studji oħra rigward dawk iż-żewġ punti ta' tmiem.

## PRINĊIPJU TAT-TEST *IN VIVO*

4. Is-sustanza kimika tat-test li għandha tkun ittestjata tiġi applikata f'doża singola għall-ġilda ta' annimal sperimentali; iż-żoni tal-ġilda mhux trattati tal-annimal tat-test iservu għall-kontroll. Il-grad tal-korrużjoni/irritazzjoni ikun moqri u rreġistrat matul intervalli speċifiċi u jkun deskritt aktar biex jipprovi evalwazzjoni sħiħa tal-effetti. Id-durata tal-istudju għandha tkun suffiċjenti biex ikunu evalwati r-riversibbiltà jew in-nuqqas ta' riversibbiltà tal-effetti osservati.
5. L-annimali li juru sinjali kontinwi ta' tbatija u/jew uġiġħ severi fi kwalunkwe stadju tat-test għandhom jinqatlu bl-ewtanażja, u s-sustanza kimika tat-test għandha tkun ivvalutata kif xieraq. Il-kriterji għat-tehid tad-deċiżjoni biex jinqatlu bl-ewtanażja l-annimali fi stat ta' agunija jew ta' tbatija severa huma spjegati f'Dokument ta' Gwida separat (2).

## PREPARAMENTI GHAT-TEST *IN VIVO*

### Għażla tal-ispeċi tal-annimali

6. Il-fenek albino hu l-annimal preferut tal-laboratorju, u jintużaw fniek adulti żgħar f'saħħithom. Ir-raġuni għall-użu ta' speċi oħra għandha tiġi pprovduta.

### Preparazzjoni tal-annimali

7. Madwar 24 siegħa qabel it-test, is-suf għandu jitneħħa bi tqaxxir taż-żona dorsali minn fuq id-dahar l-annimali. Għandha tingħata attenzjoni biex jiġi evitat li tinbarax il-ġilda, u għandhom jintużaw biss dawk l-anniml li jkunu b'saħħithom u li jkollhom ġilda intatta.

8. Uħud mir-razez tal-fniek ikollhom irqajja' folti ta' suf li jkunu aktar prominenti f'ċerti żminijiet tas-sena. Tali żoni ta' tkabbir ta' suf folt ma għandhomx jintużaw bħala siti tat-testijiet.

### **Kundizzjonijiet tal-abitazzjoni u tal-ghalf**

9. L-annimali għandhom jinżammu f'gagēg individwali. It-temperatura tal-kamra tal-annimali esperimentali għandha tkun ta' 20°C ( $\pm$  3°C) għall-fniek. Filwaqt li l-umdità relattiva għandha tkun tal-anqas ta' 30 % u idealment ma taqbiżx is-70 %, minbarra matul it-tindif tal-kamra, il-mira għandha tkun ta' 50-60 %. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, bis-sekwenza tkun ta' 12-il siegħa dawl/12-il siegħa dlam. Għall-ghalf, jistgħu jintużaw id-dieti konvenzjonali tal-laboratorju bi provvista mingħajr limitu ta' ilma tax-xorb

## **PROCEDURA TAT-TEST**

### **Applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test**

10. Is-sustanza kimika tat-test għandha tkun applikata fuq zona żgħira (madwar 6 cm<sup>2</sup>) tal-gilda u tinkesa b'kumpressa b'garża, li tinzamm fil-post bi stikk mhux irritanti. Fil-każi li fihom l-applikazzjoni diretta ma tkunx possibbli (eż. likwidi u ċerti pejsts), is-sustanza kimika tat-test l-ewwel għandha tkun applikata fuq kumpressa b'garża, li mbagħad tkun applikata fuq il-gilda. Il-kumpressa għandha tinzamm f'kuntatt laxk mal-gilda permezz ta' faxxa semiokklużiva adattata għad-durata tal-esponiment. Jekk is-sustanza kimika tat-test tkun applikata fuq il-kumpressa, din għandha titwahhal mal-gilda b'tali mod li jkun hemm kuntatt tajjeb u distribuzzjoni uniformi tas-sustanza kimika tat-test mal-gilda. L-aċċess mill-annimal għall-kumpressa u l-ingestjoni jew it-tehid man-nifs tas-sustanza kimika tat-test għandhom jiġu evitati.
11. Is-sustanzi kimiċi likwidi tat-test generalment jintużaw fi stat mhux dilwit. Meta jsiru t-testijiet ta' solidi (li jistgħu jitfarrku, jekk dan jitqies li jkun meħtieġ), is-sustanza kimika tat-test għandha tkun niedja b'ammont żgħir ilma (jew, meta meħtieġ, b'xi veikolu adattat ieħor) li jkun suffiċjenti biex jiżgura kuntatt tajjeb mal-gilda. Meta jintużaw veikoli oħra apparti l-ilma, l-influwenza potenzali tal-veikolu fuq l-irritazzjoni tal-gilda mis-sustanza kimika tat-test għandha tkun minima, jekk tkun preżenti affattu.
12. Fit-tmiem tal-perjodu tal-esponiment, li normalment ikun ta' erba' sigħat, is-sustanza kimika tat-test residwa għandha titneħħa, fejn Prattikabbli, bl-użu tal-ilma jew ta' xi solvent xieraq mingħajr ma jitbiddlu r-rispons eżistenti jew l-integrità tal-epidermis.

### **Livell tad-doża**



13. Doża ta' 0,5 ml likwidu jew 0,5 g solidu jew pejst tiġi applikata fiż-żona tat-test.

**Test inizjali (Test *in vivo* għall-irritazzjoni/korrużjoni dermali bl-użu ta' annimal wiehed)**

14. Meta sustanza kimika tat-test tiġi ġudikata bħala korrużiva, irritanti jew mhux klassifikata fuq il-bażi ta' analiżijiet tal-piż tal-evidenza jew ta' ttestjar *in vitro* preċedenti, normalment ma jkunx hemm bżonn ta' ttestjar *in vivo* ulterjuri. Madankollu, fil-każijiet li fihom id-*data* addizzjonali titqies ġustifikata, it-test *in vivo* għall-ewwel isir bl-użu ta' annimal wiehed u billi jiġi applikat l-approċċ segwenti. Sa tliet kumpressi tat-test jiġu applikati b'mod sekwenzjali fuq l-annimal. L-ewwel kumpressa titneħħa wara tliet minuti. Jekk ma tiġi osservata ebda reazzjoni serja tal-ġilda, tiġi applikata t-tieni kumpressa f'sit differenti u din titneħħa wara siegħa. Jekk l-osservazzjonijiet f'dan l-istadju jindikaw li l-esponiment jista' jithalla b'mod uman għal erba' sigħat, tiġi applikata t-tielet kumpressa u din titneħħa wara erba' sigħat, u jiġi gradat ir-rispons.
15. Jekk effett korrossiv ikun osservat wara kwalunkwe wiehed mit-tliet esponimenti sekwenzjali, it-test jiġi terminat minnufih. Jekk effett korrossiv ma jkunx osservat wara li titneħħa l-aħħar kumpressa, l-annimal ikun osservat għal 14-il jum, sakemm il-korrużjoni ma tkunx żviluppat f'xi punt aktar kmieni.
16. F'dawk il-każijiet li fihom is-sustanza kimika tat-test ma tkunx mistennija tipproduċi korrużjoni imma tista' tkun irritanti, għandha tiġi applikata kumpressa waħda fuq annimal wiehed għal erba' sigħat.

**Test konfirmatorju (Test *in vivo* għal irritazzjoni dermali b'annimali addizzjonali)**

17. Jekk effett korrużiv ma jkunx osservat fit-test inizjali, l-irritant jew ir-rispons negattiv għandu jiġi kkonfermat bl-użu ta' massimu ta' żewġ annimali oħra, kull wiehed b'kumpressa waħda, għal perjodu ta' esponiment ta' erba' sigħat. Jekk effett irritanti jkun osservat fit-test inizjali, it-test konfirmatorju jista' jitwettaq b'mod sekwenzjali, jew bl-esponiment ta' żewġ annimali addizzjonali fl-istess ħin. Fil-każ eċċezzjonali li fih ma jsirx it-test inizjali, żewġ annimali jew tlieta jistgħu jiġu ttrattati b'kumpressa waħda, li titneħħa wara erba' sigħat. Meta jintużaw żewġ annimali, jekk it-tnejn li huma juru l-istess rispons, ma jkun meħtieġ isir ebda ttestjar ulterjuri. Inkella, jiġi ttestjat it-tielet annimal ukoll. Risponsi ekwivoċi ikunu jeħtieġu evalwazzjoni bl-użu ta' annimali addizzjonali.

**Perjodu ta' osservazzjoni**

18. Id-durata tal-perjodu ta' osservazzjoni għandha tkun suffiċjenti biex tkun evalwata bis-shiħ ir-riversabbiltà tal-effetti osservati. Minkejja dan, l-esperiment għandu jiġi terminat fi kwalunkwe waqt jekk l-annimal juri sinjali kontinwi ta' uġiġħ jew ta' tbatija serji. Biex ikunu determinati l-effetti tar-riversabbiltà, l-annimali għandhom ikunu osservati sa 14-il

jum wara t-tnehhija tal-kumpressi. Jekk ir-riversibbiltà tkun osservata qabel l-14-il jum, l-esperiment għandu jiġi terminat f'dak il-waqt.

### **Osservazzjonijiet kliniċi u l-iggradar tar-reazzjonijiet tal-ġilda**

19. L-annimali kollha għandhom ikunu eżaminati għal sinjali ta' eritema u ta' edema, u r-risponsi reġistrati wara 60 minuta, u mbagħad 24, 48 u 72 siegħa wara t-tnehhija tal-kumpressa. Għat-test inizjali fuq annimal wieħed, is-sit tat-test ikun ukoll eżaminat immedjatement wara li titneħħa l-kumpressa. Ir-reazzjonijiet dermali huma ggradati u rreġistrati skont il-grad fit-Tabella ta' hawn taht. Jekk ikun hemm ħsara fil-ġilda li ma tistax tiġi identifikata bħala irritazzjoni jew korruzzjoni wara 72 siegħa, l-osservazzjonijiet jistgħu jkunu meħtieġa sal-jum 14 biex tkun determinata r-riversibbiltà tal-effetti. B'żieda mal-osservazzjonijiet tal-irritazzjoni, l-effetti tossiċi lokali kollha, bħal ma huma n-nuqqas ta' xaham min taht il-ġilda, u kwalunkwe effett sistematiku avvers (eż. l-effetti fuq sinjali kliniċi ta' tossiċità u l-piż tal-ġisem), għandhom ikunu deskritti bis-siġġ u rreġistrati. L-eżami istopatoloġiku għandu jiġi kkunsidrat biex jiċċara risponsi ekwivoċi.
20. L-iggradar tar-reazzjonijiet tal-ġilda bilfors li jkun soġġettiv. Biex tkun imħegġa l-armonizzazzjoni fl-iggradar tar-rispons tal-ġilda u biex ikunu meħjuna l-laboratorji tat-testijiet u dawk involuti fit-twettiq u fl-interpretazzjoni tal-osservazzjonijiet, il-persunal li jagħmel l-osservazzjonijiet irid ikun imħarreġ b'mod adegwat fis-sistema tal-iggradar użata (ara t-Tabella ta' hawn taht). Gwida illustrata għall-iggradar tal-irritazzjoni tal-ġilda u ta' leżjonijiet oħra tista' tkun ta' għajjnuna (3).

### **DATA U RAPPORTAR**

21. Ir-riżultati tal-istudju għandhom ikunu miġbura f'forma tabulari fir-rapport tat-test finali u għandhom ikopru l-punti kollha elenkati fil-paragrafu 24.

### **Evalwazzjoni tar-riżultati**

22. Il-punteggi tal-irritazzjoni dermali għandhom ikunu evalwati flimkien man-natura u mas-severità tal-leżjonijiet, u mar-riversibbiltà jew man-nuqqas ta' riversibbiltà tagħhom. Il-punteggi individwali ma jirrapprezentawx norma assoluta għall-propjetajiet irritanti ta' xi materjal, minhabba li jiġu evalwati wkoll effetti oħra tal-materjal tat-test. Minflok, il-punteggi individwali għandhom jitqiesu bħala valuri referenzjarji, li jridu jkunu evalwati flimkien mal-osservazzjonijiet l-oħra kollha li jirriżultaw mill-istudju.
23. Ir-riversibbiltà tal-leżjonijiet dermali wkoll għandha tkun ikkunsidrata fl-evalwazzjoni tar-risponsi irritanti. Meta r-risponsi bħalma huma l-alopeċja (żona limitata), l-iperkeratozi,

l-iperplażja u l-esfoljazzjoni, jippersistu sa tmiem il-perjodu ta' 14-il jum osservazzjoni, is-sustanza kimika tat-test għandha titqies bħala irritant.

## Rapport tat-test

24. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

*Il-ħsieb wara l-ittestjar in vivo:*

- analiżi tal-piż tal-evidenza tad-*data* preeżistenti tat-test, inklużi r-riżultati minn strategija ta' ttestjar sekwenzjali;
- Deskrizzjoni tad-*data* rilevanti disponibbli mill-ittestjar preċedenti;
- *Data* miksuba f'kull stadju tal-istrategija ta' ttestjar;
- Deskrizzjoni tat-testijiet *in vitro* mwettqa, inklużi d-dettalji tal-proċeduri, ir-riżultati miksuba bis-sustanzi tat-test/referenza;
- Analizi tal-piż tal-evidenza għat-twettieq tal-istudju *in vivo*.

*Sustanza kimika tat-test:*

- Sustanza monokostitwenti: l-identifikazzjoni kimika, bħall-isem IUPAC jew CAS, in-numru CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ;
- Sustanza multikostitwenti, taħlita u sustanzi b'kompożizzjoni mhux magħrufa jew varjabbli, prodotti b'reazzjoni kumplessa jew materjali bijoloġiċi (UVCB): ikkaratterizzati sa fejn possibbli mill-identità kimika (ara aktar 'il fuq), l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprietajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti;
- Id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma, u l-proprietajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali;
- Is-sors, in-numru tal-lott jekk disponibbli;
- It-trattament tas-sustanza kimika tat-test/tas-sustanza tal-kontroll qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (eż., it-tiġin, it-tin);
- L-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test, id-data ta' limitu għall-użu, jew id-data għall-analiżi mill-ġdid, jekk magħrufa;
- Il-kundizzjonijiet tal-ħżin.

*Il-veikolu:*

- L-identifikazzjoni, il-konċentrazzjoni (fejn xieraq), il-volum użat;
- Il-ġustifikazzjoni għall-ghażla tal-veikolu.

*L-annimal(i) tat-test:*

- L-ispeċi/ir-razza użata, ir-raġuni wara l-użu ta' annimal(i) li mhuwiex fenek albino;
- In-numru tal-annimal(i) għal kull sess;
- Il-piż(ijiet) tal-annimali individwali, kemm fil-bidu kif ukoll fil-konklużjoni tat-test;
- L-età fil-bidu tal-istudju;
- Is-sors tal-annimal(i), il-kundizzjonijiet tal-abitazzjoni, id-dieta, eċċ.

*Il-kundizzjonijiet tat-test:*

- It-teknika tal-preparazzjoni tas-sit tal-kumpressa;
- Id-dettalji dwar il-materjali tal-kumpressa użati u t-teknika tal-kumpressa;
- Id-dettalji dwar il-preparazzjoni, l-applikazzjoni u t-tneħħija tas-sustanza kimika tat-test.

*Ir-riżultati:*

- Tabulazzjoni tal-punteggi tar-rispons/korrużjoni għal kull annimal fil-punti kollha tal-hin imkejla;
- Id-deskrizzjonijiet tal-leżjonijiet kollha, kif osservati;
- Id-deskrizzjoni narrattiva tan-natura u l-grad tal-irritazzjoni jew tal-korrużjoni osservati, u kwalunkwe sejba istopatoloġika;
- Id-deskrizzjoni ta' effetti avversi lokali (eż. tneħħija tax-xaħam minn taħt il-ġilda) u sistematiki oħra minbarra l-irritazzjoni jew il-korrużjoni dermali.

*Diskussjoni dwar ir-riżultati*

*Konklużjonijiet*

## DOKUMENTAZZJONI

- (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), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.
- (2) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, kif approvata mit-28 Laqgħa Kongunta tal-Kumitat tas-Sustanzi Kimiċi u tal-Grupp ta' Hidma dwar is-Sustanzi Kimiċi, Novembru 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), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

**TABELLA: IGGRADAR TAR-REAZZJONIJIET TAL-ĠILDA****Formazzjoni ta' Eritema u ta' Eskara**

|                                                                                                       |   |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|
| Ebda eritema.....                                                                                     | 0 |
| Eritema ħafifa ħafna (kemm kemm tidher).....                                                          | 1 |
| Eritema definita sew.....                                                                             | 2 |
| Eritema moderata sa severa.....                                                                       | 3 |
| Eritema severa (ħmura tal-laħam) sa formazzjoni ta' eskara li tipprevjeni l-iggradar tal-eritema... 4 |   |
| Il-massimu possibbli: 4                                                                               |   |

**Il-Formazzjoni ta Edema**

|                                                                                    |   |
|------------------------------------------------------------------------------------|---|
| Ebda edema.....                                                                    | 0 |
| Edema ħafifa ħafna (kemm kemm tidher).....                                         | 1 |
| Edema ħafifa (il-ġnub taż-żona huma definiti sew b'nefħiet definiti).....          | 2 |
| Edema moderata (nefħa ta' madwar 1 mm).....                                        | 3 |
| Edema severa (nefħa akbar minn 1 mm u tifrix lil hinn miż-żona tal-esponiment).... | 4 |
| Il-massimu possibbli: 4                                                            |   |

L-eżami istopatoloġiku għandu jitwettaq biex jiċċara risponsi ekwivoċi.



## Appendiċi

### DEFINIZZJONIJIET

Sustanza kimika hi sustanza jew taħlita.

Irritazzjoni dermal hi l-produzzjoni ta' ħsara reversibbli fil-ġilda wara li tiġi applikata sustanza kimika tat-test għal mhux aktar minn erba' sigħat.

Korrużjoni dermal hi l-produzzjoni ta' ħsara irriversibbli fil-ġilda; jiġifieri nekrozi viżibbli mill-epidermis u ġewwa d-dermis, wara l-applikazzjoni ta' sustanza kimika tat-test għal mhux aktar minn erba' sigħat. Ir-reazzjonijiet korrossivi huma kkaratterizzati minn ulċeri, fsad, qxur bid-demm, u, fit-tmiem tal-osservazzjoni fl-14-il jum, minn skulurazzjoni minhabba t-tibjid tal-ġilda, żoni shaħ b'alopecja, u ċikatriċi. L-istopatoloġija għandha titqies biex jiġu evalwati leżjonijiet li dwarhom ikun hemm dubju.

Sustanza kimika tat-test hi kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata bl-użu ta' dan il-metodu ta' ttestjar"



(2) Fil-Parti B, il-Kapitolu B.17 hu ssostitwit b'dan li ġejj:

**“B.17 TESTIJIET *IN VITRO* TAL-MUTAZZJONI ĠENETIKA FUQ ĊELLOLI TAL-MAMMIFERI BL-UŻU TAL-ĠENI HPRT U XPRT**

**INTRODUZZJONI**

1. Dan il-metodu ta' ttestjar (TM) hu ekwivalenti għal-linji gwida tat-test 476 tal-OECD (2016). Il-metodi ta' ttestjar jiġu rieżaminati kull ċertu żmien fid-dawl tal-progress xjentifiku, tal-htigijiet regolatorji li jinbidlu u tat-trattament xieraq tal-annimali. Din il-verżjoni riveduta kurrenti tat-TM B.17 tirrifletti kwazi tletin sena esperjenza b'dan it-test u tirrizulta wkoll mill-iżvilupp ta' metodu ġdid separat dedikat għal testijiet *in vitro* tal-mutazzjoni ġenetika fuq ċelloli tal-mammiferi bl-użu tal-gene tat-timidina kinazi. TM B.17 hu parti minn sensiela ta' metodi ta' ttestjar dwar it-tossikoloġija ġenetika. L-OECD żviluppat dokument li jipprovdi informazzjoni sintetika fuq l-ittestjar dwar it-tossikoloġija ġenetika u ħarsa ġenerali lejn it-tibdiliet riċenti li sehhew fil-linji gwida tat-test tal-OECD dwar it-tossicità ġenetika (1).
2. L-iskop tat-test *in vitro* tal-mutazzjoni ġenetika fuq ċelloli tal-mammiferi hu li jindividwa l-mutazzjonijiet ġenetiċi indotti mis-sustanzi kimiċi. Il-linji ta' ċelloli użati f'dawn it-testijiet ikejlu l-mutazzjonijiet 'il quddiem fil-ġeni indikaturi, speċifikament il-gene endoġenu ipoksantina-gwanina fosforibożil trasferazi (Hprt f'ċelloli ta' rodituri, HPRT f'ċelloli umani; kollettivament imsejha l-gene Hprt u t-test HPRT f'dan il-metodu ta' ttestjar), u t-transġene ksantina-gwanina fosforibożil trasferazi (gpt) (imsejjah it-test XPRT). It-testijiet ta' mutazzjoni HPRT u XPRT jiżvelaw dehriet differenti ta' avvenimenti ġenetiċi. Minbarra l-avvenimenti mutazzjonali individwati mit-test HPRT (eż. sostituzzjonijiet tal-pari bażi, tibdil fil-qari ġenetiku, thassiriet żgħar u inserzjonijiet) il-lokazzjoni awtosomali tat-transġene gpt tista' tippermetti l-iżvelar ta' mutazzjonijiet li jirrizultaw minn thassiriet kbar u possibilment rikombinazzjoni mitotika mhux żvelata mit-test HPRT għaliex il-gene Hprt jinsab fil-kromożoma X (2) (3) (4) (5) (6) (7). L-XPRT bħalissa jintuża anqas mit-test HPRT għal skopijiet regolatorji.
3. Id-definizzjonijiet użati huma pprovduti fl-Appendiċi 1.

**KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET**

4. Ġeneralment it-testijiet imwettqa *in vitro* jehtieġu l-użu ta' sors esogeni ta' attivazzjoni metabolika. Is-sistema esogena ta' attivazzjoni metabolika ma timitax għalkollox il-kundizzjonijiet *in vivo*.

5. Ghandha tinghata attenzjoni biex jiġu evitati kundizzjonijiet li jkunu jwasslu għal riżultati pożittivi artefattwali, (jiġifieri interazzjonijiet possibbli mas-sistema tat-test), mhux ikkawżati minn interazzjoni diretta bejn is-sustanzi kimiċi tat-test u l-materjal ġenetiku taċ-ċellola; tali kundizzjonijiet jinkludu tibdiliet fil-pH jew fl-ożmolalità (8) (9) (10), interazzjoni mal-komponenti tal-medium (11) (12) jew livelli eċċessivi ta' ċitotossicità (13). Ċitotossicità li taqbez il-livelli massimi rakkomandati ta' ċitotossicità kif definiti fil-paragrafu 19 titqies eċċessiva għat-test HPRT.
6. Qabel ma jintuża l-metodu ta' ttestjar fuq tahlita għall-ġenerazzjoni ta' *data* għal skop regolatorju intiż, għandu jiġi kkunsidrat jekk jistax jipprovdi riżultati adegwati għal dak l-għan u, jekk iva, għaliex. Dawn il-kunsiderazzjonijiet ma jkunux mehtieġa meta jkun hemm rekwiżit regolatorju għall-ittestjar tat-tahlita.

## PRINĊIPJU TAT-TEST

7. Iċ-ċelloli mutanti nieqsa mill-attività tal-enzima Hprt fit-test HPRT jew mill-attività tal-enzima prt fit-test XPRT huma reżistenti għall-effetti ċitostatiċi tal-analogu tal-purina 6-tjogwanina (TG). Iċ-ċelloli profiċjenti fl-Hprt (fit-test HPRT) jew fil-gpt (fit-test XPRT) huma sensittivi għat-TG, li johloq l-inibizzjoni tal-metabolizmu ċellolari u jwaqqaf aktar diviżjoni fiċ-ċelloli. B'hekk, iċ-ċelloli mutanti jkunu jistgħu jipprolifera fil-preżenza tat-TG, filwaqt li ċelloli normali, li fihom l-enzima Hprt (fit-test HPRT) jew gpt (fit-test XPRT) ma jkunux.
8. Ċelloli f'sospensjoni jew f'kolturi monosaff jiġu esposti għas-sustanza kimika tat-test, kemm b'sors esoġenu ta' attivazzjoni metabolika kif ukoll mingħajr (ara l-paragrafu 14), għal perjodu xieraq ta' żmien (3-6 sigħat), u mbagħad jiġu subkolturati biex tiġi determinata ċ-ċitotossicità u tithalla l-espressjoni fenotipika qabel l-għażla tal-mutant (14) (15) (16) (17). Iċ-ċitotossicità tiġi determinata mis-sopravivenza relattiva (RS), jiġifieri l-effiċjenza tal-klonazzjoni mkejla eżatt wara t-trattament u aġġustata għal kwalunkwe telf ta' ċelloli matul it-trattament meta mqabbla mal-kontroll negattiv (paragrafu 18 u Appendiċi 2). Il-kolturi ttrattati jinżammu f'medium tat-tkabbir għal perjodu ta' żmien suffiċjenti, karatteristiku ta' kull tip ta' ċellola, biex jippermetti l-espressjoni fenotipika kwazi ottimali tal-mutazzjonijiet indotti (tipikament minimu ta' 7-9 ijiem). Wara l-espressjoni fenotipika, il-frekwenza mutanti tiġi stabbilita biż-żriġh ta' għadd magħruf ta' ċelloli f'medium li jkun fih l-aġent selettiv biex jiġu żvelati l-kolonji mutanti, u f'medium mingħajr aġent selettiv biex tiġi żvelata l-effiċjenza tal-klonazzjoni (vijabbiltà). Wara perjodu xieraq ta' inkubazzjoni, jingħaddu l-kolonji. Il-frekwenza tal-mutanti tiġi kkalkolata fuq il-bażi tan-numru ta' kolonji mutanti kkoreġut bl-effiċjenza tal-klonazzjoni fil-mument tal-għażla tal-mutanti.

## DESKRIZZJONI TAL-METODU

### Preparamenti

#### *Ċelloli*

9. It-tipi ta' ċelloli użati għat-testijiet HPRT u XPRT għandu jkollhom sensitività murija għal mutageni kimiċi, effiċjenza għolja tal-klonazzjoni, karjotip stabbli, u frekwenza mutanti spontanja stabbli. L-aktar ċelloli użati ta' spiss għat-test HPRT jinkludu l-linji CHO, CHL u V79 taċ-ċelloli tal-hamster Ċiniż, ċelloli tal-linfoma tal-ġrieden L5178Y, u ċelloli linfoblastojdi umani TK6 (18) (19). Għat-test XPRT jintużaw iċ-ċelloli AS52 derivati mis-CHO li fihom it-transġene gpt (u li jithassrilhom il-gene Hprt) (20) (21); it-test HPRT ma jistax isir f'ċelloli AS52 għaliex il-gene hprt ikun tħassar. L-użu ta' linji ta' ċelloli oħra għandu jkun ġustifikat u validat.
10. Il-linji ta' ċelloli għandhom jiġu verifikati b'mod regolari għall-istabbiltà tal-għadd ta' kromozomi modali u l-assenza ta' kontaminazzjoni tal-Mikoplasma (22) (23), u ċ-ċelloli ma għandhomx jintużaw jekk ikunu kontaminati jew jekk jinbidel l-għadd ta' kromozomi modali. It-tul normali taċ-ċiklu taċ-ċelloli użat fil-laboratorju tal-ittestjar għandu jkun stabbilit u konsistenti mal-karatteristiċi taċ-ċelloli ppubblikati. Il-frekwenza mutanti spontanja fiċ-ċelloli omm prinċipali għandha tiġi verifikat wkoll, u ċ-ċelloli omm ma għandhomx jintużaw jekk il-frekwenza mutanti ma tkunx aċċettabbli.
11. Qabel l-użu f'dan it-test, il-kolturi jaf ikollhom bżonn jitnaddfu miċ-ċelloli mutanti preeżistenti, eż. bil-kulturazzjoni f'medium HAT għat-test HPRT u MPA għat-test XPRT (5) (24) (Ara l-Appendiċi 1). Iċ-ċelloli mnaddfa jistgħu jiġu krijopreservati u mbagħad jinħallu biex jintużaw bħala ċelloli omm għall-użu. Iċ-ċelloli omm għall-użu li jkunu għadhom kif inħallew jistgħu jintużaw għat-test wara li jinkisbu hinijiet normali tal-irdoppjar. Meta jsir it-test XPRT, il-koltura ta' rutina taċ-ċelloli AS52 għandha tuża kundizzjonijiet li jiżguraw iż-żamma tat-transġene gpt (20).

### Kundizzjonijiet tal-media tal-koltura

12. Għandhom jintużaw kundizzjonijiet xierqa tal-media tat-tkabbir u tal-inkubazzjoni (reċipjenti tal-koltura, atmosfera umidifikata ta' 5 % CO<sub>2</sub>, u temperatura ta' inkubazzjoni ta' 37°C) għaž-żamma tal-kolturi. Il-kolturi taċ-ċelloli dejjem għandhom jinżammu f'kundizzjonijiet li jiżguraw li jkunu qed jikbru fil-faži log. Hu partikolarment importanti li l-kundizzjonijiet tal-media u tal-kolturi jingħažlu hekk li jiżguraw l-iżvilupp ottimali taċ-ċelloli matul il-perjodu ta' espressjoni u l-effiċjenza ottimali tal-klonazzjoni kemm għaċ-ċelluli mutanti kif ukoll għal dawk mhux mutanti.

### Preparazzjoni tal-kolturi

13. Il-linji taċ-ċelloli huma propagati minn kolturi omm, miżrugħa fil-medium tat-tkabbir b'densità tali li ċ-ċelloli f'sospensjonijiet jew f'monosaffi jibqgħu jikbru b'mod esponenzjali matul it-trattament u l-perjodi ta' espressjoni kollha kemm huma (eż. għandha tiġi evitata konfluwenza għal ċelloli li jikbru f'monosaffi).

### Attivazzjoni metabolika

14. Għandhom jintużaw sistemi metabolizzanti esoġeni meta jintużaw ċelloli b'kapasità metabolika endoġena inadegwata. L-aktar sistema użata spiss, li hi l-ewwel rakkomandata, sakemm ma jkunx ġustifikat mod ieħor, hi frazzjoni postmitokondrijali ssupplimentata minn kofatturi (S9) imhejjija mill-fwied ta' rodituri (ġeneralment firien) ittrattati b'indutturi enzimatiċi bħal Aroclor 1254 (25) (26) (27) (28) jew tahlita ta' fenobarbital u  $\beta$ -naftoflavon (29) (30) (31) (32). Din it-tahlita msemija l-aħħar ma tmurx kontra l-Konvenzjoni ta' Stokkolma dwar Materjal Organiku Persistenti li Jniġġes (33) u ntweri li hi effettiva daqs Aroclor 1254 għall-induzzjoni ta' ossidazzjonijiet b'funzjoni mhallta (29) (59) (31). Il-frazzjoni S9 normalment tintuża f'konċentrazzjonijiet li jvarjaw minn 1 sa 2 % (v/v) iżda tista' tiżdied sa 10 % (v/v) fil-medium tat-test finali. L-għażla tat-tip u tal-konċentrazzjoni ta' sistema ta' attivazzjoni metabolika esoġena jew tal-induttur metaboliku użati tista' tkun influwenzata mill-klassi tas-sustanzi li jiġu ttestjati (34) (35) (36).

### Preparazzjoni tas-sustanza kimika tat-test

15. Is-sustanzi kimiċi solidi tat-test għandhom jiġu ppreparati f'solventi xierqa u jiġu dilwiti, jekk dan ikun xieraq, qabel it-trattament taċ-ċelloli (ara l-paragrafu 16). Is-sustanzi kimiċi likwidi tat-test jistgħu jizdiedu direttament mas-sistema tat-test u/jew jiġu dilwiti qabel it-trattament tas-sistema tat-test. Is-sustanzi kimiċi gassużi jew volatili tat-test għandhom jiġu ttestjati b'modifiki xierqa fil-protokolli standard, bħat-trattament f'reċipjenti tal-koltura ssiġillati (37) (38). Il-preparati tas-sustanza kimika tat-test għandhom isiru eżatt qabel it-trattament, sakemm id-*data* dwar l-istabbiltà ma turix l-aċċettabbiltà tal-ħżin.

## KUNDIZZJONIJIET TAT-TEST

### Solventi

16. Is-solvent għandu jingħażel biex tiġi ottimizzata s-solubbiltà tas-sustanzi kimiċi tat-test mingħajr ma jithalla impatt avvers fuq it-twettiq tal-assaġġ, eż. tibdil fit-tkabbir taċ-ċelloli, effett fuq l-integrità tas-sustanza kimika tat-test, reazzjoni ma' reċipjenti tal-koltura, indeboliment tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika. Hu rakkomandat li, kull meta dan ikun possibbli, l-ewwel għandu jiġi kkunsidrat l-użu ta' solvent milwiem (jew medium tat-

tkabbir). Pereżempju, fost is-solventi ferm stabbiliti hemm l-ilma u s-sulfossidu tad-dimetil. Ġeneralment, is-solventi organiċi ma għandhomx jaqbzu 1-1 % (v/v) u s-solventi milwiema (salina jew ilma) ma għandhomx jaqbzu 1-10 % (v/v) fil-medium tat-trattament finali. Jekk is-solventi użati ma jkunux ferm stabbiliti (eż. etanol jew aċeton), l-użu tagħhom għandu jkun sostnut minn *data* li tindika l-kompatibbiltà tagħhom mas-sustanzi kimiċi tat-test u mas-sistema tat-test, u n-nuqqas tagħhom ta' tossiċità ġenetika bil-konċentrazzjoni użata. Fin-nuqqas ta' dik id-*data* ta' sostenn, importanti li jiġu inklużi kontrolli mhux trattati (ara l-Appendiċi 1) biex jintwera li s-solvent magħżul ma jinduci ebda effett dannuż jew mutageniku.

### **Kejl taċ-ċitotossiċità u għażla tal-konċentrazzjonijiet tal-esponiment**

17. Meta wieħed jistabbilixxi l-ogħla konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test, għandhom jiġu evitati konċentrazzjonijiet li għandhom il-kapaċità li jipproduċu rispons pożittiv artefattwali, bħal dawk li jipproduċu ċitotossiċità eċċessiva (ara l-paragrafu 20), il-preċipitazzjoni fil-medium tat-tkabbir (ara l-paragrafu 21), jew tibdiliet ċari fil-pH jew fl-ożmolalità (ara l-paragrafu 5). Jekk is-sustanza kimika tat-test tikkaguna tibdil ċar fil-pH tal-medium fi żmien iż-żgħir, il-pH tista' tiġi aġġustata bl-ibbaferjar tal-medium tat-trattament finali biex jiġu evitati riżultati pożittivi artefattwali u biex jinżammu l-kundizzjonijiet xierqa tal-koltura.
18. L-għażla tal-konċentrazzjoni hi bbażata fuq iċ-ċitotossiċità u fuq kunsiderazzjonijiet oħra (ara l-paragrafi 20-22). Filwaqt li l-evalwazzjoni taċ-ċitotossiċità f'test inizjali tista' tkun siewja biex jiġu definiti aħjar il-konċentrazzjonijiet li jkunu se jintużaw fl-esperiment ewlieni, test inizjali mhuwiex meħtieġ. Anki jekk issir evalwazzjoni taċ-ċitotossiċità inizjali, il-kejl taċ-ċitotossiċità għal kull koltura xorta waħda jkun meħtieġ fl-esperiment ewlieni. Iċ-ċitotossiċità għandha tiġi evalwata bl-użu tal-RS, jiġifieri l-effiċjenza tal-klonazzjoni (CE) taċ-ċelloli pjastrati eżatt wara t-trattament, aġġustata skont kwalunkwe telf ta' ċelloli matul it-trattament, fuq il-bażi tal-għadd taċ-ċelloli, meta mqabbla mal-aġġustament tal-effiċjenza tal-klonazzjoni f'kontrolli negattivi (assenjati sopravivenza ta' 100 %) (ara l-Appendiċi 2 għall-formula).
19. Għandhom jiġu evalwati tal-anqas erba' konċentrazzjonijiet tat-test (mhux inklużi l-kontrolli tas-solvent u pożittivi) li jissodisfaw il-kriterji ta' aċċettabbiltà (iċ-ċitotossiċità xierqa, in-numru ta' ċelloli, eċċ.). Filwaqt li l-użu ta' kulturi duplikati hu rakkomandat, jistgħu jintużaw kulturi repliki jew trattati individwalment f'kull konċentrazzjoni ttestjata. Ir-riżultati miksuba fil-kulturi rreplikati indipendenti f'konċentrazzjoni partikolari għandhom jiġu rrapportati b'mod separat iżda jistgħu jiġu aggregati għall-analizi tad-*data* (17). Għal sustanzi kimiċi tat-test li juru tossiċità baxxa jew ebda tossiċità, intervalli tal-konċentrazzjoni ta' madwar id-doppju jew it-triplu normalment ikunu xierqa. Meta ssehh ċitotossiċità, il-konċentrazzjonijiet tat-test magħżulin għandhom ikopru firxa minn dik iċ-

ċitotossicità produttiva sa konċentrazzjonijiet li fihom ikun hemm ċitotossicità moderata u baxxa jew ebda ċitotossicità. Hafna sustanzi kimiċi tat-test juru kurvi konċentrazzjoni rispons weqfin u, biex tkun koperta l-medda sħiħa taċ-ċitotossicità jew biex tiġi studjata r-relazzjoni bejn il-konċentrazzjoni u r-rispons fid-dettall, jaf ikun hemm bżonn li jintużaw konċentrazzjonijiet spazjati aktar qrib xulxin u aktar minn erba' konċentrazzjonijiet, speċjalment f'sitwazzjonijiet li fihom ikun hemm bżonn li jsir esperiment ripetut (ara l-paragrafu 43). L-użu ta' aktar minn erba' konċentrazzjonijiet jista' jkun partikolarment importanti meta jintużaw kulturi individwali.

20. Jekk il-konċentrazzjoni massima tkun ibbażata fuq iċ-ċitotossicità, l-ogħla konċentrazzjoni għandu jkollha l-għan li tilhaq bejn 20 u 10 % RS. Għandha tingħata attenzjoni meta jiġu interpretati riżultati pożittivi li jinsabu biss f'10 % RS jew anqas (il-paragrafu 43).
21. Għal sustanzi kimiċi tat-test f'tit li xejn solubbli li mhum iex ċitotossiċi f'konċentrazzjonijiet anqas mill-anqas konċentrazzjoni insolubbli, l-ogħla konċentrazzjoni analizzata għandha tipproduċi turbidità jew preċipitat viżibbli bl-għajnejn jew bl-għajnnuna ta' mikroskopju invertit fi tmiem it-test bis-sustanza kimika tat-test. Anki jekk iċ-ċitotossicità sseħħ f'livelli inqas mill-inqas konċentrazzjoni insolubbli, huwa rakkomandat li l-ittestjar isir f'konċentrazzjoni waħda biss li tipproduċi turbidità jew bi preċipitat viżibbli għaliex jistgħu jirriżultaw effetti artefattwali mill-preċipitat. Fil-konċentrazzjoni li tipproduċi preċipitat, għandha tingħata attenzjoni biex jiġi żgurat li l-preċipitat ma jxekkilk it-twetliq tat-test. Id-determinazzjoni tas-solubbiltà fil-medium tat-tkabbir qabel l-esperiment tista' tkun utli.
22. Jekk ma jiġu osservati ebda preċipitat jew ċitotossicità li tillimita, l-ogħla konċentrazzjoni tat-test għandha tkun tikkorrispondi għal 10 mM, 2 mg/ml jew 2 µl/ml, liema minnhom tkun l-anqas (39) (40). Meta s-sustanza kimika tat-test ma jkollhiex kompożizzjoni definita, eż. sustanza b'kompożizzjoni mhux magħrufa jew varjabbli, prodotti jew materjali bijoloġiċi b'reazzjoni kumplessa (jiġifieri Sustanzi Kimiċi b'Kompożizzjoni Mhux Magħrufa jew Varjabbli (UVCBs)) (41), estratti ambjentali, eċċ., il-konċentrazzjoni massima jaf ikollha bżonn tkun ogħla (eż. 5 mg/mL), fin-nuqqas ta' biżżejjed ċitotossicità, biex tiżdied il-konċentrazzjoni ta' kull wieħed mill-komponenti. Madankollu, ta' min jinnota li dawn ir-rekwiziti jistgħu jvarjaw għall-prodotti farmaċewtiċi għall-bniedem (42).

## Kontrolli

23. Għal kull kundizzjoni sperimentali għandhom ikunu inklużi kontrolli negattivi konkorrenti (ara l-paragrafu 16) li jikkonsistu f'solvent waħdu fil-medium tat-trattament u mmanigġjati bl-istess mod bħall-kulturi tat-trattament.
24. Kontrolli pożittivi konkorrenti huma meħtieġa biex juru l-hila tal-laboratorju fl-identifikazzjoni ta' mutageni fil-kundizzjonijiet tal-protokoll tat-test użat u l-effikaċja tas-

sistema ta' attivazzjoni metabolika esoġena, meta applikabbli. Fit-tabella 1 ta' hawn taht jingħataw xi eżempji ta' kontrolli pożittivi. Jistgħu jintużaw sustanzi ta' kontroll pożittiv oħra, jekk ikunu ġustifikati. Peress li t-testijiet *in vitro* fuq ċelloli tal-mammiferi għat-tossiċità ġenetika huma standardizzati biżżejjed, it-testijiet li jużaw trattament b'attivazzjoni metabolika esoġena u mingħajr jistgħu jitwettqu biss bl-użu ta' kontroll pożittiv li jeħtieġ attivazzjoni metabolika. F'dan il-każ, dan ir-rispons tal-kontroll pożittiv individwali se juri kemm l-attività tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika kif ukoll ir-risponsività tas-sistema tat-test. Kull kontroll pożittiv għandu jintuża f'koncentrazzjoni waħda jew aktar li tkun mistennija tagħti żidiet riproduttivi u individwabbli li jispikkaw biex tintwera s-sensittività tas-sistema tat-test, u r-rispons ma għandux ikun imxekkel miċ-ċitotossiċità li taqbez il-limiti speċifikati f'dan il-metodu ta' ttestjar (ara l-paragrafu 20).

**Tabella 1:** Sustanzi ta' riferiment rakkomandati għall-valutazzjoni tal-profiċjenza tal-laboratorju u għall-għażla tal-kontrolli pożittivi.

| Kundizzjoni tal-Attivazzjoni Metabolika      | Lokus       | Sustanza u Nru CAS                                                                                                      |
|----------------------------------------------|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Assenza ta' attivazzjoni metabolika esoġena  | <i>Hprt</i> | Etilmetansulfonat [Nru CAS 62-50-0]<br>Etilnitrosourea [Nru CAS 759-73-9]<br>4-Nitrokinolina 1-ossidu [Nru CAS 56-57-5] |
|                                              | <i>xprt</i> | Streptonigrina [Nru CAS 3930-19-6]<br>Mitomicina C [Nru CAS 50-07-7]                                                    |
| Preżenza ta' attivazzjoni metabolika esoġena | <i>Hprt</i> | 3-Metilkolantren [Nru CAS 56-49-5]<br>7,12-Dimetilbenzantraċen [Nru CAS 57-97-6]<br>Benzo[a]piren [Nru CAS 50-32-8]     |
|                                              | <i>xprt</i> | Benzo[a]piren [Nru CAS 50-32-8]                                                                                         |

## PROCEDURA

### Trattament bis-sustanza kimika tat-test

25. Iċ-ċelloli li jipprolifera huma ttrattati bis-sustanza tat-test fil-preżenza u fin-nuqqas ta' sistema ta' attivazzjoni metabolika. L-esponent għandu jkun għal perjodu xieraq ta' żmien (normalment perjodu ta' bejn tlieta u sitt sigħat ikun adegwat).
26. In-numru minimu ta' ċelloli użati għal kull kultura tat-test (tal-kontroll u trattata) f'kull stadju fit-test għandu jkun ibbażat fuq il-frekwenza mutanti spontanja. Gwida generali hi li jiġi ttrattati u passaġġati biżżejjed ċelloli biex jinżammu 10 mutanti spontanji f'kull kultura fil-fażijiet kollha tat-test (17). Il-frekwenza mutanti spontanja ġeneralment tkun ta' bejn 5 u 20 x 10<sup>-6</sup>. Għal frekwenza mutanti spontanja ta' 5 x 10<sup>-6</sup> u biex jinżamm numru

suffiċjenti ta' mutanti spontanji (10 jew aktar) anki għall-kolturi ttrattati b'konċentrazzjonijiet li jikkawżaw ċitotossicità ta' 90 % matul it-trattament (10 % RS), ikun hemm bżonn li tal-anqas jiġu ttrattati 20 x 10<sup>6</sup> ċelloli. Barra minn hekk, numru suffiċjenti ta' ċelloli (iżda qatt anqas minn żewġ miljuni) iridu jiġu kolturati matul il-perjodu ta' espressjoni u pjastrati għall-għażla tal-mutanti (17).

## **Il-hin tal-espressjoni fenotipika u l-kejl tal-frekwenza tal-mutanti**

27. Wara l-perjodu tat-trattament, iċ-ċelloli jiġu kkolturati biex tkun tista' ssir l-espressjoni tal-fenotip tal-mutanti. Generalment ikun biżżejjed minimu ta' bejn sebġha u disat ijiem biex tkun tista' ssir espressjoni fenotipika kważi ottimali ta' mutanti Hprt u xprt indotti godda (43) (44). Matul dan il-perjodu, iċ-ċelloli jiġu subkolturati regolarment biex jinżammu f' stat ta' tkabbir esponenzjali. Wara l-espressjoni fenotipika, iċ-ċelloli jergġhu jiġu pjastrati f' medium b'agent selettiv (6-tiogwanina) u mingħajr għad-determinazzjoni tan-numru ta' mutanti u tal-effiċjenza tal-klonazzjoni fil-mument tal-għażla, rispettivament. Dan il-pjastrament jista' jitwettaq bl-użu ta' platti għall-kolturi monosaffi jew ta' mikropjastri għaċ-ċelloli f'sospensjoni. Għall-għażla tal-mutanti, iċ-ċelloli għandhom jiġu pjastrati f'densità tali li tiżgura rkupru ottimali tal-mutanti (jiġifieri tiġi evitata kooperazzjoni metabolika) (17). Il-pjastri jiġu inkubati għal tul xieraq ta' zmien għat-tkabbir ottimali tal-kolonja (eż. 7-12-il jum) u jingħaddu l-kolonji. Il-frekwenza tal-mutanti tiġi kkalkolata fuq il-bażi tan-numru ta' kolonji mutanti kkoreġut bl-effiċjenza tal-klonazzjoni fil-mument tal-għażla tal-mutanti (ara l-Appendiċi 2 għall-formuli).

## **Profiċjenza tal-laboratorju**

28. Biex tiġi stabbilita biżżejjed esperjenza bit-test qabel ma jintuża għall-ittestjar ta' rutina, il-laboratorju għandu jkun għamel sensiela ta' esperimenti b'sustanzi pożittivi ta' riferiment li jaġixxu permezz ta' mekkaniżmi differenti (tal-anqas waħda b'attivazzjoni metabolika u waħda mingħajr magħżula mis-sustanzi elenkati fit-Tabella 1) u diversi kontrolli negattivi (bl-użu ta' diversi solventi/veikoli). Dawn ir-risponsi tal-kontrolli pożittivi u negattivi għandhom ikunu konsistenti mad-dokumentazzjoni. Dan mhuwiex applikabbli għal laboratorji li jkollhom esperjenza, jiġifieri li jkollhom bażi ta' *data* storika disponibbli kif definita fil-paragrafi 30 sa 33.
29. Għażla ta' sustanzi tal-kontrolli pożittivi (ara t-Tabella 1 fil-paragrafu 25) għandha tiġi investigata fin-nuqqas u fil-preżenza ta' attivazzjoni metabolika, biex tintwera l-profiċjenza fl-iżvelar ta' sustanzi kimiċi mutageniċi, biex tiġi ddeterminata l-effikaċja tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika u biex tintwera l-adegwatezza tal-kundizzjonijiet tat-tkabbir taċ-ċelloli matul it-trattament, l-espressjoni fenotipika u l-għażla tal-mutanti u tal-proċeduri tal-ghoti ta' punteġġ. Għandha tingħażel medda ta' konċentrazzjonijiet tas-



sustanzi magħżulin biex jingħataw żidiet riproduttivi u marbutin mal-konċentrazzjoni li jispikkaw biex jintwerew is-sensittività u l-medda dinamika tas-sistema tat-test.

### **Data storika tal-kontroll**

30. Il-laboratorju għandu jistabbilixxi:

- Medda u distribuzzjoni storika tal-kontroll pożittiv,
- Medda u distribuzzjoni storika tal-kontroll negattiv (mhux trattat, solvent).

31. Meta għall-ewwel tinkiseb id-*data* għal distribuzzjoni storika tal-kontroll negattiv, il-kontrolli negattivi konkurrenti għandhom ikunu konsistenti mad-*data* tal-kontroll ippubblikata (22). Peress li tiżdied aktar *data* sperimentali mad-distribuzzjoni tal-kontroll, idealment il-kontrolli negattivi konkurrenti għandhom ikunu fi hdan il-limiti ta' kontroll ta' 95 % ta' dik id-distribuzzjoni (17) (45) (46).

32. Il-bażi ta' *data* storika tal-kontrolli negattivi tal-laboratorju għall-ewwel għandha tinbena b'minimu ta' 10 esperimenti iżda idealment tkun tikkonsisti f'tal-anqas 20 esperiment imwettqin f'kundizzjonijiet sperimentali paragunabbli. Il-laboratorji għandhom jużaw metodi ta' kontroll tal-kwalità, bħal karti tal-kontroll (eż. C-charts jew X-bar charts (47)), biex jidentifikaw kemm hija varjabbli d-*data* tal-kontroll pożittiv u negattiv tagħhom, u biex juru li l-metodoloġija hi "taħt kontroll" fil-laboratorju tagħhom (46). Rakkomandazzjonijiet ulterjuri dwar kif jibnu u jużaw id-*data* storika (jiġifieri kriterji għall-inkluzjoni u l-eskluzjoni ta' *data* fid-*data* storika u l-kriterji ta' aċċettabilità għal esperiment partikolari) jistgħu jinkisbu mid-dokumentazzjoni (45).

33. Id-*data* ta' kontroll negattiv għandha tikkonsisti fi frekwenzi mutanti minn kulturi individwali jew idealment irreplikati kif deskritt fil-paragrafu 23. Idealment, il-kontrolli negattivi konkurrenti għandhom ikunu fi hdan il-limiti ta' kontroll ta' 95 % tad-distribuzzjoni storika tal-kontroll negattiv tal-laboratorju (17) (45) (46). Meta d-*data* tal-kontroll negattiv konkurrenti toħroġ mil-limitu ta' kontroll ta' 95 %, din tista' titqies aċċettabbli li tiddaħħal fid-distribuzzjoni storika tal-kontroll dment li din id-*data* ma tkunx eċċezzjoni estrema u jkun hemm evidenza li s-sistema tat-test tkun "taħt kontroll" (ara aktar 'il fuq) u jkun hemm evidenza ta' ebda żball tekniku jew uman.

34. Kwalunkwe tibdil fil-protokoll tal-esperimenti għandu jiġi kkunsidrat fid-dawl tal-konsistenza tiegħu mal-bażijiet ta' *data* tal-kontroll storici eżistenti tal-laboratorju. Kwalunkwe inkonsistenza kbira għandha tirriżulta fl-istabbiliment ta' bażi ta' *data* storika ġdida tal-kontroll.

### **DATA U RAPPORTAR**

### Prezentazzjoni tar-risultati

35. Il-prezentazzjoni tar-risultati għandha tinkludi d-*data* kollha meħtieġa biex tiġi kkalkolata ċ-ċitotossicità (espressa bħala RS). Id-*data*, kemm għal kulturi ttrattati kif ukoll għal daww tal-kontroll, għandha tinkludi n-numru ta' ċelloli f' tmiem it-trattament, in-numru ta' ċelloli pjastrati eżatt wara t-trattament, u l-għadd tal-kolonji (jew in-numru ta' bwejriet mingħajr kolonji għall-metodu tal-mikropjastri). L-RS għal kull kultura għandha tkun espressa bħala perċentwal relattiv għall-kontroll tas-solvent konkorrenti (irreferi għall-Appendiċi 1 għad-definizzjonijiet).
36. Il-prezentazzjoni tar-risultati għandha tinkludi wkoll id-*data* kollha meħtieġa biex tiġi kkalkolata l-frekwenza mutanti. Id-*data* għall-kulturi ttrattati kif ukoll tal-kontroll għandha tinkludi: (1) in-numru ta' ċelloli pjastrati b'agent selettiv u mingħajr (fil-mument li fih iċ-ċelloli jiġu pjastrati għall-ghazla tal-mutanti), u (2) in-numru ta' kolonji magħduda (jew in-numru ta' bwejriet mingħajr kolonji għall-metodu tal-mikropjastri) mill-pjastri b'agent selettiv u mingħajr. Il-frekwenza mutanti tiġi kkalkolata fuq il-bażi tan-numru ta' kolonji mutanti (fil-pjastri b'agent selettiv) ikkoreġut bl-effiċjenza tal-klonazzjoni (mill-pjastri mingħajr agent selettiv). Il-frekwenza mutanti għandha tiġi espressa bħala n-numru ta' ċelloli mutanti għal kull miljun ċellola vijabbli (irreferi għall-Appendiċi 1 għad-definizzjonijiet).
37. Għandha tiġi pprovduta *data* dwar il-kultura individwali. Barra minn hekk, id-*data* kollha għandha tingabar taħt forma ta' tabella.

### Kriterji ta' Aċċettabbiltà

38. L-aċċettazzjoni ta' test hi bbazata fuq il-kriterji li ġejjin:
- Il-kontroll negattiv konkorrenti jitqies aċċettabbli għaż-żieda fil-bażi ta' *data* storika tal-kontroll negattiv tal-laboratorju kif deskritt fil-paragrafu 33.
  - Il-kontrolli negattivi konkorrenti (ara l-paragrafu 24) għandhom jinduċu risponsi li huma kompatibbli ma' daww iġġenerati fil-bażi ta' *data* storika tal-kontroll pożittiv u jipproduċu żieda statistikament sinifikanti meta mqabblin mal-kontroll negattiv konkorrenti.
  - Ġew ittestjati żewġ kundizzjonijiet sperimentali (jiġifieri b'attivazzjoni metabolika u mingħajr) sakemm wiehed ma jirriżultax f'risultati pożittivi (ara l-paragrafu 25).
  - Hemm numru adegwat ta' ċelloli u konċentrazzjonijiet li huma analizzabbli (paragrafi 25, 26 u 19).
  - Il-kriterji għall-ghazla tal-oghla konċentrazzjoni huma konsistenti ma' daww deskritti fil-paragrafi 20, 21 u 22.

### Evalwazzjoni u interpretazzjoni tar-riżultati

39. Dment li ma jiġux issodisfati l-kriterji ta' aċċettabbiltà kollha, sustanza kimika tat-test titqies li tkun pożittiva biċ-ċar jekk, fi kwalunkwe waħda mill-kundizzjonijiet sperimentali analizzati:

- tal-anqas waħda mill-konċentrazzjonijiet tat-test turi żieda statistikament sinifikanti meta mqabbla mal-kontroll negattiv konkorrenti,
- iż-żieda hi relatata mal-konċentrazzjoni meta tiġi evalwata b'test xieraq tat-tendenzi,
- kwalunkwe wiehed mir-riżultati jaqa' barra mid-distribuzzjoni tad-*data* storika tal-kontroll negattiv (eż. limitu tal-kontroll ta' 95 % fuq il-bażi ta' Poisson; ara l-paragrafu 33).

Meta jiġu ssodisfati dawn il-kriterji kollha, is-sustanza kimika tat-test imbagħad tiġi kkunsidrata kapaċi tinduċi mutazzjonijiet ġenetiċi f'ċelloli kulturati tal-mammiferi f'din is-sistema tat-test. Ir-rakkomandazzjonijiet għall-aktar metodi statistiċi xierqa jistgħu jinkisbu mid-dokumentazzjoni (46) (48).

40. Dment li ma jiġux issodisfati l-kriterji ta' aċċettabbiltà kollha, sustanza kimika tat-test titqies li hija negattiva biċ-ċar jekk, fil-kundizzjonijiet sperimentali kollha eżaminati:

- l-ebda waħda mill-konċentrazzjonijiet tat-test ma turi żieda statistikament sinifikanti meta mqabbla mal-kontroll negattiv konkorrenti,
- ma hemm l-ebda żieda marbuta mal-konċentrazzjoni meta tiġi evalwata b'test xieraq tat-tendenzi,
- ir-riżultati kollha jaqgħu fid-distribuzzjoni tad-*data* storika tal-kontroll negattiv (eż. limitu tal-kontroll ta' 95 % fuq il-bażi ta' Poisson; ara l-paragrafu 33).

Imbagħad, is-sustanza kimika tat-test tiġi kkunsidrata li mhijiex kapaċi tinduċi mutazzjonijiet ġenetiċi f'ċelloli kulturati tal-mammiferi f'din is-sistema tat-test.

41. Ma hemm l-ebda hteġa għall-verifika ta' rispons posittiv jew negattiv ċar.

42. F'każijiet li fihom ir-rispons la jkun negattiv ċar u lanqas pożittiv ċar kif spjegat hawn fuq jew biex tgħin fl-istabbiliment tar-rilevanza bijoloġika ta' riżultat, id-*data* għandha tiġi evalwata b'gudizzju espert u/jew b'investigazzjonijiet ulterjuri. It-twertiq ta' speriment ripetut, possibilment bl-użu ta' kundizzjonijiet sperimentali modifikati (eż. spazjar tal-konċentrazzjonijiet, kundizzjonijiet oħra tal-attivazzjoni metabolika [jiġifieri konċentrazzjoni S9 jew origini S9]) jista' jkun siewi.

43. F'kazijiet rari, anki wara investigazzjonijiet ulterjuri, is-sett ta' *data* jipprekludi milli tinhareg konkluzjoni ta' rizultati pozittivi jew negattivi. Għaldaqstant, ir-rispons tas-sustanza kimika tat-test għandu jiġi konkluz bħala ekwivoku (interpretat bħala bl-istess probabbiltà li jkun pozittiv jew negattiv).

### **Rapport tat-test**

44. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

#### *Is-sustanza kimika tat-test:*

- is-sors, in-numru tal-lott, id-data ta' limitu għall-użu, jekk disponibbli;
- l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test stess, jekk magħrufa;
- is-solubbiltà u l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test fis-solvent, jekk magħrufin;
- il-kejl tal-pH, tal-ożmolalità u tal-preċipitat fil-medium tat-tkabbir li miegħu żdiedet is-sustanza kimika tat-test, kif xieraq.

#### *Sustanza monokostitwenti:*

- id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma, u l-proprietajiet fizikokimiċi rilevanti addizzjonali;
- l-identifikazzjoni kimika, bħall-isem IUPAC jew CAS, in-numru CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.

#### *Sustanza multikostitwenti, UVCBs u tahlitiet:*

- ikkaratterizzati sa fejn possibbli mill-identità kimika (ara aktar 'il fuq), l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprietajiet fizikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti.

#### *Is-solvent:*

- ġustifikazzjoni għall-għażla tas-solvent;
- il-perċentwal ta' solvent fil-medium tat-tkabbir finali.

#### *Iċ-ċelloli:*

#### Għal kulturi prinċipali tal-Laboratorju:

- it-tip, is-sors tal-linji ta' ċelloli;

- in-numru ta' passaġġi, jekk disponibbli, u l-istorja fil-laboratorju;
- il-karatteristiċi tal-karjotip u/jew in-numru modali tal-kromożomi;
- il-metodi għaż-żamma tal-kolturi taċ-ċelloli;
- l-assenza tal-mikoplażma;
- il-ħinijiet għall-irdoppjar taċ-ċelloli.

*Il-kundizzjonijiet tat-test:*

- ir-raġuni prinċipali għall-għażla tal-konċentrazzjonijiet u l-għadd ta' kolturi inkluzi, eż. *data* dwar iċ-ċitotossicità u limitazzjonijiet tas-solubbiltà;
- il-kompożizzjoni tal-media, il-konċentrazzjoni ta' CO<sub>2</sub>, il-livell ta' umdità;
- il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test espressa bħala konċentrazzjoni finali fil-medium tat-tkabbir (eż. µg jew mg/ml jew mM tal-medium tat-tkabbir);
- il-konċentrazzjoni (u/jew il-volum) ta' solvent u s-sustanza kimika tat-test miżjuda fil-medium tat-tkabbir;
- it-temperatura ta' inkubazzjoni;
- il-ħin ta' inkubazzjoni;
- id-durata tat-trattament;
- id-densità taċ-ċellula waqt it-trattament;
- it-tip u l-kompożizzjoni tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika (is-sors ta' S9, il-metodu ta' preparazzjoni tat-taħlita ta' S9, il-konċentrazzjoni jew il-volum ta' taħlita ta' S9 u l-S9 fil-medium tat-tkabbir finali, il-kontrolli tal-kwalità tal-S9);
- is-sustanzi tal-kontroll pożittiv u negattiv, il-konċentrazzjonijiet finali għal kull kundizzjoni tat-trattament;
- it-tul tal-perjodu ta' espressjoni (inkluz in-numru ta' ċelluli miżrugħa, u skedi ta' subkolturi u ta' tagħlif, jekk ikun xieraq);
- l-identità tal-aġent selettiv u l-konċentrazzjoni tiegħu;
- il-kriterji għall-aċċettabbiltà tat-testijiet;

- il-metodi użati biex jingħadd in-numru ta' ċelloli vijabbli u mutanti;
- il-metodi użati għall-kejl taċ-ċitotossicità;
- kwalunkwe informazzjoni supplimentari rilevanti għaċ-ċitotossicità u l-metodu użat;
- id-durata tal-ħinijiet ta' inkubazzjoni wara l-pjastrament;
- il-kriterji biex l-istudji jitqiesu bħala pożittivi, negattivi jew ekwivoċi;
- il-metodi użati biex jiġu stabbiliti l-pH, l-ożmolalità u l-preċipitazzjoni.

#### *Ir-riżultati:*

- in-numru ta' ċelloli ttrattati u n-numru ta' ċelloli subkolturati għal kull kultura;
- il-kejljiet taċ-ċitotossicità u osservazzjonijiet oħra, jekk ikun hemm;
- is-sinjali ta' preċipitazzjoni u l-ħin tad-determinazzjoni;
- in-numru ta' ċelloli pjastrati f' medium selettiv u mhux selettiv;
- in-numru ta' kolonji f' medium mhux selettiv u n-numru ta' kolonji rezistenti f' medium selettiv, u l-frekwenzi mutanti relatati;
- ir-relazzjoni konċentrazzjoni rispons, fejn possibbli,
- id-*data* tal-kontroll negattiv (solvent) u pożittiv (konċentrazzjonijiet u solventi) konkorrenti;
- id-*data* storika tal-kontroll pożittiv u negattiv (solvent), bil-meded, bil-medji u bid-dejvazzjonijiet standard u bl-intervall ta' kunfidenza (eż. 95 %) kif ukoll bin-numru tad-*data*;
- analizijiet statistiċi (għal kulturi individwali u għal repliki raggruppati jekk xieraq), u l-valuri p jekk ikun hemm.

#### *Diskussjoni tar-riżultati.*

#### *Konklużjoni*

## DOKUMENTAZZJONI

- (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. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Parigi.
- (2) Moore M.M., DeMarini D.M., DeSerres F.J. u Tindall, K.R. (Eds.) (1987). Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, New York.
- (3) Chu E.H.Y. u Malling H.V. (1968). Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro* , Proc. Natl. Acad. Sci. Sci., L-Istati Uniti, 61, 1306-1312.
- (4) Moore M.M., Harrington-Brock K., Doerr C.L. u 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. u Stankowski Jr. L.F. (1989). Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates, Mutation Res. Mutation Res., 223, 121-128.
- (6) Aaron C.S., Bolcsfoldi G., Glatt H.R., Moore M., Nishi Y., Stankowski L., Theiss J. u Thompson E. (1994). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Mutation Res. Mutation Res., 312, 235-239.
- (7) Li A.P., Gupta R.S., Heflich R.H. u 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. u 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. u 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. u 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. u 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., u 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. u 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. u 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. u 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. u Asquith J.C. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. Fi: 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., u 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., u 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., u 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. (Il-manuskritt ghadu qed jithejja).
- (23) Coecke S., Balls M., Bowe G., Davis J., Gstraunthaler G., Hartung T., Hay R., Merten O.W., Price A., Schechtman L., Stacey G. u 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. u Stich H.F. (1980). Mutagenic Activity of Ascorbate in Mammalian Cell Cultures, Can. Lett. 8, 299-305.
- (25) Natarajan A.T., Bates A.D, Van Buul P.P.W., Meijers M. u 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. u 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. u 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. u 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. u 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. u Sugimura T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic

Activation Systems. Fi: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, de Serres F.J., Fouts J.R., Bend J.R. u Philpot R.M. (Eds), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

- (31) Ong T.-m., Mukhtar M., Wolf C.R. u 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. u 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). Il-Konvenzjoni ta' Stokkolma dwar Materjal Organiku Persistenti li Jniġġes, Programm tan-Nazzjonijiet Uniti għall-Ambjent (UNEP). Disponibbli fuq: [<http://www.pops.int.html>].
- (34) Tan E.-L. u 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. u McCooey K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. Fi: 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. u 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 (Linji Gwida tat-Test 473, 476 u 487). Disponibbli fuq talba mingħand l-Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi.

- (40) Brookmire L., Chen J.J. u 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. Disponibbli fuq: [\[https://federalregister.gov/a/2012-13774\]](https://federalregister.gov/a/2012-13774).
- (43) O'Neill J.P. u 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., u 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., u 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), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.
- (47) Richardson C., Williams D.A., Allen J.A., Amphlett G., Chanter D.O., u Phillips B. (1989). Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays. Fi: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Kirkland, D.J., (Ed) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.
- (48) Fleiss J. L., Levin B., u Paik M. C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

## Appendiċi 1

### DEFINIZZJONIJIET

Mutaġeni li jissostitwixxu l-koppji tal-bażijiet: sustanzi kimiċi li jikkawżaw sostituzzjoni tal-koppji tal-bażijiet fid-DNA.

Sustanza kimika: Sustanza jew taħlita.

Effiċjenza tal-klonazzjoni: Il-perċentwal ta' ċelloli pjastrati f' densità baxxa li kapaċi jikbru f' kolonja li tista' tingħadd.

Konċentrazzjonijiet: irreferi għall-konċentrazzjonijiet finali tas-sustanza kimika tat-test fil-medium tat-tkabbir

Ċitotossicità: Għall-assaġġi koperti f'dan il-metodu ta' ttestjar, iċ-ċitotossicità hi identifikata bħala tnaqqis fis-sopravivenza relattiva taċ-ċelloli ttrattati meta mqabbla mal-kontroll negattiv (ara l-paragrafu speċifiku).

Mutazzjoni 'l quddiem: mutazzjoni ta' gene mit-tip parentali għall-forma mutanti li tkun toħloq alterazzjoni jew telf tal-attività enzimatika jew tal-funzjoni tal-proteina kodifikata.

Mutaġeni li jibdli l-qari tal-kodiċi ġenetiku: sustanzi kimiċi li jikkawżaw iż-żieda jew it-tħassir ta' koppji tal-bażijiet individwali jew multipli fil-molekula tad-DNA.

Ġenotossici: terminu generali li jinkludi kull tip ta' ħsara fid-DNA jew kromożomika, inkluż ksur tad-DNA, addotti, riarrangamenti, mutazzjonijiet, aberrazzjonijiet kromożomiċi, u aneuploidja. Mhux it-tipi kollha ta' effetti ġenotossici jirriżultaw f' mutazzjonijiet jew fi ħsara kromożomika stabbli.

Medium tal-HAT: medium li fih l-Ipoksantina, l-Aminopterina u t-Timidina, użat għat-tindif tal-mutanti Hprt.

Rikombinament mitotiku: matul il-mitozi, ir-rikombinament bejn kromatidi omologi li possibilmint jirriżulta fl-induzzjoni ta' ksur tal-ħajta doppja tad-DNA jew f'telf ta' eterożigożità.

Medium tal-MPA: medium li fih il-Ksantina, l-Adenina, it-Timidina, l-Aminopterina u l-aċidu Mikofenoliku, użat għat-tindif tal-mutanti Xprt.

Mutaġeniċi: jipproduċu tibdil ereditarju ta' sekwenza/i tal-koppja ta' bażijiet tad-DNA fil-ġeni jew tal-istruttura tal-kromożomi (aberrazzjonijiet kromożomiċi).

Frekwenza mutanti (MF): in-numru ta' kolonji mutanti osservati diviż bin-numru ta' ċelloli pjastrati f'medium selektiv, ikkoreġut għall-effiċjenza tal-klonazzjoni (jew il-vijabbiltà) fil-mument tal-ghazla.

Hin tal-espressjoni fenotipika: Il-hin wara t-trattament li matulu l-alterazzjoni ġenetika tkun fissa fi hdan il-ġenom u kwalunkwe prodott tal-ġeni preeżistenti jibattal sal-punt li l-karatteristika fenotipika tinbidel.

Sopravivenza relattiva (RS): RS tintuża bħala l-kejl taċ-ċitotossicità relatata mat-trattament. RS hi l-effiċjenza tal-klonazzjoni (CE) taċ-ċelloli pjastrati eżatt wara t-trattament agġustata skont kwalunkwe telf ta' ċelloli matul it-trattament meta mqabbla mal-effiċjenza tal-klonazzjoni f'kontrolli negattivi (assenjati sopravivenza ta' 100 %).

Frazzjoni tal-fwied S9: supernatant ta' omogenat tal-fwied wara ċentrifugazzjoni ta' 9000g, jiġifieri estratt minn fwied mhux proċessat

Taħlita ta' S9: taħlita tal-frazzjoni tal-fwied S9 u tal-kofatturi neċessarji għall-attività tal-enzimi metabolici.

Kontrolli tas-solvent: Terminu ġenerali li jiddefinixxi l-kolturi tal-kontroll li jirċievu s-solvent waħdu użat biex jiddisolvi s-sustanza kimika tat-test.

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

Kontroll mhux trattat: kolturi li ma jirċievu ebda trattament (jiġifieri la sustanza kimika tat-test u lanqas solvent) iżda jiġu proċessati fl-istess hin u bl-istess mod bħall-kolturi li jirċievu s-sustanza kimika tat-test.

UVCB: Sustanzi Kimiċi b'Kompożizzjoni Mhux Maghrufa jew Varjabbli, Prodotti jew Materjali Bijoloġiċi b'Reazzjoni Kumplessa

## Appendiċi 2

### FORMULI GHALL-VALUTAZZJONI TAČ-ĊITOTOSSICITÀ U TAL-FREKWENZA MUTANTI

L-ċitotossicità tiġi evalwata bis-sopravivenza relattiva, jiġifieri l-effiċjenza tal-klonazzjoni (CE) tač-ċelloli pjastrati eżatt wara t-trattament aġġustata skont kwalunkwe telf ta' ċelloli matul it-trattament meta mqabbla mal-effiċjenza tal-klonazzjoni aġġustata f'kontrolli negattivi (assenjati sopravivenza ta' 100 %) (ara l-formula tal-RS aktar 'il quddiem).

Is-CE aġġustata għal kultura ttrattata b'sustanza kimika tat-test tiġi kkalkolata bħala:

$$\text{CE aġġustata} = \frac{\text{Numru ta' ċelloli fi tmiem it-trattament}}{\text{Numru ta' ċelloli fil-bidu tat-trattament}}$$

RS aġġustata għal kultura ttrattata b'sustanza kimika tat-test tiġi kkalkolata bħala:

$$\text{RS} = \frac{\text{CE aġġustata fil - kultura trattata}}{\text{Adjusted CE aġġustata fil - kontroll b'solvent}} \times 100$$

Il-frekwenza mutanti hi l-effiċjenza tal-klonazzjoni tal-kolonji mutanti f'medium selettiv diviża bl-effiċjenza tal-klonazzjoni f'medium mhux selettiv imkejla għall-istess kultura fil-hin tal-ghażla.

$$\text{Frekwenza mutanti} = \frac{\text{Effiċjenza tal - klonazzjoni tal - kolonji mutanti f'medium selettiv}}{\text{Effiċjenza tal - klonazzjoni f'medium mhux selettiv}}$$

Meta l-pjastri jintużaw għall-effiċjenza tal-klonazzjoni:

$$\text{CE} = \text{Numru ta' kolonji} / \text{Numbru ta' ċelloli pjastrati}.$$

Meta l-mikropjastri jintużaw għall-effiċjenza tal-klonazzjoni:

In-numru ta' kolonji għal kull bwejra fil-mikropjastri jsegwi distribuzzjoni ta' Poisson.

$$\text{Effiċjenza tal-Klonazzjoni} = -\text{LnP}(0) / \text{Numru ta' ċelloli pjastrati għal kull bwejra}$$

Fejn  $-\ln P(0)$  hu n-numru probabbli ta' bwejriet vojta mill-bwejriet miżrugħa u hu deskritt bil-formula li ġejja

$\ln P(0) = -\ln (\text{numru ta' bwejriet vojta} / \text{numru ta' bwejriet pjastrati})$

(3) Fil-Parti B, il-Kapitolu B.22 hu ssostitwit b'dan li ġejj:

## "B.22 TEST LETALI DOMINANTI TAR-RODITURI

### INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar (TM) hu ekwivalenti għal-linji gwida tat-test 478 tal-OECD (2016). Il-metodi ta' ttestjar jiġu rieżaminati kull ċertu żmien fid-dawl tal-progress xjentifiku, tal-htigijiet regolatorji li jinbidlu u tal-kunsiderazzjonijiet relatati mat-trattament xieraq tal-annimali. Din il-verżjoni modifikata tal-metodu ta' ttestjar tirrifletti aktar minn tletin sena esperjenza b'dan it-test u l-potenzjal għall-integrazzjoni jew għall-kombinament ta' dan it-test ma' testijiet ohra tat-tossiċità bħal studji dwar it-tossiċità fl-iżvilupp jew riproduttiva, jew dwar il-ġenotossiċità; madankollu, minhabba l-limitazzjonijiet tiegħu u l-użu ta' numru kbir ta' annimali, dan l-assaġġ mhuwiex maħsub biex jintuża bħala metodu primarju, iżda aktar bħala metodu ta' ttestjar supplimentari li jista' jintuża biss meta ma jkun hemm ebda alternattiva għar-rekwiżiti regolatorji. Il-kombinament tal-ittestjar tat-tossiċità għandu l-potenzjal li jiffranka numri kbar ta' annimali mill-użu fit-testijiet tat-tossiċità. L-OECD żviluppa dokument li jipprovdi informazzjoni sintetika fuq l-ittestjar dwar it-tossikoloġija ġenetika u ħarsa ġenerali lejn it-tibdiliet riċenti li seħħew fil-linji gwida tat-test tal-OECD dwar it-tossiċità ġenetika (1).
2. L-iskop tat-test Letali Dominanti (DL) hu li jinvestiga jekk is-sustanzi kimiċi jipproduċux mutazzjonijiet li jirriżultaw minn aberrazzjonijiet kromozomiċi f'ċelloli ġerminali. Barra minn hekk, it-test letali dominanti hu rilevanti għall-valutazzjoni tal-ġenotossiċità għaliex, għalkemm jistgu jvarjaw bejn l-ispeċijiet, il-fatturi tal-metaboliżmu *in vivo*, il-farmakokinetika u l-proċessi ta' tiswija tad-DNA huma attivi u jikkontribwixxu għar-rispons. L-induzzjoni ta' mutazzjoni DL wara l-esponiment għal sustanza kimika tat-test tindika li s-sustanza kimika affettwat it-tessut ġerminali tal-annimal tat-test.
3. Il-mutazzjonijiet tad-DL jikkawżaw mewt embrijoniku jew tal-fetu. L-induzzjoni ta' mutazzjoni DL wara l-esponiment għal sustanza kimika tat-test tindika li s-sustanza kimika affettwat iċ-ċelloli ġerminali tal-annimal tat-test.
4. Assaġġ tad-DL hu siewi għall-konferma ta' riżultati pożittivi ta' testijiet bl-użu ta' punti ta' tmiem somatiċi *in vivo*, u hu punt ta' tmiem rilevanti għat-tbassir tal-periklu għall-bniedem u tar-riskju ta' mardiet ġenetiċi trażmessi permezz tal-linja ġerminali. Madankollu, dan l-assaġġ jehtieg numru kbir ta' annimali u jinvolvi xogħol intensiv; għaldaqstant, hu għali ħafna u jieħu ż-żmien biex isir. Minhabba li l-frekwenza spontanja tal-mutazzjonijiet letali dominanti hi kemxejn għolja, is-sensittività tal-assaġġ għad-detezzjoni ta' żidiet żgħar fil-frekwenza tal-mutazzjonijiet ġeneralment tkun limitata.



5. Id-definizzjonijiet tat-termini ewlenin huma stabbiliti fl-Appendiċi 1.

## KUNSIDERAZZJONIJIET TAL-BIDU

6. It-test isir l-aktar bil-ġrieden (2) (3) (4) iżda f'ċerti każijiet jistgħu jkunu xierqa speċijiet oħra, bħall-firien (5) (6) (7) (8), jekk ikunu xjentifikament ġustifikati. Id-DLs ġeneralment ikunu r-riżultat ta' aberrazzjonijiet kromożomiċi kbar (anormalitajiet strutturali u numeriċi) (9) (10) (11), iżda mutazzjonijiet tal-ġeni ma jistgħux ikunu esklużi. Mutazzjoni tad-DL hi mutazzjoni li ssehh f'ċellola ġerminali minnha nfisha, jew tiġi f'fissata wara l-fertilizzazzjoni fl-embrijun bikri, li ma tikkawżax disfunzjoni tal-gamet, iżda hi letali għall-bajda fertilizzata jew għall-embrijun li jkun qed jiżviluppa.
7. L-irġiel individwali jitgħammru b'mod sekwenzjali ma' nisa verġni f'intervalli xierqa. In-numru ta' drabi li jitgħammru wara t-trattament jiddependi mill-iskop finali tal-istudju tad-DL (Paragrafu 23) u għandu jiżgura li l-fażijiet kollha tal-maturazzjoni taċ-ċelloli ġerminali tal-irġiel jiġu evalwati għad-DLs (12).
8. Jekk ikun hemm evidenza li s-sustanza kimika tat-test, jew il-metabolit(i) tagħha, ma jkunux se jilhqqu t-testikoli, ma jkunx xieraq li jintuża dan it-test.

## PRINĊIPJU TAT-TEST

9. Ġeneralment, l-annimali rġiel jiġu esposti għal sustanza kimika tat-test b'rotta ta' esponiment xierqa u jitgħammru ma' nisa verġni mhux trattati. Tipi differenti ta' ċelloli ġerminali jistgħu jiġu ttestjati bl-użu ta' intervalli ta' tghammir sekwenzjali. Wara t-tghammir, in-nisa jiġu ewtanizzati wara perjodu ta' żmien xieraq, u l-utri tagħhom jiġu eżaminati biex jiġu determinati n-numri ta' impjanti u ta' embrijuni hajjin u mejtin. Il-letalità dominanti ta' sustanza kimika tat-test hi determinata bit-tqabbil tal-impjanti hajjin għal kull mara fil-grupp trattat mal-impjanti hajjin għal kull mara fil-grupp tal-kontroll bil-veikolu/bis-solvent. Iż-żieda fl-impjanti mejtin f'kull waħda tas-sess femminil fil-grupp trattat diviż bin-numru ta' impjanti mejtin f'kull waħda tas-sess femminil fil-grupp tal-kontroll turi t-telf ta' wara l-impjantazzjoni indott mis-sustanza kimika tat-test. It-telf ta' wara l-impjantazzjoni jiġi kkalkolat bid-determinazzjoni tal-proporzjon tal-impjanti mejtin għall-impjanti totali fil-grupp trattat meta mqabbel mal-proporzjon tal-impjanti mejtin għall-impjanti totali fil-grupp tal-kontroll. It-telf ta' qabel l-impjantazzjoni tista' tkun stimata billi jitqabbel l-għadd ta' *corpora lutea* nieqes l-impjanti totali jew l-impjanti totali għal kull mara fil-gruppi trattati u tal-kontroll.

## VERIFIKA TAL-PROFIĊJENZA TAL-LABORATORJU

10. Il-kompetenza f'dan l-assaġġ għandha tiġi stabbilita billi tintwera l-ħila li jiġu rirpodotti frekwenzi letali dominanti minn *data* ppubblikata (eż. (13) (14) (15) (16) (17) (18)) b'sustanzi tal-kontroll pożittiv (inklużi risponsi dgħajfa) bħal daww elenkati fit-Tabella 1, u b'kontrolli bil-veikoli u billi jinkisbu frekwenzi tal-kontroll negattiv li jkunu medda aċċettabbli konssistenti ta' *data* (ara r-referenzi aktar 'il fuq) jew bid-distribuzzjoni storika tal-kontroll tal-laboratorju, jekk disponibbli.

## DESKRIZZJONI TAL-METODU

### Preparamenti

#### *Għażla tal-ispeċi tal-annimali*

11. Għandhom jintużaw razez użati spiss fil-laboratorju ta' annimali sesswalment maturi f'saħħithom. Il-ġrieden jintużaw spiss iżda l-firien jistgħu jkunu adattati wkoll. Tista' tintuża kwalunkwe speċi ta' mammiferi xierqa oħra, jekk tiġi pprovduta ġustifikazzjoni xjentifika fir-rapport.

#### *Kundizzjonijiet tal-abitazzjoni u l-għalf tal-annimali*

12. Għar-roditori, it-temperatura fil-kamra tal-annimali għandha tkun ta' 22°C ( $\pm 3^\circ\text{C}$ ). Għalkemm idealment l-umdità relattiva għandha tkun ta' 50-60 %, għandha tkun ta' tal-anqas 40 % u, idealment, ma taqbiżx is-70 % ħlief matul it-tindif tal-kamra. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, b'sekwenza ta' 12-il siegħa dawl, segwita minn 12-il siegħa dlam. Dwar l-għalf, jistgħu jintużaw dieti konvenzjonali tal-laboratorju bi provvista bla limitu ta' ilma tax-xorb. L-għażla tad-dietta tista' tkun influwenzata mill-bżonn li tiġi żgurata tahlita xierqa ta' sustanza kimika tat-test meta tingħata minn din ir-rotta. Qabel it-trattament jew it-tgħammir, ir-roditori għandhom jinżammu fi gruppi żgħar (mhux aktar minn ħamsa) tal-istess sess jekk ma tkun mistennija jew osservata ebda mġiba aggressiva, idealment f'gagėġ solidi b'arrikkiment ambjentali xieraq. L-annimali jistgħu jitrabbew waħedhom jekk dan ikun xjentifikament ġustifikat.

#### *Preparazzjoni tal-annimali*

13. L-annimali adulti rġiel u nisa f'saħħithom u sesswalment maturi jkunu assenjati b'mod każwali lill-gruppi ta' kontroll u trattament. L-annimali individwali jiġu identifikati b'mod uniku bl-użu ta' metodu uman u l-inqas invasiv possibbli (eż. b'ċirku madwarhom, tikketti, mikroċipep jew identifikazzjoni bijometrika, iżda mhux b'titqib fis-swaba' u fil-widnejn) u jithallew iderru fil-kundizzjonijiet tal-laboratorju għal tal-anqas ħamest ijiem. Il-gagėġ għandhom ikunu rranġati b'mod li jkunu mminimizzati l-effetti possibbli minħabba t-tqegħid tal-gagėġ. Għandha tiġi evitata kontaminazzjoni kroċjata mill-kontroll pożittiv u

mis-sustanza kimika tat-test. Fil-bidu tal-istudju, il-varjazzjoni fil-piż tal-annimali għandha tkun minima u ma taqbiżx  $\pm 1-20\%$  tal-piż medju ta' kull sess.

#### *Preparazzjoni tad-dożi*

14. Is-sustanzi kimiċi solidi tat-test għandhom jinħallu jew jiġu sospizi f'solventi jew f'veikoli xierqa jew jithalltu f'dieta jew f'ilma tax-xorb qabel id-dożaġġ tal-annimali. Is-sustanzi kimiċi likwidi tat-test jistgħu jiġu dożati direttament jew jiġu dilwiti qabel id-dożaġġ. Għall-esponimenti bit-tehid man-nifs, is-sustanzi kimiċi tat-test jistgħu jingħataw bħala gass, fwar jew aerosol solidu/likwidu, skont il-proprjetajiet fizikokimiċi tagħhom. Għandhom jintużaw preparati ġodda tas-sustanza kimika tat-test sakemm id-*data* dwar l-istabbiltà ma turix l-aċċettabbiltà tal-ħżin u tiddefinixxi l-kundizzjonijiet tal-ħżin xierqa.

### **Kundizzjonijiet tat-test**

#### *Solvent/veikolu*

15. Is-solvent/il-veikolu ma għandux jipproduċi effetti tossiċi fil-volumi tad-doża użati, u ma għandux ikun suspettat li jgħoq reazzjoni kimika mas-sustanza kimika tat-test. Jekk jintużaw solventi/veikoli oħra li ma jkunux magħrufa sew, l-inklużjoni tagħhom għandha tkun sostnuta permezz ta' *data* ta' riferiment li tindika l-kompatibbiltà tagħhom. Hu rakkomandat li, fejn jista' jkun, l-ewwel jiġi kkunsidrat l-użu ta' solvent/veikolu milwiem. Eżempji ta' solventi/veikoli kompatibbli użati spiss jinkludu l-ilma, salina fiżjoloġika, soluzzjoni tal-metilċelluloża, soluzzjoni tal-melħ tas-sodju taċ-ċelluloża tal-karbossimetil, żejt taż-żebuga u żejt tal-qamħirrum.

#### *Kontrolli pożittivi*

16. Dejjem għandhom jintużaw annimali tal-kontroll pożittiv konkorrenti sakemm il-laboratorju ma jkunx wera profiċjenza fit-twettiq tat-test u jkun uża t-test bħala rutina fl-imġhoddi riċenti (eż. matul l-aħħar hames snin). Madankollu, ma hemmx bżonn li l-annimali tal-kontroll pożittiv jiġu ttrattati bl-istess rotta bħall-annimali li jirċievu s-sustanza kimika tat-test, jew li jiġu kampjunati l-intervalli tat-tgħammir kollha. Is-sustanzi tal-kontroll pożittiv għandhom ikunu magħrufa li jipproduċu DLs bil-kundizzjonijiet użati għat-test. Hlief għat-trattament, l-annimali fil-gruppi tal-kontroll għandhom ikunu manigġati b'mod identiku bħall-annimali fil-gruppi trattati.
17. Id-dozi tas-sustanzi tal-kontroll pożittiv għandhom jintgħazlu biex jipproduċu effetti dgħajfa jew moderati li jivvalutaw b'mod kritiku l-prestazzjoni u s-sensittività tal-assaġġ, iżda li konsistentement jipproduċu effetti letali dominanti pożittivi. Fit-Tabella 1 hemm inkluzi eżempji ta' sustanzi tal-kontroll pożittiv u tad-dozi xierqa.

**Tabella 1:** Eżempji ta' Sustanzi tal-Kontroll Pożittiv.

| Sustanza [Nru CAS]<br>(nru ta' riferiment) | Medda tad-Doża<br>Effettiva (mg/kg)<br>(speċi tar-roditori) | Żmien tal-<br>Amministrazzjo<br>ni (jiem) |
|--------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| Trietilenmelamina [51-18-3] (15)           | 0,25 (grieden)                                              | 1                                         |
| Ċiklofosfamid [50-18-0] (19)               | 50-150 (grieden)                                            | 5                                         |
| Ċiklofosfamid [50-18-0] (5)                | 25-100 (firien)                                             | 1                                         |
| Metansulfonat tal-etil [62-50-0] (13)      | 100-300 (grieden)                                           | 5                                         |
| Akriklamid Monomeriku [79-06-1] (17)       | 50 (grieden)                                                | 5                                         |
| Klorambusil [305-03-3] (14)                | 25 (grieden)                                                | 1                                         |

*Kontrolli negattivi*

18. L-annimali tal-kontrolli negattivi, trattati b'solvent jew b'veikolu wahdu, u mill-bqija trattati bl-istess mod b'hall-gruppi tal-kura, għandhom ikunu inkluzi għal kull hin tal-kampjunar (20). Fin-nuqqas ta' *data* tal-kontroll storika jew ippubblikata li turi li ma kien indott ebda DL jew effett ta' thassir iehor mis-solvent/mill-veikolu magħżul, l-annimali tal-kontroll mhux trattati għandhom ikunu inkluzi wkoll għal kull hin tal-kampjunar biex tiġi stabbilita aċċettabbiltà tal-kontroll tal-veikolu.

**PROCEDURA****Għadd ta' Annimali**

19. L-irġiel individwali jitgħammru b'mod sekwenzjali f'intervalli predeterminati xierqa (eż. intervalli ta' kull ġimgħa, Paragrafi 21 u 23), idealment ma' mara verġni wahda. L-għadd ta' rġiel għal kull grupp għandu jkun predeterminat biex ikun biżżejjed (flimkien man-numru ta' nisa mgħammra f'kull intervall ta' tghammir) biex tiġi pprovduta s-saħħa statistika neċessarja biex tal-anqas jiġi individwat irdoppjar tal-frekwenza tad-DL (Paragrafu 44).
20. L-għadd ta' nisa għal kull intervall ta' tghammir ukoll għandu jkun predeterminat mill-kalkoli tas-saħħa statistika biex tal-anqas ikun jista' jiġi individwat irdoppjar fil-frekwenza tad-DL (jiġifieri biżżejjed nisa tqal biex jipprovdu tal-anqas 400 impjant totali) (20) (21)

(22) (23) u li tal-anqas ikun mistenni impjant mejjet wiehed għal kull unità ta' analiżi (jiġifieri grupp ta' tghammir għal kull doża) (24).

### **Perjodu ta' Amministrazzjoni u l-Intervalli ta' Tghammir**

21. L-għadd ta' intervalli ta' tghammir wara t-trattament hu regolat bl-iskeda tat-trattament u għandu jiżgura li l-fażijiet kollha ta' maturazzjoni taċ-ċelloli ġerminali tal-irġiel jiġu evalwati għall-induzzjoni tad-DL (12) (25). Għal trattament wiehed sa hames amministrazzjonijiet tad-dożi kuljum, għandu jkun hemm tmien istanzi ta' tghammir (grieden) jew 10 (firien) imwettqa f'intervalli ta' kull ġimgħa wara l-aħħar trattament. Għal amministrazzjoni b'doża multipla, l-għadd ta' intervalli ta' tghammir jista' jitnaqqas b'mod proporzjonat għaż-żmien miżjud tal-perjodu ta' amministrazzjoni, iżda jinżamm l-għan ta' evalwazzjoni tal-fażijiet kollha ta' spermatogenezi (eż. wara esponiment għal 28 jum, erba' istanzi ta' tghammir fil-ġimgħa biss ikunu biżżejjed biex jiġu evalwati l-fażijiet kollha tal-ispermatogenezi fil-ġurdien). L-iskedi kollha ta' trattament u ta' tghammir għandhom ikunu xjentifikament ġustifikati.
22. In-nisa għandhom jibqgħu mal-irġiel tal-anqas għad-durata ta' ċiklu estruż wiehed (eż. ġimgħa tkopri ċiklu estruż wiehed fil-grieden kif ukoll fil-firien). In-nisa li ma jitghammirux matul intervall ta' ġimgħa jistgħu jintużaw għal intervall sussegwenti ta' tghammir. Inkella, sakemm isehh it-tghammir, kif determinat mill-preżenza ta' sperma fil-vagina jew mill-preżenza ta' tapp vaginali.
23. Ir-regimen ta' esponiment u ta' tghammir użat jiddependi mill-iskop finali tal-istudju tad-DL. Jekk l-għan hu li jiġi determinat jekk sustanza kimika partikolari tinduċix mutazzjonijiet tad-DL *per se*, il-metodu aċċettat ikun li tiġi esposta serje shiħa ta' spermatogenezi (eż. seba' ġimgħat fil-ġurdien, minn hamsa sa sebgħa trattamenti fil-ġimgħa) u tghammir ta' darba fl-aħħar. Madankollu, jekk l-għan hu li jiġi identifikat it-tip ta' ċellola ġerminali sensittiva għall-induzzjoni tad-DL, ikun preferut esponiment ta' darba jew fuq hames jiem segwit minn tghammir darba fil-ġimgħa.

### **Livelli tad-doża**

24. Jekk isir studju preliminari għat-tiftix tal-medda għaliex ma jkun hemm ebda *data* xierqa diġà disponibbli biex tghin fl-għażla tad-doża, dan għandu jsir fl-istess laboratorju, bl-użu tal-istess speċijiet, razza, sess u reġim tat-trattament li jridu jintużaw fl-istudju ewlieni (26). L-istudju għandu jkollu l-għan li jidentifika d-doża massima tollerata (MTD), definita bħala l-ogħla doża li tiġi tollerata mingħajr evidenza ta' tossiċità li tillimita l-istudju, b'rabta mad-durata tal-perjodu tal-istudju (pereżempju, imġiba jew reazzjonijiet anormali, dipressjoni minuri tal-piż tal-ġisem jew ċitotossiċità tas-sistema ematopoetika), iżda mhux mewt jew evidenza ta' uġiġħ, ta' tbatija jew ta' diffikultà li jehtieġu ewtanazja umanitarja (27).

25. L-MTD lanqas ma tista' taffettwa b'mod avvers is-suċċess tat-tgħammir (21).
26. Is-sustanzi kimiċi tat-test b'attivitajiet bijoloġiċi speċifiċi f'dozi mhux tossiċi baxxi (bħal ormoni u mitogeni), u sustanzi kimiċi li jesibixxu saturazzjoni ta' proprjetajiet tossikokinetiċi jistgħu jkunu eċċezzjonijiet għall-kriterji ta' tfassil tad-dozi u għandhom jiġu evalwati fuq bażi ta' każ b'każ.
27. Biex tinkiseb informazzjoni dwar ir-rispons għad-doża, studju shiħ għandu jinkludi grupp tal-kontroll negattiv u tal-anqas tliet livelli ta' dozi ġeneralment separati b'fattur ta' 2, iżda mhux akbar minn 4. Jekk is-sustanza kimika tat-test ma tipproduċix tossiċità fi studju għat-tiftix tal-medda jew fuq il-bażi tad-*data* eżistenti, l-ogħla doża għal amministrazzjoni waħda għandha tkun ta' 2000 mg/kg tal-piż tal-ġisem. Madankollu, jekk is-sustanza kimika tat-test tikkaguna tossiċità, l-MTD għandha tkun l-ogħla doża mogħtija u l-livelli tad-doża użati idealment għandhom idealment ikopru medda mill-massimu sa doża li tipproduċi ftit tossiċità jew ebda tossiċità. Għal sustanzi kimiċi mhux tossiċi, id-doża limitu għal perjodu ta' amministrazzjoni ta' 14-il jum jew aktar hi ta' 1000 mg/kg piż tal-ġisem/jum, u għal perjodi ta' amministrazzjoni ta' anqas minn 14-il jum id-doża limitu hi ta' 2000 mg/kg piż tal-ġisem/jum.

### **Amministrazzjoni tad-Doži**

28. Ir-rotta antiċipata tal-esponiment tal-bniedem għandha tiġi kkunsidrata meta jitfassal assaġġ. Għaldaqstant, jistgħu jingħazlu rotot tal-esponiment bħal rotta djetetika, mal-ilma tax-xorb, subkuntanja, fil-vini, bit-tehid man-nifs, orali (b'gavage), jew b'impjantazzjoni, kif ġustifikati. Fi kwalunke każ, ir-rotta għandha tingħazel biex jiġi żgurat esponiment adegwat tat-tessut(i) fil-mira. Normalment ma tkunx rakkomandata injezzjoni intraperitoneali peress li ma tkunx rotta intiża ta' esponiment tal-bniedem, u għandha tintuża biss b'ġustifikazzjoni xjentifika speċifika. Jekk is-sustanza kimika tat-test tiġi mħallta fid-dieta jew l-ilma tax-xorb, speċjalment fil-każ ta' dożaġġ wiehed, wiehed għandu joqgħod attent li l-hin bejn il-konsum tal-ikel u l-ilma u t-tgħammir ikun biżżejjed biex ikunu jistgħu jiġu identifikati l-effetti (paragrafu 31). Il-volum massimu ta' likwidu li jista' jingħata b'gavage jew b'injezzjoni f'darba jiddependi mid-daqs tal-annimal tat-test. Normalment il-volum ma għandux ikun ta' aktar minn 1 ml/100g tal-piż tal-ġisem hlief fil-każ ta' soluzzjonijiet milwiema fejn jista' jintuża massimu ta' 2 ml/100g. L-użu ta' volumi akbar minn dan (jekk ikunu permessi mil-leġiżlazzjoni dwar it-trattament xieraq tal-annimali) għandu jkun iġġustifikat. Il-varjabbiltà fil-volum tat-test għandha tiġi minimizzata billi tiġi aġġustata l-konċentrazzjoni biex jiġi żgurat volum kostanti b'rabta mal-piż tal-ġisem fil-livelli kollha tad-doża.

### **Osservazzjonijiet**

29. Ghandhom isiru osservazzjonijiet kliniċi ġenerali fuq l-annimali tat-test u s-sinjali kliniċi ghandhom jiġu rreġistrati tal-anqas darba kuljum, idealment fl-istess hin(ijiet) kuljum u filwaqt li jiġi kkunsidrat il-perjodu ta' wara d-dożaġġ li fih sejrin jidhru l-aktar l-effetti antiċipati. Tal-anqas darbtejn kuljum matul il-perjodu ta' dożaġġ, l-annimali kollha ghandhom ikunu osservati għall-morbidità u għall-mortalità. L-annimali kollha ghandhom jintiżnu fil-bidu tal-istudju u tal-anqas darba fil-ġimgħa matul l-istudji b'doża ripetuta, u fil-hin tal-ewtanażja. Il-kejljiet tal-konsum tal-ikel ghandu jsir tal-anqas darba kull ġimgħa. Jekk is-sustanza kimika tat-test tinghata mal-ilma tax-xorb, il-konsum tal-ilma ghandu jitkejjel f'kull bidla tal-ilma u tal-anqas darba fil-ġimgħa. L-annimali li jesibixxu indikaturi mhux letali ta' tossiċità eċċessiva ghandhom jiġu ewtanizzati qabel jintemm il-perjodu ta' ttestjar (27).

### Ġbir u Proċessar tat-Tessuti

30. In-nisa jiġu ewtanizzati fit-tieni nofs tat-tqala fil-jum tal-ġestazzjoni (GD), 13 għall-ġrieden u GD 14-15 għall-firien. L-utri jiġu eżaminati għal effetti letali dominanti biex jiġi determinat in-numru ta' impjanti, ta' embrijuni haġġin u mejtin, u ta' *corpora lutea*.
31. Il-qrejjien tal-utru u l-ovarji jiġu esposti għall-għadd tal-*corpora lutea*, u l-feti jitnehhew, jingħaddu u jintiżnu. Ghandha tinghata attenzjoni biex l-utri jiġu eżaminati għal riassorbimenti oskurati minn feti haġġin u biex jiġi żgurat li r-riassorbimenti kollha jiġu enumerati. Tiġi rreġistrata l-mortalità tal-feti. In-numru ta' nisa mtaqqla b'suċċess u n-numru ta' impjantazzjonijiet totali, it-telf qabel l-impjantazzjoni, u l-mortalità ta' wara l-impjantazzjoni (inklużi r-riassorbimenti bikrin u tardivi) jiġu rreġistrati wkoll. Barra minn hekk, il-feti viżibbli jistgħu jiġu preservati fil-fissattiv ta' Bouin għal tal-anqas ġimagħtejn (2) u mbagħad jiġu eżaminati għal malformazzjonijiet esterni maġġuri (28) biex tiġi pprovduta informazzjoni addizzjonali dwar l-effetti riproduttivi u fuq l-iżvilupp tal-aġent tat-test.

### DATA U RAPPORTAR

#### Trattament tar-riżultati

32. Id-data ghandha tkun fil-forma ta' tabelli biex turi n-numru ta' annimali rġiel mgħammra, in-numru ta' nisa tqal, u n-numru ta' nisa li mhumiex tqal. Ir-riżultati ta' kull tgħammir, inkluża l-identità ta' kull raġel u mara ghandhom ikunu rrapportati b'mod individwali. L-intervall tat-tgħammir, il-livell tad-doża għall-irġiel ittrattati, u n-numri ta' impjanti haġġin u ta' impjanti mejtin ghandhom jiġu enumerati għal kull mara.
33. It-telf ta' wara l-impjantazzjoni jiġi kkalkolat bid-determinazzjoni tal-proporzjon tal-impjanti mejtin għall-impjanti totali mill-grupp trattat meta mqabbel mal-proporzjon tal-

impjanti mejtin għall-impjantazzjonijiet totali mill-grupp tal-kontroll bil-veikolu/bis-solvent.

34. It-telf ta' qabel l-impjantazzjoni hu kkalkolat bħala d-differenza bejn in-numru ta' *corpora lutea* u n-numru ta' impjanti jew bħala tnaqqis fin-numru medju ta' impjanti għal kull mara meta mqabbel mat-tgħammir tal-kontroll. Meta jkun stimat it-telf ta' qabel l-impjantazzjoni, għandu jkun irrapportat.
35. Il-fattur Letali Dominanti jiġi stmat bħala: (l-imwiet ta' wara l-impjantazzjoni/l-impjantazzjonijiet totali għal kull mara) x 100.
36. Għandha tiġi rrapportata d-*data* dwar it-tossicità u s-sinjali kliniċi (skont il-Paragrafu 29).

### Kriterji ta' Aċċettabilità

37. Il-kriterji li ġejjin jistabbilixxu l-aċċettabilità ta' test.
  - Il-kontroll negattiv konkorrenti hu konsistenti man-normi ppubblikati għad-*data* storika tal-kontroll negattiv, u mad-*data* storika tal-kontroll tal-laboratorju jekk tkun disponibbli (ara l-Paragrafi 10 u 18).
  - Il-kontrolli pożittivi konkorrenti jinduċu risponsi li jkunu konsistenti man-normi ppubblikati għad-*data* storika tal-kontroll pożittiv, jew mal-bażi tad-*data* storika tal-kontroll pożittiv tal-laboratorju, jekk disponibbli, u jipproduċu zieda statistikament sinifikanti meta mqabbla mal-kontroll negattiv (ara l-Paragrafi 17 u 18).
  - Ġew analizzati numru adegwat ta' impjanti totali u dozi (Paragrafu 20).
  - Il-kriterji għall-għażla tal-ogħla doża huma konsistenti ma' dawk deskritti fil-Paragrafi 24 u 27.

### Evalwazzjoni u Interpretazzjoni tar-Riżultati

38. Tal-anqas tliet gruppi tad-doża kkurati għandhom jiġu analizzati biex tiġi pprovduta biżżejjed *data* għal analiżi tar-rispons għad-doża.
39. Dment li ma jiġux issodisfati l-kriterji ta' aċċettabilità kollha, sustanza kimika tat-test titqies li hi pożittiva biċ-ċar jekk:
  - tal-anqas waħda mid-doži tat-test turi zieda statistikament sinifikanti meta mqabbla mal-kontroll negattiv konkorrenti;



- iż-żieda tkun relatata mad-doża f'tal-anqas kundizzjoni sperimentali waħda (eż. intervall tat-tgħammir ta' kull ġimgħa) meta evalwata b'test xieraq; u,
- kwalunkwe wieħed mir-riżultati jaqa' barra mill-medda aċċettabbli tad-*data* tal-kontroll negattiv, jew mid-distribuzzjoni tad-*data* storika tal-kontroll negattiv tal-laboratorju (eż. limitu tal-kontroll ta' 95 % fuq il-bażi ta' Poisson) jekk disponibbli.

Imbagħad is-sustanza kimika tat-test titqies li kapaċi tinduċi mutazzjonijiet letali dominanti fiċ-ċelloli ġerminali tal-annimali tat-test. Ir-rakkomandazzjonijiet għall-aktar metodi statistiċi xierqa huma deskritti fil-Paragrafu 44; approċċi statistiċi rakkomandati ohra jistgħu jinstabu fid-dokumentazzjoni (20) (21) (22) (24) (29). It-testijiet statistiċi użati għandhom jikkunsidraw l-annimal bħala l-unità sperimentali.

40. Dment li ma jiġux issodisfati l-kriterji ta' aċċettabbiltà kollha, sustanza kimika tat-test titqies li hi negattiva biċ-ċar jekk:

- l-ebda waħda mid-dożi tat-test ma turi żieda statistikament sinifikanti meta mqabbla mal-kontroll negattiv konkorrenti;
- ma jkun hemm ebda żieda relatata mad-doża f'xi kundizzjoni sperimentali; u
- ir-riżultati kollha jaqgħu fi hdan il-medda aċċettabbli tad-*data* tal-kontroll negattiv, jew tad-*data* storika tal-kontroll negattiv tal-laboratorju (eż. limitu tal-kontroll ta' 95 % fuq il-bażi ta' Poisson), jekk disponibbli.

Imbagħad is-sustanza kimika tat-test titqies li ma tkunx kapaċi tinduċi mutazzjonijiet letali dominanti fiċ-ċelloli ġerminali tal-annimali tat-test.

41. Ma hemm l-ebda hteġa għal verifika ta' rispons posittiv jew negattiv ċar.

42. Jekk ir-rispons ma jkunx negattiv jew pożittiv b'mod ċar, u bħala għajjnuna għall-istabbiliment tar-rilevanza bijoloġika ta' riżultat (eż. żieda dghajfa jew ambigwa), id-*data* għandha tiġi evalwata b'gudizzju espert u/jew b'investigazzjonijiet ulterjuri li jużaw id-*data* sperimentali eżistenti, bħal kunsiderazzjoni ta' jekk ir-riżultat pożittiv jaqax barra mill-medda aċċettabbli ta' *data* tal-kontroll negattiv, jew ta' *data* storika tal-kontroll negattiv tal-laboratorju (30).

43. F'każijiet rari, anki wara investigazzjonijiet ulterjuri, is-sett ta' *data* jipprekludi milli tinhareġ konklużjoni ta' riżultati pożittivi jew negattivi u għaldaqstant jiġi konkluż bħala ekwivoku.

44. It-testijiet statistiċi użati għandhom jikkunsidraw l-annimal raġel bħala l-unità sperimentali. Filwaqt li hu possibbli li d-*data* dwar l-għadd (eż. in-numru ta' impjanti għal kull mara) tista' tkun distribwita skont Poisson u/jew il-proporzjonijiet (eż. il-proporzjon

ta' impjanti mejtin) jistgħu jkunu distribwiti b'mod binomjali, spiss ikun il-każ li t-tali *data* tkun mifruxa wisq (31). Għaldaqstant, l-ewwel l-analiżi statistika għandha tuża test għal dispersjoni eċċessiva jew subottimali billi tuża testijiet tal-varjanza bħat-test tal-varjanza binomjali ta' Cochran (32) jew it-test  $C(\alpha)$  ta' Tarone għad-dispersjoni binomjali eċċessiva (31) (33). Jekk ma jiġi individwat ebda tbeġħid mid-dispersjoni binomjali, it-tendenzi fil-proporzjonijiet bejn il-livelli tad-doża jistgħu jiġu ttestjati bl-użu tat-test tat-tendenzi ta' Cochran-Armitage (34) u l-paraguni fil-livell tal-pari mal-grupp tal-kontroll jistgħu jiġu ttestjati bl-użu tat-test eżatt ta' Fisher (35). Bl-istess mod, jekk ma jiġi individwat ebda tbeġħid mid-dispersjoni ta' Poisson, it-tendenzi fl-għadd jistgħu jiġu ttestjati bl-użu tar-rigressjoni ta' Poisson (36) u l-paraguni fil-livell tal-pari mal-grupp tal-kontroll jistgħu jiġu ttestjati fi hdan il-kuntest tal-mudell Poisson, bl-użu tal-kuntrasti bejn il-pari (36). Jekk tiġi individwata dispersjoni eċċessiva jew subottimali, huma rakkomandati metodi mhux parametriċi (23) (31). Dawn jinkludu testijiet ibbazati fuq il-klassifikazzjonijiet, bħat-test Jonckheere-Terpstra għat-tendenza (37) u t-testijiet Mann-Whitney (38) għall-paraguni bejn il-pari mal-grupp tal-kontroll bil-veikolu/bis-solvent, kif ukoll it-testijiet tal-permutazzjoni, tal-kampjunar mill-ġdid, jew bootstrap għall-paraguni tat-tendenzi u bejn il-pari mal-grupp tal-kontroll (31) (39).

45. Assaġġ tad-DL pozittiv jipprovdi evidenza għall-ġenotossicità tas-sustanza kimika tat-test fiċ-ċelloli germinali tar-raġel trattati tal-ispeċi tat-test.
46. Kunsiderazzjoni ta' jekk il-valuri osservati humiex fi hdan jew barra l-medda ta' kontroll storiku tista' tipprovdi gwida meta tiġi evalwata s-sinifikanza bijoloġika tar-rispons (40).

## Rapport tat-Test

47. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja.

### *Sommarju.*

#### *Sustanza kimika tat-test:*

- is-sors, in-numru tal-lott, id-data ta' limitu għall-użu, jekk disponibbli;
- l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test stess, jekk magħrufa;
- is-solubbiltà u l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test fis-solvent, jekk magħrufin;
- il-kejl tal-pH, tal-ożmolalità u tal-preċipitat fil-medium tat-tkabbir li miegħu żdiedet is-sustanza kimika tat-test, kif xieraq.

#### Sustanza monokostitwenti:

- id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma, u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali;
- l-identifikazzjoni kimika, bhall-isem IUPAC jew CAS, in-numru CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.

Sustanza multikostitwenti, UVCBs u tahlitiet:

- ikkaratterizzati sa fejn possibbli mill-identità kimika (ara aktar 'il fuq), l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti.

*Preparazzjoni tas-sustanza kimika tat-test:*

- il-ġustifikazzjoni għall-ghażla tal-veikolu.
- is-solubbiltà u l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test fis-solvent/veikolu, jekk magħrufin;
- il-preparazzjoni tal-formulazzjonijiet djetetiċi, tal-ilma tajjeb għax-xorb jew tat-teħid man-nifs;
- id-determinazzjonijiet analitiċi dwar il-formulazzjonijiet (eż. l-istabbiltà, l-omoġenità, il-koncentrazzjonijiet nominali), meta jsiru.

*L-annimali tat-test:*

- l-ispeċi/ir-razza użata u ġustifikazzjoni għall-ghażla,
- l-ġhadd, l-età u s-sess tal-annimali;
- is-sors, il-kundizzjonijiet tal-gaġeg, id-dieta, eċċ.;
- il-metodu tal-identifikazzjoni unika tal-annimali;
- għal studji fuq terminu qasir: il-piż tal-ġisem individwali tal-annimali rġiel fil-bidu u fi tmiem it-test; għal studji itwal minn ġimgħa: il-piżijiet tal-ġisem individwali matul l-istudju u l-konsum ta' ikel. Il-medda tal-piż individwali, id-devjazzjoni medja u standard għal kull grupp għandhom ikunu inklużi.

*Il-kundizzjonijiet tat-test:*

- *data* tal-kontrolli pożittivi u negattivi (veikolu/solvent);
- *data* mill-istudju ta' sejbien tal-medda,

- ir-raġuni għall-għażla tal-livell tad-doża;
- dettalji dwar il-preparazzjoni tas-sustanza kimika tat-test;
- dettalji dwar l-għoti tas-sustanza kimika tat-test;
- ir-raġuni għar-rotta tal-amministrazzjoni;
- metodi għall-kejl tat-tossicità tal-annimali, inklużi, fejn disponibbli, l-analizijiet istopatoloġiċi jew ematoloġiċi u l-frekwenza li biha saru l-osservazzjonijiet u ttiehdu l-piżijiet tal-ġisem tal-annimali;
- il-metodi għall-verifika li s-sustanza kimika tat-test laħqet it-tessut fil-mira, jew iċ-ċirkolazzjoni generali, jekk jinkisbu riżultati negattivi;
- id-doża proprja (mg/kg piż tal-ġisem/jum) ikkalkolata mill-koncentrazzjoni (ppm) u l-konsum tas-sustanza kimika tat-test fid-dieta/ilma tax-xorb, jekk applikabbli;
- dettalji dwar il-kwalità tal-ikel u tal-ilma;
- dettalji dwar l-arrikkiment tal-ambjent tal-gaġeġ;
- deskrizzjoni dettaljata tat-trattament u l-iskedi tal-kampjunar u ġustifikazzjonijiet għall-għażliet;
- il-metodu tal-analjeżija;
- il-metodu tal-ewtanazja;
- il-proċeduri għall-izolament u l-preservazzjoni tat-tessuti;
- is-sors u n-numri tal-lott tal-kitts u tar-reagenti kollha (fejn applikabbli);
- il-metodi għall-enumerazzjoni tad-DLs;
- l-iskeda tat-tgħammir;
- il-metodi użati biex ikun determinat li seħh it-tgħammir;
- il-ħin tal-ewtanazja;
- il-kriterji għall-għoti ta' punteġġ lill-effetti tad-DL, inklużi l-*corpora lutea*, l-impjantazzjonijiet, ir-riassorbimenti u t-telf ta' qabel l-impjantazzjoni, l-impjanti ħajjin, l-impjanti mejta.

*Ir-riżultati:*

- il-kundizzjoni tal-annimali qabel u matul il-perjodu tat-test, inklużi sinjali tat-tossicità;
- il-piż tal-gisem tal-irġiel matul il-perjodi tat-trattament u tat-tgħammir;
- in-numru ta' nisa mġhammra;
- ir-relazzjoni bejn id-doża u r-rispons, fejn possibbli;
- id-*data* konkorrenti u storika tal-kontroll negattiv bil-meded, bil-medji u bid-devjazzjonijiet standard;
- id-*data* konkorrenti tal-kontroll pożittiv;
- id-*data* f'tabelli jew kull omm inklużi: in-numru ta' *corpora lutea* għal kull omm; in-numru ta' impjantazzjonijiet għal kull omm; in-numru ta' riassorbimenti u ta' telf ta' qabel l-impjantazzjoni għal kull omm; in-numru ta' impjanti ħajjin għal kull omm; in-numru ta' impjanti mejtin għal kull omm; il-piżijiet tal-feti;
- id-*data* ta' hawn fuq miġbura għal kull perjodu ta' tgħammir u doża, bil-frekwenzi Letali Dominanti;
- l-analiżijiet u l-metodi statistiċi applikati.

*Diskussjoni tar-riżultati.**Konklużjoni.*

## DOKUMENTAZZJONI

- (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. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Parigi.
- (2) Bateman, A.J. (1977). The Dominant Lethal Assay in the Male Mouse, f'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., u 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. u 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. u 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. u 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. u 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., u 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. u Wyrobek, A.J. (2004). Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations in Mouse Zygotes Determine their Embryonic Fate. *Biol. Reprod.*, 70:616-624.
- (11) Marchetti F. u 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., u 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. u 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. u Gallo M.A. (1976). The dominant Lethal Effect of Dietary Triethylenemelamine, *Mutation Res.*, 40:371-378.
- (16) James D.A. u 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. u 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. u Generoso W.M. (1992). Bleomycin: Female-Specific Dominant Lethal Effects in Mice, *Mutation Res.*, 296: 143-156.
- (19) Holstrom L.M., Palmer A.K. u Favor, J. (1993). The Rodent Dominant Lethal Assay. In *Supplementary Mutagenicity Tests*. Kirkland D.J. u 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. u 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. u 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. u Piegorsch W.W. (1993). Dominant Lethal Tests in Male and Female Mice. *Methods, Toxicol.*, 3A:124-141.
- (23) Haseman J.K. u 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., u 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. u 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.), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.
- (28) Barrow M.V., Taylor W.J u 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. u Thybaud V. (2011). “Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data”, *Mutation. Res.*, 723:87-90.
- (31) Lockhart A.C., Piegorsch W.W. u ishop 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  $\chi^2$  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. F' *Encyclopedia of Statistical Sciences*, Volume 9, Kotz S. u Johnson N. L. (Eds.), pp. 334-336. John Wiley and Sons, New York.
- (35) Cox D.R., Analysis of Binary Data. Chapman u Hall, Londra (1970).
- (36) Neter J.M., Kutner, H.C., Nachtsheim, J. u Wasserman, W. (1996). Applied Linear Statistical Models, Fourth Edition, il-Kapitli 14 u 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.

## Appendiċi 1

### DEFINIZZJONIJIET

Sustanza kimika: Sustanza jew tahlita

Corpora lutea (lutea): l-istruttura tas-sekrezżjoni ormonali fformata fuq l-ovarju fis-sit ta' follikolu li jkun heles il-bajda. In-numru ta' *corpora lutea* fl-ovarji jikkorrispondi għan-numru ta' bajd li ġew ovulati.

Mutazzjoni Letali Dominanti: mutazzjoni li sseħħ f'ċellola ġerminali, jew li tigi fissa wara l-fertilizzazzjoni, li tikkawża mewta embrijonika jew fetali.

Rata ta' fertilità: in-numru ta' nisa tqal mġhammra fuq in-numru ta' nisa mġhammra.

Intervall tat-tgħammir: il-ħin bejn tmiem l-esponiment u t-tgħammir tal-irġiel trattati. Bil-kontroll ta' dan l-intervall, ikunu jistgħu jiġu vvalutati l-effetti kimiċi fuq it-tipi differenti ta' ċelloli ġerminali. Fit-tgħammir tal-ġrieden matul il-ġimġhat numru 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 wara tmiem l-esponiment ikejjel l-effetti fl-isperma, fl-ispermatidi kondensi, fl-ispermatidi tondi, fl-ispermatoċiti pakiten, fl-ispermatoċiti bikrin, fl-ispermatogonji differenzjati, fl-ispermatogonji tad-differenzazzjoni u fl-ispermatogonji taċ-ċelloli staminali.

Telf ta' qabel l-impjantazzjoni: id-differenza bejn in-numru ta' impjanti u n-numru ta' *corpora lutea*. Dan jista' jiġi stmat ukoll billi jitqabblu l-impjanti totali għal kull mara fil-grupp trattat u fil-grupp tal-kontroll.

Telf ta' wara l-impjantazzjoni: il-proporzjon tal-impjanti mejtin fil-grupp trattat meta mqabbel mal-proporzjon tal-impjanti mejtin għall-impjanti totali fil-grupp tal-kontroll.

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew tahlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

UVCB: Sustanza Kimika b'Kompożizzjoni Mhux Magħrufa jew Varjabbli, Prodotti u

Materjali Bijoloġiċi b'Reazzjoni Kumplessa

## Appendiċi 2

### TWAQQIT TAL-ISPERMATOĠENESI FIL-MAMMIFERI

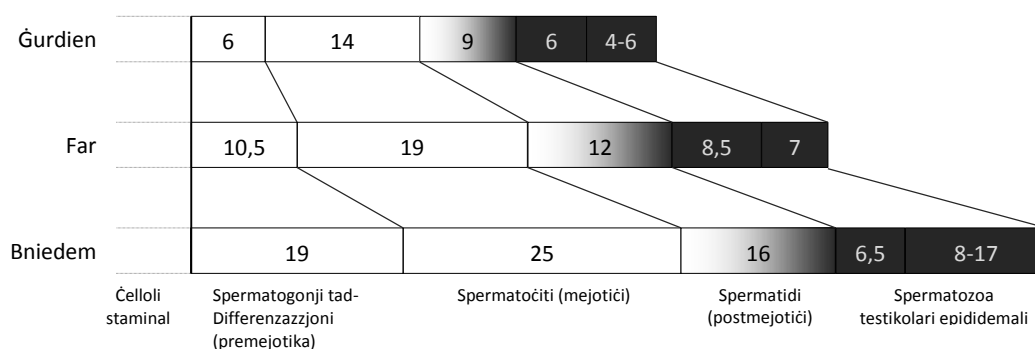


**Fig.1:** Tqabbil tad-durata (jiem) tal-iżvilupp ta' ċelloli ġerminali tal-irġiel fil-ġrieden, fil-firien u fil-bnedmin. It-tiswija tad-DNA ma sseħx matul il-perjodi indikati mit-tidwil.

Skematika tal-ispermatoġenesi fil-ġrieden, fil-firien u fil-bniedem hi murija hawn fuq (meħuda minn Adler, 1996). L-ispermatoġonji mhux differenzjati jinkludu: A-singla; A-pari; u spermatoġonji A-allinjati (Hess u de Franca, 2008). A-singla titqies bħala ċ-ċelloli staminali veri; għalhekk, biex jiġu vvalutati l-effetti fuq iċ-ċelloli staminali jridu jgħaddu tal-anqas 49 jum (fil-ġrieden) bejn l-aħħar injezzjoni tas-sustanza kimika tat-test u t-tgħammir.

## Referenzi

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. Fi: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, C. Yan Cheng (Ed), Landes Biosciences u Springer Science&Business Media:1-15.”

(4) Fil-Parti B, il-Kapitolu B.23 hu ssostitwit b'dan li ġej:

## **"B.23 TEST TAL-ABERRAZZJONI FIL-KROMOŻOMI SPERMATOGONI TAL-MAMMIFERI**

### **INTRODUZZJONI**

1. Dan il-metodu ta' ttestjar (TM) hu ekwivalenti għal-linji gwida tat-test 483 tal-OECD (2016). Il-metodi ta' ttestjar jiġu rieżaminati kull ċertu żmien fid-dawl tal-progress xjentifiku, tal-htigijiet regolatorji li jinbidlu u tal-kunsiderazzjonijiet relatati mat-trattament xieraq tal-annimali. Din il-verżjoni modifikata tal-metodu ta' ttestjar tirrifletti hafna snin ta' esperjenza b'dan l-assaġġ u l-potenzjal għall-integrazzjoni jew għall-kombinament ta' dan it-test ma' studji oħra dwar it-tossicità jew il-ġenotossicità. Il-kombinament tal-istudji tat-tossicità għandu l-potenzjal li jnaqqas in-numri ta' annimali użati fl-ittestjar tat-tossicità. Dan il-metodu ta' ttestjar hu parti minn sensiela ta' metodi ta' ttestjar dwar it-tossikoloġija ġenetika. L-OECD żviluppa dokument li jipprovdri informazzjoni sintetika fuq l-ittestjar dwar it-tossikoloġija ġenetika u harsa ġenerali lejn it-tibdiliet riċenti li sehhew fil-linji gwida tat-test tal-OECD dwar it-tossicità ġenetika (1).
2. L-għan tat-test *in vivo* tal-aberrazzjoni fil-kromożomai spermatogoni tal-mammiferi hu li jidentifika dawk is-sustanzi kimiċi li jikkawżaw aberrazzjonijiet kromożomiċi strutturali fiċ-ċelloli spermatogoni tal-mammiferi (2) (3) (4). Barra minn hekk, dan it-test hu rilevanti għall-valutazzjoni tal-ġenotossicità għaliex, għalkemm ivarjaw bejn l-ispeċijiet, il-fatturi tal-metabolizmu *in vivo*, il-farmakokinetika u l-proċessi ta' tiswija tad-DNA huma attivi u jikkontribwixxu għar-rispons. Dan il-metodu ta' ttestjar mhuwixx imfassal biex ikejjel l-anormalitajiet numeriċi; l-assaġġ ma jintużax bħala rutina għal dan l-għan.
3. Dan it-test ikejjel l-aberrazzjonijiet kromożomiċi strutturali (kemm tat-tip kromożomiku u kromatidiku) fid-diviżjoni taċ-ċelloli ġerminali spermatogoni u, għalhekk, hu mistenni jkun ibassar mutazzjonijiet li jintirtu f'dawn iċ-ċelloli ġerminali.
4. Id-definizzjonijiet tat-termini ewlenin huma stabbiliti fl-Appendiċi.

### **KUNSIDERAZZJONIJIET TAL-BIDU**

5. F'dan it-test spiss jintużaw rodituri, iżda f'ċerti każijiet jista' jkun hemm speċijiet oħrajn li jkunu xierqa, jekk ikunu xjentifikament ġustifikati. Il-preparati ċitoġenetiki standard tat-testikoli tar-rodituri jiġġeneraw metafażijiet mitotiċi (spermatogonji) u mejotiċi (spermatoċiti). Il-metafażijiet mitotiċi u mejotiċi huma identifikati fuq il-bażi tal-morfoloġija tal-kromożomi (4). Dan it-test ċitoġenetiku *in vivo* jindividwa aberrazzjonijiet kromożomiċi strutturali fil-mitożijiet spermatogoni. Ċelloli oħra mmirati mhumix l-oġġett ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

6. Biex jiġu individwati aberrazzjonijiet tat-tip kromatidiku f'ċelloli spermatogoni, l-ewwel divizjoni taċ-ċelloli mitotiċi wara t-trattament għandha tiġi eżaminata qabel ma dawn l-aberrazzjonijiet jiġu konvertiti f'aberrazzjonijiet tat-tip kromozomatiku f'divizjonijiet sussegwenti taċ-ċelloli. Informazzjoni addizzjonali mill-ispermatoċiti trattati tista' tinkiseb b'analizi tal-kromozomi mejotiċi għal aberrazzjonijiet kromozomiċi strutturali fil-metafażi I u fil-metafażi II tad-dijakinezi.
7. Numru ta' generazzjonijiet ta' spermatogonji huma preżenti fit-testikoli (5), u dawn it-tipi differenti ta' ċelloli ġerminali jista' jkollhom spettru ta' sensittività għat-trattament bis-sustanza kimika. B'hekk, l-aberrazzjonijiet individwati jirrapprezentaw rispons aggregat ta' popolazzjonijiet ta' ċelloli spermatogoni trattati. Il-maġġoranza taċ-ċelloli mitotiċi fil-preparati tat-testikoli huma spermatogonji B, li għandhom ċiklu taċ-ċelloli ta' madwar 26 siegħa (3).
8. Jekk ikun hemm evidenza li s-sustanza kimika tat-test, jew il-metabolit(i) tagħha, ma jkunx se jilhqqu t-testikoli, ma jkunx xieraq li jintuża dan it-test.

## PRINĊIPJU TAL-METODU TA' TTESTJAR

9. Ġeneralment, l-annimali jiġu esposti għas-sustanza kimika tat-test b'rotta ta' esponiment xierqa u jiġu ewtanizzati fi żminijiet xierqa wara t-trattament. Qabel l-ewtanażja, l-annimali jiġu ttrattati b'inibitur tal-metafażi (eż. kolliċina jew Colcemid®). Imbagħad isiru preparati ta' kromozomi miċ-ċelloli ġerminali u jiġu mtebbgħin, u ċ-ċelloli metafażiċi jiġu analizzati għal aberrazzjonijiet kromozomiċi.

## VERIFIKA TAL-PROFIĊJENZA TAL-LABORATORJU

10. Il-kompetenza f'dan l-assaġġ għandha tiġi stabbilita billi tintwera l-ħila li jiġu riprodotti r-risultati mistennija għall-frekwenzi ta' aberrazzjonijiet kromozomiċi strutturali fl-ispermatoġonji b'sustanzi tal-kontroll pożittiv (inklużi risponsi dgħajfa) bħal daww elenkati fit-Tabella 1 u jinkisbu frekwenzi tal-kontroll negattiv li jkunu konsistenti mal-medda aċċettabbli ta' *data* tal-kontroll fid-dokumentazzjoni ippubblikata (eż. (2)(3)(6)(7)(8)(9)(10)) jew mad-distribuzzjoni storika tal-kontroll tal-laboratorju, jekk disponibbli.

## DESKRIZZJONI TAL-METODU

### Preparamenti

#### *Għażla tal-ispeċi tal-annimali*

11. Għandhom jintużaw razez użati spiss fil-laboratorju ta' annimali adulti żgħar b'saħħithom. Spiss jintużaw ġrieden irġiel; madankollu, l-irġiel ta' speċijiet ta' mammiferi xierqa oħra

jistgħu jintużaw meta dan ikun xjentifikament ġustifikat u biex dan it-test ikun jista' jsir flimkien ma' metodu ta' ttestjar ieħor. Fir-rapport għandha tiġi pprovduta ġustifikazzjoni xjentifika meta jintużaw speċijiet oħrajn li mhumiex roditori.

#### *Kundizzjonijiet tal-abitazzjoni u tal-ġhalf tal-annimali*

12. Għar-roditori, it-temperatura fil-kamra tal-annimali għandha tkun ta' 22°C ( $\pm 3^\circ\text{C}$ ). Għalkemm idealment l-umdità relattiva għandha tkun ta' 50-60 %, għandha tkun tal-anqas ta' 40 % u, idealment, ma taqbiżx is-70 % hlief matul it-tindif tal-kamra. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, bis-sekwenza tkun ta' 12-il siegħa dawl/12-il siegħa dlam. Dwar l-ġhalf, jistgħu jintużaw dieti konvenzjonali tal-laboratorju bi provvista bla limitu ta' ilma tax-xorb. L-ġhażla tad-dieta tista' tkun influwenzata mill-bżonn li tiġi żgurata taħlita xierqa ta' sustanza kimika tat-test meta tingħata minn din ir-rotta. Ir-roditori għandhom jinżammu fi gruppi żgħar (mhux aktar minn hamsa f'kull gaġġa) jekk ma tkun mistennija ebda mġiba aggressiva, idealment f'gaġġ solidi (ta' mal-art) b'arrikkiment ambjentali xieraq. L-annimali jistgħu jitrabbew waħedhom jekk dan ikun xjentifikament ġustifikat.

#### *Preparazzjoni tal-annimali*

13. Normalment jintużaw annimali rġiel adulti żgħar f'saħħithom (8-12-il ġimġha fil-bidu tal-kura) u dawn jiġu assenjati b'mod aleatorju fil-gruppi ta' kontroll u tal-kura. L-annimali individwali jiġu identifikati b'mod uniku bl-użu ta' metodu uman u l-inqas invasiv possibbli (eż. b'ċirku madwarhom, tikketti, mikroċipep jew identifikazzjoni bijometrika, iżda mhux b'titqib fil-widnejn jew fis-swaba') u jithallew iderru fil-kundizzjonijiet tal-laboratorju għal tal-anqas hamest ijiem. Il-gaġġ għandhom ikunu rrangati b'mod li jkunu mminimizzati l-effetti possibbli minhabba t-tqegħid tal-gaġġ. Għandha tiġi evitata kontaminazzjoni kroċjata mill-kontroll pożittiv u mis-sustanza kimika tat-test. Fil-bidu tal-istudju, il-varjazzjoni bejn il-piżijiet tal-annimali individwali għandha tkun minima u ma taqbiżx  $\pm 1-20$  %.

#### *Preparazzjoni tad-dożi*

14. Is-sustanzi kimiċi solidi tat-test għandhom jinhallu jew jiġu sospizi f'solventi jew f'veikoli xierqa jew jithalltu f'dieta jew f'ilma tajjeb għax-xorb qabel id-dożaġġ tal-annimali. Is-sustanzi kimiċi likwidi tat-test jistgħu jiġu dożati direttament jew jiġu dilwiti qabel id-dożaġġ. Għal esponimenti bit-tehid man-nifs, is-sustanzi kimiċi tat-test jistgħu jingħataw bhala gass, fwar jew aerosol solidu/likwidu, skont il-proprietajiet fiżikokimiċi tagħhom. Għandhom jintużaw preparati ġodda tas-sustanza kimika tat-test sakemm id-data dwar l-istabbiltà ma turix l-aċċettabbiltà tal-ħżin u tiddefinixxi l-kundizzjonijiet tal-ħżin xierqa.

#### **Kundizzjonijiet tat-test - Solvent/veikolu**

15. Is-solvent/veikolu ma għandux jipproduċi effetti tossiċi fil-livelli tad-doża użati, u ma għandux ikun kapaci li johloq reazzjoni kimika mas-sustanzi kimiċi tat-test. Jekk jintużaw



solventi/veikoli oħra li ma jkunux magħrufa sew, l-inklużjoni tagħhom għandha tkun sostnuta permezz ta' *data* ta' riferiment li tindika l-kompatibbiltà tagħhom. Hu rrakkomandat li, kull fejn ikun possibbli, l-ewwel għandu jiġi kkunsidrat l-użu ta' solvent/mezz likwidu. Eżempji ta' solventi/veikoli kompatibbli użati spiss jinkludu l-ilma, salina fiżjoloġika, soluzzjoni tal-metilċelluloża, soluzzjoni tal-melħ tas-sodju taċ-ċelluloża tal-karbossimetil, żejt taż-żebuga u żejt tal-qamħirrum. Fin-nuqqas ta' *data* storika jew ippubblikata tal-kontroll li turi li ma huma indotti ebda aberrazzjoni kromożomika strutturali u effett dannuż ieħor minn solvent/veikolu atipiku magħżul, għandu jsir studju inizjali biex tiġi stabbilita l-aċċettabbiltà tal-kontroll bis-solvent/bil-veikolu.

### *Kontrolli pożittivi*

16. Dejjem għandhom jintuawz annimali tal-kontroll pożittiv konkorrenti sakemm il-laboratorju ma jkunx wera profiċjenza fit-twettiq tat-test u jkun uża t-test bħala rutina fl-imghoddi riċenti (eż. matul l-aħħar 5 snin). Meta ma jkunx hemm grupp tal-kontroll pożittiv konkorrenti inkluż, il-kontrolli tal-punteġġ (lametti fissi u mhux imlewnin) għandhom ikunu inklużi f'kull esperiment. Dawn jistgħu jinkisbu billi fl-ikklassifikar tal-istudju jiddaħħlu kampjuni ta' riferiment xierqa li nkisbu u nħażnu minn esperiment tal-kontroll pożittiv separat imwettaq b'mod perijodiku (eż. kull 6-18-il xahar) fil-laboratorju fejn isir it-test; pereżempju, matul l-ittestjar tal-profiċjenza u fuq bażi regolari wara, fejn ikun hemm bżonn.
17. Is-sustanzi tal-kontroll pożittiv għandhom jipproduċu b'mod affidabbli zieda identifikabbli fil-frekwenzi taċ-ċelloli b'aberrazzjonijiet kromożomiċi strutturali fuq il-livelli spontanji. Id-dożi tal-kontroll pożittiv għandhom jingħazlu biex l-effetti jkunu ċari iżda ma jiżvelawx immedjatament l-identità tal-kampjuni kodifikati lil min jaqrahom. Fit-Tabella 1 hemm inklużi eżempji ta' sustanzi tal-kontroll pożittiv.

**Tabella 1:** Eżempji ta' sustanzi tal-kontroll pożittiv.

| <b>Sustanzi [Nru CAS] (nru ta' riferiment)</b>                      |
|---------------------------------------------------------------------|
| Ċiklofosfamid (monoidrat) [Nru CAS 50-18-0 (Nru CAS 6055-19-2)] (9) |
| Ċikloessilamina [Nru CAS 108-91-8]                                  |
| Mitomicina C [Nru CAS 50-07-7] (6)                                  |
| Akrilammid monomeriku [CAS 79-06-1] (10)                            |
| Trietilenmelamina [CAS 51-18-3] (8)                                 |

### *Kontrolli negattivi*

18. L-annimali tal-kontrolli negattivi, trattati b'solvent jew b'veikolu waħdu, u mill-bqija trattati bl-istess mod bħall-gruppi tal-kura, għandhom ikunu inklużi għal kull hin tal-kampjunar. Fin-

nuqqas ta' *data* tal-kontroll storika jew ippubblikata li turi li ma kien indott ebda aberrazzjoni kromozomika jew effetti ta' thassir ieħor mis-solvent/mill-veikolu magħżul, l-annimali tal-kontroll mhux trattati għandhom ikunu inklużi wkoll għal kull hin tal-kampjunar biex tiġi stabbilita aċċettabbiltà tal-kontroll tal-veikolu.

## PROCEDURA

### Numru ta' annimali

19. Id-daqsijiet tal-grupp fil-bidu tal-istudju għandhom jiġu stabbiliti bl-għan li tal-anqas jiġu pprovduti hames annimali rġiel għal kull grupp. Dan in-numru ta' annimali għal kull grupp jitqies li hu biżżejjed biex tiġi pprovduta saħħa statistika adegwata (jiġifieri generalment ikun jista' jiġi individwat tal-anqas irdoppjar fil-frekwenza tal-aberrazzjonijiet kromozomiċi meta l-livell tal-kontroll negattiv ikun 1,0 % jew akbar bi probabbiltà ta' 80 % f'livell ta' sinifikat ta' 0,05) (3) (11). Bħala gwida għar-rekwiziti tipiċi massimi tal-annimali, studju f'żewġ waqtiet tal-kampjunar bi tliet gruppi tad-doża u grupp tal-kontroll negattiv konkorrenti, flimkien ma' grupp tal-kontroll pozittiv (kull wieħed imsawwar minn hames annimali għal kull grupp), ikun jeħtieġ 45 annimal.

### Skeda tat-trattament

20. Normalment is-sustanzi kimiċi tat-test jingħataw darba (jiġifieri bħala trattament wieħed); jistgħu jintużaw regimi tad-doži oħra, dment li ma jkunx xjentifikament ġustifikati.
21. Fil-grupp tal-ogħla doża jittieħdu żewġ kampjuni wara t-trattament. Ladarba l-hin meħtieġ għall-bidu u l-metaboliżmu tas-sustanza (jew sustanzi) kimika tat-test kif ukoll l-effetti tagħha fuq il-kinetika taċ-ċikli taċ-ċelloli jistgħu jaffettwaw il-hin ottimali għall-individwar tal-aberrazzjonijiet kromozomiċi, jintużaw hin tal-kampjunar wieħed bikri u hin ieħor tard madwar 24 u 48 siegħa wara t-trattament. Għal doži li mhumie x l-ogħla doża, għandu jittieħed hin tal-kampjunar bikri ta' 24 siegħa (anqas jew daqs il-hin taċ-ċiklu taċ-ċelloli ta' spermatogonji B u b'hekk tiġi ottimizzata l-probabbiltà ta' għoti ta' puntegg għall-ewwel metafazijiet ta' wara t-trattament) wara t-trattament, sakemm ma jkunx magħruf li hemm hin ieħor tal-kampjunar aktar xieraq u ġustifikat.
22. Jistgħu jintużaw hinijiet oħra tal-kampjunar. Pereżempju, fil-każ ta' sustanzi kimiċi li jehilsu effetti indipendenti mis-S, hinijiet tal-kampjunar aktar bikrin (jiġifieri anqas minn 24 siegħa) jistgħu jkunu xierqa.
23. Jista' jintuża regim ta' trattament ta' doża ripetuta, bħal flimkien ma' test fuq punt ta' tmiem ieħor li juża perjodu ta' amministrazzjoni ta' 28 jum (eż., TM B.58); madankollu, gruppi ta' annimali addizzjonali jkunu meħtieġa jakkomodaw hinijiet tal-kampjunar differenti. Għalhekk, l-idoneità ta' skeda bħal din trid tiġi aġġustata xjentifikament skont kull każ individwali.

24. Qabel l-ewtanażja, l-annimali jiġu injettati intraperitonealment b'doża xierqa ta' sustanza kimika li twaqqaf l-metafażi (eż. Colcemid<sup>®</sup> jew kolkičina). Wara dan, jittiehed kampjun mill-annimali f'intervalli xierqa. Għall-grieden u għall-firien, dan l-intervall hu ta' madwar 3 - 5 sigħat.

### Livelli tad-doża

25. Jekk isir studju preliminari għat-tiftix tal-medda għaliex ma jkun hemm ebda *data* xierqa diġà disponibbli biex tgħin fl-għażla tad-doża, dan għandu jsir fl-istess laboratorju, bl-użu tal-istess speċijiet, razza, sess u reġim tat-trattament li jridu jintużaw fl-istudju ewlieni, skont ir-rakkomandazzjonijiet għat-twettiq ta' studji ta' individwazzjoni tad-doża (26). Dan l-istudju għandu jkollu l-għan li jidentifika d-doża massima tollerata (MTD), definita bħala d-doża li tinduċi effetti tossiċi ħfief b'rabta mad-durata tal-perjodu tal-istudju (pereżempju, imġiba jew reazzjonijiet anormali, dipressjoni minuri tal-piż tal-ġisem jew ċitotossicità tas-sistema ematopoetika) iżda mhux mewt jew evidenza ta' uġiġħ, ta' tbatija jew ta' diffikultà li jehtieġu ewtanażja tal-annimali (27).
26. L-ogħla doża tista' ukoll tfisser id-doża li tipproduċi xi indikazzjoni ta' tossicità fiċ-ċelloli spermatogoni (eż. tnaqqis fil-proporzjon bejn mitożijiet spermatogoni sal-ewwel u t-tieni metafażijiet mejotiċi). Dan it-tnaqqis ma għandux jaqbeż il-50 %).
27. Is-sustanzi kimiċi tat-test b'attivitajiet bijoloġiċi speċifiċi f'dożi mhux tossiċi baxxi (bħal ormoni u mitogeni), u sustanzi kimiċi li jesibixxu saturazzjoni ta' proprjetajiet tossikokinetiċi jistgħu jkunu eċċezzjonijiet għall-kriterji ta' tfassil tad-dożi u għandhom jiġu evalwati fuq bażi ta' każ b'każ.
28. Biex tinkiseb informazzjoni dwar ir-rispons għad-doża, studju shiħ għandu jinkludi grupp tal-kontroll negattiv (paragrafu 18) u tal-anqas tliet livelli ta' dożi generalment separati b'fattur ta' 2, iżda b'mhux akbar minn 4. Jekk is-sustanza kimika tat-test ma tipproduċi tossicità fi studju għat-tiftix tal-medda jew fuq il-bażi tad-*data* eżistenti, l-ogħla doża għal amministrazzjoni waħda għandha tkun ta' 2000 mg/kg tal-piż tal-ġisem. Madankollu, jekk is-sustanza kimika tat-test tikkaguna tossicità, l-MTD għandha tkun l-ogħla doża mogħtija u l-livelli tad-doża użati idealment għandhom idealment ikopru medda mill-massimu sa doża li tipproduċi ftit tossicità jew ebda tossicità. Meta tiġi osservata tossicità tat-tessut fil-mira (jiġifieri testikoli) fil-livelli tad-doża kollha ttestjati, hu rakkomandat li jsir studju ulterjuri f'dożi mhux tossiċi. Studji li jkollhom l-għan li jikkarakterizzaw iktar bis-shiħ l-informazzjoni kwantitattiva dwar ir-rispons għad-doża jistgħu jehtieġu gruppi tad-doża addizzjonali. Għal ċerti tipi ta' sustanzi kimiċi tat-test (eż. prodotti farmaċewtiċi għall-bniedem) koperti minn rekwiżiti speċifiċi, dawn il-limiti jistgħu jvarjaw. Jekk is-sustanza kimika tat-test tipproduċi tossicità, għandhom jintgħażlu d-doża limitu flimkien ma' żewġ dożi inferjuri (kif deskritti aktar 'il fuq). Id-doża limitu għal perjodu ta' amministrazzjoni ta' 14-il jum jew aktar hi ta' 1000 mg/kg piż tal-ġisem/jum, u għal perjodi ta' amministrazzjoni ta' anqas minn 14-il jum id-doża limitu hi ta' 2000 mg/kg/piż tal-ġisem/jum.

## Amministrazzjoni tad-dożi

29. Ir-rotta antiċipata tal-esponiment tal-bniedem għandha tigi kkunsidrata meta jitfassal assaġġ. Għaldaqstant, jistgħu jingħazlu rotot tal-esponiment bħal rotta djetetika, mal-ilma tax-xorb, subkuntanja topika, fil-vini, orali (gavage), mat-tehid man-nifs, jew b'impjant, kif iġġustifikati. Fi kwalunke każ, ir-rotta għandha tingħazel biex jiġi żgurat esponiment adegwat tat-tessut fil-mira. L-injezzjoni intraperitoneali normalment ma tkunx rakkomandata sakemm ma tkunx xjentifikament ġustifikata peress li normalment ma tkunx rotta fiżjoloġikament rilevanti ta' esponiment tal-bniedem. Jekk is-sustanza kimika tat-test tigi mhallta fid-dieta jew fl-ilma tax-xorb, speċjalment fil-każ ta' dożaġġ wiehed, wiehed għandu joqgħod attent li l-hin bejn il-konsum tal-ikel u l-ilma u l-kampjunar ikun biżżejjed biex ikunu jistgħu jiġu identifikati l-effetti (ara l-paragrafi 33). Il-volum massimu ta' likwidu li jista' jingħata b'gavage jew b'injezzjoni f'darba jiddependi mid-daqs tal-annimal tat-test. Normalment il-volum ma għandux ikun ta' aktar minn 1 ml/100g tal-piż tal-ġisem hlief fil-każ ta' soluzzjonijiet milwiema fejn jista' jintuża massimu ta' 2 ml/100g tal-piż tal-ġisem. L-użu ta' volumi akbar minn dan (jekk ikunu permessi mil-legiżlazzjoni dwar it-trattament xieraq tal-annimali) għandu jkun iġġustifikat. Il-varjabbiltà fil-volum tat-test għandha tigi minimizzata billi tigi aġġustata l-koncentrazzjoni biex jiġi żgurat volum kostanti b'rabta mal-piż tal-ġisem fil-livelli kollha tad-doża.

## Osservazzjonijiet

30. Għandhom isiru osservazzjonijiet kliniċi generali fuq l-annimali tat-test u s-sinjali kliniċi għandhom jiġu rreġistrati tal-anqas darba kuljum, idealment fl-istess hin(ijiet) kuljum u filwaqt li jiġi kkunsidrat il-perjodu ta' wara d-dożaġġ li fih sejrjn jidhru l-aktar l-effetti antiċipati. Tal-anqas darbtejn kuljum, l-annimali kollha għandhom ikunu osservati għal morbidità u mortalità. L-annimali kollha għandhom jintiżnu fil-bidu tal-istudju, tal-anqas darba fil-ġimgħa matul l-istudji b'doża ripetuta, u fil-fażi tal-ewtanazja. Fi studji twal tal-anqas ġimgħa, il-kejljiet tal-konsum tal-ikel għandhom isiru tal-anqas kull ġimgħa. Jekk is-sustanza kimika tat-test tingħata mal-ilma tax-xorb, il-konsum tal-ilma għandu jitkejjel f'kull bidla tal-ilma u tal-anqas darba fil-ġimgħa. L-annimali li jesibixxu indikaturi mhux letali ta' tossiċità eċċessiva għandhom jiġu ewtanizzati qabel jintemm il-perjodu ta' ttestjar (13).

## Preparazzjoni tal-kromożomi

31. Ezatt wara l-ewtanazja, is-sospensjonijiet taċ-ċelloli ġerminali jinkisbu minn testikola wahda, jew mit-tnejn, esposti għal soluzzjoni ipotonika u ffissati skont il-protokoll stabbiliti (eż. (2) (14) (15). Imbagħad iċ-ċelloli jitferrxu fuq il-lametti u jitlewnu (16) (17). Il-lametti kollha għandhom ikunu kodifikati biex l-identità tagħhom ma tkunx disponibbli għal min jiggradahom.

## Analizi

32. Tal-anqas 200 metafazi mifruxa sew għandhom jiġu ggradati għal kull animal (3) (11). Jekk il-frekwenza tal-kontroll negattiv storiku tkun  $< 1 \%$ , aktar minn 200 ċellola/animal għandhom jiġu gradati biex tiżdied is-saħħa statistika (3). Għandhom jintużaw metodi ta' tilwin li jippermettu l-identifikazzjoni ta' ċentromeru.
33. Aberrazzjonijiet tat-tip kromozomiku u kromatidiku għandhom jiġu registrati għalihom u jiġu klassifikati skont is-sottotipi (ksur, skambji). Id-diskrepanzi għandhom jiġu registrati, iżda mhux kunsidrati, meta jiġi determinat jekk sustanza kimika tinduċix żidiet sinifikanti fl-inċidenza ta' ċelloli b'aberrazzjonijiet kromozomiċi. Il-proċeduri użati fil-laboratorji għandhom jiżguraw li l-analiżi tal-aberrazzjonijiet kromozomiċi ssir minn persuni mharrġa kif suppost fl-għoti ta' punteġġ. Fid-dawl tal-fatt li l-proċeduri ta' preparazzjoni tal-lametti spiss jirriżultaw fil-ksur ta' sehem mill-metafażijiet li jirriżulta fit-telf ta' kromozomi, iċ-ċelloli li jingħataw punteġġ għandu jkun fihom għadd ta' ċentromeri ta' mhux inqas minn  $2n \pm 2$ , fejn  $n$  hi n-numru aplojdi ta' kromozomi għal dik l-ispeċi.
34. Għalkemm l-iskop tat-test hu li jindividwa aberrazzjonijiet kromozomiċi strutturali, importanti li jiġu registrati l-frekwenzi ta' ċelloli poliplojdi u ta' ċelloli bi kromozomi endoreduplikati meta jiġu osservati dawn l-avvenimenti (ara l-Paragrafu 44).

## DATA U RAPPORTAR

### Trattament tar-riżultati

35. *Data* dwar l-annimali individwali għandha tiġi ppreżentata f'forma ta' tabelli. Għal kull animal għandhom jiġu evalwati n-numru ta' ċelloli b'aberrazzjoni(jiet) kromozomika/ċi strutturali u n-numru ta' aberrazzjonijiet kromozomiċi għal kull ċellola. L-aberrazzjonijiet tat-tip kromatidiku u kromozomiku klassifikat skont is-sottotipi (ksur, skambji) għandhom jiġu elenkati b'mod separat bin-numri u bil-frekwenzi tagħhom għall-gruppi sperimentali u tal-kontroll. Id-diskrepanzi jiġu registrati b'mod separat. Il-frekwenza tad-diskrepanzi tiġi rapportata iżda, generalment, ma tkunx inkluża fl-analiżi tal-frekwenza totali ta' aberrazzjonijiet kromozomiċi strutturali. Il-perċentwal ta' poliploidija u ta' ċelloli bi kromozomi endoreduplikati jiġi rapportat meta jiġi osservat.
36. Għandha tiġi rrapportata d-*data* dwar it-tossicità u s-sinjali kliniċi (skont il-Paragrafu 30).

### Kriterji ta' Aċċettabilità

37. Il-kriterji li ġejjin jistabbilixxu l-aċċettabilità ta' test.
- Il-kontroll negattiv konkorrenti hu konsistenti man-normi ppubblikati għad-*data* storika tal-kontroll negattiv, li generalment ikunu mistennija jkunu  $> 0 \%$  u  $\leq 1,5 \%$  ta' ċelloli

b'aberrazzjonijiet kromożomiċi, u u mad-*data* storika tal-kontroll tal-laboratorju jekk tkun disponibbli (ara l-Paragrafi 10 u 18).

- Il-kontrolli pożittivi konkorrenti jinduċu risponsi li jkunu konsistenti man-normi ppubblikati għad-*data* storika tal-kontroll pożittiv, jew mal-bażi tad-*data* storika tal-kontroll pożittiv tal-laboratorju, jekk disponibbli, u jipproduċu zieda statistikament sinifikanti meta mqabbla mal-kontroll negattiv (ara l-Paragrafi 17, 18).
- Ġew analizzati numri adegwati ta' ċelloli u ta' doži (ara l-Paragrafi 28 u 32).
- Il-kriterji għall-għażla tal-oghla doża huma konsistenti ma' daww deskritti fil-Paragrafi 25 u 26.

38. Jekk jiġu osservati mitożi u mejozi, il-proporzjon ta' mitożijiet spermatogoni għall-ewwel u t-tieni metafażijiet mejotiċi għandu jkun determinat bħala kejl ta' ċitotossicità għall-annimali trattati u tal-kontroll negattiv kollha f'kampjun totali ta' 100 ċellola diviżorja għal kull annimal. Jekk tiġi osservata mitożi biss, l-indiċi mitotiku għandu jiġi determinat f'tal-anqas 1000 ċellola għal kull annimal.

#### **Evalwazzjoni u interpretazzjoni tar-riżultati**

39. Tal-anqas tliet gruppi tad-doża kkurati għandhom jiġu analizzati biex tiġi pprovduta biżżejjed *data* għal analiżi tar-rispons għad-doża.

40. Dment li ma jiġux issodisfati l-kriterji ta' aċċettabbiltà kollha, sustanza kimika tat-test titqies li hi pożittiva biċ-ċar jekk:

- tal-anqas waħda mid-doži tat-test turi zieda statistikament sinifikanti meta mqabbla mal-kontroll negattiv konkorrenti;
- iż-żieda hi relatata mad-doża tal-anqas f'hin tal-kampjunar wieħed; u,
- kwalunkwe wieħed mir-riżultati jaqa' barra mill-medda aċċettabbli tad-*data* tal-kontroll negattiv, jew mid-distribuzzjoni tad-*data* storika tal-kontroll negattiv tal-laboratorju (eż. limitu tal-kontroll ta' 95 % fuq il-bażi ta' Poisson) jekk disponibbli.

Imbagħad is-sustanza kimika tat-test titqies li kapaċi tinduċi aberrazzjonijiet kromożomiċi fi-ċelloli spermatogoni tal-annimali tat-test. Ir-rakkomandazzjonijiet għall-aktar metodi statistiċi xierqa jistgħu jinkisbu wkoll mid-dokumentazzjoni (11) (18). It-testijiet statistiċi użati għandhom jikkunsidraw l-annimal bħala l-unità sperimentali.

41. Dment li ma jiġux issodisfati l-kriterji ta' aċċettabbiltà kollha, sustanza kimika tat-test titqies li hi negattiva biċ-ċar jekk:

- l-ebda waħda mid-dożi tat-test turi żieda statistikament sinifikanti meta mqabbla mal-kontroll negattiv konkorrenti;
- ma jkun hemm ebda żieda relatata mad-doża f'xi kundizzjoni sperimentali; u,
- ir-riżultati kollha jaqgħu fi hdan il-medda aċċettabbli tad-*data* tal-kontroll negattiv, jew tad-*data* storika tal-kontroll negattiv tal-laboratorju (eż. limitu tal-kontroll ta' 95 % fuq il-bażi ta' Poisson), jekk disponibbli.

Imbagħad is-sustanza kimika tat-test titqies li mhix kapaċi tinduċi aberrazzjonijiet kromożomiċi f'ċelloli spermatogoni tal-annimali tat-test. Ir-rakkomandazzjonijiet għall-aktar metodi statistiċi xierqa jistgħu jinkisbu wkoll mid-dokumentazzjoni (11) (18). Riżultat negattiv ma jeskludix il-possibbiltà li s-sustanza kimika tista' tinduċi aberrazzjonijiet kromożomiċi f'fażijiet tal-iżvilupp aktar tard mhux studjati, jew mutazzjonijiet tal-ġeni.

42. Ma hemm l-ebda hteġa għal verifika ta' rispons posittiv jew negattiv ċar.
43. Jekk ir-rispons ma jkunx negattiv jew pożittiv b'mod ċar, u bħala għajnuna għall-istabbiliment tar-rilevanza bijoloġika ta' riżultat (eż. żieda dgħajfa jew ambigwa), id-*data* għandha tiġi evalwata b'gudizzju espert u/jew b'investigazzjonijiet ulterjuri li jużaw id-*data* sperimentali eżistenti, bħal kunsiderazzjoni ta' jekk ir-riżultat pożittiv jaqax barra mill-medda aċċettabbli ta' *data* tal-kontroll negattiv, jew ta' *data* storika tal-kontroll negattiv tal-laboratorju (19).
44. F'każijiet rari, anki wara investigazzjonijiet ulterjuri, is-sett ta' *data* jipprekludi milli tinħareġ konklúzjoni ta' riżultati pożittivi jew negattivi u għaldaqstant jiġi konkluz bħala ekwivoku.
45. Żieda fin-numru ta' ċelloli poliplojdi tista' tindika li s-sustanza kimika tat-test għandha l-potenzjal li tinibixxi l-proċessi mitotiċi u tinduċi aberrazzjonijiet kromożomiċi numeriċi (20). Żieda fin-numru ta' ċelloli bi kromożomi endoreduplikati tista' tindika li s-sustanza kimika tat-test għandha l-potenzjal li tinibixxi progress fiċ-ċiklu taċ-ċelloli (21) (22), li hu mekkaniżmu differenti ta' induzzjoni ta' tibdiliet kromożomiċi numeriċi mill-inibizzjoni tal-proċessi mitotiċi (ara l-Paragrafu 2). Għaldaqstant, l-inċidenza ta' ċelloli poliplojdi u ċelloli bi kromożomi endoreduplikati għandha tiġi registrata b'mod separat.

## Rapport tat-test

46. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

### Sommarju.

#### *Sustanza kimika tat-test:*

- is-sors, in-numru tal-lott, id-*data* ta' limitu għall-użu, jekk disponibbli;

- l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test stess, jekk magħrufa;
- is-solubbiltà u l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test fis-solvent, jekk magħrufin;
- il-kejl tal-pH, tal-ożmolalità u tal-preċipitat fil-medium tat-tkabbir li miegħu żdiedet is-sustanza kimika tat-test, kif xieraq.

#### Sustanza monokostitwenti:

- id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma, u l-proprietajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali;
- l-identifikazzjoni kimika, bhall-isem IUPAC jew CAS, in-numru CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.

#### Sustanza multikostitwenti, UVCBs u taħlitiet:

- ikkaratterizzati sa fejn possibbli mill-identità kimika (ara aktar 'il fuq), l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprietajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti.

#### Preparazzjoni tas-sustanza kimika tat-test:

- il-ġustifikazzjoni għall-għażla tal-veikolu.
- is-solubbiltà u l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test fis-solvent/fil-mezz.
- il-preparazzjoni tal-formulazzjonijiet djetetiċi, tal-ilma tajjeb għax-xorb jew tat-tehid man-nifs;
- id-determinazzjonijiet analitiċi dwar il-formulazzjonijiet (eż. l-istabbiltà, l-omoġenità, il-koncentrazzjonijiet nominali)
- meta jsiru.

#### L-annimali tat-test:

- l-ispeċi/ir-razza użata u ġustifikazzjoni għall-għażla;
- l-għadd u l-età tal-annimali,
- is-sors, il-kundizzjonijiet tal-gaġeg, id-dieta, eċċ.;
- il-metodu għall-identifikazzjoni unika tal-annimali
- għal studji fuq terminu qasir: il-piż individwali tal-annimali fil-bidu u fi tmiem it-test; għal studji itwal minn ġimgħa: il-piżijiet tal-ġisem individwali matul l-istudju u l-konsum ta' ikel.



Il-medda tal-piż individwali, id-devjazzjoni medja u standard għal kull grupp għandhom ikunu inklużi.

*Il-kundizzjonijiet tat-test:*

- *data* tal-kontrolli pożittivi u negattivi (veikolu/solvent);
- *data* minn studju għat-tiftix tal-medda, jekk ikun sar;
- ir-raġuni għall-għażla tal-livell tad-doża;
- ir-raġuni għar-rotta tal-amministrazzjoni;
- dettalji dwar il-preparazzjoni tas-sustanza kimika tat-test;
- dettalji dwar l-għoti tas-sustanza kimika tat-test;
- raġuni prinċipali għall-hinijiet tas-sagrifiċċju;
- metodi għall-kejl tat-tossicità tal-annimali, inklużi, fejn disponibbli, l-analizijiet istopatologiċi jew ematologiċi u l-frekwenza li biha saru l-osservazzjonijiet u ttiehdu l-piżijiet tal-ġisem tal-annimali;
- il-metodi għall-verifika li s-sustanza kimika tat-test laqget it-tessut fil-mira, jew iċ-ċirkolazzjoni ġenerali, jekk jinkisbu riżultati negattivi;
- id-doża proprja (mg/kg piż tal-ġisem/jum) ikkalkolata mill-konċentrazzjoni (ppm) u l-konsum tas-sustanza kimika tat-test fid-dieta/ilma tax-xorb, jekk applikabbli;
- dettalji dwar il-kwalità tal-ikel u tal-ilma;
- deskrizzjoni dettaljata tat-trattament u l-iskedi tal-kampjunar u ġustifikazzjonijiet għall-għażliet;
- il-metodu tal-ewtanażja;
- il-metodu tal-analgeżija (meta tintuża)
- il-proċeduri għall-izolament tat-tessuti;
- l-identità tas-sustanza kimika li twaqqaf il-metafażi, il-konċentrazzjoni tagħha u d-durata tat-trattament;
- il-metodi tal-preparazzjoni tal-lametti;
- il-kriterji għall-ikklassifikar tal-aberrazzjonijiet;

- in-numru ta' ċelloli analizzati għal kull animal;
- kriterji biex l-istudji jitqiesu bħala pożittivi, negattivi jew ekwivoċi.

#### *Ir-rizultati:*

- il-kundizzjoni tal-annimali qabel u matul il-perjodu tat-test, inklużi sinjali tat-tossiċità;
- il-piżijiet tal-ġisem u tal-organi matul is-sagrifiċċju (jekk jintużaw diversi trattamenti, il-piżijiet tal-ġisem meħuda matul ir-regim tat-trattament);
- sinjali ta' tossiċità;
- indiċi mitotiku;
- il-proporzjon ta' ċelloli tal-mitozi spermatogoni għall-ewwel u t-tieni metafażijiet mejotiċi, jew evidenza oħra ta' esponiment għat-tessut fil-mira;
- it-tip u n-numru ta' aberrazzjonijiet, mogħtija separatament għal kull animal;
- in-numru totali ta' aberrazzjonijiet għal kull grupp bil-medji u bid-devjazzjonijiet standard;
- in-numru ta' ċelloli b'aberrazzjonijiet għal kull grupp bil-medji u bid-devjazzjonijiet standard;
- ir-relazzjoni bejn id-doża u r-rispons, fejn possibbli;
- l-analizzjiet statistiċi u l-metodi applikati;
- *data* konkorrenti tal-kontroll negattiv;
- *data* storika tal-kontroll negattiv b'meded, b'medji, b'devjazzjonijiet standard, u b'intervall ta' kunfidenza ta' 95 % (fejn disponibbli), jew *data* storika ppubblikata tal-kontroll negattiv użata għall-aċċettabbiltà tar-rizultati tat-test;
- *data* konkorrenti tal-kontroll pożittiv;
- tibdiliet fil-ploidija, inklużi l-frekwenzi ta' ċelloli poliplojdi u/jew endoreduplikati.

#### *Diskussjoni tar-rizultati*

##### *Konkluzjoni*

## DOKUMENTAZZJONI

- (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, Parigi
- (2) Adler, I.-D. (1984). Cytogenetic Tests in Mammals. Fi: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. Ed. S. Venitt u 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. u 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. u de Franca L.R. (2008). Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. Fi: 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. Fi: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel C., Lambert B. u Magnusson J. (Eds.) Liss, New York, pp. 477-484.
- (7) Cattanaach, B.M., u Pollard C.E. (1971). Mutagenicity Tests with Cyclohexylamine in the Mouse, Mutation Res., 12, 472-474.
- (8) Cattanaach, B.M., u 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. u 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. u 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.), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.
- (14) Yamamoto, K. u Kikuchi, Y. (1978). A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes. *Mutation Res.*, 52, 207-209.
- (15) Hsu, T.C., Elder, F. u 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., u 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. u Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetics Assays, Fi: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Report. 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. u Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays fi: 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. u Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data. *Mutation Res.*, 723, 87-90.
- (20) Warr T.J., Parry E.M. u 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. u 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.

## Appendiċi

### DEFINIZZJONIJIET

Anewplojdija: kwalunkwe devjazzjoni mill-ġhadd ta' diplojdi (jew aplojdi) normali ta' kromożomi minn kromożomu wiehed jew aktar, iżda mhux mis-sett(ijiet) kollu/kollha ta' kromożomi (poliplojdija).

Ċentromeru: Reġjun(i) ta' kromożomu li miegħu huma assoċjati fibri rqaq waqt id-diviżjoni taċ-ċellola, li jippermettu l-moviment b'ċertu ordni ta' kromożomi sekondarji għall-poli ta' ċelloli sekondarji.

Sustanza kimika: Sustanza jew tahlita

Diversità tal-kromożomi: diversità tal-forom tal-kromożomi (eż. metaċentriċi, akroċentriċi, eċċ) u d-daqsijiet.

Aberrazzjoni tat-tip kromatidiku: ħsara strutturali fil-kromożomi espressa bħala ksur ta' kromatidi singoli jew ksur u għaqda mill-ġdid bejn kromatidi.

Aberrazzjoni tat-tip kromożomiku: ħsara strutturali fil-kromożomi espressa bħala ksur, jew ksur u għaqda mill-ġdid, taż-żewġ kromatidi f'sit identiku.

Klastoġenu: kwalunkwe sustanza kimika li tikkawża aberrazzjonijiet kromożomiċi f'popolazzjonijiet ta' ċelloli jew ta' organiżmi.

Vojt: leżjoni akromatika iżgħar mill-wisa' ta' kromatid wiehed, u b'misallinjament minimu tal-kromatidi.

Ġenotossiċi: terminu generali li jkopri t-tipi kollha ħsara lid-DNA jew lill-kromożomi, inklużi ksur, thassiriet, addotti, modifiki u konnessjonijiet tan-nukleotidi, riarrangamenti, mutazzjonijiet, aberrazzjonijiet kromożomiċi, u anewplojdija. Mhux it-tipi kollha ta' effetti ġenotossiċi jirriżultaw f'mutazzjonijiet jew ħsara fil-kromożomi stabbli."

Indiċi mitotiku (MI): il-proporzjon ta' ċelloli fil-metafażi diviż bin-numru totali ta' ċelloli osservati f'popolazzjoni ta' ċelloli; indikazzjoni tal-livell ta' profilerazzjoni ta' dik il-popolazzjoni.

Mitoži: diviżjoni tan-nukleu taċ-ċelloli li normalment jinqasam fi profaži, prometafaži, metafaži, anafaži u telofaži.

Mutaġeniku: jipproduċi tibdil ereditarju ta' sekwenza/i tal-koppja ta' bażijiet tad-DNA f'ġeni jew tal-istruttura tal-kromożomi (aberrazzjonijiet kromożomiċi).

Anormalità numerika: tibdil fin-numru ta' kromożomi min-numru karatteristku normali tal-annimali użati.

Poliploidija: multiplu tan-numru aploidu ta' kromożomi ( $n$ ) minbarra  $n$ -numru diploidu (jiġifieri  $3n$ ,  $4n$  u l-bqija).

Aberrazzjoni strutturali: tibdil fl-istruttura tal-kromożomi li wiehed jinduna biha bl-eżami mikroskopiku tal-istadju metafażiku tad-diviżjoni taċ-ċelloli, osservati bħala tħassir u biċċiet, skambji.

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

UVCB: Sustanzi Kimiċi b'Kompożizzjoni Mhux Magħrufa jew Varjabbli, Prodotti u Materjali Bijoloġiċi b'Reazzjoni Kumpressa"

(5) Fil-Parti B, il-Kapitolu B.40 hu ssostitwit b'dan li ġejj:

**"B.40 KORRUŻJONI TAL-ĠILDA *IN VITRO*: IL-METODU TA' TTESTJAR TAR-REŻISTENZA ELETTRIKA TRANSKUTANJA (TER)**

**INTRODUZZJONI**

1. Dan il-metodu ta' ttestjar (TM) hu ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 430 tal-OECD (2015). Il-korrużjoni tal-ġilda tirreferi għall-produzzjoni ta' hsara irreversibbli għall-ġilda li tidher bħala nekrozi vizibbli permezz tal-epidermis u fid-dermis, wara l-applikazzjoni ta' sustanza kimika tat-test [kif definita mis-Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi (GHS) tan-Nazzjonijiet Uniti (NU) (1) u mir-Regolament tal-Unjoni Ewropea (UE) 1272/2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet (CLP)<sup>1</sup>]. Dan il-metodu ta' ttestjar aġġornat B.40 jipprovdi proċedura *in vitro* li tippermetti li jiġu identifikati sustanzi u taħlitiet mhux korrużivi u korrużivi skont il-GHS tan-NU (1) u s-CLP.
2. Il-valutazzjoni tal-korrużività tal-ġilda tipikament involviet l-użu ta' annimali tal-laboratorju (TM B.4, ekwivalenti għat-TG 404 tal-OECD oriġinarjament adottata fl-1981, u riveduta fl-1992, fl-2002 u fl-2015) (2). Minbarra t-TM B.40 preżenti, metodi ta' ttestjar *in vitro* oħra għall-ittestjar tal-potenzjal ta' korrużjoni tal-ġilda tas-sustanzi kimiċi ġew validati u adottati bħala TM B.40bis (ekwivalenti għat-TG 431 tal-OECD) (3) u TM B.65 (ekwivalenti għat-TG 435 tal-OECD) (4), li wkoll huma kapaċi jidentifikaw subkategoriji ta' sustanzi kimiċi korrużivi meta jkun hemm bżonn. Ġew adottati diversi metodi ta' ttestjar *in vitro* validati bħala TM B.46 (ekwivalenti għat-TG 439 tal-OECD (5), biex jintużaw għall-ittestjar tal-irritazzjoni tal-ġilda. Dokument ta' gwida tal-OECD dwar Approċċi Integrati għall-Ittestjar u għall-Valutazzjoni (IATA) għall-Korrużjoni u għall-Irritazzjoni tal-Ġilda jiddeskrivi diversi moduli li jiġbru fihom diversi sorsi ta' informazzjoni u għodod ta' valutazzjoni, u jipprovdi gwida dwar (i) kif tintegra u tuża d-*data* eżistenti dwar l-ittestjar u mhux tal-ittestjar għall-valutazzjoni tal-potenzjali ta' irritazzjoni tal-ġilda u ta' korrużjoni tal-ġilda tas-sustanzi kimiċi u (ii) jipproponi approċċ fejn ikun meħtieġ ittestjar ulterjuri (6).

---

<sup>1</sup> Ir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tas-16 ta' Diċembru 2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet, li jemenda u jhassar id-Direttivi 67/548/KEE u 1999/45/KE, u li jemenda r-Regolament (KE) Nru 1907/2006, ĠU L 353/1, 31.12.2008



3. Dan il-metodu ta' ttestjar jindirizza l-korrużjoni tal-ġilda tal-punt tat-tmim tas-saħħa umana. Hu bbażat fuq il-metodu ta' ttestjar tar-reżistenza elettrika transkutanja (TER) tal-ġilda tal-firien, li juża diski tal-ġilda biex jidentifika l-korrużivi mill-ħila tagħhom li jipproduċu telf ta' integrità orjali *stratum corneum* u funzjoni barriera. Il-linja gwida tat-test korrispondenti tal-OECD originarjament ġiet adottata fl-2004 u aġġornata fl-2015 biex tirreferi għad-dokument ta' gwida tal-IATA.
4. Biex jiġi evalwat l-ittestjar tal-korrużjoni tal-ġilda *in vitro* għall-finijiet regolatorji, saru studji ta' qabel il-validazzjoni (7) segwiti minn studju tal-validazzjoni formali tal-metodu ta' ttestjar TER tal-ġilda tal-firien għall-valutazzjoni tal-korrużjoni tal-ġilda (8) (9) (10) (11). L-eżitu ta' dawn l-istudji wassal għar-rakkomandazzjoni li l-metodu ta' ttestjar TER (imsejjah il-Metodu ta' Referenza Validat – VRM) jista' jintuża għall-finijiet regolatorji għall-valutazzjoni tal-korrużjoni tal-ġilda *in vivo* (12) (13) (14).
5. Qabel ma metodu ta' ttestjar TER *in vitro* simili jew modifikat propost għall-korrużjoni tal-ġilda li mhuwiex il-VRM ikun jista' jintuża għall-finijiet regolatorji, l-ewwel għandhom jiġu determinati l-affidabbiltà, ir-rilevanza (preċiżjoni), u l-limitazzjonijiet tiegħu biex tiġi żgurata s-similarità tiegħu għall-VRM, skont ir-rekwiżiti tal-Istandards tal-Prestazzjoni (PS) (15). L-Aċċettazzjoni Reċiproka tad-Data tal-OECD tiġi garantita biss wara li kwalunkwe metodu ta' ttestjar propost għid jew aġġornat wara l-PS ikun ġie rieżaminat u inkluz fil-linja gwida tat-test korrispondenti tal-OECD.

## DEFINIZZJONIJIET

6. Id-definizzjonijiet użati huma pprovduti fl-Appendiċi.

## KUNSIDERAZZJONIJIET TAL-BIDU

7. Studju tal-validazzjoni (10) u studji ppubblikati oħra (16) (17) irrapportaw li l-metodu ta' ttestjar TER tal-ġilda tal-firien kapaċi jiddiskrimina bejn korrużivi tal-ġilda magħrufa u mhux korrużivi b'sensittività ġenerali ta' 94 % (51/54) u bi speċifità ta' 71 % (48/68) għal bażi ta' data ta' 122 sustanza.
8. Dan il-metodu ta' ttestjar jindirizza l-korrużjoni tal-ġilda *in vitro*. Jippermetti l-identifikazzjoni ta' sustanzi kimiċi tat-test mhux korrużivi u korrużivi skont il-GHS tan-NU/is-CLP. Limitazzjoni ta' dan il-metodu ta' ttestjar, kif murija mill-istudji ta' validazzjoni (8) (9) (10) (11), hi li dan ma jippermettix is-subkategorizzazzjoni ta' sustanzi u ta' taħlitiet korrużivi skont il-GHS tan-NU/is-CLP. Il-qafas regolatorju applikabbli jiddetermina kif se jintuża dan il-metodu ta' ttestjar. Filwaqt li dan il-metodu ta' ttestjar ma jipprovdix informazzjoni adegwata dwar l-irritazzjoni tal-ġilda, ta' min jinnota li t-TM B.46 jindirizza b'mod speċifiku l-irritazzjoni tal-ġilda *in vitro* b'effett fuq is-saħħa (5). Għal evalwazzjoni shiħa tal-effetti lokali

fuq il-ġilda wara esponiment dermali wiehded, għandu jiġi kkonsultat id-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar il-IATA (6).

9. Firxa wiesgħa ta' sustanzi kimiċi li jirrappreżentaw primarjament sustanzi ġiet ittestjata fil-validazzjoni li hi l-bażi ta' dan il-metodu ta' ttestjar u l-bażi ta' *data* empirika tal-istudju ta' validazzjoni kienet tammonta għal total ta' 60 sustanza kimika li tkopri firxa wiesgħa ta' klassijiet kimiċi (8) (9). Fuq il-bażi tad-*data* generali disponibbli, dan il-metodu ta' ttestjar hu applikabbli għal firxa wiesgħa ta' klassijiet kimiċi u ta' stati fiżiċi li jinkludu likwidi, semisolidi, solidi u xama'. Madankollu, peress li għal ma hemmx disponibbli għalkollox oġġetti tat-test b'*data* ta' riferiment xierqa għal stati fiżiċi speċifiċi, ta' min jinnota li matul il-validazzjoni ġie vvalutat numru komparabbilment żgħir ta' xama' u ta' solidi korrużivi. Il-likwidi jistgħu jkunu jew ma jkunux milwiema; is-solidi jistgħu jkunu jew ma jkunux solubbli fl-ilma. F'każijiet li fihom tista' tiġi pprovduta evidenza fuq in-nuqqas ta' applikabbiltà tal-metodu ta' ttestjar għal kategorija speċifika ta' sustanzi, il-metodu ta' ttestjar ma għandux jintuża għal dik il-kategorija speċifika ta' sustanzi. Barra minn hekk, dan il-metodu ta' ttestjar hu preżunt bħala applikabbli għal taħlitiet bħala estensjoni tal-applikabbiltà tiegħu għas-sustanzi. Madankollu, minhabba l-fatt li t-taħlitiet ikopru spettru mifrux ta' kategoriji u ta' kompożizzjoni, u li bħalissa hemm disponibbli biss informazzjoni limitata dwar l-ittestjar tat-taħlitiet, f'każijiet li fihom tkun tista' tintwera evidenza fuq in-nuqqas ta' applikabbiltà tal-metodu ta' ttestjar għal kategorija speċifika ta' taħlitiet (eż. skont strategika kif proposta minn Eskes *et al.*, 2012) (18), il-metodu ta' ttestjar ma għandux jintuża għal dik il-kategorija speċifika ta' taħlitiet. Qabel ma jintuża l-metodu ta' ttestjar fuq taħlita għall-ġenerazzjoni ta' *data* għal skop regolatorju maħsub, għandu jiġi kkunsidrat jekk jistax jipprovdri riżultati adegwati għal dak l-għan u, jekk iva, għaliex. Dawn il-kunsiderazzjonijiet mhumieq meħtieġa meta jkun hemm rekwiżit regolatorju għall-ittestjar tat-taħlita. Il-gassijiet u l-aerosols għadhom ma ġewx ivvalutati fi studji ta' validazzjoni (8) (9). Filwaqt li hu konċepibbli li dawn jistgħu jiġu ttestjati billi jintuża l-metodu ta' ttestjar TER, il-metodu ta' ttestjar attwali ma jippermettix l-ittestjar ta' gassijiet u ta' aerosols.

## PRINĊIPJU TAT-TEST

10. Is-sustanza kimika tat-test hi applikata għal mhux aktar minn 24 siegħa fuq l-uċuħ epidermiċi ta' diski ta' ġilda f sistema tat-test b'żewġ kompartimenti fejn id-diski tal-ġilda jaħdmu bħala s-separazzjoni bejn il-kompartimenti. Id-diski tal-ġilda jittiehdu minn firien maqtula b'mod uman ta' età ta' 28-30 jum. Is-sustanzi kimiċi korriżivi huma identifikati mill-abbiltà tagħhom li jipproduċu telf ta' integrità normali ta' *stratum corneum* u tal-funzjoni ta' barrjera, li jitkejjel bħala tnaqqis fit-TER 'l isfel minn livell ta' limitu (16) (ara l-paragrafu 32). Għat-TER tal-ġilda tal-firien, intgħażel valur ta' limitu ta' 5kΩ ibbażat fuq *data* estensiva għal varjetà kbira ta' sustanzi fejn il-maġġoranza l-kbira ta' valuri kienu jew sew aktar 'il fuq (spiss > 10 kΩ), jew sew aktar 'l isfel (spiss < 3 kΩ) minn dan il-valur (16). B'mod ġenerali, is-sustanzi kimiċi tat-test li mhumieq korrużivi fl-annimali iżda li huma irritanti jew mhux irritanti ma jnaqqasux it-

TER inqas minn dan il-valur ta' limitu. Barra minn hekk, l-użu ta' preparati ta' ġilda oħrajn jew tagħmir ieħor jista' jibdel il-valur ta' limitu, li jeħtieġ aktar validazzjoni.

11. Hu inkorporat fil-proċedura tat-test pass li jorbot iż-żebgħa sabiex isir it-test ta' konferma tar-riżultati pozittivi fit-TER inklużi valuri madwar 5 kΩ. Il-pass li jorbot iż-żebgħa jiddetermina jekk iż-żjieda fil permeabbiltà ionika hijiex minhabba qerda fiżika tal-*istratum corneum*. Il-metodu TER tal-ġilda tal-firien wera li jista' jibassar il-korrużività *in vivo* fil-fenek ivvalutat taħt it-TM B.4 (2).

## WIRI TAL-PROFIĊJENZA

12. Qabel l-użu ta' rutina tal-metodu ta' ttestjar TER tal-ġilda tal-firien li jaderixxi ma' dan il-metodu ta' ttestjar, il-laboratorji għandhom juru profiċjenza teknika billi jikklassifikaw kif suppost tmax-il Sustanza ta' Profiċjenza rakkomandati fit-Tabella 1. F'sitwazzjonijiet li fihom sustanza elenkata ma tkunx disponibbli jew, fejn ġustifikabbli, tista' tintuża sustanza oħra li għaliha jkun hemm *data* ta' riferiment adegwata *in vivo* u *in vitro* (eż. mil-lista ta' sustanzi kimiċi ta' riferiment (16)) dment li ma jiġux applikati l-istess kriterji tal-ghazla bhal daww deskritti fit-Tabella 1.

**Tabella 1:** Lista ta' Sustanzi ta' Profiċjenza<sup>1</sup>

| Sustanza                                 | CASRN      | Klassi Kimika <sup>2</sup> | GHS tan-NU/CLP Kat. Ibbażata fuq Riżultati <i>In Vivo</i> <sup>3</sup> | VRM Kat. Ibbażata fuq Riżultati <i>In Vitro</i> | Stat Fiżiku | pH <sup>4</sup> |
|------------------------------------------|------------|----------------------------|------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------|-----------------|
| <b>Korrużivi <i>In Vivo</i></b>          |            |                            |                                                                        |                                                 |             |                 |
| N,N'-Dimetil dipropilentrjammjina        | 10563-29-8 | bazi organika              | 1A                                                                     | 6 x C                                           | L           | 8,3             |
| 1,2-Diamminopropan                       | 78-90-0    | bazi organika              | 1A                                                                     | 6 x C                                           | L           | 8,3             |
| Aċidu sulfuriku (10 %)                   | 7664-93-9  | aċidu inorganiku           | (1A)/1B/1C                                                             | 5 x C<br>1x NC                                  | L           | 1,2             |
| Idrossidu tal-potassju (10 % soluzzjoni) | 1310-58-3  | bazi inorganika            | (1A)/1B/1C                                                             | 6 x C                                           | L           | 13,2            |
| Aċidu ottanojku (Kapriliċu)              | 124-07-2   | aċidu organiku             | 1B/1C                                                                  | 4 x C<br>2 x NC                                 | L           | 3,6             |
| 2-terz-Butilfenol                        | 88-18-6    | fenol                      | 1B/1C                                                                  | 4 x C<br>2 x NC                                 | L           | 3,9             |
| <b>Non korrużivi <i>in vivo</i></b>      |            |                            |                                                                        |                                                 |             |                 |
| Aċidu isosteariku                        | 2724-58-5  | aċidu organiku             | NC                                                                     | 6 x NC                                          | L           | 3,6             |
| 4-Ammino-1,2,4-triazol                   | 584-13-4   | bazi organika              | NC                                                                     | 6 x NC                                          | S           | 5,5             |

| Sustanza                 | CASRN     | Klassi Kimika <sup>2</sup> | GHS tan-NU/CLP Kat. Ibbazata fuq Riżultati <i>In Vivo</i> <sup>3</sup> | VRM Kat. Ibbazata fuq Riżultati <i>In Vitro</i> | Stat Fiziku | pH <sup>4</sup> |
|--------------------------|-----------|----------------------------|------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------|-----------------|
| Fenetil bromur           | 103-63-9  | elettrofil                 | NC                                                                     | 6 x NC                                          | L           | 3,6             |
| 4-(Metiltjo)-benzaldehyd | 3446-89-7 | elettrofil                 | NC                                                                     | 6 x NC                                          | L           | 6,8             |
| 1,9-Dekadjen             | 1647-16-1 | organiku newtrali          | NC                                                                     | 6 x NC                                          | L           | 3,9             |
| Tetrakloroetilen         | 127-18-4  | organiku newtrali          | NC                                                                     | 6 x NC                                          | L           | 4,5             |

Abbrevjazzjonijiet: aq = soluzzjoni milwiema; CASRN = Numru tar-Reġistru tas-Servizz tat-Taqsiriet tas-Sustanzi Kimiċi; VRM = Metodu ta' Referenza Validat; ND = Mhux Determinat.

<sup>1</sup>Is-sustanzi ta' profiċjenza, imqassma l-ewwel skont il-korrużivi kontra dawk mhux korrużivi, imbagħad skont is-subkategorija tal-korrużivi u mbagħad skont il-klassi kimika, intgħazlu mis-sustanzi użati fl-istudju ta' validazzjoni tal-ECVAM tal-metodu ta' ttestjar TER tal-ġilda tal-firien (8) (9). Sakemm ma jkunx indikat mod ieħor, is-sustanzi ġew ittestjati fil-livell ta' purità miksub meta ntraw minn sors kummerċjali (8). L-għażla, sa fejn possibbli, inkludiet sustanzi li: (i) huma rappreżentattivi tal-firxa ta' risponsi tal-korrużività (eż. nonkorrużivi; korrużivi dgħajfa sa b'saħħithom) li l-VRM kapaċi jkejje l-jew ibassar; (ii) huma rappreżentattivi tal-klassijiet kimiċi użati fl-istudju ta' validazzjoni; (iii) jirriflettu l-karatteristiċi tal-prestazzjoni tal-VRM; (iv) għandhom strutturi kimiċi li huma definiti sew; (v) jinduċu riżultati definitivi fil-metodu ta' ttestjar ta' riferiment *in vivo*; (vi) huma kummerċjalment disponibbli; u (vii) mhumiex assoċjati ma' spejjeż projbittivi tar-rimi.

<sup>2</sup>Il-klassi kimika assenjata minn Barratt *et al.* (8).

<sup>3</sup>Il-gruppi ta' Imballaġġ korrispondenti tan-NU huma I, II u III, rispettivament, għall-kategoriji 1A, 1B u 1C tal-GHS tan-NU/tas-CLP.

<sup>4</sup>Il-valuri tal-pH inkisbu minn Fentem *et al.* (9) u minn Barratt *et al.* (8).

## PROCEDURA

13. Il-Proċeduri Operatorji Standard (SOP) għall-metodu ta' ttestjar tal-korrużjoni tal-ġilda TER tal-ġilda tal-firien huma disponibbli (19). Il-metodu ta' ttestjar TER tal-ġilda tal-firien koperti minn dan il-metodu ta' ttestjar għandhom jikkonformaw mal-kundizzjonijiet li ġejjin:

### Annimali

14. Il-firien għandhom jintużaw għaliex is-sensittività tal-ġilda tagħhom għal sustanzi f'dan il-metodu ta' ttestjar intweriet fl-imġhoddi (12) u huma l-uniku sors ta' ġilda li ġie validat b'mod formali (8) (9). L-età (meta tingabar il-ġilda) u l-ispeċi tal-far huma partikolarment importanti biex jiġi żgurat li l-follikoli tax-xahar fil-fażi dormanti qabel ma jibda t-tkabbir tax-xahar adult.
15. Ix-xahar dorsali u tal-ġenb minn firien żgħar, ta' età ta' madwar 22 jum (derivati minn Wistar jew fergħa komparabbli), jitneħħa bir-reqqa b'qattiegħ ix-xahar żgħir. Imbagħad l-annimali jiġu maħsula billi jintmashu bl-attenzjoni, filwaqt li l-parti bix-xagħar maqtugħ tiġi mgħarrqa f'taħlita antibijotika (li pereżempju, li jkun fiha streptomycin, penicillin, kloramfenikol, u

amfoteriċina, f konċentrazzjonijiet li huma effettivi biex jinibixxu t-tkabbir tal-batterji). L-annimali jerggħu jiġu maħsula bl-anitibjotiċi fit-tielet jew ir-raba' jum wara l-ewwel hasla u jintużaw fi żmien tlitt ijiem wara t-tieni hasla, meta l-*istratum corneum* ikun irkupra mit-tneħħija tax-xahar.

## Il-preparazzjoni tad-diski tal-ġilda

16. L-annimali jinqatlu umanament meta jagħlqu 28-30 jum; din l-età hi kritika. Il-ġilda dorso-laterali ta' kull annimal imbagħad titneħħa u jinqatgħalha x-xaħam subkutanju eċċess billi titqaxxar bil-galbu mill-ġilda. Id-diski tal-ġilda, b'djometru ta' madwar 20 mm kull wiehed, jitneħħew. Il-ġilda tista' tiġi maħżuna qabel ma jintużaw id-diski fejn jidher li d-*data* tal-kontroll pożittiv u negattiv tkun ekwivalenti għal dik miksuba b'ġilda friska.
17. Kull disk tal-ġilda jitqiegħed fuq wiehed mit-truf ta' tubu PTFE (politetrafluworoetilen), li jiżgura li l-wiċċ epidermiku hu f'kuntatt mat-tubu. Ċirku "O" tal-gomma jitwagħhal billi jingħafas mat-tarf tat-tubu biex il-ġilda tinżamm f'potha u t-tessut żejjed jiġi maqtuġħ. Iċ-ċirku "O" tal-ġilda imbagħad jiġi ssiġġillat bir-reqqa mat-tarf tat-tubu PTFE bl-ingwent. It-tubu hu appoġġjat minn molla ġewwa parti reċettorja li fiha tahlita ta'  $\text{MgSO}_4$  (154 mM) (Figura 1). Id-disk tal-ġilda għandha tiġi għal kollhox meqruda fit-tahlita ta'  $\text{MgSO}_4$ . Minn ġilda ta' far wiehed jistgħu jinkisbu daqs 10 – 15-il disk tal-ġilda. Id-dimensjonijiet tat-tubu u taċ-ċirku "O" jintwerew fil-Figura 2.
18. Qabel ma jibda l-ittestjar, it-TER taż-żewġ diski tal-ġilda jitkejlu bħala proċedura ta' kontroll tal-kwalità għal kull ġilda tal-annimal. Iż-żewġ diski għandhom jagħtu valuri ta' rezistenza elettrika akbar minn 10 k $\Omega$  biex jintużaw il-bqija tad-diski għall-metodu ta' ttestjar. Jekk il-valur tar-reżistenza huwa inqas minn 10 k $\Omega$ , il-bqija tad-diski minn dik il-ġilda għandha tintrema.

## Applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test u tas-sustanzi tal-kontroll

19. Għandhom jintużaw kontrolli konkorrenti pożittivi u negattivi għal kull sessjoni (esperiment) biex tiġi żgurata l-hidma xierqa tal-mudell sperimentali. Id-diski tal-ġilda minn annimal wiehed għandhom jintużaw f'kull sessjoni (esperiment). Is-sustanzi kimiċi tat-test tal-kontroll pożittiv jew negattiv sugġeriti huma 10M aċidu idrokloriku u ilma ddistillat, rispettivament.
20. Is-sustanzi kimiċi tat-test likwidi (150  $\mu\text{L}$ ) huma applikati b'mod uniformi mal-wiċċ epidermiku ġewwa t-tubu. Meta jiġu ttestjati materjali solidi, hu applikat ammont biżżejjed ta' solidu b'mod livell fuq id-disk biex jiġi żgurat li l-wiċċ kollu tal-epidermis hu kopert. Jiżdied l-ilma deionizzat (150  $\mu\text{L}$ ) fuq is-solidu u t-tubu jiġi aġitat bil-mod. Biex jinkiseb il-kuntatt massimu mal-ġilda, is-solidi jistgħu jkunu jridu jissahħnu sa 30<sup>0</sup> C biex tinhall jew tiġi mrattba s-sustanza kimika tat-test, jew mithuna biex jipproduċu materjal granurali jew terra.

21. Jintużaw tliet diski tal-ġilda għal kull sustanza kimika tat-test u tal-kontroll f'kull sessjoni ta' ttestjar (esperiment). Is-sustanzi kimiċi tat-test jiġu applikati għal 24 siegħa f'20-23<sup>0</sup> C. Is-sustanza kimika tat-test titneħħa bil-ħasil b'ġett ta' ilma tal-vit f'temperatura li tasal sa dik ambjentali sakemm ma jifdal ebda materjal ieħor li jista' jitneħħa.

## II-kejl tat-TER

22. L-impedenza tal-ġilda titkejjel bħala TER bl-użu ta' Wheatstone bridge b'vultaġġ baxx u kurrent alternanti (18). L-ispeċifikazzjonijiet ġenerali tal-bridge huma vultaġġ operattiv ta' 1-3 Volt, kurrent sinus jew rettangolari alternat ta' 50 - 1000 Hz, u firxa tal-kejl ta' mhux anqas minn 0,1 – 30 kΩ. Id-databridge użat fl-istudju tal-validazzjoni kejjel l-induttanza, il-kapaċitanza u r-reżistenza sa valuri ta' 2000H, 2000 μF, u 2 MΩ, rispettivament bi frekwenzi ta' 100Hz jew 1kHz, bl-użu ta' valuri serje jew paralleli. Għal-ghanijiet tal-korrożività tat-TER il-kejl tal-figura hu rrekordjat f'reżistenza, bi frekwenzi ta' 100 Hz u bl-użu ta' valuri serje. Qabel ma titkejjel ir-reżistenza elettrika, it-tensjoni tal-wiċċ tal-ġilda titnaqqas billi jiżdied volum suffiċjenti ta' etanol 70 % biex ikopri l-epidermis. Wara ftit sekondi, l-ethanol jitneħħa mit-tubu u mbagħad t-tessut jiġi idratat billi tiżdied soluzzjoni ta' 3 ml MgSO<sub>4</sub> (154mM). L-elettrodi tad-databridge jitqieghdu fuq kull naħa tad-disk tal-ġilda biex titkejjel ir-reżistenza f'kΩ/disk tal-ġilda (Figura 1). Id-dimensjonijiet tal-elettrodi u t-tul tal-elettrodu espost taħt il-klipep tal-kukkudrill jintwerew fil-Figura 2. Il-klipep imqabbdha mal-elettrodu intern titqieghed fuq il-wiċċ tat-tubu PTFE matul il-kejl tar-resistenza, biex ikun żgurat li jiddaħħal tul konsistenti tal-elettrodu fis-soluzzjoni ta' MgSO<sub>4</sub>. L-elettrodu ta' barra jitqieghed ġewwa l-kamra riċeventi biex isserraħ fuq il-qiegh tal-kompartiment. Id-distanza bejn il-molla u l-qiegh tat-tubu PTFE tinżamm kostanti (Figura 2), għaliex din id-distanza taffettwa l-valur ta' reżistenza miksub. Għalhekk, id-distanza bejn l-elettrodu ta' ġewwa u d-disk tal-ġilda għandha tkun kostanti u minimali (1-2 mm).
23. Jekk il-valur tar-reżistenza mkejjel ikun akbar minn 20 kΩ, dan jista' jkun dovut għall-fdalijiet tas-sustanza kimika tat-test li jiksu l-wiċċ epidermiku tad-disk tal-ġilda. Tista' tiġi ppruvata t-tneħħija ulterjuri ta' din il-kisja, pereżempju, billi t-tubu PTFE jiġi ssiġillat bis-saba' kbir b'ingwanta u jithawwad għal madwar 10 sekondi; is-soluzzjoni ta' MgSO<sub>4</sub> tintrema u jerga' jsir il-kejl tar-reżistenza b' MgSO<sub>4</sub> ġdid.
24. Il-karatteristiċi u d-dimensjonijiet tal-apparat tat-test u l-proċedura tal-esperiment użati jistgħu jinfluwenzaw il-valuri tat-TER miksuba. Il-limitu korrożiv ta' 5 kΩ ġie żviluppat mid-data miksuba fl-apparat u fil-proċedura speċifiċi użati f'dan il-metodu ta' ttestjar. Jistgħu jgħoddu valuri differenti tal-limitu u tal-kontroll jekk jinbidlu l-kundizzjonijiet tat-test jew jintuza apparat differenti. Għalhekk, hu meħtieġ li jiġu kkalibrati l-metodoloġija u l-valuri tal-limiti tar-reżistenza bl-ittestjar ta' serje ta' Sustanzi ta' Profiċjenza magħżula mis-sustanzi fl-istudju tal-validazzjoni (8) (9), jew minn klassijiet tas-sustanzi kimiċi li jkunu simili għas-sustanzi li jkunu qed jiġu investigati. Sett ta' Sustanzi ta' Profiċjenza xierqa hu identifikat fit-Tabella 1.

## Metodi ta' Fissazzjoni tal-Kulurant

25. L-esponiment ta' xi materjali mhux korrużivi jista' jirriżulta fi tnaqqis tar-reżistenza 'l isfel mil-limitu ta' 5 kΩ li jippermetti l-mogħdija ta' joni mill-*istratum corneum*, u b'hekk titnaqqas ir-reżistenza elettrika (9). Pereżempju, l-organiċi newtri u s-sustanzi li għandhom karatteristiċi tensjoattivi (inklużi deterġenti, emulsifikanti u tensjoattivi oħrajn) jistgħu jneħħu l-lipidi tal-ġilda b'tali mod li jagħmlu l-barriera aktar permeabbli għall-ioni. Għalhekk, jekk il-valuri TER prodotti mit-tali sustanzi kimiċi jkun qas minn jew madwar 5 kΩ fin-nuqqas ta' dannu viżwalment perċettibbli tad-diski tal-ġilda, tista' ssir valutazzjoni tal-penetrazzjoni tal-kulurant fuq it-tessuti tal-kontroll u daww trattati biex jiġi determinat jekk il-valuri tat-TER miksuba kinix ir-riżultat tal-permeabbiltà akbar tal-ġilda, jew tal-korrużjoni tal-ġilda (7) (9). Fil-każ tal-aħħar fejn jinqasam l-*istratum corneum*, il-kulurant sulforodammina B, meta applikat mas-superfiċje tal-ġilda, jippenetra malajr u jtebba' t-tessut ta' taħt. Dan il-kulurant partikolari hu stabbli għal varjetà kbira ta' sustanzi u mhuwiex affettwat mill-proċedura tal-estrazzjoni deskritta hawn taħt.

## Applikazzjoni u Tnehhija tal-kulurant Sulforodammina B

26. Wara l-valutazzjoni tat-TER, is-sulfat tal-manjeżju jintrema mit-tubu u l-ġilda tiġi eżaminata bir-reqqa għal dannu ovvj. Jekk ma jkun hemm ebda dannu maġġuri ovvj (eż. perforazzjoni), 150 µl ta' dilwizzjoni ta' 10 % (w/v) fl-ilma distillat tal-kulurant sulforodammina B (Aħmar Aċidu 52; C.I. 45100; Numru CAS 3520-42-1), tiġi applikata għall-wiċċ epidermiku ta' kull disk tal-ġilda għal sagħtejn. Dawn id-diski tal-ġilda mbagħad jinħaslu bl-ilma tal-vit sa temperatura ambjentali għal madwar 10 sekondi biex jitneħħa l-kulurant eċċessiv/mhux użat. Kull disk tal-ġilda mbagħad jitneħħa bl-attenzjoni mit-tubu PTFE u jitqiegħed f'kunjett (eż. flixxun tal-ħġieġ tax-xintillazzjoni ta' 20 ml) li jkun fih ilma dejonizzat (8 ml). Il-flixxun jigu aġitati bil-mod għal ħames minuti biex jitneħħa kulurant żejjed mhux użat. Din il-proċedura ta' tlaħħil imbagħad tiġi ripetuta, u wara dan jitneħħew id-diski tal-ġilda u jitqiegħdu fi flixxun li fihom 5ml ta' 30 % (w/v) dodeċilsulfat tas-sodju (SDS) fl-ilma distillat u jigu inkubati mal-lejl f'temperatura ta' 60°C.

27. Wara l-inkubazzjoni, kull disk tal-ġilda jitneħħa u jintrema u l-bqija tas-soluzzjoni tiġi ċċentrifugata għal tmien minuti f'temperatura ta' 21°C (forza relattiva ċentrifugali ~175 x g). Kampjun ta' 1ml tas-supernatant jiġi dilwit 1 f'5 (v/v) [jiġifieri 1ml + 4ml] ma' 30 % (w/v) SDS fl-ilma ddistillat. Id-densità ottika (OD) tas-soluzzjoni titkejjel f'565 nm.

## Il-kalkolu tal-kontenut tal-kulurant

28. Il-kontenut tal-kulurant sulforodammina B għal kull disk jiġi kkalkolat mill-valuri OD (9) (koeffiċjent ta' estinzjoni molari tal-kulurant sulforodammina B ta' 565nm =  $8,7 \times 10^4$ ; piż molekulari = 580). Il-kontenut tal-kulurant jiġi determinat għal kull disk tal-ġilda bl-użu ta' kurva xierqa tal-kalibrizzjoni u l-kontenut medju tal-kulurant imbagħad jiġi kkalkolat għar-repliki.

### Kriterji ta' Aċċettabbiltà

29. Ir-rizultati medji tat-TER huma aċċettati jekk il-valuri tal-kontroll pożittiv u negattiv konkorrenti jaqgħu fl-iskali aċċettabbli għall-metodi fil-laboratorju tat-test. L-iskali aċċettabbli tar-reżistenza għall-metodoloġija u l-apparat deskritti hawn fuq jingħataw f'din it-tabella li ġejja:

| Kontroll | Sustanza              | Medda ta' reżistenza (kΩ) |
|----------|-----------------------|---------------------------|
| Pożittiv | 10M Aċidu idrokloriku | 0,5 - 1,0                 |
| Negattiv | Ilma distillat        | 10 - 25                   |

30. Ir-rizultati medji tal-fissazzjoni tal-kulurant jiġu aċċettati b'kundizzjoni li l-valuri konkorrenti tal-kontroll jaqgħu fil-meded aċċettabbli għall-metodu. Meded aċċettabbli sugġeriti tal-kontenut tal-kulurant għas-sustanzi tal-kontroll għall-metodoloġija u għall-apparat deskritti hawn fuq jingħataw fit-tabella li ġejja:

| Kontroll | Sustanza              | Medda ta' kontenut tal-kulurant (µg/disk) |
|----------|-----------------------|-------------------------------------------|
| Pożittiv | 10M Aċidu idrokloriku | 40 - 100                                  |
| Negattiv | Ilma distillat        | 15 - 35                                   |

### Interpretazzjoni tar-rizultati

31. Il-valur ta' limitu TER li jiddistingwi sustanzi kimiċi tat-test korrużivi minn dawk mhux korrużivi ġie stabbilit matul l-ottimizzazzjoni tal-metodu ta' ttestjar, ittestjat matul fażi ta' prevalidazzjoni, u kkonfermat fi studju ta' validazzjoni formali.

32. Il-mudell ta' tbassir għall-metodu ta' ttestjar tal-korrużjoni tal-ġilda TER tal-ġilda tal-firien (9) (19), assoċjat mas-sistema ta' klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU/tas-CLP, hu pprovdut hawn taht:

Is-sustanza kimika tat-test titqies li mhix korrużiva għall-ġilda:

- i) jekk il-valur TER medju miksub għas-sustanza kimika tat-test ikun akbar minn ( $>$ ) 5kΩ, jew
- ii) il-valur TER medju miksub għas-sustanza kimika tat-test ikun anqas jew daqs ( $\leq$ ) 5kΩ, u
- id-diski tal-ġilda ma juru ebda dannu ovvjw (eż. perforazzjoni), u
- il-kontenut medju ta' kulurant tad-disk jkun anqas ( $<$ ) mill-kontenut medju ta' kulurant tad-disk tal-kontroll pożittiv 10M Hcl miksub b'mod konkorrenti (ara l-paragrafu 30 għall-valuri tal-kontroll pożittiv).

Is-sustanza kimika tat-test titqies li hi korrużiva għall-ġilda:

- i) jekk il-valur TER medju miksub għas-sustanza kimika tat-test ikun anqas minn jew daqs ( $\leq$ ) 5 kΩ u d-diski tal-ġilda jkollhom dannu ovvjw (eż. perforati), jew
- ii) il-valur TER medju miksub għas-sustanza kimika tat-test ikun anqas jew daqs ( $\leq$ ) 5kΩ, u



- id-diski tal-ġilda ma juru ebda dannu ovvjw (eż. perforazzjoni), iżda
  - il-kontenut medju ta' kulurant tad-disk jkun akbar (>) mill-kontenut medju ta' kulurant tad-disk tal-kontroll pozittiv 10M Hcl miksub b'mod konkorrenti (ara l-paragrafu 30 għall-valuri tal-kontroll pozittiv).
33. Sessjoni ta' ttestjar (esperiment) magħmula minn tal-anqas tliet diski tal-ġilda rreplikati għandha tkun biżżejjed għal sustanza kimika tat-test meta l-klassifikazzjoni tkun inekwivokabbli. Madankollu, f'każijiet ta' riżultati li joqorbu hafna lejn il-limitu, bħal pereżempju kejl irreplikat mhux konkordanti u/jew TER medja daqs  $5 \pm 0,5$  kΩ, għandha tiġi kkunsidrata t-tieni sessjoni ta' ttestjar indipendenti (esperiment), kif ukoll it-tielet waħda f'każ ta' riżultati mhux konkordanti bejn l-ewwel żewġ sessjonijiet ta' ttestjar (esperimenti).

## DATA U RAPPORTAR

### Data

34. Il-valuri tar-reżistenza (kΩ) u l-valuri tal-kontenut tal-kulurant (μg/disk), fejn xieraq, għas-sustanza kimika tat-test, kif ukoll għall-kontrolli pozittivi u negattivi għandhom jiġu rrapportati f'forma tabulari, inkluża d-data għal kull disk rreplikat individwali f'kull sessjoni ta' ttestjar (esperiment) u l-valuri medji  $\pm$  SD. L-esperimenti ripetuti kollha għandhom jiġu rrapportati. Id-dannu osservat fid-diski tal-ġilda għandu jiġi rrapportat għal kull sustanza kimika tat-test.

### Rapport tat-test

35. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

#### *Sustanza Kimika tat-Test u Sustanzi tal-Kontroll:*

- Sustanza monokostitwenti: l-identifikazzjoni kimika, bħall-isem IUPAC jew CAS, in-numru CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ;
- Sustanza multikostitwenti, UVCB u tahlita: ikkaratterizzati sa fejn possibbli mill-identità kimika (ara aktar 'il fuq), l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti;
- Id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma, u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali;
- Is-sors, in-numru tal-lott jekk disponibbli;
- It-trattament tas-sustanza kimika tat-test/tas-sustanza tal-kontroll qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (eż., it-tishin, it-thin);

- L-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test, id-data ta' limitu għall-użu, jew id-data għall-analiżi mill-ġdid, jekk magħrufa;
- Il-kundizzjonijiet tal-ħżin.

*Annimali tat-Test:*

- Razza u sess użati;
- L-età tal-annimali meta użati bħala annimali donaturi;
- Is-sors, il-kundizzjoni tal-abitazzjoni, id-dieta, eċċ.;
- Id-dettalji tal-preparazzjoni tal-ġilda.

*Kundizzjonijiet tat-Test:*

- Il-kurvi tal-kalibrazzjoni għall-apparat tat-test;
- Il-kurvi tal-kalibrazzjoni għat-twettiq tat-test tal-fissazzjoni tal-kulurant, il-band pass użat għall-kejl tal-valuri tal-OD, u l-medda tal-linearità tal-OD tal-apparat tal-kejl (eż. spettrofotometru), jekk xieraq;
- Id-dettalji tal-proċedura tat-test użata biex titkejjel it-TER;
- Dettalji tal-proċedura tat-test użata għall-valutazzjoni tal-fissazzjoni tal-kulurant, jekk xieraq;
- Id-dożi tat-test użati, id-durata tal-perjodu/i tal-esponiment u t-temperatura/i tal-esponiment;
- Dettalji dwar il-proċedura tal-ħasil użata wara l-perjodu tal-esponiment;
- In-numru ta' diski tal-ġilda rreplikati użati għal kull sustanza kimika tat-test u kontroll (kontroll pożittiv u negattiv);
- Deskrizzjoni ta' kwalunkwe modifika tal-proċedura tat-test;
- Referenza għad-*data* storika tal-mudell. Din għandha tinkludi, iżda ma għandhiex tkun limitata għal:
  - i) Accettabbiltà tal-valuri TER tal-kontrolli pożittivi u negattivi ( $f^{\circ}k\Omega$ ) b'referenza għall-medied tar-reżistenza tal-kontrolli pożittivi u negattivi
  - ii) Accettabbiltà tal-valuri tal-kontenut tal-kulurant tal-kontrolli pożittivi u negattivi ( $f^{\circ}\mu g/disk$ ) b'referenza għall-medied tal-kontenut tal-kulurant tal-kontrolli pożittivi u negattivi
  - iii) Accettabbiltà tar-riżultati tat-test b'referenza għall-varjabbiltà storika bejn ir-repliki tad-diski tal-ġilda
- Deskrizzjoni tal-kriterji ta' deċiżjoni/tal-mudell ta' tbassir applikati.

*Ir-riżultati:*

- Tabulazzjoni tad-*data* mill-assaġġi tat-TER u tal-fissazzjoni tal-kulurant (jekk xieraq) għal sustanzi kimiċi tat-test u għal kontrolli individwali, għal kull sessjoni ta' ttestjar (esperiment) u għal kull replika tad-diski tal-ġilda (annimali individwali u kampjuni tal-ġilda individwali), medji, SDs u CVs;
- Deskrizzjoni ta' kwalunkwe effett osservat;
- Il-klassifikazzjoni derivata b'referenza għall-mudell ta' tbassir/għall-kriterji tad-deċiżjoni użati.

*Diskussjoni tar-riżultati**Konklużjonijiet*

## DOKUMENTAZZJONI

- (1) In-Nazzjonijiet Uniti (NU) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, UN New York u Ġinevra, 2013. Disponibbli fuq: [[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) Il-Kapitolu B.4 ta' dan l-Anness, Irritazzjoni, Korrużjoni Akuta tal-Ġilda.
- (3) Il-Kapitolu B.40bis ta' dan l-Anness, Mudell tal-Ġilda *In Vitro*.
- (4) Il-Kapitolu B.65 ta' dan l-Anness, Metodu ta' Ttestjar tal-Barriera tal-Membrana *In Vitro*.
- (5) Il-Kapitolu B.46 ta' dan l-Anness, Irritazzjoni tal-Ġilda *In Vitro*: Metodu ta' Ttestjar tal-Epidermis Uman Rikostitwit.
- (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), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.
- (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., u 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., u 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., u 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., u 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. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.
- (12) EC-ECVAM (1998). Dikjarazzjoni dwar il-Validità Xjentifika tat-Test ta' Reżistenza Elettrika Transkuntanja tal-Ġilda tal-Firien (TER) (Test *In Vitro* għall-Korrużività tal-Ġilda), Maħruġa mill-Kumitat Konsultattiv Xjentifiku tal-ECVAM (ESAC10), 3 ta' 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. 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. Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.
  - (16) Oliver G.J.A., Pemberton M.A., u 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., u 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. u 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 (Dicembru 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), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

**FIGURA 1: APPARAT GHALL-ASSAĠĠ TAT-TER TAL-ĠILDA TAL-FIRIEN**

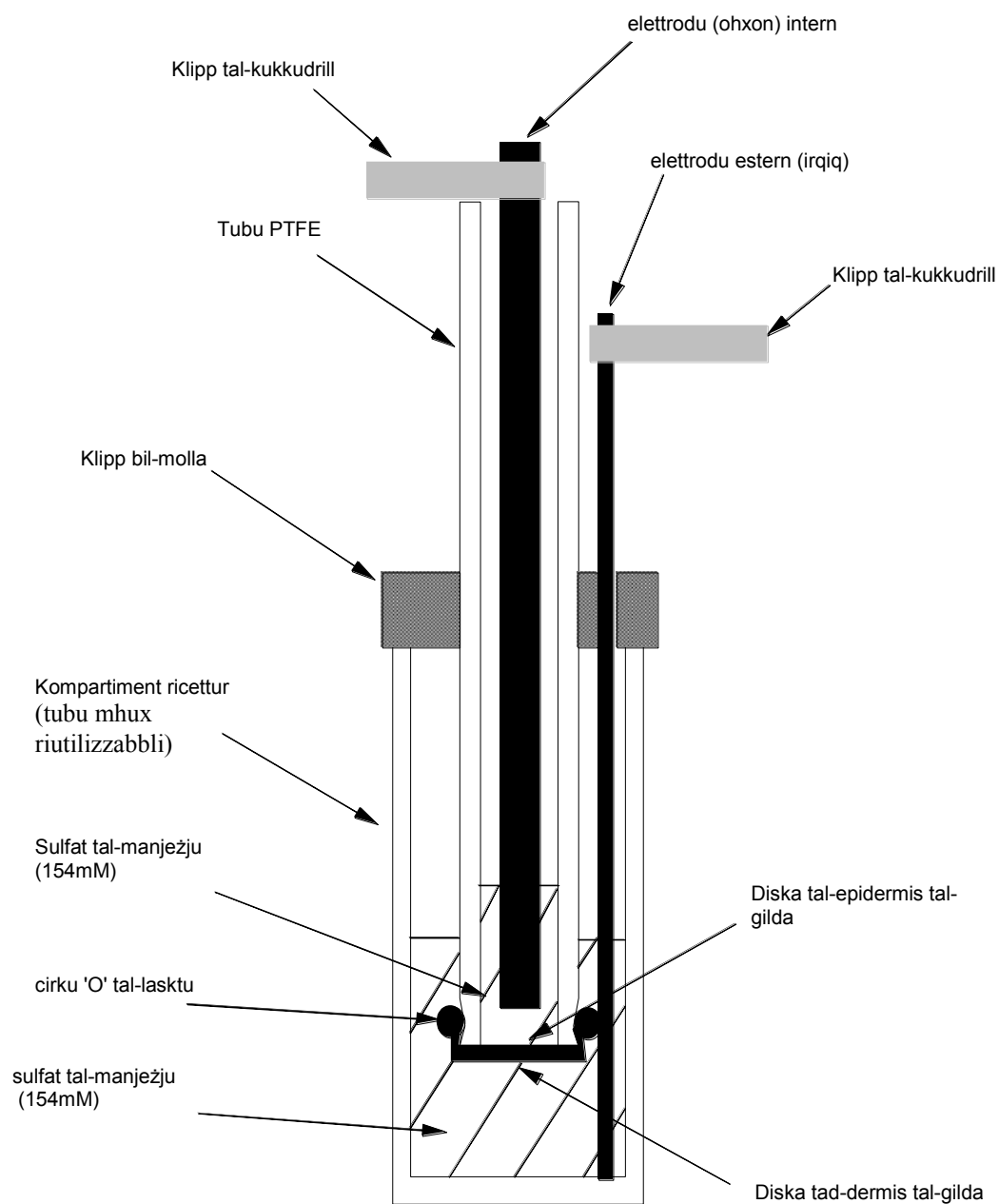
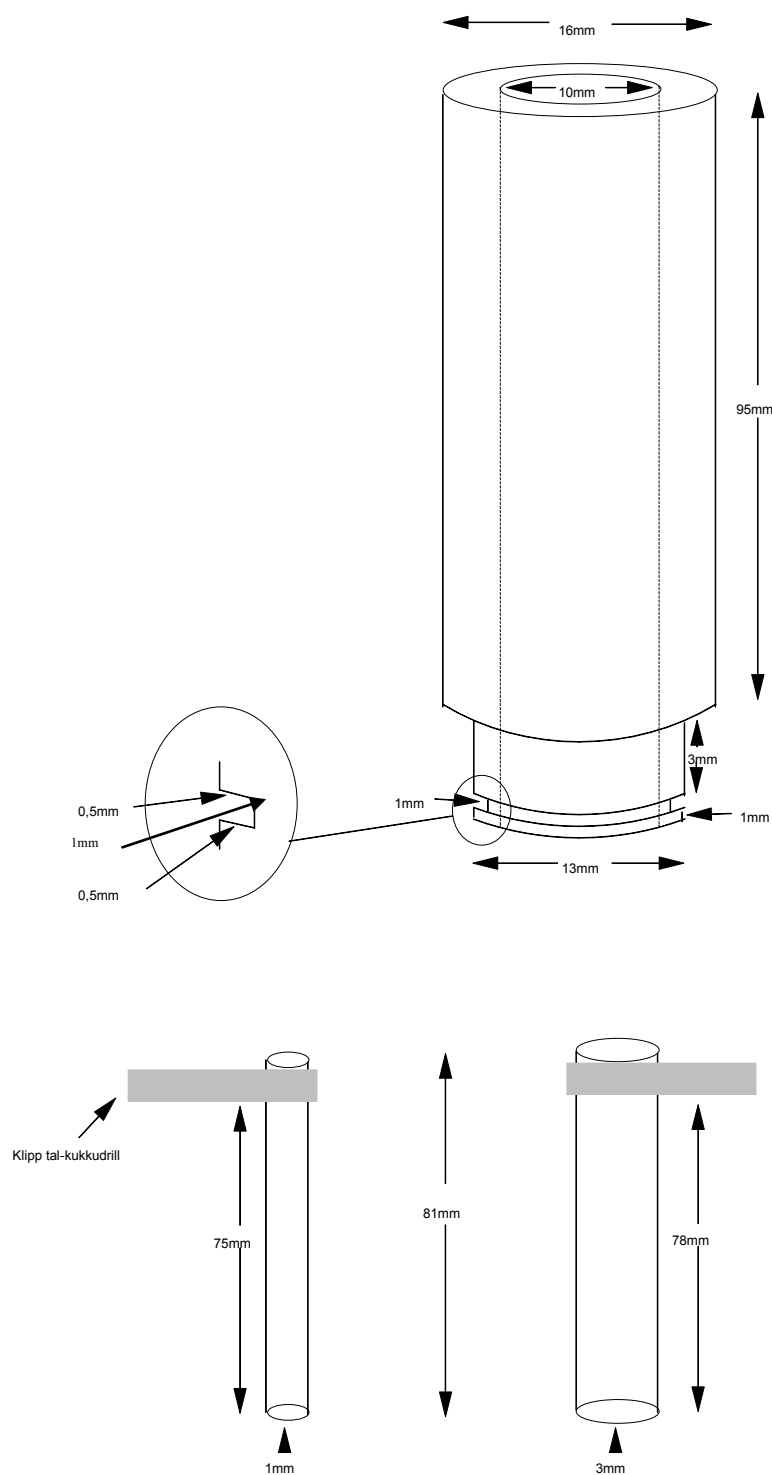


**FIGURA 2: DIMENSIJONIJET TAL-TUBU TAL-POLITETRAFLUWOROETILEN (PTFE) U T-TUBI REĊETTORJI U L-ELETTRODI UŻATI**



**Il-fatturi kritiċi tal-apparat muri fuq:**

- Id-djamentru ġewwieni tat-tubu tal-PTFE,
- It-tul tal-elettrodi relattivi għat-tubu tal-PTFE u t-tubu reċettorju, b'tali mod li d-disk tal-ġilda ma għandux jintmess mill-elettrodi u li tul standard tal-elettrodu hu f'kuntatt mas-soluzzjoni  $\text{MgSO}_4$ ;
- L-ammont tas-soluzzjoni  $\text{MgSO}_4$  fit-tubu reċettorju għandu jagħti fond ta' likwidu, relattiv għal-livell fit-tubu tal-PTFE, kif muri fil-Figura 1,
- Id-disk tal-ġilda għandu jitwāħħal tajjeb biżżejjed mat-tubu tal-PTFE, b'tali mod li r-reżistenza elettrika tkun kejl veru tal-karatteristiċi tal-ġilda.



## Appendiċi

### DEFINIZZJONIJIET

**Akkuratezza:** Il-qrubija fil-livell ta' qbil bejn ir-rizultati tal-metodu ta' ttestjar u l-valuri referenzjarji aċċettati. Hi kejl tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar u wiehed mill-aspetti ta' rilevanza. Spiss it-terminu jintuża b'mod alternanti ma' "konkordanza" biex ifisser il-proporzjon ta' rizultati korretti ta' metodu ta' ttestjar (20).

**C:** Korrużiv.

**Sustanza kimika:** Sustanza jew tahlita.

**Konkordanza:** Kejl tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar għal metodi ta' ttestjar li jagħtu riżultat kategoriku, u hu aspett wiehed tar-rilevanza. It-terminu kultant jintuża b'mod interkambjabbli mal-akkuratezza, u hu definit bħala l-proporzjon tas-sustanzi kimiċi kollha ttestjati li jiġu klassifikati kif suppost bħala pożittivi jew negattivi. Il-konkordanza hi ferm dipendenti fuq il-prevalenza tal-pożittivi fit-tipi ta' sustanzi kimiċi tat-test li jkunu qed jiġu eżaminati (20).

**GHS (Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi (NU)):** Sistema li tipproponi l-klassifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi (sustanzi u tahlitiet) skont it-tipi u l-livelli standardizzati ta' perikli fiżiċi, sanitarji u ambjentali, u tindirizza l-elementi ta' komunikazzjoni korrispondenti, bħal pittogrammi, kliem ta' twissija, dikjarazzjonijiet ta' periklu, dikjarazzjonijiet ta' prekawzjoni u skedi ta' *data* dwar is-sikurezza, biex jitwassal tagħrif dwar l-effetti avversi bil-għan li n-nies ikunu protetti (inklużi min iħaddem, il-haddiema, it-trasportaturi, il-konsumaturi u min jintervjeni f'emergenza) u l-ambjent (1).

**IATA:** Approċċ Integrat għall-Ittestjar u għall-Valutazzjoni

**Tahlita:** Tahlita jew soluzzjoni msawra minn żewġ sustanzi jew aktar.

**Sustanza monokostitwenti:** Sustanza, definita mill-kompożizzjoni kwantitattiva tagħha, li fiha kostitwent ewlieni wiehed ikun preżenti għal tal-anqas 80 % (w/w).

**Sustanza multikostitwenti:** Sustanza, definita mill-kompożizzjoni kwantitattiva tagħha, li fiha aktar minn kostitwent ewlieni wiehed ikunu preżenti f'koncentrazzjoni  $\geq 10$  % (w/w) u  $< 80$  % (w/w). Sustanza multikostitwenti hi r-rizultat ta' proċess tal-manifattura. Id-differenza bejn tahlita u sustanza multikostitwenti hi li tahlita tinkiseb bit-thallit ta' żewġ sustanzi jew aktar

mingħajr reazzjoni kimika. Sustanza multikostitwenti hi r-riżultat ta' reazzjoni kimika.

**NC:** Mhux korrużiva.

**OD:** Densità Ottika.

**PC:** Kontroll Pożittiv, replika li jkun fiha l-komponenti kollha ta' sistema tat-test u trattat b'sustanza li jkun magħruf li tikkawża reazzjoni pożittiva. Biex jiġi żgurat li l-varjabbiltà fir-rispons tal-kontroll pożittiv tkun tista' tiġi vvalutata tul iż-żmien, id-daqs tar-rispons pożittiv ma għandux ikun eċċessiv.

**Standards tal-prestazzjoni (PS):** Standards, ibbażati fuq metodu ta' ttestjar validat, li jipprovdu bażi għall-evalwazzjoni tal-komparabbiltà ta' metodu ta' ttestjar propost li hu simili b'mod funzjonali u mekkanistiku. Hemm inkluzi; (i) il-komponenti essenzjali tal-metodi ta' ttestjar; (ii) lista minima ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza magħżula minn fost is-sustanzi kimiċi użati biex tintwera l-prestazzjoni aċċettabbli tal-metodu ta' ttestjar validat; u (iii) il-livelli simili ta' affidabbiltà u ta' akkuratezza, fuq il-bażi ta' dak li nkiseb għall-metodu ta' ttestjar validat, li l-metodu ta' ttestjar propost għandu juri meta evalwat bl-użu tal-lista minima ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza.

**Rilevanza:** Deskrizzjoni tar-relazzjoni tal-metodu ta' ttestjar mal-effett ta' interess u jekk huwiex sinifikanti u utli għal skop partikolari. Din tiddetermina kemm il-metodu ta' ttestjar għandu l-hila jkejjel jew ibassar b'mod korrett l-effett bijoloġiku ta' interess. Ir-rilevanza tinkorpora l-kunsiderazzjoni tal-akkuratezza (konkordanza) ta' metodu ta' ttestjar (20).

**Affidabbiltà:** Kejljiet ta' kemm metodu ta' ttestjar jista' jitwettaq b'mod riproducibbli fil-laboratorji u bejn il-laboratorji tul iż-żmien, meta jitwettaq billi jintuża l-istess protokoll. Din hi vvalutata billi tiġi kkalkolata r-riproducibbiltà fi hdan laboratorju u bejn laboratorju u ieħor (20).

**Sensittività:** Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi pożittivi/attivi kollha li huma klassifikati kif suppost mill-metodu ta' ttestjar. Hi kejl tal-preċiżjoni għal metodu ta' ttestjar li jipproduċi riżultati kategorici, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' metodu ta' ttestjar (20).

**Korrużjoni tal-ġilda *in vivo*:** Il-produzzjoni ta' dannu irriversibbli fil-ġilda; jiġifieri nekrozi vizibbli mill-epidermis u ġewwa d-dermis, wara l-applikazzjoni ta' sustanza kimika tat-test għal mhux aktar minn erba' sigħat. Ir-reazzjonijiet korrossivi huma kkaratterizzati minn ulċeri, fsad, qxur bid-demm, u, fit-tmiem tal-osservazzjoni fl-14-il jum, minn skulurazzjoni minhabba t-tibjid tal-ġilda, żoni shah b'alopecja, u ċikatriċi. L-istopatoloġija għandha titqies biex jiġu evalwati leżjonijiet li dwarhom hemm dubju.

**Speċificità:** Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi negattivi/inattivi kollha li huma klassifikati kif

suppost mill-metodu ta' ttestjar. Hi kejl tal-preċiżjoni għal metodu ta' ttestjar li jipproduċi riżultati kategorici, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' metodu ta' ttestjar (20).

**Sustanza:** Element kimiku u l-komposti tiegħu fl-istat naturali jew mislut minn kwalunkwe proċess ta' produzzjoni, li jinduċi kull addittiv neċessarju għall-preżervazzjoni tal-istabbiltà tiegħu u kwalunkwe impurità li tirriżulta mill-proċess użat, iżda bl-esklużjoni ta' kull solvent li jista' jkun separat mingħajr ma tkun effettwata l-istabbiltà tas-sustanza jew mibdula l-kompożizzjoni tagħha.

**Sessjoni (ta' ttestjar):** Sustanza kimika tat-test waħda testjata b'mod konkorrenti f'minimu ta' tliet diski tal-ġilda rreplikati.

**Sustanza kimika tat-test:** Kwalunkwe sustanza jew taħlita testjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

**Reżistenza Elettrika Transkutanja (TER):** hi kejl tal-impedenza elettrika tal-ġilda, bħala valur ta' reżistenza f'kilo Ohms. Metodu sempliċi u robust biex tiġi stmata l-funzjoni ta' barrjera bir-rekordjar tal-passaġġ tal-joni mill-ġilda bl-użu ta' apparat Wheatstone bridge.

**UVCB:** Sustanzi kimiċi b'kompożizzjoni mhux magħrufa jew varjabbli, prodotti jew materjali bijoloġiċi b'reazzjoni kumplessa. ”

(6) Fil-Parti B, il-Kapitolu B.40bis hu ssostitwit b'dan li ġej:

**“B.40bis KORRUŻJONI TAL-ĠILDA *IN VITRO*: METODU TA’ TTESTJAR TAL-EPIDERMIS UMAN RIKOSTITWIT (RhE)**

**INTRODUZZJONI**

1. Dan il-metodu ta’ ttestjar (TM) hu ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 431 tal-OECD (2016). Il-korrużjoni tal-ġilda tirreferi għall-produzzjoni ta’ hsara irreversibbli għall-ġilda li tidher bħala nekrozi viżibbli permezz tal-*epidermis* u fid-*dermis*, wara l-applikazzjoni ta’ sustanza kimika tat-test [kif definita mis-Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta’ Sustanzi Kimiċi (GHS) tan-Nazzjonijiet Uniti (NU) (1) u mir-Regolament tal-Unjoni Ewropea (UE) 1272/2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet (CLP)<sup>1</sup>]. Dan il-metodu ta’ ttestjar aġġornat B.40bis jipprovdi proċedura *in vitro* li tippermetti li jiġu identifikati sustanzi u taħlitiet mhux korrużivi u korrużivi skont il-GHS tan-NU u s-CLP. Jippermetti wkoll subkategorizzazzjoni parzjali tal-korrużivi.
2. Il-valutazzjoni tal-potenzjal ta’ korrużjoni tal-ġilda tas-sustanzi kimiċi tipikament kienet tinvolvi l-użu ta’ annimali tal-laboratorju (TM B.4 ekwivalenti għat-TG 404 tal-OECD; oriġinarjament adottata fl-1981 u riveduta fl-1992, fl-2002 u fl-2015) (2). Minbarra l-metodu ta’ ttestjar B.40bis preżenti, żewġ metodi ta’ ttestjar *in vitro* oħra għall-ittestjar tal-potenzjal ta’ korrużjoni tas-sustanzi kimiċi ġew validati u adottati bħala TM B.40 (ekwivalenti għat-TG 430 tal-OECD) (3) u TM B.65 (ekwivalenti għat-TG 435 tal-OECD) (4). Barra minn hekk, it-TM B.46 *in vitro* (ekwivalenti għat-TG 439 tal-OECD) (5) ġie adottat għall-ittestjar tal-potenzjal ta’ irritazzjoni tal-ġilda. Dokument ta’ gwida tal-OECD dwar Approċċi Integrati għall-Ittestjar u għall-Valutazzjoni (IATA) għall-Korrużjoni u għall-Irritazzjoni tal-Ġilda jiddeskrivi diversi moduli li jiġbru fihom sorsi ta’ informazzjoni u għodod ta’ valutazzjoni, u jipprovdi gwida dwar (i) kif tintegra u tuża d-*data* eżistenti dwar l-ittestjar u mhux tal-ittestjar għall-valutazzjoni tal-potenzjali ta’ irritazzjoni tal-ġilda u ta’ korrużjoni tal-ġilda tas-sustanzi kimiċi u (ii) jipproponi approċċ fejn ikun meħtieġ ittestjar ulterjuri (6).

---

<sup>1</sup> Ir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tas-16 ta’ Diċembru 2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet, li jemenda u jħassar id-Direttivi 67/548/KEE u 1999/45/KE, u li jemenda r-Regolament (KE) Nru 1907/2006, ĠU L 353/1, 31.12.2008

3. Dan il-metodu ta' ttestjar jindirizza l-korrużjoni tal-ġilda tal-punt tat-tmiem tas-saħħa umana. Jagħmel użu minn *epidermis* uman rikostitwit (RhE) (miksub minn keratinoċiti epidermali mhux trasformati derivati mill-bniedem) li jimita mill-qrib il-proprietajiet istoloġiċi, morfoloġiċi, bijokimiċi u fiżjoloġiċi tal-partijiet ta' fuq tal-ġilda tal-bniedem, jiġifieri l-*epidermis*. Il-linja gwida korrispondenti tal-OECD oriġinarjament ġiet adottata fl-2004 u aġġornata fl-2013 biex tinkludi metodi ta' ttestjar addizzjonali bl-użu tal-mudelli RhE u l-possibbiltà li jintużaw il-metodi għas-sostenn tas-subkategorizzazzjoni ta' sustanzi kimiċi korrużivi, u aġġornata fl-2015 biex tirreferi għad-dokument ta' gwida tal-IATA u tintroduċi l-użu ta' proċedura alternattiva għall-kejl tal-vijabbiltà.
4. F'dan il-metodu ta' ttestjar huma inklużi erba' mudelli RhE kummerċjalment disponibbli. Saru (11) (12) studji ta' prevalidazzjoni (7), segwiti minn studju formali ta' validazzjoni għall-valutazzjoni tal-korrużjoni tal-ġilda (8)(9)(10) għal tnejn minn dawn il-mudelli tat-test kummerċjalment disponibbli, EpiSkin™ Standard Model (SM) u EpiDerm™ Skin Corrosivity Test (SCT) (EPI-200) (imsejha fit-test segwenti bħala l-Metodi ta' Referenza Validat - VRMs). L-eżitu ta' dawn l-istudji wassal għar-rakkomandazzjoni li ż-żewġ VRMs imsemmija hawn fuq jistgħu jintużaw għall-finijiet regolatorji ta' distinzjoni ta' sustanzi korrużivi (C) minn sustanzi mhux korrużivi (NC), u li barra minn hekk EpiSkin™ jista' jintuża biex isostni s-subkategorizzazzjoni ta' sustanzi korrużivi (13)(14)(15). Żewġ mudelli oħra tat-test RhE tal-korrużjoni tal-ġilda *in vitro* disponibbli kummerċjalment urew riżultati simili għall-VRM EpiDerm™ skont il-validazzjoni bbażata fuq il-PS (16)(17)(18). Dawn huma SkinEthic™ RHE<sup>1</sup> u epiCS® (qabel imsejha EST-1000) li jistgħu jintużaw ukoll għall-finijiet regolatorji ta' distinzjoni tas-sustanzi korrużivi minn daww mhux korrużivi (19)(20). L-istudji ta' wara l-validazzjoni mwettqa mill-produtturi tal-mudell tal-RhE fis-snin 2012 sal-2014 bi protokoll irfinut li jikkoreġi interferenzi ta' tnaqqis mhux speċifiku ta' MTT mis-sustanzi kimiċi tat-test tejbu l-prestazzjoni kemm fid-diskriminazzjoni tas-C/NC kif ukoll fis-sostenn tas-subkategorizzazzjoni tal-korrużivi (21)(22). Analizijiet statistiċi ulterjuri tad-*data* ta' wara l-validazzjoni ġġenerata b'EpiDerm™ SCT, bi SkinEthic™ RHE u b'EpiCS® saru bl-għan li jidentifikaw mudelli ta' tbassir alternattivi li tejbu l-kapaċità ta' tbassir għas-subkategorizzazzjoni (23).
5. Qabel ma metodu ta' ttestjar tal-RhE *in vitro* simili jew modifikat propost għall-korrużjoni tal-ġilda li mhuwiex il-VRMs ikun jista' jintuża għall-finijiet regolatorji, l-ewwel għandhom jiġu

---

<sup>1</sup> L-abbrevjazzjoni RhE (=Epidermis uman Rikostitwit) tintuża għall-mudelli kollha bbażati fuq teknoloġija tal-RhE. L-abbrevjazzjoni RHE kif użata flimkien mal-mudell SkinEthic™ tfisser l-istess, iżda, bħala parti mill-isem ta' dan il-metodu ta' ttestjar speċifiku kif kummerċjalizzat, hi miktuba kollha kemm hi b'ittri kapitali.

determinati l-affidabbiltà, ir-rilevanza (preċiżjoni), u l-limitazzjonijiet tiegħu biex tiġi zgurata s-similarità tiegħu għall-VRMs, skont ir-rekwiżiti tal-Istandards tal-Prestazzjoni (PS) (24) stabbiliti skont il-prinċipji tad-dokument ta' gwida Nru 34 tal-OECD (25). L-Aċċettazzjoni Reċiproka tad-*Data* tiġi garantita biss wara li kwalunkwe metodu ta' ttestjar propost għdid jew aġġornat wara l-PS ikun ġie rieżaminat u inkluż fil-linja gwida tat-test korrispondenti. Il-mudelli tat-test inklużi fil-linja gwida tat-test jistgħu jintużaw biex jindirizzaw ir-rekwiżiti tal-pajjiżi għar-riżultati tat-testijiet fuq il-metodu ta' ttestjar *in vitro* għall-korrużjoni tal-ġilda, filwaqt li jibbenefikaw mill-Aċċettazzjoni Reċiproka tad-*Data*.

## DEFINIZZJONIJIET

6. Id-definizzjonijiet użati huma pprovduti fl-Appendiċi 1.

## KUNSIDERAZZJONIJIET TAL-BIDU

7. Dan il-metodu ta' ttestjar jippermetti li jiġu identifikati sustanzi u taħlitiet mhux korrużivi u korrużivi skont il-GHS tan-NU u s-CLP. Dan il-metodu ta' ttestjar ikompli jsostni s-subkategorizzazzjoni ta' sustanzi u ta' taħlitiet korrużivi fis-subkategorija fakultattiva 1A, skont il-GHS tan-NU (1), kif ukoll taħlita tas-subkategoriji 1B u 1C (21)(22)(23). Limitazzjoni ta' dan il-metodu ta' ttestjar hi li ma jippermettix id-diskriminazzjoni bejn is-subkategorija 1B u s-subkategorija 1C tal-korrużivi tal-ġilda skont il-GHS tan-NU u s-CLP minhabba s-sett limitat ta' sustanzi kimiċi korrużivi *in vivo* ferm magħrufa tas-subkategorija 1C. Il-mudelli tat-test EpiSkin™, EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE u epiCS® jistgħu jiġu subkategorizzati (jiġifieri 1A kontra 1B-u-1C kontra NC)
8. Firxa wiesgħa ta' sustanzi kimiċi li primarjament tirrappreżenta sustanzi individwali għet ittestjata fil-validazzjoni li ssostni l-mudelli tat-test inklużi f'dan il-metodu ta' ttestjar meta jintużaw għall-identifikazzjoni ta' sustanzi mhux korrużivi u korrużivi; il-bażi ta' *data* empirika tal-istudju ta' validazzjoni kien fiha 60 sustanza kimika li jkopru firxa wiesgħa ta' klassijiet kimiċi (8)(9)(10). L-ittestjar biex jintwerew is-sensittività, l-ispeċifità, l-akkuratezza u ir-riproduċibbiltà fi hdan il-laboratorju tal-assaġġ għas-subkategorizzazzjoni sar mill-iżviluppaturi tal-metodu ta' ttestjar u r-riżultati ġew rieżaminati mill-OECD (21) (22) (23). Fuq il-bażi tad-*data* ġenerali disponibbli, dan il-metodu ta' ttestjar hu applikabbli għal firxa wiesgħa ta' klassijiet kimiċi u ta' stati fiżiċi li jinkludu likwidi, semisolidi, solidi u xama'. Il-likwidi jistgħu jkunu jew ma jkunux milwiema; is-solidi jistgħu jkunu jew ma jkunux solubbli fl-ilma. Kull meta dan ikun possibbli, is-solidi għandhom jiġu mithuna fi trab fin qabel ma jiġu applikati; mhu meħtieġ ebda trattament preċedenti ieħor tal-kampjun. F'każijiet li fihom tista' tiġi pprovduta evidenza fuq in-nuqqas ta' applikabbiltà tal-mudelli tat-test inklużi f'dan il-metodu ta' ttestjar għal kategorija speċifika ta' sustanzi kimiċi tat-test, dawn ma għandhomx jintużaw għal dik il-kategorija speċifika ta' sustanzi kimiċi tat-test. Barra minn hekk, dan il-metodu ta' ttestjar hu preżunt bħala applikabbli għal taħlitiet bħala estensjoni tal-applikabbiltà tiegħu għas-

sustanzi. Madankollu, minhabba l-fatt li t-tahlitiet ikopru spettru mifrux ta' kategoriji u ta' kompożizzjoni, u li bħalissa hemm disponibbli biss informazzjoni limitata dwar l-ittestjar tat-tahlitiet, f'każijiet li fihom tkun tista' tintwera evidenza fuq in-nuqqas ta' applikabbiltà tal-metodu ta' ttestjar għal kategorija speċifika ta' tahlitiet (*eż.* skont strategika kif proposta f'(26)), il-metodu ta' ttestjar ma għandux jintuża għal dik il-kategorija speċifika ta' tahlitiet. Qabel ma jintuża l-metodu ta' ttestjar fuq tahlita għall-generazzjoni ta' *data* għal skop regolatorju intiż, għandu jiġi kkunsidrat jekk jistax jipprovdi riżultati adegwati għal dak l-għan u, jekk iva, għaliex. Dawn il-kunsiderazzjonijiet mhumiex meħtieġa meta jkun hemm rekwiżit regolatorju għall-ittestjar tat-tahlita. Il-gassijiet u l-aerosols għadhom ma ġewx ivvalutati f' studji ta' validazzjoni (8)(9)(10). Filwaqt li huwa mifhum li dawn jistgħu jiġu ttestjati billi tintuża t-teknoloġija tal-RhE, il-metodu ta' ttestjar attwali ma jippermettix l-ittestjar ta' gassijiet u ta' aerosols.

9. Is-sustanzi kimiċi tat-test li jassorbu d-dawl fl-istess medda bħal MTT formażan u s-sustanzi kimiċi tat-test li kapaċi jnaqqsu direttament l-MTT tal-kulurant vitali (għal MTT formażan) jistgħu jinterferixxu mal-kejljiet tal-vijabbiltà tat-tessut u jkollhom bżonn l-użu ta' kontrolli adattati għall-korrezzjonijiet. It-tip ta' kontrolli adattati li jistgħu jkunu meħtieġa se jvarja skont it-tip ta' interferenza prodotta mis-sustanza kimika tat-test u l-proċedura użata biex jitkejjel MTT formażan (ara l-paragrafi 25-31).
10. Filwaqt li dan il-metodu ta' ttestjar ma jipprovdi informazzjoni adegwata dwar l-irritazzjoni tal-ġilda, ta' min jinnota li t-TM B.46 jindirizza b'mod speċifiku l-irritazzjoni tal-ġilda *in vitro* b'effett fuq is-saħħa u hu bbażat fuq l-istess sistema tat-test tal-RhE, bl-użu ta' protokoll ieħor (5). Għal evalwazzjoni shiħa tal-effetti lokali fuq il-ġilda wara esponiment dermal wiehied, għandu jiġi kkonsultat id-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar l-Approċċi Integrati għall-Ittestjar u għall-Valutazzjoni (6). Dan l-approċċ tal-IATA jinkludi t-twettiq ta' testijiet *in vitro* għall-korrożjoni tal-ġilda (bħal kif deskritt f'dan il-metodu ta' ttestjar) u l-irritazzjoni tal-ġilda qabel ma jitqies l-ittestjar fl-annimali hajjin. Hu rikonoxxut li l-użu ta' ġilda umana hu soġġett għal konsiderazzjonijiet u kundizzjonijiet etiċi nazzjonali u internazzjonali.

## PRINĊIPJU TAT-TEST

11. Is-sustanza kimika tat-test hi applikata b'mod topiku għal mudell tal-RhE tridimensjonali, ifformata minn keratinoċiti mhux trasformati mnissla mill-*epidermis* uman, li ffurmaw ruħhom f'mudell b'diversi saffi, ferm differenzjat ta' *epidermis* uman. Din tikkonsisti f'saff tal-qiegh, f'saff spinuż u f'saff granulari organizzati, u fi *stratum corneum* b'diversi saffi li jkun fih saffi lipidi lamellari interċellolari li jirrappreżentaw il-klassijiet lipidi ewlenin b'mod analoġu għal dawk li jinstabu *in vivo*.
12. Il-metodu ta' ttestjar tal-RhE hu bbażat fuq il-premessa li s-sustanzi kimiċi korrużivi jistgħu jinfdu l-*istratum corneum* permezz tad-diffużjoni jew tal-erożjoni, u huma ċitotossiċi għaċċelloli li jinsabu fis-saffi ta' taht. Il-vijabbiltà taċċelloli titkejjel b'konverżjoni enzimatika tal-

kulurant vitali MTT [bromur tat-3-(4,5-Dimetiltjażol-2-il)-2,5- difeniltetrażolju, bromur tat-tetrażolju tal-blu tjażolil; Numru CAS 298-93-1], f'melħ tal-formažan blu li jitkejjel b'mod kwantitattiv wara l-estrazzjoni mit-tessuti (27). Is-sustanzi kimiċi korrużivi huma identifikati mill-abbiltà tagħhom li jnaqqsu l-vijabbiltà taċ-ċelloli taħt il-livelli limitu definiti (ara l-paragrafi 35 u 36). Il-metodu ta' ttestjar tal-korrużjoni tal-ġilda bbażat fuq l-RhE wera li jbassar effetti tal-korrużjoni tal-ġilda *in vivo* vvalutati fil-fniek skont it-TM B.4 (2).

## WIRI TAL-PROFIĊJENZA

13. Qabel l-użu ta' rutina ta' kwalunkwe wiehed mill-erba' metodi ta' ttestjar validati tal-RhE li jaderixxu ma' dan il-metodu ta' ttestjar, il-laboratorji għandhom juru profiċjenza teknika billi jikklassifikaw kif suppost tmax-il Sustanza ta' Profiċjenza elenkati fit-Tabella 1. Fil-każ ta' użu ta' metodu għas-subklassifikazzjoni, għandha tintwera s-subkategorizzazzjoni korretta wkoll. F'sitwazzjonijiet li fihom sustanza elenkata ma tkunx disponibbli jew, fejn ġustifikabbli, tista' tintuża sustanza oħra li għaliha jkun hemm *data* ta' riferiment adegwata *in vivo* u *in vitro* (eż. mil-lista ta' sustanzi kimiċi ta' riferiment (24)) dment li ma jiġux applikati l-istess kriterji tal-għażla bħal dawk deskritti fit-Tabella 1.

**Tabella 1:** Lista ta' Sustanzi ta' Profiċjenza<sup>1</sup>

| Sustanza                                                              | CASRN      | Klassi Kimika <sup>2</sup> | Kat. tal-GHS tan-NU/tas-CLP fuq il-bażi tar-riżultati <i>In vivo</i> <sup>3</sup> | VRM Kat. Ibbażata fuq riżultati <sup>4</sup> <i>In Vitro</i> | Riduċent tal-MTT <sup>5</sup> | Stat Fiziku |
|-----------------------------------------------------------------------|------------|----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-------------------------------|-------------|
| <b>Korrużivi <i>In Vivo</i> tas-Subkategorija 1A</b>                  |            |                            |                                                                                   |                                                              |                               |             |
| Aċidu bromoaċetiku                                                    | 79-08-3    | Aċidu organiku             | 1A                                                                                | (3) 1A                                                       | --                            | S           |
| Diidrat tat-trifluworur tal-Boron                                     | 13319-75-0 | Aċidi inorganici           | 1A                                                                                | (3) 1A                                                       | --                            | L           |
| Fenol                                                                 | 108-95-2   | Fenol                      | 1A                                                                                | (3) 1A                                                       | --                            | S           |
| Klorur tad-Dikloroaċetil                                              | 79-36-7    | Elettrofil                 | 1A                                                                                | (3) 1A                                                       | --                            | L           |
| <b>Tahlita ta' Korrużivi <i>In Vivo</i> tas-subkategoriji 1B u 1C</b> |            |                            |                                                                                   |                                                              |                               |             |
| Monoidrat tal-aċidu gliossiliku                                       | 563-96-2   | Aċidu organiku             | 1B-u-1C                                                                           | (3) 1B-u-1C                                                  | --                            | S           |
| Aċidu lattiku                                                         | 598-82-3   | Aċidu organiku             | 1B-u-1C                                                                           | (3) 1B-u-1C                                                  | --                            | L           |
| Etanolamina                                                           | 141-43-5   | Bażi organika              | 1B)                                                                               | (3) 1B-u-1C                                                  | Y                             | Viskuż      |
| Aċidu idrokloriku (14,4 %)                                            | 7647-01-0  | Aċidi inorganici           | 1B-u-1C                                                                           | (3) 1B-u-1C                                                  | --                            | L           |
| <b>Mhux korrużivi <i>In Vivo</i></b>                                  |            |                            |                                                                                   |                                                              |                               |             |
| Bromur tal-fenetil                                                    | 103-63-9   | Elettrofil                 | NC                                                                                | (3) NC                                                       | Y                             | L           |
| 4-Amino-1,2,4-triażol                                                 | 584-13-4   | Bażi organika              | NC                                                                                | (3) NC                                                       | --                            | S           |



|                         |           |                |    |        |    |   |
|-------------------------|-----------|----------------|----|--------|----|---|
| 4-(metiltjo)-benzaldeid | 3446-89-7 | Elettrofil     | NC | (3) NC | Y  | L |
| Aċidu lawriku           | 143-07-7  | Aċidu organiku | NC | (3) NC | -- | S |

Abbrevjazzjonijiet: CASRN = Numru tar-Registru tas-Servizz tat-Taqsiriet tas-Sustanzi Kimiċi; VRM = Metodu ta' Referenza Validat; NC = Mhux Korrużivi

<sup>1</sup> Is-sustanzi ta' profiċjenza, imqassma l-ewwel bil-korrużivi kontra l-mhux korrużivi, u mbagħad skont is-subkategorija ta' korrużivi u mbagħad skont il-klassi kimika, intgħażlu mis-sustanzi użati fl-istudji ta' validazzjoni tal-ECVAM ta' EpiSkin™ u ta' EpiDerm™ (8) (9) (10) u mill-istudji ta' wara l-validazzjoni fuq il-bażi ta' *data* pprovduta mill-iżviluppaturi ta' EpiSkin™ (22), ta' EpiDerm™, ta' SkinEthic™ u ta' epiCS®(23). Sakemm ma jkunx indikat mod ieħor, is-sustanzi ġew ittestjati fil-livell ta' purità miksub meta ntraw minn sors kummerċjali (8) (10). L-għażla, sa fejn possibbli, tinkludi sustanzi li: (i) huma rappreżentattivi tal-firxa ta' risponsi tal-korrużività (eż. non korrużivi; korrużivi dgħajfa sa b'saħħithom) li l-VRMs kapaċi jkejlu jew ibassru; (ii) huma rappreżentattivi tal-klassijiet kimiċi użati fl-istudji ta' validazzjoni; (iii) għandhom strutturi kimiċi li huma definiti sew; (iv) jinduċu riżultati riprodubbli fil-VRM; (v) jinduċu riżultati definittivi fil-metodu ta' ttestjar ta' riferiment *in vivo*; (vi) huma kummerċjalment disponibbli; u (vii) mhumiex assoċjati ma' spejjeż projbittivi tar-rimi.

<sup>2</sup> Il-klassi kimika assenjata minn Barratt *et al.* (8).

<sup>3</sup> Il-gruppi ta' Imballaġġ korrispondenti tan-NU huma I, II u III, rispettivament, għall-kategoriji 1A, 1B u 1C tal-GHS tan-NU/tas-CLP.

<sup>4</sup> It-tbassiriet *in vitro* tal-VRM rapprotati f'din it-tabella nkisbu bil-mudelli tat-test (VRMs) ta' EpiSkin™ u ta' EpiDerm™ matul l-ittestjar ta' wara l-validazzjoni mwettaq mill-iżviluppaturi tal-metodu ta' ttestjar.

<sup>5</sup> Il-valuri tal-vijabbiltà miksuba fl-Istudji ta' Validazzjoni tal-Korrużjoni tal-ġilda tal-ECVAM ma ġewx ikkoreġuti għattnaqis dirett tal-MTT (il-kontrolli maqtula ma sarux fl-istudji tal-validazzjoni). Madankollu, id-*data* ta' wara l-validazzjoni generata mill-iżviluppaturi tal-metodu ta' ttestjar li hi pprezentata f'din it-tabella nkisbet b'kontrolli adattati (23).

14. Bħala parti mill-eżerċizzju tal-profiċjenza, hu rrakkomandat li l-utent jivverifika l-karatteristiċi ta' protezzjoni tat-tessuti wara li dawn jiġu riċevuti kif speċifikat mill-manifattur tal-mudell tal-RhE. Dan hu ta' importanza partikolari jekk it-tessuti jintbagħtu minn distanzi twal jew jekk idumu biex jaslu. Ladarba metodu ta' ttestjar ikun ġie stabbilit b'suċċess u tkun intweriet profiċjenza fl-użu tiegħu, verifika bħal din ma għandhiex tkun meħtieġa fuq bażi ta' rutina. Madankollu, meta jintuża metodu ta' ttestjar b'rutina, hu rrakkomandat li jibqgħu jiġu vvalutati l-karatteristiċi ta' protezzjoni f'intervalli regolari.

## PROCEDURA

15. Din li ġejja hi deskrizzjoni ġenerika tal-komponenti u tal-proċeduri tal-mudelli tat-test tal-RhE għall-valutazzjoni tal-korrużjoni tal-ġilda koperti minn dan il-metodu ta' ttestjar. Il-mudelli tal-RhE approvati bħala xjentifikament validi għall-użu fi hdan dan il-metodu ta' ttestjar, jiġifieri l-mudelli EpiSkin™ (SM), EpiDerm™ (EPI-200), SkinEthic™ RHE u epiCS® (16)(17)(19)(28)(29)(30)(31)(32)(33), jistgħu jinkisbu minn sorsi kummerċjali. Il-Proċeduri Operatorji Standard (SOPs) għal dawn l-erba' mudelli tal-RhE huma disponibbli (34)(35)(36)(37), u l-komponenti ewlenin tal-metodu ta' ttestjar tagħhom huma miġbura fil-qosor fl-Appendiċi 2. Hu rrakkomandat li l-SOP rilevanti tiġi kkonsultata matul l-

implimentazzjoni u l-użu ta' wiehed minn dawn il-mudelli fil-laboratorju. L-ittestjar bl-erba' mudelli tat-test tal-RhE b'dan il-metodu ta' ttestjar għandu jikkonforma mal-kundizzjonijiet li ġejjin:

## KOMPONENTI TAL-METODU TA' TTESTJAR TAL-RHE

### Kundizzjonijiet Ġenerali

16. Keratinoċiti umani mhux trasformati għandhom jintużaw biex jerggħu jibnu l-epitelju. Is-saffi multipli ta' ċelloli epitelji vijabbli (saff tal-qiegħ, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*) għandhom ikunu preżenti taht *stratum corneum* funzjonali. L-*istratum corneum* għandu jkollu saffi multipli li jkun fihom il-profil lipidu essenzjali biex jipproduċu protezzjoni funzjonali robusta biex tirreżisti l-penetrazzjoni rapida ta' sustanzi kimiċi referenzjarji ċitotossici, pereżempju d-dodeċilsulfat tas-sodju (SDS) jew Triton X-100. Il-funzjoni ta' protezzjoni għandha tintwera u tista' tiġi eżaminata jew permezz ta' determinazzjoni tal-konċentrazzjoni li fiha s-sustanza kimika referenzjarja tnaqqas il-vijabbiltà tat-tessuti b'50 % (IC<sub>50</sub>) wara hin ta' esponiment fiss, jew permezz ta' determinazzjoni tal-hin ta' esponiment meħtieġ sabiex il-vijabbiltà taċ-ċellola titnaqqas b'50 % (ET<sub>50</sub>) wara l-applikazzjoni tas-sustanza kimika referenzjarja b'konċentrazzjoni speċifika u fissa (ara l-paragrafu 18). Il-karatteristiċi ta' trażżin tal-mudell tal-RhE għandhom iwaqqfu l-passaġġ ta' materjal madwar l-*istratum corneum* għat-tessut vijabbli, li nkella jwassal għal immudellar ta' livell baxx tal-esponiment tal-ġilda. Il-mudell tal-RhE għandu jkun hieles minn kontaminazzjoni minn batterji, vajrusijiet, majkoplasma, jew fungi.

### Kundizzjonijiet Funzjonali

#### Vijabbiltà

17. L-assaġġ użat għall-kwantifikazzjoni tal-vijabbiltà tat-tessut hu l-assaġġ MTT (27). Iċ-ċelloli vijabbli tal-mudell ta' tessut tal-RhE jnaqqsu l-MTT tal-kulurant vitali fi preċipitat tal-blu MTT formażan, li mbagħad jiġi estratt mit-tessut bl-użu tal-isopropanol (jew solvent simili). L-OD tas-solvent ta' estrazzjoni waħedha għandha tkun żgħira biżżejjed, jiġifieri OD < 0,1. L-MTT formażan estratt jista' jiġi kwantifikat bl-użu ta' kejl tal-assorbanza standard (OD) jew bi proċedura ta' spettrofotometrija tal-HPLC/UPLC (38). L-utenti tal-mudell tal-RhE għandhom jiżguraw li kull lott mill-mudell tal-RhE użat jissodisfa l-kriterji definiti għall-kontroll negattiv. Medda tal-aċċettabbiltà (limitu superjuri u inferjuri) għall-valuri tal-OD tal-kontroll negattiv għandha tiġi stabbilita mill-iżviluppatur/fornitur tal-mudell tal-RhE. Meded tal-aċċettabbiltà għall-valuri tal-OD tal-kontroll negattiv għall-erba' mudelli tat-test tal-RhE validati inkluzi f'dan il-metodu ta' ttestjar huma mogħtija fit-Tabella 2. Utent tal-Ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC għandu juża l-meded tal-OD tal-kontroll negattiv ipprovduti fit-Tabella 2 bħala l-kriterju ta' aċċettazzjoni għall-kontroll negattiv. Għandu jiġi dokumentat li t-tessuti ttrattati bil-

kontroll negattiv huma stabbli fil-kultura (jipprovdu kejl tal-OD simili) sakemm idum il-perjodu ta' esponiment.

**Tabella 2:** Il-meded ta' aċċettabbiltà għall-valuri tal-OD tal-kontroll negattiv għall-kontroll tal-kwalità tal-lott

|                               | Limitu inferjuri ta' | Limitu superjuri ta' |
|-------------------------------|----------------------|----------------------|
| <b>EpiSkin™ (SM)</b>          | > 0,6                | < 1,5                |
| <b>EpiDerm™ SCT (EPI-200)</b> | > 0,8                | < 2,8                |
| <b>SkinEthic™ RHE</b>         | > 0,8                | < 3,0                |
| <b>epiCS®</b>                 | > 0,8                | < 2,8                |

#### *Funzjoni ta' protezzjoni*

18. L-*istratum corneum* u l-kompożizzjoni lipida tiegħu għandhom ikunu biżżejjed biex jirreżistu l-penetrazzjoni rapida ta' ċerti sustanzi kimiċi referenzjarji ċitotossiċi (eż. SDS jew Triton X-100), kif stmat minn IC<sub>50</sub> jew ET<sub>50</sub> (Tabella 3). Il-funzjoni ta' protezzjoni ta' kull lott tal-mudell tal-RhE użat għandha tintwera mill-iżviluppatur/bejjiegħ tal-mudell tal-RhE mal-provvista tat-tessuti lill-utent finali (ara l-paragrafu 21).

#### *Morfologija*

19. L-eżaminazzjoni istoloġika tal-mudell tal-RhE għandha ssir billi tintwera struttura qisha *epidermis* uman b'diversi saffi li jkun fiha *stratum basale*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum* u *stratum corneum* u turi profil lipidu simili għall-profil lipidu tal-epidermis uman. Eżaminazzjoni istoloġika ta' kull lott tal-mudell tal-RhE użat li turi morfologija xierqa tat-tessuti għandha tiġi pprovduta mill-iżviluppatur/bejjiegħ tal-mudell tal-RhE mal-provvista tat-tessuti lill-utent finali (ara l-paragrafu 21).

#### *Riproduċibbiltà*

20. L-utenti tal-metodu ta' ttestjar għandhom juru r-riproduċibbiltà tal-metodi ta' ttestjar maż-żmien bil-kontrolli pożittivi u negattivi. Barra minn hekk, il-metodu ta' ttestjar għandu jintuża biss jekk l-iżviluppatur/il-fornitur tal-mudell tal-RhE jipprovdi *data* li turi r-riproduċibbiltà maż-żmien b'sustanzi kimiċi korrużivi u mhux korrużivi, pereżempju, mil-lista tas-Sustanzi ta' Profiċjenza (Tabella 1). Fil-każ ta' użu ta' metodu ta' ttestjar għas-subkategorizzazzjoni, ir-riproduċibbiltà fir-rigward tas-subkategorizzazzjoni għandha tintwera wkoll.

#### *Kontroll tal-kwalità (QC)*

21. Il-mudell tal-RhE għandu jintuża biss jekk l-iżviluppatur/il-fornitur juri li kull lott mill-mudell tal-RhE użat jissodisfa l-kriterji tat-tnedija tal-produzzjoni definiti, fosthom dawk għall-viżibbiltà (paragrafu 17), il-funzjoni ta' protezzjoni (paragrafu 18) u l-morfologija (paragrafu

19) huma l-aktar rilevanti. Din id-*data* tiġi pprovduta lill-utenti tal-metodu ta' ttestjar, biex ikunu jistgħu jinkludu din l-informazzjoni fir-rapport tat-test. Huma biss daww il-risultati prodotti b'lottijiet ta' tessuti aċċettati bi QC li jistgħu jiġu aċċettati għal tbassir affidabbli tal-klassifikazzjoni korrużiva. Medda tal-aċċettabbiltà (limitu superjuri u inferjuri) għall-IC<sub>50</sub> jew għall-ET<sub>50</sub> tiġi stabbilita mill-iżviluppatur/fornitur tal-mudell tal-RhE. Il-medda tal-aċċettabbiltà għall-erba' mudelli tat-test validati jingħataw fit-Tabella 3.

**Tabella 3:** Kriterji tal-QC għar-rilaxx tal-lottijiet

|                                                                   | <b>Limitu inferjuri ta'</b><br><b>(inferjuri)</b> | <b>Limitu superjuri ta'</b><br><b>(superjuri)</b> |
|-------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| <b>EpiSkin™ (SM)</b><br>(trattament ta' 18-il siegħa b' SDS) (33) | IC <sub>50</sub> = 1,0 mg/ml                      | IC <sub>50</sub> = 3,0 mg/ml                      |
| <b>EpiDerm™ SCT (EPI-200)</b><br>(1 % Triton X-100) (34)          | ET <sub>50</sub> = 4,0 sigħat                     | ET <sub>50</sub> = 8,7 sigħat                     |
| <b>SkinEthic™ RHE</b><br>(1 % Triton X-100) (35)                  | ET <sub>50</sub> = 4,0 sigħat                     | ET <sub>50</sub> = 10,0 sigħat                    |
| <b>epiCS®</b><br>(1 % Triton X-100) (36)                          | ET <sub>50</sub> = 2,0 sigħat                     | ET <sub>50</sub> = 7,0 sigħat                     |

### Applikazzjoni tas-Sustanza Kimika tat-Test u tas-Sustanzi Kimiċi tal-Kontroll

22. Tal-anqas għandhom jintużaw żewġ repliki tat-tessuti għal kull sustanza kimika tat-test u għall-kontrolli għal kull hin tal-esponiment. Għas-sustanzi kimiċi likwidi kif ukoll għas-sustanzi kimiċi solidi, għandu jiġi applikat ammont suffiċjenti ta' sustanza kimika tat-test sabiex ikopri b'mod uniformi l-wiċċ tal-epidermis filwaqt li tiġi evitata doża infinita, jiġifieri għandu jintuża minimu ta' 70 µl/cm<sup>2</sup> jew 30 mg/cm<sup>2</sup>. Skont il-mudelli, il-wiċċ tal-epidermis għandu jixxarrab b'ilma dejonizzat jew distillat qabel l-applikazzjoni tas-sustanzi kimiċi solidi, biex jitjieb il-kuntatt bejn is-sustanza kimika tat-test u l-wiċċ tal-epidermis (34)(35)(36)(37). Kull meta dan ikun possibbli, is-solidi għandhom jiġu ttestjati bħala trab fin. Il-metodu ta' applikazzjoni għandu jkun xieraq għas-sustanza kimika tat-test (ara pereżempju r-referenzi (34-37)). Fi tmien il-perjodu ta' esponiment, is-sustanza kimika tat-test għandha tinħasel bir-reqqa mill-*epidermis* b'bafer milwiem, jew b'0,9 % NaCl. Skont liema jintuża mill-erba' mudelli tat-test validati tal-RhE, jintużaw żewġ jew tliet perjodi ta' esponiment għal kull sustanza kimika tat-test (għall-erba' mudelli validi kollha tal-RhE: tliet minuti u siegħa; għal EpiSkin™ esponiment addizzjonali ta' erba' sigħat). Skont il-mudell tat-test tal-RhE użat u l-perjodu ta' esponiment ivvalutat, it-temperatura ta' inkubazzjoni matul l-esponiment tista' tvarja bejn it-temperatura ambjentali u 37°C.

23. F'kull sessjoni għandhom jintużaw kontrolli negattivi (NC) u pożittivi (PC) konkorrenti biex jintwera li l-vijabbiltà (bil-kontrolli negattivi), il-funzjoni ta' protezzjoni u s-sensittività tat-tessuti li tirriżulta (bil-PC) jinsabu fi hdan medda ta' aċċettazzjoni storika definita. Is-sustanzi kimiċi tal-PC sugġeriti huma aċidu aċetetiku glaċjali jew 8N KOH skont il-mudell tal-RhE użat. Ta' min jinnota li 8N KOH hu riduċent dirett tal-MTT li jista' jehtieg kontrolli adattati kif deskritti fil-paragrafi 25 u 26. Il-kontrolli negattivi sugġeriti huma 0,9 % (w/v) NaCl jew ilma.

### Kejljiet tal-Vijabbiltà taċ-Ċelloli

24. L-analiżi tal-MTT, li hi assaġġ kwantitattiv, għandha tintuża biex titkejjel il-vijabbiltà taċ-ċelloli skont dan il-metodu ta' ttestjar (27). Il-kampjun tat-tessut jitqiegħed f'soluzzjoni tal-MTT b'konċentrazzjoni xierqa (0,3 jew 1 mg/ml) għal 3 sigħat. Imbagħad il-prodott preċipitat formażan blu jiġi estratt mit-tessuti permezz ta' solvent (e.g., isopropanol, isopropanol aċiduż), u l-konċentrazzjoni tal-formażan titkejjel billi tiġi determinata l-OD f'570 nm permezz ta' filter band pass sa massimu ta'  $\pm 30$  nm, jew bi proċedura ta' spettrofotometrija tal-HPLC/UPLC (ara l-paragrafi 30 u 31)(38).
25. Is-sustanzi kimiċi tat-test jistgħu jinterferixxu mal-assaġġ tal-MTT, jew bi tnaqqis dirett tal-MTT fi blu formażan, u/jew b'interferenza tal-kulur jekk is-sustanza kimika tat-test tassorbi, b'mod naturali jew minhabba l-proċeduri ta' trattament, fl-istess medda tal-OD ta' formażan ( $570 \pm 30$  nm, primarjament sustanzi kimiċi blu u vjola). Għandhom jintużaw kontrolli addizzjonali biex tiġi individwata u kkoreġuta interferenza potenzjali minn dawn is-sustanzi kimiċi tat-test bħall-kontroll tat-tnaqqis mhux speċifiku tal-MTT (NSMTT) u l-kontroll tal-kulur mhux speċifiku (NSC) (ara l-paragrafi 26 sa 30). Dan hu partikolarment importanti meta sustanza kimika speċifika tat-test ma titneħhiex għalkollox mit-tessut bit-tlaħliħ jew meta din tippenetra l-*epidermis*, u għalhekk tkun preżenti fit-tessuti meta jitwettaq it-test tal-vijabbiltà tal-MTT. Spjegazzjoni dettaljata dwar kif għandhom jiġu kkoreġuti tnaqqis u interferenzi diretti tal-MTT permezz ta' aġenti koloranti hi disponibbli fl-SOPs għall-mudelli tat-test (34)(35)(36)(37).
26. Biex jiġu identifikati r-ridutturi diretti tal-MTT, kull sustanza kimika tat-test għandha tiżdied ma' medium tal-MTT preparata ġdida (34) (35) (36) (37). Jekk it-taħlita ta' MTT li fiha s-sustanza kimika tat-test issir blu/vjola, is-sustanza kimika tat-test tkun preżunta li tnaqqas b'mod dirett l-MTT u għandha ssir verifika funzjonali oħra fuq l-epidermis mhux vijabbli, indipendentement mill-użu tal-kejl tal-assorbanza standard (OD) jew ta' proċedura tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC. Din il-verifika funzjonali addizzjonali thaddem tessuti maqtula li jkollhom biss attività metabolika residwa iżda jassorbu s-sustanza kimika tat-test f'ammont simili bħal tessuti vijabbli. Kull sustanza kimika li tnaqqas l-MTT tiġi applikata fuq tal-anqas żewġ repliki tat-tessut maqtula għal kull hin tal-esponiment, li jsir ilhom it-test tal-korrużjoni tal-ġilda shih. Imbagħad, il-vijabbiltà tat-tessuti veru tiġi kkalkolata bħala l-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali miksuba b'tessuti ħajjin esposti għar-riduċent tal-MTT nieqes it-tnaqqis tal-MTT mhux speċifiku perċentwali miksub bit-tessuti maqtula esposti għall-istess

riduċent tal-MTT, ikkalkolat b'rabta mas-sessjoni ta' kontroll negattiv b'mod konkorrenti għat-test li jkun qed jiġi kkoreġut ( %NSMTT).

27. Biex tiġi identifikata interferenza potenzjali mis-sustanzi kimiċi tat-test ikkuluriti jew mis-sustanzi kimiċi tat-test li jitlewnu meta jidhlu f'kontatt mal-ilma jew mal-isopropanol u tittiehed deċiżjoni dwar il-htieġa ta' kontrolli addizzjonali, għandha ssir analiżi spettrali tas-sustanza kimika tat-test fl-ilma (ambjent matul l-esponiment) u/jew fl-isopropanol (soluzzjoni tal-estrazzjoni). Jekk is-sustanza kimika tat-test fl-ilma u/jew fl-isopropanol tassorbi d-dawl fil-medda ta'  $570 \pm 30$  nm, għandhom isiru kontrolli ulterjuri tal-kolorant jew inkella għandha tintuża proċedura ta' spettrofotometrija tal-HPLC/UPLC f'liema każ dawn il-kontrolli ma jkunux meħtieġa (ara l-paragrafi 30 u 31). Meta jsir il-kejl tal-assorbanza standard (OD), kull sustanza kimika tat-test imlewna li tinterferixxi tiġi applikata fuq tal-anqas żewġ repliki tat-tessut vijabbli għal kull hin ta' esponiment, li jsir ilhom it-test shiħ tal-korrużjoni tal-gilda iżda jiġu inkubati b'medium minflok b'soluzzjoni tal-MTT matul l-istadju tal-inkubazzjoni tal-MTT biex jiġġeneraw kontroll tal-kulur mhux speċifiku (NSC<sub>living</sub>). Il-kontroll tal-NSC<sub>living</sub> irid jitwettaq fl-istess hin għal kull hin tal-esponiment għal kull sustanza kimika tat-test ikkulurita (f'kull sessjoni) minhabba l-varjabbiltà bijoloġika inerenti tat-tessuti ħajjin. Imbagħad il-vijabbiltà vera tat-tessuti tiġi kkalkolata bħala l-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali miksuba b'tessuti ħajjin esposti għas-sustanza kimika tat-test interferenti u inkubati bis-soluzzjoni MTT nieqes il-kulur mhux speċifiku perċentwali miksub bit-tessuti ħajjin esposti għas-sustanza kimika tat-test interferenti u inkubati b'medium mingħajr MTT, imwettqa fl-istess hin bħat-test li jkun qed jiġi kkoreġut (%NSC<sub>living</sub>).
28. Is-sustanzi kimiċi tat-test li jiġu identifikati bħala li jipproduċu tnaqqis dirett tal-MTT (ara l-paragrafu 26) u interferenza tal-kulur (ara l-paragrafu 27) se jkunu jeħtieġu t-tielet sett ta' kontrolli wkoll, minbarra l-kontrolli tal-NSMTT u tal-NSC<sub>living</sub> deskritti fil-paragrafi ta' qabel, meta jitwettaq il-kejl tal-assorbanza standard (OD). Normalment dan ikun il-każ b'sustanzi kimiċi tat-test ikkuluriti skuri li jinterferixxu mal-assaġġ tal-MTT (eż. blu, vjola, suwed) minhabba li l-kulur intrinsiku tagħhom ixekkel il-valutazzjoni tal-kapaċità tagħhom li jnaqqsu b'mod dirett l-MTT kif deskritt fil-paragrafu 26. Dawn is-sustanzi kimiċi tat-test jistgħu jitgħaqqdu kemm ma' tessuti ħajjin kif ukoll ma' dawk maqtula u, għalhekk, il-kontroll tal-NSMTT jaf ma jikkoreġix biss għat-tnaqqis potenzjali dirett tal-MTT mis-sustanza kimika tat-test, iżda anki għall-interferenza tal-kulur li tirriżulta mit-tgħaqqid tas-sustanza kimika tat-test mat-tessuti maqtula. Dan jista' jwassal għal korrezzjoni doppja għall-interferenza tal-kulur peress li l-kontroll tal-NSC<sub>living</sub> diġà jikkoreġi għall-interferenza tal-kulur li tirriżulta mit-tgħaqqid tas-sustanza kimika tat-test mat-tessuti ħajjin. Biex tiġi evitata korrezzjoni doppja possibbli għall-interferenza tal-kulur, irid isir it-tielet kontroll għal kulur mhux speċifiku f'tessuti maqtula (NSC<sub>killed</sub>). F'dan il-kontroll addizzjonali, is-sustanza kimika tat-test tiġi applikata fuq tal-anqas żewġ repliki tat-tessuti maqtula għal kull hin tal-esponiment, li ssir ilhom il-proċedura tal-itestjar shiħa iżda jiġu inkubati b'medium minflok is-soluzzjoni tal-MTT matul l-istadju tal-inkubazzjoni tal-MTT. Kontroll tal-NSC<sub>killed</sub> wiehed hu biżżejjed għal kull sustanza kimika tat-test indipendentement min-numru ta' testijiet/sessjonijiet indipendenti

mwettqa, izda ghandu jsir fl-istess hin mal-kontroll tal-NSMTT u, fejn possibbli, bl-istess lott ta' tessuti. Imbagħad il-vijabbiltà vera tat-tessuti tiġi kkalkolata bħala l-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali miksuba b'tessuti ħajjin esposti għas-sustanza kimika tat-test nieqes il- %NSMTT nieqes il-%NSC<sub>living</sub> flimkien mal-kulur mhux speċifiku perċentwali miksub bit-tessuti maqtula esposti għas-sustanza kimika tat-test interferenti u inkubati b'medium mingħajr MTT, ikkalkolati b'rabta mas-sessjoni tal-kontroll negattiv imwettqa fl-istess hin bħat-test li jkun qed jiġi kkoreġut (%NSC<sub>killed</sub>).

29. Ta' min jinnota li t-tnaqqis tal-MTT mhux speċifiku u l-interferenzi tal-kulur mhux speċifiku jistgħu jżidu l-kejl tal-estratt tat-tessut f'livell oġġla mill-medda tal-linearità tal-ispettrofotometru. Fuq din il-bażi, kull laboratorju għandu jiddetermina l-medda tal-linearità tal-ispettrofotometru tiegħu bil-formażan tal-MTT (CAS # 57360-69-7) minn sors kummerċjali qabel il-bidu tal-ittestjar tas-sustanzi kimiċi tat-test għal finijiet regolatorji. B'mod partikolari, il-kejl tal-assorbanza standard (OD) bl-użu tal-ispettrofotometru hu xieraq biex jiġu vvalutati r-riduċenti diretti tal-MTT u s-sustanzi kimiċi tat-test interferenti tal-kulur meta l-ODs tal-estratti tat-tessuti miksuba bis-sustanza kimika tat-test mingħajr ebda korrezzjoni għal tnaqqis dirett tal-MTT u/jew għal interferenza tal-kulur ikunu fi hdan il-medda lineari tal-ispettrofotometru jew meta l-vijabbiltà perċentwali mhux ikkoreġuta miksuba bis-sustanza kimika tat-test diġà tkun iddefinietha bħala korrużiva (ara l-paragrafi 35 u 36). Minkejja dan, ir-riżultati għas-sustanzi kimiċi tat-test li jipproduċu %NSMTT u/jew %NSC<sub>living</sub> > 50 % tal-kontroll negattiv għandhom jittieħdu bil-galbu.
30. Għal sustanzi kimiċi tat-test ikkuluriti li ma jkunux kompatibbli mal-kejl tal-assorbanza standard (OD) minħabba interferenza qawwija wisq mal-assaġġ MTT, tista' tithaddem il-proċedura alternattiva tal-ispettrofotometrija HPLC/UPLC biex jitkejjel il-formażan MTT (ara l-paragrafu 31) (37). Is-sistema tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC tippermetti s-separazzjoni tal-formażan MTT mis-sustanza kimika tat-test qabel il-kwantifikazzjoni tiegħu (38). Għal din ir-raġuni, il-kontrolli tal-NSC<sub>living</sub> jew tal-NSC<sub>killed</sub> qatt ma jkun meħtieġa meta tintuża l-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC, indipendentement mis-sustanza kimika li tkun qed tiġi ttestjata. Il-kontrolli tal-NSMTT xorta waħda għandhom jintużaw jekk is-sustanza kimika tat-test tkun suspettata li tnaqqas b'mod dirett l-MTT jew ikollha kulur li jimpedixxi l-valutazzjoni tal-kapaċità ta' tnaqqis dirett tal-MTT (kif deskritt fil-paragrafu 26). Meta tintuża l-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC biex jitkejjel il-formażan MTT, il-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali tiġi kkalkolata bħala l-oġġla erja perċentwali tal-formażan MTT miksuba b'tessuti ħajjin esposti għas-sustanza kimika tat-test meta mqabbla mal-oġġla erja tal-formażan MTT miksuba bil-kontroll negattiv konkorrenti. Għal sustanzi kimiċi tat-test li kapaċi jnaqqsu l-MTT b'mod dirett, il-vijabbiltà vera tat-tessuti tiġi kkalkolata bħala l-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali miksuba b'tessuti ħajjin esposti għas-sustanza kimika tat-test nieqes il- %NSMTT. Finalment, ta' min jinnota li r-riduċenti diretti tal-MTT li jistgħu jkun interferenti tal-kulur ukoll, li jinżammu fit-tessuti wara t-trattament u jnaqqsu l-MTT b'tant saħħa li jwasslu għal Ods (bl-użu ta' kejl standard tal-ODs) jew l-oġġla erjas (bl-użu tal-ispettrofotometrija tal-UPLC/HPLC) tal-estratti tat-tessuti ttestjati li jaqgħu barra mill-medda tal-linearità tal-ispettrofotometru ma

jistgħux jiġu vvalutati, għalkemm dawn ikunu mistennija jseħħu f'sitwazzjonijiet rari hafna biss.

31. L-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC tista' tintuża wkoll bit-tipi kollha ta' sustanzi kimiċi tat-test (ikkuluriti, mhux ikkuluriti, riduċenti tal-MTT u mhux riduċenti tal-MTT) għall-kejl tal-formażan MTT (38). Minhabba d-diversità tas-sistemi tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC, il-kwalifikazzjoni tas-sistema tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC għandha tintwera qabel l-użu tagħha għall-kwantifikazzjoni tal-formażan MTT mill-estratti tat-tessuti bl-issodisfar tal-kriterji ta' aċċettazzjoni għal sett ta' parametri standard ta' kwalifikazzjoni fuq il-bażi ta' daww deskritti fil-gwida tal-Food and Drug Administration tal-Istati Uniti għall-industrija fuq il-validazzjoni tal-metodi bijoanalitiċi (38)(39). Dawn il-parametri importanti u l-kriterji ta' aċċettazzjoni tagħhom jintwerew fl-Appendiċi 4. Ladarba jiġu ssodisfati l-kriterji ta' aċċettazzjoni definiti fl-Appendiċi 4, is-sistema tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC titqies kwalifikata u lesta biex tkejjel il-formażan MTT fil-kundizzjonijiet sperimentali deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar.

### **Kriterji ta' Aċċettabilità**

32. Għal kull metodu ta' ttestjar li juża mudelli validi tal-RhE, it-tessuti trattati bil-kontroll negattiv għandhom jesibixxu OD li tirrifletti l-kwalità tat-tessuti kif deskritta fit-tabella 2 u ma għandhomx ikunu anqas mil-limiti storikament stabbiliti. Tessuti trattati bil-PC, jiġifieri aċidu aċetiku glaċjali jew 8N KOH, għandhom jirriflettu l-hila tat-tessuti li jirrispondu għal sustanza kimika korrużiva fil-kundizzjonijiet tal-mudell tat-test (ara l-Appendiċi 2). Il-varjabbiltà bejn ir-repliki tat-tessuti tas-sustanza kimika tat-test u/jew tas-sustanzi kimiċi tal-kontroll għandha taqa' fi hdan il-limiti aċċettati għal kull rekwiżit validu tal-mudell tal-RhE (ara l-Appendiċi 2) (eż. id-differenza tal-vijabbiltà bejn iż-żewġ repliki tat-tessuti ma għandhiex taqbeż it-30 %). Jekk il-kontroll negattiv jew il-PC inkluz f'sessjoni jaqa' barra mill-meded aċċettati, is-sessjoni titqies li mhix kwalifikata u għandha tigi ripetuta. Jekk il-varjabbiltà tas-sustanzi kimiċi tat-test taqa' barra mill-medda definita, l-ittestjar tagħha għandu jerga' jsir.

### **Interpretazzjoni tal-Mudell tar-Riżultati u tat-Tbassir**

33. Il-valuri tal-OD miksuba għal kull sustanza kimika tat-test għandhom jintużaw biex jiġi kkalkolat il-perċentwal tal-vijabbiltà relattiva għall-kontroll negattiv, li hi stabbilita għal 100 %. F'każ li tintuża l-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC, il-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali tigi kkalkolata bhala l-ogħla erja perċentwali tal-formażan MTT miksuba b'tessuti hajjin esposti għas-sustanza kimika tat-test meta mqabbla mal-ogħla erja tal-formażan MTT miksuba bil-kontroll negattiv konkorrenti. Il-valuri perċentwali ta' limitu tal-vijabbiltà taċ-ċelloli li jiddistingwu sustanza kimika tat-test korrużiva minn waħda mhux korrużiva (jew li jiddiskriminaw bejn subkategoriji korrużivi differenti) huma definiti hawn taht fil-paragrafi 35 u 36 għal kull wieħed mill-mudelli tat-testijiet koperti minn dan il-metodu ta' ttestjar u għandhom jintużaw għall-interpretazzjoni tar-riżultati.



34. Sessjoni waħda ta' ttestjar magħmula minn tal-anqas żewġ repliki tat-tessuti għandha tkun biżżejjed għal sustanza kimika tat-test meta l-klassifikazzjoni li tirriżulta tkun inekwivokabbli. Madankollu, f'każijiet ta' riżultati li joqorbu hafna lejn il-limitu, bħal pereżempju kejl irreplikat mhux konkordanti, tista' tiġi kkunsidrata t-tieni sessjoni, kif ukoll it-tielet waħda f'każ ta' riżultati mhux konkordanti bejn l-ewwel żewġ sessjonijiet.
35. Il-mudell ta' tbassir għall-metodu ta' ttestjar tal-korrużjoni EpiSkin™ (9)(34)(22), assoċjat mas-sistema ta' klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU/tas-CLP, hu muri fit-Tabella 4:

**Tabella 4:** Mudell ta' tbassir EpiSkin™

| Il-vijabbiltà mkejla wara l-punti tal-hin tal-esponiment (t=3, 60 u 240 minuta)                                                                                    | It-tbassir li għandu jiġi kkunsidrat                                  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| < 35 % wara esponiment ta' 3 min                                                                                                                                   | <b>Korrużivi:</b><br>• Subkategorija fakultattiva 1A*                 |
| ≥ 35 % wara esponiment ta' 3 min U<br>< 35 % wara esponiment ta' 60 min<br><b>JEW</b><br>≥ 35 % wara esponiment ta' 60 min U<br>< 35 % wara esponiment ta' 240 min | <b>Korrużivi:</b><br>• Tahlita tas-subkategoriji fakultattivi 1B-u-1C |
| ≥ 35 % wara esponiment ta' 240 min                                                                                                                                 | <b>Mhux korrużivi</b>                                                 |

\*) Skont id-data ġġenerata fid-dawl tal-valutazzjoni tal-utilità tal-mudelli ta' ttestjar tal-RhE għas-sostenn tas-subkategorizzazzjoni, intwera li madwar 22 % tar-riżultati tas-subkategorija 1A tal-mudell tat-test EpiSkin™ jistgħu fil-fatt jikkostitwixxu sustanzi/tahlitiet tas-subkategorija 1B jew tas-subkategorija 1C (jiġifieri sovraklassifikazzjonijiet) (ara l-Appendiċi 3).

36. Il-mudelli ta' tbassir għall-mudelli ta' ttestjar għall-korrużjoni tal-ġilda EpiDerm™ SCT (10)(23)(35), SkinEthiC™ RHE (17)(18) (23) (36), u epiCS® (16)(23)(37) assoċjati mas-sistema ta' klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU/tas-CLP, huma murija fit-Tabella 5:

**Tabella 5:** EpiDerm™ SCT, SkinEthiC™ RHE u epiCS®

| Il-vijabbiltà mkejla wara l-punti tal-hin tal-esponiment (t=3 60 minuta)                              | It-tbassir li għandu jiġi kkunsidrat |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| <b>STADJU 1 għal EpiDerm™ SCT, għal SkinEthiC™ RHE u għal epiCS®</b>                                  |                                      |
| < 50 % wara esponiment ta' 3 min                                                                      | <b>Korrużiv</b>                      |
| ≥ 50 % wara esponiment ta' 3 min U<br>< 15 % wara esponiment ta' 60 min                               | <b>Korrużiv</b>                      |
| ≥ 50 % wara esponiment ta' 3 min U<br>≥ 15 % wara esponiment ta' 60 min                               | <b>Mhux korrużivi</b>                |
| <b>STADJU 2 għal EpiDerm™ SCT - għal sustanzi/tahlitiet identifikati bħala Korrużivi fl-istadju 1</b> |                                      |

|                                                                                                         |                                                |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| < 25 % wara esponiment ta' 3 min                                                                        | Subkategorija fakultattiva 1A *                |
| ≥ 25 % wara esponiment ta' 3 min                                                                        | Taħlita tas-subkategoriji fakultattivi 1B u 1C |
| <b>STADJU 2 għal SkinEthic™ RHE - għal sustanzi/tahlitiet identifikati bħala Korrużivi fl-istadju 1</b> |                                                |
| < 18 % wara esponiment ta' 3 min                                                                        | Subkategorija fakultattiva 1A *                |
| ≥ 18 % wara esponiment ta' 3 min                                                                        | Taħlita tas-subkategoriji fakultattivi 1B u 1C |
| <b>STADJU 2 għal epiCS® - għal sustanzi/tahlitiet identifikati bħala Korrużivi fl-istadju 1</b>         |                                                |
| < 15 % wara esponiment ta' 3 min                                                                        | Subkategorija fakultattiva 1A *                |
| ≥ 15 % wara esponiment ta' 3 min                                                                        | Taħlita tas-subkategoriji fakultattivi 1B u 1C |

## DATA U RAPPORTAR

### Data

37. Għal kull test, id-*data* minn repliki tat-tessuti individwali (eż. valuri tal-OD u *data* dwar il-perċentwal ikkalkolat ta' vijabbiltà taċ-ċelloli għal kull sustanza kimika tat-test, inkluża l-klassifikazzjoni) għandha tiġi rrapportata f'forma tabulari, inkluża d-*data* minn esperimenti ripetuti, kif ikun xieraq. Barra minn hekk, għandhom jiġu rrapportati l-medji u l-meded tal-vijabbiltà u s-CVs bejn ir-repliki tat-tessuti għal kull test. Interazzjonijiet osservati bir-reagent MTT b'riduċenti diretti tal-MTT jew b'sustanzi kimiċi tat-test ikkuluriti għandhom jiġu rrapportati għal kull sustanza kimika ttestjata.

### Rapport tat-test

38. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

#### Sustanza Kimika tat-Test u Sustanzi Kimiċi tal-Kontroll:

- Sustanza monokostitwenti: l-identifikazzjoni kimika, bħall-isem IUPAC jew CAS, in-numru CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ;
- Sustanza multikostitwenti, UVCB u taħlita: ikkaratterizzati sa fejn possibbli mill-identità kimika (ara aktar 'il fuq), l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprietajiet fizikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti;
- Id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma, u kwalunkwe proprietà fizikokimika rilevanti addizzjonali;

- Is-sors, in-numru tal-lott jekk disponibbli;
- It-trattament tas-sustanza kimika tat-test/tas-sustanza tal-kontroll qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (eż., it-tishin, it-thin);
- L-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test, id-data ta' limitu għall-użu, jew id-data għall-analizi mill-ġdid, jekk magħrufa;
- Il-kundizzjonijiet tal-hżin.

*Il-mudell u l-protokoll tal-RhE użati u l-hsieb warajhom (jekk applikabbli)*

*Kundizzjonijiet tat-Test:*

- Il-mudell tal-RhE użat (inkluż in-numru tal-lott);
- Informazzjoni dwar il-kalibrazzjoni għall-apparat tal-kejl (eż. spettrofotometru), it-tul ta' mewġa u l-band pass (jekk applikabbli) użati għall-kwantifikazzjoni tal-formażen MTT, u l-medda tal-linearità tal-apparat tal-kejl;
- Deskrizzjoni tal-metodu użat għall-kwantifikazzjoni tal-formażen MTT;
- Deskrizzjoni tal-kwantifikazzjoni tas-sistema tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC, jekk applikabbli;
- Informazzjoni ta' appoġġ kompluta għall-mudell tal-RhE speċifiku użat inkluża l-prestazzjoni tiegħu. Din għandha tinkludi, iżda ma għandhiex tkun limitata għal:
  - i) Il-vijabbiltà;
  - ii) Il-funzjoni ta' protezzjoni;
  - iii) Il-morfologija;
  - iv) Ir-riproduċibbiltà u l-kapaċità ta' tbassir;
  - v) Il-kontrolli tal-kwalità (QC) tal-mudell;
- Referenza għad-*data* storika tal-mudell. Din għandha tinkludi, iżda ma għandhiex tkun limitata għal
- aċċettabbiltà tad-*data* dwar il-QC b'referenza għad-*data* storika tal-lott;
- Wiri ta' profiċjenza fit-twettiq tal-metodu ta' ttestjar qabel użu ta' rutina bl-ittestjar tas-sustanzi ta' profiċjenza.

*Proċedura tat-Test:*

- Dettalji tal-proċedura tat-test użata (inklużi l-proċeduri ta' hasil użati wara l-perjodu ta' esponiment);
- Dożi tas-sustanza kimika tat-test u tas-sustanzi kimiċi tal-kontroll użati;
- Id-durata tal-perjodu/i tal-esponiment u t-temperatura/i tal-esponiment;
- Indikazzjoni tal-kontrolli użati għal riduċenti diretti tal-MTT u/jew sustanzi kimiċi tat-test li jerġu l-kulur, jekk applikabbli;
- In-numru ta' repliki tat-tessuti użati għal kull sustanza kimika tat-test u kontroll (PC, kontroll negattiv, u NSMTT, NSCliving u NSCKilled, jekk applikabbli), għal kull hin tal-esponiment;
- Deskrizzjoni tal-kriterji tad-deċiżjonijiet/tal-mudell tat-tbassir applikati fuq il-bażi tal-mudell tal-RhE użat;
- Deskrizzjoni ta' kwalunkwe modifika tal-proċedura tat-test (inklużi l-proċeduri tal-hasil).

*Kriterji ta' Aċċettazzjoni tas-Sessjoni u tat-Test:*

- Il-valuri medji tal-kontrolli pożittivi u negattivi u l-meded tal-aċċettazzjoni fuq il-bażi tad-*data* storika;
- Il-varjabbiltà aċċettabbli bejn ir-repliki tat-tessuti għall-kontrolli pożittivi u negattivi;
- Il-varjabbiltà aċċettabbli bejn ir-repliki tat-tessuti għas-sustanza kimika tat-test.

*Ir-riżultati:*

- Tabultazzjoni tad-*data* għal sustanzi kimiċi tat-test u għal kontrolli individwali, għal kull perjodu ta' esponiment, kull sessjoni u kull kejl tar-repliki inklużi l-OD jew l-oghla erja tal-formażan MTT, il-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali, il-vijabbiltà perċentwali medja tat-tessuti, id-differenzi bejn ir-repliki, l-SDs u/jew is-CVs jekk applikabbli;
- Jekk applikabbli, ir-riżultati tal-kontrolli użati għar-riduċenti diretti tal-MTT u/jew is-sustanzi kimiċi tat-test li jerġu l-kulur inklużi l-OD jew l-oghla erja tal-formażan MTT, %NSMTT, %NSCliving, %NSCKilled, id-differenzi bejn ir-repliki tat-tessuti, l-SDs u/jew is-CVs (jekk applikabbli), u l-vijabbiltà perċentwali korretta finali tat-tessuti;
- Ir-riżultati miksuba bis-sustanza/i kimika/kimiċi tat-test u bis-sustanzi kimiċi tal-kontroll b'rabta mas-sessjoni definita u mal-kriterji ta' aċċettazzjoni tat-test;
- Deskrizzjoni ta' effetti oħra osservati;

- Il-klassifikazzjoni derivata b'referenza għall-mudell ta' tbassir/għall-kriterji tad-deċiżjoni użati.

*Diskussjoni tar-riżultati*

*Konklużjonijiet*

## DOKUMENTAZZJONI

- (1) NU (2013). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth Revised Edition, NU New York u Ġinevra. Disponibbli fuq: [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) Il-Kapitolu B.4 ta' dan l-Anness, Irritazzjoni, Korrużjoni Dermal Akuta.
- (3) Il-Kapitolu B.40 ta' dan l-Anness, Korrużjoni tal-Ġilda *In Vitro*.
- (4) Il-Kapitolu B.65 ta' dan l-Anness, Metodu ta' Ttestjar tal-Barriera tal-Membrana *In Vitro*.
- (5) Il-Kapitolu B.46 ta' dan l-Anness, Irritazzjoni tal-Ġilda *In Vitro*: Metodu ta' Ttestjar tal-Epidermis Uman Rikostitwit.
- (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) Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.
- (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., u 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., u 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., u 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. u 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. u 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. 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), EPI-SKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangolu Park, NC, USA.
- (14) EC-ECVAM (1998). Dikjarazzjoni dwar il-Validità Xjenetifika tat-Test EpiSkin™ (Test *In Vitro* għall-Korrużività tal-Ġilda), Maħruġa mill-Kumitat Konsultattiv Xjentifiku tal-ECVAM (ESAC10), 3 ta' April 1998.
- (15) EC-ECVAM (2000). Dikjarazzjoni dwar l-Applikazzjoni tal-Mudell tal-Ġilda Umana EpiDerm™ għall-Ittestjar tal-Korrużività tal-Ġilda, Maħruġa mill-Kumitat Konsultattiv Xjentifiku tal-ECVAM (ESAC14), 21 ta' Marzu 2000.
- (16) Hoffmann J., Heisler E., Karpinski S., Losse J., Thomas D., Siefken W., Ahr H.J., Vohr H.W. u 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., u 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. u Fraissinette A.B. (2010). Adaptation of the Validated SkinEthic™ Reconstructed Human Epidermis (RHE) Skin Corrosion Test Method to 0,5 cm<sup>2</sup> Tissue Sample. *Toxicol. In Vitro* 24: 1379-1385.
- (19) EC-ECVAM (2006). Dikjarazzjoni dwar l-Applikazzjoni tal-Mudell tal-Ġilda Umana SkinEthic™ għall-Ittestjar tal-Korrużività tal-Ġilda, Maħruġa mill-Kumitat Konsultattiv Xjentifiku tal-ECVAM (ESAC25), 17 ta' Novembru 2006.
- (20) EC-ECVAM (2009). Dikjarazzjoni tal-ESAC dwar il-Validità Xjentifika ta' Metodu ta' Ttestjar *In-Vitro* għall-Ittestjar tal-Korrużività tal-Ġilda: l-EST-1000, Maħruġa mill-Kumitat Konsultattiv Xjentifiku tal-ECVAM (ESAC30), 12 ta' Ġunju 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). Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.
- (22) Alépée N., Grandidier M.H., u 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., u 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). Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi
- (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), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.
- (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*. Fi: *In Vitro Skin Toxicology*. Rougier A., Goldberg A.M u Maibach H.I. (Eds): 133-140.
- (29) Cannon C. L., Neal P.J., Southee J.A., Kubilus J. u Klausner M. (1994), New Epidermal Model for Dermal Irritancy Testing. *Toxicol.in Vitro* 8:889 - 891.
- (30) Ponc M., Boelsma E, Weerheim A, Mulder A, Bouwstra J u 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. u 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 u 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 u Parenteau N.L. (1994). Development of a Bilayered Living Skin Construct for Clinical Applications. *Biotech. Bioeng.* 43/8:747-756.
- (34) EpiSkin™ SOP (Dicembre 2011). *INVITTOX* Protocol (No 118). EpiSkin™ Skin Corrosivity Test.
- (35) EpiDerm™ SOP (Frar 2012). Verżjoni 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 (Jannar 2012). *INVITTOX* Protocol SkinEthic™ Skin Corrosivity Test.
- (37) EpiCS® SOP (Jannar 2012). Verżjoni 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., u 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. (Mejju 2001). Disponibbli fuq: [\[http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf\]](http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf).

## Appendiċi 1

### DEFINIZZJONIJIET

**Akkuratezza:** Il-qrubija fil-livell ta' qbil bejn ir-riżultati tal-metodu ta' ttestjar u l-valuri referenzjarji aċċettati. Hi kejl tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar u wieħed mill-aspetti ta' rilevanza. Spiss it-terminu jintuża b'mod alternanti ma' "konkordanza" biex ifisser il-proporzjon ta' riżultati korretti ta' metodu ta' ttestjar (25).

**Vijabbiltà taċ-ċelloli:** Il-parametru li jkejjel l-attività shiġa tal-popolazzjoni ċellulari *eż.* il-kapaċità tad-deidroġenazi mitokondrijali ċellulari biex titnaqqas is-sustanza koloranti vitali MTT ([bromur tat-3-(4,5-Dimetiltijazol 1-2-il)-2,5-difeniltetrazolu, blu Tijazolil;), li, skont il-punt ta' tmiem imkejjel u d-disinn tat-test użat, jikkorrispondi għall-għadd totali u/jew għall-vitalità taċ-ċelloli ħajjin.

**Sustanza kimika:** Sustanza jew taħlita.

**Konkordanza:** Dan hu kejl tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar għal metodi ta' ttestjar li jagħtu riżultat kategoriku, u hu aspett wieħed tar-rilevanza. It-terminu kultant jintuża b'mod interkambjabbli mal-akkuratezza, u hu definit bħala l-proporzjon tas-sustanzi kimiċi kollha ttestjati li jiġu klassifikati kif suppost bħala pożittivi jew negattivi. Il-konkordanza hi ferm dipendenti fuq il-prevalenza tal-pożittivi fit-tipi ta' sustanzi kimiċi tat-test li jkunu qed jiġu eżaminati (25).

**ET<sub>50</sub>:** Jista' jiġi smat bid-determinazzjoni tal-hin tal-esponiment mehtieg biex il-vijabbiltà taċ-ċelloli titnaqqas b'50 % mal-applikazzjoni tas-sustanza kimika ta' riferiment f'konċentrazzjoni speċifikata fissa, ara wkoll IC<sub>50</sub>.

**GHS (Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi):** Sistema li tipproponi l-klassifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi (sustanzi u taħlitiet) skont it-tipi u l-livelli standardizzati ta' perikli fiżiċi, sanitarji u ambjentali, u tindirizza l-elementi ta' komunikazzjoni korrispondenti, bħal pittogrammi, kliem ta' twissija, dikjarazzjonijiet ta' periklu, dikjarazzjonijiet ta' prekawzjoni u skedi ta' data dwar is-sikurezza, biex jitwassal tagħrif dwar l-effetti avversi bil-għan li n-nies ikunu protetti (inklużi min iħaddem, il-ħaddiema, it-trasportaturi, il-konsumaturi u min jintervjeni f'emergenza) u l-ambjent (1).

**HPLC:** Kromatografija Likwida ta' Prestazzjoni Għolja.

**IATA:** Approċċ Integrat għall-Ittestjar u għall-Valutazzjoni

**IC<sub>50</sub>:** Tista' tiġi stmata bid-determinazzjoni tal-koncentrazzjoni li fiha sustanza kimika ta' riferiment tnaqqas il-vijabbiltà tat-tessuti b'50 % (IC<sub>50</sub>) wara hin ta' esponiment fiss, ara wkoll ET<sub>50</sub>.

**Doża infinita:** Ammont tas-sustanza kimika tat-test applikata għall-*epidermis* lil hinn mill-ammont mehtieg biex tinkesa b'mod shiħ u uniformi s-superfiċje tal-*epidermis*. **Tahlita:** Tahlita jew soluzzjoni msawra minn żewġ sustanzi jew aktar li fiha ma jirreaġixxux.

**Sustanza monokostitwenti:** Sustanza, definita mill-kompożizzjoni kwantitattiva tagħha, li fiha kostitwent ewlieni wiehed ikun preżenti għal tal-anqas 80 % (w/w).

**MTT:** Bromur tat-3-(4,5-Dimetiltjażol-2-il)-2,5-difeniltetrażolju; Bromur tat-tetrażolju tal-blu tjazolil.

Sustanza multikostitwenti: Sustanza, definita mill-kompożizzjoni kwantitattiva tagħha, li fiha aktar minn kostitwent ewlieni wiehed ikunu preżenti f'koncentrazzjoni > 10 % (w/w) u < 80 % (w/w). Sustanza multikostitwenti hi r-riżultat ta' proċess tal-manifattura. Id-differenza bejn tahlita u sustanza multikostitwenti hi li tahlita tinkiseb bit-thallit ta' żewġ sustanzi jew aktar mingħajr reazzjoni kimika. Sustanza multikostitwenti hi r-riżultat ta' reazzjoni kimika.

**NC:** Mhux korrużiva.

**Kontroll tal-NSC<sub>killed</sub>:** Kontroll tal-Kulur Mhux Speċifiku f'tessuti maqtula.

**Kontroll tal-NSC<sub>living</sub>:** Kontroll tal-Kulur Mhux Speċifiku f'tessuti ħajjin.

**NSMTT:** Tnaqqis fl-MTT Mhux Speċifiku.

**OD:** Densità Ottika

**PC:** Kontroll Pożittiv, Replika li jkun fiha l-komponenti kollha ta' sistema tat-test u trattata b'sustanza kimika li jkun magħruf li tikkawża reazzjoni pożittiva. Biex jiġi żgurat li l-varjabbiltà fir-rispons tal-kontroll pożittiv tkun tista' tiġi vvalutata tul iż-żmien, id-daqs tar-rispons pożittiv ma għandux ikun eċċessiv.

**Standards tal-prestazzjoni (PS):** Standards, ibbażati fuq metodu ta' ttestjar validu, li jipprovdu bażi għall-evalwazzjoni tal-komparabbiltà ta' metodu ta' ttestjar propost li hu simili b'mod funzjonali u mekkanistiku. Hemm inkluzi; (i) il-komponenti essenzjali tal-metodi ta' ttestjar; (ii) lista minima ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza magħżula minn fost is-sustanzi kimiċi użati biex tintwera l-prestazzjoni aċċettabbli tal-metodu ta' ttestjar validat; u (iii) il-livelli simili ta' affidabbiltà u ta' akkuratizza, fuq il-bażi ta' dak li nkiseb għall-metodu ta' ttestjar validat, li l-metodu ta' ttestjar propost għandu juri meta evalwat bl-użu tal-lista minima ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza (25).

**Rilevanza:** Deskrizzjoni tar-relazzjoni tal-metodu ta' ttestjar mal-effett ta' interess u jekk huwiex sinifikanti u utli għal skop partikolari. Din tiddetermina kemm il-metodu ta' ttestjar għandu l-hila jkejjel jew ibassar b'mod korrett l-effett bijoloġiku ta' interess. Ir-rilevanza tinkorpora l-kunsiderazzjoni tal-akkuratezza (konkordanza) ta' metodu ta' ttestjar (25).

**Affidabbiltà:** Kejljiet ta' kemm metodu ta' ttestjar jista' jitwettag b'mod riprodubbli fil-laboratorji u bejn il-laboratorji tul iż-żmien, meta jitwettag billi jintuża l-istess protokoll. Din hi vvalutata billi tiġi kkalkolata r-riprodubbiltà fi hdan laboratorju u bejn laboratorju u ieħor (25).

**Sessjoni:** Sessjoni tikkonsisti f'sustanza kimika tat-test waħda jew aktar ittestjata flimkien ma' kontroll negattiv u ma' PC.

**Sensittività:** Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi pożittivi/attivi kollha li huma klassifikati kif suppost mill-metodu ta' ttestjar. Hi kejl tal-preċiżjoni għal metodu ta' ttestjar li jipproduċi riżultati kategorici, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' metodu ta' ttestjar (25).

**Korrużjoni tal-ġilda *in vivo*:** Il-produzzjoni ta' dannu irriversibbli fil-ġilda; jiġifieri nekrozi viżibbli mill-*epidermis* u ġewwa d-*dermis*, wara l-applikazzjoni ta' sustanza kimika tat-test għal mhux aktar minn erba' sigħat. Ir-reazzjonijiet korrossivi huma kkaratterizzati minn ulċeri, fsad, qxur bid-demm, u, fit-tmiem tal-osservazzjoni fl-14-il jum, minn skulurazzjoni minhabba t-tibjid tal-ġilda, żoni sħaħ b'alopecja, u ċikatriċi. L-istopatoloġija għandha titqies biex jiġu evalwati leżjonijiet li dwarhom hemm dubju.

**Speċifità:** Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi negattivi/inattivi kollha li huma klassifikati kif suppost mill-metodu ta' ttestjar. Hi kejl tal-preċiżjoni għal metodu ta' ttestjar li jipproduċi riżultati kategorici, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' metodu ta' ttestjar (25).

**Sustanza:** Element kimiku u l-komposti tiegħu fl-istat naturali jew mislut minn kwalunkwe proċess ta' produzzjoni, li jinduċi kull addittiv neċessarju għall-preżervazzjoni tal-istabbiltà

tiegħu u kwalunkwe impurità li tirriżulta mill-proċess użat, iżda bl-esklużjoni ta' kull solvent li jista' jkun separat mingħajr ma tkun effettwata l-istabbiltà tas-sustanza jew mibdula l-kompożizzjoni tagħha. **Sustanza kimika tat-test:** Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

**UPLC:** Kromatografija Likwida ta' Prestazzjoni Għolja Hafna.

**UVCB:** sustanzi b'kompożizzjoni varjabbli jew mhux magħrufa, prodotti jew materjali bijoloġiċi b'reazzjoni kumplessa.

## Appendiċi 2

### KOMPONENTI EWLENIN TAL-MUDELLI TAT-TEST TAL-RHE VALIDATI GHALL-ITTESTJAR TAL-KORRUŻJONI TAL-ĠILDA

| Komponenti<br>tal-Mudell tat-<br>Test | EpiSkin™                                 | EpiDerm™ SCT                               | SkinEthic™ RHE                           | epiCS®                                   |
|---------------------------------------|------------------------------------------|--------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|
| Superfiċje tal-<br>mudell             | 0,38 cm <sup>2</sup>                     | 0,63 cm <sup>2</sup>                       | 0,5 cm <sup>2</sup>                      | 0,6 cm <sup>2</sup>                      |
| Numru<br>repliki<br>tessuti           | Tal-anqas 2 għal kull hin tal-esponiment | Tal-anqas 2-3 għal kull hin tal-esponiment | Tal-anqas 2 għal kull hin tal-esponiment | Tal-anqas 2 għal kull hin tal-esponiment |

| Komponenti tal-Mudell tat-Test             | EpiSkin™                                                                                                                                                                                                                                       | EpiDerm™ SCT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | SkinEthic™ RHE                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | epiCS®                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|--------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Doži applikazzjoni tat-trattament</b>   | <p><u>Likwidi u viskużi</u>: 50 µl ± 3 µl (131,6 µl/cm²)</p> <p><u>Solidi</u>: 20 ± 2 mg (52,6 mg/cm²) + 100 µl ± 5µl soluzzjoni NaCl (9 g/l)</p> <p><u>Tax-xama'/iwehhl</u>: 50 ± 2 mg (131,6 mg/cm²) b'xibka tan-najlon</p>                  | <p><u>Likwidi</u>: 50 µl (79,4 µl/cm²) b'xibka tan-najlon jew minghajr</p> <p><i>Kompatibbiltà ta' qabel it-test tas-sustanza kimika tat-test b'xibka tan-najlon</i></p> <p><u>Semisolidi</u>: 50 µl (79,4 µl/cm²)</p> <p><u>Solidi</u>: 25 µl H<sub>2</sub>O (jew aktar jekk ikun hemm bżonn) + 25 mg (39,7 mg/cm²)</p> <p><u>Xama'</u>: biċċa ċatta “forma ta' diska” b'dijametru ta' madwar 8 mm imqiegħda fuq it-tessut imxarrab bi 15-il µl H<sub>2</sub>O.</p> | <p><u>Likwidi u viskużi</u>: 40 µl ± 3µl (80 µl/cm²) bl-użu ta' xibka tan-najlon</p> <p><i>Kompatibbiltà ta' qabel it-test tas-sustanza kimika tat-test b'xibka tan-najlon</i></p> <p><u>Solidi</u>: 20 µl ± 2µl H<sub>2</sub>O + 20 ± 3 mg (40 mg/cm²)</p> <p><u>Tax-xama'/iwehhl</u>: 20 ± 3 mg (40 mg/cm²) bl-użu ta' xibka tan-najlon</p> | <p><u>Likwidi</u>: 50 µl (83,3 µl/cm²) bl-użu ta' xibka tan-najlon</p> <p><i>Kompatibbiltà ta' qabel it-test tas-sustanza kimika tat-test b'xibka tan-najlon</i></p> <p><u>Semisolidi</u>: 50 µl (83,3 µl/cm²)</p> <p><u>Solidi</u>: 25 mg (41,7 mg/cm²) + 25 µl H<sub>2</sub>O (jew aktar jekk ikun hemm bżonn)</p> <p><u>Tax-xama'</u>: biċċa ċatta “forma ta' cookie” b'dijametru ta' madwar 8 mm imqiegħda fuq it-tessut imxarrab bi 15-il µl H<sub>2</sub>O</p> |
| <b>Kontroll qabel għat-tnaqqis tal-MTT</b> | <p>50 µl (likwidi) jew 20 mg (solidi) + 2 ml MTT</p> <p>soluzzjoni ta' 0,3 mg/ml għal 180 ± 5 min</p> <p>f'37°C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % RH</p> <p>→ jekk is-soluzzjoni ssir blu/vjola, għandhom isiru kontrolli adattati maqtula bl-ilma</p> | <p>50 µl (likwidi) jew 25 mg (solidi) + 1 ml MTT</p> <p>soluzzjoni ta' 1 mg/ml għal 60 min</p> <p>f'37°C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % RH</p> <p>→ jekk is-soluzzjoni ssir blu/vjola, għandhom isiru kontrolli adattati maqtula bil-friza</p>                                                                                                                                                                                                                            | <p>40 µl (likwidi) jew 20 mg (solidi) + 1 ml MTT</p> <p>soluzzjoni ta' 1 mg/ml għal 180± 15-il min f'37°C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % RH</p> <p>→ jekk is-soluzzjoni ssir blu/vjola, għandhom isiru kontrolli adattati maqtula bil-friza</p>                                                                                                    | <p>50 µl (likwidi) jew 25 mg (solidi) + 1 ml MTT</p> <p>soluzzjoni ta' 1 mg/ml għal 60 min</p> <p>f'37°C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % RH</p> <p>→ jekk is-soluzzjoni ssir blu/vjola, għandhom isiru kontrolli adattati maqtula bil-friza</p>                                                                                                                                                                                                                            |

| Komponenti tal-Mudell tat-Test                     | EpiSkin™                                                                                                                                                                  | EpiDerm™ SCT                                                                                                                                                                                        | SkinEthic™ RHE                                                                                                                                                                       | epiCS®                                                                                                                                                                                              |
|----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Kontroll qabel għall-interferenza tal-kulur</b> | 10 µl (likwidi) jew 10 mg (solidi) + 90 µl H <sub>2</sub> O mħallta għal 15-il min f'RT<br>→ jekk is-soluzzjoni tiegħi l-kulur, għandhom isiru kontrolli adattati għajjin | 50 µl (likwidi) jew 25 mg (solidi) + 300 µl H <sub>2</sub> O<br>għal 60 min f'37°C, 5 % CO <sub>2</sub> , 95 % RH<br>→ jekk is-soluzzjoni tiegħi l-kulur, għandhom isiru kontrolli adattati għajjin | 40 µl (likwidi) jew 20mg (solidi) + 300 µl H <sub>2</sub> O mħallta għal 60 min f'RT<br>→ jekk is-sustanza kimika tat-test tiegħi l-kulur, għandhom isiru kontrolli adattati għajjin | 50 µl (likwidi) jew 25 mg (solidi) + 300 µl H <sub>2</sub> O<br>għal 60 min f'37°C, 5 % CO <sub>2</sub> , 95 % RH<br>→ jekk is-soluzzjoni tiegħi l-kulur, għandhom isiru kontrolli adattati għajjin |
| <b>Hin u temperatura tal-esponiment</b>            | 3 min, 60 min (± 5 min)<br>u 240 min (± 10 min)<br>F'armarju ventilat<br>Temperatura Ambjentali (RT, 18-28°C)                                                             | 3 min f'RT, u 60 min<br>f'37°C, 5 % CO <sub>2</sub> , 95 % RH                                                                                                                                       | 3 min f'RT, u 60 min<br>f'37°C, 5 % CO <sub>2</sub> , 95 % RH                                                                                                                        | 3 min f'RT, u 60 min<br>f'37°C, 5 % CO <sub>2</sub> , 95 % RH                                                                                                                                       |
| <b>Tlahlh</b>                                      | 25 ml 1x PBS (2 ml/xeha)                                                                                                                                                  | 20 darba bi fluss artab kostanti ta' 1x PBS                                                                                                                                                         | 20 darba bi fluss artab kostanti ta' 1x PBS                                                                                                                                          | 20 darba bi fluss artab kostanti ta' 1x PBS                                                                                                                                                         |
| <b>Kontroll negattiv</b>                           | 50 µl soluzzjoni NaCl (9 g/l)<br>Ittestjat b'kull hin tal-esponiment                                                                                                      | 50 µl H <sub>2</sub> O<br>Ittestjat b'kull hin tal-esponiment                                                                                                                                       | 40 µl H <sub>2</sub> O<br>Ittestjat b'kull hin tal-esponiment                                                                                                                        | 50 µl H <sub>2</sub> O<br>Ittestjat b'kull hin tal-esponiment                                                                                                                                       |
| <b>Kontroll pożittiv</b>                           | 50 µl Aċidu aċetiku glaċjali<br>Ittestjat għal 4 sigħat biss                                                                                                              | 50 µl 8N KOH<br>Ittestjat b'kull hin tal-esponiment                                                                                                                                                 | 40 µl 8N KOH<br>Ittestjat għal siegħa (1) biss                                                                                                                                       | 50 µl 8N KOH<br>Ittestjat b'kull hin tal-esponiment                                                                                                                                                 |



| <b>Komponenti tal-Mudell tat-Test</b>           | <b>EpiSkin™</b>                                                                               | <b>EpiDerm™ SCT</b>                                                              | <b>SkinEthic™ RHE</b>                                                            | <b>epiCS®</b>                                                                    |
|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Soluzzjoni tal-MTT</b>                       | 2 ml 0,3 mg/ml                                                                                | 300 µl 1 mg/ml                                                                   | 300 µl 1 mg/ml                                                                   | 300 µl 1 mg/ml                                                                   |
| <b>Hin temperatura tal-inkubazzjoni tal-MTT</b> | 180 min (± 15-il min) f'37°C, 5 % CO <sub>2</sub> , 95 % RH                                   | 180 min f'37°C, 5 % CO <sub>2</sub> , 95 % RH                                    | 180 min (± 15-il min) f'37°C, 5 % CO <sub>2</sub> , 95 % RH                      | 180 min f'37°C, 5 % CO <sub>2</sub> , 95 % RH                                    |
| <b>Solvent estrazzjoni ta'</b>                  | 500 µl isopropanol aċidifikat (0,04 N HCl fl-isopropanol) (tessut iżolat mgħaddas għalkollox) | 2 ml isopropanol (estrazzjoni mill-quċcata u mill-qiegh tal-inserzjoni)          | 1,5 ml isopropanol (estrazzjoni mill-quċcata u mill-qiegh tal-inserzjoni)        | 2 ml isopropanol (estrazzjoni mill-quċcata u mill-qiegh tal-inserzjoni)          |
| <b>Hin temperatura tal-estrazzjoni</b>          | Matul il-lejl f'RT, bi protezzjoni mid-dawl                                                   | Matul il-lejl mingħajr thawwid f'RT jew għal 120 min bit-thawwid (~120 rpm) f'RT | Matul il-lejl mingħajr thawwid f'RT jew għal 120 min bit-thawwid (~120 rpm) f'RT | Matul il-lejl mingħajr thawwid f'RT jew għal 120 min bit-thawwid (~120 rpm) f'RT |
| <b>Qari tal-OD</b>                              | 570 nm (545 - 595 nm) mingħajr filtru ta' riferiment                                          | 570 nm (jew 540 nm) mingħajr filtru ta' riferiment                               | 570 nm (540 - 600 nm) mingħajr filtru ta' riferiment                             | 540 - 570 nm mingħajr filtru ta' riferiment                                      |
| <b>Kontroll Kwalità Tessuti tal-tat-</b>        | trattament ta' 18-il siegħa b'SDS 1,0 mg/ml ≤ IC <sub>50</sub> ≤ 3,0 mg/ml                    | Trattament b'1 % Triton X-100 4,08 sigħat ≤ ET <sub>50</sub> ≤ 8,7 sigħat        | Trattament b'1 % Triton X-100 4,0 sigħat ≤ ET <sub>50</sub> ≤ 10,0 sigħat        | Trattament b'1 % Triton X-100 2,0 sigħat ≤ ET <sub>50</sub> ≤ 7,0 sigħat         |

| Komponenti tal-Mudell tat-Test    | EpiSkin™                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | EpiDerm™ SCT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | SkinEthic™ RHE                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | epiCS®                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|-----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Kriterji ta' Aċċettabilità</b> | <p>1. L-OD medja tar-repliki tat-tessuti trattati bil-kontroll negattiv (NaCl) għandha tkun <math>\geq 0,6</math> u <math>\leq 1,5</math> għal kull hin tal-esponiment</p> <p>2. Il-vijabbiltà medja tar-repliki tat-tessuti esposti għal 4 sigħat bil-kontroll pożittiv (aċidu aċetiku glaċjali), espressa bħala % tal-kontroll negattiv, għandha tkun <math>\leq 20</math> %</p> <p>3. Fil-medda ta' 20-100 % vijabbiltà u għall-ODs <math>\geq 0,3</math>, id-differenza tal-vijabbiltà bejn iż-żewġ repliki tat-tessuti ma għandhiex taqbeż it-30 %.</p> | <p>1. L-OD medja tar-repliki tat-tessuti trattati bil-kontroll negattiv (H<sub>2</sub>O) għandha tkun <math>\geq 0,8</math> u <math>\leq 2,8</math> għal kull hin tal-esponiment</p> <p>2. Il-vijabbiltà medja tar-repliki tat-tessuti esposti għal siegħa (1) bil-kontroll pożittiv (8N KOH), espressa bħala % tal-kontroll negattiv, għandha tkun <math>&lt; 15</math> %</p> <p>3. Fil-medda ta' 20 - 100 % vijabbiltà, il-Koeffiċjent ta' Varjazzjoni (CV) bejn ir-repliki tat-tessuti għandha tkun ta' <math>\leq 30</math> %.</p> | <p>1. L-OD medja tar-repliki tat-tessuti trattati bil-kontroll negattiv (H<sub>2</sub>O) għandha tkun <math>\geq 0,8</math> u <math>\leq 3,0</math> għal kull hin tal-esponiment</p> <p>2. Il-vijabbiltà medja tar-repliki tat-tessuti esposti għal siegħa (1) (u 4 sigħat, jekk applikabbli) bil-kontroll pożittiv (8N KOH), espressa bħala % tal-kontroll negattiv, għandha tkun <math>&lt; 15</math> %</p> <p>3. Fil-medda ta' 20-100 % vijabbiltà u għall-ODs <math>\geq 0,3</math>, id-differenza tal-vijabbiltà bejn iż-żewġ repliki tat-tessuti ma għandhiex taqbeż it-30 %</p> | <p>1. L-OD medja tar-repliki tat-tessuti trattati bil-kontroll negattiv (H<sub>2</sub>O) għandha tkun <math>\geq 0,8</math> u <math>\leq 2,8</math> għal kull hin tal-esponiment</p> <p>2. Il-vijabbiltà medja tar-repliki tat-tessuti esposti għal siegħa (1) bil-kontroll pożittiv (8N KOH), espressa bħala % tal-kontroll negattiv, għandha tkun <math>&lt; 20</math> %</p> <p>3. Fil-medda ta' 20-100 % vijabbiltà u għall-ODs <math>\geq 0,3</math>, id-differenza tal-vijabbiltà bejn iż-żewġ repliki tat-tessuti ma għandhiex taqbeż it-30 %</p> |

### Appendiċi 3

#### **PRESTAZZJONI TAL-MUDELLI TAT-TEST GHAS-SUBKATEGORIZZAZZJONI**

It-tabella ta' hawn taht tipprovdi l-prestazzjoni tal-erba' mudelli tat-test ikkalkolati fuq il-bażi ta' sett ta' 80 sustanza kimika ttestjati mill-erba' żviluppaturi tat-test. Il-kalkoli saru mis-Segretarjat tal-OECD, u ġew rieżaminati u miftiehma minn subgrupp ta' esperti (21) (23).

Il-mudelli tat-test EpiSkin™, EpiDerm™, SkinEthic™ u epiCS® jistgħu jiġu subkategorizzati (jiġifieri 1A kontra 1B-u-1C kontra NC)

Il-prestazzjonijiet, ir-rati ta' sovraklassifikazzjoni, ir-rati ta' sottoklassifikazzjoni, u l-preċiżjoni (Kapaċità ta' tbassir) tal-erba' mudelli tat-test fuq il-bażi ta' sett ta' 80 sustanza kimika lkoll ittestjati fuq żewġ jew tliet sessjonijiet f'kull mudell tat-test:

| <b>STATISTIKI DWAR IT-TBASSIRIET MIKSUBA FUQ IS-SETT SHIH TA' SUSTANZI KIMIČI</b>                                                                                                                                                   |               |               |               |               |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| (n= 80 sustanza kimika ttestjati fuq żewġ sessjonijiet indipendenti għal epiCS® jew tliet sessjonijiet indipendenti għal EpiDerm™ SCT, għal EpiSkin™ u għal SkinEthic™ RHE, jiġifieri rispettivament 159* jew 240 klassifikazzjoni) |               |               |               |               |
|                                                                                                                                                                                                                                     | EpiSkin™      | EpiDerm™      | SkinEthic™    | epiCS®        |
| <b>Sovraklassifikazzjonijiet:</b>                                                                                                                                                                                                   |               |               |               |               |
| 1B-u-1C 1A sovraklassifikati                                                                                                                                                                                                        | 21,50 %       | 29,0 %        | 31,2 %        | 32,8 %        |
| 1B-u-1C sovraklassifikati NC                                                                                                                                                                                                        | 20,7 %        | 23,4 %        | 27,0 %        | 28,4 %        |
| 1A sovraklassifikati NC                                                                                                                                                                                                             | 0,00 %        | 2,7 %         | 0,0 %         | 0,00 %        |
| Korr. sovraklassifikata                                                                                                                                                                                                             | 20,7 %        | 26,1 %        | 27,0 %        | 28,4 %        |
| <b>Rata globali ta' sovraklassifikazzjoni (il-</b>                                                                                                                                                                                  | <b>17,9 %</b> | <b>23,3 %</b> | <b>24,5 %</b> | <b>25,8 %</b> |
| <b>Sottoklassifikazzjonijiet:</b>                                                                                                                                                                                                   |               |               |               |               |
| 1A 1B-u-1C sottoklassifikati                                                                                                                                                                                                        | 16,7 %        | 16,7 %        | 16,7 %        | 12,5 %        |
| 1A NC sottoklassifikati                                                                                                                                                                                                             | 0,00 %        | 0,00 %        | 0,00 %        | 0,00 %        |
| NC sottoklassifikati 1B-u-1C                                                                                                                                                                                                        | 2,2 %         | 0,00 %        | 7,5 %         | 6,6 %         |
| <b>Rata globali ta' sottoklassifikazzjoni (il-</b>                                                                                                                                                                                  | <b>3,3 %</b>  | <b>2,5 %</b>  | <b>5,4 %</b>  | <b>4,4 %</b>  |
| <b>Klassifikazzjonijiet Korretti:</b>                                                                                                                                                                                               |               |               |               |               |

|                                   |               |               |             |               |
|-----------------------------------|---------------|---------------|-------------|---------------|
| 1A klassifikati kif suppost       | 83,3 %        | 83,3 %        | 83,3 %      | 87,5 %        |
| 1B-u-/1C klassifikati kif suppost | 76,3 %        | 71,0 %        | 61,3 %      | 60,7 %        |
| NC klassifikati kif suppost       | 79,3 %        | 73,9 %        | 73,0 %      | 71,62 %       |
| <b>Preċiżjoni Ġenerali</b>        | <b>78,8 %</b> | <b>74,2 %</b> | <b>70 %</b> | <b>69,8 %</b> |

NC: Mhux korrużivi

#### **Appendiċi 4**

Parametri ewlenin u kriterji ta' aċċettazzjoni għall-kwalifikazzjoni ta' sistema tal-ispettrofotometru ta' HPLC/UPLC għall-kejl tal-formażan MTT estratt mit-tessut tal-RhE

| <b>Parametru</b>                                                                 | <b>Protokoll Derivat mill-Gwida tal-FDA (37)(38)</b>                                                                                                                                                                                            | <b>Kriterji tal-Aċċettazzjoni</b>                                                                                                                                                            |
|----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Selettività                                                                      | Analizi tal-isopropanol, inbjank haj (estratt tal-isopropanol minn tessuti tal-RhE hajjin mingħajr ebda trattament), inbjank mejjet (estratt tal-isopropanol minn tessuti tal-RhE maqtula mingħajr ebda trattament)                             | $\text{Area}_{\text{interference}} \leq 20 \% \text{ ta' } \text{Area}_{\text{LLOQ}}^1$                                                                                                      |
| Preċiżjoni                                                                       | Kontrolli tal-Kwalità (jigifieri formażan MTT f'1,6 µg/ml, 16 µg/ml u 160 µg/ml ) fl-isopropanol (n=5)                                                                                                                                          | $\text{CV} \leq 15 \% \text{ jew } \leq 20 \% \text{ għal-LLOQ}$                                                                                                                             |
| Preċiżjoni                                                                       | Kontrolli tal-Kwalità fl-isopropanol (n=5)                                                                                                                                                                                                      | $\% \text{Dev} \leq 15 \% \text{ jew } \leq 20 \% \text{ għal-LLOQ}$                                                                                                                         |
| Effett tal-Matriċi                                                               | Kontrolli tal-Kwalità fl-inbjank haj (n=5)                                                                                                                                                                                                      | $85 \% \leq \text{Effett tal-Matriċi} \leq 115 \%$                                                                                                                                           |
| Riport                                                                           | Analizi tal-isopropanol wara ULOQ <sup>2</sup> standard                                                                                                                                                                                         | $\text{Area}_{\text{interference}} \leq 20 \% \text{ tal-} \text{Area}_{\text{LLOQ}}$                                                                                                        |
| Riproduċibbiltà (dakinhar)                                                       | 3 kurvi ta' kalibrizzjoni indipendenti (fuq il-bażi ta' 6 dilwizzjonijiet ta' 1/3 konsekuttivi ta' formażan MTT fl-isopropanol mill-ULOQ, jigifieri 200 µg/ml);<br>Kontrolli tal-Kwalità fl-isopropanol (n=5)                                   | Kurvi ta' Kalibrizzjoni:<br>$\% \text{Dev} \leq 15 \% \text{ jew } \leq 20 \% \text{ għal-LLOQ}$<br><br>Kontrolli tal-Kwalità:<br>$\% \text{Dev} \leq 15 \% \text{ u } \text{CV} \leq 15 \%$ |
| Riproduċibbiltà (bejn granet differenti)                                         | Jum 1: Kurva ta' kalibrizzjoni 1 u Kontrolli tal-Kwalità fl-isopropanol (n=3)<br>Jum 2: Kurva ta' kalibrizzjoni 1 u Kontrolli tal-Kwalità fl-isopropanol (n=3)<br>Jum 3: Kurva ta' kalibrizzjoni 1 u Kontrolli tal-Kwalità fl-isopropanol (n=3) |                                                                                                                                                                                              |
| Stabbiltà fuq Terminu Qasir tal-Formażan MTT fl-Estratt tat-Tessuti tal-RhE      | Kontrolli tal-Kwalità fl-inbjank haj (n=3) analizzati dakinhar tal-preparazzjoni u wara 24 siegħa ta' hżin f'temperatura ambjentali                                                                                                             | $\% \text{Dev} \leq 15 \%$                                                                                                                                                                   |
| Stabbiltà fit-Tul tal-Formażan MTT fl-Estratt tat-Tessuti tal-RhE, jekk mehtieġa | Kontrolli tal-Kwalità fl-inbjank haj (n=3) analizzati dakinhar tal-preparazzjoni u wara diversi jiem ta' hżin f'temperatura speċifikata (eż. 4°C, -20°C, -80°C)                                                                                 | $\% \text{Dev} \leq 15 \%$                                                                                                                                                                   |

1LLOQ: Limitu Inferjuri ta' Kwantifikazzjoni, definit biex ikopri vijabbiltà tat-tessuti ta' 1-2 %, jigifieri 0,8 µg/ml.

2ULOQ: Limitu Superjuri ta' Kwantifikazzjoni, definit biex ikun tal-anqas id-doppju tal-ogħla konċentrazzjoni mistennija ta' formażan MTT fl-estratti tal-isopropanol mill-kontrolli negattivi, jigifieri 200 µg/ml."

(7) Fil-Parti B, il-Kapitolu B.46 hu ssostitwit b'dan li ġej:

**“B.46 IRRITAZZJONI TAL-ĠILDA *IN VITRO*: METODU TA' TTESTJAR TAL-EPIDERMIS UMAN RIKOSTITWIT**

**INTRODUZZJONI**

1. Dan il-metodu ta' ttestjar (TM) hu ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 439 tal-OECD (2015). L-irritazzjoni tal-ġilda tirreferi għall-produzzjoni ta' ħsara irriversibbli għall-ġilda wara l-applikazzjoni ta' sustanza kimika tat-test għal massimu ta' 4 sigħat [kif definita mis-Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi (GHS) tan-Nazzjonijiet Uniti (NU)]<sup>(1)</sup> u mir-Regolament tal-Unjoni Ewropea (UE) 1272/2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet (CLP)<sup>1</sup>. Dan il-metodu ta' ttestjar jipprovdi proċedura *in vitro* li tista' tintuża għall-identifikazzjoni tal-periklu ta' sustanzi kimiċi irritanti (sustanzi u taħlitiet) f'konformità mal-GHS tan-NU/mal-Kategorija 2 tas-CLP (2). Fir-reġjuni li ma jadottawx il-Kategorija 3 tal-GHS tan-NU (irritanti ħfief), dan il-metodu ta' ttestjar jista' jintuża wkoll biex jiġu identifikati sustanzi kimiċi mhux klassifikati. Għaldaqstant, skont il-qafas regolatorju u s-sistema ta' klassifikazzjoni użati, dan il-metodu ta' ttestjar jista' jintuża biex tiġi determinata l-irritazzjoni tal-ġilda tas-sustanzi kimiċi jew bħala test sostitut awtonomu għall-ittestjar tal-irritazzjoni tal-ġilda *in vivo* jew bħala test sostitut parzjali fi hdan strategija ta' ttestjar (3).
2. Il-valutazzjoni tal-irritazzjoni tal-ġilda tipikament involviet l-użu ta' annimali tal-laboratorju [TM B.4, ekwivalenti għat-TG 404 tal-OECD oriġinarjament adottata fl-1981, u riveduta fl-1992, fl-2002 u fl-2015] (4). Għall-ittestjar tal-korrużività, ġew adottati tliet metodi ta' ttestjar *in vitro* validati bħala t-TM B.40 (ekwivalenti għat-TG 430 tal-OECD), it-TM B.40bis (ekwivalenti għat-TG 431 tal-OECD) u t-TM B.65 (ekwivalenti għat-TG 435 tal-OECD) tal-OECD (5) (6) (7). Dokument ta' gwida tal-OECD dwar Approċċi Integrati għall-Ittestjar u għall-Valutazzjoni (IATA) għall-Korrużjoni u għall-Irritazzjoni tal-Ġilda jiddeskrivi diversi moduli li jiġbru fihom sorsi ta' informazzjoni u għodod ta' valutazzjoni, u jipprovdi gwida dwar (i) kif tintegra u tuża *data* eżistenti tat-testijiet u

---

<sup>1</sup> Ir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tas-16 ta' Diċembru 2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet, li jemenda u jħassar id-Direttivi 67/548/KEE u 1999/45/KE, u li jemenda r-Regolament (KE) Nru 1907/2006, ĠU L 353/1, 31.12.2008

mhux tat-testijiet għall-valutazzjoni tal-potenzjali ta' irritazzjoni tal-gilda u ta' korruzzjoni tal-gilda tas-sustanzi kimiċi u (ii) jipproponi approċċ fejn ikun meħtieġ ittestjar ulterjuri (3).

3. Dan il-metodu ta' ttestjar jindirizza l-irritazzjoni tal-gilda tal-punt ta' tmiem tas-saħħa umana. Hu bbażat fuq is-sistema ta' ttestjar *in vitro* tal-epidermis uman rikostitwit (RhE), li jimita mill-qrib il-proprietajiet bijokimiċi u fiżjoloġiċi tal-partijiet superjuri tal-gilda umana, jiġifieri l-epidermis. Is-sistema tat-test tal-RhE tuża keratinoċiti mhux trasformati derivati mill-bniedem bħala sors ta' ċelloli biex tirrikostitwixxi mudell epidermali b'istologija u b'ċitoarkitektura rappreżentattivi. Hemm Standards tal-Prestazzjoni (PS) disponibbli biex jiffaċilitaw il-validazzjoni u l-valutazzjoni ta' metodi ta' ttestjar tal-RhE simili u modifikati, f'konformità mal-prinċipji tad-dokument ta' gwida tal-OECD Nru 34 (8) (9). Il-linja gwida korrispondenti oriġinarjament giet adottata fl-2010, aġġornata fl-2013 biex tinkludi mudelli tal-RhE, u giet aġġornata fl-2015 biex tirreferi għad-dokument ta' gwida tal-IATA u tintroduċi l-użu ta' proċedura alternattiva għall-kejl tal-vijabbiltà.
4. Tlestew studji ta' qabel il-validazzjoni, dwar l-ottimizzazzjoni u l-validazzjoni għal erba' mudelli tat-test *in vitro* disponibbli kummerċjalment (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) fuq il-bażi tas-sistema ta' ttestjar tal-RhE (sensittività 80 %, speċifità 70 %, u preċiżjoni 75 %). Dawn l-erba' mudelli tat-test huma inkluzi f'din it-TG u huma elenkati fl-Appendiċi 2, li jipprovdi wkoll informazzjoni dwar it-tip ta' studju ta' validazzjoni użat għall-validazzjoni tal-metodi ta' ttestjar rispettivi. Kif innotat fl-Appendiċi 2, il-Metodu ta' Referenza Validat (VRM) intuża biex jiġu żviluppati l-metodu ta' ttestjar preżenti u l-Istandards tal-Prestazzjoni (8).
5. L-Aċċettazzjoni Reċiproka tad-Data tal-OECD tkun garantita biss għall-mudelli tat-test validati skont l-Istandards tal-Prestazzjoni (8), jekk dawn il-mudelli tat-test ikunu ġew rieżaminati u adottati mill-OECD. Il-mudelli tat-test inkluzi f'dan il-metodu ta' ttestjar u t-TG korrispondenti tal-OECD jistgħu jintużaw b'mod indiskriminat biex jindirizzaw ir-rekwiżiti tal-pajjiżi għar-risultati tat-testijiet mill-metodi ta' ttestjar *in vitro* għall-irritazzjoni tal-gilda, filwaqt li jibbenefikaw mill-Aċċettazzjoni Reċiproka tad-Data.
6. Id-definizzjonijiet tat-termini użati f'dan id-dokument huma pprovduti fl-Appendiċi 1.

## KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

7. Limitazzjoni tal-metodu ta' ttestjar, kif muri mill-istudju ta' validazzjoni prospettiv shih li jivvaluta u jikkarakterizza l-metodi ta' ttestjar tal-RhE (16), hi li dan ma jippermettix il-klassifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi għall-Kategorija 3 tal-GHS tan-NU (irritanti hfief) (1). B'hekk, il-qafas regolatorju fil-pajjiżi membri se jiddeċiedi kif se jintuża dan il-metodu ta' ttestjar. Għall-UE, il-Kategorija 3 ma ntuzatx fis-CLP. Għal evalwazzjoni shiha tal-effetti lokali fuq il-gilda wara esponiment dermali wiehed, għandu jiġi kkonsultat id-Dokument

ta' Gwida tal-OECD dwar l-Approċċi Integrati għall-Valutazzjoni tal-Ittestjar (3). Hu rikonossut li l-użu ta' gilda umana hu soġġett għal konsiderazzjonijiet u għal kundizzjonijiet etiċi nazzjonali u internazzjonali.

8. Dan il-metodu ta' ttestjar jindirizza l-irritazzjoni tal-gilda tal-punt ta' tmiem tas-saħħa umana. Filwaqt li dan il-metodu ta' ttestjar ma jipprovdi informazzjoni adegwata dwar il-korrużjoni tal-gilda, ta' min jinnota t-TM B.40bis (ekwivalenti għat-TG 431 tal-OECD) dwar il-korrużjoni tal-gilda hu bbażat fuq l-istess sistema tat-test tal-RhE, għalkemm juża protokoll ieħor (6). Dan il-metodu ta' ttestjar hu bbażat fuq il-mudelli tal-RhE billi jintużaw keratinociti umani, li għaldaqstant jirrappreżentaw b'mod *in vitro* l-organu fil-mira tal-ispeċi ta' interess. Barra minn hekk, dan ikopri direttament il-pass inizjali tal-katina/mekkaniżmu infjammatorja/u tal-azzjoni (ħsara liċ-ċelloli u lit-tessut li tirriżulta fi trawma lokalizzata) li sseħħ/jseħħ waqt l-irritazzjoni *in vivo*. Giet ittestjata firxa wiesgħa ta' sustanzi kimiċi fil-validazzjoni li hi l-bażi ta' dan il-metodu ta' ttestjar u l-bażi ta' *data* tal-istudju ta' validazzjoni kienet tammonta għal total ta' 58 sustanza kimika (16) (18) (23). Il-metodu ta' ttestjar hu applikabbli għas-solidi, għal-likwidi, għas-semisolidi u għax-xama'. Il-likwidi jistgħu jkunu jew ma jkunux milwiema; is-solidi jistgħu jkunu jew ma jkunux solubbli fl-ilma. Kull meta dan ikun possibbli, is-solidi għandhom jiġu mithuna fi trab fin qabel ma jiġu applikati; mhu meħtieġ ebda pretrattament ieħor tal-kampjun. Il-gassijiet u l-aerosols għadhom ma ġewx eżaminati fi studju ta' validazzjoni (29). Filwaqt li huwa mifhum li dawn jistgħu jiġu ttestjati billi tintuża t-teknoloġija tal-RhE, il-metodu ta' ttestjar attwali ma jippermettix l-ittestjar ta' gassijiet u ta' aerosols.
9. Qabel ma jintuża l-metodu ta' ttestjar fuq tahlita għall-ġenerazzjoni ta' *data* għal skop regolatorju intiż, għandu jiġi kkunsidrat jekk jistax jipprovdi riżultati adegwati għal dak l-għan u, jekk iva, għaliex. Dawn il-konsiderazzjonijiet mhumix meħtieġa meta jkun hemm rekwiżit regolatorju għall-ittestjar tat-tahlita. Madankollu, minhabba l-fatt li t-tahlitiet ikopru spettru mifrux ta' kategoriji u ta' kompożizzjoni, u li bħalissa hemm disponibbli biss informazzjoni limitata dwar l-ittestjar tat-tahlitiet, f'każijiet li fihom tkun tista' tintwera evidenza fuq in-nuqqas ta' applikabbiltà tal-metodu ta' ttestjar għal kategorija speċifika ta' tahlitiet (*eż.* skont strateġika kif proposta f'Eskes *et al.*, 2012 (30)), il-metodu ta' ttestjar ma għandux jintuża għal dik il-kategorija speċifika ta' tahlitiet. Għandha tingħata attenzjoni speċjali f'każ li klassijiet speċifiċi ta' sustanzi kimiċi jew proprjetajiet fiżikokimiċi jinstab li ma jkunux applikabbli għall-metodu ta' ttestjar kurrenti.
10. Is-sustanzi kimiċi tat-test li jassorbu d-dawl fl-istess medda bħal MTT formażan u s-sustanzi kimiċi tat-test li kapaċi jnaqqsu direttament l-MTT tal-kulurant vitali (għal MTT formażan) jistgħu jinterferixxu mal-kejl jiet tal-vijabbiltà taċ-ċelloli u jkollhom bżonn l-użu ta' kontrolli adattati għall-korrezzjonijiet (ara l-paragrafi 28-34).
11. Sessjoni waħda ta' ttestjar magħmula minn tliet tessuti rreplikati għandha tkun biżżejjed għal sustanza kimika tat-test meta l-klassifikazzjoni tkun inekwivokabbli. Madankollu,



f'kazijiet ta' riżultati li joqorbu hafna lejn il-limitu, b'hal pereżempju kejl irreplikat mhux konkordanti u/jew il-vijabbiltà perċentwali medja ugwali għal  $50 \pm 5 \%$ , għandha tiġi kkunsidrata t-tieni sessjoni, kif ukoll it-tielet waħda f'każ ta' riżultati mhux konkordanti bejn l-ewwel żewġ sessjonijiet.

## PRINĊIPJU TAT-TEST

12. Is-sustanza kimika tat-test hi applikata b'mod topiku għal mudell tal-RhE tridimensjonali, ifformata minn keratinoċiti mhux trasformati minn mill-epidermis uman, li ffurmaw ruħhom f'mudell b'diversi saffi, ferm differenzjat ta' *epidermis* uman. Din tikkonsisti f'saff tal-qiegh, saff spinuż u saff granulari organizzati, u *stratum corneum* b'diversi saffi li jkun fih saffi lipidi lamellari interċellolari li jirrappreżentaw il-klassijiet lipidi ewlenin b'mod analoġu għal dawk li jinstabu *in vivo*.
13. Irritazzjoni tal-ġilda indotta b'sustanza kimika, murija primarjament b'eritema u edema, hi r-riżultat ta' kaskata ta' avvenimenti li jibdwu bil-penetrazzjoni tas-sustanzi kimiċi permezz tal-*istratum corneum* fejn dawn jistgħu jagħmlu ħsara lis-saffi sottostanti tal-keratinoċiti u lil ċelloli oħra tal-ġilda. Iċ-ċelloli li jgħarrbu ħsara jistgħu jehilsu medjaturi infjammatorji jew inkella jinduċu kaskata infjammatorja li wkoll tagħxi fuq iċ-ċelloli fid-*dermis*, b'mod partikolari iċ-ċelloli stromali u edoteljali tal-vażi. Hi d-dilazzjoni u l-permeabbiltà akbar taċ-ċelloli endoteljali li jipproduċu l-eritema u l-edema osservati (29). B'mod partikolari, il-metodi ta' ttestjar bbażati fuq l-RhE, fin-nuqqas ta' kwalunkwe vaskularizzazzjoni fis-sistema ta' ttestjar *in vitro*, ikejlu l-avvenimenti tal-bidu fil-kaskata, eż. ħsara fiċ-ċelloli / fit-tessuti (16) (17), bl-użu tal-vijabbiltà b'hal readout.
14. Il-vijabbiltà taċ-ċelloli fil-mudelli tal-RhE titkejjel b'konverżjoni enzimatika tal-kulurant vitali MTT [bromur tat-3-(4,5-Dimetiltetrazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolju, blu tjażolil; Numru CAS 298-93-1], f'melħ tal-formaġan blu li jitkejjel b'mod kwantitattiv wara l-estrazzjoni mit-tessuti (31). Sustanzi kimiċi irritanti huma identifikati mill-abbiltà tagħhom li jnaqqsu l-vijabbiltà taċ-ċelloli taħt il-livelli limitati definiti (jiġifieri  $\leq 50 \%$ , għall-GHS tan-NU/għall-Kategorija 2 tas-CLP). Skont il-qafas regolatorju u l-applikabbiltà tal-metodu ta' ttestjar, is-sustanzi kimiċi li jipproduċu l-vijabbiltajiet taċ-ċelloli oghla mil-livell massimu definit, jistgħu jitqiesu b'hal mhux irritanti (jiġifieri  $> 50 \%$ , L-Ebda Kategorija).

## WIRI TAL-PROFIĊJENZA

15. Qabel l-użu ta' rutina ta' kwalunkwe wieħed mill-erba' metodi ta' ttestjar validati li jaderixxu ma' dan il-metodu ta' ttestjar (Appendiċi 2), il-laboratorji għandhom juru profiċjenza teknika, billi jużaw l-għaxar Sustanzi ta' Profiċjenza elenkati fit-Tabella 1. F'sitwazzjonijiet li fihom, pereżempju, sustanza elenkata ma tkunx disponibbli, tista' tintuża sustanza oħra li għaliha jkun hemm *data* ta' riferiment adegwata *in vivo* u *in vitro*

(eż. mil-lista ta' sustanzi kimiċi ta' riferiment (8)) dment li ma jiġux applikati l-istess kriterji tal-ġhażla bħal daww deskritti fit-Tabella 1. L-użu ta' sustanza ta' profiċjenza alternattiva għandu jkun ġustifikat.

16. Bħala parti mill-ittejtjar tal-profiċjenza, hu rrakkomandat li l-utenti jivverifikaw il-karatteristiċi ta' protezzjoni tat-tessuti wara li dawn jiġu riċevuti kif speċifikat mill-produttur tal-mudell tal-RhE. Dan hu ta' importanza partikolari jekk it-tessuti jintbagħtu minn distanzi twal jew jekk idumu biex jaslu. Ladarba metodu ta' ttejtjar ikun ġie stabbilit b'suċċess u tkun inkisbet u ntweriet profiċjenza fl-użu tiegħu, verifika bħal din ma għandhiex tkun meħtieġa fuq bażi ta' rutina. Madankollu, meta jintuża metodu ta' ttejtjar b'rutina, hu rrakkomandat li jibqgħu jiġu vvalutati l-karatteristiċi ta' protezzjoni f'intervalli regolari.

**Tabella 1:** Sustanzi ta' Profiċjenza<sup>1</sup>

| Sustanza                                                              | NRU CAS   | Punteġġ <i>in vivo</i> <sup>2</sup> | Stat fiżiku | Kategorija tal-GHS tan-NU                         |
|-----------------------------------------------------------------------|-----------|-------------------------------------|-------------|---------------------------------------------------|
| <b>SUSTANZI MHUX KLASSIFIKATI (Nru tal-Kategorija tal-GHS tan-NU)</b> |           |                                     |             |                                                   |
| aċidu naftalenaċetiku                                                 | 86-87-3   | 0                                   | Solidu      | Ebda Kat.                                         |
| isopropanol                                                           | 67-63-0   | 0,3                                 | Likwidi     | Ebda Kat.                                         |
| stearat tal-metil                                                     | 112-61-8  | 1                                   | Solidu      | Ebda Kat.                                         |
| butirat tal-ettil                                                     | 5870-93-9 | 1,7                                 | Likwidi     | Ebda Kat.<br>(Kat. 3 Fakultattiva 3) <sup>3</sup> |
| saliċilat tal-eżil                                                    | 6259-76-3 | 2                                   | Likwidi     | Ebda Kat.<br>(Kat. 3 Fakultattiva 3) <sup>3</sup> |
| <b>SUSTANZI KLASSIFIKATI (Kategorija 2 tal-GHS tan-NU)</b>            |           |                                     |             |                                                   |
| aldeid taċ-ċiklamen                                                   | 103-95-7  | 2,3                                 | Likwidi     | Kat. 2                                            |
| 1-bromoeżan                                                           | 111-25-1  | 2,7                                 | Likwidi     | Kat. 2                                            |
| idrossidu tal-potassju (5 % soluzzjoni milwiema)                      | 1310-58-3 | 3                                   | Likwidi     | Kat. 2                                            |
| 1-metil-3-fenil-1-piperazina                                          | 5271-27-2 | 3,3                                 | Solidu      | Kat. 2                                            |
| heptanal                                                              | 111-71-7  | 3,4                                 | Likwidi     | Kat. 2                                            |

<sup>1</sup> Is-Sustanzi ta' Profiċjenza huma subsett tas-sustanzi użati fl-istudju ta' validazzjoni u l-ġhażla hi bbażata fuq il-kriterji li ġejjin; (i), is-sustanzi kimiċi jkunu kummerċjalment disponibbli; (ii), dawn ikunu rappreżentattivi tal-medda shiħa tal-punteġġi ta' irritazzjoni ta' Draize (minn mhux irritanti sa irritanti hafna); (iii), ikollhom struttura kimika definita sew; (iv) ikunu rappreżentattivi tal-funzjonalità kimika użata fil-proċess ta' validazzjoni; (v) ikunu pprovdew riżultati *in vitro* riprodubbli f'diversi testijiet u f'diversi laboratorji; (vi) ikunu ġew imbassra kif suppost *in vitro*, u (vii) ma jkunux assoċjati ma' profil estremament tossiku (eż. karċinoġeniku jew tossiku għas-sistema riproduttiva) u ma jkunux assoċjati ma' kostijiet projbittivi għar-rimi.

<sup>2</sup> Punteġġ *in vivo* skont it-TM B.4 (4).

Skont dan il-metodu ta' ttejtjar, il-Kategorija 3 (irritanti hfief) fakultattiva tal-GHS tan-NU (1) hi meqjusa bħala L-Ebda Kategorija.

## PROCEDURA

17. Din li ġejja hi deskrizzjoni tal-komponenti u tal-proċeduri ta' metodu ta' ttestjar tal-RhE għall-valutazzjoni tal-irritazzjoni tal-ġilda (Ara wkoll l-Appendiċi 3 għall-parametri relatati ma' kull mudell tat-test). Il-Proċeduri Operatorji Standard (SOPs) għall-erba' mudelli li jikkonformaw ma' dan il-metodu ta' ttestjar huma disponibbli (32) (33) (34) (35).

## KOMPONENTI TAL-METODU TA' TTESTJAR TAL-RHE

### Kundizzjonijiet ġenerali

18. Għandhom jintużaw keratinoċiti umani mhux trasformati biex jerġgħu jibnu l-epitelju. Is-saffi multipli ta' ċelloli epitelji vijabbli (saff tal-qiegħ, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*) għandhom ikunu preżenti taħt *stratum corneum* funzjonali. L-*istratum corneum* għandu jkollu saffi multipli li jkun fihom il-profil lipidu essenzjali biex jipproduċu protezzjoni funzjonali robusta biex tirreżisti l-penetrazzjoni rapida ta' sustanzi kimiċi referenzjarji ċitotossici, eż. dodeċilsulfat tas-sodju (SDS) jew Triton X-100. Il-funzjoni ta' protezzjoni għandha tintwera u tista' tiġi eżaminata jew permezz ta' determinazzjoni tal-konċentrazzjoni li fiha s-sustanza kimika referenzjarja tnaqqas il-vijabbiltà tat-tessuti b'50 % (IC<sub>50</sub>) wara ħin ta' esponiment fiss, jew permezz ta' determinazzjoni tal-ħin ta' esponiment mehtieg sabiex il-vijabbiltà taċ-ċellola titnaqqas b'50 % (IC<sub>50</sub>) wara l-applikazzjoni tas-sustanza kimika referenzjarja b'konċentrazzjoni speċifika u fissa. Il-karatteristiċi ta' trazzin tal-mudell tal-RhE għandhom iwaqqfu l-passaġġ ta' materjal madwar l-*istratum corneum* għat-tessut vijabbli, li nkella jwassal għal immudellar ta' livell baxx tal-esponiment tal-ġilda. Il-mudell tal-RhE għandu jkun hieles minn kontaminazzjoni minn batterji, vajrusijiet, majkoplasma, jew fungi.

### Kundizzjonijiet funzjonali

#### Vijabbiltà

19. L-assaġġ użat għall-kwantifikazzjoni tal-vijabbiltà hu l-assaġġ MTT (31). Iċ-ċelloli vijabbli tal-mudell ta' tessut tal-RhE jistgħu jnaqqsu l-MTT tal-kulurant vitali fi preċipitat tal-blu MTT formażan, li mbagħad jiġi estratt mit-tessut bl-użu tal-isopropanol (jew solvent simili). Id-densità ottika (OD) tas-solvent ta' estrazzjoni waħedha għandha tkun żgħira biżżejjed, jiġifieri OD < 0,1. L-MTT formażan estratt jista' jiġi kwantifikat bl-użu ta' kejl tal-assorbanza standard (OD) jew bi proċedura ta' spettrofotometrija tal-HPLC/UPLC (36). L-utenti tal-mudell tal-RhE għandhom jiżguraw li kull lott mill-mudell tal-RhE użat jissodisfa l-kriterji definiti għall-kontroll negattiv. Medda tal-aċċettabbiltà (limitu superjuri u inferjuri) għall-valuri tal-OD tal-kontroll negattiv (fil-kundizzjonijiet tal-metodu ta' ttestjar tal-Irritazzjoni tal-Ġilda) tiġi stabbilita mill-iżviluppatur/fornitur tal-mudell tal-RhE. Meded tal-aċċettabbiltà għall-erba' mudelli tal-RhE validati inklużi f'dan

il-metodu ta' ttestjar huma mogħtija fit-Tabella 2. Utent tal-Ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC għandu juża l-meded tal-OD tal-kontroll negattiv ipprovduti fit-Tabella 2 bħala l-kriterju ta' aċċettazzjoni għall-kontroll negattiv. Għandu jiġi dokumentat li t-tessuti ttrattati bil-kontroll negattiv huma stabbli fil-koltura (jipprovdut kejl tal-vijabbiltà simili) sakemm idum il-perjodu ta' esponiment tat-test.

**Tabella 2:** Meded ta' aċċettabbiltà għall-valuri tal-OD tal-kontrolli negattivi tal-mudelli tat-test inklużi f'dan it-TM.

|                                | <b>Limitu inferjuri ta' aċċettabbiltà</b> | <b>Limitu superjuri ta' aċċettabbiltà</b> |
|--------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|
| <b>EpiSkin™ (SM)</b>           | $\geq 0,6$                                | $\leq 1,5$                                |
| <b>EpiDerm™ SIT (EPI-200)</b>  | $\geq 0,8$                                | $\leq 2,8$                                |
| <b>SkinEthic™ RHE</b>          | $\geq 0,8$                                | $\leq 3,0$                                |
| <b>LabCyte EPI-MODEL24 SIT</b> | $\geq 0,7$                                | $\leq 2,5$                                |

#### *Funzjoni ta' protezzjoni*

20. L-*istratum corneum* u l-kompożizzjoni lipida tiegħu għandhom ikunu biżżejjed biex jirreżistu l-penetrazzjoni rapida ta' sustanzi kimiċi referenzjarji ċitotossici, eż. SDS jew Triton X-100, kif stmat minn IC<sub>50</sub> jew ET<sub>50</sub> (Tabella 3).

#### *Morfologija*

21. Għandu jiġi pprovdut eżami istoloġiku tal-mudell tal-RhE li juri struttura li tixbah l-*epidermis* uman (inkluż l-*istratum corneum* b'saffi multipli).

#### *Riproduċibbiltà*

22. Ir-risultati tal-kontrolli pożittivi u negattivi tal-metodu ta' ttestjar għandhom juru r-riproduċibbiltà maż-żmien.

#### *Kontroll tal-kwalità (QC)*

23. Il-mudell tal-RhE għandu jintuża biss jekk l-iżviluppatur/il-fornitur juri li kull lott mill-mudell tal-RhE użat jissodisfa l-kriterji tat-tnedija tal-produzzjoni definiti, fosthom daww għall-vijabbiltà (paragrafu 17), għall-funzjoni ta' protezzjoni (paragrafu 18) u għall-morfologija (paragrafu 19) huma l-aktar rilevanti. Din id-data għandha tiġi pprovduta lill-utenti tal-metodu ta' ttestjar, biex ikunu jistgħu jinkludu din l-informazzjoni fir-rapport tat-test. Medda tal-aċċettabbiltà (limitu superjuri u inferjuri) għall-IC<sub>50</sub> jew għall-ET<sub>50</sub> għandha tiġi stabbilita mill-iżviluppatur/fornitur tal-mudell tal-RhE. Daww ir-risultati li huma prodotti b'tessuti kkwalifikati biss jistgħu jiġu aċċettati għal tbassir affidabbli ta' klassifikazzjoni tal-irritazzjoni. Il-meded tal-aċċettabbiltà għall-erba' mudelli tat-test inklużi f'dan it-TG huma mogħtija fit-Tabella 3.

**Tabella 3:** Il-kriterji tar-rilaxx tal-lott tal-QC tal-mudelli tat-test inklużi f' dan it-TM

|                                                                                | <b>Limitu inferjuri ta' aċċettabbiltà</b> | <b>Limitu superjuri ta' aċċettabbiltà</b> |
|--------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|
| <b>EpiSkin™ (SM)</b><br>(trattament ta' 18-il siegħa b' SDS)<br>(32)           | IC <sub>50</sub> = 1,0 mg/ml              | IC <sub>50</sub> = 3,0 mg/ml              |
| <b>EpiDerm™ SIT (EPI-200)</b><br>(1 % Triton X-100) (33)                       | ET <sub>50</sub> = 4,0 hr                 | ET <sub>50</sub> = 8,7 hr                 |
| <b>SkinEthic™ RHE</b><br>(1 % Triton X-100) (34)                               | ET <sub>50</sub> = 4,0 hr                 | ET <sub>50</sub> = 10,0 hr                |
| <b>LabCyte EPI-MODEL24 SIT</b><br>(trattament ta' 18-il siegħa b' SDS)<br>(35) | IC <sub>50</sub> = 1,4 mg/ml              | IC <sub>50</sub> = 4,0 mg/ml              |

### Applikazzjoni tas-Sustanza Kimika tat-Test u tas-Sustanzi Kimiċi tal-Kontroll

24. Tal-anqas għandhom jintużaw tliet repliki għal kull sustanza kimika tat-test u għall-kontrolli f'kull sessjoni. Għas-sustanzi kimiċi likwidi kif ukoll għas-sustanzi kimiċi solidi, għandu jiġi applikat ammont suffiċjenti ta' sustanza kimika tat-test biex ikopri b'mod uniformi l-wiċċ tal-*epidermis* filwaqt li tigi evitata doża infinita, jiġifieri tvarja minn 26 sa 83  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  jew  $\text{mg}/\text{cm}^2$  (ara l-Appendiċi 3). Għas-sustanzi kimiċi solidi, il-wiċċ tal-*epidermis* għandu jixxarrab b'ilma dejonizzat jew distillat qabel l-applikazzjoni, biex jitjieb il-kuntatt bejn is-sustanza kimika tat-test u s-superfiċje tal-*epidermis*. Kull meta dan ikun possibbli, is-solidi għandhom jiġu ttestjati bħala trab fin. F'ċerti każijiet tista' tintuża xibka tan-najlon bħala għajjnuna għat-tifrix (ara l-Appendiċi 3). Fi tmiem il-perjodu ta' esponiment, is-sustanza kimika tat-test għandha tinhasel bir-reqqa mill-*epidermis* b'superfiċje b'bafer milwiem, jew b'0,9 % NaCl. Skont il-mudelli tat-test tal-RhE użati, il-perjodu ta' esponiment ivarja bejn 15-il minuta u 60 minuta, u t-temperatura ta' inkubazzjoni bejn 20 u 37°C. Dawn il-perjodi ta' esponiment u t-temperaturi huma ottimizzati għal kull metodu ta' ttestjar tal-RhE individwali u jirrappreżentaw il-proprietajiet intrinseci differenti tal-mudelli tat-test (eż. il-funzjoni ta' protezzjoni) (ara Appendiċi 3).
25. F'kull sessjoni għandhom jintużaw kontroll negattiv (NC) u kontroll pożittiv (PC) konkorrenti biex jintwera li l-vijabbiltà (bl-użu tal-NC), il-funzjoni ta' protezzjoni u s-sensittività tat-tessuti li tirriżulta (bl-użu tal-PC) jinsabu fi hdan medda ta' aċċettazzjoni storika definita. Il-PC suggerit hu ta' SDS 5 % milwiemi. L-NCs suggeriti huma ilma jew salina bbaferjata bil-fosfat (PBS).

### Kejljiet tal-Vijabbiltà taċ-Ċelloli

26. Skont il-proċedura tat-test, hu essenzjali li l-kejl tal-vijabbiltà ma jsirx immedjatement wara l-esponiment għas-sustanza kimika tat-test, iżda wara perjodu ta' inkubazzjoni ta' wara t-trattament twil biżżejjed tat-tessut imlahlah f'medium ġdid. Dan il-perjodu

jippermetti kemm l-irkupru minn effetti ċitotossiċi dgħajfa kif ukoll il-manifestazzjoni tal-effetti ċitotossiċi b'mod ċar. Perjodu ta' inkubazzjoni ta' wara t-trattament ta' 42 siegħa nstab li kien ottimali matul l-ottimizzazzjoni tat-test ta' tnejn mill-mudelli tat-test ibbażati fuq l-RhE li huma l-baži ta' dan il-metodu ta' ttestjar (11) (12) (13) (14) (15).

27. L-assaġġ tal-MTT hu metodu kwantitattiv standardizzat li għandu jintuża biex ikejjel il-vijabbiltà taċ-ċelloli taht dan il-metodu ta' ttestjar. Hu kompatibbli mal-użu f'bini ta' tessuti tridimensjonali. Il-kampjun tat-tessut jitqiegħed f'soluzzjoni tal-MTT b'konċentrazzjoni xierqa (eż. 0,3 jew 1 mg/ml) għal tliet sigħat. L-MTT jiġi kkonvertit f'formażan blu miċ-ċelloli vijabbli. Imbagħad il-prodott preċipitat formażan blu jiġi estratt mit-tessuti permezz ta' solvent (e.g., isopropanol, isopropanol aċiduż), u l-konċentrazzjoni tal-formażan titkejjel billi tiġi determinata l-OD f'570 nm permezz ta' filtru band pass sa massimu ta'  $\pm 30$  nm, jew bl-użu ta' proċedura ta' spettrofotometrija tal-HPLC/UPLC (ara l-paragrafu 34) (36).
28. Il-proprjetajiet ottiċi tas-sustanza kimika tat-test jew l-azzjoni kimika tagħha fuq l-MTT (eż. is-sustanzi kimiċi jistgħu jipprevjenu jew iregġgħu lura l-ġenerazzjoni tal-kulur kif ukoll jikkawżawha) jistgħu jinterferixxu mal-assaġġ u jwasslu għal stima falza tal-vijabbiltà. Dan jista' jsehh meta sustanza kimika tat-test speċifika ma titneħħix kompletament mit-tessut bi tlaħliħ jew meta din tippenetra l-*epidermis*. Jekk sustanza kimika tat-test taġixxi direttament fuq l-MTT (eż. riduċenti tal-MTT), ikollha kulur naturali, jew issir ikkulurita matul it-trattament tat-tessut, għandhom jintużaw kontrolli addizzjonali biex jiġu identifikati u kkoreġuti l-interferenzi tas-sustanzi kimiċi tat-test mat-teknika ta' kejl tal-vijabbiltà (ara l-paragrafi 29 u 33). Spjegazzjoni dettaljata dwar kif għandhom jiġu kkoreġuti tnaqqis u interferenzi diretti tal-MTT permezz ta' agenti koloranti hi disponibbli fl-SOPs għall-erba' mudelli validati inklużi f'dan il-metodu ta' ttestjar (32) (33) (34) (35).
29. Biex jiġu identifikati r-ridutturi diretti tal-MTT, kull sustanza kimika tat-test għandha tizdied ma' soluzzjoni MTT preparata ġdida. Jekk it-taħlita ta' MTT li fiha s-sustanza kimika tat-test issir blu/vjola, is-sustanza kimika tat-test tkun preżunta li tnaqqas b'mod dirett l-MTT u għandha ssir verifika funzjonali oħra fuq it-tessuti tal-RhE mhux vijabbli, indipendentement mill-użu tal-kejl tal-assorbanza standard (OD) jew ta' proċedura tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC. Din il-verifika funzjonali addizzjonali tħaddem tessuti maqtula li jkollhom biss attività metabolika residwa iżda jassorbu s-sustanza kimika tat-test b'mod simili bħal tessuti vijabbli. Kull sustanza kimika tat-test li tnaqqas l-MTT tiġi applikata fuq tal-anqas żewġ repliki tat-tessut maqtula li ssirilhom il-proċedura shiħa ta' ttestjar biex jiġi ġġenerat tnaqqis mhux speċifiku tal-MTT (NSMTT) (32) (33) (34) (35). Kontroll tal-NSMTT wieħed hu biżżejjed għal kull sustanza kimika tat-test indipendentement min-numru ta' testijiet/sessjonijiet indipendenti mwettqa. Imbagħad, il-vijabbiltà tat-tessuti veru tiġi kkalkolata bħala l-vijabbiltà tat-tessuti percentwali miksuba b'tessuti haġġin esposti għar-riduċent tal-MTT nieqes it-tnaqqis tal-MTT mhux speċifiku

perċentwali miksub bit-tessuti maqtula esposti għall-istess riduċent tal-MTT, ikkalkolat b'rabta mas-sessjoni ta' kontroll negattiv b'mod konkorrenti għat-test li jkun qed jiġi kkoreġut (%NSMTT).

30. Biex tiġi identifikata interferenza potenzjali mis-sustanzi kimiċi tat-test ikkukuriti jew mis-sustanzi kimiċi tat-test li jitlewnu meta jidhlu f'kontatt mal-ilma jew mal-isopropanol u tittiehed deċiżjoni dwar il-ħtieġa ta' kontrolli addizzjonali, għandha ssir analiżi spettrali tas-sustanza kimika tat-test fl-ilma (ambjent matul l-esponiment) u/jew fl-isopropanol (soluzzjoni tal-estrazzjoni). Jekk is-sustanza kimika tat-test fl-ilma u/jew fl-isopropanol tassorbi d-dawl fil-medda ta'  $570 \pm 30$  nm, għandhom isiru kontrolli ulterjuri tal-kolorant jew inkella għandha tintuża proċedura ta' spettrofotometrija tal-HPLC/UPLC f'liema każ dawn il-kontrolli ma jkunux meħtieġa (ara l-paragrafi 33 u 34). Meta jsir il-kejl tal-assorbanza standard (OD), kull sustanza kimika tat-test imlewna li tinterferixxi tiġi applikata fuq tal-anqas żewġ repliki tat-tessut vijabbli, li ssirilhom il-proċedura shiħa ta' ttestjar iżda jiġu inkubati b'medium minflok b'soluzzjoni tal-MTT matul l-istadju tal-inkubazzjoni tal-MTT biex jiġġeneraw kontroll tal-kulur mhux speċifiku (NSC<sub>living</sub>). Il-kontroll tal-NSC<sub>living</sub> irid jitwettaq fl-istess ħin bħall-ittestjar tas-sustanza kimika tat-test ikkukurita u f'każ ta' ttestjar multiplu, irid jitwettaq kontroll indipendenti tal-NSC<sub>living</sub> li għandu jsir b'kull test imwettaq (f'kull sessjoni) minhabba l-varjabbiltà bijoloġika inerenti tat-tessuti ħajjin. Imbagħad il-vijabbiltà vera tat-tessuti tiġi kkalkolata bħala l-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali miksuba b'tessuti ħajjin esposti għas-sustanza kimika tat-test interferenti u inkubati bis-soluzzjoni MTT nieqes il-kulur mhux speċifiku perċentwali miksub bit-tessuti ħajjin esposti għas-sustanza kimika tat-test interferenti u inkubati b'medium mingħajr MTT, imwettqa fl-istess ħin bħat-test li jkun qed jiġi kkoreġut (%NSC<sub>living</sub>).
31. Is-sustanzi kimiċi tat-test li jiġu identifikati bħala li jipproduċu tnaqqis dirett tal-MTT (ara l-paragrafu 29) u interferenza tal-kulur (ara l-paragrafu 30) se jkunu jeħtieġu t-tielet sett ta' kontrolli wkoll, minbarra l-kontrolli tal-NSMTT u tal-NSC<sub>living</sub> deskritti fil-paragrafi ta' qabel, meta jitwettaq il-kejl tal-assorbanza standard (OD). Normalment dan ikun il-każ b'sustanzi kimiċi tat-test ikkukuriti skuri li jinterferixxu mal-assaġġ tal-MTT (eż. blu, vjola, suwed) minhabba li l-kulur intrinsiku tagħhom ixekkel il-valutazzjoni tal-kapaċità tagħhom li jnaqqsu b'mod dirett l-MTT kif deskritt fil-paragrafu 29. Dawn is-sustanzi kimiċi tat-test jistgħu jitgħaqqdu kemm ma' tessuti ħajjin kif ukoll ma' dawk maqtula u, għalhekk, il-kontroll tal-NSMTT jaf ma jikkoreġix biss għat-tnaqqis potenzjali dirett tal-MTT mis-sustanza kimika tat-test, iżda anki għall-interferenza tal-kulur li tirriżulta mit-tgħaqqid tas-sustanza kimika tat-test mat-tessuti maqtula. Dan jista' jwassal għal korrezzjoni doppja għall-interferenza tal-kulur peress li l-kontroll tal-NSC<sub>living</sub> diġà jikkoreġi għall-interferenza tal-kulur li tirriżulta mit-tgħaqqid tas-sustanza kimika tat-test mat-tessuti ħajjin. Biex tiġi evitata korrezzjoni doppja possibbli għall-interferenza tal-kulur, irid isir it-tielet kontroll għal kulur mhux speċifiku f'tessuti maqtula (NSC<sub>killed</sub>). F'dan il-kontroll

addizzjonali, is-sustanza kimika tat-test tiġi applikata fuq tal-anqas żewġ repliki tat-tessuti maqtula, li ssirilhom il-proċedura tal-ittestjar shiġha iżda jiġu inkubati b'medium minflok is-soluzzjoni tal-MTT matul l-istadju tal-inkubazzjoni tal-MTT. Kontroll tal-NSC<sub>killed</sub> wieheh hu biżżejjed għal kull sustanza kimika tat-test indipendentement min-numru ta' testijiet/sessjonijiet indipendenti mwettqa, iżda għandu jsir fl-istess hin mal-kontroll tal-NSMTT u, fejn possibbli, bl-istess lott ta' tessuti. Imbagħad il-vijabbiltà vera tat-tessuti tiġi kkalkolata bħala l-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali miksba b'tessuti haġġin esposti għas-sustanza kimika tat-test nieqes il- %NSMTT nieqes il- %NSC<sub>living</sub> flimkien mal-kulur mhux speċifiku perċentwali miksba bit-tessuti maqtula esposti għas-sustanza kimika tat-test interferenti u inkubati b'medium mingħajr MTT, ikkalkolati b'rabta mas-sessjoni tal-kontroll negattiv imwettqa fl-istess hin bħat-test li jkun qed jiġi kkoreġut (%NSC<sub>killed</sub>).

32. Ta' min jinnota li t-tnaqqis tal-MTT mhux speċifiku u l-interferenzi tal-kulur mhux speċifiku jistgħu jżidu l-kejl tal-estratt tat-tessut f'livell oġġla mill-medda tal-linearità tal-ispettrofotometru. Fuq din il-bażi, kull laboratorju għandu jiddetermina l-medda tal-linearità tal-ispettrofotometru tiegħu bil-formażan tal-MTT (CAS # 57360-69-7) minn sors kummerċjali qabel il-bidu tal-ittestjar tas-sustanzi kimiċi tat-test għal finijiet regolatorji. Il-kejl tal-assorbanza standard (OD) bl-użu tal-ispettrofotometru hu xieraq biex jiġu vvalutati r-riduċenti diretti tal-MTT u s-sustanzi kimiċi tat-test interferenti tal-kulur meta l-ODs tal-estratti tat-tessuti miksba bis-sustanza kimika tat-test mingħajr ebda korrezzjoni għal tnaqqis dirett tal-MTT u/jew għal interferenza tal-kulur ikunu fi hdan il-medda lineari tal-ispettrofotometru jew meta l-vijabbiltà perċentwali mhux ikkoreġuta miksba bis-sustanza kimika tat-test diġà tkun  $\leq 50\%$ . Minkejja dan, ir-riżultati għas-sustanzi kimiċi tat-test li jipproduċu %NSMTT u/jew %NSC<sub>living</sub>  $\geq 50\%$  tal-kontroll negattiv għandhom jittiehdu b'attenzjoni peress li dan hu l-limitu użat biex jiġu distinti s-sustanzi kimiċi klassifikati minn dawh mhux klassifikati (ara l-paragrafu 36).
33. Għal sustanzi kimiċi tat-test ikkuluriti li ma jkunux kompatibbli mal-kejl tal-assorbanza standard (OD) minhabba interferenza qawwija wisq mal-assaġġ MTT, tista' tithaddem il-proċedura alternattiva tal-ispettrofotometrija HPLC/UPLC biex jitkejjel il-formażan MTT (ara l-paragrafu 34) (36). Is-sistema tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC tippermetti s-separazzjoni tal-formażan MTT mis-sustanza kimika tat-test qabel il-kwantifikazzjoni tiegħu (36). Għal din ir-raġuni, il-kontrolli tal-NSC<sub>living</sub> jew tal-NSC<sub>killed</sub> qatt ma jkunu meħtieġa meta tintuża l-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC, indipendentement mis-sustanza kimika li tkun qed tiġi ttestjata. Il-kontrolli tal-NSMTT xorta waħda għandhom jintużaw jekk is-sustanza kimika tat-test tkun suspettata li tnaqqas b'mod dirett l-MTT jew ikollha kulur li jimpedixxi l-valutazzjoni tal-kapaċità ta' tnaqqis dirett tal-MTT (kif deskritt fil-paragrafu 29). Meta tintuża l-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC biex jitkejjel il-formażan MTT, il-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali tiġi kkalkolata bħala l-oġġla erja perċentwali tal-formażan MTT miksba b'tessuti haġġin esposti għas-sustanza kimika tat-test meta mqabbla mal-oġġla erja tal-formażan MTT miksba bil-kontroll negattiv



konkorrenti. Għal sustanzi kimiċi tat-test li kapaċi jnaqqsu l-MTT b'mod dirett, il-vijabbiltà vera tat-tessuti tiġi kkalkolata bħala l-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali miksuba b'tessuti ħajjin esposti għas-sustanza kimika tat-test nieqes il- %NSMTT. Finalment, ta' min jinnota li r-riduċenti diretti tal-MTT li jistgħu jkunu interferenti tal-kulur ukoll, li jinżammu fit-tessuti wara t-trattament u jnaqqsu l-MTT b'tant saħħa li jwasslu għal Ods (bl-użu ta' kejl standard tal-ODs) jew l-oghla erjas (bl-użu tal-ispettrofotometrija tal-UPLC/HPLC) tal-estratti tat-tessuti ttestjati li jaqgħu barra mill-medda tal-linearità tal-ispettrofotometru ma jistgħux jiġu vvalutati, għalkemm dawn ikunu mistennija jseħħu f'sitwazzjonijiet rari ħafna biss.

34. L-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC tista' tintuża wkoll bit-tipi kollha ta' sustanzi kimiċi tat-test (ikkuluriti, mhux ikkuluriti, riduċenti tal-MTT u mhux riduċenti tal-MTT) għall-kejl tal-formażen MTT (36). Minhabba d-diversità tas-sistemi tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC, il-kwalifikazzjoni tas-sistema tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC għandha tintwera qabel l-użu tagħha għall-kwantifikazzjoni tal-formażen MTT mill-estratti tat-tessuti bl-issodisfar tal-kriterji ta' aċċettazzjoni għal sett ta' parametri standard ta' kwalifikazzjoni fuq il-bażi ta' daww deskritti fil-gwida tal-Food and Drug Administration tal-Istati Uniti għall-industrija fuq il-validazzjoni tal-metodi bijoanalitiċi (36)(37). Dawn il-parametri importanti u l-kriterji ta' aċċettazzjoni tagħhom jintwerew fl-Appendiċi 4. Ladarba jiġu ssodisfati l-kriterji ta' aċċettazzjoni definiti fl-Appendiċi 4, is-sistema tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC titqies kwalifikata u lesta biex tkejjel il-formażen MTT fil-kundizzjonijiet sperimentali deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar.

### **Kriterji ta' Aċċettabbiltà**

35. Għal kull metodu ta' ttestjar li juża lottijiet tal-mudell tal-RhE validi (ara l-paragrafu 23), it-tessuti ttrattati bil-kontroll negattiv għandhom jimmanifestaw OD li tirrefletti l-kwalità tat-tessuti li segwew il-passi ta' kunsinna u riċevuta u l-proċessi kollha tal-protokoll. Il-valuri ta' kontroll tal-OD ma għandhomx ikunu aktar baxxi mil-limiti storikament stabbiliti. B'mod simili, it-tessuti ttrattati bil-PC, jiġifieri SDS 5 % milwiema, għandhom jirriflettu l-hila tagħhom li jwieġbu għal sustanza kimika irritanti taħt il-kundizzjonijiet tal-metodu ta' ttestjar (ara l-Appendiċi 3 u għal aktar informazzjoni l-SOPs tal-erba' mudelli tat-test inklużi f'din it-TG (32) (33) (34) (35)). Il-kejljiet assoċjati u xierqa tal-varjabbiltà bejn ir-repliki tat-tessuti, jiġifieri d-devjazzjonijiet standard (SD) għandhom jaqgħu fi ħdan il-limiti tal-aċċettazzjoni stabbiliti għall-mudell tat-test użat (ara l-Appendiċi 3).

### **Interpretazzjoni tal-Mudell tar-Riżultati u Tbassir**

36. Il-valuri tal-OD miksuba minn kull sustanza kimika tat-test jistgħu jintużaw biex jiġi kkalkolat il-perċentwal ta' vijabbiltà normalizzat għall-kontroll negattiv, li hu stabbilit għal 100 %. F'każ li tintuża l-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC, il-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali tiġi kkalkolata bħala l-oghla erja perċentwali tal-formażen MTT miksuba

b'tessuti ħajjin esposti għas-sustanza kimika tat-test meta mqabbla mal-ogħla erja tal-formażan MTT miksuba bil-kontroll negattiv konkorrenti. Il-valur ta' limitu tal-perċentwal tal-vijabbiltà ta' ċellola li jiddistingwi sustanzi kimiċi tat-test irritanti minn dawk mhux klassifikati u l-proċedura/i statistika/statistiki użata/i biex jiġu evalwati r-riżultati u jiġu identifikati s-sustanzi kimiċi irritanti għandhom jiġu ddefiniti u dokumentati b'mod ċar u għandu jintwera li dawn huma xierqa (ara l-SOPs tal-mudelli tat-test għal informazzjoni). Il-valuri ta' limitu għat-tbassir tal-irritazzjoni huma pprovduti hawn taht:

- Is-sustanza kimika tat-test hi identifikata bħala waħda li teħtieġ klassifikazzjoni u tikkettar skont il-GHS tan-NU/is-CLP (Kategorija 2 jew Kategorija 1) jekk il-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali medja wara l-esponiment u l-inkubazzjoni ta' wara t-trattament tkun anqas jew daqs ( $\leq$ ) 50 %. Peress li l-mudelli tat-test tal-RhE koperti minn dan il-metodu ta' ttestjar ma jistgħux jiddistingwu bejn il-Kategoriji 1 u 2 tal-GHS tan-NU/tas-CLP, se jkun hemm bżonn ta' informazzjoni ulterjuri dwar il-korrużjoni tal-ġilda biex jiġi deċiż dwar il-klassifikazzjoni finali tagħha [ara woll id-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar il-IATA (3)]. Fil-każ li s-sustanza kimika tat-test tinstab li ma tkunx korrużiva (eż. ibbażata fuq it-TM.40, B.40bis jew B.65), u turi vijabbiltà tat-tessuti wara l-esponiment u l-inkubazzjoni ta' wara t-trattament tkun anqas jew daqs ( $\leq$ ) 50 %, is-sustanza kimika tat-test titqies li tkun irritanti għall-ġilda skont il-Kategorija 2 tal-GHS tan-NU/is-CLP.
- Skont il-qafas regolatorju fil-pajjiżi membri, is-sustanza kimika tat-test tista' titqies bħala mhux irritanti għall-ġilda skont L-Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU/tas-CLP jekk il-vijabbiltà tat-tessuti wara l-esponiment u l-inkubazzjoni ta' wara t-trattament tkun aktar ( $>$ ) minn 50 %.

## **DATA U RAPPORTAR**

### **Data**

37. Għal kull sessjoni, id-*data* mit-tessuti replikati individwali (eż. valuri tal-OD u *data* dwar il-perċentwal ikkalkolat ta' vijabbiltà taċ-ċelloli għal kull sustanza kimika tat-test, inkluża l-klassifikazzjoni) għandha tiġi rrapportata f'forma tabulari, inkluża d-*data* minn esperimenti ripetuti, kif ikun xieraq. Barra minn hekk, għandhom jiġu rrapportati l-SD  $\pm$  medji għal kull sessjoni. Interazzjonijiet osservati mar-reagent u s-sustanzi kimiċi tat-test ikkuluriti tal-MTT għandhom jiġu rrapportati għal kull sustanza kimika ttestjata.

### **Rapport tat-Test**

38. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

*Sustanza Kimika tat-Test u Sustanzi Kimiċi tal-Kontroll:*

- Sustanza monokostitwenti: l-identifikazzjoni kimika, bhall-isem IUPAC jew CAS, in-numru CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ;
- Sustanza multikostitwenti, UVCB u tahlita: ikkaratterizzati sa fejn possibbli mill-identità kimika (ara aktar 'il fuq), l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprietajiet fizikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti;
- Id-dehra fizika, is-solubbiltà fl-ilma, u kwalunkwe proprietà fizikokimika rilevanti addizzjonali;
- Is-sors, in-numru tal-lott jekk disponibbli;
- It-trattament tas-sustanza kimika tat-test/tas-sustanzi kimiċi tal-kontroll qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (eż., it-tishin, it-thin);
- L-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test, id-data ta' limitu għall-użu, jew id-data għall-analiżi mill-ġdid, jekk magħrufa;
- Il-kundizzjonijiet tal-ħżin.

Il-mudell u l-protokoll tal-RhE użati (u l-ħsieb għall-għażla, jekk applikabbli)

#### *Kundizzjonijiet tat-Test:*

- Il-mudell tal-RhE użat (inkluż in-numru tal-lott);
- Informazzjoni dwar il-kalibrazzjoni għall-apparat tal-kejl (eż. spettrofotometru), it-tul ta' mewġa u l-band pass (jekk applikabbli) użati għall-kwantifikazzjoni tal-formażan MTT, u l-medda tal-linearità tal-apparat tal-kejl; Deskrizzjoni tal-metodu użat għall-kwantifikazzjoni tal-formażan MTT;
- Deskrizzjoni tal-kwantifikazzjoni tas-sistema tal-ispettrotometrija tal-HPLC/UPLC, jekk applikabbli; Informazzjoni ta' appoġġ kompluta għall-mudell tal-RhE speċifiku użat inkluża l-prestazzjoni tiegħu. Din l-informazzjoni għandha tiġi inkluża, iżda ma għandhiex tkun limitata għal dawn:
  - i) Il-vijabbiltà;
  - ii) Il-funzjoni ta' protezzjoni;
  - iii) Il-morfologija;

- iv) Ir-riproduċibbiltà u l-prevedibbiltà;
- v) Il-kontrolli tal-kwalità (QC) tal-mudell;
- Referenza għad-*data* storika tal-mudell. Din għandha tinkludi, iżda ma tkunx limitata għall-aċċettabbiltà tad-*data* tal-QC b'referenza għad-*data* tal-lottijiet storiċi.
- Wiri ta' profiċjenza fit-twettiq tal-metodu ta' ttestjar qabel użu ta' rutina bl-ittestjar tas-sustanzi ta' profiċjenza.

*Proċedura tat-Test:*

- Dettalji tal-proċedura tat-test użata (inklużi l-proċeduri ta' hasil użati wara l-perjodu ta' esponiment); Doża tas-sustanza kimika tat-test u tal-kontrolli użati;
- Durata u temperatura tal-perjodu ta' esponiment u tal-inkubazzjoni ta' wara l-esponiment;
- Indikazzjoni tal-kontrolli użati għal riduċenti diretti tal-MTT u/jew sustanzi kimiċi tat-test li jerġu l-kulur, jekk applikabbli;
- In-numru ta' repliki tat-tessuti użati għal kull sustanza kimika tat-test u kontroll (PC, kontroll negattiv, u NSMTT, NSC<sub>living</sub> u NSC<sub>killed</sub>, jekk applikabbli);
- Deskrizzjoni tal-kriterji tad-deċiżjonijiet/tal-mudell tat-tbassir applikati fuq il-bażi tal-mudell tal-RhE użat;
- Deskrizzjoni ta' kwalunkwe modifika fil-proċedura tat-test (inklużi l-proċeduri tal-hasil).

*Kriterji ta' Aċċettazzjoni tas-Sessjoni u tat-Test:*

- Il-valuri medji tal-kontrolli pożittivi u negattivi u l-meded tal-aċċettazzjoni fuq il-bażi tad-*data* storika; Il-varjabbiltà aċċettabbli bejn ir-repliki tat-tessuti għall-kontrolli pożittivi u negattivi;
- Il-varjabbiltà aċċettabbli bejn ir-repliki tat-tessuti għas-sustanza kimika tat-test.

*Ir-riżultati:*

- Tabultazzjoni tad-*data* għal sustanza kimika tat-test individwali għal kull sessjoni u kull kejl tar-repliki inklużi l-OD jew l-ogħla erja tal-formażen MTT, il-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali, il-vijabbiltà perċentwali medja tat-tessuti u l-SD;

- Jekk applikabbli, ir-riżultati tal-kontrolli użati għar-riduċenti diretti tal-MTT u/jew is-sustanzi kimiċi tat-test li jerġu l-kulur inklużi l-OD jew l-ogħla erja tal-formażan MTT, %NSMTT, %NSC<sub>living</sub>, %NSC<sub>killed</sub>, SD, il-vijabbiltà perċentwali korretta finali tat-tessuti;
- Ir-riżultati miksuba bis-sustanza/i kimika/kimiċi tat-test u bil-kontrolli b'rabta massessjoni definita u mal-kriterji ta' aċċettazzjoni tat-test;
- Deskrizzjoni ta' effetti oħra osservati;
- Il-klassifikazzjoni derivata b'referenza għall-mudell ta' tbassir/ghall-kriterji tad-deċiżjoni użati.

*Diskussjoni tar-riżultati*

*Konklużjonijiet*

## DOKUMENTAZZJONI

- (1) In-Nazzjonijiet Uniti (NU) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, NU New York u Ġinevra, 2013. Disponibbli fuq: [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) EURL-ECVAM (2009). Dikjarazzjoni dwar il-“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”, Mahruġa mill-Kumitat Konsultattiv Xjentifiku tal-ECVAM (ESAC31), 9 ta' April 2009. Disponibbli fuq: [https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC31\\_skin-irritation-statement\\_20090922.pdf](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), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.
- (4) Il-Kapitolu B.4 ta' dan l-Anness, Irritazzjoni, Korrużjoni Dermal Akuta.
- (5) Il-Kapitolu B.40 ta' dan l-Anness, Korrużjoni tal-Ġilda *In Vitro*: Ir-Reżistenza Elettrika Transkutanja (TER).
- (6) Il-Kapitolu B.40bis ta' dan l-Anness, Korrużjoni tal-Ġilda *In Vitro*: Metodu ta' testjar tal-Epidermis Uman Rikostitwit (RHE).
- (7) Kapitolu B.65 ta' dan l-Anness, Metodu ta' Ttestjar tal-Barriera tal-Membrana *In Vitro*.
- (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). Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.
- (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), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.
- (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. u 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. u 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. u 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. u 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. u 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. u 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. u 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- $\alpha$ .
- (18) Eskes C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. u 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. u 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). Dikjarazzjoni dwar il-Validità tat-Testijiet *In Vitro* għall-Irritazzjoni tal-Ġilda, Maħruġa mill-Kumitat Konsultattiv Xjentifiku tal-ECVAM (ESAC26), 27 ta' April 2007. Disponibbli fuq: [https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC26\\_statement\\_SkinIrritation\\_20070525\\_C.pdf](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. Dawn huma l-PS oriġinali użati għall-validazzjoni taż-żewġ metodi ta' ttestjar. Dawn il-PS ma għandhomx jibqgħu jintużaw peress li issa hemm verżjoni aġġornata (8) disponibbli.*
- (22) EURL-ECVAM. (2008). Dikjarazzjoni dwar il-Validità Xjentifika tat-Testijiet *In Vitro* għall-Irritazzjoni tal-Ġilda, Maħruġa mill-Kumitat Konsultattiv Xjentifiku tal-ECVAM (ESAC29), 5 ta' Novembru 2008. [https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication/ESAC\\_Statement\\_SkinEthic-EpiDerm-FINAL-0812-01.pdf](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), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.
- (24) Katoh, M., Hamajima, F., Ogasawara, T. u 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. u 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), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.
- (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), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.



- (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. u 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. u 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™ (Frar 2009). SOP, Verzjoni 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™ (Riveduta Marzu 2009). SOP, Verzjoni 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 (Ġunju 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., u 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. Il-manuskritt għadu qed jithejja.
- (37) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Mejju 2001. Disponibbli fuq: [<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>].

- (38) Harvell, J.D., Lamminstausta, K., u Maibach, H.I. (1995). Irritant Contact Dermatitis, fi: 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. Din hi l-verżjoni kurrenti tal-PS tal-ECVAM, aġġornata fl-2009 fid-dawl tal-implimentazzjoni tal-GHS tan-NU. Dawn il-PS ma għandhomx jibqgħu jintużaw peress li issa hemm verżjoni aġġornata (8) disponibbli relatata mat-TG preżenti.*
- (40) EURL-ECVAM. (2009). Dikjarazzjoni tal-ESAC dwar l-Istandards tal-Prestazzjoni (PS) għall-Ittestjar tal-Irritazzjoni tal-Ġilda *In Vitro* bl-użu ta' Epidermis Uman Rikostitwit, Mahruġa mill-Kumitat Xjentifiku Konsultattiv tal-ECVAM (ESAC31), 8 ta' Lulju 2009.
- (41) KE (2001). Id-Direttiva tal-kummissjoni 2001/59/KE tas-6 ta' Awwissu 2001 li taddatta għall-progress tekniku għat-28 darba d-Direttiva tal-Kunsill 67/548/KEE rigward l-approssimazzjoni tal-liġijiet, tar-regolamenti u tad-dispożizzjonijiet amministrattivi dwar il-klassifikazzjoni, l-imballaġġ u l-ittikkettjar ta' sustanzi perikolużi, il-*Ġurnal Uffiċjali tal-Unjoni Ewropea* L225, 1-333.

## **Appendiċi 1**

### **DEFINIZZJONIJIET**

**Akkuratezza:** Il-qrubija fil-livell ta' qbil bejn ir-riżultati tal-metodu ta' ttestjar u l-valuri referenzjarji aċċettati. Hi kejl tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar u wiehed mill-aspetti ta' rilevanza. Spiss it-terminu jintuża b'mod alternanti ma' "konkordanza" biex ifisser il-proporzjon ta' riżultati korretti ta' metodu ta' ttestjar (9).

**Vijabbiltà taċ-ċelloli:** Il-parametru li jkejjel l-attività shiha tal-popolazzjoni ċellulari *eż.* il-kapaċità tad-deidrogenaġi mitokondrijali ċellulari biex titnaqqas is-sustanza koloranti vitali MTT ([bromur tat-3-(4,5-Dimetiltijazol 1-2-il)-2,5-difeniltetrażolju, blu tijazolil;], li, skont il-punt ta' tmiem imkejjel u d-disinn tat-test użat, tikkorrispondi għall-ghadd totali u/jew għall-vitalità taċ-ċelloli ħajjin.

**Sustanza kimika:** tfisser sustanza jew tahlita.

**Konkordanza:** Dan hu kejl tal-prestazzjoni għal mudelli tat-test li jagħtu riżultat kategoriku, u hu aspett wiehed tar-rilevanza. It-terminu kultant jintuża b'mod interkambjabbli mal-akkuratezza, u hu definit bħala l-proporzjon tas-sustanzi kimiċi kollha ttestjati li jiġu klassifikati kif suppost bħala pożittivi jew negattivi. Il-konkordanza hi ferm dipendenti fuq il-prevalenza tal-pożittivi fit-tipi ta' sustanzi kimiċi tat-test li jkunu qed jiġu eżaminati (9).

**ET<sub>50</sub>:** Jista' jiġi stmat bid-determinazzjoni tal-hin tal-esponiment mehtieg biex il-vijabbiltà taċ-ċelloli titnaqqas b'50 % mal-applikazzjoni tas-sustanza kimika ta' riferiment f'konċentrazzjoni speċifikata fissa, ara wkoll IC<sub>50</sub>.

**GHS (Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi min-Nazzjonijiet Uniti (NU)):** Sistema li tipproponi l-klassifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi (sustanzi u tahlitiet) skont it-tipi u l-livelli standardizzati ta' perikli fiżiċi, sanitarji u ambjentali, u tindirizza l-elementi ta' komunikazzjoni korrispondenti, bħal pittogrammi, kliem ta' twissija, dikjarazzjonijiet ta' periklu, dikjarazzjonijiet ta' prekawzjoni u skedi ta' *data* dwar is-sikurezza, biex jitwassal tagħrif dwar l-effetti avversi bil-ghan li n-nies ikunu protetti (inklużi min ihaddem, il-haddiema, it-trasportaturi, il-konsumaturi u min jintervjeni f'emergenza) u l-ambjent (1).

**HPLC:** Kromatografija Likwida ta' Prestazzjoni Għolja.

**IATA:** Approċċ Integrat għall-Ittestjar u għall-Valutazzjoni

**IC<sub>50</sub>:** Tista' tiġi stmata bid-determinazzjoni tal-konċentrazzjoni li fiha sustanza kimika ta' riferiment tnaqqas il-vijabbiltà tat-tessuti b'50 % (IC<sub>50</sub>) wara hin ta' esponiment fiss, ara wkoll ET<sub>50</sub>.

**Doża infinita:** Ammont tas-sustanza kimika tat-test applikata għall-*epidermis* lil hinn mill-ammont mehtieġ biex tinkesa b'mod shiħ u uniformi s-superficje tal-*epidermis*.

**Tahlita:** Tahlita jew soluzzjoni msawra minn żewġ sustanzi jew aktar.

**Sustanza monokostitwenti:** Sustanza, definita mill-kompożizzjoni kwantitattiva tagħha, li fiha kostitwent ewlieni wiehed ikun preżenti għal tal-anqas 80 % (w/w).

**MTT:** Bromur tat-3-(4,5-Dimetiltjazo-2-il)-2,5-difeniltetrazolu; Bromur tat-tetrazolu tal-blu tjazolil.

**Sustanza multikostitwenti:** Sustanza, definita mill-kompożizzjoni kwantitattiva tagħha, li fiha aktar minn kostitwent ewlieni wiehed ikunu preżenti f'konċentrazzjoni  $\geq 10$  % (w/w) u  $< 80$  % (w/w). Sustanza multikostitwenti hi r-riżultat ta' proċess tal-manifattura. Id-differenza bejn tahlita u sustanza multikostitwenti hi li tahlita tinkiseb bit-thallit ta' żewġ sustanzi jew aktar mingħajr reazzjoni kimika. Sustanza multikostitwenti hi r-riżultat ta' reazzjoni kimika.

**NSC<sub>killed</sub>:** Kulur Mhux Speċifiku f'tessuti maqtula.

**NSC:** Kulur Mhux Speċifiku f'tessuti ħajjin.

**NSMTT:** Tnaqqis fl-MTT Mhux Speċifiku.

**Standards tal-prestazzjoni (PS):** Standards, ibbażati fuq metodu ta' ttestjar validu, li jipprovdu bażi għall-evalwazzjoni tal-komparabbiltà ta' metodu ta' ttestjar propost li hu simili b'mod funzjonali u mekkanistiku. Hemm inklużi; (i) il-komponenti essenzjali tal-metodi ta' ttestjar; (ii) lista minima ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza magħzula minn fost is-sustanzi kimiċi użati biex tintwera l-prestazzjoni aċċettabbli tal-metodu ta' ttestjar validat; u (iii) il-livelli komparabbli ta' akkuratizza u ta' affidabbiltà, fuq il-bażi ta' dak li nkiseb għall-metodu ta' ttestjar validat, li l-metodu ta' ttestjar propost għandu juri meta evalwat bl-użu tal-lista minima ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza (9).

**PC:** Kontroll Pożittiv, Replika li jkun fiha l-komponenti kollha ta' sistema tat-test u trattata b'sustanza kimika li jkun magħruf li tikkawża reazzjoni pożittiva. Biex jiġi żgurat li l-varjabbiltà fir-rispons tal-kontroll pożittiv tkun tista' tiġi vvalutata tul iż-żmien, id-daqs tar-rispons pożittiv ma għandux ikun eċċessiv.

**Rilevanza:** Deskrizzjoni tar-relazzjoni tat-test mal-effett ta' interess u jekk huwiex sinifikanti u utli għal skop partikolari. Din tiddetermina kemm it-test għandu l-hila jkejjel jew ibassar b'mod korrett l-effett bijologiku ta' interess. Ir-rilevanza tinkorpora l-kunsiderazzjoni tal-akkuratezza (konkordanza) ta' metodu ta' ttestjar (9).

**Affidabbiltà:** Kejljiet ta' kemm metodu ta' ttestjar jista' jitwettaq b'mod riproducibbli fil-laboratorji u bejn il-laboratorji tul iż-żmien, meta jitwettaq billi jintuza l-istess protokoll. Din hi vvalutata billi tiġi kkalkolata r-riproducibbiltà fi ħdan laboratorju u bejn laboratorju u iehor (9).

**Test ta' sostituzzjoni:** Test li hu mfassal biex jieħu post test li hu f'użu ta' rutina u aċċettat għall-identifikazzjoni tal-perikli u/jew għall-valutazzjoni tar-riskji, u li ġie determinat li jipprovi protezzjoni ekwivalenti jew imtejba tas-saħħa tal-bniedem jew tal-annimali jew tal-ambjent, skont kif ikun applikabbli, meta mqabbel mat-test aċċettat, għas-sitwazzjonijiet u għas-sustanzi kimiċi ta' ttestjar possibbli kollha (9).

**Sessjoni:** Sessjoni tikkonsisti f'sustanza kimika tat-test waħda jew aktar ittestjata flimkien ma' kontroll negattiv u ma' PC.

**Sensittività:** Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi tat-test pożittivi/attivi kollha li huma klassifikati kif suppost mit-test. Hi kejl tal-preċiżjoni għal metodu ta' ttestjar li jipproduċi riżultati kategorici, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' metodu ta' ttestjar (9).

**Irritazzjoni tal-ġilda *in vivo*:** Il-produzzjoni ta' hsara reversibbli fuq il-ġilda wara li tiġi applikata sustanza kimika tat-test għal massimu ta' erba' sigħat. Irritazzjoni tal-ġilda hi reazzjoni lokali tat-tessut tal-ġilda affettwat u li tidher flit wara l-istimolazzjoni (38). Hi kkawżata minn reazzjoni infjammatorja lokali li tinvolvi s-sistema immuni innata (mhux speċifika) tat-tessut tal-ġilda. Hi karatterizzata primarjament minn proċess reversibbli li jinvolvi reazzjonijiet infjammatorji u ħafna mis-sinjali karatteristiċi kliniċi ta' irritazzjoni (eritema, edema, ħakk u uġiġħ) relatati mal-proċess ta' infjammazzjoni.

**Speċifità:** Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi tat-test negattivi/inattivi kollha li huma klassifikati kif suppost mit-test. Hi kejl tal-preċiżjoni għal metodu ta' ttestjar li jipproduċi riżultati kategorici, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' metodu ta' ttestjar (9).

**Sustanza:** Element kimiku u l-komposti tiegħu fl-istat naturali jew mislut minn kwalunkwe proċess ta' produzzjoni, li jinduċi kull addittiv neċessarju għall-preżervazzjoni tal-istabbiltà tiegħu u kwalunkwe impurità li tirriżulta mill-proċess użat, iżda bl-esklużjoni ta' kull solvent li jista' jkun separat mingħajr ma tkun effettwata l-istabbiltà tas-sustanza jew mibdula l-kompożizzjoni tagħha.

**Sustanza kimika tat-test:** Kwalunkwe sustanza jew taħlita li tkun qed tiġi ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

**UPLC:** Kromatografija Likwida ta' Prestazzjoni Għolja Ħafna.

**UVCB:** sustanzi b'kompożizzjoni varjabbli jew mhux magħrufa, prodotti jew materjali bijoloġiċi b'reazzjoni kumplessa.

## Appendiċi 2

### MUDELLI TAT-TEST INKLUŻI F'DAN IL-METODU TA' TTESTJAR

| Nru | Isem tal-mudell tat-test       | Tip ta' studju ta' validazzjoni                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Referenzi                                                                                           |
|-----|--------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1   | <b>EpiSkin™</b>                | Studju ta' validazzjoni prospettiv shih (2003-2007). Il-komponenti ta' dan il-mudell intużaw biex jiġu definiti l-komponenti essenzjali tal-metodu ta' ttestjar originali u aġġornat tal-PS tal-ECVAM (39) (40) (21)*. Barra minn hekk, id-data tal-metodu relatata mal-identifikazzjoni ta' sustanzi mhux klassifikati kontra daww klassifikati fformat il-bażi ewlenija għad-definizzjoni tal-valuri tal-ispeċifità u tas-sensittività tal-PS originali*. | (2) (10) (11) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (23) (32) (39) (40)                           |
| 2   | <b>EpiDerm™ SIT (EPI-200)</b>  | EpiDerm™ ( <i>originali</i> ): Għall-ewwel il-mudell tat-test saritlu validazzjoni prospettiva shiha flimkien man-Nru 1 mill-2003-2007. Il-komponenti ta' dan il-mudell intużaw biex jiġu definiti l-komponenti essenzjali tal-metodi ta' ttestjar originali u aġġornat tal-PS tal-ECVAM (39) (40) (21)*.<br><b>EpiDerm™ SIT (EPI-200)</b> : Modifika tal-EpiDerm™ originali giet validata bl-użu tal-PS originali tal-ECVAM (21) fl-2008*.                 | (2) (10) (12) (13) (15) (16) (17) (18) (20) (21) (23) (33) (39) (40)<br><br>(2) (21) (22) (23) (33) |
| 3   | <b>SkinEthic™ RHE</b>          | Studju ta' validazzjoni bbażat fuq l-Istandards tal-Prestazzjoni originali tal-ECVAM (21) fl-2008*.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | (2) (21) (22) (23) (31)                                                                             |
| 4   | <b>LabCyte EPI-MODEL24 SIT</b> | Studju ta' validazzjoni (2011-2012) ibbażat fuq l-Istandards tal-Prestazzjoni (PS) tat-TG 439 (8) tal-OECD li huma bbażati fuq il-PS* aġġornat tal-ECVAM (39) (40).                                                                                                                                                                                                                                                                                         | (24) (25) (26) (27) (28) (35) (39) (40) u l-PS ta' din it-TG (8)*                                   |

\*) L-Istandards tal-Prestazzjoni (PS) originali tal-ECVAM (21) ġew żviluppati fl-2007 mat-tlestija tal-istudju ta' validazzjoni prospettiv (16) li kien iġva l-valuta l-prestazzjoni tal-mudelli tat-test Nri 1 u 2 b'rabta mas-sistema ta' klassifikazzjoni kif deskritta fit-28 emenda tad-Direttiva tal-UE dwar is-Sustanzi Perikolużi (41). Fl-2008 ġew introdotti l-GHS tan-NU (1) u s-CLP tal-UE, li b'mod effettiv mexxew il-valur ta' limitu għad-distinzjoni bejn sustanzi mhux klassifikati u daww klassifikati minn puntegg *in vivo* ta' 2,0 għal 2,3. Biex jiġi adattat għal dan ir-rekwiżit regolatorju mibdul, il-valuri referenzjarji u l-lista ta' sustanzi kimiċi ta' riferiment tal-PS tal-ECVAM ġew aġġornati fl-2009 (2) (39) (40). Bħall-PS originali, anki l-PS aġġornati kienu primarjament ibbażati fuq *data* mill-mudelli Nru 1 u 2 (16), iżda użaw ukoll *data* dwar is-sustanzi kimiċi ta' riferiment mill-mudell Nru 3. Fl-2010, intużaw il-PS aġġornati tal-ECVAM għall-istipular tal-PS b'rabta ma' din it-TG (8). Għall-fini ta' dan il-metodu ta' ttestjar, EpiSkin™ hu kkunsidrat il-VRM, minhabba l-fatt li kien intuża biex jiġi żviluppati l-kriterji kollha tal-PS. Informazzjoni dettaljata dwar l-istudji ta' validazzjoni, kompilazzjoni tad-*data* ġenerata kif ukoll l-isfond għall-adattamenti neċessarji tal-PS bħala konsegwenza tal-implimentazzjoni tal-GHS tan-NU/tas-CLP jistgħu jinkisbu mid-dokument ta' spjegazzjoni ta' sfond tal-ECVAM/BfR għat-TG 439 korrispondenti tal-OECD (23).

SIT: Test tal-Irritazzjoni tal-Ġilda

RHE: Epidermis Uman Rikostitwit



### Appendiċi 3

## PARAMETRI TAL-PROTOKOLL SPECIFIĊI GHAL KULL WIEHED MILL-MUDELLI TAT-TEST INKLUŻI F'DAN IL-METODU TA' TTESTJAR

Il-mudelli tal-RhE juru protokoll simili ħafna u b'mod partikolari lkoll jużaw perjodu ta' wara l-inkubazzjoni ta' 42 siegħa (32) (33) (34) (35). Il-varjazzjonijiet jikkonċernaw primarjament tliet parametri relatati mal-funzjonijiet differenti ta' protezzjoni tal-mudelli tat-test u elenkati hawn: A) hin u volum ta' qabel l-inkubazzjoni, B) Applikazzjoni tas-sustanza kimiċi tat-test u C) Volum ta' wara l-inkubazzjoni.

|                                                      | <b>EpiSkin™<br/>(SM)</b>         | <b>EpiDerm™<br/>SIT (EPI-200)</b>                  | <b>SkinEthic<br/>RHE™</b>         | <b>LabCyte<br/>EPI-MODEL24 SIT</b> |
|------------------------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| <b>A) Preinkubazzjoni</b>                            |                                  |                                                    |                                   |                                    |
| Hin ta' inkubazzjoni                                 | 18- 24 siegħa                    | 18-24 siegħa                                       | < sagħtejn (2)                    | 15-30 siegħa                       |
| Volum medju                                          | 2ml                              | 0,9ml                                              | 0,3 jew 1ml                       | 0,5ml                              |
| <b>B) Applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test</b> |                                  |                                                    |                                   |                                    |
| Għal likwidi                                         | 10µl (26µl/cm²)                  | 30µl (47µl/cm²)                                    | 16µl (32µl/cm²)                   | 25µl (83µl/cm²)                    |
| Għal solidi                                          | 10mg<br>(26mg/cm²)<br>+ DW (5µl) | 25mg<br>(39mg/cm²)<br>+ DPBS (25µl)                | 16mg<br>(32mg/cm²)<br>+ DW (10µl) | 25mg (83mg/cm²)<br>+ DW (25µl)     |
| Użu ta' xibka tan-najlon                             | Ma ntuzatx                       | Jekk ikun hemm bżonn                               | Applikata                         | Ma ntuzatx                         |
| Hin totali tal-applikazzjoni                         | 15-il minuta                     | 60 minuta                                          | 42 minuta                         | 15-il minuta                       |
| Temperatura tal-applikazzjoni                        | RT                               | a) f'RT għal 25 minuta<br>b) f'37°C għal 35 minuta | RT                                | RT                                 |
| <b>C) Volum ta' wara l-inkubazzjoni</b>              |                                  |                                                    |                                   |                                    |
| Volum medju                                          | 2 ml                             | 0,9ml x 2                                          | 2 ml                              | 1 ml                               |
| <b>D) Varjabbiltà aċċettabbli massima</b>            |                                  |                                                    |                                   |                                    |
| Devjazzjoni standard bejn ir-repliki tat-tessuti     | SD18                             | SD18                                               | SD18                              | SD18                               |

RT: Temperatura ambjentali

DW: ilma distillat

DPBS: Salina tal-Bafer tal-Fosfat ta' Dulbecco

#### Appendiċi 4

### **PARAMETRI EWLENIN U KRITERJI TA' AĊĊETTAZZJONI GHALL-KWALIFIKAZZJONI TA' SISTEMA TAL-ISPETTROFOTOMETRU TA' HPLC/UPLC GHALL-KEJL TAL-FORMAŻAN MTT ESTRATT MIT-TESSUTI TAL-RHE**

| Parametru                                                                        | Protokoll Derivat mill-Gwida tal-FDA (36) (37)                                                                                                                                                                                                  | Kriterji ta' Aċċettazzjoni                                             |
|----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| Selettività                                                                      | Analizi tal-isopropanol, inbjank ħaj (estratt tal-isopropanol minn tessuti tal-RhE ħajjin mingħajr ebda trattament), inbjank mejjet (estratt tal-isopropanol minn tessuti tal-RhE maqtula mingħajr ebda trattament)                             | $Area_{interference} \leq 20 \%$<br>ta' $Area_{LLOQ}^1$                |
| Preċiżjoni                                                                       | Kontrolli tal-Kwalità (jiġifieri formażan MTT f' 1,6 µg/ml, 16 µg/ml u 160 µg/ml ) fl-isopropanol (n=5)                                                                                                                                         | $CV \leq 15 \%$ jew $\leq 20 \%$ għal-LLOQ                             |
| Preċiżjoni                                                                       | Kontrolli tal-Kwalità fl-isopropanol (n=5)                                                                                                                                                                                                      | $\%Dev \leq 15 \%$ jew $\leq 20 \%$ għal-LLOQ                          |
| Effett tal-Matriċi                                                               | Kontrolli tal-Kwalità fl-inbjank ħaj (n=5)                                                                                                                                                                                                      | $85 \% \leq$ Effett tal-Matriċi $\% \leq 115 \%$                       |
| Riport                                                                           | Analizi tal-isopropanol wara ULOQ <sup>2</sup> standard                                                                                                                                                                                         | $Area_{interference} \leq 20 \%$<br>tal- $Area_{LLOQ}$                 |
| Riproduċibbiltà (dakinhar)                                                       | Tliet kurvi ta' kalibrazzjoni indipendenti (fuq il-bażi ta' sitt dilwizzjonijiet ta' 1/3 konsekuttivi ta' formażan MTT fl-isopropanol mill-ULOQ, jiġifieri 200 µg/ml);<br>Kontrolli tal-Kwalità fl-isopropanol (n=5)                            | Kurvi ta' Kalibrazzjoni: $\%Dev \leq 15 \%$ jew $\leq 20 \%$ għal-LLOQ |
| Riproduċibbiltà (bejn ġranet differenti)                                         | Jum 1: Kurva ta' kalibrazzjoni 1 u Kontrolli tal-Kwalità fl-isopropanol (n=3)<br>Jum 2: Kurva ta' kalibrazzjoni 1 u Kontrolli tal-Kwalità fl-isopropanol (n=3)<br>Jum 3: Kurva ta' kalibrazzjoni 1 u Kontrolli tal-Kwalità fl-isopropanol (n=3) | Kontrolli tal-Kwalità: $\%Dev \leq 15 \%$ u $CV \leq 15 \%$            |
| Stabbiltà fuq Terminu Qasir tal-Formażan MTT fl-Estratt tat-Tessuti tal-RhE      | Kontrolli tal-Kwalità fl-inbjank ħaj (n=3) analizzati dakinhar tal-preparazzjoni u wara 24 siegħa ta' ħzin f' temperatura ambjentali                                                                                                            | $\%Dev \leq 15 \%$                                                     |
| Stabbiltà fit-Tul tal-Formażan MTT fl-Estratt tat-Tessuti tal-RhE, jekk meħtieġa | Kontrolli tal-Kwalità fl-inbjank ħaj (n=3) analizzati dakinhar tal-preparazzjoni u wara diversi jiem ta' ħzin f' temperatura speċifikata (eż. 4°C, -20°C, -80°C)                                                                                | $\%Dev \leq 15 \%$                                                     |

<sup>1</sup>LLOQ: Limitu Inferjuri ta' Kwantifikazzjoni, definit biex ikopri vijabbiltà tat-tessuti ta' 1-2 %, jiġifieri 0,8 µg/ml.

<sup>2</sup>ULOQ: Limitu Superjuri ta' Kwantifikazzjoni, definit biex ikun tal-anqas id-doppju tal-ogħla konċentrazzjoni mistennija ta' formażan MTT fl-estratti tal-isopropanol mill-kontrolli negattivi, jiġifieri 200 µg/ml."

(8) Fil-Parti B, jizdiedu l-Kapitoli li ġejjin:

## **“B.63 TEST TA’ SKRINJAR TAT-TOSSICITÀ RIPRODUTTIVA/TAL-IŻVILUPP**

### **INTRODUZZJONI**

1. Dan il-metodu ta’ ttestjar hu ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 421 tal-OECD (2016). Il-linji gwida tal-OECD għall-ittestjar tas-sustanzi kimiċi jiġu rieżaminati kull ċertu żmien fid-dawl tal-progress xjentifiku. Il-linja gwida tat-test ta’ skrinjar originali 421 ġiet adottata fl-1995, fuq il-bażi ta’ protokoll għal “Test ta’ Skrinjar għat-Tossicità Riproduttiva Preliminari” diskuss f’żewġ laqgħat ta’ esperti, f’Londra fl-1990 (1) u f’Tokyo fl-1992 (2).
2. Dan il-metodu ta’ ttestjar ġie aġġornat b’punti ta’ tmiem rilevanti tal-interferenti endokrinali, bħala segwitu għall-attività ta’ prijorità għolja mnedija fl-OECD fl-1998 biex jiġu riveduti l-linji gwida tat-test eżistenti u jiġu żviluppati linji gwida tat-test godda għall-iskrinjar u għall-ittestjar ta’ interferenti endokrinali potenzjali (3). Pereżempju, it-TG 407 tal-OECD (Studju dwar it-Tossicità Orali fuq 28 Jum b’Doża Ripetuta fir-Rodituri, Kapitolu B.7 ta’ dan l-Anness) ġiet miżjudha fl-2008 b’parametri xierqa biex tiġi individwata l-attività endokrinali tas-sustanzi kimiċi tat-test. L-objettiv fl-aġġornar tat-TG 421 kien li jiġu inklużi xi punti ta’ tmiem rilevanti ta’ interferenti endokrinali fit-TGs tal-iskrinjar meta l-perjodi ta’ esponiment ikopru whud mill-perjodi sensitivi matul l-iżvilupp (perjodi ta’ qabel it-twelid jew ta’ kmieni wara t-twelid).
3. Il-punti ta’ tmiem rilevanti tal-interferenti endokrinali addizzjonali magħżula, li wkoll huma parti mit-TG 443 (Studju Estiż dwar it-Tossicità Riproduttiva f’Ġenerazzjoni Waħda, Kapitolu B.56 ta’ dan l-Anness), kienu inklużi fit-TG 421 fuq il-bażi ta’ studju tal-fattibbiltà li jindirizza mistoqsijiet xjentifiċi u tekniċi relatati mal-inklużjoni tagħhom, kif ukoll adattamenti possibbli fid-disinn tat-test meħtieġa għall-inklużjoni tagħhom (4).
4. Dan il-metodu ta’ ttestjar hu mfassal biex jiġġenera informazzjoni limitata rigward l-effetti ta’ sustanza kimika tat-test fuq il-prestazzjoni riproduttiva fl-irġiel u fin-nisa bħall-funzjoni gonadali, l-imġiba tat-tgħammir, il-konċepiment, l-iżvilupp tal-konċepit u l-ħlas. Mhuwiex alternattiva għall-metodi ta’ ttestjar eżistenti B.31, B.34, B.35 jew B.56 u lanqas ma jidhrihom posthom.

### **KUNSIDERAZZJONIJIET TAL-BIDU**

5. Dan il-metodu ta’ ttestjar ta’ skrinjar jista’ jintuża biex jipprovdi informazzjoni inizjali dwar l-effetti possibbli fuq ir-riproduzzjoni u/jew l-iżvilupp, jew fi stadju bikri ta’

valutazzjoni tal-proprietajiet tossikologiċi tas-sustanzi kimiċi, jew fuq is-sustanzi kimiċi ta' tħassib. Jista' jintuża wkoll bħala parti minn sett ta' testijiet ta' skrinjar inizjali għal sustanzi kimiċi tat-test eistenti li għalihom ftit li xejn ikun hemm informazzjoni tossikologika disponibbli jew l-ebda affattu, bħal studju ta' individwazzjoni tad-doża għal studji aktar estensivi dwar ir-riproduzzjoni/l-iżvilupp, jew meta jitqies rilevanti b'xi mod iehor. Fit-twettiq tal-istudju, għandhom jiġu segwiti l-prinċipji ta' gwida u l-kunsiderazzjonijiet spjegati fid-dokument ta' gwida nru 19 tal-OECD dwar ir-rikonnoxximent, il-valutazzjoni, u l-użu ta' sinjali kliniċi bħala punti ta' tmiem umanitarji għal annimali sperimentali użati fl-evalwazzjonijiet tas-sikurezza (5).

6. Dan il-metodu ta' ttestjar ma jipprovdix informazzjoni kompluta fuq l-aspetti kollha tar-riproduzzjoni u tal-iżvilupp. B'mod partikolari, dan joffri biss mezz limitat kif jiġu individwati l-manifestazzjonijiet ta' wara t-twelid ta' esponiment ta' qabel it-twelid, jew l-effetti li jistgħu jiġu indotti matul l-esponiment ta' wara t-twelid. Minhabba (fost raġunijiet oħra) in-numri relattivament żgħir ta' annimali fil-gruppi tad-doża, is-selettività tal-punti ta' tmiem, u d-durata qasira tal-istudju, dan il-metodu mhux se jipprovdix evidenza għal dikjarazzjonijiet definiti ta' ebda effett. Barra minn hekk, fin-nuqqas ta' *data* minn testijiet oħra dwar it-tossicità riproduttiva/tal-iżvilupp, ir-riżultati pożittivi huma siewja għall-valutazzjoni inizjali tal-periklu u jikkontribwixxu għal deċiżjonijiet b'rabta man-neċessità u mat-tempestività tat-testijiet addizzjonali.
7. Ir-riżultati miksubin mill-parametri relatati mas-sistema endokrinali għandhom jitqiesu fil-kuntest tal-“OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals” (6). F'dan il-Qafas Kuncettwali, it-TG 421 imtejba tal-OECD tinsab fil-livell 4 bħala assaġġ *in vivo* li jipprovdix *data* dwar l-effetti avversi fuq il-punti ta' tmiem endokrinali rilevanti. Madankollu, sinjal endokrinali waħdu jaf ma jitqiesx evidenza suffiċjenti li s-sustanza kimika tat-test hi interferent endokrinali.
8. Dan il-metodu ta' ttestjar jassumi amministrazzjoni orali tas-sustanza kimika tat-test. Jaf ikun hemm bżonn ta' modifiki jekk jintużaw rotot oħra ta' esponiment.
9. Qabel ma jintuża l-metodu ta' ttestjar fuq tahlita għall-ġenerazzjoni ta' *data* għal skop regolatorju intiz, għandu jiġi kkunsidrat jekk jistax jipprovdix riżultati adegwati għal dak l-għan u, jekk iva, għaliex. Dawn il-kunsiderazzjonijiet mhumiex meħtieġa meta jkun hemm rekwiżit regolatorju għall-ittestjar tat-tahlita.
10. Fl-Appendiċi 1 jingħataw id-definizzjonijiet użati.

## PRINĊIPJU TAT-TEST

11. Is-sustanza kimika tat-test tingħata f'dożi gradwali lil diversi gruppi ta' rġiel u nisa. L-irġiel għandhom jingħataw doża għal minimu ta' erba' ġimgħat u sal-jum ta' qabel il-qatla

skedata (dan jinkludi minimu ta' ġimagħtejn qabel it-tgħammir, matul il-perjodu ta' tgħammir u, bejn wieħed u ieħor, ġimagħtejn wara t-tgħammir). Fid-dawl tal-perjodu ta' dożaġġ limitat ta' qabel it-tgħammir, il-fertilità jaf ma tkunx indikatur partikolarment sensittiv ta' tossiċità testikolari. Għaldaqstant, eżami istoloġiku dettaljat tat-testikoli hu essenzjali. Il-kombinazzjoni tal-perjodu ta' dożaġġ ta' qabel it-tgħammir ta' ġimagħtejn u l-osservazzjonijiet sussegwenti dwar it-tgħammir/il-fertilità b'perjodu ta' dożaġġ ġenerali ta' tal-anqas erba' ġimgħat, segwiti minn istopatoloġija dettaljata tal-gonadi tal-irġiel, hija meqjusa suffiċjenti biex tkun tista' tiġi individwata l-maġġoranza tal-effetti fuq il-fertilità u l-ispermatogenezi tal-irġiel.

12. In-nisa għandhom jingħataw doża matul l-istudju kollu. Dan jinkludi ġimagħtejn qabel it-tgħammir (bl-oġġettiv li jkunu koperti tal-anqas żewġ ċikli estrużi shaħ), il-hin varjabbli sal-konċepiment, id-durata tat-tqala u tal-anqas 13-il jum wara l-hlas, sa u inkluż il-jum ta' qabel il-qatla skedata.
13. Id-durata tal-istudju, wara l-akklimatizzazzjoni u l-evalwazzjoni taċ-ċiklu estruż ta' qabel id-dożaġġ, tiddependi mill-prestazzjoni tan-nisa u hi madwar 63 jum, [tal-anqas 14-il jum qabel it-tgħammir, (sa) 14-il jum tat-tgħammir, 22 jum tal-ġestazzjoni, 13-il jum tat-treddigh].
14. Matul il-perjodu ta' amministrazzjoni l-annimali jkunu osservati mill-qrib, kull jum għal sinjali ta' tossiċità. L-annimali li jmutu jew li jinqatlu matul il-perjodu tat-test issirilhom awtopsja u, fit-tmiem tat-test, annimali li jkunu baqgħu haġġin jinqatlu u ssirilhom awtopsja.

## **DESKRIZZJONI TAL-METODU**

### **Għażla tal-ispeċi tal-annimali**

15. Dan il-metodu ta' ttestjar hu mfassal biex jintuża b'firien. Għandha tingħata ġustifikazzjoni dettaljata jekk il-parametri speċifikati f'dan il-metodu ta' ttestjar ikunu investigati fi speċijiet oħra ta' rodituri. Fil-programm internazzjonali ta' validazzjoni għad-detezzjoni tal-interferenti endokrinali fit-TG 407 tal-OECD (li tikkorrispondi għall-Kapitolu B.7 ta' dan l-Anness), il-far kien l-unika speċi użata. Ma għandhomx jintużaw razzi b'fekundità baxxa jew li huma magħrufa li għandhom inċidenza għolja ta' difetti fl-iżvilupp. Għandhom ikunu użati annimali vergni f'saħħithom li ma kinux soġġetti għal proċeduri sperimentali preċedenti. L-annimali ittestjati għandhom ikunu karatterizzati skont l-ispeċi, ir-razza, is-sess, il-piż u/jew l-età. Malli jinbeda l-istudju l-varjazzjoni fil-piż tal-annimali użati għandha tkun minima u ma għandhiex taqbeż l-20 % tal-piż medju taż-żewġ sessi. Meta l-istudju jsir bħala studju preliminari għal studju fit-tul jew ta'

generazzjoni shiha, idealment fiż-żewġ studji jintużaw annimali li jkunu mill-istess razza u sors.

### **Abitazzjoni u għalf**

16. Il-proċeduri kollha għandhom ikunu konformi ma' standards lokali tal-kura tal-annimali tal-laboratorju. It-temperatura fil-kamra tal-esperimenti tal-annimali għandha tkun ta' 22 °C ( $\pm$  3°). Għalkemm l-umidità relattiva għandha tkun tal-anqas ta' 30 % u preferibbilment ma taqbizx is-70 % apparti milli waqt it-tindif tal-kamra, il-mira għandha tkun ta' 50-60 %. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, billi l-fotoperjodu jkun ta' 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam. Dwar l-għalf, jistgħu jintużaw dieti konvenzjonali tal-laboratorju bi provvista bla limitu ta' ilma tax-xorb. L-għażla tad-dieta tista' tkun influwenzata mill-bżonn li tiġi żgurata taħlita xierqa ta' sustanza kimika tat-test meta tingħata b'dan il-metodu.
17. L-annimali għandhom jitqieghdu f'abitazzjoni fi gruppi żgħar tal-istess sess; l-annimali jistgħu jitqieghdu f'abitazzjoni waħedhom jekk dan ikun xjentifikament ġustifikat. Għal gruppi f'gagėġ, ma għandux ikun hemm aktar minn hames annimali jabitaw f'gagėġ waħda. Il-proċeduri ta' tghammir għandhom jitwettqu f'gagėġ adattati għall-iskop. In-nisa tqal għandhom jitqieghdu fil-gagėġ waħedhom u jiġu pprovduti b'materjali tat-tibjit. In-nisa li jkunu qed iredgħu jitqieghdu f'gagėġ waħedhom mal-wild tagħhom.
18. L-għalf għandu jkun analizzat regolarment għall-kontaminanti. Għandu jinżamm kampjun tad-dieta sakemm ikun iffinalizzat ir-rapport.

### **Preparazzjoni tal-annimali**

19. L-annimali adulti żgħażaġh f'saħħithom ikunu assenjati b'mod każwali lill-gruppi ta' kontroll u ta' trattament. Il-gagėġ għandhom ikunu rranġati b'mod li jkunu mminimizzati l-effetti possibbli minhabba t-tqegħid tal-gagėġ. L-annimali jiġu identifikati unikament u jinżammu fil-gagėġ tagħhom tal-anqas għal hamest ijiem qabel ma jibda l-istudju biex jippermetti żmien biex jidraw il-kundizzjonijiet fil-laboratorju.

### **Preparazzjoni tad-dożi**

20. Hu rakkomandat li s-sustanza kimika tat-test tingħata b'mod orali sakemm rotot oħra ta' amministazzjoni ma jitqisux aktar xierqa. Meta tingħażel ir-rotta orali, is-sustanza kimika tat-test normalment tingħata b'gavage; madankollu, f'każijiet oħra, is-sustanzi kimiċi tat-test jistgħu jingħataw mad-dieta jew mal-ilma tax-xorb.
21. Meta jkun hemm bżonn, is-sustanza kimika tat-test tinħall jew tiġi sospiża f'veikolu xieraq. Hu rakkomandat li, kull meta jkun possibbli, l-ewwel jiġi kkunsidrat l-użu ta' soluzzjoni fl-ilma/sospensjoni, segwit minn kunsiderazzjoni ta' soluzzjoni/emulsjoni fiż-żejt (eż. żejt tal-qamħa) u mbagħad possibbilment b'soluzzjoni f'veikoli oħra. Għal veikoli

li mhumie x ilma, għandhom ikunu magħrufin il-karatteristiċi tossiċi tal-veikolu. Għandhom jiġu ddeterminati l-istabbiltà u l-omoġenità tas-sustanza kimika tat-test fil-veikolu.

## PROCEDURA

### Numru u Sess tal-annimali

22. Hu rakkomandat li kull grupp jinbeda b'tal-anqas 10 irġiel u 12-13-il mara. In-nisa jiġu evalwati qabel l-esponiment għaċ-ċikličità estruża u l-annimali li ma jurux ċikli tipiċi ta' bejn erba' u hamest ijiem ma jiddaħħlux fl-istudju; għaldaqstant, huma rakkomandati nisa żejda biex jinkisbu 10 nisa għal kull grupp. Hlief fil-każ ta' effetti tossiċi ċari, hu mistenni li dan jipprovd i tal-anqas tmien nisa tqal għal kull grupp li normalment ikun in-numru minimu aċċettabbli ta' nisa tqal għal kull grupp. L-oġġettiv hu li jiġu prodotti biżżejjed nisa tqal u wlied biex tkun żgurata evalwazzjoni sinifikattiva tal-potenzjal tas-sustanza kimika tat-test biex taffettwa l-fertilità, it-tqala, l-imġiba materna u tat-treddiġh, u t-kabbir u l-iżvilupp tal-ulied F<sub>1</sub>, mill-konċepiment sa 13-il jum wara l-ħlas.

### Dożaġġ

23. Ġeneralment tal-anqas għandhom jintużaw tliet gruppi għat-test u grupp ta' kontroll. Il-livelli tad-doża jistgħu jkunu bbażati fuq informazzjoni minn testijiet tat-tossiċità akuta jew fuq riżultati minn studji dwar doża ripetuta. Hlief għat-trattament bis-sustanza kimika tat-test, l-annimali fil-grupp tal-kontroll għandhom jitqandlu bl-istess mod bħas-sugġetti tal-grupp tat-test. Jekk jintuża veikolu għall-amministrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test, il-grupp tal-kontroll għandu jirċievi l-veikolu fl-ogħla volum użat.
24. Il-livelli tad-doża għandhom jintgħażlu b'kunsiderazzjoni ta' kwalunkwe *data* eżistenti disponibbli dwar it-tossiċità u l-kinetika (jew it-tossikokinetika). Ta' min iqis ukoll li jista' jkun hemm differenzi fis-sensittività bejn annimali tqal u annimali mhux tqal. L-ogħla livell ta' doża għandu jintgħażel bl-għan li jgħib effetti tossiċi iżda mhux il-mewt jew tbatija severa. Wara, għandha tingħażel sekwenza dixxendenti tal-livelli tad-doża bl-għan li jintwerew kwalunkwe reazzjoni relatata mad-dożaġġ u l-livell bla effett ħażin osservat (NOAEL) fl-anqas livell tad-doża. Intervalli ta' darbtejn jew ta' erba' darbiet ta' spiss ikunu l-aħjar biex ikunu stabbiliti l-livelli neżlin tad-doži, u ż-żieda tar-raba' grupp tat-test sikwit spiss tkun preferibbli milli jintużaw intervalli twal ħafna (eż. aktar minn fattur ta' 10) bejn id-dożaġġi.
25. Meta jkun hemm tossiċità generali osservata (eż. piż tal-ġisem imnaqqas, effetti tal-fwied, qalb, pulmun jew kliewi, eċċ.) jew tibdiliet oħra li jistgħu ma jkunux risponsi tossiċi (eż.

konsum anqas ta' ikel, tkabbir tal-fwied), l-effetti osservati fuq punti ta' tmiem sensitivi endokrinali għandhom ikunu interpretati b'kawtela.

### **Test tal-limitu**

26. Jekk studju orali b'livell ta' doża waħda ta' mill-anqas 1000 mg/kg tal-piż tal-ġisem/jum jew, għall-amministrazzjoni tad-dieta jew tal-ilma tax-xorb, ta' percentwali ekwivalenti fid-dieta, jew ta' ilma tax-xorb billi jintużaw il-proċeduri deskritti għal dan l-istudju, ma jipproduċi l-ebda effetti tossiċi osservabbli u jekk ma tkunx mistennija tossiċità bbażata fuq *data* minn sustanzi relatati strutturalment, f'dak il-każ studju shiħ bl-użu ta' diversi livelli ta' doża jista' ma jitqiesx li jkun meħtieġ. It-test tal-limitu hu applikabbli apparti minn meta l-eposizzjoni umana tindika il-ħtieġa għal doża orali għola fil-livell użat. Għal tipi oħrajn ta' amministrazzjoni, bħal ma hi l-applikazzjoni man-nifs jew dermali, il-proprietajiet fiżikokimiċi tas-sustanzi kimiċi tat-test, bħal kemm tinhall, ta' spiss jistgħu jiddettaw il-konċentrazzjoni massima li tista' tinkiseb.

### **Amministrazzjoni tad-doża**

27. L-annimali jingħataw doża tas-sustanza kimika tat-test darba kuljum għal sebat ijiem fil-ġimgha. Meta s-sustanza kimika tat-test tkun amministrata b'gavage, dan għandu jsir b'doża singola lill-annimali billi jintuża tubu tal-istonku jew tubu rqiġ ta' intubazzjoni adattat. Il-volum massimu ta' likwidu li jista' jingħata f'darba jiddependi mid-daqs tal-annimal tat-test. Il-volum ma għandux ikun aktar minn 1 ml/100 g tal-piż tal-ġisem hlief fil-każ ta' soluzzjonijiet milwiema fejn jistgħu jintużaw 2 ml/100 g tal-piż tal-ġisem. Hlief għal sustanzi kimiċi tat-test irritanti jew korrużivi, li normalment juru effetti ta' irritazzjoni b'konċentrazzjonijiet oghla, il-varjabbiltà fil-volum tat-test għandha tkun imminimizzata billi l-konċentrazzjoni tkun aġġustata biex ikun żgurat volum kostanti fil-livelli kollha tad-doża.
28. Għas-sustanzi kimiċi tat-test mogħtija permezz tad-dieta jew tal-ilma tax-xorb, importanti li jiġi żgurat li l-kwantitajiet tas-sustanza kimika tat-test involuti ma jxekkklux in-nutrizzjoni jew il-bilanċ tal-ilma normali. Meta s-sustanza kimika tat-test tkun amministrata fid-dieta, jistgħu jintużaw konċentrazzjoni djetetika kostanti (ppm) jew livell ta' doża kostanti f'termini tal-piż tal-ġisem tal-annimal; l-alternattiva użata għandha tkun speċifikata. Għal sustanza amministrata b'gavage, id-doża għandha tingħata f'hinijiet simili ta' kull jum, u tiġi aġġustata mill-anqas darba fil-ġimgha biex jinżamm livell kostanti ta' doża f'termini tal-piż tal-ġisem tal-annimal.

### **Skeda sperimentali**

29. Id-dożaġġ taż-żewġ sessi għandu jibda tal-anqas ġimagħtejn (2) qabel it-tgħammir, wara li jkunu thallew iderru għal tal-anqas hamest ijiem u n-nisa jkunu ġew skrinjati għaċ-ċikli



estrużi normali (f'perjodu ta' pretrattament ta' ġimagħtejn). L-istudju għandu jkun skedat b'tali mod li l-evalwazzjoni tač-ċiklu estruż tibda ftit wara li l-animalli jkunu kisbu maturità sesswali shiħa. Dan jista' jvarja ftit għal razzi differenti ta' firien f'laboratorji differenti, eż. firien Sprague Dawley ta' 10 ġimġhat, firien Wistar li jkollhom madwar 12-il ġimġha. L-ommijiet b'wild għandhom jinqatlu fil-jum 13 wara l-hlas, jew ftit wara. Il-jum tat-twellid (meta jitlesta l-hlas) hu definit bħala l-jum 0 wara l-hlas. In-nisa li ma juru ebda evidenza ta' tghammir jinqatlu 24-26 jum wara l-aħħar jum tal-perjodu ta' tghammir. Id-dożaġġ jissokta għaž-żewġ sessi matul il-perjodu ta' tghammir. L-irġiel għandhom jibqgħu jingħataw id-doża wara l-perjodu ta' tghammir tal-anqas sakemm jitlesta l-perjodu minimu totali ta' dożaġġ ta' 28 jum. Imbagħad dawn jinqatlu jew inkella jinżammu u jibqgħu jingħataw id-doża għat-tweitiq possibbli tat-tieni fażi ta' tghammir jekk jitmies li din tkun xierqa.

30. Id-dożaġġ ta' kuljum tan-nisa ommijiet għandu jkompli matul it-tqala u tal-anqas sal-jum 13 wara l-hlas, b'dan il-jum inkluz, jew sal-jum ta' qabel is-sagrifiċċju. Għall-istudji li fihom is-sustanza kimika tat-test tingħata bit-tehid man-nifs jew bir-rota dermali, id-dożaġġ għandu jkompli tal-anqas sal-jum 19 tal-ġestazzjoni, b'dan il-jum inkluz, u id-dożaġġ għandu jerġa' jinbeda mill-aktar fis possibbli u mhux aktar tard mill-PND 4.

31. Dijagramma tal-iskeda sperimentali hi mogħtija fl-Appendiċi 2.

### **Priċedura tat-tghammir**

32. Normalment, f'dan l-istudju għandu jsir tghammir 1:1 (raġel wieħed ma' mara waħda). Jista' jkun hemm eċċezzjonijiet f'każ ta' mwiet okkażjonali tal-irġiel. Il-mara għandha titqiegħed mal-istess raġel sakemm tiġi osservata evidenza ta' tghammir jew ikunu għaddew ġimagħtejn. Kull filgħodu in-nisa għandhom ikunu eżaminati għall-preżenza ta' sperma jew ta' tapp vaġinali. Il-jum 0 tat-tqala hu definit bħala l-jum li fih tiġi kkonfermata evidenza ta' tghammir (jinstabu tapp vaġinali jew sperma). Fil-każ li l-par ma jirnexxi, jista' jiġi kkunsidrat it-tghammir mill-ġdid ta' nisa ma' rġiel diġa ipprovat tal-istess grupp.

### **Daqs tal-boton**

33. Fil-jum 4 wara t-twelid, id-daqs ta' kull boton jista' jiġi aġġustat billi jiġu eliminati l-frieħ żejda b'għažla aleatorja biex jitrendew, l-aktar viċin possibbli, erba' jew hamest ifrieħ għal kull sess għal kull boton skont id-daqs normali tal-boton fir-razza ta' firien użata. Il-kampjuni tad-demmi għandhom jingħabru minn tnejn mill-frieħ eċċessi, jiġu raggruppati, u jintużaw għad-determinazzjoni tal-livelli tas-serum T4. Ma għandhiex issir eliminazzjoni selettiva tal-frieħ, eż. fuq il-baži tal-piż tal-ġisem, jew tad-distanza anogenitali (AGD). Mull meta n-numru ta' frieħ irġiel jew nisa jipprevjeni milli jkun hemm erbgħa jew hamsa minn kull sess għal kull boton, hu aċċettabbli li jsir aġġustament parzjali (pereżempju, sitt

irġiel u erba' nisa). Ebda ferħ ma jiġi eliminat meta d-daqs tal-boton jonqos għal anqas mill-mira tal-qtil (8 jew 10 ferħ/boton). Jekk ikun hemm ferħ wieħed biss disponibbli aktar mill-mira tal-qtil, ferħ wieħed biss jiġi eliminat u jintuża għall-ġbir tad-demm għall-valutazzjonijiet possibbli tas-serum T4.

34. Jekk id-daqs tal-boton ma jkunx aġġustat, żewġt ifrieh għal kull boton jiġu saġrifikati fil-jum 4 wara t-twelid u jittiehdu l-kampjuni tad-demm għall-kejl tal-konċentrazzjonijiet tal-ormon tat-tirojde tas-serum. Jekk possibbli, iż-żewġt ifrieh għal kull boton għandhom ikunu frieh nisa biex il-frieh irġiel jinżammu għall-evalwazzjonijiet taż-żamma tal-beżżula hliet fil-każ li jekk jitnehhew dawn il-frieh ma jifdal ebda nisa għall-valutazzjoni fit-terminazzjoni. Ebda ferħ ma jiġi eliminat meta d-daqs tal-boton jonqos għal anqas minn 8 jew 10 ifrieh/boton (skont id-daqs normali tal-boton fir-razza ta' firien użati). Jekk ikun hemm ferħ wieħed biss disponibbli aktar mid-daqs normali tal-boton, ferħ wieħed biss jiġi eliminat u jintuża għall-ġbir tad-demm għall-valutazzjonijiet possibbli tas-serum T4.

## **Osservazzjonijiet fil-hajja**

### *Osservazzjonijiet kliniċi*

35. Matul il-perjodu tat-test, għandhom isiru osservazzjonijiet kliniċi ġenerali tal-anqas darba kuljum, u aktar spiss meta jiġu osservati sinjali ta' tossiċità. Idealment dawn għandhom isiru fl-istess hin kuljum, b'kunsiderazzjoni tal-perjodu bl-oġġla livell ta' effetti antiċipati wara d-dożaġġ. Tibdil rilevanti fl-imġiba, sinjali ta' diffikultà jew titwil tal-proċess tal-ħlas u kull sinjal ta' tossiċità, inkluża l-mortalità, għandhom ikunu irregistrati. Dawn ir-rekords għandhom jinkludu l-hin tal-bidu, il-grad u d-durata tas-sinjali ta' tossiċità.

### *Piż tal-ġisem u konsum ta' ikel/ilma*

36. L-irġiel u n-nisa għandhom jintiżnu fl-ewwel jum tad-dożaġġ, tal-anqas darba fil-ġimgħa wara dan, u fit-terminazzjoni. Matul it-tqala, in-nisa għandhom jintiżnu fil-jiem 0, 7, 14 u 20 u fi żmien 24 siegħa mill-ħlas (jum 0 jew 1 wara l-ħlas) u tal-anqas fil-jiem 4 u 13 wara l-ħlas. Dawn l-osservazzjonijiet għandhom ikunu rapportati individwalment għal kull annimal adult.
37. Matul il-fażi ta' qabel it-tgħammir, it-tqala u t-treddiġh, il-konsum tal-ikel għandu jitkejjel tal-anqas darba fil-ġimgħa. Il-kejl tal-konsum tal-ikel matul it-tgħammir hu fakultattiv. Il-konsum tal-ikel matul dawn il-perjodi għandu jitkejjel ukoll meta s-sustanza kimika tat-test tingħata mal-ilma tax-xorb.

### *Ċikli estrużi*

38. Iċ-ċikli estrużi għandhom jiġu ssorveljati qabel ma jibda t-trattament biex għall-istudju jintgħazlu nisa b'ċikličità regolari (ara l-paragrafu 22). It-tiċpisiet vaginali għandhom jiġu

ssorveljati ta' kuljum ukoll mill-bidu tal-perjodu ta' trattament sal-evidenza ta' tghammir. Jekk ikun hemm thassib dwar effetti akuti ta' stress li jistgħu jibiddu ċ-ċikli estrużi bit-tnedija tad-dożagġ, il-laboratorji jistgħu jesponu l-annimali tat-test għal ġimagħtejn (2), imbagħad jiġbru tiċpisiet vaginali ta' kuljum biex jissorveljaw iċ-ċiklu estruż għal minimu ta' ġimagħtejn matul il-perjodu ta' qabel it-tghammir b'monitoraġġ issoktat fil-perjodu ta' tghammir sakemm ikun hemm evidenza ta' tghammir. Meta jinkisbu ċelloli vaginali/ċervikali, għandha tingħata attenzjoni biex jiġi evitat tfixkil tal-mukoża, li jista' jinduci psewdotqala (7) (8).

#### *Parametri tal-ulied*

39. Id-durata tal-ġestazzjoni għandha tiġi registrata u hi kkalkolata mill-jum 0 tat-tqala. Kull boton għandu jiġi eżaminat mill-aktar fis possibbli wara l-hlas biex jiġu stabbiliti n-numru u s-sess tal-frieħ, it-twelid mejjet, it-twelid ħaj, it-twelid mhux żviluppat (frieħ li jkunu ferm iżgħar mill-frieħ tal-kontroll korrispondenti) u l-preżenza ta' anormalitajiet serji.
40. Frieħ ħajjin għandhom jingħaddu u jitqassmu skont is-sess u kull boton għandu jintizen fi żmien 24 siegħa mill-hlas (jum 0 jew 1 wara l-hlas) u tal-anqas fil-jiem 4 u 13 wara l-hlas. Minbarra l-osservazzjonijiet deskritti fil-paragrafu 35, kwalunkwe mġiba anormali tal-wild għandha tiġi registrata.
41. L-AGD ta' kull ferħ għandha titkejjel fl-istess jum postnatali bejn il-PND 0 sal-PND 4. Il-piż tal-ġisem tal-frieħ għandu jingabar dak inhar li titkejjel l-AGD u l-AGD għandha tiġi normalizzata għal kejl tad-daqs tal-ferħ, idealment l-għerq kwadrat tal-piż tal-ġisem (9). In-numru ta' bzieżel/areoli fil-frieħ irġiel għandu jingħadd fil-PND 12 jew 13 kif rakkomandat fil-GD 151 tal-OECD (10).

#### **Bijokimika klinika**

42. Il-kampjuni tad-demmi minn sit definit jittieħdu fuq il-baži tal-iskeda li ġejja:

- minn tal-anqas żewġt ifrieħ għal kull boton fil-jum 4 wara t-twelid, jekk in-numru ta' frieħ jippermetti (ara l-paragrafi 33-34)
- mill-ommijiet kollha u minn tal-anqas żewġt ifrieħ għal kull boton fit-terminazzjoni fil-jum 13, u
- mill-irġiel adulti kollha, fit-terminazzjoni,

Il-kampjuni kollha tad-demmi jinħażnu f'kundizzjonijiet xierqa. Kampjuni tad-demmi mill-frieħ tal-jum 13 u mill-irġiel adulti jiġu vvalutati għal-livelli tas-serum għall-ormoni tat-tirojde (T4). Issir valutazzjoni ulterjuri tat-T4 fil-kampjuni tad-demmi għall-ommijiet u għall-frieħ tal-jum 4 jekk tkun rilevanti. Hemm l-għażla li jistgħu jitkejlu ormoni oħra jekk

ikunu rilevanti. Id-demm tal-frieħ jista' jiġi raggruppat skont il-boton għall-analizzjiet tal-ormon tat-tirojde. L-ormoni tat-tirojde (T4 u TSH) idealment għandhom jitkejlu bħala "total".

43. Il-fatturi li ġejjin jistgħu jinfluwenzaw il-varjabbiltà u l-konċentrazzjonijiet assoluti tad-determinazzjonijiet tal-ormoni:

- il-ħin tal-qatla minhabba varjazzjonijiet tul il-jum tal-konċentrazzjonijiet tal-ormoni
- il-metodu tal-qatla biex tkun evitata tensjoni bla bżonn għall-annimali li tista' taffettwa l-konċentrazzjonijiet tal-ormoni
- is-settijiet tat-testijiet għad-determinazzjonijiet tal-ormoni li jistgħu jkunu differenti mill-kurvi standard tagħhom.

44. Kampjuni ta' plazma maħsubin speċifikament għal determinazzjoni tal-ormoni għandhom jinkisbu f'ħin komparabbli tal-jum. Il-valuri numeriċi miksubin meta jkunu analizzati l-konċentrazzjonijiet tal-ormoni jkunu differenti fost diversi settijiet ta' analiżi kummerċjali.

## **Patoloġija**

### *Nekroskopija grossa*

45. Fil-waqt tas-sagrifiċċju jew tal-mewt matul l-istudju, l-annimali adulti għandhom jiġu eżaminati makroskopikament għal kwalunkwe anormalità jew tibdil patoloġiku. Għandha tingħata attenzjoni partikolari għall-organi tas-sistema riproduttiva. In-numru ta' siti ta' impjantazzjoni għandu jiġi registrat. It-tiċpisiet vaġinali għandhom jiġu eżaminati filgħodu dakinhar tan-nekroskopija biex jiġi determinat l-istadju taċ-ċiklu estruż u tkun tista' ssir korrelazzjoni mal-istopatoloġija tal-ovarji.

46. It-testikoli u l-epididimidi kif ukoll il-bżieġaq tal-prostata u seminali bil-glandoli koagolanti fis-shuħija tagħhom, tal-annimali adulti rġiel kollha għandhom jiġu mirquma minn kwalunkwe tessut aderenti, kif xieraq, u l-piż niedi tagħhom għandu jittiehed mill-aktar fis possibbli wara d-dissezzjoni biex jiġi evitat milli jinxfu. Barra minn hekk, il-piżijiet tal-organi fakultattivi jistgħu jinkludu l-kumplex tal-levator ani u tal-muskolu bulbokavernuż, il-glandoli ta' Cowper u r-ras tal-pene fl-irġiel u l-ovarji f'pari (piż imxarrab) u l-utru (inkluz iċ-ċerviċi) fin-nisa; jekk inkluzi, dawn il-piżijiet għandhom jingabru mill-aktar fis possibbli wara d-dissezzjoni.

47. Frieħ mejtin u frieħ maqtula fil-jum 13 wara l-ħlas, jew ftit wara, tal-anqas għandhom jiġu eżaminati bir-reqqa esternament għal anormalitajiet serji. Għandha tingħata attenzjoni partikolari għall-ġenitali riproduttivi esterni li għandhom jiġu eżaminati għal sinjali ta'

żvilupp mibdul. Fil-jum 13, għandha tiġi preservata t-tirojde minn ferħ raġel wieħed u minn ferħ mara waħda għal kull boton.

48. L-ovarji, it-testikoli, l-organi sesswali aċċessorji (utru u ċerviċi, epididimidu, prostata, buzzieqa seminali u l-glandoli koagolanti), it-tirojde u l-organi kollha li juru leżjonijiet makroskopiċi tal-annimali adulti kollha għandhom jiġu preservati. Il-fissazzjoni formalina mhix rakkomandata għall-eżaminazzjoni ta' rutina tat-testikoli u tal-epididimidu. Metodu aċċettabbli hu l-użu tal-fissattiv ta' Bouin jew ta' Davidsons modifikat għal dawn it-tessuti (11). It-tunika albuginea tista' tittaqkab bil-mod u mhux fil-fond fiż-żewġ poli tal-organu b'labra biex jithalla jkun hemm penetrazzjoni malajr tal-fissattiv.

### *Istopatoloġija*

49. Għandu jsir eżami istoloġiku dettaljat fuq l-ovarji, it-testikoli u l-epididimide (b'enfasi speċjali fuq l-istadji tal-ispermatogenezi u l-istopatoloġija tal-istruttura ċellolari testikolari interstizjali) tal-annimali tal-grupp tal-ogħla doża u tal-grupp tal-kontroll. L-organi preservati l-oħra inklużi t-tirojde mill-frieħ u mill-annimali adulti jistgħu jiġu eżaminati meta jkun hemm bżonn. Il-piż tat-tirojde jista' jiġi ddeterminat wara l-fissazzjoni. It-tirqim għandu jsir ukoll b'reqqa kbira u biss wara l-fissazzjoni biex tkun evitata l-ħsara lit-tessut. Il-ħsara fit-tessut tista' tippregudika analiżi istopatoloġika. L-eżaminazzjonijiet għandhom ikunu estiżi għall-annimali tal-gruppi l-oħra ta' dożaġġ meta jkunu osservati tibdiliet fil-grupp tal-ogħla doża. Il-Gwida dwar l-istopatoloġija (11) tagħti aktar informazzjoni dwar id-dissezzjoni, fissazzjoni, tqassim f'taqsimiet u l-istopatoloġija ta' tessuti endokrinali.

## **DATA U RAPPORTAR**

### *Data*

50. Għandha tkun ipprovduta d-*data* dwar l-annimali individwali. Barra minn hekk, id-*data* kollha għandha tingabar f'forma tabulari, u għal kull grupp tat-test għandha turi n-numru ta' annimali fil-bidu tat-test, in-numru ta' annimali misjuba mejta matul it-test jew maqtula għal raġunijiet umanitarji, il-ħin ta' xi mewt jew qtil uman, in-numru ta' annimali fertili, in-numru ta' nisa tqal, in-numru ta' annimali li juru sinjali ta' tossiċità, deskrizzjoni tas-sinjali ta' tossiċità osservati, inklużi l-ħin tal-ewwel darba, id-durata, u s-severità ta' kwalunkwe effett tossiku, it-tip ta' tibdiliet istopatoloġiċi u d-*data* rilevanti kollha dwar il-boton. Format tabulari tar-rapport ta' sommarju li wera li hu tassew siewi għall-evalwazzjoni tal-effett riproduttiv/tal-iżvilupp hu mogħti fl-Appendiċi 3.
51. Minhabba d-dimensjonijiet limitati tal-istudju, l-analiżijiet statistiċi fil-forma ta' testijiet għal "sinifikat" huma ta' valur limitat għal hafna punti ta' tmiem, speċjalment il-punti ta' tmiem riproduttivi. Jekk jintużaw analiżijiet statistiċi, il-metodu magħżul għandu jkun xieraq għad-distribuzzjoni tal-varjabbli eżaminat, u jintgħażel qabel il-bidu tal-istudju.

Analizi statistika tal-AGD u taż-żamma tal-beżżula għandha tkun ibbażata fuq *data* tal-frieħ individwali, b'kunsiderazzjoni tal-effetti fuq il-boton. Fejn xieraq, il-boton hu l-unità ta' analizi. Analizi statistika tal-piż tal-ġisem tal-frieħ għandha tkun ibbażata fuq *data* tal-frieħ individwali, b'kunsiderazzjoni tad-daqs tal-boton. Minhabba d-daqs żgħir tal-grupp, l-użu ta' *data* storika tal-kontroll (eż. għad-daqs tal-boton), fejn disponibbli, jista' jkun siewi wkoll bħala għajnuna għall-interpretazzjoni tal-istudju.

### **Evalwazzjoni tar-riżultati**

52. Is-sejbiet ta' dan l-istudju tat-tossicità għandhom jiġu evalwati f'termini tal-effetti osservati, tan-nekroskopija u tas-sejbiet mikroskopiċi. L-evalwazzjoni għandha tinkludi r-relazzjoni bejn id-doża u s-sustanza kimika tat-test u l-preżenza jew l-assenza, l-inċidenza jew is-severità tal-anormalitajiet, inklużi l-feriti kbar, l-organi tal-mira identifikati, l-infertilità, l-anormalitajiet kliniċi, l-imġiba tar-riproduzzjoni u l-boton affettwati, it-tibdiliet fil-piż tal-ġisem, l-effetti fuq il-mortalità u xi effetti tossiċi oħra.
53. Minhabba l-perjodu qasir ta' trattament tal-irġiel, l-istopatologija tat-testikoli u tal-epididimu għandha tiġi kkunsidrata flimkien mad-*data* dwar il-fertilità meta jiġu vvalutati l-effetti riproduttivi fuq l-irġiel. L-użu ta' *data* storika tal-kontroll fuq ir-riproduzzjoni/l-iżvilupp (eż. għad-daqs tal-boton, l-AGD, iż-żamma tal-beżżula, il-livelli tas-serum T4), fejn disponibbli, jista' jkun siewi wkoll bħala għajnuna għall-interpretazzjoni tal-istudju.
54. Għall-kontroll tal-kwalità hu propost li tingabar *data* storika ta' kontroll u li għad-*data* numerika jkunu kkalkolati l-koeffiċjenti ta' varjazzjoni, speċjalment għall-parametri li jkollhom rabta mad-detezzjoni tal-interferenti endokrinali. Din id-*data* tista' tintuża għal finijiet ta' paragun meta jkunu evalwati studji attwali.

### **Rapport tat-test**

55. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

#### *Sustanza kimika tat-test:*

- is-sors, in-numru tal-lott, id-data ta' limitu għall-użu, jekk disponibbli
- l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test, jekk magħrufa.

#### *Sustanza monokostitwenti:*

- id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma, u l-proprietajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali;

- l-identifikazzjoni kimika, bhall-isem IUPAC jew CAS, in-numru CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.

Sustanza multikostitwenti, UVBCs u tahlitiet:

- ikkaratterizzati sa fejn possibbli mill-identità kimika (ara aktar 'il fuq), l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprietajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti.

*Veikolu (jekk xieraq):*

- ġustifikazzjoni għall-għażla tal-veikolu jekk mhuwiex ilma.

*L-annimali tat-test:*

- speċi/razza użata;
- l-għadd, l-età u s-sess tal-annimali;
- is-sors, il-kundizzjonijiet tal-gaġeg, id-dieta, eċċ.;
- il-piżijiet individwali tal-annimali fil-bidu tat-test.
- ġustifikazzjoni għal speċi jekk ma jkunx far

*Il-kundizzjonijiet tat-test:*

- ir-raġuni għall-għażla tal-livell tad-doża;
- dettalji dwar il-formulazzjoni tas-sustanza kimika tat-test/il-preparazzjoni tad-dieta, il-koncentrazzjonijiet, l-istabbiltà u l-omogenità miksubin tal-preparazzjoni;
- dettalji dwar l-għoti tas-sustanza kimika tat-test;
- konverżjoni minn dieta/koncentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test ta' ilma tax-xorb (ppm) għad-doża attwali (mg/kg tal-piż tal-ġisem/jum), jekk applikabbli;
- dettalji dwar il-kwalità tal-ikel u tal-ilma;
- deskrizzjoni dettaljata tal-proċedura ta' każwalizzazzjoni biex jintgħażlu l-frieħ għall-qtil, jekk jinqatlu.

*Ir-riżultati:*

- il-piż tal-ġisem/it-tibdiliel fil-piż tal-ġisem;

- il-konsum ta' ikel, u konsum ta' ilma, jekk disponibbli;
- id-*data* dwar ir-rispons tossiku skont is-sess u d-doża, inkluzi l-fertilità, il-ġestazzjoni u kwalunkwe sinjal ieħor ta' tossiċità;
- it-tul tal-ġestazzjoni;
- l-effetti tossiċi jew oħra fuq ir-riproduzzjoni, l-ulied, it-tkabbir ta' wara t-twelid, eċċ.;
- in-natura, is-severità u d-durata tal-osservazzjonijiet kliniċi (jekk reversibbli jew le);
- in-numru ta' nisa adulti b'ċiklu estruż normali jew anormali u d-durata taċ-ċiklu;
- in-numru ta' twelid ħaj u ta' telf ta' wara l-impjantazzjoni;
- id-*data* dwar il-piż tal-ġisem tal-frieħ
- l-AGD tal-frieħ kollha (u l-piż tal-ġisem fl-jum tal-kejl tal-AGD)
- iż-żamma tal-beżżula fil-frieħ irġiel,
- il-livelli tal-ormon tat-tirojde, il-frieħ tal-jum 13 u l-irġiel adulti (u l-ommijiet u l-frieħ tal-jum 4 jekk jitkejlu)
- in-numru ta' frieħ b'anormalitajiet viżibbli ċari, evalwazzjoni grossa tal-ġenitali esterni, in-numru ta' frieħ imwielda żgħar;
- il-ħin tal-mewt matul l-istudju jew meta l-annimali jkunu baqgħu ħajjin fit-terminazzjoni tat-test;
- in-numru ta' impjantazzjonijiet, id-daqs tal-boton u l-piżijiet tal-boton fil-ħin tar-registrazzjoni;
- il-piż tal-ġisem fis-sagrifiċċju u d-*data* dwar il-piż tal-organi għall-annimali ġenituri;
- sejbiet tan-nekroskopija;
- deskrizzjoni dettaljata tas-sejbiet istopatoloġiċi;
- id-dettalji tal-assorbiment (jekk disponibbli);
- trattament statistiku tar-riżultati, fejn xieraq.

*Diskussjoni tar-riżultati.*



*Kunklużjonijiet.*

### **Interpretazzjoni tar-riżultati**

56. L-istudju jipprovdi evalwazzjonijiet tat-tossiċità riproduttiva/tal-iżvilupp assoċjata mal-amministrazzjoni ta' dożi ripetuti (ara l-paragrafi 5 u 6). Jista' jipprovdi indikazzjoni tal-htieġa li jsiru investigazzjonijiet ulterjuri u jipprovdi gwida fit-tfassil tal-istudji sussegwenti. Id-Dokument ta' Gwida tal-OECD Nru 43 għandu jiġi kkonsultat għal għajjnuna fl-interpetazzjoni tar-riżultati dwar ir-riproduzzjoni u l-iżvilupp (12). Id-Dokument ta' Gwida tal-OECD Nru 106 dwar l-Evalwazzjoni Istoloġika tat-Testijiet Endokrinali u Riproduttivi fir-Rodituri (11) jipprovdi informazzjoni dwar it-tnejn u l-evalwazzjoni tal-organi (endokrinali) u tat-tiċpisiet vaginali li jistgħu jkunu ta' għajjnuna għal din it-TG.

## DOKUMENTAZZJONI

- (1) OECD (1990). Dokument tas-seduta Nru 1 għall-14-il Laqgħa Kongunta tal-Chemicals Group and Management Committee. Disponibbli fuq talba mingħand l-Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.
- (2) OECD (1992). Ir-Rapport tal-President tal-Laqgħa ta' Esperti *ad hoc* dwar il-Metodi ta' Skrinjar tat-Tossicità Riproduttiva, Tokyo, 27-29 ta' Ottubru, 1992. Disponibbli Fuq Talba Mingħand l-Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.
- (3) OECD (1998). Rapport tal-Ewwel Laqgħa tat-Task Force tal-OECD dwar l-Ittestjar u l-Valutazzjoni tal-Interferenti Endokrinali (EDTA), 10-11 ta' Marzu 1998. Disponibbli Fuq Talba Mingħand l-Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.
- (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), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.
- (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), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.
- (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), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.
- (7) Goldman, J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M. u Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, Birth Defects Research, Parti B, 80 (2), 84-97.
- (8) Sadleir R.M.F.S (1979). Cycles and Seasons, f'Auston C.R. u 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. u 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), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.
- (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), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.
- (12) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 43), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

## **Appendiċi 1**

### **DEFINIZZJONIJIET (ARA WKOLL IL-GD 150 TAL-OECD (6))**

Androġeniċità hi l-kapaċità ta' sustanza kimika li taġixxi bħal ormon androġeniku naturali (eż. testosteron) f'organizmu mammiferu.

Antiandroġeniċità hi l-kapaċità ta' sustanza kimika li trażżan l-azzjoni ta' ormon androġeniku naturali (eż. testosteron) f'organizmu mammiferu.

Antiestroġeniċità hi l-kapaċità ta' sustanza kimika li trażżan l-azzjoni ta' ormon estrogeniku naturali (eż. estradijol 17β) f'organizmu mammiferu.

Attività tal-antitirojde hi l-kapaċità ta' sustanza kimika li trażżan l-azzjoni ta' ormon naturali tat-tirojde (eż. T3) f'organizmu mammiferu.

Sustanza kimika hi sustanza jew tahlita.

Tossiċità tal-iżvilupp: il-manifestazzjoni tat-tossiċità riproduttiva, li tirrappreżenta disturbi strutturali jew funzjonali prenatali, perinatali u postnatali fil-wild.

Dożaġġ hi terminu ġenerali li jinvolti d-doża, il-frekwenza taġħha u d-durata tad-dożaġġ.

Doża hi l-ammont ta' sustanza kimika tat-test mogħtija. Id-doża hi espressa bħala piż tas-sustanza kimika tat-test għal kull unità ta' piż tal-ġisem ta' animal tat-test għal kull jum (eż. mg/kg tal-piż tal-ġisem/jum), jew bħala konċentrazzjoni kostanti ta' dieta.

Tossiċità evidenti hi terminu ġenerali li jiddeskrivi sinjali ċari ta' tossiċità wara li tkun ġiet amministrata kimika għall-ittestjar. Dawn għandhom ikunu suffiċjenti għal valutazzjoni tal-periklu u għandhom ikunu tali li żieda fid-doża amministrata tista' tkun mistennija li tirriżulta fl-iżvilupp ta' sinjali ta' tossiċità estrema u probabbilment mortalità.

Indeboliment tal-fertilità tirrappreżenta disturbi tal-funzjonijiet jew tal-kapaċità riproduttivi tal-irġiel jew tan-nisa.

Tossiċità materna: effetti avversi fuq nisa tqal, li jseħħu b'mod speċifiku (effett dirett) jew mhux speċifiku (effett indirett).

NOAEL hi l-abbrevjazzjoni għal-livell bla effett hażin osservat. Dan hu l-ogħla livell ta' doża fejn l-ebda sejbiet hżiena relatati ma' trattament ma jkunu osservati minhabba trattament.

Estroġeniċità hi l-kapaċità ta' sustanza kimika li taġixxi bħal ormon estrogeniku naturali (eż. estradijol 17β) f'organizmu mammiferu.

Tossiċità riproduttiva tirrappreżenta l-effetti dannużi fuq il-wild u/jew indeboliment tal-funzjonijiet jew tal-kapaċità riproduttivi tal-irġiel u tan-nisa.

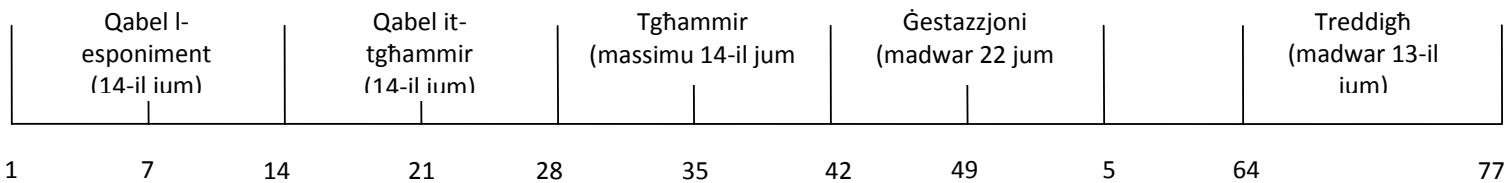
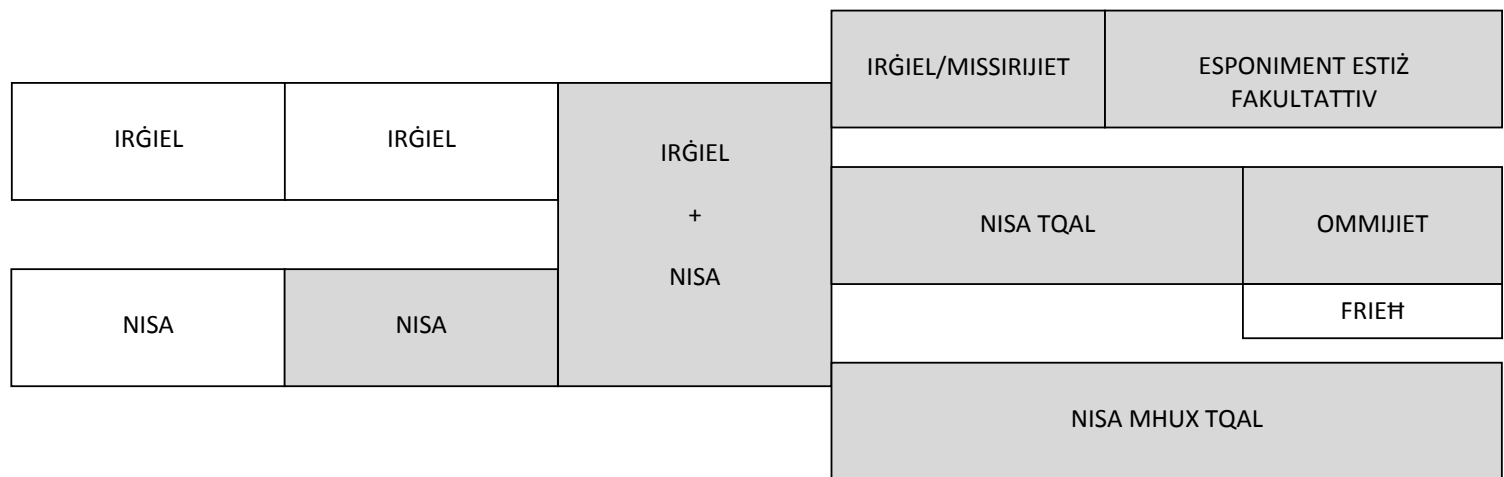
Sustanza kimika tat-test hi kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata bl-użu ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

Attività tat-tirojde hi l-kapaċità ta' sustanza kimika li taġixxi bħal ormon naturali tat-tirojde (eż. T<sub>3</sub>) f'organizmu mammiferu.

Validazzjoni hi proċess xjentifiku mfassal biex jiġu karatterizzati r-rekwiżiti u l-limitazzjonijiet operazzjonali ta' metodu ta' ttestjar u biex tintwera l-affidabbiltà u r-relevanza tiegħu għal skop partikolari.

## Appendiċi 2

**DIJAGRAMMA TAL-ISKEDA SPERIMENTALI LI TINDIKA D-DURATA MASSIMA TAL-ISTUDJU, FUQ IL-BAŽI TA' PERJODU SHIH TA' TGHAMMIR FUQ 14-IL JUM**



Bidu tal-istudju

Evalwazzjoni qabel l-esponiment taċ-ċikličità estruża, segwita minn monitoraġġ ta' kuljum tal-istrixxi vaginali mill-bidu tat-trattament sal-evidenza tat-tgħammir

Dożaġġ

Mingħajr dożaġġ

Nekroskopija rġiel/missirijiet (wara perjodu ta' dożaġġ minimu ta' 4 ġimgħat)

Hlas (PND 0) sal-PND 4: AGD fil-frieĥ kollha (PND 0-PND 4; l-istess jum) Terminazzjoni ta' 2 ifrieĥ għal kull boton għat-T4 (PND 4)

Jum 13 wara l-hlas Nekroskopija tan-nisa u tal-frieĥ Zamma tal-beżżula fil-frieĥ irġiel. Nekroskopija rġiel/missirijiet (fakultattiva).

### Appendiċi 3

## RAPPORT SOMMARJU TABULARI TAL-EFFETTI FUQ IR-RIPRODUZZJONI/L-IŻVILUPP

| OSSERVAZZJONIJIET                                                        | Valuri          |         |         |         |         |
|--------------------------------------------------------------------------|-----------------|---------|---------|---------|---------|
| Dożaġġ (unitajiet)                                                       | 0<br>(kontroll) | ..<br>. | ..<br>. | ..<br>. | ..<br>. |
| Pari mibdija (N)                                                         |                 |         |         |         |         |
| Ċiklu estruż (tal-anqas it-tul medju u l-frekwenza taċ-ċikli irregolari) |                 |         |         |         |         |
| Nisa li juru evidenza ta' tghammir (N)                                   |                 |         |         |         |         |
| Nisa li jilhq t-tqala (N)                                                |                 |         |         |         |         |
| Jiem tal-konċepiment 1 - 5 (N)                                           |                 |         |         |         |         |
| Jiem tal-konċepiment 6 - . . . <sup>(1)</sup> (N)                        |                 |         |         |         |         |
| Tqala ≤ 21 jum (N)                                                       |                 |         |         |         |         |
| Tqala = 22 jum (N)                                                       |                 |         |         |         |         |
| Tqala ≥ 23 jum (N)                                                       |                 |         |         |         |         |
| Ommijiet b'żgħar hajjin imwielda (N)                                     |                 |         |         |         |         |
| Ommijiet b'żgħar hajjin imwielda fil-jum 4 pp (N)                        |                 |         |         |         |         |
| Impjanti/omm (medja)                                                     |                 |         |         |         |         |
| Frieħ hajjin/omm fil-ħlas (medja)                                        |                 |         |         |         |         |
| Frieħ hajjin/omm fil-jum 4 (medja)                                       |                 |         |         |         |         |
| Proporzjon tas-sessi (r/n) fil-ħlas (medja)                              |                 |         |         |         |         |
| Proporzjon tas-sessi (r/n) fil-jum 4 (medja)                             |                 |         |         |         |         |

---

<sup>(1)</sup> l-aħħar jum tal-perjodu ta' tghammir



|                                                                                                                  |  |  |  |  |  |  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|--|--|--|--|--|
| Piż tal-boton fil-ħlas (medja)                                                                                   |  |  |  |  |  |  |
| Piż tal-boton fil-jum 4 (medja)                                                                                  |  |  |  |  |  |  |
| Piż tal-frieħ fil-ħlas (medja)                                                                                   |  |  |  |  |  |  |
| Piż tal-frieħ fil-ħin tal-kejl tal-AGD (medja tal-irġiel, medja tan-nisa)                                        |  |  |  |  |  |  |
| AGD tal-frieħ fl-istess jum wara t-twelid, fil-ħlas – fil-jum 4 (medja tal-irġiel, medja tan-nisa, nota tal-PND) |  |  |  |  |  |  |
| Piż tal-frieħ fil-jum 4 (medja)                                                                                  |  |  |  |  |  |  |
| Żamma tal-beżżula tal-frieħ irġiel fil-jum 13 (medja)                                                            |  |  |  |  |  |  |
| Piż tal-frieħ fil-jum 13 (medja)                                                                                 |  |  |  |  |  |  |
| <b>FRIEH ANORMALI</b>                                                                                            |  |  |  |  |  |  |
| Ommijiet b'0                                                                                                     |  |  |  |  |  |  |
| Ommijiet b'1                                                                                                     |  |  |  |  |  |  |
| Ommijiet bi $\geq 2$                                                                                             |  |  |  |  |  |  |
| <b>TELF TAL-ULIED</b>                                                                                            |  |  |  |  |  |  |
| <b>Impjantazzjonijiet qabel/wara t-twelid (impjantazzjonijiet nieqes it-twelid haj)</b>                          |  |  |  |  |  |  |
| Nisa b'0                                                                                                         |  |  |  |  |  |  |
| Nisa b'1                                                                                                         |  |  |  |  |  |  |
| Nisa bi 2                                                                                                        |  |  |  |  |  |  |
| Nisa bi $\geq 3$                                                                                                 |  |  |  |  |  |  |
| <b>Wara t-twelid (twelid haj nieqes il-hajjin fil-jum 13 wara t-twelid)</b>                                      |  |  |  |  |  |  |
| Nisa b'0                                                                                                         |  |  |  |  |  |  |
| Nisa b'1                                                                                                         |  |  |  |  |  |  |
| Nisa bi 2                                                                                                        |  |  |  |  |  |  |
| Nisa bi $\geq 3$                                                                                                 |  |  |  |  |  |  |

## **B.64 STUDJU TAT-TOSSIČITÀ B'DOŻA RIPETUTA KOMBINAT MAT- TEST TA' SKRINJAR TAT-TOSSIČITÀ RIPRODUTTIVA/TAL-IŻVILUPP**

### **INTRODUZZJONI**

1. Dan il-metodu ta' ttestjar hu ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 422 tal-OECD (2016). Il-linji gwida tal-OECD għall-Ittestjar tas-Sustanzi Kimiċi jiġu rieżaminati kull ċertu żmien fid-dawl tal-progress xjentifiku. Il-linja gwida tat-test ta' skrinjar originali 422 ġiet adottata fl-1996, fuq il-bażi ta' protokoll għal "Doża Ripetuta Kombinata u Test ta' Skrinjar Riproduttiv/tal-Iżvilupp" diskuss f'żewġ laqgħat ta' esperti, f'Londra fl-1990 (1) u f'Tokyo fl-1992 (2).
2. Dan il-metodu ta' ttestjar jgħaqqad parti tal-iskrinjar tat-tossiċità riproduttiva/tal-iżvilupp li hi bbażata fuq l-esperjenza miksuba fil-Pajjiżi membri mill-użu tal-metodu originali fuq sustanzi kimiċi eżistenti b'volum ta' produzzjoni għoli u f'testijiet esploratorji b'sustanzi tal-kontroll pozittiv (3) (4), u parti tat-tossiċità b'doża ripetuta, b'mod konkordat mal-linja gwida tat-test 407 tal-OECD (Studju dwar it-Tossiċità Orali fuq 28 Jum b'Doża Ripetuta, li tikkorrispondi għall-Kapitolu B.7 ta' dan l-Anness).
3. Dan il-metodu ta' ttestjar gie aġġornat b'punti ta' tmiem rilevanti tal-interferenti endokrinali, bħala segwitu għall-attività ta' prijorità għolja mnedija fl-OECD fl-1998 biex jiġu riveduti l-linji gwida tat-test eżistenti u jiġu żviluppati linji gwida tat-test ġodda għall-iskrinjar u għall-ittestjar ta' interferenti endokrinali potenzjali (5). F'dan il-kuntest, it-TG 407 (li jikkorrispondi għall-Kapitolu B.7 ta' dan l-Anness) issa għet fl-2008 b'parametri xierqa għall-individwar tal-attività endokrinali tas-sustanzi kimiċi tat-test. L-oġettiv fl-aġġornar tat-TG 422 kien li jiġu inklużi xi punti ta' tmiem rilevanti ta' interferenti endokrinali fit-TGs tal-iskrinjar meta l-perjodi ta' esponiment ikopru whud mill-perjodi sensittivi matul l-iżvilupp (perjodi ta' qabel it-twelid jew ta' kmieni wara t-twelid).
4. Il-punti ta' tmiem rilevanti tal-interferenti endokrinali addizzjonali magħżula, li wkoll huma parti mit-TG 443 (Studju Estiż dwar it-Tossiċità Riproduttiva f'Ġenerazzjoni Wahda, li jikkorrispondi għall-Kapitolu B.56 ta' dan l-Anness), kienu inklużi fit-TG 422 fuq il-bażi ta' studju tal-fattibbiltà li jindirizza mistoqsijiet xjentifiċi u tekniċi relatati mal-inklużjoni tagħhom, kif ukoll adattamenti possibbli fid-disinn tat-test meħtieġa għall-inklużjoni tagħhom (6).
5. Dan il-metodu ta' ttestjar hu mfassal biex jiġġenera informazzjoni limitata rigward l-effetti ta' sustanza kimika tat-test fuq il-prestazzjoni riproduttiva fl-irġiel u fin-nisa bħall-funzjoni gonadali, l-imġiba tat-tgħammir, il-konċepiment, l-iżvilupp tal-konċepit u l-ħlas. Mhuwiex

alternattiva għall-metodi ta' ttestjar eżistenti B.31, B.34, B.35 jew B.56 u lanqas ma jiġidilhom posthom.

## KUNSIDERAZZJONIJIET TAL-BIDU

6. Fil-valutazzjoni u l-evalwazzjoni tal-karatteristiċi tossiċi ta' sustanza kimika tat-test, id-determinazzjoni ta' tossiċità orali bl-użu ta' dożi ripetuti tista' ssir wara li tkun inkisbet l-informazzjoni inizjali dwar it-tossiċità bl-ittestjar akut. Dan l-istudju jipprovdi informazzjoni dwar il-perikli possibbli għas-saħħa li aktarx li jirriżultaw minn esponiment ripetut fuq perjodu relattivament limitat ta' żmien. Il-metodu jinkludi l-istudju dwar id-doża bażika ripetuta ta' tossiċità li jista' jintuża għal kimiċi li dwarhom ma jkunx jista' jsir studju ta' 90 jum (eż. meta l-volum tal-produzzjoni ma jkunx jeċċedi ċerti limiti) jew bħala studju preliminari għal studju fit-tul. Fit-tweġġ tal-istudju, għandhom jiġu segwiti l-prinċipji ta' gwida u l-kunsiderazzjonijiet spjegati fid-dokument ta' gwida nru 19 tal-OECD dwar ir-rikonossiment, il-valutazzjoni, u l-użu ta' sinjali kliniċi bħala punti ta' tmiem umanitarji għal annimali sperimentali użati fl-evalwazzjonijiet tas-sikurezza (7).
7. Jinkludi wkoll test ta' skrinjar tat-tossiċità riproduttiva/tal-iżvilupp u, għalhekk, jista' jintuża wkoll biex jipprovdi informazzjoni inizjali dwar l-effetti possibbli fuq il-prestazzjoni riproduttiva tal-irġiel u tan-nisa bħall-funzjoni gonadali, l-imġiba tat-tgħammir, il-konċepiment, l-iżvilupp tal-konċepit u tal-ħlas, fi stadju bikri tal-valutazzjoni tal-proprietajiet tossikoloġiċi tas-sustanzi kimiċi tat-test, jew inkella fuq is-sustanzi kimiċi tat-test ta' tħassib. Dan il-metodu ta' ttestjar ma jipprovdi informazzjoni kompluta fuq l-aspetti kollha tar-riproduzzjoni u tal-iżvilupp. B'mod partikolari, dan joffri biss mezz limitat kif jiġu individwati l-manifestazzjonijiet ta' wara t-twelid ta' esponiment ta' qabel it-twelid, jew l-effetti li jistgħu jiġu indotti matul l-esponiment ta' wara t-twelid. Minhabba (fost raġunijiet oħra) is-selettività tal-punti ta' tmiem, u d-durata qasira tal-istudju, dan il-metodu mhux se jipprovdi evidenza għal dikjarazzjonijiet definiti ta' ebda effett fuq ir-riproduzzjoni/l-iżvilupp. Barra minn hekk, fin-nuqqas ta' *data* minn testijiet oħra dwar it-tossiċità riproduttiva/tal-iżvilupp, ir-riżultati pożittivi huma siewja għall-valutazzjoni inizjali tal-periklu u jikkontribwixxu għal deċiżjonijiet b'rabta man-neċessità u mat-tempestività tat-testijiet addizzjonali.
8. Ir-riżultati miksubin mill-parametri relatati mas-sistema endokrinali għandhom jitqiesu fil-kuntest tal-"Qafas Kunċettwali tal-OECD għall-Ittestjar u għall-Valutazzjoni ta' Sustanzi Kimiċi Interferenti Endokrinali" (8). F'dan il-Qafas Kunċettwali, it-TG 422 imtejba tal-OECD tinsab fil-livell 4 bħala assaġġ *in vivo* li jipprovdi *data* dwar l-effetti avversi fuq il-punti ta' tmiem endokrinali rilevanti. Madankollu, sinjal endokrinali waħdu jaf ma jitqiesx evidenza suffiċjenti li s-sustanza kimika tat-test hi interferent endokrinali.

9. Dan il-metodu ta' ttestjar jenfasizza wkoll fuq l-effetti newroloġiċi bħala punt ta' tmiem, u fuq il-htieġa ta' osservazzjonijiet kliniċi bil-galbu tal-annimali, biex tinkiseb kemm jista' jkun informazzjoni. Il-metodu għandu jidentifika is-sustanzi kimiċi li għandhom potenzjal newrotossiku, u li jistgħu jiġġustifikaw investigazzjoni approfondita ulterjuri ta' dan l-aspett. Barra minn hekk, il-metodu jista' jagħti wkoll indikazzjoni bażika tal-effetti immunoloġiċi.
10. Fin-nuqqas ta' *data* minn studji oħra dwar it-tossiċità sistemika, it-tossiċità riproduttiva/tal-iżvilupp, in-newrotossiċità u/jew l-immunotossiċità, ir-riżultati pożittivi huma siewja għall-valutazzjoni inizjali tal-periklu u jikkontribwixxu għal deċiżjonijiet b'rabta man-neċessità u mat-tempestività tat-testijiet addizzjonali. It-test jista' jkun partikolarment siewi bħala parti mill-Ġabra ta' *Data* għall-Analiżi (SIDS) tal-OECD għall-valutazzjoni tas-sustanzi kimiċi eżistenti li għalihom ftit li xejn ikun hemm informazzjoni tossikoloġika disponibbli jew ebda informazzjoni affattu u jista' jservi bħala alternattiva għat-twettiq ta' żewġ testijiet separati għal toossiċità b'doża ripetuta (TG 407 tal-OECD, li tikkorrispondi għall-Kapitolu B.7 ta' dan l-Anness) u t-tossiċità riproduttiva/tal-iżvilupp (TG 421 tal-OECD, li tikkorrispondi għall-Kapitolu B.63 ta' dan l-Anness), rispettivament. Jista' jintuża wkoll bħala studju ta' individwazzjoni tad-doża għal studji aktar estensivi dwar ir-riproduzzjoni/l-iżvilupp, jew meta jitqies rilevanti għal xi raġuni oħra.
11. Ġeneralment jiġi preżunt li jkun hemm differenzi fis-sensittività bejn annimali tqal u mhux tqal. Konsegwentement, jista' jkun aktar kumplikat li jiġu determinati livelli tad-doża f'dan it-test kombinat li jkunu adegwati biex jiġu evalwati kemm it-tossiċità sistemika ġenerali kif ukoll it-tossiċità riproduttiva/tal-iżvilupp speċifika, minflok meta t-testijiet indiwali jitwettqu b'mod separat. Barra minn hekk, l-interpretazzjoni tar-riżultati tat-test fir-rigward tat-tossiċità sistemika ġenerali tista' tkun aktar diffiċli milli meta jitwettaq studju separat b'doża ripetuta, speċjalment meta l-parametri tas-serum u tal-istopatoloġija ma jkunux evalwati fl-istess hin fl-istudju. Minhabba dawn il-kumplesstajiet tekniċi, hi meħtieġa esperjenza konsiderevoli fl-itestjar tat-tossiċità għat-twettiq ta' dan it-test ta' skrinjar kombinat. Min-naħa l-oħra, apparti n-numru iżgħar ta' annimali involuti, it-test kombinat jista' joffri mezz aħjar kif jiġu diskriminati l-effetti diretti fuq ir-riproduzzjoni/l-iżvilupp minn dawk li huma sekondarji għal effetti (sistemiċi) oħra.
12. F'dan it-test, il-perjodu ta' dożaġġ hu itwal milli fi studju konvenzjonali b'doża ripetuta fuq 28 jum. Madankollu, juża anqas annimali ta' kull sess għal kull grupp meta mqabbel mas-sitwazzjoni li fiha jitwettaq studju konvenzjonali b'doża ripetuta fuq 28 jum minbarra Test ta' Skrinjar tat-Tossiċità Riproduttiva/tal-Iżvilupp.
13. Dan il-metodu ta' ttestjar jassumi amministrazzjoni orali tas-sustanza kimika tat-test. Jaf ikun hemm bżonn ta' modifiki jekk jintużaw rotot oħra ta' esponiment.
14. Qabel ma jintuża l-metodu ta' ttestjar fuq tahlita għall-ġenerazzjoni ta' *data* għal skop regolatorju intiż, għandu jiġi kkunsidrat jekk jistax jipprovdi riżultati adegwati għal dak l-

għan u, jekk iva, għaliex. Dawn il-kunsiderazzjonijiet mhumiex meħtieġa meta jkun hemm rekwiżit regolatorju għall-ittestjar tat-taħlita.

15. Fl-Appendiċi 1 jingħataw id-definizzjonijiet użati.

## **PRINĊIPJU TAT-TEST**

16. Is-sustanza kimika tat-test tingħata f'dożi gradwali lil diversi gruppi ta' rġiel u nisa. L-irġiel għandhom jingħataw doża għal minimu ta' erba' ġimgħat, sal-jum ta' qabel il-qatla skedata (dan jinkludi minimu ta' ġimgħatejn qabel it-tgħammir, matul il-perjodu ta' tgħammir u, bejn wiehied u iehor, ġimgħatejn wara t-tgħammir). Fid-dawl tal-perjodu ta' dożaġġ limitat ta' qabel it-tgħammir, il-fertilità jaf ma tkunx indikatur partikolarment sensittiv ta' tossiċità testikolari. Għaldaqstant, eżami istologiku dettaljat tat-testikoli hu essenzjali. Il-kombinazzjoni tal-perjodu ta' dożaġġ ta' qabel it-tgħammir ta' ġimgħatejn u l-osservazzjonijiet sussegwenti dwar it-tgħammir/il-fertilità b'perjodu ta' dożaġġ ġenerali ta' tal-anqas erba' ġimgħat, segwiti minn istopatoloġija dettaljata tal-gonadi tal-irġiel, hija meqjusa suffiċjenti biex tkun tista' tigi individwata l-maġġoranza tal-effetti fuq il-fertilità u l-ispermatogenezi tal-irġiel.
17. In-nisa għandhom jingħataw doża matul l-istudju kollu. Dan jinkludi ġimgħatejn qabel it-tgħammir (bl-oġġettiv li jkunu koperti tal-anqas żewġ ċikli estrużi shaħ), il-hin varjabbli sal-konċepiment, id-durata tat-tqala u tal-anqas 13-il jum wara l-hlas, sa u inkluż il-jum ta' qabel il-qatla skedata.
18. Id-durata tal-istudju, wara l-akklimatizzazzjoni u l-evalwazzjoni taċ-ċiklu estruż ta' qabel id-dożaġġ, tiddependi mill-prestazzjoni tan-nisa u hi madwar 63 jum, [tal-anqas 14-il jum qabel it-tgħammir, (sa) 14-il jum tat-tgħammir, 22 jum tal-ġestazzjoni, 13-il jum tat-treddiġh].
19. Matul il-perjodu ta' amministrazzjoni l-annimali jkunu osservati mill-qrib, kull jum għal sinjali ta' tossiċità. L-annimali li jmutu jew li jinqatlu matul it-test issirilhom awtopsja u, fit-tmiem tat-test, annimali li jkunu baqgħu haġġin jinqatlu u ssirilhom awtopsja.

## **DESKRIZZJONI TAL-METODU**

### **Għażla tal-ispeċi tal-annimali**

20. Dan il-metodu ta' ttestjar hu mfassal biex jintuża b'firien. Għandha tingħata ġustifikazzjoni dettaljata jekk il-parametri speċifikati f'dan it-TG 422 ikunu investigati fi speċijiet oħra ta' rodituri. Fil-programm internazzjonali ta' validazzjoni għad-detezzjoni tal-interferenti endokrinali fit-TG 407, il-far kien l-unika speċi użata. Ma għandhomx

jintużaw razez b'fekundità baxxa jew li huma magħrufa li għandhom incidenza għolja ta' difetti fl-iżvilupp. Għandhom ikunu użati annimali vergni f'saħħithom li ma kinux soġġetti għal proċeduri sperimentali preċedenti. L-annimali ittestjati għandhom ikunu karatterizzati skont l-ispeċi, ir-razza, is-sess, il-piż u/jew l-età. Fil-bidu tal-istudju, il-varjazzjoni fil-piż tal-annimali użati ma għandux jaqbeż  $\pm 20\%$  tal-valur medju ta' kull sess. Meta l-istudju jsir bħala studju preliminari għal studju fit-tul jew ta' generazzjoni shiħa, idealment fiż-żewġ studji jintużaw annimali li jkunu mill-istess razza u sors.

### **Abitazzjoni u għalf**

21. Il-proċeduri kollha għandhom ikunu konformi ma' standards lokali tal-kura tal-annimali tal-laboratorju. It-temperatura fil-kamra tal-annimali tal-esperiment għandha tkun ta'  $22^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 3^{\circ}$ ). L-umdità relattiva għandha tkun tal-anqas ta'  $30\%$  u, idealment, ma taqbiżx is- $70\%$  hlief matul it-tindif tal-kamra. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, billi l-fotoperjodu jkun ta' 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam. Dwar l-għalf, jistgħu jintużaw dieti konvenzjonali tal-laboratorju bi provvista bla limitu ta' ilma tax-xorb. L-għażla tad-dieta tista' tkun influwenzata mill-bżonn li tiġi żgurata tahlita xierqa ta' sustanza kimika tat-test meta tingħata b'dan il-metodu.
22. L-annimali għandhom jitqieghdu f'abitazzjoni fi gruppi żgħar tal-istess sess; l-annimali jistgħu jitqieghdu f'abitazzjoni waħedhom jekk dan ikun xjentifikament ġustifikat. Għal gruppi f'gagġ, ma għandux ikun hemm aktar minn hames annimali jabitaw f'gagġa waħda. Il-proċeduri ta' tghammir għandhom jitwettqu f'gagġ adattati għall-iskop. In-nisa tqal għandhom jitqieghdu fil-gagġ waħedhom u jiġu pprovduti b'materjali tat-tibjit. In-nisa li jkunu qed iredgħu jitqieghdu f'gagġ waħedhom mal-wild tagħhom.
23. L-għalf għandu jkun analizzat regolarment għall-kontaminanti. Għandu jinżamm kampjun tad-dieta sakemm ikun iffinalizzat ir-rapport.

### **Preparazzjoni tal-annimali**

24. Annimali adulti zghazagh b'saħħithom huma miġbura kif jinzerta u assenjati għall-gruppi tat-trattament u għall-gagġ. Il-gagġ għandhom ikunu rranġati b'mod li jkunu mminimizzati l-effetti possibbli minhabba t-tqeghid tal-gagġ. L-annimali jiġu identifikati unikament u jinżammu fil-gagġ tagħhom tal-anqas għal hamest ijiem qabel ma jibda l-istudju biex jippermetti żmien biex jidraw il-kundizzjonijiet fil-laboratorju.

### **Preparazzjoni tad-dożi**

25. Hu rakkomandat li s-sustanza kimika tat-test tingħata b'mod orali sakemm rotot oħra ta' amministazzjoni ma jitqisux aktar xierqa. Meta tingħażel ir-rota orali, is-sustanza kimika tat-test normalment tingħata b'gavage; madankollu, f'każijiet oħra, is-sustanzi kimiċi tat-test jistgħu jingħataw ukoll mad-dieta jew mal-ilma tax-xorb.

26. Meta jkun hemm bżonn, is-sustanza kimika tat-test tinhall jew tiġi sospiża f'Veikolu xieraq. Hu rakkomandat li, kull meta jkun possibbli, l-ewwel għandu jitqies l-użu ta' soluzzjoni/sospensjoni fl-ilma, segwit minn konsiderazzjoni ta' soluzzjoni/sospensjoni fiż-żejt (eż. żejt tal-qamħa) u mbagħad possibbilment b'soluzzjoni f'Veikoli oħra. Għal Veikoli mhux milwiema, għandhom ikunu magħrufin il-karatteristiċi tossiċi tal-veikolu. Għandhom jiġu ddeterminati l-istabbiltà u l-omoġenità tas-sustanza kimika tat-test fil-veikolu.

## PROCEDURA

### Numru u Sess tal-annimali

27. Hu rakkomandat li kull grupp jinbeda b'tal-anqas 10 irġiel u 12-13-il mara. In-nisa jiġu evalwati qabel l-esponiment għaċ-ċikliċità estruża u l-annimali li ma jurux ċikli tipici ta' bejn erba' u ħamest ijiem ma jiddaħħlux fl-istudju; għaldaqstant, huma rakkomandati nisa żejda biex jinkisbu 10 nisa għal kull grupp. Hlief fil-każ ta' effetti tossiċi ċari, hu mistenni li dan jipprovi tal-anqas tmien nisa tqal għal kull grupp li normalment ikun in-numru minimu aċċettabbli ta' nisa tqal għal kull grupp. L-oġġettiv hu li jiġu prodotti biżżejjed nisa tqal u wlied biex tkun żgurata evalwazzjoni sinifikattiva tal-potenzjal tas-sustanza kimika tat-test biex taffettwa l-fertilità, it-tqala, l-imġiba materna u tat-treddiġh, u t-tkabbir u l-iżvilupp tal-ulied F<sub>1</sub>, mill-konċepiment sa 13-il jum wara l-ħlas. Jekk il-qtil interim ikun pjanat, in-numru għandu jiżdied bin-numru ta' annimali ppjanati li jinqatlu qabel tmien l-istudju. Għandha tingħata konsiderazzjoni għal grupp satellitarju addizzjonali ta' ħames annimali għal kull sess fil-grupp ta' kontroll u f'dak tad-doża l-aktar għolja għall-osservazzjoni ta' reversibbiltà, persistenza jew okkorrenza mdewma ta' effetti tossiċi sistemici, għal mill-anqas 14-il jum wara it-trattament. L-annimali tal-gruppi satellitarji ma jitgħammrux u, konsegwentement, ma jintużawx għall-valutazzjoni tat-tossiċità riproduttiva/tal-iżvilupp.

### Dożagġ

28. Ġeneralment, tal-anqas għandhom jintużaw tliet gruppi għat-test u grupp ta' kontroll. Jekk ma jkun hemm l-ebda *data* adattata disponibbli dwar it-tossiċità ġenerali, jista' jsir studju dwar tiftix ta' firxa (annimali tal-istess razza u sors) bħala għajnuna għad-determinazzjoni tad-doži li jkollhom jintużaw. Hlief għat-trattament bis-sustanza kimika tat-test, l-annimali fil-grupp tal-kontroll għandhom jitqandlu bl-istess mod bħas-sugġetti tal-grupp tat-test. Jekk jintuża Veikolu biex tkun amministrata s-sustanza kimika tat-test, il-grupp ta' kontroll għandu jirċievi l-veikolu fl-ogħla volum użat.
29. Il-livelli tad-doża għandhom jintgħażlu b'kunsiderazzjoni ta' kwalunkwe *data* eżistenti disponibbli dwar it-tossiċità u l-kinetika (jew it-tossikokinetika). Ta' min iqis ukoll li jista'

jkun hemm differenzi fis-sensittività bejn annimali tqal u annimali mhux tqal. L-ogħla livell ta' doża għandu jintgħażel bl-għan li jgħib effetti tossiċi iżda mhux il-mewt jew tbatija evidenti. Wara, għandha tingħażel sekwenza dixxendenti tal-livelli tad-doża bl-għan li jintwerew kwalunkwe reazzjoni relatata mad-dożaġġ u ebda effett avvers fl-anqas livell tad-doża. Intervalli ta' darbtejn jew ta' erba' darbiet ta' spiss ikunu ottimali u ż-żieda tar-raba' grupp tat-test sikwit spiss tkun preferibbli milli jintużaw intervalli twal hafna (eż. aktar minn fattur ta' 10) bejn id-dożaġġi.

30. Meta jkun hemm tossiċità generali osservata (eż. piż tal-ġisem imnaqqas, effetti tal-fwied, qalb, pulmun jew kliwi, eċċ.) jew tibdiliet oħra li jistgħu ma jkunux risponsi tossiċi (eż. konsum anqas ta' ikel, tkabbir tal-fwied), l-effetti osservati fuq punti ta' tmiem sensitivi endokrinali għandhom ikunu interpretati b'kawtela.

### Test tal-limitu

31. Jekk studju orali b'livell ta' doża waħda ta' mill-anqas 1000 mg/kg tal-piż tal-ġisem/jum jew, għall-amministrazzjoni tad-dieta, ta' perċentwali ekwivalenti fid-dieta, jew ta' ilma tax-xorb (fuq il-bażi tad-determinazzjonijiet tal-piż tal-ġisem), billi jintużaw il-proċeduri deskritti għal dan l-istudju, ma jipproduċi l-ebda effetti tossiċi osservabbli u jekk ma tkunx mistennija tossiċità bbażata fuq *data* minn sustanzi relatati strutturalment, f'dak il-każ studju shih bl-użu ta' diversi livelli ta' doża jista' ma jitqiesx li jkun meħtieġ. It-test ta' limitu japplika hlief meta espożizzjoni umana tindika l-htieġa li jkollu jintuża livell oghla ta' doża. Għal tipi oħrajn ta' amministrazzjoni, bħal ma hi l-applikazzjoni man-nifs jew dermali, il-proprjetajiet fizikokimiċi tas-sustanzi kimiċi tat-test, bħal kemm tinhall, ta' spiss jistgħu jiddettaw l-esponiment massimu li jista' jinkiseb.

### Amministrazzjoni tad-doži

32. L-annimali jingħataw doża tas-sustanza kimika tat-test darba kuljum għal sebat ijiem f'gimgha. Meta s-sustanza kimika tat-test tkun amministrata b'gavage, dan għandu jsir b'doża singola lill-annimali billi jintuża tubu tal-istonku jew tubu rqiġ ta' intubazzjoni adattat. Il-volum massimu ta' likwidu li jista' jingħata f'darba jiddependi mid-daqs tal-annimal tat-test. Il-volum ma għandux ikun aktar minn 1 ml/100 g tal-piż tal-ġisem hlief fil-każ ta' soluzzjonijiet milwiema fejn jistgħu jintużaw 2 ml/100 g tal-piż tal-ġisem. Hlief għal sustanzi kimiċi tat-test irritanti jew korrużivi, li normalment juru effetti ta' irritazzjoni b'konċentrazzjonijiet oghla, il-varjabbiltà fil-volum tat-test għandha tkun imminimizzata billi l-konċentrazzjoni tkun aġġustata biex ikun żgurat volum kostanti fil-livelli kollha tad-doża.
33. Għal sustanzi kimiċi tat-test mogħtija permezz tad-dieta jew tal-ilma tax-xorb, importanti li jiġi żgurat li l-kwantitajiet tas-sustanza kimika tat-test involuti ma jxekklu in-nutrizzjoni jew il-bilanċ tal-ilma normali. Meta s-sustanza kimika tat-test tkun amministrata fid-dieta,



koncentrazzjoni djetetika kostanti (ppm) jew livell ta' doża kostanti f'termini tal-piż tal-gisem tal-annimal, jista' jkun użat; l-alternattiva użata għandha tkun speċifikata. Għal sustanza amministrata b'gavage, id-doża għandha tingħata f'hinijiet simili ta' kull jum, u tiġi aġġustata mill-anqas darba fil-gimgha biex jinżamm livell kostanti ta' doża f'termini tal-piż tal-gisem tal-annimal. Meta l-istudju kombinat jintuża bħala preliminari għal studju tat-tossiċità riproduttiva fit-tul jew shih, għandha tintuża dieta simili fiż-żewġ studji.

### **Skeda sperimentali**

34. Id-dożaġġ taż-żewġ sessi għandu jibda gimagħtejn (2) qabel it-tgħammir, wara li jkunu thallew iderru għal tal-anqas hamest ijiem u n-nisa jkunu ġew skrinjati għaċ-ċikli estrużi normali (f'perjodu ta' pretrattament ta' gimagħtejn). L-istudju għandu jkun skedat b'tali mod li l-evalwazzjoni taċ-ċiklu estruż tibda ftit wara li l-annimali jkunu kisbu maturità sesswali shiha. Dan jista' jvarja ftit għal razzi differenti ta' firien f'laboratorji differenti, eż. firien Sprague Dawley ta' 10 gimghat, firien Wistar li jkollhom madwar 12-il gimgha. L-ommijiet b'wild għandhom jinqatlu fil-jum 13 wara l-hlas, jew ftit wara. Biex l-ommijiet jithallew isumu qabel il-ġbir tad-demm (jekk din l-għażla tkun preferuta), l-ommijiet u uliedhom mhux bilfors ikollhom jinqatlu fl-istess jum. Il-jum tat-twellid (meta jitlestha l-hlas) hu definit bħala l-jum 0 wara l-hlas. In-nisa li ma juru ebda evidenza ta' tgħammir jinqatlu 24-26 jum wara l-aħħar jum tal-perjodu ta' tgħammir. Id-dożaġġ jissokta għaž-żewġ sessi matul il-perjodu ta' tgħammir. L-irġiel għandhom jibqgħu jingħataw id-doża wara l-perjodu ta' tgħammir tal-anqas sakemm jitlestha l-perjodu minimu totali ta' dożaġġ ta' 28 jum. Imbagħad dawn jinqatlu jew inkella jinżammu u jibqgħu jingħataw id-doża għat-twettiq possibbli tat-tieni fażi ta' tgħammir jekk jitqies li din tkun xierqa.
35. Id-dożaġġ ta' kuljum tan-nisa ommijiet għandu jkompli matul it-tqala u tal-anqas sal-jum 13 wara l-hlas, b'dan il-jum inkluż, jew sal-jum ta' qabel is-sagrifiċċju. Għall-istudji li fihom is-sustanza kimika tat-test tingħata bit-tehid man-nifs jew bir-rotta dermali, id-dożaġġ għandu jkompli tal-anqas sal-jum 19 tal-ġestazzjoni, b'dan il-jum inkluż, u id-dożaġġ għandu jerga' jinbeda mill-aktar fis possibbli u mhux aktar tard mill-jum 4 ta' wara t-twelid (PND).
36. L-annimali fi grupp satellitarju skedati għall-osservazzjonijiet ta' segwitu, jekk jiġu inklużi, ma jithallewx jitgħammru. Dawn għandhom jinżammu tal-anqas għal 14-il jum ulterjuri wara l-ewwel qtil skedat tal-ommijiet, mingħajr trattament biex jiġu individwati okkorrenza ttardjata, jew persistenza ta' effetti tossiċi jew irkupru minn dawn.
37. Dijagramma tal-iskeda sperimentali hi mogħtija fl-Appendiċi 2.

### **Ċikli estrużi**

38. Iċ-ċikli estrużi għandhom jiġu ssorveljati qabel ma jibda t-trattament biex għall-istudju jintgħazlu nisa b'ċikličità regolari (ara l-paragrafu 27). It-tiċpisiet vaġinali għandhom jiġu

ssorveljati ta' kuljum ukoll mill-bidu tal-perjodu ta' trattament sal-evidenza ta' tghammir. Jekk ikun hemm thassib dwar effetti akuti ta' stress li jistghu jbiddu ċ-ċikli estrużi bit-tnedija tad-dożagġ, il-laboratorji jistghu jesponu l-annimali tat-test għal ġimagħtejn (2), imbagħad jiġbru tiċpisiet vaġinali ta' kuljum biex jissorveljaw iċ-ċiklu estruż għal minimu ta' ġimagħtejn matul il-perjodu ta' qabel it-tghammir b'monitoraġġ issoktat fil-perjodu ta' tghammir sakemm ikun hemm evidenza ta' tghammir. Meta jinkisbu ċelloli vaġinali/ċervikali, għandha tingħata attenzjoni biex jiġi evitat tfixkil tal-mukoża, li jista' jinduci psewdotqala (8) (9).

### **Priċedura tat-tghammir**

39. Normalment, f'dan l-istudju għandu jsir tghammir 1:1 (raġel wiehed ma' mara waħda). Jista' jkun hemm eċċezzjonijiet f'każ ta' mwiet okkażjonali tal-irġiel. Il-mara għandha titqiegħed mal-istess raġel sakemm tiġi osservata evidenza ta' tghammir jew ikunu għaddew ġimagħtejn. Kull filgħodu in-nisa għandhom ikunu eżaminati għall-preżenza ta' sperma jew ta' tapp vaġinali. Il-jum 0 tat-tqala hu definit bħala l-jum li fih tiġi kkonfermata evidenza ta' tghammir (jinstabu tapp vaġinali jew sperma). Fil-każ li l-par ma jkunx irnexxa, jista' jiġi kkunsidrat it-tghammir mill-ġdid ta' nisa ma' rġiel diġa ipprovat tal-istess grupp.

### **Daqs tal-boton**

40. Fil-jum 4 wara t-twelid, id-daqs ta' kull boton jista' jiġi aġġustat billi jiġu eliminati l-frieħ żejda b'għażla aleatorja biex jitrendew, l-aktar viċin possibbli, erba' jew hamest ifrieħ għal kull sess għal kull boton skont id-daqs normali tal-boton fir-razza ta' firien użata. Il-kampjuni tad-demmm għandhom jingabru minn tnejn mill-frieħ eċċessivi, jiġu raggruppati, u jintużaw għad-determinazzjoni tal-livelli tas-serum T4. Ma għandhiex issir eliminazzjoni selettiva tal-frieħ, eż. fuq il-baži tal-piż tal-ġisem jew tad-distanza anogenitali (AGD). Mull meta n-numru ta' frieħ irġiel jew nisa jipprevjeni milli jkun hemm erbgħa jew hamsa minn kull sess għal kull boton, hu aċċettabbli li jsir aġġustament parzjali (pereżempju, sitt irġiel u erba' nisa). Ebda ferħ ma jiġi eliminat meta d-daqs tal-boton jonqos għal anqas mill-mira tal-qtil (8 jew 10 ferħ/boton). Jekk ikun hemm ferħ wiehed biss disponibbli aktar mill-mira tal-qtil, ferħ wiehed biss jiġi eliminat u jintuża għall-ġbir tad-demmm għall-valutazzjonijiet possibbli tas-serum T4.
41. Jekk id-daqs tal-boton ma jkunx aġġustat, żewġt ifrieħ għal kull boton jiġu sagrifikati fil-jum 4 wara t-twelid u jittieħdu l-kampjuni tad-demmm għall-kejl tal-konċentrazzjonijiet tal-ormon tat-tirojde tas-serum. Jekk possibbli, iż-żewġt ifrieħ għal kull boton għandhom ikunu frieħ nisa biex il-frieħ irġiel jinżammu għall-evalwazzjonijiet taż-żamma tal-beżżula, hlief fil-każ li jekk jitneħħew dawn il-frieħ ma jifdal ebda nisa għall-valutazzjoni fit-terminazzjoni. Ebda ferħ ma jiġi eliminat meta d-daqs tal-boton jonqos għal anqas minn 8 jew 10 ifrieħ/boton (skont id-daqs normali tal-boton fir-razza ta' firien użati). Jekk ikun

hemm ferh wiehed biss disponibbli aktar mid-daqs normali tal-boton, ferh wiehed biss jiġi eliminat u jintuża għall-għbir tad-demm għall-valutazzjonijiet possibbli tas-serum T4.

## Osservazzjonijiet

42. Għandhom isiru osservazzjonijiet kliniċi generali tal-anqas darba kuljum, idealment fl-istess hin(ijiet) kuljum u b'kunsiderazzjoni tal-perjodu bl-ogħla livell ta' effetti antiċipati wara d-dożaġġ. Il-kundizzjoni tas-saħħa tal-annimali għandha tiġi rreġistrata. Tal-inqas darbtejn kuljum l-annimali kollha jiġu osservati għal morbidità u għal mortalità.
43. Darba qabel l-ewwel esponiment (biex ikunu jistgħu jsiru paraguni fi hdan l-istess suġġetti), u tal-anqas darba fil-ġimgħa wara dan, għandhom isiru osservazzjonijiet kliniċi dettaljati fl-annimali ġenituri kollha. Dawn l-osservazzjonijiet għandhom isiru barra l-gaġġa f'arena standard u preferibbilment fl-istess jum kull darba. Dawn għandhom jiġu reġistrati bir-reqqa; idealment bl-użu ta' sistemi ta' punteġġ, definiti b'mod esplicitu mil-laboratorju tal-ittestjar. Għandu jsir sforz biex ikun żgurat li l-varjazzjonijiet fil-kundizzjonijiet tat-test ikunu minimi u li l-osservazzjonijiet preferibbilment jitmexxew minn osservaturi li ma jkunux jafu bit-trattament. Is-sinjali osservati għandhom jinkludu, iżda mhumiex limitati għal, tibdljet fil-ġilda, il-pil, l-għajnejn, il-membrani mukużi, l-okkorrenza ta' tnixxijiet u eskrezzjonijiet u attività awtonomika (eż., dmugh, piloerezzjoni, daqs tal-ħabba, xejra respiratorja mhux tas-soltu). Tibdljet fil-mixja, fil-qagħda u fir-rispons għal immaniggar, kif ukoll il-preżenza ta' movimenti kloniċi jew toniċi, stereotipi (eż. tindif eċċessiv, dawran ripetittiv), hlas bit-tbatija jew fit-tul jew imġiba bizarra (eż. awtomutilazzjoni, mixi b'lura) għandhom ukoll ikunu rreġistrati (10).
44. Darba matul l-istudju, ir-reattività sensorjali għal stimoli ta' modalitajiet differenti (eż. stimoli awditorji, viżwali u proprjoċettivi) (8) (9) (11), valutazzjoni tas-saħħa tal-qabda (12) u valutazzjoni tal-attività motorja (13) għandhom isiru f'ħamest irġiel u f'ħames nisa, magħżula b'mod aleatorju minn kull grupp. Aktar dettalji tal-proċeduri li jistgħu jkun segwiti jingħataw fir-referenzi rispettivi. Iżda jistgħu jintużaw proċeduri alternattivi minbarra dawk fir-referenzi. Fl-irġiel, dawn l-osservazzjonijiet funzjonali għandhom isiru lejn tmiem il-perjodu tad-dożaġġ, ftit qabel il-qtil skedat iżda qabel il-kampjunar tad-demm għall-ematoloġija jew għall-kimika klinika (ara l-paragrafi 53-56, inkluża n-nota 1 f'qiegħ il-paġna). In-nisa għandhom ikunu fi stat fiżjoloġikament simili matul dawn it-testijiet funzjonali u idealment għandhom jiġu ttestjati darba matul l-aħħar ġimgħa tat-treddiġh (eż. LD 6-13), ftit qabel il-qtil skedat. Sa fejn possibbli, naqqas il-ħinijiet ta' separazzjoni tal-ommijiet u tal-frieħ.
45. Osservazzjonijiet funzjonali li jsiru darba lejn tmiem l-istudju jistgħu jithallew barra meta l-istudju jsir bħala studju preliminari għal studju subkroniku sussegwenti (90 jum) jew fit-tul. F'dak il-każ, l-osservazzjonijiet funzjonali għandhom ikunu inklużi f'dan studju ta' segwitu. Min-naħa l-oħra, id-disponibbiltà ta' *data* dwar osservazzjonijiet funzjonali minn

dan l-istudju b'doża ripetuta tista' ssahhah il-kapaċità biex jintgħazlu dożi għal studju subkroniku sussegwenti jew fit-tul.

46. Bħala eċċezzjoni, l-osservazzjonijiet funzjonali jistgħu wkoll jithallew barra għal gruppi li xort'oħra juru sinjali ta' tossiċità tant li tfixxkel b'mod sinifikanti l-prestazzjoni funzjonali tat-test.
47. Id-durata tal-ġestazzjoni għandha tigi reġistrata u hi kkalkolata mill-jum 0 tat-tqala. Kull boton għandu jiġi eżaminat mill-aktar fis possibbli wara l-ħlas biex jiġu stabbiliti n-numru u s-sess tal-frieħ, it-twelid mejjet, it-twelid ħaj, it-twelid mhux żviluppat (frieħ li jkunu ferm iżgħar mill-frieħ tal-kontroll korrispondenti), u l-preżenza ta' anormalitajiet serji.
48. Frieħ ħajjin għandhom jingħaddu u jitqassmu skont is-sess u kull boton għandu jintiżen fi żmien 24 siegħa mill-ħlas (jum 0 jew 1 wara l-ħlas) u tal-anqas fil-jiem 4 u 13 wara l-ħlas. Minbarra l-osservazzjonijiet fuq l-annimali ġenituri (ara l-paragrafi 43 u 44), kwalunkwe mġiba anormali tal-wild għandha tigi reġistrata.
49. L-AGD ta' kull ferħ għandha titkejjel fl-istess jum postnatali bejn il-PND 0 sal-PND 4. Il-piż tal-ġisem tal-frieħ għandu jingabar dakinhar li titkejjel l-AGD u l-AGD għandha tigi normalizzata għal kejl tad-daqs tal-ferħ, idealment l-għerq kwadrat tal-piż tal-ġisem (14). In-numru ta' bżiežel/areoli fil-frieħ irġiel għandu jingħadd fil-PND 12 jew 13 kif rakkomandat fil-GD 151 tal-OECD (15).

#### **Piż tal-ġisem u konsum ta' ikel/ilma**

50. L-irġiel u n-nisa għandhom jintiżnu fl-ewwel jum tad-dożaġġ, tal-anqas darba fil-ġimgħa wara dan, u fit-terminazzjoni. Matul it-tqala, in-nisa għandhom jintiżnu fil-jiem 0, 7, 14 u 20 u fi żmien 24 siegħa mill-ħlas (jum 0 jew 1 wara l-ħlas) u tal-anqas fil-jiem 4 u 13 wara l-ħlas. Dawn l-osservazzjonijiet għandhom ikunu rapportati individwalment għal kull annimal adult.
51. Matul il-fażi ta' qabel it-tgħammir, it-tqala u t-treddiġh, il-konsum tal-ikel għandu jitkejjel tal-anqas darba fil-ġimgħa. Il-kejl tal-konsum tal-ikel matul it-tgħammir hu fakultattiv. Il-konsum tal-ikel matul dawn il-perjodi għandu jitkejjel ukoll meta s-sustanza kimika tat-test tingħata b'dak il-medium.

#### **Ematoloġija**

52. Darba matul l-istudju, għandhom isiru l-eżaminazzjonijiet ematoloġiċi li ġejjin f'ħamest irġiel u ħames nisa magħżula b'mod aleatorju minn kull grupp: ematokrit, konċentrazzjoni ta' emoglobina, l-għadd ta' eritroċiti, retikulociti, l-għadd totali u differenzjali tal-lewkoċiti, l-għadd tal-pjastrini u kejl tal-ħin/potenzjali ta' koagulazzjoni. Determinazzjonijiet oħra li għandhom isiru, jekk is-sustanza kimika tat-test jew il-

metaboliti putattivi tagħha jkollhom jew ikunu ssuspettati li jkollhom proprjetajiet ossidanti, jinkludu konċentrazzjoni ta' metemoglobina u l-korpi ta' Heinz.

53. Il-kampjuni tad-demmi għandhom jittiehdu minn sit imsemmi. In-nisa għandhom ikunu fi stat fiżjologikament simili matul il-kampjunar. Biex jiġi evitati diffikultajiet prattiċi relatati mal-varjabbiltà fil-bidu tal-ġestazzjoni, il-ġbir tad-demmi fin-nisa jista' jsir fi tmiem il-perjodu ta' tghammir bħala alternattiva għall-kampjunar eżatt qabel il-proċedura għall-ewtanaġġa tal-annimali jew bħala parti minn din. Il-kampjuni tad-demmi tal-irġiel idealment għandhom jittiehdu eżatt qabel l-ewtanaġġa tal-annimali jew bħala parti minn din. Inkella, il-ġbir tad-demmi fl-irġiel jista' jsir ukoll fi tmiem il-perjodu ta' tghammir meta dan il-punt ta' żmien ikun ingħata preferenza għan-nisa.
54. Il-kampjuni tad-demmi għandhom jinħażnu f'kundizzjonijiet xierqa.

### **Bijokimika klinika**

55. Id-determinazzjonijiet tal-bijokimika klinika biex jiġi investigati effetti tossiċi kbar f'tessuti u, b'mod speċifiku, l-effetti fuq il-kliwi u l-fwied, għandhom isiru fuq kampjuni tad-demmi miksuba mill-ħamest irġiel u mill-ħames nisa magħżula ta' kull grupp. Hu rakkomandat is-sawm mal-lejl tal-annimali qabel it-teħid tal-kampjuni tad-demmi<sup>1</sup>. L-investigazzjonijiet tal-plażma jew serum għandhom jinkludu is-sodju, il-potassju, il-glukożju, il-kolesterol totali, l-urea, il-kreatinina, il-proteini u l-albumina totali, tal-anqas żewġ enzimi indikattivi ta' effetti epatoċellulari (bħalma huma l-alanina aminotransferazi, aspartataminotransferazi u sorbitol deidrogenazi) u aċidi biljari. Il-kejl ta' enzimi addizzjonali (ta' oriġini epatika jew oriġinijiet oħra) u ta' bilirubina jistgħu jipprovdu informazzjoni utli f'ċerti ċirkostanzi.
56. Il-kampjuni tad-demmi minn sit definit jittiehdu fuq il-bażi tal-iskeda li ġejja:

---

<sup>1</sup> Għal għadd ta' kejl jistgħu ta' serum u plazma, l-aktar għall-glukożju, is-sawm tul il-lejl ikun ippreferut. Ir-raġuni ewlenija għal din il-preferenza hi li aktar varjabbiltà li għandha inevitabbilment tirriżulta minn nuqqas ta' sawm, tittendi li taħbi effetti aktar sottili u tagħmel l-interpretazzjoni diffiċli. Madankollu, min-naha l-oħra, is-sawm matul il-lejl jista' jinterferixxi mal-metabolizmu ġenerali tal-annimali (tqal), itellef it-treddiġ u l-imġiba tat-treddiġ, u, b'mod partikolari fi studji dwar it-tagħlif, jista' jfixxkel l-esponiment ta' kuljum għas-sustanza kimika tat-test. Jekk ikun adottat sawm tul il-lejl, id-determinazzjonijiet bijokimiċi kliniċi għandhom isiru wara li jkunu twettqu l-osservazzjonijiet funzjonali fir-raba' (4) ġimgħa tal-istudju għall-irġiel. L-ommijiet għandhom jinżammu għal jum ieħor wara li l-frieħ jitneħħew fil-PND 13, pereżempju). L-ommijiet għandhom jithallew isumu tul il-lejl mill-jum tat-treddiġ 13-14 u d-demmi terminali jintuza għall-parametri kimiċi kliniċi.

- minn tal-anqas żewġt ifrieh għal kull boton fil-jum 4 wara t-twelid, jekk in-numru ta' frieh jippermetti (ara l-paragrafi 40-41)
- mill-ommijiet kollha u minn tal-anqas żewġt ifrieh għal kull boton fit-terminazzjoni fil-jum 13, u
- mill-irġiel adulti kollha, fit-terminazzjoni

Il-kampjuni kollha tad-demmi jinħażnu f'kundizzjonijiet xierqa. Kampjuni tad-demmi mill-frieh tal-jum 13 u mill-irġiel adulti jiġu vvalutati għal-livelli tas-serum għall-ormoni tat-tirojde (T4). Issir valutazzjoni ulterjuri tat-T4 fil-kampjuni tad-demmi għall-ommijiet u għall-frieh tal-jum 4 jekk tkun rilevanti. Hemm l-għażla li jistgħu jitkejlu ormoni oħra jekk ikunu rilevanti. Id-demmi tal-frieh jista' jiġi raggruppat skont il-boton għall-analizijiet tal-ormon tat-tirojde. L-ormoni tat-tirojde (T4 u TSH) idealment għandhom jitkejlu bħala "total".

57. Hemm l-għażla li jsiru d-determinazzjonijiet tal-urinalizi li ġejjin f'hamest irġiel magħzula b'mod aleatorju ta' kull grupp matul l-aħħar ġimgħa tal-istudju bl-użu ta' ġbir ta' volum ta' urina bil-ħin miżmum; l-apparenza, il-volum, l-ożmolalità jew gravità speċifika, il-pH, il-proteini, il-glukożju u d-demmi/iċ-ċelloli tad-demmi.
58. Barra minn hekk, l-istudji biex jinvestigaw l-immarkar tas-serum ta' ħsara generali għat-tessuti għandhom jiġu kkunsidrati. Determinazzjonijiet oħra li għandhom jitwettqu jekk il-proprjetajiet magħrufa tas-sustanza kimika tat-test jistgħu, jew huma suspettati li jaffettwaw il-profilu metaboliċi relatati jinkludu il-kalcju, it-trigliceridi waqt sawm u l-glukożju waqt sawm, l-ormoni speċifiċi, il-metaemoglobina u l-kolinesterasi. Dawn jeħtieġ li jiġu eżaminati fuq bażi ta' każ b'każ.
59. Il-fatturi li ġejjin jistgħu jinfluwenzaw il-varjabbiltà u l-koncentrazzjonijiet assoluti tad-determinazzjonijiet tal-ormoni:
  - il-ħin tal-qatla minhabba varjazzjonijiet tul il-jum tal-koncentrazzjonijiet tal-ormoni
  - il-metodu tal-qatla biex tkun evitata tensjoni bla bżonn għall-annimali li tista' taffettwa l-koncentrazzjonijiet tal-ormoni
  - is-settijiet tat-testijiet għad-determinazzjonijiet tal-ormoni li jistgħu jkunu differenti mill-kurvi standard tagħhom.
60. Kampjuni ta' plazma maħsubin speċifikatament għal determinazzjoni tal-ormoni għandhom jinkisbu f'ħin komparabbli tal-jum. Il-valuri numeriċi miksubin meta jkunu analizzati l-koncentrazzjonijiet tal-ormoni jkunu differenti fost diversi settijiet ta' analizi kummerċjali.

61. Jekk bazi ta' *data* storika ma tkunx adegwata, għandha tingħata kunsiderazzjoni lid-determinazzjoni ta' varjabbli ematoloġiċi u ta' bijokimika klinika qabel ma jibda d-dożagġ jew preferibbilment f'sett ta' annimali mhux inklużi fil-gruppi ta' esperimenti. Għan-nisa, id-*data* trid tiġi minn annimali li jreddgħu.

## PATOLOĠIJA

### Nekroskopija grossa

62. L-annimali adulti kollha fl-istudju għandhom ikunu ssoġġettati għal nekroskopija profonda shiħa u dettaljata li tkun tinkludi eżami bir-reqqa tal-wiċċ estern tal-gisem, tal-fethiet kollha u tal-kavitajiet kranjali, toraċiċi u abdominali u tal-kontenuti tagħhom. Għandha tingħata attenzjoni partikolari għal-organi tas-sistema riproduttiva. In-numru ta' siti ta' impjantazzjoni għandu jiġi registrat. It-tiċpisiet vaġinali għandhom jiġu eżaminati dakinhar tan-nekroskopija biex jiġi determinat l-istadju taċ-ċiklu estruż u tkun tista' ssir korrelazzjoni mal-istopatoloġija tal-organi riproduttivi tan-nisa.
63. It-testikoli u l-epididimidi kif ukoll il-bżieżaq tal-prostata u seminali bil-glandoli koagolanti fis-shuħija tagħhom, tal-annimali adulti rgħiel kollha għandhom jiġu mirquma minn kwalunkwe tessut aderenti, kif xieraq, u l-piż niedi tagħhom għandu jittiehed mill-aktar fis possibbli wara d-dissezzjoni biex jiġi evitat milli jinxfu. Barra minn hekk, il-piżijiet tal-organi fakultattivi jistgħu jinkludu l-kumpless tal-levator ani u tal-muskolu bulbokavernuż, il-glandoli ta' Cowper u r-ras tal-pene fl-irgħiel u l-ovarji f'pari (piż imxarrab) u l-utru (inklud iċ-ċerviċi) fin-nisa; jekk inklużi, dawn il-piżijiet għandhom jingabru mill-aktar fis possibbli wara d-dissezzjoni. L-ovarji, it-testikoli, l-epididimu, l-organi sesswali aċċessorji, u l-organi kollha li juru leżjonijiet makroskopiċi tal-annimali adulti kollha għandhom jiġu preservati.
64. Għall-irgħiel u għan-nisa adulti kollha u għal raġel wiehed u għal mara waħda li jkunu frieħ tal-jum 13 minn kull boton, il-glandoli tat-tirojde għandhom jiġu preservati fl-aktar medium ta' fissazzjoni xierqa għall-eżami istopatoloġiku sussegwenti maħsub. Il-piż tat-tirojde jista' jiġi ddeterminat wara l-fissazzjoni. It-tirqim għandu jsir ukoll b'reqqa kbira u biss wara l-fissazzjoni biex tkun evitata l-ħsara lit-tessut. Il-ħsara fit-tessut tista' tippregudika analiżi istopatoloġika. Il-kampjuni tad-demmi għandhom jittieħdu minn sit imsemmi eżatt qabel jew bħala parti mill-proċedura għall-ewtanazja tal-annimali, u għandhom jinħażnu f'kundizzjonijiet xierqa (ara l-paragrafu 56).
65. Barra minn hekk, għal tal-anqas haġest irgħiel u nisa adulti, magħżula b'mod aleatorju minn kull grupp (minbarra dawki misjuba fi stat ta' agunija u/jew ewtanizzati qabel it-terminazzjoni tal-istudju), il-fwied, il-kliwi, l-adrenali, it-timus, il-milsa, il-moħħ u l-qalb għandhom jittraqqmu minn kwalunkwe tessut aderenti, kif xieraq u l-piż tagħhom għandu

jittiehed mill-aktar fis wara d-dissezzjoni biex jiġi evitat milli jinxfu. It-tessuti li ġejjin għandhom ikunu preservati fl-iktar medium xieraq kemm għat-tip ta' tessut u kemm għall-eżaminazzjoni ispatoloġika maħsuba sussegwenti: il-leżjonijiet kbar kollha, il-moħħ (reġjuni rappreżentattivi li jinkludu ċ-ċerebru, iċ-ċerebellum u l-pons), is-sinsla tad-dahar, l-ġhajj, l-istonku, l-intestini żgħar u kbar (inklużi l-irqajja' ta' Peyer), il-fwied, il-kliwi, l-adrenali, il-milsa, il-qalb, it-timus, it-trakea u l-pulmun (preservat bl-infih b'fissattiv u mbaġħad mġhaddas), il-gonadi (testikoli u ovarji), l-organi sesswali aċċessorji (utru u ċerviċi, epididimu, prostata, bżieġaq seminali u l-glandoli koagolanti), il-vaġina, il-borża tal-awrina, il-limfonodi (minbarra l-aktar limfonodu drenanti prossimali, għandu jittiehed limfonodu ieħor skont l-esperjenza tal-laboratorju (16)), in-nerv periferali (xjati jew tibjali) idealment qrib il-muskolu, il-muskolu skeletali u l-ġhadma, bil-mudullun (sezzjoni jew inkella aspirat tal-mudullun immuntat ġdid). Hu rrakkomandat li t-testikoli jkunu f'fissati b'immersjoni fil-fissattiv ta' Bouin jew f'dak modifikat ta' Davidson (16) (17) (18); fissazzjoni tal-formalina mhix rakkomandata għal dawn it-tessuti. It-tunika albuginea tista' tittaqqab bil-mod u mhux fil-fond fiż-żewġ poli tal-organu b'labra biex jithalla jkun hemm penetrazzjoni malajr tal-fissattiv. Is-sejbiet kliniċi u oħrajn jistgħu jissuggerixxu l-htieġa li jkunu eżaminati tessuti addizzjonali. Għandu wkoll ikun ippreservat kull organu li x'aktarx ikun meqjus b'ħala organu mmirat abbażi tal-proprjetajiet magħrufa tas-sustanza kimika tat-test.

66. It-tessuti li ġejjin jistgħu jagħtu indikazzjoni siewja għall-effetti relatati mal-endokrina: Il-gonadi (ovarji u testikoli), l-organi sesswali aċċessorji (utru li jinkludi ċerviċi, epididimu, bżieġaq seminali bi glandoli tal-koagulazzjoni, prostata dorsolaterali u ventrali), il-vaġina, il-glandola pitwitarja tal-mammiferi rġiel u l-glandola adrenali. It-tibdiliet fil-glandoli tal-mammiferi rġiel ma kinux iddokumentati b'mod suffiċjenti iżda dan il-parametru jista' jkun sensittiv ħafna għal sustanzi b'azzjoni estrogenika. L-osservazzjoni tal-organi/tat-tessuti li mhumx elenkati fil-paragrafu 65 hi fakultattiva.
67. Frieħ mejtin u frieħ maqtula fil-jum 13 wara l-ħlas, jew ftit wara, tal-anqas għandhom jiġu eżaminati bir-reqqa esternament għal anormalitajiet serji. Għandha tingħata attenzjoni partikolari għall-ġenitali riproduttivi esterni li għandhom jiġu eżaminati għal sinjali ta' żvilupp mibdul.

## **Istopatoloġija**

68. Għandha ssir istopatoloġija shiħa fuq l-organi u t-tessuti preservati tal-annimali magħżula fil-gruppi tal-kontroll u ta' doża għolja (b'enfasi speċjali fuq l-istadji tal-ispermatogenezi fil-gonadi tal-irġiel u l-istopatoloġija tal-istruttura taċ-ċelloli testikolari interstizjali). Il-glandola tat-tirojda mill-frieħ u mill-annimali adulti li jifdal tista' tiġi eżaminata meta jkun hemm bżonn. Dawn l-eżaminazzjonijiet għandhom ikunu estenzi għall-annimali tal-gruppi l-oħra ta' dożaġġ, jekk jiġu osservati tibdiliet relatati mat-trattament fil-grupp ta' doża



għolja. Il-Gwida dwar l-istopatoloġija (10) tagħti aktar informazzjoni dwar id-dissezzjoni, il-fissazzjoni, is-sezzjonar u l-istopatoloġija ta' tessuti endokrinali.

69. Il-feriti kbar kollha għandhom jiġu eżaminati. Bħala għajnuna fl-iċċarar tal-NAOELs, l-organi fil-mira fi gruppi ta' doża oħra għandhom jiġu eżaminati, b'mod partikolari fi gruppi li jiġi ddikjarat li juru NAOEL.
70. Meta jintuża grupp satellitarju, l-istopatoloġija għandha ssir fuq tessuti u organi identifikati bħala li juru effetti fil-gruppi ttrattati.

## **DATA U RAPPORTAR**

### ***Data***

71. Għandha tkun ipprovduta d-*data* dwar l-annimali individwali. Barra minn hekk, id-*data* kollha għandha tingabar f'forma tabulari, u għal kull grupp tat-test għandha turi n-numru ta' annimali fil-bidu tat-test, in-numru ta' annimali misjuba mejta matul it-test jew ewtanizzati għal raġunijiet umanitarji, il-hin ta' xi mewt jew ewtanażja, in-numru ta' annimali fertili, in-numru ta' nisa tqal, in-numru ta' annimali li juru sinjali ta' tossiċità, deskrizzjoni tas-sinjali ta' tossiċità osservati, inklużi l-hin tal-ewwel darba, id-durata, u s-severità ta' kwalunkwe effett tossiku, it-tip ta' tibdiliet istopatoloġiċi u d-*data* rilevanti kollha dwar il-boton. Format tabulari tar-rapport ta' sommarju li wera li hu tassew siewi għall-evalwazzjoni tal-effetti riproduttivu/tal-iżvilupp hu mogħti fl-Appendiċi 3.
72. Meta jkun possibbli, ir-riżultati numeriċi għandhom ikunu evalwati b'metodu ta' statistika generalment aċċettabbli u adattat. Il-paraguni tal-effett tul firxa tad-doża għandhom jevitaw l-użu ta' testijiet-t multipli. Il-metodi ta' statistika għandhom jintgħazlu matul it-tfassil tal-istudju. Analizi statistika tal-AGD u taż-żamma tal-beżżula għandha tkun ibbażata fuq *data* tal-frieħ individwali, b'kunsiderazzjoni tal-effetti fuq il-boton. Fejn xieraq, il-boton hu l-unità ta' analizi. Analizi statistika tal-piż tal-ġisem tal-frieħ għandha tkun ibbażata fuq *data* tal-frieħ individwali, b'kunsiderazzjoni tad-daqs tal-boton. Minhabba d-dimensjonijiet limitati tal-istudju, l-analizijiet statistiċi fil-forma ta' testijiet għal "sinifikat" huma ta' valur limitat għal hafna punti ta' tmim, speċjalment il-punti ta' tmim riproduttivi. Uħud mill-aktar metodi użati ta' spiss, speċjalment testijiet parametriċi għall-kejl tat-tendenza ċentrali, mhumiex adattati. Jekk jintużaw analizijiet statistiċi, il-metodu magħżul għandu jkun xieraq għad-distribuzzjoni tal-varjabbli eżaminat, u jintgħazel qabel il-bidu tal-istudju.

### **Evalwazzjoni tar-riżultati**

73. Is-sejbiet ta' dan l-istudju tat-tossiċità għandhom jiġu evalwati f'termini tal-effetti osservati, tan-nekroskopija u tas-sejbiet mikroskopiċi. L-evalwazzjoni għandha tinkludi r-

relazzjoni bejn id-doża u s-sustanza kimika tat-test u l-preżenza jew l-assenza, l-inċidenza jew is-severità tal-anormalitajiet, inklużi l-feriti kbar, l-organi tal-mira identifikati, l-infertilità, l-anormalitajiet kliniċi, l-imġiba tar-riproduzzjoni u l-boton affettwati, it-tibdiliet fil-piż tal-ġisem, l-effetti fuq il-mortalità u xi effetti tossiċi oħra.

74. Minhabba l-perjodu qasir ta' trattament tal-irġiel, l-istopatoloġija tat-testikoli u tal-epididimu għandha tiġi kkunsidrata flimkien mad-*data* dwar il-fertilità meta jiġu vvalutati l-effetti riproduttivi fuq l-irġiel. L-użu ta' *data* storika tal-kontroll fuq ir-riproduzzjoni/l-iżvilupp (eż. għad-daqs tal-boton, l-AGD, iż-żamma tal-beżżula, il-livelli tas-serum T4), fejn disponibbli, jista' jkun siewi wkoll bħala għajnuna għall-interpretazzjoni tal-istudju.
75. Għall-kontroll tal-kwalità huwa propost li tingabar *data* storika ta' kontroll u li għad-*data* numerika jkunu kkalkolati l-koeffiċjenti ta' varjazzjoni, speċjalment għall-parametri li jkollhom rabta mad-detezzjoni tal-interferent endokrinali. Din id-*data* tista' tintuża għal finijiet ta' paragun meta jkunu evalwati studji attwali.

## Rapport tat-test

76. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

### *Sustanza kimika tat-test:*

- is-sors, in-numru tal-lott, id-data ta' limitu għall-użu, jekk disponibbli
- l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test, jekk magħrufa.

### *Sustanza monokostitwenti:*

- id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma, u l-proprietajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali;
- l-identifikazzjoni kimika, bħall-isem IUPAC jew CAS, in-numru CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.

### *Sustanza multikostitwenti, UVBCs u taħlitiet:*

- ikkaratterizzati sa fejn possibbli mill-identità kimika (ara aktar 'il fuq), l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprietajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti.

### *Veikolu (jekk xieraq):*

- ġustifikazzjoni għal għażla ta' veikolu, jekk ma jkunx ilma.

*L-annimali tat-test:*

- speċi/razza użata;
- l-ġhadd, l-età u s-sess tal-annimali;
- is-sors, il-kundizzjonijiet tal-ġaġeg, id-dieta, eċċ.;
- il-pizijiet individwali tal-annimali fil-bidu tat-test.
- ġustifikazzjoni għal speċi jekk ma jkunx far

*Il-kundizzjonijiet tat-test:*

- ir-raġuni għall-ġhażla tal-livell tad-doża;
- dettalji dwar il-formulazzjoni tas-sustanza kimika tat-test/il-preparazzjoni tad-dieta, il-konċentrazzjoni, l-istabbiltà u l-omoġenità miksubin tal-preparazzjoni,
- dettalji dwar l-ġhoti tas-sustanza kimika tat-test;
- konverżjoni minn dieta/konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test ta' ilma tax-xorb (ppm) għad-doża attwali (mg/kg tal-piż tal-ġisem/jum), jekk applikabbli;
- dettalji dwar il-kwalità tal-ikel u tal-ilma;
- deskrizzjoni dettaljata tal-proċedura ta' każwalizzazzjoni biex jintgħažlu l-frieħ għall-qtil, jekk jinqatlu.

*Riżultati:*

- piż tal-ġisem/bidliet fil-piż tal-ġisem;
- konsum ta' ikel, u konsum ta' ilma, jekk applikabbli;
- id-*data* dwar ir-rispons tossiku skont is-sess u d-doża, inklużi l-fertilità, il-ġestazzjoni u kwalunkwe sinjal ieħor ta'
- tossiċità;
- it-tul tal-ġestazzjoni;
- l-effetti tossiċi jew oħra fuq ir-riproduzzjoni, l-ulied, it-tkabbir ta' wara t-twelid, eċċ.;
- natura, severità u durata ta' osservazzjonijiet kliniċi (jekk reversibbli jew le);

- attività sensorja, qawwa tal-qabda u valutazzjonijiet tal-attività motorja;
- testijiet ematoloġiċi b'valuri bażi rilevanti;
- testijiet ta' bijokimika klinika b'valuri linja bażi rilevanti;
- in-numru ta' nisa adulti b'ċiklu estruż normali jew anormali u d-durata taċ-ċiklu;
- in-numru ta' twelid ħaj u ta' telf ta' wara l-impjantazzjoni;
- in-numru ta' frieħ b'anormalitajiet ferm vizibbli; evalwazzjoni profonda tal-ġenitali esterni, in-numru ta' frieħ li jitwiellu żgħar ħafna;
- il-ħin tal-mewt matul l-istudju jew meta l-annimali jkunu baqgħu ħajjin fit-terminazzjoni tat-test;
- in-numru ta' impjantazzjonijiet, id-daqs tal-boton u l-piżijiet tal-boton fil-ħin tar-reġistrazzjoni;
- id-*data* dwar il-piż tal-ġisem tal-frieħ
- l-AGD tal-frieħ kollha (u l-piż tal-ġisem fl-jum tal-kejl tal-AGD)
- iż-żamma tal-beżżula fil-frieħ irġiel,
- il-livelli tal-ormon tat-tirojde, il-frieħ tal-jum 13 u l-irġiel adulti (u l-ommijiet u l-frieħ tal-jum 4 jekk
- jitkejlu)
- il-piż tal-ġisem fis-sagrifiċċju u d-*data* dwar il-piż tal-organi għall-annimali ġenituri;
- sejbiet dwar in-nekroskopija,
- deskrizzjoni dettaljata tas-sejbiet istopatoloġiċi;
- id-dettalji tal-assorbiment (jekk disponibbli);
- trattament ta' statistika ta' riżultati, fejn jixraq.

*Diskussjoni tar-riżultati.*

*Kunklużjonijiet.*

## **Interpretazzjoni tar-Riżultati**

77. L-istudju jipprovdi evalwazzjonijiet tat-tossiċità riproduttiva/tal-iżvilupp assoċjata mal-amministrazzjoni ta' dożi ripetuti. B'mod partikolari, peress li l-enfasi hi mixhuta kemm fuq il-punti ta' tmiem tat-tossiċità ġenerali kif ukoll tat-tossiċità riproduttiva/tal-iżvilupp, ir-riżultati tal-istudju jippermettu li ssir distinzjoni bejn l-effetti fuq ir-riproduzzjoni/l-iżvilupp li jseħhu fin-nuqqas ta' tossiċità ġenerali u dawk li jkunu espressi biss f'livelli li jkunu tossiċi għall-annimali ġenituri wkoll (ara l-paragrafi 7-11). Jista' jipprovdi indikazzjoni tal-htieġa li jsiru investigazzjonijiet ulterjuri u jista' jipprovdi gwida fit-tfassil tal-istudji sussegwenti. Id-Dokument ta' Gwida tal-OECD Nru 43 għandu jiġi kkonsultat għal għajnuna fl-interpetazzjoni tar-riżultati dwar ir-riproduzzjoni u l-iżvilupp (19). Id-Dokument ta' Gwida tal-OECD Nru 106 dwar l-Evalwazzjoni Istoloġika tat-Testijiet Endokrinali u Riproduttivi fir-Rodituri (16) jipprovdi informazzjoni dwar it-tnejn u l-evalwazzjoni tal-organi (endokrinali) u tat-tiċpisiet vaġinali li jistgħu jkunu ta' għajnuna għal dan il-metodu ta' ttestjar.

## DOKUMENTAZZJONI

- (1) OECD (1990). Dokument tas-seduta Nru 1 għall-14-il Laqgħa Kongunta tal-Chemicals Group and Management Committee. Disponibbli fuq talba mingħand l-Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi
- (2) OECD (1992). Ir-Rapport tal-President tal-Laqgħa ta' Esperti *ad hoc* dwar il-Metodi ta' Skrinjar tat-Tossicità Riproduttiva, Tokyo, 27-29 ta' Ottubru, 1992. . Disponibbli fuq talba mingħand l-Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi
- (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. u 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. u 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). Rapport tal-Ewwel Laqgħa tat-Task Force tal-OECD dwar l-Ittestjar u l-Valutazzjoni tal-Interferenti Endokrinali (EDTA), 10-11 ta' Marzu 1998, Disponibbli fuq talba mingħand l-Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi
- (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), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.
- (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), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.
- (8) Goldman J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M. u Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, *Birth Defects Research, Parti B*, 80 (2), 84-97.

- (9) Sadleir R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, f'Auston C.R. u 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. Environmental Health Criteria Document (No 60).
- (11) Moser V.C., McDaniel K.M. u 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. u Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb 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 u 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). Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.
- (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), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.
- (17) Hess RA u Moore BJ. (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. Fi: *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), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

- (20) OECD (2011), Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (No 150), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.



## **Appendiċi 1**

### **DEFINIZZJONIJIET (ARA WKOLL (20) GD 150 TAL-OECD)**

Androġeniċità hi l-kapaċità ta' sustanza kimika li taġixxi bħal ormon androġeniku naturali (eż. testosterone) f'organizmu mammiferu.

Antiandroġeniċità hi l-kapaċità ta' sustanza kimika li trażżan l-azzjoni ta' ormon androġeniku naturali (eż. testosterone) f'organizmu mammiferu.

Antiestroġeniċità hi l-kapaċità ta' sustanza kimika li trażżan l-azzjoni ta' ormon estroġeniku naturali (eż. estradijol 17β) f'organizmu mammiferu.

Attività tal-antitirojde hi l-kapaċità ta' sustanza kimika li trażżan l-azzjoni ta' ormon naturali tat-tirojde (eż. T3) f'organizmu mammiferu.

Sustanza kimika hija sustanza jew taħlita.

Tossiċità tal-iżvilupp: il-manifestazzjoni tat-tossiċità riproduttiva, li tirrappreżenta disturbi strutturali jew funzjonali prenatali, perinatali u post natali fil-wild.

Doża hi l-ammont ta' sustanza kimika tat-test mogħtija. Id-doża hi espressa bħala piż tas-sustanza kimika tat-test għal kull unità ta' piż tal-ġisem ta' animal tat-test għal kull jum (eż. mg/kg tal-piż tal-ġisem/jum), jew bħala konċentrazzjoni kostanti ta' dieta.

Dożaġġ hi terminu ġenerali li jinkludi d-doża, il-frekwenza taġġha u d-durata tad-dożaġġ.

Tossiċità evidenti hi terminu ġenerali li jiddeskrivi sinjali ċari ta' tossiċità wara li tkun ġiet amministrata kimika għall-ittestjar. Dawn għandhom ikunu suffiċjenti għal valutazzjoni tal-periklu u għandhom ikunu tali li zieda fid-doża amministrata tista' tkun mistennija li tirriżulta fl-iżvilupp ta' sinjali ta' tossiċità estrema u probabbilment mortalità.

Indeboliment tal-fertilità tirrappreżenta disturbi tal-funzjonijiet jew tal-kapaċità riproduttivi tal-irġiel jew tan-nisa.

Tossiċità materna: effetti avversi fuq nisa tqal, li jsejnhu b'mod speċifiku (effetti diretti) jew mhux speċifiku (effetti indiretti) u li jkunu relatati mal-istat ta' tqala.

NOAEL hi l-abbrevjazzjoni għal-livell bla effett ħazin osservat. Dan hu l-ogħla livell ta' doża fejn l-ebda sejbiet ħżiena relatati ma' trattament ma jkunu osservati minhabba trattament.

Estroġeniċità hi l-kapaċità ta' sustanza kimika li tagixxi bħal ormon estrogeniku naturali (eż. estradijol 17β) f'organizmu mammiferu.

Tossiċità riproduttiva tirrappreżenta l-effetti dannużi fuq il-wild u/jew indeboliment tal-funzjonijiet jew tal-kapaċità riproduttivi tal-irġiel u tan-nisa.

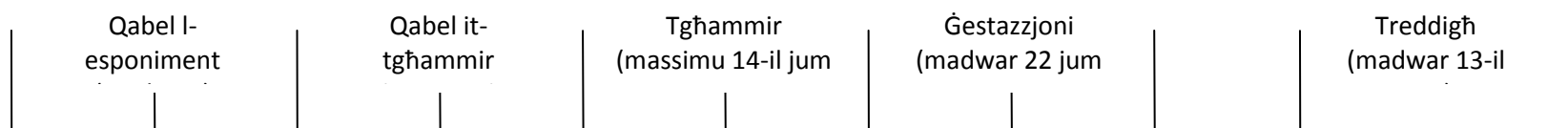
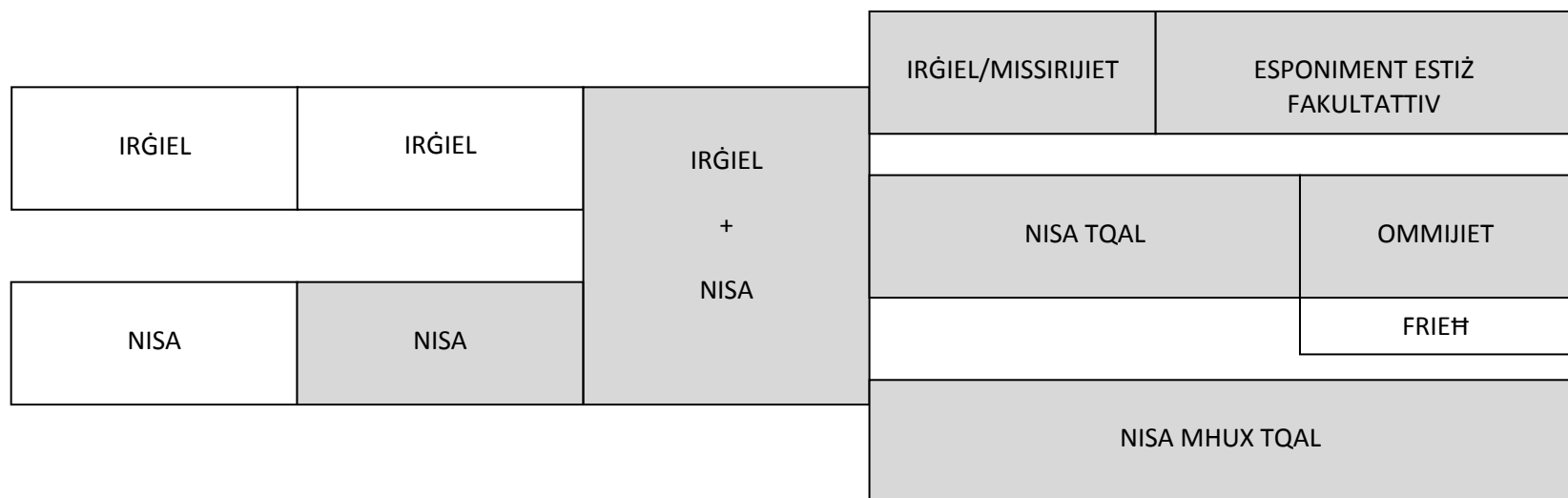
Sustanza kimika tat-test hi kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata bl-użu ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

Attività tat-tirojde hi l-kapaċità ta' sustanza kimika li tagixxi bħal ormon naturali tat-tirojde (eż. T<sub>3</sub>) f'organizmu mammiferu.

Validazzjoni hi proċess xjentifiku mfassal biex jiġu karatterizzati r-rekwiżiti u l-limitazzjonijiet operazzjonali ta' metodu ta' ttestjar u biex tintwera l-affidabbiltà u r-relevanza tiegħu għal skop partikolari.

## Appendiċi 2

**DIJAGRAMMA TAL-ISKEDA SPERIMENTALI, LI TINDIKA D-DURATA MASSIMA TAL-ISTUDJU, FUQ IL-BAŽI TA' PERJODU SHIH TA' TGHAMMIR FUQ 14-IL JUM**



1      7      14      21      28      35      42      49      56      64      77

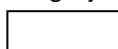
Bidu tal-istudju

Evalwazzjoni qabel l-esponiment ta' cikličità estruża, segwita minn monitoraġġ ta' kuljum tal-istrixxi vaġinali mill-bidu tat-trattament sal-evidenza tat-tgħammir

Dożaġġ



Mingħajr dożaġġ

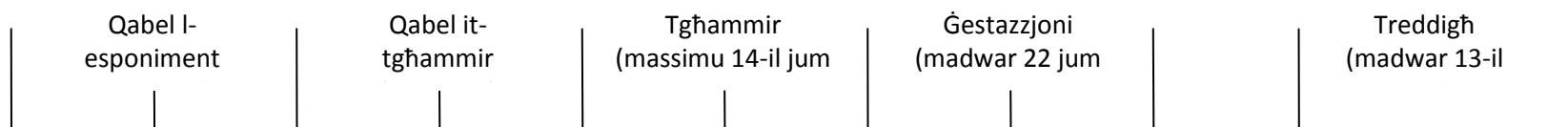
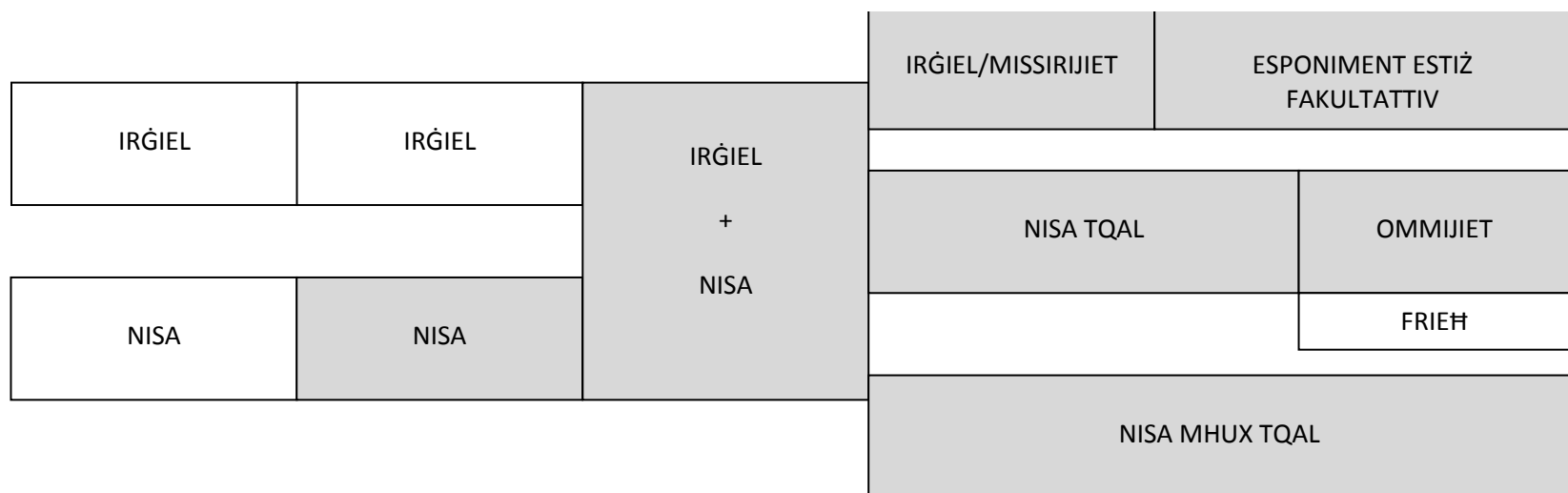


Ematoloġija/kimika klinika fl-irġiel u fin-nisa (fakultattiva)

Nekroskopija rġiel/missirijiet  
Osservazzjonijiet funzjonali fl-irġiel (fakultattivi)  
Ematoloġija/kimika klinika fl-irġiel, meta maqtula (wara perjodu ta' dożaġġ minimu ta' 4 ġimgħat)

Ħlas (PND 0) sal-PND 4: AGD fil-frieġ kollha (PND 0-PND 4; l-istess jum)  
Terminazzjoni ta' 2 ifrieġ għal kull boton għat-T4 (PND 4)

Jum 13 wara l-ħlas  
Nekroskopija tan-nisa u tal-frieġ  
Nekroskopija rġiel/missirijiet (fakultattiva).  
Osservazzjonijiet funzjonali fl-irġiel (fakultattivi) u fin-nisa  
Ematoloġija/kimika klinika fl-irġiel u fin-nisa (fakultattiva)  
Żamma tal-heżżula fil-frieġ



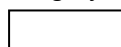
Bidu tal-istudju

Evalwazzjoni qabel l-esponiment ta' ċikličità estruża, segwita minn monitoraġġ ta' kuljum tal-istrixxi vaginali mill-bidu tat-trattament sal-evidenza tat-tgħammir

Dożaġġ



Mingħajr dożaġġ



Ematoloġija/kimika klinika fl-irġiel u fin-nisa (fakultattiva)

Nekroskopija rġiel/missirijiet  
Osservazzjonijiet funzjonali fl-irġiel (fakultattivi)  
Ematoloġija/kimika klinika fl-irġiel, meta maqtula (wara perjodu ta' dożaġġ minimu ta' 4 ġimgħat)

Hlas (PND 0) sal-PND 4: AGD fil-frieġ kollha (PND 0-PND 4; l-istess jum)  
Terminazzjoni ta' 2 ifrieġ għal kull boton għat-T4 (PND 4)

Jum 13 wara l-hlas  
Nekroskopija tan-nisa u tal-frieġ  
Nekroskopija rġiel/missirijiet (fakultattiva).  
Osservazzjonijiet funzjonali fl-irġiel (fakultattivi) u fin-nisa  
Ematoloġija/kimika klinika fl-irġiel u fin-nisa (fakultattiva)  
Żamma tal-beżżula fil-frieġ

### Appendiċi 3

## RAPPORT SOMMARJU TABULARI TAL-EFFETTI FUQ IR-RIPRODUZZJONI/L-IŻVILUPP

| OSSERVAZZJONIJIET                                                                                               | Valuri       |     |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|-----|-----|-----|-----|
| Dożaġġ (unitajiet).....                                                                                         | 0 (kontroll) | ... | ... | ... | ... |
| Pari mibdija (N)                                                                                                |              |     |     |     |     |
| Ċiklu estruż (tal-anqas it-tul medju u l-frekwenza taċ-ċikli irregolari)                                        |              |     |     |     |     |
| Nisa li juru evidenza ta' tghammir (N)                                                                          |              |     |     |     |     |
| Nisa li jilhq t-tqala (N)                                                                                       |              |     |     |     |     |
| Jiem tal-konċepiment 1 - 5 (N)                                                                                  |              |     |     |     |     |
| Jiem tal-konċepiment 6 - . . . <sup>(1)</sup> (N)                                                               |              |     |     |     |     |
| Tqala ≤ 21 jum (N)                                                                                              |              |     |     |     |     |
| Tqala = 22 jum (N)                                                                                              |              |     |     |     |     |
| Tqala ≥ 23 jum (N)                                                                                              |              |     |     |     |     |
| Ommijiet b'zgħar hajjin imwielda (N)                                                                            |              |     |     |     |     |
| Ommijiet b'zgħar hajjin imwielda fil-jum 4 pp (N)                                                               |              |     |     |     |     |
| Impjanti/omm (medja)                                                                                            |              |     |     |     |     |
| Frieħ hajjin/omm fit-twelid (medja)                                                                             |              |     |     |     |     |
| Frieħ hajjin/omm fil-jum 4 (medja)                                                                              |              |     |     |     |     |
| Proporzjon tas-sessi (r/n) fil-hlas (medja)                                                                     |              |     |     |     |     |
| Proporzjon tas-sessi (r/n) fil-jum 4 (medja)                                                                    |              |     |     |     |     |
| Piż tal-boton fil-hlas (medja)                                                                                  |              |     |     |     |     |
| Piż tal-boton fil-jum 4 (medja)                                                                                 |              |     |     |     |     |
| Piż tal-frieħ fil-hlas (medja)                                                                                  |              |     |     |     |     |
| Piż tal-frieħ fil-hin tal-kejl tal-AGD (medja tal-irġiel, medja tan-nisa)                                       |              |     |     |     |     |
| AGD tal-frieħ fl-istess jum wara t-twelid, fil-hlas, fil-jum 4 (medja tal-irġiel, medja tan-nisa, nota tal-PND) |              |     |     |     |     |
| Piż tal-frieħ fil-jum 4 (medja)                                                                                 |              |     |     |     |     |
| Piż tal-frieħ fil-jum 13 (medja)                                                                                |              |     |     |     |     |

---

<sup>(1)</sup> l-ahħar jum tal-perjodu ta' tghammir

|                                                                                     |  |  |  |  |  |
|-------------------------------------------------------------------------------------|--|--|--|--|--|
| Żamma tal-beżżula tal-frieh irġiel fil-jum 13 (medja)                               |  |  |  |  |  |
| <b>FRIEH ANORMALI</b>                                                               |  |  |  |  |  |
| Ommijiet b'0                                                                        |  |  |  |  |  |
| Ommijiet b'1                                                                        |  |  |  |  |  |
| Ommijiet b'≥ 2                                                                      |  |  |  |  |  |
| <b>TELF TAL-ULIED</b>                                                               |  |  |  |  |  |
| <b>Impjantazzjonijiet qabel it-twelid (impjantazzjonijiet nieqes it-twelid haj)</b> |  |  |  |  |  |
| Nisa b'0                                                                            |  |  |  |  |  |
| Nisa b'1                                                                            |  |  |  |  |  |
| Nisa b'2                                                                            |  |  |  |  |  |
| Nisa b'≥ 3                                                                          |  |  |  |  |  |
| <b>Wara t-twelid (twelid haj nieqes il-hajjin fil-jum 13 wara t-twelid)</b>         |  |  |  |  |  |
| Nisa b'0                                                                            |  |  |  |  |  |
| Nisa b'1                                                                            |  |  |  |  |  |
| Nisa b'2                                                                            |  |  |  |  |  |
| Nisa b'≥ 3                                                                          |  |  |  |  |  |

## B.65 METODU TA' TTESTJAR *IN VITRO* TAL-BARRIERA TAL-MEMBRANA GĦALL-KORRUŻJONI TAL-ĠILDA

### INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar hu ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 435 tal-OECD (2015). Il-korrużjoni tal-ġilda tirreferi għall-produzzjoni ta' ħsara irreversibbli għall-ġilda li tidher bħala nekrozi vizibbli permezz tal-epidermis u fid-dermis, wara l-applikazzjoni ta' sustanza kimika tat-test kif definita mis-Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi (GHS) tan-Nazzjonijiet Uniti (NU) (1) u mir-Regolament tal-Unjoni Ewropea (UE) 1272/2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet (CLP)<sup>1</sup> Dan il-metodu ta' ttestjar, ekwivalenti għal-linja gwida aġġornata 435 tal-OECD jipprovdi metodu ta' ttestjar tal-barriera tal-membrana *in vitro* li jista' jintuża biex jiġu identifikati sustanzi kimiċi korrużivi. Il-metodu ta' ttestjar juża membrana artifiċjali mfassla biex twieġeb għal sustanzi kimiċi korrużivi b'mod simili għall-ġilda tal-annimali *in situ*.
2. Il-korrużività tal-ġilda tradizzjonalment giet ivvalutata billi tiġi applikata s-sustanza kimika tat-test għall-ġilda tal-annimali ħajjin u tiġi vvalutata l-firxa tal-ħsara fit-tessut wara perjodu fiss ta' żmien (2). Minbarra dan il-metodu ta' ttestjar, ġew adottati diversi metodi ta' ttestjar *in vitro* oħra bħala alternattivi (3)(4) għall-proċedura standard tal-ġilda tal-fniek *in vivo* (Kapitolu B.4 ta' dan l-Anness, ekwivalenti għat-TG 404 tal-OECD) użati biex jiġu identifikati sustanzi kimiċi korrużivi (2). L-istrateġija ta' ttestjar u ta' evalwazzjoni mqassma fuq saffi tal-GHS tan-NU għall-valutazzjoni u għall-klassifikazzjoni tal-korrużività tal-ġilda u d-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar Approċċi Integrati għall-Ittestjar u għall-Valutazzjoni (IATA) għall-Irritazzjoni/Korrużjoni tal-Ġilda jirrakkomandaw l-użu ta' metodi ta' ttestjar *in vitro* validati u aċċettati skont il-moduli 3 u 4 (1)(5). L-IATA jiddeskrivi diversi moduli li jiġbru fihom sorsi ta' informazzjoni u għodod ta' valutazzjoni, u jipprovdi gwida dwar (i) kif tintegra u tuża *data* eżistenti tat-testijiet u mhux tat-testijiet għall-valutazzjoni tal-potenzjali ta' irritazzjoni tal-ġilda u ta' korrużjoni tal-ġilda tas-sustanzi kimiċi u (ii) jipproponi approċċ fejn ikun meħtieġ ittestjar ulterjuri, inkluż meta jinstabu riżultati negattivi (5). F'dan l-approċċ

---

<sup>1</sup> Ir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tas-16 ta' Diċembru 2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet, li jemenda u jħassar id-Direttivi 67/548/KEE u 1999/45/KE, u li jemenda r-Regolament (KE) Nru 1907/2006, ĠU L 353/1, 31.12.2008



modulari, ir-riżultati pozittivi mill-metodi ta' ttestjar *in vitro* jistgħu jintużaw biex sustanza kimika tiġi klassifikata bħala korrużiva mingħajr il-ħtieġa ta' ttestjar fuq l-annimali, u b'hekk jitnaqqas u jiġi rfinat l-użu ta' annimali u jiġu evitati l-uġiġh u t-tbatija li jistgħu jseħħu jekk l-annimali jintużaw għal dan l-għan.

3. Tlestew studji ta' validazzjoni għall-mudell tal-barriera tal-membrana *in vitro* kummerċjalment disponibbli bħal Corrositex® (6)(7)(8), li wrew preċiżjoni ġenerali fit-tbassir tal-korrużività tal-ġilda ta' 79 % (128/163), sensitività ta' 85 % (76/89), u speċifità ta' 70 % (52/74) għal bażi ta' *data* ta' 163 sustanza u taħlita (7). Fuq il-bażi tal-validità rikonnoxxuta tiegħu, dan il-metodu ta' riferiment validat (VRM) ġie rakkomandat biex jintuża bħala parti minn strateġija ta' ttestjar imqassma fuq saffi għall-valutazzjoni tal-potenzjal ta' periklu ta' korrużjoni dermali tas-sustanzi kimiċi (5)(7). Qabel ma mudell ta' barriera tal-membra *in vitro* għall-korrużjoni tal-ġilda jkun jista' jintuża għall-finijiet regolatorji, l-ewwel għandhom jiġu determinati l-affidabbiltà, ir-rilevanza (preċiżjoni), u l-limitazzjonijiet tiegħu biex jiġi żgurat li jkun simili għal dak tal-VRM (9), f'konformità mal-istandards predefiniti tal-prestazzjoni (PS) (10). L-Aċċettazzjoni Reċiproka tad-*Data* tal-OECD tiġi garantita biss wara li kwalunkwe metodu propost ġdid jew aġġornat wara l-PS ikun ġie rieżaminat u inkluż fil-linja gwida tat-test ekwivalenti tal-OECD. Bhalissa, metodu *in vitro* wieħed biss hu kopert mil-linja gwida tat-test 435 tal-OECD u dan il-metodu ta' ttestjar, il-mudell disponibbli kummerċjalment Corrositex®.
4. Metodi ta' ttestjar oħra għall-ittestjar tal-korrużività tal-ġilda huma bbażati fuq l-użu ta' ġilda umana rikostitwita (TG 431 tal-OECD) (3) u ta' ġilda ta' firien iżolati (TG 430 tal-OECD) (4). Din il-Linja Gwida tat-Test ttipprovdi wkoll għas-subkategorizzazzjoni ta' sustanzi kimiċi korrużivi fit-tliet Subkategoriji tal-GHS tan-NU ta' korrużività u t-tliet Gruppi ta' Imballaġġ tat-Trasport tan-NU għall-periklu ta' korrużività. Din il-Linja Gwida tat-Test oriġinarjament ġiet adottata fl-2006 u aġġornata fl-2015 biex tirreferi għad-dokument ta' gwida tal-IATA u tiġi aġġornata l-lista ta' sustanzi ta' profiċjenza.

## **DEFINIZZJONIJIET**

5. Id-definizzjonijiet użati huma pprovduti fl-Appendiċi.

## **KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET**

6. It-test deskritt f'dan il-metodu ta' ttestjar jippermetti l-identifikazzjoni ta' sustanzi kimiċi tat-test korrużivi u jippermetti s-subkategorizzazzjoni ta' sustanzi kimiċi tat-test korrużivi skont il-GHS tan-NU/is-CLP (Tabella 1). Barra minn hekk, metodu ta' ttestjar b'hal dan jista' jintuża biex jittieħdu deċiżjonijiet dwar il-korrużività u n-nuqqas ta' korrużività ta' klassijiet speċifiċi ta' sustanzi kimiċi, eż. l-aċidi organiċi u inorganiċi, id-derivati tal-aċidi<sup>1</sup>, u bażijiet għal ċerti finijiet ta' ttestjar tat-trasport (7)(11)(12). Dan il-metodu ta' ttestjar jiddeskrivi proċedura ġenerika simili għall-metodu ta' ttestjar ta' riferiment validat (7). Filwaqt li dan il-metodu ta' ttestjar ma jipprovdi informazzjoni adegwata dwar l-irritazzjoni tal-ġilda, ta' min jinnota li t-TM B.46 (ekwivalenti għat-TG 439 tal-OECD) jindirizza b'mod speċifiku l-irritazzjoni tal-ġilda *in vitro* b'effett fuq is-sahha (13). Għal evalwazzjoni shiħa tal-effetti lokali fuq il-ġilda wara esponiment dermal wiehied, għandu jiġi kkonsultat id-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar l-Approċċi Integrati għall-Valutazzjoni tal-Ittestjar (5).

**Tabella 1:** Il-Kategorija u s-Subkategoriji ta' Korrużivi tal-Ġilda tal-GHS tan-NU (1)

| Kategorija tal-Korrużiv (kategorija 1)<br>(għall-awtoritajiet li ma jużawx is-subkategoriji) | Subkategoriji Potenzjali tal-Korrużiv <sup>2</sup><br>(għall-awtoritajiet li jużaw is-subkategoriji, inkluż ir-Regolament CLP) | Korrużiv f' $\geq$ animal (1) minn 3  |                   |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|-------------------|
|                                                                                              |                                                                                                                                | Esponiment                            | Osservazzjoni     |
| Korrużiv                                                                                     | Subkategorija 1A tal-korrużivi                                                                                                 | $\leq 3$ minuti                       | $\leq$ Siegħa (1) |
|                                                                                              | Subkategorija 1B tal-korrużivi                                                                                                 | $> 3$ minuti / $\leq$ siegħa (1)      | $\leq 14$ -il jum |
|                                                                                              | Subkategorija 1C tal-korrużivi                                                                                                 | $> \text{siegħa (1)} / \leq 4$ sigħat | $\leq 14$ -il jum |

7. Limitazzjoni tal-metodu ta' riferiment validat (7) hi li hafna sustanzi kimiċi mhux korrużivi u xi sustanzi kimiċi korrużivi jaf ma jikkwalifikawx għall-ittestjar, fuq il-bażi

<sup>1</sup> "Derivattivi tal-aċidu" hu dezinjazzjoni ta' klassi mhux speċifika u hu definit b'mod wiesa' b'hal aċidu prodott minn sustanza kimika b'mod dirett jew inkella b'modifika jew b'sostituzzjoni parzjali. Din il-klassi tinkludi anidridi, aċidi halo, imluħ, u tipi oħra ta' sustanzi kimiċi.

<sup>2</sup> Għall-UE, ir-Regolament tas-CLP japplika t-tliet subkategoriji 1A, 1B u 1C tal-korrużjoni tal-ġilda.

tar-rizultati tat-test tal-kompatibbiltà inizjali (ara l-paragrafu 13). Sustanzi kimiċi milwiema b'pH fil-medda ta' 4,5 sa 8,5 spiss ma jikkwalifikawx għall-ittestjar; madankollu, 85 % tas-sustanzi kimiċi ttestjati f'din il-medda ta' pH ma kinux korrużivi fit-testijiet fuq l-annimali (7). Il-metodu tal-barriera tal-membrana *in vitro* jista' jintuża biex jiġu ttestjati is-solidi (solubbli jew insolubbli fl-ilma), il-likwidi (milwiema jew mhux milwiema), u l-emulsjonijiet. Madankollu, is-sustanzi kimiċi tat-test li ma jikkawżawx tibdil individwabbli fit-test tal-kompatibbiltà (jiġifieri tibdil fil-kulur fis-Sistema ta' Detezzjoni tas-Sustanzi Kimiċi (CDS) tal-metodu ta' ttestjar ta' riferiment validat) ma jistgħux jiġu ttestjati bil-metodu tal-barriera tal-membrana u għandhom jiġu ttestjati bl-użu ta' metodi ta' ttestjar oħra.

## PRINĊIPJU TAT-TEST

8. Is-sistema tat-test tinkludi żewġ komponenti: bijobarriera makromolekolari sintetika u sistema ta' identifikazzjoni tas-sustanza kimika (CDS); dan il-metodu ta' ttestjar jindivida permezz tal-barriera tal-membrana tas-CDS il-ħsara kkawżata mis-sustanzi kimiċi tat-test korrużivi wara l-applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fuq is-superfiċje tal-barriera tal-membrana makromolekolari sintetika (7), probabbilment bl-istess mekkanizmu/i ta' korrużjoni li jopera(w) fuq il-gilda ħajja.
9. Il-penetrazzjoni tal-barriera tal-membrana (jew l-infid) tista' titkejjel b'numru ta' proċeduri jew b'CSD, inkluż tibdil fil-kulur ta' kulur tal-indikatur tal-pH jew f'xi proprjetà oħra tas-soluzzjoni indikatur taħt il-barriera.
10. Il-barriera tal-membrana għandha tkun determinata bħala valida, jiġifieri rilevanti u affidabbli, għall-użu maħsub tagħha. Dan jinkludi l-żgurar li l-preparati differenti jkunu konsistenti fir-rigward tal-proprjetajiet tal-barriera, eż. kapaċi jżommu barriera għal sustanzi mhux korrużivi, kapaċi jikkategorizzaw il-proprjetajiet korrużivi tas-sustanzi kimiċi fost id-diversi Subkategoriji ta' korrużività tal-GHS tan-NU (1). Il-klassifikazzjoni assenjata hi bbażata fuq iż-żmien meħud biex sustanza kimika tippenetra minn għol-barriera tal-membrana sas-soluzzjoni indikatur.

## WIRI TAL-PROFIĊJENZA

11. Qabel l-użu ta' rutina tal-metodu tal-barriera tal-membrana *in vitro*, li jaderixxi ma' dan il-metodu ta' ttestjar, il-laboratorji għandhom juru profiċjenza teknika billi jikklassifikaw kif suppost tmax-il Sustanza ta' Profiċjenza rakkomandati fit-Tabella 1. F'sitwazzjonijiet li fihom sustanza elenkata ma tkunx disponibbli jew, fejn ġustifikabbli, tista' tintuża sustanza oħra li għaliha jkun hemm *data* ta' riferiment adegwata *in vivo* u *in vitro* (eż. mil-lista ta'

sustanzi kimiċi ta' riferiment (10)) dment li ma jiġux applikati l-istess kriterji tal-ġhażla bħal daww deskritti fit-Tabella 1.

**Tabella 2:** Sustanzi ta' Profiċjenza<sup>1</sup>

| Sustanza <sup>2</sup>             | CASRN      | Klassi Kimika                   | Subkategorija<br><i>In Vivo</i> tal-GHS tan-NU <sup>3</sup> | Subkategorija<br><i>In Vitro</i> tal-GHS tan-NU <sup>3</sup> |
|-----------------------------------|------------|---------------------------------|-------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| Diidrat tat-trifluworur tal-Boron | 13319-75-0 | Aċidi inorganici                | 1A                                                          | 1A                                                           |
| Aċidu nitriku                     | 7697-37-2  | Aċidi inorganici                | 1A                                                          | 1A                                                           |
| Pentaklorur tal-fosfru            | 10026-13-8 | Prekursuri tal-aċidi inorganici | 1A                                                          | 1A                                                           |
| Klorur tal-valeril                | 638-29-9   | Kloruri tal-aċidu               | 1B)                                                         | 1B)                                                          |
| Idrossidu tas-Sodju               | 1310-73-2  | Bażijiet inorganici             | 1B)                                                         | 1B)                                                          |
| 1-(2-Aminoetil) piperazina        | 140-31-8   | Ammini alifatici                | 1B)                                                         | 1B)                                                          |
| Klorur tal-benzensulfonil         | 98-09-9    | Kloruri tal-aċidu               | 1C                                                          | 1C                                                           |
| N,N-Dimetil benzilamina           | 103-83-3   | Anilini                         | 1C                                                          | 1C                                                           |
| Tetraetilenpentamina              | 112-57-2   | Ammini alifatici                | 1C                                                          | 1C                                                           |
| Eugenol                           | 97-53-0    | Fenoli                          | NC                                                          | NC                                                           |
| Nonil akrilat                     | 2664-55-3  | Akrilati/metakrilati            | NC                                                          | NC                                                           |
| Bikarbonat tas-sodju              | 144-55-8   | Imluħ inorganici                | NC                                                          | NC                                                           |

<sup>1</sup>It-12-il sustanza elenkati hawn fuq fihom tliet sustanzi minn kull waħda mit-tliet subkategoriji tal-GHS tan-NU għal sustanzi korrużivi u tliet sustanzi mhux korrużivi, huma disponibbli minnufih minghand fornituri kummerċjali, u s-subkategorija tal-GHS tan-NU hi bbażata fuq ir-riżultati ta' ttestjar *in vivo* ta' kwalità għolja. Dawn is-sustanzi huma meħuda mil-lista ta' 40 sustanza ta' riferiment li huma inklużi fil-lista minima ta' sustanzi kimiċi identifikati għall-wiri tal-preċiżjoni u tal-affidabbiltà tal-metodi ta' ttestjar li huma strutturalment u funzjonalment simili għall-metodu ta' ttestjar ta' riferiment validat, u ntgħażlu mill-163 sustanza kimika ta' riferiment li oriġinarjament intużaw biex jiġi vvalidat il-metodu ta' ttestjar ta' riferiment (Corrositex<sup>®</sup>) (7) (10) (14). L-għan ta' dan il-proċess tal-ġhażla kien li jinkludi, sa fejn possibbli, sustanzi kimiċi li: kienu rappreżentattivi tal-firxa ta' risponsi tal-korrużività (eż. nonkorrużivi; Korrużivi tal-Gruppi tal-Imballaġġ I, II, u III tan-NU) li l-metodu ta' ttestjar ta' riferiment validat kapaċi jkejjel jew ibassar; kienu rappreżentattivi tal-klassijiet kimiċi użati matul il-proċess ta' validazzjoni; għandhom strutturi kimiċi li kienu definiti sew; induċew riżultati riproduċibbli fil-metodu ta' ttestjar ta' riferiment validat; induċew riżultati definittivi fit-test ta' riferiment *in vivo*; kienu kummerċjament disponibbli; u ma kinux assoċjati ma' spejjeż projbittivi tar-rimi (14).

<sup>2</sup>Sustanzi ttestjati puri jew b'purità ta'  $\geq 90\%$

<sup>3</sup>Il-gruppi ta' Imballaġġ korrispondenti tan-NU huma I, II u III, rispettivament, għas-Subkategoriji 1A, 1B u 1C tal-GHS tan-NU. NC; Mhux korrużivi.

## PROCEDURA

12. Il-paragrafi li ġejjin jiddeskrivu l-komponenti u l-proċeduri ta' metodu ta' ttestjar tal-barriera tal-membrana artifiċjali għall-valutazzjoni tal-korrużività (7)(15), fuq il-bażi tal-VRM kurrenti, jiġifieri l-Corrositex<sup>®</sup> kummerċjalment disponibbli. Il-barriera tal-membrana u l-kompatibbiltà/l-indikatur u s-soluzzjonijiet ta' kategorizzazzjoni jistgħu jinbnew, jithejjew jew jinkisbu kummerċjalment bħal fil-każ tal-VRM Corrositex<sup>®</sup>. Hu disponibbli protokoll kampjun tal-metodu ta' ttestjar għall-metodu ta' ttestjar ta' riferiment validat (7). L-ittestjar għandu jsir f'temperatura ambjentali (17-25°C) u l-komponenti għandhom jikkonformaw mal-kundizzjonijiet li ġejjin.

### Test tal-Kompatibbiltà tas-Sustanza Kimika tat-Test

13. Qabel it-twettiq tat-test tal-barriera tal-membrana, isir test tal-kompatibbiltà biex jiġi determinat jekk is-sustanza kimika tat-test hix individwabbli mis-CDS. Jekk is-CDS ma tindividwax is-sustanza kimika tat-test, il-metodu ta' ttestjar tal-barriera tal-membrana ma jkunx xieraq għall-evalwazzjoni tal-korrużività potenzjali ta' dik is-sustanza kimika tat-test partikolari u għandu jintuża metodu ta' ttestjar differenti. Is-CDS u l-kundizzjonijiet ta' esponiment użati għat-test tal-kompatibbiltà għandhom jirriflettu l-esponiment fit-test tal-barriera tal-membrana sussegwenti.

### Test tal-Kategorija tal-Iskala ta' Żmien tas-Sustanza Kimika tat-Test

14. Jekk dan ikun xieraq għall-metodu ta' ttestjar, sustanza kimika tat-test li tkun ġiet kwalifikata mit-test tal-kompatibbiltà għandha tkun soġġetta għal test tal-kategorija tal-iskala ta' żmien, jiġifieri test ta' skrinjar biex issir distinzjoni bejn aċidi jew bażijiet dgħajfa u b'saħħithom. Pereżempju, fil-metodu ta' ttestjar ta' riferiment validat, test ta' kategorizzazzjoni tal-iskala ta' żmien jintuża biex jindika liema miż-żewġ skali ta' żmien għandha tintuża fuq il-bażi ta' jekk tigix individwata riserva aċida jew alkalina sinifikanti. Żewġ skali ta' żmien tal-infid differenti għandhom jintużaw għad-determinazzjoni tal-korrużività u tas-Subkategorija tal-korrużività tal-gilda tal-GHS tan-NU, fuq il-bażi tar-riserva aċida jew alkalina tas-sustanza kimika tat-test.

## KOMPONENTI TAL-METODU TA' TTESTJAR TAL-BARRIERA TAL-MEMBRANA

### Barriera tal-Membrana

15. Il-barriera tal-membrana tikkonsisti f'żewġ komponenti: gel milwiem makromolekolari proteiniku u membrana ta' sostenn permeabbli. Il-gel proteiniku għandu jkun impermeabbli għal-likwidi u għas-solidi iżda jista' jgarrab korrużjoni u jsir permeabbli. Il-barriera tal-membrana mibnija bis-shiħ għandha tinhażen f'kundizzjonijiet predeterminati

muriġa li jipprekludu deterjorament tal-ġel, *eż.* tnixxif, tkabbir mikrobjali, qlib, qsim, li jkunu jiddegradaw il-prestazzjoni tiegħu. Il-perjodu ta' ħzin aċċettabbli għandu jkun determinat u l-preparati tal-barriera tal-membrana ma għandhomx jintużaw wara dak il-perjodu.

16. Il-membrana ta' sostenn permeabbli tipprovdi appoġġ mekkaniku lill-ġel proteiniku matul il-proċess ta' fformar tal-ġel u l-esponiment għas-sustanza kimika tat-test. Il-membrana ta' sostenn għandha tipprevjeni d-dendil jew il-qlib tal-ġel u għandha tkun permeabbli minnufih għas-sustanzi kimiċi tat-test kollha.
17. Il-ġel proteiniku, kompost minn proteina, *eż.* keratina, kollagen, jew tahlitiet ta' proteini, li jiffirmaw matriċi tal-ġel, iservi bħala l-mira għas-sustanza kimika tat-test. Il-materjal proteiniku jitqiegħed fuq is-superfiċje tal-membrana ta' sostenn u jithalla jiffirma ġel qabel ma l-barriera tal-membrana titqiegħed fuq is-soluzzjoni indikatur. Il-ġel proteiniku għandu jkun ta' ħxuna u densità ugwali kullimkien, u mingħajr bzieżaq tal-arja jew difetti li jistgħu jaffettwaw l-integrità funzjonali tiegħu.

#### **Sistema ta' Detezzjoni tas-Sustanza Kimika (CDS)**

18. Is-soluzzjoni indikatur, li hi l-istess soluzzjoni użata għat-test tal-kompatibbiltà, għandha twieġeb għall-preżenza ta' sustanza kimika tat-test. Għandhom jintużaw kolorant indikatur tal-pH jew tahlita ta' koloranti, *eż.* aħmar kreżol u orangjo metil li juru tibdil fil-kulur, bħala tweġiba għall-preżenza tas-sustanza kimika tat-test. Is-sistema tal-kejl tista' tkun viżwali jew elettronika.
19. Is-sistemi ta' detezzjoni li huma żviluppatti għad-detezzjoni tal-passaġġ tas-sustanza kimika tat-test mill-membrana barriera għandhom jiġu vvalutati għar-rilevanza u għall-affidabbiltà tagħhom biex tintwera l-firxa ta' sustanzi kimiċi li jistgħu jiġu individwati u l-limiti kwantitattivi ta' detezzjoni.

#### **TWETTIQ TAT-TEST**

##### **Assemblaġġ tal-Komponenti tal-Metodu ta' Ttestjar**

20. Il-barriera tal-membrana titqiegħed f'kunjett (jew tubu) li fih is-soluzzjoni indikatur biex il-membrana ta' sostenn tkun f'kontatt shiħ mas-soluzzjoni indikatur u mingħajr ebda buzzieqa tal-arja preżenti. Għandha tingħata attenzjoni biex jiġi żgurat li tinżamm l-integrità tal-barriera.

##### **Applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test**

21. Ammont xiearq tas-sustanza kimika tat-test, *eż.* 500  $\mu$ l ta' likwidu jew 500 mg ta' solidu mithun fin (7), jitqieghed bil-galbu f'saffi fuq is-superficije superjuri tal-barriera tal-membrana u jitqassam b'mod ugwali. Numru xiearq ta' repliki, *eż.* erba' (7), jithejja ghal kull sustanza kimika tat-test u għall-kontrolli korrispondenti tagħha (ara l-paragrafi 23 sa 25). Jiġi rreġistrat il-hin tal-applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fuq il-barriera tal-membrana. Biex jiġi żgurat li l-hinijiet ta' korrużjoni qosra jiġu registrati bi preċiżjoni, il-hinijiet tal-applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fuq il-kunjetti tar-repliki jitqassmu fi stadji.

### **Kejl tal-Penetrazzjonijiet tal-Barriera tal-Membrana**

22. Kull kunjett jiġi ssorveljat kif xiearq u l-hin tal-ewwel tibdil fis-soluzzjoni indikatur, jiġifieri l-penetrazzjoni tal-barriera, jiġi rreġistrat, u jiġi determinat il-hin li jgħaddi bejn l-applikazzjoni u l-penetrazzjoni tal-barriera tal-membrana.

### **Kontrolli**

23. F'testijiet li jinvolvu l-użu ta' veikolu jew ta' solvent bis-sustanza kimika tat-test, il-veikolu jew is-solvent għandhom ikunu kompatibbli mas-sistema tal-barriera tal-membrana, jiġifieri ma jbidlux l-integrità tas-sistema tal-barriera tal-membrana, u ma għandhomx ibiddu l-korrużività tas-sustanza kimika tat-test. Meta applikabbli, kontroll bis-solvent (jew veikolu) għandu jiġi ttestjat fl-istess hin mas-sustanza kimika tat-test biex tintwera l-kompatibbiltà tas-solvent mas-sistema tal-barriera tal-membrana.
24. Kontroll (korrużiv) pożittiv b'attività ta' korrużività immedjata, *eż.*  $110 \pm 15$  mg idrossidu tas-sodju (Subkategorija Korrużiva 1B tal-GHS tan-NU) (7), għandu jiġi ttestjat fl-istess hin mas-sustanza kimika tat-test biex jiġi vvalutat jekk is-sistema tat-test hix qed taħdem b'mod aċċettabbli. It-tieni kontroll pożittiv li jkun tal-istess klassi ta' sustanzi kimiċi bħas-sustanza kimika tat-test jista' jkun siewi għall-evalwazzjoni tal-potenzjal ta' korrużività relattiv ta' sustanza kimika tat-test korrużiva. Għandu/għandhom jintuża(w) kontroll(i) pożittiv(i) li jkun(u) intermedjarji fil-korrużività tiegħu/tagħhom (*eż.* is-Subkategorija 1B tal-GHS tan-NU) biex jiġu individwati tibdiliet fil-hin tal-penetrazzjoni li jistgħu jkunu itwal jew iqsar b'mod inaċċettabbli mill-valur referenzjarju stabbilit, li tkun indikazzjoni li s-sistema tat-test mhix qed taħdem kif suppost. Għal dan l-għan, sustanzi kimiċi estremament korrużivi (Subkategorija 1A tal-GHS tan-NU) jew mhux korrużivi ftit li xejn ikunu utli. Sustanza kimika tas-Subkategorija korrużiva 1B tal-GHS tan-NU tkun tippermetti d-detezzjoni ta' hin ta' penetrazzjoni rapidu wisq jew bil-mod wisq. Korrużiv dgħajfef (Subkategorija 1C tal-GHS tan-NU) jista' jintuża bħala kontroll pożittiv biex titkejjel il-ħila tal-metodu ta' ttestjar li jiddistingwi b'mod konsistenti bejn sustanzi kimiċi ftit li xejn korrużivi u dawk mhux korrużivi. Indipendentement mill-approċċ użat, għandha tiġi żviluppata medda ta' rispons tal-kontroll pożittiv aċċettabbli fuq il-bażi tal-medda

storika tal-hinijiet ta' penetrazzjoni għall-kontroll(i) pożittiv(i) użat(i), bħal  $\pm 2-3$  devjazzjonijiet standard medji. F'kull studju, il-hin eżatt tal-penetrazzjoni għandu jiġi determinat għall-kontroll pożittiv biex ikunu jistgħu jiġu individwati d-devjazzjonijiet barra l-medda aċċettabbli.

25. Kontroll negattiv (mhux korrużiv), eż. 10 % aċidu ċitriku, 6 % aċidu propjoniku (7), ukoll għandu jiġi ttestjat fl-istess hin mas-sustanza kimika tat-test bħala kejl iehor tal-kontroll tal-kwalità biex tintwera l-integrità funzjonali tal-barriera tal-membrana.

### **Kriterji ta' Aċċettabbiltà tal-Istudju**

26. Skont il-parametri tal-hin stabbiliti għal kull waħda mis-Subkategoriji tal-korrużività tal-GHS tan-NU, il-hin (f' minuti) li jgħaddu bejn l-applikazzjoni ta' sustanza kimika tat-test għall-barriera tal-membrana u l-penetrazzjoni tal-barriera jintuża biex titbassar il-korrużività tas-sustanza kimika tat-test. Biex studju jitqies aċċettabbli, il-kontroll pożittiv konkorrenti għandu jagħti l-hin ta' rispons tal-penetrazzjoni mistenni (eż. hin ta' penetrazzjoni ta' 8-16-il min għall-idrossidu tas-sodju jekk jintuża bħala kontroll pożittiv), il-kontroll negattiv konkorrenti ma għandux ikun korrużiv, u, meta jkun inkluż, il-kontroll bis-solvent konkorrenti la għandu jkun korrużiv u lanqas ma għandu jbidel il-potenzjal ta' korrużività tas-sustanza kimika tat-test. Qabel ma jużaw b'mod sistematiku xi metodu li jkun konformi ma' dan il-metodu ta' ttestjar, il-laboratorji għandhom juru l-profiċjenza teknika tagħhom, billi jużaw it-12-il sustanza rrakkomandata fit-Tabella 2. Għal metodi ġodda "me-too" żviluppati fl-ambitu ta' dan il-metodu ta' ttestjar li jkunu strutturalment u funzjonalment simili għall-metodu ta' riferiment validat (14), għandhom jintużaw l-istandards tal-prestazzjoni predefiniti biex jintwerew l-affidabbiltà u l-preċiżjoni tal-metodu l-ġdid qabel l-użu tiegħu għall-ittestjar regolatorju (10).

### **Interpretazzjoni tar-Riżultati u tal-Klassifikazzjoni tal-Korrużività tas-Sustanzi Kimiċi tat-Test**

27. Il-hin (f' minuti) li jgħaddi bejn l-applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test għall-barriera tal-membrana u l-penetrazzjoni tal-barriera jintuża biex is-sustanza kimika tat-test tiġi klassifikata f'termini tas-Subkategoriji korrużivi tal-GHS tan-NU (1) u, jekk applikabbli, tal-Grupp tal-Imballaġġ tan-NU (16). Il-valuri tal-hin ta' limitu għal kull waħda mit-tliet subkategoriji korrużivi huma stabbiliti għal kull metodu ta' ttestjar propost. Id-deċiżjonijiet finali dwar il-hinijiet ta' limitu għandhom jikkunsidraw il-htieġa li tiġi minimizzata s-sottoklassifikazzjoni tal-periklu korrużiv (jiġifieri negattivi foloz). Fil-linja gwida tat-test preżenti, għandhom jintużaw il-hinijiet ta' limitu ta' Corrositex® kif deskritti fit-tabella 3 peress li dan jirrappreżenta l-uniku metodu ta' ttestjar li bħalissa jaqa' fi hdan il-linja gwida tat-test (7).



**Tabella 3:** Mudell ta' tbassir Corrositex®

| Hin medju tal-penetrazzjoni (min.)                                                                                |                                                                                                                | Tbassir tal-GHS tan-NU <sup>3</sup>                      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| Sustanzi kimiċi tat-test tal-kategorija 1 <sup>1</sup><br>(determinati mit-test ta' kategorizzazzjoni tal-metodu) | Sustanzi kimiċi tat-test tal-kategorija 2 <sup>2</sup> (determinati mit-test ta' kategorizzazzjoni tal-metodu) |                                                          |
| 0-3 min.                                                                                                          | 0-3 min.                                                                                                       | <b>Korrużivi</b><br><b>Subkategorija fakultattiva 1A</b> |
| > 3 sa 60 min.                                                                                                    | > 3 sa 30 min.                                                                                                 | <b>Korrużivi</b><br><b>Subkategorija fakultattiva 1B</b> |
| > 60 sa 240 min.                                                                                                  | > 30 sa 60 min.                                                                                                | <b>Korrużivi</b><br><b>Subkategorija fakultattiva 1C</b> |
| > 240 min.                                                                                                        | > 60 min.                                                                                                      | <b>Mhux korrużivi</b>                                    |

<sup>1</sup> Sustanzi kimiċi tat-test b'riserva aċida/alkalina għolja (6)

<sup>2</sup> Sustanzi kimiċi tat-test b'riserva aċida/alkalina baxxa (6)

<sup>3</sup> Is-subkategoriji 1A, 1B u 1C tal-GHS tan-NU jikkorrispondu għall-gruppi tal-imballaġġ I, II u III tan-NU rispettivament

## DATA U RAPPORTAR

### Data

28. Il-ħin (f'minuti) li jgħaddi bejn l-applikazzjoni u l-penetrazzjoni tal-barriera għas-sustanza kimika tat-test u l-kontroll(i) pożittiv(i) għandu jiġi rapportat f'forma tabulari bħala *data* dwar ir-replikati individwali, kif ukoll ifisser id-devjazzjoni standard  $\pm$  għal kull prova.

### Rapport tat-Test

29. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

#### *Sustanza Kimika tat-Test u Sustanzi tal-Kontroll:*

- Sustanza monokostitwenti: l-identifikazzjoni kimika, bħall-isem IUPAC jew CAS, in-numru CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ;

- Sustanza multikostitwenti, UVCB u tahlita: ikkaratterizzati sa fejn possibbli mill-identità kimika (ara aktar 'il fuq), l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fizikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti;
- id-dehra fizika, is-solubbiltà fl-ilma, u l-proprjetajiet fizikokimiċi rilevanti addizzjonali;
- Is-sors, in-numru tal-lott jekk disponibbli;
- It-trattament tas-sustanza kimika tat-test/tas-sustanza tal-kontroll qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (eż., it-tishin, it-thin);
- L-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test, id-data ta' limitu għall-użu, jew id-data għall-analiżi mill-ġdid, jekk magħrufa;
- Il-kundizzjonijiet tal-ħżin.

*Veikolu:*

- L-identifikazzjoni, il-konċentrazzjoni (fejn xieraq), il-volum użat;
- Il-ġustifikazzjoni għall-għażla tal-veikolu.

*Il-mudell u l-protokoll tal-barriera tal-membrana in vitro użati, inklużi l-preċiżjoni u l-affidabbiltà murija*

*Kundizzjonijiet tat-Test:*

- Deskrizzjoni tal-apparat u tal-proċeduri ta' thejjija użati;
- Sors u kompożizzjoni tal-barriera tal-membrana *in vitro* użati;
- Kompożizzjoni u proprjetajiet tas-soluzzjoni indikatur;
- Metodu ta' detezzjoni;
- Ammonti tas-sustanza kimika tat-test u sustanzi tal-kontroll;
- Numru ta' repliki;
- Deskrizzjoni u ġustifikazzjoni għat-test ta' kategorizzazzjoni tal-iskala ta' żmien;
- Metodu tal-applikazzjoni;
- Ħinijiet ta' osservazzjoni.

- Deskrizzjoni tal-kriterji ta' evalwazzjoni u ta' klassifikazzjoni applikati;
- Wiri ta' profiċjenza fit-twettiq tal-metodu ta' ttestjar qabel użu ta' rutina bl-ittestjar tas-sustanzi kimiċi ta' profiċjenza.

#### *Ir-riżultati:*

- Tabulazzjoni tad-*data* mhux proċessata individwali mit-test u mill-kampjuni tal-kontroll individwali għal kull replikat;
- Deskrizzjonijiet ta' effetti oħra osservati;
- Il-klassifikazzjoni derivata b'referenza għall-mudell ta' tbassir/għall-kriterji tad-deċiżjoni użati.

#### *Diskussjoni tar-riżultati*

#### *Konklużjonijiet*

## DOKUMENTAZZJONI

- (1) In-Nazzjonijiet Uniti (NU) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), First Revised Edition, UN New York u Ġinevra, 2013. Disponibbli fuq: [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) Il-Kapitolu B.4 ta' dan l-Anness, Irritazzjoni, Korrużjoni Dermal Akuta.
- (3) Il-Kapitolu B.40bis ta' dan l-Anness, Korrużjoni tal-ġilda *in vitro*: metodu ta' ttestjar tal-epidermis uman rikostitwit (RHE).
- (4) Il-Kapitolu .40 ta' dan l-Anness, Korrużjoni tal-Ġilda *In Vitro*: Ir-Reżistenza Elettrika Transkutanja (TER).
- (5) OECD (2015). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203). Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.
- (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. u 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. u 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. Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-

Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi. Disponibbli fuq:  
<http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/PerfStand-TG430-June14.pdf>.

- (11) ECVAM (2001). Dikjarazzjoni dwar l-Applikazzjoni tal-Assaġġ CORROSITEX® għall-Ittestjar tal-Korrużività tal-Ġilda. Il-15-il Laqgħa tal-Kumitat Konsultattiv Xjentifiku tal-ECVAM (ESAC), Ispra, l-Italja. ATLA 29, 96-97.
- (12) U.S. DOT (2002). Exemption DOT-E-10904 (Fifth Revision). (l-20 ta' Settembru 2002). Washington, D.C., U.S. DOT.
- (13) Kapitolu B.46 ta' dan l-Anness, Irritazzjoni tal-Ġilda *In Vitro*: Metodu ta' Ttestjar tal-Epidermis Uman Rikostitwit. ICCVAM (2004). ICCVAM Recommended Performance Standards for *In Vitro* Test Methods for Skin Corrosion. NIEHS, NIH Publication No 04-4510. Disponibbli fuq:  
[http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/dermal\\_docs/ps/ps044510.pdf](http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/dermal_docs/ps/ps044510.pdf).
- (14) U.S. EPA (1996). Method 1120, Dermal Corrosion. Disponibbli fuq:  
<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/1120.pdf>.
- (15) In-Nazzjonijiet Uniti (NU) (2013). UN Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Model Regulations, 18th Revised Edition (Parti, Kapitolu 2.8), UN, 2013. Disponibbli fuq:  
[http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/unrec/rev18/English/Rev18\\_Volume1\\_Part2.pdf](http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/unrec/rev18/English/Rev18_Volume1_Part2.pdf).

## Appendiċi

### DEFINIZZJONIJIET

**Akkuratezza:** Il-qrubija fil-livell ta' qbil bejn ir-riżultati tal-metodu ta' ttestjar u l-valuri referenzjarji aċċettati. Hi kejl tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar u wieħed mill-aspetti ta' rilevanza. Spiss it-terminu jintuża b'mod alternanti ma' 'konkordanza' sabiex ifisser il-proporzjon ta' riżultati korretti ta' metodu ta' ttestjar (9).

**Sustanza kimika:** Sustanza jew tahlita.

**Sistema ta' Detezzjoni tas-Sustanza Kimika (CDS):** Sistema ta' kejl viżwali jew elettronika b'soluzzjoni indikatur li twieġeb għall-preżenza ta' sustanza kimika tat-test, *eż.* b'tibdil f'kolorant indikatur tal-pH, jew f'tahlita ta' koloranti, li juru tibdil fil-kulur bħala tveġiba għall-preżenza tas-sustanza kimika tat-test jew b'tipi oħra ta' reazzjonijiet kimiċi jew elettrokimiċi.

**Konkordanza:** Dan hu kejl tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar għal metodi ta' ttestjar li jagħtu riżultat kategoriku, u hu aspett wieħed tar-rilevanza. It-terminu kultant jintuża b'mod interkambjabbli mal-akkuratezza, u hu definit bħala l-proporzjon tas-sustanzi kimiċi kollha ttestjati li jiġu klassifikati kif suppost bħala pożittivi jew negattivi. Il-konkordanza hi ferm dipendenti fuq il-prevalenza tal-pożittivi fit-tipi ta' sustanzi kimiċi tat-test li jkunu qed jiġu eżaminati (9).

**GHS (Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi):** Sistema li tipproponi l-klassifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi (sustanzi u tahlitiet) skont it-tipi u l-livelli standardizzati ta' perikli fiżiċi, sanitarji u ambjentali, u tindirizza l-elementi ta' komunikazzjoni korrispondenti, bħal pittogrammi, kliem ta' twissija, dikjarazzjonijiet ta' periklu, dikjarazzjonijiet ta' prekawzjoni u skedi ta' *data* dwar is-sikurezza, biex jitwassal tagħrif dwar l-effetti avversi bil-għan li n-nies ikunu protetti (inklużi min iħaddem, il-ħaddiema, it-trasportaturi, il-konsumaturi u min jintervjeni f'emergenza) u l-ambjent (1).

**IATA:** Approċċ Integrat għall-Ittestjar u għall-Valutazzjoni

**Tahlita:** Tahlita jew soluzzjoni msawra minn żewġ sustanzi jew aktar.

**Sustanza monokostitwenti:** Sustanza, definita mill-kompożizzjoni kwantitattiva tagħha, li fiha kostitwent ewlieni wieħed ikun preżenti għal tal-anqas 80 % (w/w).

**Sustanza multikostitwenti:** Sustanza, definita mill-kompożizzjoni kwantitattiva tagħha, li fiha aktar minn kostitwent ewlieni wiehed ikunu preżenti f'konċentrazzjoni  $\geq 10\%$  (w/w) u  $< 80\%$  (w/w). Sustanza multikostitwenti hi r-riżultat ta' proċess tal-manifattura. Id-differenza bejn taħlita u sustanza multikostitwenti hi li taħlita tinkiseb bit-tħallit ta' żewġ sustanzi jew aktar mingħajr reazzjoni kimika. Sustanza multikostitwenti hi r-riżultat ta' reazzjoni kimika.

**NC:** Mhux korrużiva.

**Standards tal-prestazzjoni:** Standards, ibbażati fuq metodu ta' ttestjar validu, li jipprovdu bażi għall-evalwazzjoni tal-komparabbiltà ta' metodu ta' ttestjar propost li hu simili b'mod funzjonali u mekkanistiku. Inkluzi hemm (i) il-komponenti essenzjali tal-metodi ta' ttestjar; (ii) lista minima ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza magħżula minn fost is-sustanzi kimiċi użati biex tintwera l-prestazzjoni aċċettabbli tal-metodu ta' ttestjar validat; u (iii) il-livelli simili ta' affidabbiltà u ta' akkuratezza, fuq il-bażi ta' dak li nkiseb għall-metodu ta' ttestjar validat, li l-metodu ta' ttestjar propost għandu juri meta evalwat bl-użu tal-lista minima ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza (9).

**Rilevanza:** Deskrizzjoni tar-relazzjoni tal-metodu ta' ttestjar mal-effett ta' interess u jekk huwiex sinifikanti u utli għal skop partikolari. Din tiddetermina kemm il-metodu ta' ttestjar għandu l-hila jkejjel jew ibassar b'mod korrett l-effett bijologiku ta' interess. Ir-rilevanza tinkorpora l-kunsiderazzjoni tal-akkuratezza (konkordanza) ta' metodu ta' ttestjar (9).

**Affidabbiltà:** Kejljiet ta' kemm metodu ta' ttestjar jista' jitwettaq b'mod riproducibbli fil-laboratorji u bejn il-laboratorji tul iż-żmien, meta jitwettaq billi jintuża l-istess protokoll. Din hi vvalutata billi tiġi kkalkolata r-riproducibbiltà fi hdan laboratorju u bejn laboratorju u ieħor (9).

**Sensittività:** Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi pożittivi/attivi kollha li huma klassifikati kif suppost mill-metodu ta' ttestjar. Hi kejl tal-preċiżjoni għal metodu ta' ttestjar li jipproduċi riżultati kategorici, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' metodu ta' ttestjar (9).

**Korrużjoni tal-ġilda *in vivo*:** Il-produzzjoni ta' dannu irriversibbli fil-ġilda; jiġifieri nekrozi viżibbli mill-*epidermis* u ġewwa d-*dermis*, wara l-applikazzjoni ta' sustanza kimika tat-test għal mhux aktar minn erba' sigħat. Ir-reazzjonijiet korrossivi huma kkaratterizzati minn ulċeri, fsad, qxur bid-demm, u, fit-tmiem tal-osservazzjoni fl-14-il jum, minn skulurazzjoni minhabba t-tibjid tal-ġilda, żoni shaħ b'alopecja, u ċikatriċi. L-istopatologija għandha titqies biex jiġu evalwati leżjonijiet li dwarhom hemm dubju.

**Speċifità:** Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi negattivi/inattivi kollha li huma klassifikati kif suppost mill-metodu ta' ttestjar. Hi kejl tal-preċiżjoni għal metodu ta' ttestjar li jipproduċi

riżultati kategoriċi, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' metodu ta' ttestjar (9).

**Sustanza:** Element kimiku u l-komposti tiegħu fl-istat naturali jew mislut minn kwalunkwe proċess ta' produzzjoni, li jinduċi kull addittiv neċessarju għall-preżervazzjoni tal-istabbiltà tiegħu u kwalunkwe impurità li tirriżulta mill-proċess użat, iżda bl-esklużjoni ta' kull solvent li jista' jkun separat mingħajr ma tkun effettwata l-istabbiltà tas-sustanza jew mibdula l-kompożizzjoni tagħha.

**Sustanza kimika tat-test:** Kwalunkwe sustanza jew tahlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

**UVCB:** Sustanzi kimiċi b'kompożizzjoni mhux magħrufa jew varjabbli, prodotti jew materjali bijoloġiċi b'reazzjoni kumplessa.



## **B.66 ASSAĠĠI *IN VITRO* TA' TRANSATTIVAZZJONI TRANSFETTATI B'MOD STABBLI BIEX JIĠU INDIVIDWATI AGONISTI U ANTAGONISTI RIĊETTURI TAL-ESTROĠENU**

### **INTRODUZZJONI ĠENERALI**

#### **Linja Gwida tat-Test Ibbazata fuq il-Prestazzjoni tal-OECD**

1. Dan il-metodu ta' ttestjar hu ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 455 tal-OECD (2016). It-TG 455 hi linja gwida tat-test ibbazata fuq il-prestazzjoni (PBTG), li tiddeskrivi l-metodoloġija ta' Assaġġi *In Vitro* ta' Transattivazzjoni Transfettati b'Mod Stabbli biex jiġu individwati Agonisti u Antagonisti Riċetturi tal-Estroġenu (assaġġi TA tal-ER). Din tinkludi diversi metodi ta' ttestjar mekkanistikament u funzjonalment simili għall-identifikazzjoni tal-agonisti u tal-antagonisti riċetturi tal-estroġenu (jiġifieri ER $\alpha$ , u/jew ER $\beta$ ) u għandha tiffaċilita l-iżvilupp ta' metodi ta' ttestjar simili jew modifikati ġodda skont il-prinċipji għall-validazzjoni stabbiliti fl-OECD Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment (1). Il-metodi ta' ttestjar ta' riferiment validati bis-sħiħ (Appendiċi 2 u Appendiċi 3) li jipprovdu l-bażi għal din il-PBTG huma:
  - L-assaġġ TA Transfettat b'Mod Stabbli (STTA) (2) bl-użu tal-linja ta' ċelloli (h) ER $\alpha$ -HeLa-9903; u
  - L-assaġġ TA tal-ER VM7Luc (3) bl-użu tal-linja ta' ċelloli VM7Luc4E2<sup>1</sup> li b'mod predominanti jesprimi hER $\alpha$  b'xi kontribuzzjoni minn hER $\beta$ (4)(5).

Għall-iżvilupp u għall-validazzjoni ta' assaġġi simili għall-istess punt ta' tmiem tal-periklu, hemm disponibbli standards tal-prestazzjoni (PS) (6) (7) u dawn għandhom

---

<sup>1</sup> Qabel Ġunju 2016, din il-linja ta' ċelloli kienet imsejha l-linja ta' ċelloli BG1Luc. Iċ-ċelloli BG-1 oriġinarjament kienu deskritti minn Geisinger et al. (1998) (35) u aktar tard ġew karatterizzati mir-riċerkaturi fin-National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) (36). B'mod relattivament riċenti, ġie skopert li jeżistu żewġ varjanti differenti taċ-ċelloli BG-1 li jintużaw mir-riċerkaturi, BG-1 Fr u BG-1 NIEHS. Analizi approfondita, li tinkludi ttestjar tad-DNA, ta' dawn iż-żewġ linji ta' ċelloli varjanti tal-BG-1 saret minn Li u l-kollegi (2014) (37) uriet li l-BG-1 Fr kienet unika u li l-BG-1 NIEHS, jiġifieri l-linja ta' ċelloli originali użata għall-iżvilupp tal-assaġġ, ma kinitx il-linja ta' ċelloli tal-karċinoma ovarjana umana BG1, iżda minflok kienet varjant tal-linja ta' ċelloli tal-kanċer tas-sider uman MCF7. Il-linja ta' ċelloli użata fl-assaġġ, oriġinarjament imsejha BG1Luc4E2 (38), issa se tibda tissejjah VM7Luc4E2 ("V" = varjant; "M7" = ċelloli MCF7). Bl-istess mod, l-assaġġ issa se jibda jissejjah it-TA tal-ER VM7Luc. Filwaqt li dan ibiddel l-oriġini tal-linja ta' ċelloli li fuqha hu bbażat l-assaġġ, dan ma jaffettwax l-istudji ta' validazzjoni ppubblikati u lanqas l-utilità u l-applikazzjoni ta' dan l-assaġġ għall-iskrinjar ta' sustanzi kimiċi estroġeniċi/antiestroġeniċi.

jintużaw. Dawn jippermettu għall-emendar puntwali tal-PBTG 455 biex l-assaġġi simili l-godda jkunu jistgħu jiżdiedu ma' PBTG aġġornata; madankollu, assaġġi simili jiżdiedu bis wara rieżami u qbil mill-OECD li ntlaħqu l-istandards tal-prestazzjoni. L-assaġġi inklużi fit-TG 455 jistgħu jintużaw b'mod indiskriminat biex jiġu indirizzati r-rekwiżiti tal-pajjiżi membri tal-OECD għar-riżultati tat-testijiet dwar it-transattivazzjoni tar-riċettur tal-estrogenu filwaqt li jinkiseb benefiċċju mill-Aċċettazzjoni Reċiproka tad-Data tal-OECD.

### **Sfond u prinċipji tal-assaġġi inklużi f'dan il-metodu ta' ttestjar**

2. Fl-1998, l-OECD nediet attività ta' prijorità għolja biex tirrevedi linji gwida dwar it-testijiet eżistenti, u tiżviluppa godda, għall-iskrinjar u għall-ittestjar ta' sustanzi kimiċi interferenti endokrinali potenzjali. Il-qafas kunċettwali (CF) tal-OECD għall-ittestjar u għall-valutazzjoni ta' sustanzi kimiċi interferenti endokrinali potenzjali ġie rivedut fl-2012. Is-CFs originali u riveduti huma inklużi bħala Annessi fid-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar Linji Gwida tat-Testijiet Standardizzati għall-Evalwazzjoni ta' Sustanzi Kimiċi għall-Interferenza Endokrinali (8). Is-CF jinkludi ħames livelli, b'kull livell li jikkorrispondi għal livell differenti ta' kumplessità bijoloġika. L-assaġġi tat-transattivazzjoni (TA) tal-ER deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar huma l-livell 2, li jinkludi "*assaġġi in vitro li jipprovdu data dwar il-mekkaniżmu/i/il-perkors(i) endokrinali magħżula*". Dan il-metodu ta' ttestjar hu għall-assaġġi ta' Transattivazzjoni (TA) *in vitro* mfassla biex jidentifikaw agonisti u antagonisti tar-riċetturi tal-estrogenu (ER).
3. L-interazzjoni tal-estrogeni mal-ERs tista' taffettwa t-traskrizzjoni tal-ġeni kkontrollati mill-estrogenu, li tista' twassal għall-induzzjoni jew għall-inibizzjoni ta' proċessi ċellolari, inklużi dawk neċessarji għall-proliferazzjoni taċ-ċelloli, għall-iżvilupp normali tal-fetu, u għall-funzjoni riproduttiva (9)(10)(11). Il-perturbazzjoni ta' sistemi estrogeniċi normali jista' jkollha l-potenzjal li tiskatta effetti avversi fuq l-iżvilupp normali (ontogenezi), is-saħħa riproduttiva u l-integrità tas-sistema riproduttiva.
4. L-assaġġi TA *in vitro* huma bbażati fuq interazzjoni diretta jew indiretta tas-sustanzi ma' riċettur speċifiku li jirregola t-traskrizzjoni ta' prodott ta' ġene indikatur. Assaġġi bħal dawn jintużaw b'mod estensiv għall-evalwazzjoni tal-espressjoni ġenika regolata minn riċetturi nukleari speċifiċi, bħall-ERs (12) (13) (14) (15) (16). Dawn ġew proposti għad-detezzjoni tat-transattivazzjoni estrogenika regolata mill-ER (17) (18) (19). Hemm tal-anqas żewġ subtipi ewlenin ta' ERs nukleari,  $\alpha$  u  $\beta$ , li huma kodifikati minn ġeni distinti. Il-proteini rispettivi għandhom funzjonijiet bijoloġiċi differenti kif ukoll distribuzzjonijiet tat-tessuti u affinitajiet għall-irbit ligandi differenti (20)(21)(22)(23)(24)(25)(26). L-ER $\alpha$  nukleari jimmedja r-rispons estrogeniku klassiku (27)(28)(29)(30), u għalhekk ħafna mill-mudelli li qed jiġu żviluppati bħalissa għall-kejl tal-attivazzjoni jew tal-inibizzjoni tal-ER huma speċifiċi għall-ER $\alpha$ . L-assaġġi jintużaw biex jidentifikaw sustanzi kimiċi li jattivaw (jew jinibixxu) l-ER wara li jsiru leganti ligandi, wara liem il-kumpless riċettur-

ligand jillega ma' elementi ta' rispons speċifiċi tad-DNA u jittransattiva gene indikatur, li jirrizulta f'espressjoni ċellolari akbar ta' proteina markatur. F'dawn l-assaġġi jistgħu jintużaw risponsi indikaturi differenti. F'sistemi bbażati fuq luċiferażi, l-enzima luċiferażi tittrasaforma s-substrat luċiferin fi prodott bijoluminexxenti li jista' jitkejjel b'mod kwantitattiv b'luminometru. Eżempji oħra ta' indikaturi komuni huma proteina fluworexxenti u l-gene *LacZ*, li jikkodifika l- $\beta$ -galaktosidażi, enzima li tista' tittrasaforma s-substrat bla kulur X-gal (5-bromo-4-kloro-indolil-galaktopiranosid) fi prodott blu li jista' jiġi kwantifikat bi spettrofotometru. Dawn l-indikaturi jistgħu jiġu evalwati malajr u mingħajr ma jintefqu wisq flus b'kits tat-test disponibbli kummerċjalment.

5. Studji ta' validazzjoni tal-STTA u l-assaġġi tat-TA VM7Luc urew ir-rilevanza u l-affidabbiltà tagħhom għall-iskop mahsub tagħhom (3)(4)(5)(30). L-istandards tal-prestazzjoni għal assaġġi TA tal-ER ibbażati fuq il-luminexxenza li jużaw linji ta' ċelloli tas-sider huma inklużi fir-Rapport ta' Evalwazzjoni tal-Metodu ta' Ttestjar tal-ICCVAM dwar il-Metodu ta' Ttestjar LUMI-CELL<sup>®</sup> ER (TA tal-ER VM7Luc). Assaġġ *In Vitro* għall-Identifikazzjoni tal-Attività Agonista u Antagonista tar-Riċettur tal-Estroġenu Uman tas-Sustanzi Kimiċi (3). Dawn l-istandards tal-prestazzjoni ġew modifikati biex ikunu applikabbli kemm għall-assaġġi STTA kif ukoll TA VM7Luc (2).
6. Id-definizzjonijiet u l-abbrevjazzjonijiet użati f'dan il-metodu ta' ttestjar huma deskritti fl-Appendiċi 1.

### **Ambitu u limitazzjonijiet relatati mal-assaġġi TA**

7. Dawn l-assaġġi qed jiġu proposti għall-finijiet ta' skrinjar u ta' prijoritizzazzjoni, iżda jistgħu jipprovdu wkoll informazzjoni mekkanistika li tista' tintuża f'approċċ ta' piż tal-evidenza. Dawn jindirizzaw TA indott b'irbit kimiku mal-ERs f'sistema *in vitro*. B'hekk, ir-riżultati ma għandhomx jiġu estrapolati direttament għas-sinjalar u għar-regolamentazzjoni kumplessi tas-sistema endokrinali intatta *in vivo*.
8. TA medjat mill-ERs jitqies wiehed mill-mekkanizmi ewlenin tal-interferenza endokrinali (ED), għalkemm hemm mekkanizmi oħra li bihom tista' ssehh l-ED, inklużi (i) interazzjonijiet ma' riċetturi u ma' sistemi enzimatiċi oħra fi hdan is-sistema endokrinali, (ii) sintezi ormonali, (iii) attivazzjoni metabolika u/jew inattivazzjoni tal-ormoni, (iv) distribuzzjoni tal-ormoni għat-tessuti fil-mira, u (v) tnehhija tal-ormoni mill-ġisem. L-ebda wiehed mill-assaġġi taht dan il-metodu ta' ttestjar ma jindirizza dawn il-modalitajiet ta' azzjoni.
9. Dan il-metodu ta' ttestjar jindirizza l-hila tas-sustanzi kimiċi li jattivaw (jiġifieri jaġixxu bħala agonisti) kif ukoll irażżnu (jiġifieri jaġixxu bħala antagonisti) traskrizzjoni dipendenti mill-ER. Ċerti sustanzi kimiċi jistgħu juru, b'mod dipendenti fuq it-tip ta' ċellola, kemm attività agonista kif ukoll antagonista u huma magħrufa bħala modulatori selettivi tar-riċetturi tal-estroġenu (SERMs). Is-sustanzi

kimiċi li huma negattivi f'dawn l-assaġġi jistgħu jiġu evalwati f'assaġġ tal-irbit tal-ER qabel ma jiġi konkluż li s-sustanza kimika ma tillegax mar-riċettur. Barra minn hekk, l-assaġġi aktarx li jinformatu biss dwar l-attività tal-molekula omm fid-dawl tal-kapaċitajiet metabolizzanti limitati tas-sistemi ċellolari *in vitro*. Peress li ntużaw sustanzi singli biss matul il-validazzjoni, l-applikabbiltà għat-taħlitiet tat-test ma ġietx indirizzata. Il-metodu ta' ttestjar xorta waħda hu teorikament applikabbli għall-ittestjar ta' sustanzi multikostitwenti, ta' UVCBs u ta' taħlitiet. Qabel ma jintuża dan il-metodu ta' ttestjar fuq sustanza multikostitwenti, UVCB jew taħlita għall-ġenerazzjoni ta' *data* għal skop regolatorju intiż, għandu jiġi kkunsidrat jekk jistax jipprovdi riżultati adegwati għal dak l-ghan u, jekk iva, għaliex. Dawn il-kunsiderazzjonijiet mhumix meħtieġa meta jkun hemm rekwiżit regolatorju għall-ittestjar tat-taħlita.

10. Għal-finijiet ta' informazzjoni, it-Tabella 1 tipprovdi r-riżultati tat-test tal-agonisti għall-34 sustanza li ġew ittestjati fiż-żewġ metodi ta' ttestjar ta' riferiment validati bis-shih deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar. Minn dawn is-sustanzi, 26 huma klassifikati bħala agonisti definittivi tal-ER u tmienja negattivi fuq il-bażi tar-rapporti ppubblikati, inklużi assaġġi *in vitro* għall-irbit mal-ER u t-TA, u/jew l-assaġġ uterotofiku (2)(3)(18)(31)(32)(33)(34). It-Tabella 2 tipprovdi r-riżultati tat-test tal-antagonisti għall-15-il sustanza li ġew ittestjati fiż-żewġ metodi ta' ttestjar ta' riferiment validati bis-shih deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar. Minn dawn is-sustanzi, erbgħa huma klassifikati bħala agonisti definittivi/preżunti tal-ER u 10 negattivi fuq il-bażi tar-rapporti ppubblikati, inklużi assaġġi *in vitro* għall-irbit mal-ER u t-TA (2)(3)(18)(31). B'referenza għad-*data* miġbura fil-qosor fit-Tabella 1 u fit-Tabella 2, kien hemm qbil ta' 100 % bejn iż-żewġ metodi ta' ttestjar ta' riferiment dwar il-klassifikazzjonijiet tas-sustanzi kollha hliet sustanza waħda (mifepristone) għall-assaġġ tal-antagonisti, u kull sustanza ġiet klassifikata kif suppost bħala agonist/antagonist tal-ER jew negattiva. Informazzjoni supplimentari dwar dan il-grupp ta' sustanzi kimiċi kif ukoll sustanzi kimiċi addizzjonali ttestjati fl-assaġġi STTA u TA tal-ER VM7Luc matul l-istudji ta' validazzjoni hi pprovduta fl-Istandards tal-Prestazzjoni għall-ERTA (6)(7), fl-Appendiċi 2 (Tabelli 1, 2 u 3).

**Tabella 1:** Harsa ġenerali lejn ir-Riżultati mill-Assaġġi STTA u TA tal-ER VM7Luc għas-Sustanzi Ttestjati fiż-Żewġ Assaġġi Agonisti u Klassifikati bħala Agonisti tal-ER (POŽ) jew Negattivi (NEG).

|    | Sustanza              | CASRN      | Assaġġ1 STTA       |                |                 | Assaġġ2 TA tal-ER VM7Luc |                   | Sors tad-Data għall-Klassifikazzjoni4 |            |              |
|----|-----------------------|------------|--------------------|----------------|-----------------|--------------------------|-------------------|---------------------------------------|------------|--------------|
|    |                       |            | TA tal-ER Attività | Valur PC10 (M) | Valurb PC50 (M) | Attività TA tal-ER       | Valurb,3 EC50 (M) | TAsC tal-ER Ohrajn                    | ER Leganti | Uterotrofiċi |
| 1  | 17β-estradjola        | 50-28-2    | POŽ                | <1,00 × 10-11  | <1,00 × 10-11   | POŽ                      | 5,63 × 10-12      | POŽ (227/227)                         | POŽ        | POŽ          |
| 2  | 17α-estradjola        | 57-91-0    | POŽ                | 7,24 × 10-11   | 6,44 × 10-10    | POŽ                      | 1,40 × 10-9       | POŽ(11/11)                            | POŽ        | POŽ          |
| 3  | 17α-etinil estradjola | 57-63-6    | POŽ                | <1,00 × 10-11  | <1,00 × 10-11   | POŽ                      | 7,31 × 10-12      | POŽ(22/22)                            | POŽ        | POŽ          |
| 4  | 17β-trenbolon         | 10161-33-8 | POŽ                | 1,78 × 10-8    | 2,73 × 10-7     | POŽ                      | 4,20 × 10-8       | POŽ (2/2)                             | NT         | NT           |
| 5  | 19-nortestosteronea   | 434-22-0   | POŽ                | 9,64 × 10-9    | 2,71 × 10-7     | POŽ                      | 1,80 × 10-6       | POŽ(4/4)                              | POŽ        | POŽ          |
| 6  | 4-kumilfenola         | 599-64-4   | POŽ                | 1,49 × 10-7    | 1,60 × 10-6     | POŽ                      | 3,20 × 10-7       | POŽ(5/5)                              | POŽ        | NT           |
| 7  | 4-terz-ottilfenola    | 140-66-9   | POŽ                | 1,85 × 10-9    | 7,37 × 10-8     | POŽ                      | 3,19 × 10-8       | POŽ(21/24)                            | POŽ        | POŽ          |
| 8  | Apigenina             | 520-36-5   | POŽ                | 1,31 × 10-7    | 5,71 × 10-7     | POŽ                      | 1,60 × 10-6       | POŽ(26/26)                            | POŽ        | NT           |
| 9  | Atrazinea             | 1912-24-9  | NEG                | -              | -               | NEG                      | -                 | NEG (30/30)                           | NEG        | NT           |
| 10 | Bisfenol Aa           | 80-05-7    | POŽ                | 2,02 × 10-8    | 2,94 × 10-7     | POŽ                      | 5,33 × 10-7       | POŽ(65/65)                            | POŽ        | POŽ          |
| 11 | Bisfenol Ba           | 77-40-7    | POŽ                | 2,36 × 10-8    | 2,11 × 10-7     | POŽ                      | 1,95 × 10-7       | POŽ(6/6)                              | POŽ        | POŽ          |
| 12 | Butilbenzil ftalatea  | 85-68-7    | POŽ                | 1,14 × 10-6    | 4,11 × 10-6     | POŽ                      | 1,98 × 10-6       | POŽ(12/14)                            | POŽ        | NEG          |
| 13 | Kortikosteronea       | 50-22-6    | NEG                | -              | -               | NEG                      | -                 | NEG( 6/6 )                            | NEG        | NT           |
| 14 | Koumestrola           | 479-13-0   | POŽ                | 1,23 × 10-9    | 2,00 × 10-8     | POŽ                      | 1,32 × 10-7       | POŽ(30/30)                            | POŽ        | NT           |
| 15 | Daidzeina             | 486-66-8   | POŽ                | 1,76 × 10-8    | 1,51 × 10-7     | POŽ                      | 7,95 × 10-7       | POŽ(39/39)                            | POŽ        | POŽ          |
| 16 | Dietilstilbestrola    | 56-53-1    | POŽ                | <1,00 × 10-11  | 2,04 × 10-11    | POŽ                      | 3,34 × 10-11      | POŽ(42/42)                            | POŽ        | NT           |
| 17 | Ftalat tad-di-n-butil | 84-74-2    | POŽ                | 4,09 × 10-6    |                 | POŽ                      | 4,09 × 10-6       | POŽ(6/11)                             | POŽ        | NEG          |
| 18 | Etil paraben          | 120-47-8   | POŽ                | 5,00 × 10-6    | (ebda PC50)     | POŽ                      | 2,48 × 10-5       | POŽ                                   |            | NT           |
| 19 | Estronea              | 53-16-7    | POŽ                | 3,02 × 10-11   | 5,88 × 10-10    | POŽ                      | 2,34 × 10-10      | POŽ(26/28)                            | POŽ        | POŽ          |
| 20 | Ġenisteina            | 446-72-0   | POŽ                | 2,24 × 10-9    | 2,45 × 10-8     | POŽ                      | 2,71 × 10-7       | POŽ(100/102)                          | POŽ        | POŽ          |
| 21 | Haloperidol           | 52-86-8    | NEG                | -              | -               | NEG                      | -                 | NEG (2/2)                             | NEG        | NT           |
| 22 | Kempferola            | 520-18-3   | POŽ                | 1,36 × 10-7    | 1,21 × 10-6     | POŽ                      | 3,99 × 10-6       | POŽ(23/23)                            | POŽ        | NT           |
| 23 | Keponea               | 143-50-0   | POŽ                | 7,11 × 10-7    | 7,68 × 10-6     | POŽ                      | 4,91 × 10-7       | POŽ(14/18)                            | POŽ        | NT           |

|    |                     |            |     |                         |                        |     |                        |            |     |     |
|----|---------------------|------------|-----|-------------------------|------------------------|-----|------------------------|------------|-----|-----|
| 24 | Ketokonazol         | 65277-42-1 | NEG | -                       | -                      | NEG | -                      | NEG (2/2)  | NEG | NT  |
| 25 | Linurona            | 330-55-2   | NEG | -                       | -                      | NEG | -                      | NEG (8/8)  | NEG | NT  |
| 26 | meso-Ežestrola      | 84-16-2    | POŽ | $<1,00 \times 10^{-11}$ | $2,75 \times 10^{-11}$ | POŽ | $1,65 \times 10^{-11}$ | POŽ(4/4)   | POŽ | NT  |
| 27 | Metil testosteronea | 58-18-4    | POŽ | $1,73 \times 10^{-7}$   | $4,11 \times 10^{-6}$  | POŽ | $2,68 \times 10^{-6}$  | POŽ(5/6)   | POŽ | NT  |
| 28 | Morin               | 480-16-0   | POŽ | $5,43 \times 10^{-7}$   | $4,16 \times 10^{-6}$  | POŽ | $2,37 \times 10^{-6}$  | POŽ(2/2)   | POŽ | NT  |
| 29 | Noretinodrela       | 68-23-5    | POŽ | $1,11 \times 10^{-11}$  | $1,50 \times 10^{-9}$  | POŽ | $9,39 \times 10^{-10}$ | POŽ(5/5)   | POŽ | NT  |
| 30 | p,p'-Metossiklora   | 72-43-5    | POŽ | $1,23 \times 10^{-6}$   | (ebda PC50)b           | POŽ | $1,92 \times 10^{-6}$  | POŽ(24/27) | POŽ | POŽ |
| 31 | Fenobarbitala       | 57-30-7    | NEG | -                       | -                      | NEG | -                      | NEG(2/2)   | NEG | NT  |
| 32 | Reserpina           | 50-55-5    | NEG | -                       | -                      | NEG | -                      | NEG(4/4)   | NEG | NT  |
| 33 | Spironolattonea     | 52-01-7    | NEG | -                       | -                      | NEG | -                      | NEG(4/4)   | NEG | NT  |
| 34 | Testosteron         | 58-22-0    | POŽ | $2,82 \times 10^{-8}$   | $9,78 \times 10^{-6}$  | POŽ | $1,75 \times 10^{-5}$  | POŽ(5/10)  | POŽ | NT  |

Abbrevjazzjonijiet: CASRN = Numru tar-Reġistru tas-Servizz tat-Taqsiriet tas-Sustanzi Kimiċi; M = molari; EC50 = konċentrazzjoni effettiva medjana tas-sustanza tat-test; NEG = negattivi; POŽ = pożittivi; NT = Mhux ittestjati; PC10 (u PC50) = il-konċentrazzjoni ta' sustanza tat-test li fiha r-rispons ikun 10 % (jew 50 % għall-PC50) tar-rispons indott mill-kontroll pożittiv (E2, 1nM) f'kull pjastra.

aSustanzi komuni ttestjati fl-assaġġi STTA u TA tal-ER VM7Luc li ġew nominati agonisti tal-ER jew negattivi u jintużaw biex tiġi evalwata l-akkuratezza fl-istudju ta' validazzjoni tat-TA tal-ER VM7Luc (Rapport ta' Evalwazzjoni tat-TA tal-ER VM7Luc tal-ICCVAM, Tabella 4-1 (3).

bIl-konċentrazzjoni massima ttestjata fin-nuqqas ta' limitazzjonijiet minhabba ċitotossicità jew insolubilità kienet ta'  $1 \times 10^{-5}$  M (Assaġġ STTA) u ta'  $1 \times 10^{-3}$  M (Assaġġ TA tal-ER VM7Luc).

cIn-numru fil-parentesi jirrappreżenta r-risultati tat-test klassifikati bħala pożittivi (POŽ) jew negattivi (NEG) min-numru totali ta' studji referenzjati.

1Valuri rrapportati fl-Abbozz tar-Rapport ta' Prevalidazzjoni u Validazzjoni Interlaboratorji għall-Assaġġ ta' Attivazzjoni Traskrizzjonali (TA) Transfettata biex tiġi Individwata Attività Estroġenika - L-Assaġġ tal-Ġene Indikatur Medjat Alfa tar-Reċettur tal-Estroġenu Uman Bl-Użu tal-Linja Ċelolari hER-HeLa-9903 (2).

2Rapport ta' Evalwazzjoni tal-Metodu ta' Ttestjar ICCVAM dwar il-Metodu ta' Ttestjar LUMI-CELL® ER (TA tal-ER VM7Luc): Metodu *In Vitro* għall-Identifikazzjoni tal-Agonisti u tal-Antagonisti tal-ER (3)

3Il-valuri medji tal-EC50 ġew ikkalkolati bil-valuri rrapportati mil-laboratorji tal-istudju ta' validazzjoni tat-TA tal-ER VM7Luc (XDS, ECVAM u Hiyoshi) (3).

4Klassifikazzjoni bħala agonist tal-ER jew negattivi kienet ibbażata fuq informazzjoni fid-Dokumenti ta' Rieżami ta' Sfond (BRD) tal-ICCVAM għall-metodi ta' ttestjar tal-Irbit tal-ER u tat-TA (31) kif ukoll fuq informazzjoni miksuba minn pubblikazzjonijiet ippubblikati u rieżaminati wara t-tlestija tal-BRDs tal-ICCVAM (2) (3) (18) (31) (33) (34).

Noti: L-ebda assaġġ fi hdan dan il-metodu ta' ttestjar ma fih l-istess kejljiet. F'ċerti sitwazzjonijiet, l-EC<sub>50</sub> ma tkunx tista' tiġi kkalkolata għaliex ma tkunx ġiet ġenerata kurva ta' doża-rispons shiha. Filwaqt li bl-assaġġ STTA, il-valur tal-PC10 hu kejl importanti, jista' jkun hemm ukoll eżempji oħra li fihom PCx tipprovdi informazzjoni siewja.

**Tabella 2:** Tqabbil tar-Riżultati mill-Assaġġi STTA u TA tal-ER VM7Luc għas-Sustanzi Ttestjati fiż-Żewġ Assaġġi Antagonisti u Klassifikati bħala Antagonisti tal-ER (POŽ) jew Negattivi (NEG).

|    | Sustanza <sup>a</sup> | CASRN      | Assaġġ STTA tal-ER <sup>1</sup> |                                             | Assaġġ TA tal-ER VM7Luc <sup>2</sup> |                                               | STTA tal-ER kandidat effetti <sup>4</sup> | ICCVAM <sup>5</sup> Klassifikazzjoni tal-Kunsens | MeSH <sup>6</sup> Klassi Kimika   | Klassi tal-Prodott <sup>7</sup>                                  |
|----|-----------------------|------------|---------------------------------|---------------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------------------------------------|
|    |                       |            | TA tal-ER Attività              | Valur tal-IC <sub>50</sub> <sup>b</sup> (M) | TA tal-ER Attività                   | Valur tal-IC <sub>50</sub> <sup>b,3</sup> (M) |                                           |                                                  |                                   |                                                                  |
| 1  | 4-idrossitamossifen   | 68047-06-3 | POŽ                             | $3,97 \times 10^{-9}$                       | POŽ                                  | $2,08 \times 10^{-7}$                         | POŽ moderati                              | POŽ                                              | Idrokarbur (Ċikliku)              | Farmaċewtiku                                                     |
| 2  | Dibenzo[a.h]antraċen  | 53-70-3    | POŽ                             | Ebda IC <sub>50</sub>                       | POŽ                                  | Ebda IC <sub>50</sub>                         | POŽ                                       | PP                                               | Kompost Poliċikliku               | Sustanza Kimika tal-Laboratorju, Prodott Naturali                |
| 3  | Mifepriston           | 84371-65-3 | POŽ                             | $5,61 \times 10^{-6}$                       | NEG                                  | -                                             | POŽ hġief                                 | NEG                                              | Sterojde                          | Farmaċewtiku                                                     |
| 4  | Ralossifen HCl        | 82640-04-8 | POŽ                             | $7,86 \times 10^{-10}$                      | POŽ                                  | $1,19 \times 10^{-9}$                         | POŽ moderati                              | POŽ                                              | Idrokarbur (Ċikliku)              | Farmaċewtiku                                                     |
| 5  | Tamossifen            | 10540-29-1 | POŽ                             | $4,91 \times 10^{-7}$                       | POŽ                                  | $8,17 \times 10^{-7}$                         | POŽ                                       | POŽ                                              | Idrokarbur (Ċikliku)              | Farmaċewtiku                                                     |
| 6  | 17β-estradjol         | 50-28-2    | NEG                             | -                                           | NEG                                  | -                                             | NP                                        | NP                                               | Sterojde                          | Farmaċewtiku, Aġent Veterinarju                                  |
| 7  | Apigenin              | 520-36-5   | NEG                             | -                                           | NEG                                  | -                                             | NEG                                       | NEG                                              | Kompost Eteroċikliku              | Kolorant, Prodott Naturali, Intermedjarju Farmaċewtiku           |
| 8  | Atrazina              | 1912-24-9  | NEG                             | -                                           | NEG                                  | -                                             | NEG                                       | NP                                               | Kompost Eteroċikliku              | Erbċida                                                          |
| 9  | Ftalat tad-di-n-butyl | 84-74-2    | NEG                             | -                                           | NEG                                  | -                                             | NEG                                       | NEG                                              | Ester, Aċidu Ftaliku              | Ingredjent Kożmetiku, Sustanza Kimika Industrijali, Plastifikant |
| 10 | Fenarimol             | 60168-88-9 | NEG                             | -                                           | NEG                                  | -                                             | mhux ittestjat                            | NP                                               | Komposti Eteroċikliċi, Pirimidina | Funġiċida                                                        |
| 11 | Flavon                | 525-82-6   | NEG                             | -                                           | NEG                                  | -                                             | NP                                        | NP                                               | Flavonojċe, Kompost Eletroċikliku | Prodott Naturali, Farmaċewtiku                                   |
| 12 | Flutammid             | 13311-84-7 | NEG                             | -                                           | NEG                                  | -                                             | NEG                                       | NP                                               | Ammid                             | Farmaċewtiku, Aġent Veterinarju                                  |
| 13 | Ġenisteina            | 446-72-0   | NEG                             | -                                           | NEG                                  | -                                             | NP                                        | NEG                                              | Flavonojċe, Kompost Eletroċikliku | Prodott Naturali, Farmaċewtiku                                   |
| 14 | p-n-nonilfenol        | 104-40-5   | NEG                             | -                                           | NEG                                  | -                                             | mhux ittestjat                            | NEG                                              | Fenol                             | Intermedjarju Kimiku                                             |

|    |             |          |     |   |     |   |    |     |                      |                  |
|----|-------------|----------|-----|---|-----|---|----|-----|----------------------|------------------|
| 15 | Resveratrol | 501-36-0 | NEG | - | NEG | - | NP | NEG | Idrokarbur (Ċikliku) | Prodott Naturali |
|----|-------------|----------|-----|---|-----|---|----|-----|----------------------|------------------|

Abbrevjazzjonijiet: CASRN = Numru tar-Reġistru tas-Servizz tat-Taqsiriet tas-Sustanzi Kimiċi; M = molari; IC<sub>50</sub> = konċentrazzjoni inibitorja medjana tas-sustanza tat-test; NEG = negattivi; NP = negattivi preżunti; POŽ = pożittivi; PP = pożittivi preżunti.

<sup>a</sup> Sustanzi komuni ttestjati fl-assaġġi STTA u TA tal-ER VM7Luc li ġew nominati antagonisti tal-ER jew negattivi u jintużaw biex tiġi evalwata l-akkuratezza fl-istudju ta' validazzjoni tat-TA tal-ER VM7Luc (2) (3).

<sup>b</sup> Il-konċentrazzjoni massima ttestjata fin-nuqqas ta' limitazzjonijiet minhabba ċitotossicità jew insolubilità kienet ta' 1 x 10<sup>-3</sup> M (Assaġġ STTA) u ta' 1 x 10<sup>-5</sup> M (Assaġġ TA tal-ER VM7Luc).

<sup>1</sup> Ir-Rapport ta' Validazzjoni tal-Assaġġ ta' Aktivazzjoni Traskrizzjonali transfettata b'Mod Stabbli biex tiġi Individwata Attività medjata mill-ER, Parti B (2)

<sup>2</sup> Rapport ta' Evalwazzjoni tal-Metodu ta' Ttestjar ICCVAM dwar il-Metodu ta' Ttestjar LUMI-CELL ER (TA tal-ER VM7Luc): Metodu *In Vitro* għall-Identifikazzjoni tal-Agonisti u tal-Antagonisti tal-ER (3).

<sup>3</sup> Il-valuri medji tal-EC<sub>50</sub> ġew ikkalkolati bil-valuri rapportati mil-laboratorji tal-istudju ta' validazzjoni tat-TA tal-ER VM7Luc (XDS, ECVAM u Hiyoshi) (3).

<sup>4</sup> Attività STTA tal-ER preżunta mill-effetti rapportati tagħhom magħrufa mid-*data* storika tas-CERI tal-assaġġ dwar l-irbit tar-riċettur tal-ER, l-assaġġ uterotrofik u l-informazzjoni miġbura mid-dokumentazzjoni disponibbli (2)

<sup>5</sup> Klassifikazzjoni bħala antagonist tal-ER jew negattivi kienet ibbażata fuq informazzjoni fid-Dokumenti ta' Rieżami ta' Sfond (BRD) tal-ICCVAM għall-assaġġi tal-Irbit tal-ER u tat-TA (31) kif ukoll fuq informazzjoni miksuba minn pubblikazzjonijiet ippubblikati u rieżaminati wara t-tlestija tal-BRDs tal-ICCVAM (2) (3) (18) (31).

<sup>6</sup> Is-sustanzi ġew assenjati fi klassi kimika waħda jew aktar bl-użu tal-Intestaturi tas-Suġġetti Mediċi (MeSH) tal-Librerija Nazzjonali tal-Mediċina tal-Istati Uniti, skema ta' klassifikazzjoni standardizzata rikonoxxuta fil-livell internazzjonali (disponibbli fuq <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

<sup>7</sup> Is-sustanzi ġew assenjati fi klassi waħda jew aktar ta' prodott bl-użu tal-Bank ta' *Data* tas-Sustanzi Perikolużi tal-Librerija Nazzjonali tal-Mediċina tal-Istati Uniti (disponibbli fuq <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).



## KOMPONENTI TAL-ASSAĠĠ TA' TAL-ER

### Komponenti Essenzjali tal-Assaġġ

11. Dan il-metodu ta' ttestjar japplika għal assaġġi li jużaw riċettur tal-ER $\alpha$  transfettat b'mod stabbli jew endoġenu u binja ta' ġene indikatur transfettat b'mod stabbli taħt il-kontroll ta' element ta' rispons tal-estrogenu wiehed jew aktar; madankollu, jistgħu jkunu preżenti riċetturi oħra bħall-ER $\beta$ . Dawn huma komponenti essenzjali tal-assaġġ.

### Kontrolli

12. Il-bażi għall-istandards referenzjarji konkorrenti proposti għal kull assaġġ tal-agonisti u tal-antagonisti għandha tkun deskritta. Il-kontrolli konkorrenti (negattivi, solvent, u pożittivi), kif xieraq, iservu bħala indikazzjoni li l-assaġġ hu operattiv skont il-kundizzjonijiet tat-test u jipprovdu bażi għal tqabbil bejn esperiment u ieħor; normalment dawn ikunu parti mill-kriterji ta' aċċettabbiltà għal esperiment partikolari (1).

### Proċeduri Standard ta' Kontroll tal-Kwalità

13. Il-proċeduri standard ta' kontroll tal-kwalità għandhom jitwettqu kif deskritt għal kull assaġġ biex jiġi żgurat li l-linja ta' ċelloli tibqa' stabbli matul diversi passaġġi, tibqa' hielsa mill-mikoplażma (jiġifieri hielsa minn kontaminazzjoni batterjali), u żżomm il-ħila li tipprovdi r-risponsi medjati mill-ER mistennija maż-żmien. Il-linji ta' ċelloli għandhom ikomplu jiġu verifikati għall-identità korretta tagħhom kif ukoll għal kontaminanti oħra (eż. fungi, ħmira u vajrusis).

### Wiri tal-Profiċjenza tal-Laboratorju

14. Qabel l-ittestjar ta' sustanzi kimiċi mhux magħrufa bi kwalunkwe wiehed mill-assaġġi f'dan il-metodu ta' ttestjar, kull laboratorju għandu juri profiċjenza fl-użu tal-assaġġ. Biex juri l-profiċjenza, kull laboratorju għandu jittestja l-14-il sustanza ta' profiċjenza elenkati fit-Tabella 3 għall-assaġġ tal-agonisti u 10 sustanzi ta' profiċjenza fit-Tabella 4 għall-assaġġ tal-antagonisti. Dan l-ittestjar tal-profiċjenza jikkonferma r-risponsività tas-sistema tat-test ukoll. Il-lista ta' sustanzi ta' profiċjenza hi subsett tas-sustanzi ta' riferiment pprovduti fl-Istandards tal-Prestazzjoni għall-assaġġi TA tal-ER (6). Dawn is-sustanzi huma kummerċjalment disponibbli, jirrapprezentaw il-klassijiet ta' sustanzi kimiċi assoċjati komunement mal-attività agonista jew antagonista tal-ER, jesibixxu firxa xierqa ta' potenza mistennija għall-agonisti/antagonisti tal-ER (jiġifieri b'saħħithom sa dgħajfa) u jinkludu negattivi. L-ittestjar tas-sustanzi ta' profiċjenza għandu jerga' jsir tal-anqas darbtejn, f'jiem differenti. Il-profiċjenza tintwera bil-klassifikazzjoni korretta (pożittiva/negattiva) ta' kull sustanza ta' profiċjenza. L-ittestjar tal-profiċjenza għandu jerga' jsir minn kull tekniku meta jkun qed

jitghallem l-assaġġi. Skont it-tip ta' ċellola, uħud minn dawn is-sustanzi ta' profiċjenza jafu jġibu ruħhom bħala SERMs u juru attività kemm bħala agonisti kif ukoll bħala antagonisti. Madankollu, is-sustanzi ta' profiċjenza huma klassifikati fit-Tabelli 3 u 4 skont l-attività predominanti magħrufa tagħhom li għandha tintuża għall-evalwazzjoni tal-profiċjenza.

15. Biex tintwera l-prestazzjoni u għall-finijiet ta' kontroll tal-kwalità, kull laboratorju għandu jġbor bażijiet ta' *data* storiċi dwar l-agonisti u l-antagonisti bi b'*data* ta' riferiment standard (eż. 17 $\beta$ -estradijoli u tamossifen), dwar is-sustanzi kimiċi tal-kontrolli pożittivi u negattivi u dwar il-kontroll bis-solvent (eż. DMSO). Bħala bidu, il-bażi ta' *data* għandha tiġi generata minn tal-anqas 10 sessjonijiet indipendenti tal-agonisti (eż. 17 $\beta$ -estradijoli) u 10 sessjonijiet indipendenti tal-antagonisti (eż. tamossifen). Ir-riżultati mill-analizzijiet futuri ta' dawn l-istandards referenzjarji u l-kontrolli bis-solvent għandhom jiżdiedu biex ikabbru l-bażi ta' *data* bl-għan li jiġu żgurati konsistenza u twettiq tal-bijoassaġġ mil-laboratorju matul iż-żmien.

**Tabella 3: Lista ta' (14) Sustanzi ta' Profiċjenza għall-assaġġ tal-agonisti<sup>8</sup>**

| Nru <sup>7</sup> | Sustanza                 | CASRN      | Rispons Mistenni <sup>1</sup> | Assaġġ STTA                                 |                                             |                              | Assaġġ TA tal-ER VM7Luc                            |                                                       | Klassi Kimika tal-MeSH <sup>5</sup>      | Klassi tal-Prodott <sup>6</sup>            |
|------------------|--------------------------|------------|-------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|------------------------------|----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|------------------------------------------|--------------------------------------------|
|                  |                          |            |                               | Valur tal-PC <sub>10</sub> (M) <sup>2</sup> | Valur tal-PC <sub>50</sub> (M) <sup>2</sup> | Medda ta' Konċ. tat-Test (M) | Valur tal-VM7Luc EC <sub>50</sub> (M) <sup>3</sup> | L-Oghla Konċ. għas-Sejbien tal-Medda (M) <sup>4</sup> |                                          |                                            |
| 14               | Dietilstilbestrol        | 56-53-1    | POŽ                           | <1,00 × 10 <sup>-11</sup>                   | 2,04 × 10 <sup>-11</sup>                    | 10-14 – 10-8                 | 3,34 × 10 <sup>-11</sup>                           | 3,73 × 10 <sup>-4</sup>                               | Idrokarbur (Ċikliku)                     | Aġent Veterinarju<br>Farmaċewtiku          |
| 12               | 17 $\alpha$ -estradijoli | 57-91-0    | POŽ                           | 4,27 × 10 <sup>-11</sup>                    | 6,44 × 10 <sup>-10</sup>                    | 10-11 – 10-5                 | 1,40 × 10 <sup>-9</sup>                            | 3,67 × 10 <sup>-3</sup>                               | Sterojde                                 | Farmaċewtiku, Aġent Veterinarju            |
| 15               | meso-Ežestrol            | 84-16-2    | POŽ                           | <1,00 × 10 <sup>-11</sup>                   | 2,75 × 10 <sup>-11</sup>                    | 10-11 – 10-5                 | 1,65 × 10 <sup>-11</sup>                           | 3,70 × 10 <sup>-3</sup>                               | Idrokarbur (Ċikliku), Fenol              | Farmaċewtiku, Aġent Veterinarju            |
| 11               | 4-terz-Ottilfenol        | 140-66-9   | POŽ                           | 1,85 × 10 <sup>-9</sup>                     | 7,37 × 10 <sup>-8</sup>                     | 10-11 – 10-5                 | 3,19 × 10 <sup>-8</sup>                            | 4,85 × 10 <sup>-3</sup>                               | Fenol                                    | Intermedjarju Kimiku                       |
| 9                | Ġenisteina               | 446-72-0   | POŽ                           | 2,24 × 10 <sup>-9</sup>                     | 2,45 × 10 <sup>-8</sup>                     | 10-11 – 10-5                 | 2,71 × 10 <sup>-7</sup>                            | 3,70 × 10 <sup>-4</sup>                               | Flavonojde, Kompost Eletroċikliku        | Prodott Naturali, Farmaċewtiku             |
| 6                | Bisfenol A               | 80-05-7    | POŽ                           | 2,02 × 10 <sup>-8</sup>                     | 2,94 × 10 <sup>-7</sup>                     | 10-11 – 10-5                 | 5,33 × 10 <sup>-7</sup>                            | 4,38 × 10 <sup>-3</sup>                               | Fenol                                    | Intermedjarju Kimiku                       |
| 2                | Kempferolina             | 520-18-3   | POŽ                           | 1,36 × 10 <sup>-7</sup>                     | 1,21 × 10 <sup>-6</sup>                     | 10-11 – 10-5                 | 3,99 × 10 <sup>-6</sup>                            | 3,49 × 10 <sup>-3</sup>                               | Flavonojde, Kompost Eletroċikliku        | Prodott Naturali                           |
| 3                | Ftalat tal-butilbenzil   | 85-68-7    | POŽ                           | 1,14 × 10 <sup>-6</sup>                     | 4,11 × 10 <sup>-6</sup>                     | 10-11 – 10-5                 | 1,98 × 10 <sup>-6</sup>                            | 3,20 × 10 <sup>-4</sup>                               | Aċidu Karbossiliku, Ester, Aċidu Ftaliku | Plastifikant, Sustanza Kimika Industrijali |
| 4                | p,p'-Metossiklor         | 72-43-5    | POŽ                           | 1,23 × 10 <sup>-6</sup>                     | -                                           | 10-11 – 10-5                 | 1,92 × 10 <sup>-6</sup>                            | 2,89 × 10 <sup>-3</sup>                               | Idrokarbur (Aloġenat)                    | Pestiċida, Aġent Veterinarju               |
| 1                | Etil paraben             | 120-47-8   | POŽ                           | 5,00 × 10 <sup>-6</sup>                     | -                                           | 10-11 – 10-5                 | 2,48 × 10 <sup>-5</sup>                            | 6,02 × 10 <sup>-3</sup>                               | Aċidu Karbossiliku, Fenol                | Farmaċewtiku, Preservattiv                 |
| 17               | Atrazina                 | 1912-24-9  | NEG                           | -                                           | -                                           | 10-10 – 10-4                 | -                                                  | 4,64 × 10 <sup>-4</sup>                               | Kompost Eteroċikliku                     | Erbċida                                    |
| 20               | Spironolattone           | 52-01-7    | NEG                           | -                                           | -                                           | 10-11 – 10-5                 | -                                                  | 2,40 × 10 <sup>-3</sup>                               | Latton, Sterojde                         | Farmaċewtiku                               |
| 21               | Ketokonażol              | 65277-42-1 | NEG                           | -                                           | -                                           | 10-11 – 10-5                 | -                                                  | 9,41 × 10 <sup>-5</sup>                               | Kompost Eteroċikliku                     | Farmaċewtiku                               |
| 22               | Reserpina                | 50-55-5    | NEG                           | -                                           | -                                           | 10-11 – 10-5                 | -                                                  | 1,64 × 10 <sup>-3</sup>                               | Kompost Eteroċikliku Indol               | Farmaċewtiku, Aġent Veterinarju            |

Abbrevjazzjonijiet: CASRN = Numru tar-Registru tas-Servizz tat-Taqsiriet tas-Sustanzi Kimiċi; EC50 = konċentrazzjoni effettiva medjana tas-sustanza tat-test; NEG = negattiv; POŽ = pożittiv; PC10 (u PC50) = il-konċentrazzjoni ta' sustanza tat-test li fiha r-rispons ikun 10 % (jew 50 % għall-PC50) tar-rispons indott mill-kontroll pożittiv (E2, 1nM) f'kull pjastra.

- 1 Klassifikazzjoni bhala pozittiv jew negattiv ghal attività agonista tal-ER kienet ibbażata fuq id-Dokumenti ta' Rieżami ta' Sfond (BRD) tal-ICCVAM għall-assaġġi tal-Irbid tal-ER u AT (31) kif ukoll fuq *data* empirika u informazzjoni ohra miksuba minn studji ta' riferiment ppubblikati u rieżaminati wara t-tlestija tal-BRDs tal-ICCVAM.  
(2) (3) (18) (31) (32) (33) (34).
- 2 Valuri rrapportati fl-Abbozz tar-Rapport ta' Prevalidazzjoni u Validazzjoni Interlaboratorji għall-Assaġġ ta' Attivazzjoni Traskrizzjonali (TA) Transfettata biex tiġi Individwata Attività Estrogenika - L-Assaġġ tal-Ġene Indikatur Medjat Alfa tar-Reċettur tal-Estroġenu Uman BI-Użu tal-Linja Ċelolari hER-HeLa-9903 (30).
- 3 Il-valuri medji tal-EC50 gew ikkalkolati bil-valuri rrapportati mil-laboratorji tal-istudju ta' validazzjoni tat-TA tal-ER VM7Luc (XDS, ECVAM u Hiyoshi) (3).
- 4 Konċentrazzjonijiet rrapportati kienu l-ogħla konċentrazzjonijiet ittestjati (sejbien tal-medda) matul il-validazzjoni tal-Assaġġ TA tal-ER VM7Luc. Jekk il-konċentrazzjonijiet varjaw bejn il-laboratorji, tiġi rrapportata l-ogħla konċentrazzjoni. Ara t-tabella 4-10 tar-Rapport ta' Evalwazzjoni tal-Metodu ta' Ttestjar tal-ICCVAM; Il-Metodu ta' Ttestjar LUMI-Cell®ER (TA tal-ER VM7Luc): Assaġġ *In Vitro* għall-Identifikazzjoni tal-Attività Agonista u Antagonista tar-Riċettur tal-Estroġenu Uman tas-Sustanzi Kimiċi (3).
- 5 Is-sustanzi ġew assenjati fi klassi kimika waħda jew aktar bl-użu tal-Intestaturi tas-Suġġetti Mediċi (MeSH) tal-Librerija Nazzjonali tal-Mediċina tal-Istati Uniti, skema ta' klassifikazzjoni standardizzata rikonoxxuta fil-livell internazzjonali (disponibbli fuq: <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).
- 6 Is-sustanzi ġew assenjati fi klassi waħda jew aktar ta' prodott bl-użu tal-Bażi ta' *Data* tas-Sustanzi Perikolużi tal-Librerija Nazzjonali tal-Mediċina tal-Istati Uniti (disponibbli fuq: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).
- 7 Mit-Tabella 1 (Lista ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza (22) għall-Evalwazzjoni tal-Akkuratezza tal-Agonisti tal-ER) tal-Istandards tal-Prestazzjoni (6)
- 8 Jekk sustanza ta' profiċjenza ma għadhiex kummerċjalment disponibbli, tista' tintuża sustanza bl-istess klassifikazzjoni u b'potenza, b'modalità ta' azzjoni u bi klassi kimika komparabbli.

**Tabella 4:** Lista ta' (10) Sustanzi ta' Proficjenza għall-assaġġ tal-antagonisti

|    | Sustanza <sup>a</sup> | CASRN      | Assaġġ STTA tal-ER <sup>1</sup> |                        |                              | Assaġġ TA tal-ER VM7Luc <sup>2</sup> |                                   |                                                       | Effetti tal-Kandidat tal-STTA tal-ER <sup>1</sup> | ICCVAM <sup>5</sup> Klassifikazzjoni tal-Kunsens | MeSH <sup>6</sup> Klassi Kimika   | Klassi tal-Prodott <sup>7</sup>                                  |
|----|-----------------------|------------|---------------------------------|------------------------|------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------------------------------------|
|    |                       |            | Attività TA tal-ER              | IC <sub>50</sub> (M)   | Medda ta' Konċ. tat-test (M) | Attività TA tal-ER                   | IC <sub>50</sub> <sup>3</sup> (M) | L-Oghla Konċ. għas-Sejbien tal-Medda (M) <sup>4</sup> |                                                   |                                                  |                                   |                                                                  |
| 1  | 4-idrossitamossifen   | 68047-06-3 | POŽ                             | $3,97 \times 10^{-9}$  | $10^{-12} - 10^{-7}$         | POŽ                                  | $2,08 \times 10^{-7}$             | $2,58 \times 10^{-4}$                                 | POŽ moderati                                      | POŽ                                              | Idrokarbur (Ċikliku)              | Farmaċewtiku                                                     |
| 2  | Ralossifen HCl        | 82640-04-8 | POŽ                             | $7,86 \times 10^{-10}$ | $10^{-12} - 10^{-7}$         | POŽ                                  | $1,19 \times 10^{-9}$             | $1,96 \times 10^{-4}$                                 | POŽ moderati                                      | POŽ                                              | Idrokarbur (Ċikliku)              | Farmaċewtiku                                                     |
| 3  | Tamossifen            | 10540-29-1 | POŽ                             | $4,91 \times 10^{-7}$  | $10^{-10} - 10^{-5}$         | POŽ                                  | $8,17 \times 10^{-7}$             | $2,69 \times 10^{-4}$                                 | POŽ                                               | POŽ                                              | Idrokarbur (Ċikliku)              | Farmaċewtiku                                                     |
| 4  | 17β-estradijoli       | 50-28-2    | NEG                             | -                      | $10^{-9} - 10^{-4}$          | NEG                                  | -                                 | $3,67 \times 10^{-3}$                                 | biex ikunu negattivi*                             | NP                                               | Sterojde                          | Farmaċewtiku, Aġent Veterinarju                                  |
| 5  | Apigenin              | 520-36-5   | NEG                             | -                      | $10^{-9} - 10^{-4}$          | NEG                                  | -                                 | $3,70 \times 10^{-4}$                                 | NEG                                               | NEG                                              | Kompost Eteroċikliku              | Kolorant, Prodott Naturali, Intermedjarju Farmaċewtiku           |
| 6  | Ftalat tad-di-n-butyl | 84-74-2    | NEG                             | -                      | $10^{-8} - 10^{-3}$          | NEG                                  | -                                 | $3,59 \times 10^{-3}$                                 | NEG                                               | NEG                                              | Ester, Aċidu Ftaliku              | Ingredjent Kozmetiku, Sustanza Kimika Industrijali, Plastifikant |
| 7  | Flavon                | 525-82-6   | NEG                             | -                      | $10^{-8} - 10^{-3}$          | NEG                                  | -                                 | $4,50 \times 10^{-4}$                                 | biex ikunu negattivi*                             | NP                                               | Flavonojdi, Kompost Eletroċikliku | Prodott Naturali, Farmaċewtiku                                   |
| 8  | Ġenisteina            | 446-72-0   | NEG                             | -                      | $10^{-9} - 10^{-4}$          | NEG                                  | -                                 | $3,70 \times 10^{-4}$                                 | biex ikunu negattivi*                             | NEG                                              | Flavonojdi, Kompost Eletroċikliku | Prodott Naturali, Farmaċewtiku                                   |
| 9  | p-n-nonilfenol        | 104-40-5   | NEG                             | -                      | $10^{-9} - 10^{-4}$          | NEG                                  | -                                 | $4,54 \times 10^{-4}$                                 | mhux ittestjat                                    | NEG                                              | Fenol                             | Intermedjarju Kimiku                                             |
| 10 | Resveratrol           | 501-36-0   | NEG                             | -                      | $10^{-8} - 10^{-3}$          | NEG                                  | -                                 | $4,38 \times 10^{-4}$                                 | biex ikunu                                        | NEG                                              | Idrokarbur                        | Prodott Naturali                                                 |

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |            |  |           |  |
|--|--|--|--|--|--|--|--|--|------------|--|-----------|--|
|  |  |  |  |  |  |  |  |  | negattivi* |  | (Ċikliku) |  |
|--|--|--|--|--|--|--|--|--|------------|--|-----------|--|

Abbrevjazzjonijiet: CASRN = Numru tar-Reġistru tas-Servizz tat-Taqsiriet tas-Sustanzi Kimiċi; M = molari; IC<sub>50</sub> = konċentrazzjoni inibitorja medjana tas-sustanza tat-test; NEG = negattivi; NP = negattivi preżunti; POŽ = pożittivi.

\* klassifikati negattivi skont ir-rieżami tad-dokumentazzjoni (2).

<sup>a</sup> Sustanzi komuni ttestjati fl-assaġġi STTA u TA tal-ER VM7Luc li ġew nominati antagonisti tal-ER jew negattivi u jintużaw biex tiġi evalwata l-akkuratezza fl-istudju ta' validazzjoni tat-TA tal-ER VM7Luc (2) (3).

<sup>1</sup> Ir-Rapport ta' Validazzjoni tal-Assaġġ ta' Attivazzjoni Traskrizzjonali transfettata b'Mod Stabbli biex tiġi Individwata Attività medjata mill-ER, Parti B (2)

<sup>2</sup> Rapport ta' Evalwazzjoni tal-Metodu ta' Ttestjar ICCVAM dwar il-Metodu ta' Ttestjar LUMI-CELL ER (TA tal-ER VM7Luc): Metodu *In Vitro* għall-Identifikazzjoni tal-Agonisti u tal-Antagonisti tal-ER (3).

<sup>3</sup> Il-valuri medji tal-EC<sub>50</sub> ġew ikkalkolati bil-valuri rapportati mil-laboratorji tal-istudju ta' validazzjoni tat-TA tal-ER VM7Luc (XDS, ECVAM u Hiyoshi) (3).

<sup>4</sup> Konċentrazzjonijiet rapportati kienu l-ogħla konċentrazzjonijiet ittestjati (sejbien tal-medda) matul il-validazzjoni tal-Assaġġ TA tal-ER VM7Luc. Jekk il-konċentrazzjonijiet varjaw bejn il-laboratorji, tiġi rrapportata l-ogħla konċentrazzjoni. Ara t-tabella 4-11 tar-Rapport ta' Evalwazzjoni tal-Metodu ta' Ttestjar tal-ICCVAM; Il-Metodu ta' Ttestjar LUMI-Cell@ER (TA tal-ER VM7Luc): Assaġġ *In Vitro* għall-Identifikazzjoni tal-Attività Agonista u Antagonista tar-Riċettur tal-Estroġenu Uman tas-Sustanzi Kimiċi (3).

<sup>5</sup> Klassifikazzjoni bħala antagonist tal-ER jew negattivi kienet ibbażata fuq informazzjoni fid-Dokumenti ta' Rieżami ta' Sfond (BRD) tal-ICCVAM għall-metodi ta' ttestjar tal-Irbid tal-ER u tat-TA (31) kif ukoll fuq informazzjoni miksuba minn pubblikazzjonijiet ippublikati u rieżaminati wara t-tlestija tal-BRDs tal-ICCVAM (2) (3) (18) (31).

<sup>6</sup> Is-sustanzi ġew assenjati fi klassi kimika wahda jew aktar bl-użu tal-Intestaturi tas-Suġġetti Mediċi (MeSH) tal-Librerija Nazzjonali tal-Mediċina tal-Istati Uniti, skema ta' klassifikazzjoni standardizzata rikonossuta fil-livell internazzjonali (disponibbli fuq <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

<sup>7</sup> Is-sustanzi ġew assenjati fi klassi wahda jew aktar ta' prodott bl-użu tal-Bank ta' Data tas-Sustanzi Perikolużi tal-Librerija Nazzjonali tal-Mediċina tal-Istati Uniti (disponibbli fuq <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).

### Kriterji ta' Aċċettabbiltà tas-Sessjoni tat-Test

16. Aċċettazzjoni jew rifjut ta' sessjoni tat-test huma bbażati fuq l-evalwazzjoni tar-rizultati miksuba għall-istandards referenzjarji u għall-kontrolli użati għal kull esperiment. Il-valuri għall-PC<sub>50</sub> (EC<sub>50</sub>) jew għall-IC<sub>50</sub> għall-istandards referenzjarji għandhom jissodisfaw l-kriterji ta' aċċettabbiltà kif previst għall-assaġġ magħżul (għall-STTA ara l-Appendiċi 2, għat-TA tal-ER VM7Luc ara l-Appendiċi 3), u l-kontrolli pożittivi/negattivi kollha għandhom ikunu klassifikati kif suppost għal kull esperiment aċċettat. Il-ħila ta' twettiq tal-assaġġ b'konsistenza għandha tintwera bl-iżvilupp u biż-żamma ta' bażi ta' *data* storika għall-istandards u għall-kontrolli referenzjarji (ara l-paragrafu 15). Id-devjazzjonijiet standard (SD) jew il-koeffiċjenti ta' varjazzjoni (CV) għall-parametri ta' dhul tal-kurva tal-istandards referenzjarji minn diversi esperimenti jistgħu jintużaw bħala kejl tar-riproduċibbiltà fi hdan il-laboratorju. Barra minn hekk, għandhom jiġu rispettati l-prinċipji li gejjin rigward il-kriterji ta' aċċettabbiltà:

- Id-*data* għandha tkun biżżejjed għal valutazzjoni kwantitattiva tal-attivazzjoni tal-ER (għall-assaġġ tal-agonisti) jew għat-trażżin tal-ER (għall-assaġġ tal-antagonisti) (jiġifieri l-effikaċja u l-potenza).
- L-attività indikatur medja għall-konċentrazzjoni ta' riferiment tal-estrogenu ta' riferiment għandha tkun tal-anqas il-minimu speċifikat fl-assaġġi fir-rigward ta' dak il-kontroll bil-veikolu (solvent) biex tiġi żgurata sensittività adegwata. Għall-assaġġi STTA u TA tal-ER VM7Luc, din hi erba' darbiet dik tal-kontroll bil-veikolu medju f'kull pjastra.
- Il-konċentrazzjonijiet ittestjati għandhom jibqgħu fi hdan il-medda ta' solubbiltà tas-sustanzi kimiċi tat-test u ma jurux ċitotossicità.

### Analizi tad-*data*

17. Il-proċedura definita ta' interpretazzjoni tad-*data* għal kull assaġġ għandha tintuża għall-klassifikazzjoni ta' rispons pożittiv u negattiv.

18. L-ilhuq tal-kriterji ta' aċċettabbiltà (il-paragrafu 16) jindika li l-assaġġ qed jopera kif suppost, iżda ma jiżgurax li kwalunkwe sessjoni tat-test partikolari tipproduċi *data* preċiża. Ir-replikar tar-rizultati tal-ewwel sessjoni hu l-aħjar indikazzjoni li tkun ġiet prodotta *data* preċiża. Jekk żewġ sessjonijiet jagħtu riżultati riproduttibbli (eż. ir-rizultati taż-żewġ sessjonijiet ta' test jindikaw li sustanza kimika tat-test hi pożittiva), ma hemmx bżonn li ssir it-tielet sessjoni.

19. Jekk żewġ sessjonijiet ma jagħtux riżultati riproduttibbli (eż. sustanza kimika tat-test tkun pożittiva f'sessjoni minnhom u negattiva fis-sessjoni l-oħra), jew jekk ikun meħtieġ grad

oghla ta' ċertezza rigward l-eżitu ta' dan l-assaġġ, tal-anqas għandhom isiru tliet sessjonijiet indipendenti. F'dan il-każ, il-klassifikazzjoni hi bbażata fuq iż-żewġ riżultati konkordanti mit-tlieta.

### **Kriterji ta' Interpretazzjoni tad-*Data* Ġenerali**

20. Bhalissa ma hemm ebda metodu miftiehem f'livell universali għall-interpretazzjoni tad-*data* tat-TA tal-ER. Madankollu, kemm il-valutazzjonijiet kwalitattivi (eż. pożittivi/negattivi) u/jew kwantitattivi (eż. EC<sub>50</sub>, PC<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub>) tal-attività medjata bl-ER għandhom ikunu bbażati fuq *data* empirika u ġudizzju xjentifiku solidu. Fejn possibbli, ir-riżultati pożittivi għandhom ikunu karatterizzati kemm mill-kobor tal-effett meta mqabbel mal-kontroll bil-veikolu (solvent) jew mal-estrogen ta' riferiment kif ukoll mill-konċentrazzjoni li fiha jsehh l-effett (eż. EC<sub>50</sub>, PC<sub>50</sub>, RPC<sub>Max</sub>, IC<sub>50</sub>, eċċ.).

### **Rapport tat-Test**

21. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

#### *Assaġġ:*

- L-assaġġ użat;
- Il-kontroll/L-istandard referenzjarju/Is-sustanza kimika tat-test
- is-sors, in-numru tal-lott, id-data ta' limitu għall-użu, jekk disponibbli
- l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test stess, jekk magħrufa;
- is-solubbiltà u l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test fis-solvent, jekk magħrufin;
- il-kejl tal-pH, tal-ożmolalità u tal-preċipitat fil-medium tat-tkabbir li miegħu żdiedet is-sustanza kimika tat-test, kif xieraq.

#### *Sustanza monokostitwenti:*

- id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma, u l-proprietajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali;
- l-identifikazzjoni kimika, bhall-isem IUPAC jew CAS, in-numru CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.

#### *Sustanza multikostitwenti, UVCBs u taħlitiet:*



- ikkaratterizzati sa fejn possibbli mill-identità kimika (ara aktar 'il fuq), l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprietajiet fizikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti.

*Solvent/Veikolu:*

- il-karatterizzazzjoni (natura, fornitur u lott);
- il-ġustifikazzjoni għall-għażla tas-solvent/tal-veikolu;
- is-solubbiltà u l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test fis-solvent/veikolu, jekk magħrufin;

*Ċelloli:*

- it-tip u s-sors taċ-ċelloli:
  - L-ER hu espress b'mod endoġenu? Jekk le, liema riċettur(i) ġie/ġew transfettat(i)?
  - Il-binja/binjiet indikatur(i) użata/i (inklużi l-ispeċijiet sors);
  - Il-metodu ta' transfezzjoni;
  - Il-metodu tal-għażla għaż-żamma ta' transfezzjoni stabbli (fejn applikabbli);
  - Il-metodu ta' transfezzjoni hu rilevanti għal linji stabbli?
- in-numru ta' passagġi taċ-ċelloli (mit-taħlil);
- in-numru ta' passagġi taċ-ċelloli fit-taħlil;
- il-metodi għaż-żamma tal-kolturi taċ-ċelloli;

*Il-kundizzjonijiet tat-test:*

- limitazzjonijiet tas-solubbiltà;
- deskrizzjoni tal-metodi ta' valutazzjoni tal-vijabbiltà applikati;
- komposizzjoni tal-media, konċentrazzjoni tas-CO<sub>2</sub>;
- konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test;
- volum tal-veikolu u tas-sustanza kimika tat-test miżjuda;
- it-temperatura tal-inkubazzjoni u l-umdità;

- id-durata tat-trattament;
- id-densità fil-bidu tat-trattament u matulu;
- standards referenzjarji pożittivi u negattivi;
- reaġenti indikaturi (isem tal-prodott, fornitur u lott);
- kriterji biex is-sessjonijiet ta' testijiet jitqiesu bħala pożittivi, negattivi jew ekwivoċi;

#### *Kontroll tal-aċċettabbiltà:*

- l-induzzjonijiet tad-drabi għal kull pjastra tal-assaġġ u jekk dawn jissodisfawx il-minimu mehtieg mill-assaġġ fuq il-bażi tal-kontrolli storiċi;
- il-valuri propji għall-kriterji ta' aċċettabbiltà, eż.  $\log_{10}EC_{50}$ ,  $\log_{10}PC_{50}$ ,  $\log IC_{50}$  u l-valuri Hillslope, għal kontrolli pożittivi konkorrenti/standards referenzjarji;

#### *Ir-riżultati:*

- *data* mhux proċessata u normalizzata;
- il-livell massimu ta' induzzjoni tad-drabi;
- *data* dwar iċ-ċitotossicità;
- jekk teżisti, l-anqas konċentrazzjoni effettiva (LEC);
- il-valuri  $RPC_{Max}$ ,  $PC_{Max}$ ,  $PC_{50}$ ,  $IC_{50}$  u/jew  $EC_{50}$ , kif ikun xieraq;
- ir-relazzjoni konċentrazzjoni rispons, fejn possibbli,
- analizijiet statistiċi, jekk jeżistu, flimkien ma' kejl tal-errur u tal-kunfidenza (eż. SEM, SD, CV jew 95 % CI) u deskrizzjoni ta' kif inkisbu dawn il-valuri;

#### *Diskussjoni tar-riżultati*

#### *Konklużjoni*

## DOKUMENTAZZJONI

- (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.), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.
- (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), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.
- (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. u 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.), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.
- (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.), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.
- (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.), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

- (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. u 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  $\beta$  - 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  $\beta$  (hER $\beta$ ) and its Heterodimerization with ER $\alpha$  *In Vivo* and *In Vitro*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 243(1): p. 122-126.

- (22) Enmark E. *et al.* (1997). Human Estrogen Receptor  $\beta$ -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. u Buensuceso A.V. (2010). Minireview: Estrogen Receptor- $\beta$ : 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. u 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. u 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.

## Appendiċi 1

### DEFINIZZJONIJIET U ABBREVJAZZJONIJIET

**Kriterji ta' aċċettabbiltà:** L-istandards minimi għat-twettiq tal-kontrolli sperimentali u l-istandards referenzjarji. Il-kriterji ta' aċċettabbiltà kollha għandhom jiġu ssodisfati biex esperiment jitqies validu.

**Akkuratezza (konkordanza):** Il-qrubija fil-livell ta' qbil bejn ir-riżultati tal-assaġġ u l-valuri referenzjarji aċċettati. Hi kejl tal-prestazzjoni tal-assaġġ u wiehed mill-aspetti ta' rilevanza. Spiss it-terminu jintuża b'mod alternanti ma' "konkordanza" biex ifisser il-proporzjon ta' riżultati korretti ta' assaġġ (20).

**Agonist:** Sustanza li tipproduċi rispons, eż. traskrizzjoni, meta tillega ma' reċettur speċifiku.

**Antagonist:** Tip ta' ligand ta' reċettur jew ta' sustanza kimika li ma jipprovokax rispons bijoloġiku hu stess meta jillega ma' reċettur, iżda jimblokka jew itaffi risponsi medjati minn agonist.

**Attività antiestroġenika,** il-kapaċità ta' sustanza kimika li trażzan l-azzjoni ta' 17 $\beta$ -estradjol medjata permezz tar-riċetturi tal-estroġenu.

**Morfoloġija taċ-ċelloli:** Il-forma u d-dehra ta' ċelloli mkabbra f'monosaff fi bwejra waħda ta' pjastra tal-koltura tat-tessuti. Ċelloli li jkunu qed jinxfu spiss juru morfoloġija anormali taċ-ċelloli.

**CF:** Il-Qafas Kuncettwali tal-OECD għall-Ittestjar u għall-Evalwazzjoni tal-Interferenti Endorkinali.

**Trattament bil-faham/bid-dekstran:** Trattament ta' serum użat f'koltura taċ-ċelloli. Trattament bil-faham/bid-dekstran (spiss imsejjah "strippaġġ") inehhi l-ormoni endoġeni u l-proteini li jillegaw mal-ormoni.

**Sustanza kimika:** Sustanza jew tahlita.

**Ċitotossicità:** Effetti dannużi fl-istruttura jew fil-funzjoni ċellolari li finalment jistgħu jikkawżaw mewt taċ-ċelloli u jistgħu jkunu riflessi bi tnaqqis fin-numru ta' ċelloli preżenti fil-bwejra fi tmiem il-perjodu ta' esponiment jew tnaqqis fil-kapaċità għal kejl ta' funzjoni

ċellolari meta mqabbla mal-kontroll b'veikolu konkorrenti.

**CV:** Koeffiċjent ta' varjazzjoni

**DCC-FBS:** Serum bovin fetali trattat bil-faħam miksi bid-dekstran.

**DMEM:** Modifika ta' Dulbecco tal-Medium ta' Eagle

**DMSO:** Sulfossidu tad-dimetil

**E2:** 17 $\beta$ -estradijoli

**EC<sub>50</sub>:** Il-koncentrazzjoni effettiva medjana ta' sustanza kimika tat-test.

**ED:** Interferenza endokrinale

**hER $\alpha$ :** Riċettur alfa tal-estrogeni umani

**hER $\beta$ :** Riċettur beta tal-estrogeni umani

**EFM:** Medium hieles mill-estrogeni. Il-Modifika ta' Dulbecco tal-Medium ta' Eagle (DMEM) supplimentat b'4,5 % FBS trattat bil-faħam/bid-dekstran, 1,9 % L-glutamina, u 0,9 % Pen-Strep.

**ER:** Riċettur tal-Estrogeni

**ERE:** Element ta' rispons tal-estrogeni

**Attività estrogenika:** Il-kapaċità ta' sustanza kimika li timita 17 $\beta$ -estradijoli fil-hila tiegħu li jillega ma' riċetturi tal-estrogeni u jattivahom. L-attività estrogenika medjata minn hER $\alpha$  tista' tiġi individwata b'dan il-metodu ta' ttestjar.

**ERTA:** Trans Attivazzjoni tar-Riċettur tal-Estrogeni

**FBS:** Serum bovin fetali



**HeLa:** Linja ta' ċelloli ċervikali umana immortali

**HeLa9903:** Subklon taċ-ċellola HeLa li fih hER $\alpha$  u ġene indikatur tal-luċiferażi jkunu ġew transfettati b'mod stabbli

**IC<sub>50</sub>:** Il-konċentrazzjoni effettiva medjana ta' sustanza kimika tat-test inibitorja.

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

**Riproduċibbiltà interlaboratorja:** Kejl ta' kemm laboratorji kwalifikati differenti, li jużaw l-istess protokoll u li jittestjaw l-istess sustanzi, jistgħu jipproduċu riżultati kwalitattivament u kwantitattivament simili. Ir-riproduċibbiltà interlaboratorja hi determinata matul il-proċessi ta' qabel il-validazzjoni u tal-validazzjoni, u tindika kemm assaġġ jista' jiġi trasferit b'suċċess bejn laboratorji, u din tissejjaħ ukoll riproduċibbiltà bejn laboratorji (1).

**Riproduċibbiltà intralaboratorja:** Determinazzjoni ta' kemm persuni kwalifikati fi ħdan l-istess laboratorju jistgħu jirreplikaw b'suċċess ir-riżultati billi jużaw protokoll speċifiku f'ħinijiet differenti. Din tissejjaħ ukoll "riproduċibbiltà fi ħdan il-laboratorju" (1).

**LEC:** L-anqas konċentrazzjoni effettiva hi l-anqas konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li tipproduċi rispons (jiġifieri l-anqas konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li fiha l-induzzjoni tad-drabi tkun statistikament differenti mill-kontroll bil-veikolu konkorrenti).

**Test me-too:** Espressjoni kollokwjali għal assaġġ li jkun strutturalment u funzjonalment simili għal metodu ta' ttestjar ta' riferiment validat u aċċettat. Jintuża b'mod alternanti ma' metodu ta' ttestjar simili.

**MT:** Metallojtjonein

**MMTV:** Vajrus tat-Tumur Mammarju fil-Ġrieden

**OHT:** 4-Idrossitamossifen

**PBTG:** Linja Gwida tat-Test Ibbazata fuq il-Prestazzjoni

**PC (Kontroll pożittiv):** sustanza attiva hafna, idealment 17 $\beta$ -estradijoli, li tkun inkluża fit-testijiet kollha biex tgħin fl-iżgurar ta' funzjonament xieraq tal-assaġġ.

**PC<sub>10</sub>:** il-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li fiha l-attività mkejla f'assaggj agonist tkun 10 % tal-attività massima indotta mill-PC (E2 f' 1nM għall-assaggj STTA) f'kull pjastra.

**PC<sub>50</sub>:** il-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li fiha l-attività mkejla f'assaggj agonist tkun 50 % tal-attività massima indotta mill-PC (E2 fil-konċentrazzjoni ta' riferiment speċifikata fil-metodu ta' ttestjar) f'kull pjastra.

**PC<sub>Max</sub>:** il-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li tinduċi l-RPCMax

**Standards tal-prestazzjoni:** Standards, ibbażati fuq assaggj validu, li jipprovdu bażi għall-evalwazzjoni tal-komparabbiltà ta' assaggj propost li hu simili b'mod funzjonali u mekkanistiku. Inklużi hemm (1) il-komponenti essenzjali tal-assaggj; (2) lista minima ta' sustanzi kimiċi ta' riferiment magħżula minn fost is-sustanzi kimiċi użati biex tintwera l-prestazzjoni aċċettabbli tal-metodu ta' ttestjar validat; u (3) il-livelli komparabbli ta' akkuratezza u ta' affidabbiltà, fuq il-baży ta' dak li nkiseb għall-assaggj validat, li l-metodu ta' ttestjar propost għandu juri meta evalwat bl-użu tal-lista minima ta' sustanzi kimiċi ta' riferiment (1).

**Sustanzi ta' profiċjenza:** Subsett tas-sustanzi ta' riferiment inklużi fl-Istandards tal-Prestazzjoni li jistgħu jintużaw mil-laboratorji biex tintwera kompetenza teknika b'metodu ta' ttestjar standardizzat. Il-kriterji tal-għażla għal dawn is-sustanzi tipikament jinkludu li daww jirrappreżentaw il-medda ta' risponsi, ikunu kummerċjalment disponibbli, u jkollhom *data* ta' riferiment ta' kwalità għolja disponibbli.

**Profiċjenza:** Il-hila murija biex jitwettaq assaggj kif suppost qabel l-ittestjar ta' sustanza mhux magħrufa.

**Estroġenu ta' riferiment (Kontroll pożittiv, PC):** 17β-estradijoli (E2, CAS 50-28-2).

**Standard ta' riferiment:** sustanza ta' riferiment użata biex tintwera l-adegwatezza ta' assaggj. 17β-estradijoli hu l-istandard referenzjarju għall-assaggj STTA u TA tal-ER VM7Luc.

**Metodi ta' ttestjar ta' riferiment:** L-assaggj li fuqhom hi bbażata PBTG 455.

**Rilevanza:** Deskrizzjoni tar-relazzjoni ta' assaggj mal-effett ta' interess u jekk huwiex sinifikanti u utli għal skop partikolari. Din tiddetermina kemm l-assaggj għandu l-hila jkejjel jew ibassar b'mod korrett l-effett bijoloġiku ta' interess. Ir-rilevanza tinkorpora l-kunsiderazzjoni tal-akkuratezza (konkordanza) ta' assaggj (1).

**Affidabbiltà:** Kejl ta' kemm assaġġ jista' jitwettaq b'mod riproduttibbli fil-laboratorji u bejn il-laboratorji tul iż-żmien, meta jitwettaq billi jintuża l-istess protokoll. Din tiġi evalwata billi tkun ikkalkolata r-riproduttività ta' fost u bejn il-laboratorji.

**RLU:** Unitajiet tad-Dawl Relattivi

**RNA:** Aċidu Ribonukleiku

**RPC<sub>Max</sub>:** il-livell massimu ta' rispons indott minn sustanza kimika tat-test, espress bħala perċentwal tar-rispons indott minn 1 nM E2 fuq l-istess pjastra

**RPMI:** Medium RPMI 1640 supplimentat b'0,9 % Pen-Strep u 8,0 % serum bovin fetali (FBS)

**Sessjoni:** Esperiment individwali li jevalwa l-azzjoni kimika fuq l-eżitu bijoloġiku tal-assaġġ. Kull sessjoni tkun esperiment komplut fuq bwejriet repliki ta' ċelloli pjastrati minn raggruppament komuni ta' ċelloli fl-istess hin.

**Sessjoni indipendenti:** Esperiment separat, indipendenti li jevalwa l-azzjoni kiika fuq l-eżitu bijoloġiku tal-assaġġ, bl-użu ta' ċelloli minn raggruppament differenti, sustanzi kimiċi dilwiti friski, imwettaq f'jiem differenti jew fl-istess jum minn persunal differenti.

**SD:** Devjazzjoni standard.

**Sensittività:** Il-proporzjon tas-sustanzi pożittivi/attivi kollha li huma klassifikati kif suppost mill-assaġġ. Hi kejl tal-preċiżjoni għal assaġġ li jipproduċi riżultati kategorici, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' assaġġ (1).

**Speċificità:** Il-proporzjon tas-sustanzi negattivi/inattivi kollha li huma klassifikati kif suppost mit-test. Hi kejl tal-preċiżjoni għal assaġġ li jipproduċi riżultati kategorici, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' assaġġ (1).

**Transfezzjoni stabbli:** Meta d-DNA jiġi transfettat f'ċelloli kulturati b'tali mod li jiġi integrat b'mod stabbli fil-ġenoma ta' ċelloli, li jirriżulta fl-espressjoni stabbli ta' ġeni transfettati. Kloni ta' ċelloli transfettati stabbilment jintgħazlu minn markaturi stabbli (eż. rezistenza għall-G418).

**Assaġġ STTA:** Assaġġ ta' Transattivazzjoni Transfettata b'Mod Stabbli, l-assaġġ ta' attivazzjoni traskrizzjonali tal-ER $\alpha$  li juża l-Linja ta' Ċelloli HeLa 9903.

**Studju:** Il-medda shiha ta' hidma sperimentali mwettqa biex tigi evalwata sustanza wahda speċifika bl-użu ta' assaġġ speċifiku. Studju jinkludi l-istadji kollha inklużi t-testijiet ta' dilwizzjoni tas-sustanza tat-test fil-media tat-test, sessjonijiet preliminari ta' sejbien tal-medda, is-sessjonijiet komprensivi neċessarji kollha, l-analiżijiet tad-*data*, l-assigurazzjoni tal-kwalità, il-valutazzjonijiet taċ-ċitotossicità, eċċ. It-tlestija ta' studju tippermetti l-klassifikazzjoni tal-attività tas-sustanza kimika tat-test fuq il-mira ta' tossicità (jiġifieri attiva, inattiva jew inkonklużiva) li tkun evalwata mill-assaġġ użat u stima tal-potenza relattiva għas-sustanza kimika ta' riferiment pożittiva.

**Sustanza:** Skont REACH<sup>12</sup>, sustanza hi definita bħala element kimiku u l-komposti tiegħu fl-istat naturali jew mislut minn kwalunkwe proċess ta' manifattura, li jinduċi kull addittiv neċessarju għall-preżervazzjoni tal-istabbiltà tiegħu u kwalunkwe impurità li tirriżulta mill-proċess użat, iżda bl-esklużjoni ta' kull solvent li jista' jkun separat mingħajr ma tkun effettwata l-istabbiltà tas-sustanza jew mibdula l-kompożizzjoni tagħha. Tintuża definizzjoni simili hafna fil-kuntest tal-GHS tan-NU (1).

**TA (Transattivazzjoni):** It-tnedija tas-sinteżi tal-mRNA bħala rispons għal sinjal kimiku speċifiku, bħal irbit ta' estrogenu mar-riċettur tal-estrogenu

**Assaġġ:** Fi hdan il-kuntest ta' dan il-metodu ta' ttestjar, assaġġ hu wahda mill-metodoloġiji bħala validi fl-issodisfar tal-kriterji ta' prestazzjoni spjegati. Il-komponenti tal-assaġġ jinkludu, pereżempju, il-linja ta' ċelloli speċifika bil-kundizzjonijiet ta' tkabbir assoċjati, il-media speċifiċi li fihom jitwettaq it-test, il-kundizzjonijiet tal-kompożizzjoni tal-pjastri, l-arrangament u d-dilwizzjonijiet tas-sustanzi kimiċi tat-test flimkien ma' kwalunkwe miżura ta' kontroll tal-kwalità meħtieġa oħra u l-istadji ta' evalwazzjoni tad-*data* assoċjati.

**Sustanza kimika tat-test:** Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

**Traskrizzjoni:** Sinteżi tal-mRNA

---

<sup>12</sup> Ir-Regolament (KE) Nru 1907/2006 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tat-18 ta' Diċembru 2006 dwar ir-registrazzjoni, il-valutazzjoni, l-awtorizzazzjoni u r-restrizzjoni ta' sustanzi kimiċi (REACH), li jistabbilixxi Aġenzija Ewropea għas-Sustanzi Kimiċi, li jemenda d-Direttiva 1999/45/KE u li jhassar ir-Regolament (KEE) Nru 793/93 tal-Kunsill u r-Regolament (KE) Nru 1488/94 tal-Kummissjoni kif ukoll id-Direttiva 76/769/KEE tal-Kunsill u d-Direttivi 91/155/KEE, 93/67/KEE, 93/105/KE u 2000/21/KE tal-Kummissjoni (ĠU L 304, 22.11.2007, p. 1).

**UVCB:** Sustanzi Kimiċi b'Kompożizzjoni Mhux Maghrufa jew Varjabbli, Prodotti jew Materjali Bijoloġiċi b'Reazzjoni Kumplessa

**Metodu ta' ttestjar validat:** Assaġġ li għalih ikunu tlestew studji ta' validazzjoni biex tiġi determinata r-rilevanza (inkluża l-akkuratezza) u l-affidabbiltà għal għan speċifiku. Ta' min jinnota li jista' jkun li metodu ta' ttestjar validat ma jkollux prestazzjoni tajba biżżejjed f'termini ta' akkuratezza u ta' affidabbiltà biex jitqies aċċettabli għall-għan propost (1).

**Validazzjoni:** Il-proċess li bih l-affidabbiltà u r-rilevanza ta' approċċ, ta' metodu, ta' assaġġ, ta' proċess jew ta' valutazzjoni partikolari jkunu stabbiliti għal għan definit (1).

**VC (Kontroll bil-veikolu):** Is-solvent li jintuża biex jiġu dissolti s-sustanzi kimiċi tat-test u tal-kontroll jiġi ttestjat unikament b'hal veikolu mingħajr sustanza kimika dissolta.

**VM7:** Ċellola tal-adenokarċinoma immortalizzata li tesprimi b'mod endoġenu r-riċettur tal-estrogeni.

**VM7Luc4E2:** Il-linja ta' ċelloli VM7Luc4E2 ġiet derivata miċ-ċelloli tal-adenokarċinoma immortalizzati derivati mill-bniedem VM7 li jesprimu b'mod endoġenu  $\alpha$ - $\beta$  forom tar-riċettur tal-estrogeni (ER $\alpha$  u ER $\beta$ ) u ġew transfettati b'mod stabbli bil-plażmid pGudLuc7.ERE. Dan il-plażmid fih erba' kopji ta' oligonukleotid sintetiku li fih l-element ta' rispons tal-estrogeni upstream mill-promotur virali tat-tumur mammarju fil-ġrieden (MMTV) u l-gene tal-luċiferazi tal-firefly.

**Kontroll pożittiv dgħajjed:** Sustanza attiva b'mod dgħajjed magħzula mil-lista ta' sustanzi kimiċi ta' riferiment li tkun inkluża f'it-testijiet kollha biex tgħin fl-iżgurar ta' funzjonament xieraq tal-assaġġ.

## **Appendiċi 2**

### **ASSAĠĠ TA' TRANSATTIVAZZJONI TAR-RIĊETTUR-A TAL-ESTROĠENU UMAN TRANSFETTAT B'MOD STABBLI GHAD-DETEZZJONI TA' ATTIVITÀ AGONISTA U ANTAGONISTA TA' SUSTANZI KIMIĊI BL-UŻU TAL-LINJA TA' ĊELLOLI HERA-HELA-9903**

#### **KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET (ARA WKOLL INTRODUZZJONI ĠENERALI)**

1. Dan l-assaġġ tat-transattivazzjoni (TA) juża l-linja ta' ċelloli hER $\alpha$ -HeLa-9903 biex jindividwa attività agonista estrogenika medjata permezz tal-alfa tar-riċettur tal-estrogeni uman (hER $\alpha$ ). L-istudju ta' validazzjoni tal-Assaġġ ta' Transattivazzjoni Transfettata b'Mod Stabbli (STTA) mill-Japanese Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI) bl-użu tal-linja ta' ċelloli hER $\alpha$ -HeLa-9903 għad-detezzjoni ta' attività agonista u antagonista estrogenika medjata permezz tal-alfa tar-riċettur tal-estrogeni uman (hER $\alpha$ ) wera r-rilevanza u l-affidabbiltà tal-assaġġ għall-għan maħsub tiegħu (1).
2. Dan l-assaġġ hu mfassal b'mod speċifiku biex jindividwa TA medjata minn hER $\alpha$  billi jkejjel il-kemiluminexxenza bħala l-punt ta' tmiem. Madankollu, sinjali ta' luminexxenza medjata mhux minn riċettur ġew rapportati f'konċentrazzjonijiet ta' fitoestrogeni oġġla minn 1  $\mu$ M minhabba l-attivazzjoni eċċessiva tal-gene indikatur tal-luċiferażi (2) (3). Filwaqt li l-kurva ta' doża - rispons tindika li l-attivazzjoni vera tas-sistema tal-ER isseħħ f'konċentrazzjonijiet inferjuri, l-espressjoni tal-luċiferażi miksuba f'konċentrazzjonijiet oġġla ta' fitoestrogeni jew ta' komposti simili suspettati li jipproduċu attivazzjoni eċċessiva simili għal fitoestrogeni tal-gene indikatur tal-luċiferażi trid tiġi eżaminata bir-reqqa f'sistemi tal-assaġġ TA tal-ER transfettati b'mod stabbli (Appendiċi 1).
3. Għandhom jinqraw it-taqsimiet "INTRODUZZJONI ĠENERALI" u "KOMPONENTI TAL-ASSAĠĠ TA TAL-ER" qabel ma dan l-assaġġ jintuża għal finijiet regolatorji. Id-definizzjonijiet u l-abbrevjazzjonijiet użati f'din it-TG huma deskritti fl-Appendiċi 2.1.

#### **PRINĊIPJU TAL-ASSAĠĠ (ARA WKOLL INTRODUZZJONI ĠENERALI)**

4. L-assaġġ jintuża biex jissenjala rbit tar-riċettur tal-estrogeni ma' ligand. Wara l-irbit mal-ligand, il-kumpless riċettur-ligand jitttrażloka għan-nukleu fejn hu jillega elementi speċifiċi ta' rispons tad-DNA u jittransattiva gene indikatur tal-luċiferażi tal-firefly, li jirriżulta

f'espressjoni ċellolari miżjuda tal-enzima luċiferażi. Il-luċiferin hu substrat li jiġi trasformat mill-enzima luċiferażi fi prodott tal-bijoluminexxenza li jista' jitkejjel b'mod kwantitattiv b'luminometru. L-attività tal-luċiferażi tista' tiġi evalwata malajr u minghajr ma jintefqu wisq flus b'numru ta' kits tat-test disponibbli kummerċjalment.

5. Is-sistema tat-test tuża l-linja ta' ċelloli hER $\alpha$ -HeLa-9903, li hi derivata minn tumor ċervikali uman, b'żewġ binjiet imdaħħla b'mod stabbli: (i) il-binja tal-espressjoni tal-hER $\alpha$  (li tikkodifika r-riċettur uman b'tul shiħ), u (ii) binja indikatur tal-luċiferażi tal-firefly li ġġarrab hames ripetizzjonijiet tandem ta' Element Risponsiv għall-Estroġenu (ERE) tal-vitellogenin xprunat minn element TATA promotur tal-metallotjonein (MT) tal-ġrieden. Intwera li l-binja tal-gene TATA MT tal-ġrieden għandha l-aħjar prestazzjoni, u b'hekk tintuża ta' spiss. Konsegwentement, din il-linja ta' ċelloli hER $\alpha$ -HeLa-9903 tista' tkejjel il-ħila ta' sustanza kimika tat-test li tinduċi transattivazzjoni medjata tal-hER $\alpha$  tal-espressjoni ġenika tal-luċiferażi.
6. Fil-każ ta' assaġġ tal-agonisti tal-ER, l-interpretazzjoni tad-*data* hi bbażata fuq jekk il-livell ta' rispons massimu indott minn sustanza kimika tat-test jilħaqx jew jaqbiżx rispons tal-agonist ekwivalenti għal 10 % ta' dak indott minn konċentrazzjoni li tinduċi massimalment (1 nM) tal-kontroll pożittiv (PC) 17 $\beta$ -estradijoli (E2) (jiġifieri l-PC10). Fil-każ tal-assaġġ tal-antagonisti tal-ER, l-interpretazzjoni tad-*data* hi bbażata fuq jekk ir-rispons jurix tal-anqas tnaqqis ta' 30 % fl-attività mir-rispons indott miż-żieda fil-kontroll (25 pM tal-E2) minghajr ċitotossicità. L-analiżi u l-interpretazzjoni tad-*data* huma diskussi fid-dettall fil-paragrafi 34 - 48.

## PROCEDURA

### Linja ta' Ċelloli

7. Il-linja ta' ċelloli trasferita b'mod stabbli hER $\alpha$ -HeLa-9903 għandha tintuża għall-assaġġ. Il-linja ta' ċelloli tista' tinkiseb mill-Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB) Cell Bank<sup>13</sup>, wara li jiġi ffirmat Ftehim ta' Trasferiment tal-Materjal (MTA).

---

<sup>13</sup> JCRB Cell Bank : National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Asagi Saito, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Japan Fax: +81-72-641-9812

8. Fl-ittestjar għandhom jintużaw biss ċelloli karatterizzati bħala ħielsa minn mikoplażma. RT-PCR (Reazzjoni Katina bil-Polimerazi f'Ħin Reali) hi l-metodu tal-għażla għal detezzjoni sensittiva ta' infezzjoni tal-mikoplażma (4) (5) (6).

### **Stabbiltà tal-linja ta' ċelloli**

9. Biex tiġi ssorveljata l-istabbiltà ta' linja ta' ċelloli, E2, 7 $\alpha$ -estradijoli, 17 $\alpha$ -metiltestosterone u kortikosteron għandhom jintużaw bħala l-istandards referenzjarji għall-assaġġ tal-agonisti u kurva shiħa konċentrazzjoni rispons fil-medda tal-konċentrazzjoni tat-test ipprovduta fit-Tabella 1 għandha titkejjel tal-anqas darba kull darba li jsir l-assaġġ, u r-riżultati għandhom ikunu jaqblu mar-riżultati pprovduti fit-Tabella 1.
10. Fil-każ ta' assaġġ tal-antagonisti, kurvi ta' konċentrazzjoni shah għal żewġ standards referenzjarji, tamossifen u flutammid, għandhom jitkejlu b'mod simultanju ma' kull sessjoni. Il-klassifikazzjoni kwalitattiva korretta bħala pożittiva jew negattiva għaž-żewġ sustanzi kimiċi għandha tiġi ssorveljata.

### **Koltura taċ-Ċelloli u Kundizzjonijiet tal-Pjastrament**

11. Iċ-ċelloli għandhom jinżammu f'Medium Essenzjali Minimu ta' Eagle (EMEM) mingħajr fenol aħmar, supplimentati b'60 mg/l ta' kanamiċina antibijotika u 10 % serum bovin fetal i trattat bil-faħam miksi bid-dekstran (DCC-FBS), f'inkubatur tas-CO<sub>2</sub> (5 % CO<sub>2</sub>) f'37 $\pm$ 1°C. Malli jilhqu konfluwenza ta' 75-90 %, iċ-ċelloli jistgħu jiġu subkolturati f'10 ml ta' 0,4 x 10<sup>5</sup> – 1 x 10<sup>5</sup> ċelloli/ml għal platt tal-koltura taċ-ċelloli ta' 100 mm. Iċ-ċelloli għandhom jiġu sospizi b'10 % FBS-EMEM (li hu l-istess bħall-EMEM b'DCC-FBS) u mbagħad jiġu pjastrati fi bwejriet ta' mikropjastra f'densità ta' 1 x 10<sup>4</sup> ċelloli/(100  $\mu$ l x bwejra). Imbagħad, iċ-ċelloli għandhom jiġu preinkubati f'inkubatur tas-CO<sub>2</sub> ta' 5 % f'37 $\pm$ 1°C għal tliet sigħat qabel l-esponiment għas-sustanza kimika. L-oġġetti tal-plastik għandhom ikunu ħielsa minn attività estrogenika.
12. Biex tinżamm l-integrità tar-rispons, iċ-ċelloli għandhom jitkabbru għal aktar minn passaġġ wieħed mill-istokk friżat fil-media kundizzjonata u ma għandhomx jiġu kolturati għal aktar minn 40 passaġġ. Għal-linja ta' ċelloli hER $\alpha$ -HeLa-9903, dan ikun anqas minn tliet xhur. Madankollu, il-prestazzjoni taċ-ċelloli tista' tonqos jekk jitkabbru f'kundizzjonijiet ta' koltura mhux adatti.
13. Id-DCC-FBS jista' jithejja kif deskritt fl-Appendiċi 2.2, jew jinkiseb minn sorsi kummerċjali.

### **Kriterji ta' aċċettabbiltà**

*Standards ta' referenza pożittivi u negattivi għall-assaġġ tal-agonisti tal-ER*



14. Qabel u matul l-istudju, ir-risponsività tas-sistema tat-test għandha tigi verifikata bl-użu tal-konċentrazzjonijiet xierqa ta' estrogeni b'saħħtu: E2, estrogeni dgħajjef (17 $\alpha$ -estradijoli), agonist dgħajjef hafna (17 $\alpha$ -metilttestosteron), u sustanza negattiva (kortikosteron). Il-valuri tal-medda aċċettabbli miksuba mill-istudju ta' validazzjoni (1) jingħataw fit-Tabella 1. Dawn l-erba' standards referenzjarji konkorrenti għandhom ikunu inklużi ma' kull esperiment u r-risultati għandhom jaqgħu fi hdan il-limiti aċċettabbli mogħtija. Jekk dan ma jkunx il-każ, il-kawża għan-nuqqas ta' ssodisfar tal-kriterji ta' aċċettabbiltà għandha tkun determinata (eż. immaniġġjar taċ-ċelloli, u serum u antibijotiċi għall-kwalità u għall-konċentrazzjoni) u l-assaġġ għandu jerga' jsir. Ladarba jintlaħqu l-kriterji ta' aċċettabbiltà, biex tigi żgurata varjabbiltà minima tal-valuri tal-EC<sub>50</sub>, tal-PC<sub>50</sub> u tal-PC<sub>10</sub>, hu essenzjali li jsir użu konsistenti mill-materjali għall-kolturar taċ-ċelloli. L-erba' standards referenzjarji konkorrenti, li għandhom ikunu inklużi f'kull esperiment (imwettqa fl-istess kundizzjonijiet inklużi l-materjali, il-livell tal-passaġġi taċ-ċelloli u t-tekniki), jistgħu jiżguraw is-sensittività tal-assaġġ għaliex il-PC<sub>10</sub>s tat-tliet standards referenzjarji pożittivi għandhom jaqgħu fi hdan il-medda aċċettabbli, u hekk ukoll il-PC<sub>50</sub>s u l-EC<sub>50</sub>s fejn jistgħu jiġu kkalkolati (ara t-Tabella 1).

**Tabella 1:** Il-valuri tal-medda aċċettabbli tal-erba standards referenzjarji għall-assaġġ tal-agonisti tal-ER

| Isem                                               | logPC <sub>50</sub> | logPC <sub>10</sub> | logEC <sub>50</sub> | Pendil ta' Hill | Medda tat-test                        |
|----------------------------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-----------------|---------------------------------------|
| 17 $\beta$ -estradijoli (E2)<br>Nru CAS: 50-28-2   | -11,4~-10,1         | <-11                | -11,3~-10,1         | 0,7~1,5         | 10 <sup>-14</sup> ~10 <sup>-8</sup> M |
| 17 $\alpha$ -estradijoli<br>Nru CAS: 57-91-0       | -9,6~-8,1           | -10,7~-9,3          | -9,6~-8,4           | 0,9~2,0         | 10 <sup>-12</sup> ~10 <sup>-6</sup> M |
| Kortikosteron<br>Nru CAS: 50-22-6                  | —                   | —                   | —                   | —               | 10 <sup>-10</sup> ~10 <sup>-4</sup> M |
| 17 $\alpha$ -metilttestosteron<br>Nru CAS: 58-18-4 | -6,0~-5,1           | -8,0~-6,2           | —                   | —               | 10 <sup>-11</sup> ~10 <sup>-5</sup> M |

*Standards ta' referenza pożittivi u negattivi għall-assaġġ tal-antagonisti tal-ER*

15. Qabel u matul l-istudju, ir-risponsività tas-sistema tat-test għandha tigi verifikata bl-użu tal-konċentrazzjonijiet xierqa ta' sustanza pożittiva (Tamossifen), u ta' sustanza negattiva (Flutammid). Il-valuri tal-medda aċċettabbli miksuba mill-istudju ta' validazzjoni (1) jingħataw fit-Tabella 2. Dawn iż-żewġ standards referenzjarji konkorrenti għandhom ikunu inklużi ma' kull esperiment u r-risultati għandhom jiġu ġġudikati kif suppost kif muri fil-kriterji. Jekk dan ma jkunx il-każ, il-kawża għan-nuqqas ta' ssodisfar tal-kriterji għandhom ikunu determinati (eż. immaniġġjar taċ-ċelloli, u serum u antibijotiċi għall-kwalità u għall-konċentrazzjoni) u l-assaġġ għandu jerga' jsir. Barra minn hekk, il-valuri tal-IC<sub>50</sub> għal sustanza pożittiva (Tamossifen) għandhom jiġu kkalkolati u r-risultati għandhom jaqgħu fi hdan il-limiti aċċettabbli mogħtija. Ladarba jintlaħqu l-kriterji ta' aċċettabbiltà, biex tigi żgurata varjabbiltà minima tal-valuri tal-IC<sub>50</sub>, hu essenzjali li jsir użu konsistenti mill-materjali għall-kolturar taċ-ċelloli. Iż-żewġ standards referenzjarji konkorrenti, li għandhom ikunu

inkluzi f'kull esperiment (imwettaq fl-istess kundizzjonijiet inkluzi l-materjali, il-livell tal-passaġġi taċ-ċelloli u tat-tekniki), jistgħu jiżguraw is-sensittività tal-assaġġ (ara t-Tabella 2).

**Tabella 2:** Il-kriterji u l-valuri tal-medda aċċettabbli taż-żewġ standards ta' refrenza għall-assaġġ tal-antagonisti tal-ER

| Isem                              | Kriterji                                                | LogIC <sub>50</sub> | Medda tat-test |
|-----------------------------------|---------------------------------------------------------|---------------------|----------------|
| Tamossifen<br>Nru CAS: 10540-29-1 | Pożittiv:<br>IC <sub>50</sub> għandu jiġi kkalkolat     | -5,942~-7,596       | 10-10~10-5M    |
| Flutammid<br>Nru CAS: 13311-84-7  | Negattiv:<br>IC <sub>30</sub> ma għandux jiġi kkalkolat | -                   | 10-10 ~10-5M   |

#### *Kontrolli Pożittivi u Negattivi*

16. Il-kontroll pożittiv (PC) għall-assaġġ tal-agonisti tal-ER (1 nM tal-E2) u għall-assaġġ tal-antagonisti tal-ER (10µM TAM) għandu jiġi ttestjat tal-anqas fi triplikat f'kull pjastra. Il-veikolu li jintuża biex sustanza kimika tat-test tiġi dissolta għandu jiġi ttestjat bħala kontroll b'veikolu (VC) tal-anqas fi triplikat f'kull pjastra. Minbarra dan il-VC, jekk il-PC juża veikolu differenti mis-sustanza kimika tat-test, VC iehor għandu jiġi ttestjat tal-anqas fi triplikat fuq l-istess pjastra bil-PC.

#### *Kriterji tal-kwalità għall-assaġġ tal-agonisti tal-ER*

17. L-attività medja tal-luċiferażi tal-kontroll pożittiv (1 nM E2) tal-anqas għandha tkun erba' darbiet dik tal-VC medju f'kull pjastra. Dan il-kriterju hu stabbilit fuq il-bażi tal-affidabbiltà tal-valuri tal-punt ta' tmiem mill-istudju ta' validazzjoni (storikament bejn erba' darbiet u 30 darba).
18. Fir-rigward tal-kontroll tal-kwalità tal-assaġġ, l-induzzjoni tad-drabi li tikkorrispondi għall-valur tal-PC<sub>10</sub> tal-PC konkorrenti (1 nM E2) għandha tkun akbar minn 1+2SD tal-valur tal-induzzjoni tad-drabi (=1) tal-VC konkorrenti. Għall-finijiet ta' prijoritizzazzjoni, il-valur tal-PC<sub>10</sub> jista' jkun siewi biex tiġi simplifikata l-analizi tad-*data* meħtieġa meta mqabbla ma' analizi statistika. Għalkemm analizi statistika tipprovdi informazzjoni dwar is-sinifikat, analizi bħal din mhix parametru kwantitattiv fir-rigward tal-potenzjal ibbażat fuq il-konċentrazzjoni, u għalhekk hi anqas utli għall-finijiet ta' prijoritizzazzjoni.

#### *Kriterji tal-kwalità għall-assaġġ tal-antagonisti tal-ER*

19. L-attività medja tal-luċiferażi taż-żieda fil-kontroll (25 pM E2) tal-anqas għandha tkun erba' darbiet dik tal-VC medju f'kull pjastra. Dan il-kriterju hu stabbilit fuq il-bażi tal-affidabbiltà tal-valuri tal-punt ta' tmiem mill-istudju ta' validazzjoni.

20. Fir-rigward tal-kontroll tal-kwalità tal-assaġġ, l-attivazzjoni traskrizzjonali relattiva (RTA) ta' 1 nM E2 għandha tkun akbar minn 100 %, l-RTA ta' 1  $\mu$ M 4-Idrossitamossifen (OHT) għandha tkun anqas minn 40,6 % u l-RTA ta' 100  $\mu$ M Digitonina (Dig) għandha tkun anqas minn 0 %.

Wiri tal-Profiċjenza tal-Laboratorju (ara l-paragrafu 14 u t-Tabelli 3 u 4 f'« KOMPONENTI TAL-ASSAĠĠ TA TAL-ER» ta' dan il-metodu ta' ttestjar).

## **Veikolu**

21. Id-dimetil sulfossidu (DMSO), jew solvent xieraq, fl-istess konċentrazzjoni użata għall-kontrolli pożittivi u negattivi differenti u għas-sustanzi kimiċi tat-test għandu jintuża bħala l-VC konkorrenti. Is-sustanzi kimiċi tat-test għandhom jiġu dissolti f'solvent li jissolubilizza dik is-sustanza kimika tat-test u li jithallat mal-medium taċ-ċelloli. L-ilma, l-etanol (purità ta' 95 % sa 100 %) u d-DMSO huma veikoli xierqa. Jekk jintuża d-DMSO, il-livell ma għandux jaqbeż iż-0,1 % (v/v). Għal kwalunkwe veikolu, għandu jintwera li l-volum massimu użat mhuwiex ċitotossiku u ma jinterferixx mat-twettiq tal-assaġġ.

## **Preparazzjoni tas-Sustanzi Kimiċi tat-Test**

22. Ġeneralment, is-sustanzi kimiċi tat-test għandhom jiġu dissolti fid-DMSO jew f'solvent xieraq ieħor, u jiġu dilwiti serjalment bl-istess solvent fi proporzjon komuni ta' 1:10 biex jithejjew soluzzjonijiet għad-dilwizzjoni mal-media.

## **Solubbiltà u Ċitotossicità: Kunsiderazzjonijiet għas-Sejbien tal-Medda.**

23. Għandu jitwettaq test preliminari biex tiġi determinata l-medda ta' konċentrazzjoni xierqa tas-sustanza kimika li tkun se tiġi ttestjata, u biex jiġi żgurat jekk is-sustanza kimika tat-test jistax ikollha xi problemi ta' solubbiltà u ta' ċitotossicità. Għall-ewwel, is-sustanzi kimiċi jiġu ttestjati sal-konċentrazzjoni massima ta' 1  $\mu$ l/ml, 1 mg/ml, jew 1 mM, skont liema tkun l-anqas waħda. Fuq il-bażi tal-firxa ta' ċitotossicità jew tan-nuqqas ta' solubbiltà osservati fit-test preliminari, l-ewwel sessjoni definita għandha tittestja s-sustanza kimika tat-test f'dilwizzjonijiet log-serjali billi tibda bil-konċentrazzjoni aċċettabbli massima (eż. 1 mM, 100 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, eċċ.) u tiġi nnotata l-preżenza ta' dardir jew ta' preċipitat jew ta' ċitotossicità. Il-konċentrazzjonijiet fit-tieni, u jekk meħtieġa, fit-tielet sessjoni, għandhom jiġu aġġustati kif xieraq biex jikkarakterizzaw aħjar il-kurva konċentrazzjoni rispons u biex jiġu evitati konċentrazzjonijiet li jinstabu li jkunu insolubbli jew jinduċu ċitotossicità eċċessiva.
24. Għall-agonisti u għall-antagonisti tal-ER, il-preżenza ta' livelli dejjem akbar ta' ċitotossicità tista' tbiddel b'mod sinifikanti jew telimina r-rispons sigmojdali tipiku u għandha tiġi kkunsidrata meta tiġi interpretata d-data. Għandhom jintużaw metodi ta' ttestjar taċ-

ċitotossicità li jistgħu jipprovdu informazzjoni rigward vijabbiltà ta' 80 % taċ-ċelloli, billi jintuża assaġġ xieraq ibbażat fuq l-esperjenza tal-laboratorju.

25. Jekk ir-riżultati tat-test taċ-ċitotossicità juru li l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test naqqset in-numru ta' ċelloli b'20 % jew aktar, din il-konċentrazzjoni għandha titqies bħala ċitotossika, u l-konċentrazzjonijiet fil-konċentrazzjoni ċitotossika jew oghla minn din għandhom jiġu esklużi mill-evalwazzjoni.

### Esponiment ghas-Sustanza Kimika u Organizzazzjoni tal-Pjastra tal-Assaġġ

26. Il-proċedura għad-dilwizzjonijiet kimċi (Stadji 1 u 2) u għall-esponiment għaċ-ċelloli (Stadju 3) tista' titwettaq kif ġej:

Stadju 1: Kull sustanza kimika tat-test għandha tiġi dilwita serjalment fid-DMSO, jew f'solvent xieraq, u tiżdied mal-bwejriet ta' pjastra għall-mikrotitraġġ biex jinkisbu konċentrazzjonijiet serjali finali kif determinati mit-test preliminari ta' sejbien tal-medda (tipikament f'serje ta', pereżempju, 1 mM, 100  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM, u 10 pM ( $10^{-3}$ - $10^{-11}$  M)) għall-ittestjar triplikat.

Stadju 2: Dilwizzjoni kimika: L-ewwel issir dilwizzjoni ta' 1,5  $\mu$ l tas-sustanza kimika tat-test fis-solvent sa konċentrazzjoni ta' 500  $\mu$ l tal-media.

Stadju 3: Esponiment kimiku taċ-ċelloli: Jiżdiedu 50  $\mu$ l tad-dilwizzjoni mal-media (imhejjija fl-Istadju 2) fi bwejra tal-assaġġ li jkun fiha  $10^4$  ċelloli/100  $\mu$ l/bwejra.

Il-volum finali rakkomandat tal-media meħtieġ għall kull bwejra hu ta' 150  $\mu$ l. Il-kampjuni tat-test u l-istandards referenzjarji jistgħu jiġu assenjati kif muri fit-Tabella 3 u fit-Tabella 4.

**Tabella 3:** Eżempju ta' assenjament tal-konċentrazzjoni tal-pjastru tal-istandards referenzjarji fil-pjastra tal-assaġġ fl-assaġġ tal-agonisti tal-ER

| Ringiela | 17 $\alpha$ -metilttestosteron |   |   | Kortikosteron |   |   | 17 $\alpha$ -estradiol |   |   | E2      |    |    |
|----------|--------------------------------|---|---|---------------|---|---|------------------------|---|---|---------|----|----|
|          | 1                              | 2 | 3 | 4             | 5 | 6 | 7                      | 8 | 9 | 10      | 11 | 12 |
| A        | konċ 1 (10 $\mu$ M)            | → | → | 100 $\mu$ M   | → | → | 1 $\mu$ M              | → | → | 10 nM   | →  | →  |
| B        | konċ 2 (1 $\mu$ M)             | → | → | 10 $\mu$ M    | → | → | 100 nM                 | → | → | 1 nM    | →  | →  |
| C        | konċ 3 (100 nM)                | → | → | 1 $\mu$ M     | → | → | 10 nM                  | → | → | 100 pM  | →  | →  |
| D        | konċ 4 (10 nM)                 | → | → | 100 nM        | → | → | 1 nM                   | → | → | 10 pM   | →  | →  |
| E        | konċ 5 (1 nM)                  | → | → | 10 nM         | → | → | 100 pM                 | → | → | 1 pM    | →  | →  |
| F        | konċ 6 (100 pM)                | → | → | 1 nM          | → | → | 10 pM                  | → | → | 0,1 pM  | →  | →  |
| G        | konċ 7 (10 pM)                 | → | → | 100 pM        | → | → | 1 pM                   | → | → | 0,01 pM | →  | →  |
| H        | VC                             | → | → | →             | → | → | PC                     | → | → | →       | →  | →  |

VC: Kontroll bil-veikolu (0,1 % DMSO); PC: Kontroll pożittiv (1 nM E2)

27. L-standards referenzjarji (E2, 17 $\alpha$ -estradiol, 17- $\mu$ ετιλ τεστοστερον u κορτικοστερον) γ $\alpha$ νδηομ φι!u τεστρατι φ $\square$ κυλλ σεσφορνι (Τα βελλα 3). Il-bwejriet tal-PC trattati b'1 nM ta' E2 li jistghu jipproducu induzzjoni massima ta' bwejriet ta' E2 u ta' VC bid-DMSO (jew b'solvent xieraq) wahdu ghandhom ikunu inkluzi f'kull pjastra tal-assagg tat-test (Tabella 4). Jekk fl-istess esperiment jintuzaw celloli minn sorsi differenti (eż. numru ta' passagghi differenti, lott differenti, eċċ.), l-standards referenzjarji ghandhom jigu ttestjati ghal kull sors ta' celloli.

**Tabella 4:** Eżempju ta' assenjament tal-koncentrazzjoni tal-pjastri tas-sustanzi kimiċi tat-test u tal-kontroll tal-pjastra fil-pjastra tal-assagg fl-assagg tal-agonisti tal-ER

| Ring iela | Sustanza Kimika tat-Test 1 |   |   | Sustanza Kimika tat-Test 2 |   |   | Sustanza Kimika tat-Test 3 |   |   | Sustanza Kimika tat-Test 4 |    |    |
|-----------|----------------------------|---|---|----------------------------|---|---|----------------------------|---|---|----------------------------|----|----|
|           | 1                          | 2 | 3 | 4                          | 5 | 6 | 7                          | 8 | 9 | 10                         | 11 | 12 |
| A         | konċ 1 (10 $\mu$ M)        | → | → | 1 mM                       | → | → | 1 $\mu$ M                  | → | → | 10 nM                      | →  | →  |
| B         | konċ 2 (1 $\mu$ M)         | → | → | 100 $\mu$ M                | → | → | 100 nM                     | → | → | 1 nM                       | →  | →  |
| C         | konċ 3 (100 nM)            | → | → | 10 $\mu$ M                 | → | → | 10 nM                      | → | → | 100 pM                     | →  | →  |
| D         | konċ 4 (10 nM)             | → | → | 1 $\mu$ M                  | → | → | 1 nM                       | → | → | 10 pM                      | →  | →  |
| E         | konċ 5 (1 nM)              | → | → | 100 nM                     | → | → | 100 pM                     | → | → | 1 pM                       | →  | →  |
| F         | konċ 6 (100 pM)            | → | → | 10 nM                      | → | → | 10 pM                      | → | → | 0,1 pM                     | →  | →  |
| G         | konċ 7 (10 pM)             | → | → | 1 nM                       | → | → | 1 pM                       | → | → | 0,01 pM                    | →  | →  |
| H         | VC                         | → | → | →                          | → | → | PC                         | → | → | →                          | →  | →  |

VC: Kontroll bil-veikolu (0,1 % DMSO); PC: Kontroll pożittiv (1 nM E2)

**Tabella 5:** Eżempju ta' assenjament tal-koncentrazzjoni tal-pjastri tal-standards referenzjarji fil-pjastra tal-assagg fl-assagg tal-antagonisti tal-ER

| Ringiel a | Tamossifen          |   |   | Flutammid  |   |   | Sustanza Kimika tat-Test 1 |   |   | Sustanza Kimika tat-Test 2 |    |    |
|-----------|---------------------|---|---|------------|---|---|----------------------------|---|---|----------------------------|----|----|
|           | 1                   | 2 | 3 | 4          | 5 | 6 | 7                          | 8 | 9 | 10                         | 11 | 12 |
| A         | konċ 1 (10 $\mu$ M) | → | → | 10 $\mu$ M | → | → | 10 $\mu$ M                 | → | → | 10 $\mu$ M                 | →  | →  |
| B         | konċ 2 (1 $\mu$ M)  | → | → | 1 $\mu$ M  | → | → | 1 $\mu$ M                  | → | → | 1 $\mu$ M                  | →  | →  |
| C         | konċ 3 (100 nM)     | → | → | 100 nM     | → | → | 100 nM                     | → | → | 100 nM                     | →  | →  |
| D         | konċ 4 (10 nM)      | → | → | 10 nM      | → | → | 10 nM                      | → | → | 10 nM                      | →  | →  |
| E         | konċ 5 (1 nM)       | → | → | 1 nM       | → | → | 1 nM                       | → | → | 1 nM                       | →  | →  |
| F         | konċ 6 (100 pM)     | → | → | 100 pM     | → | → | 100 pM                     | → | → | 100 pM                     | →  | →  |
| G         | 0,1 % DMSO          | → | → | →          | → | → | 1 $\mu$ M OHT              | → | → | 100 $\mu$ M Diġ            | →  | →  |
| H         | VC                  | → | → | →          | → | → | PC                         | → | → | →                          | →  | →  |

VC: Kontroll bil-veikolu (0,1 % DMSO), PC: Kontroll pożittiv (1 nM E2), OHT :4-Idrossitamossifen, Diġ: Digitonina.

 = mizjuda b'25pM E2

28. Biex tiġi evalwata l-attività antagonista tas-sustanzi kimiċi, il-bwejriet tal-assagg li jinsabu fir-ringieli minn A sa G ghandhom jiżdiedu b'25pM E2. L-standards referenzjarji (Tamossifen u

Flutammid) għandhom jiġu ttestjati f'kull sessjoni. Bwejrjet tal-PC trattati b'1 nM tal-E2 li jistgħu jkunu kwalità tal-kontroll tal-linja ta' ċelloli hER $\alpha$ -HeLa-9903, bwejrjet tal-VC trattati bid-DMSO (jew b'solvent xieraq), bwejrjet tad-DMSO ta' 0,1 % trattati b'żieda tad-DMSO mal-E2 miżjud li jikkorrispondu għaż-“Żieda fil-kontroll”, bwejrjet trattati b'konċentrazzjoni finali ta' 1  $\mu$ M OHT u bwejrjet trattati b'100  $\mu$ M Diġ għandhom ikunu inklużi f'kull pjastra tal-assaġġ tat-test (Tabella 5). Pjastra tal-assaġġ sussegwenti għandha ssegwi l-istess tifsila tal-pjastra mingħajr bwejrjet tal-istandards referenzjarji (Tabella 6). Jekk fl-istess esperiment jintużaw ċelloli minn sorsi differenti (eż. numru ta' passaġġi differenti, lott differenti, eċċ.), l-istandards referenzjarji għandhom jiġu ttestjati għal kull sors ta' ċelloli.

**Tabella 6:** Eżempju ta' assenjament tal-konċentrazzjoni tal-pjastri tas-sustanzi kimiċi tat-test u tal-kontroll tal-pjastra fil-pjastra tal-assaġġ fl-assaġġ tal-antagonisti tal-ER

| Ringiel<br>a | Sustanza Kimika tat-Test 1 |   |   | Sustanza Kimika tat-Test 2 |   |   | Sustanza Kimika tat-Test 3 |   |   | Sustanza Kimika tat-Test 4 |    |    |
|--------------|----------------------------|---|---|----------------------------|---|---|----------------------------|---|---|----------------------------|----|----|
|              | 1                          | 2 | 3 | 4                          | 5 | 6 | 7                          | 8 | 9 | 10                         | 11 | 12 |
| A            | konċ 1 (10 $\mu$ M)        | → | → | 10 $\mu$ M                 | → | → | 10 $\mu$ M                 | → | → | 10 $\mu$ M                 | →  | →  |
| B            | konċ 2 (1 $\mu$ M)         | → | → | 1 $\mu$ M                  | → | → | 1 $\mu$ M                  | → | → | 1 $\mu$ M                  | →  | →  |
| C            | konċ 3 (100 nM)            | → | → | 100 nM                     | → | → | 100 nM                     | → | → | 100 nM                     | →  | →  |
| D            | konċ 4 (10 nM)             | → | → | 10 nM                      | → | → | 10 nM                      | → | → | 10 nM                      | →  | →  |
| E            | konċ 5 (1 nM)              | → | → | 1 nM                       | → | → | 1 nM                       | → | → | 1 nM                       | →  | →  |
| F            | konċ 6 (100 pM)            | → | → | 100 pM                     | → | → | 100 pM                     | → | → | 100 pM                     | →  | →  |
| G            | 0,1 % DMSO                 | → | → | →                          | → | → | 1 $\mu$ M OHT              | → | → | 100 $\mu$ M Diġ            | →  | →  |
| H            | VC                         | → | → | →                          | → | → | PC                         | → | → | →                          | →  | →  |

VC: Kontroll bil-veikolu (0,1 % DMSO), PC: Kontroll pożittiv (1 nM E2), OHT: 4-Idrossitamossifen, Diġ: Diġitonina.

 : Miżjuda b'25pM E2

29. In-nuqqas ta' effetti tax-xfar għandu jiġi kkonfermat, kif xieraq, u jekk ikun hemm suspett ta' effetti tax-xfar, it-tifsila tal-pjastra għandha tinbidel biex jiġu evitati t-tali effetti. Pereżempju, tista' tintuża tifsila tal-pjastra li teskludi l-bwejrjet tax-xfar.
30. Wara li jiżdiedu s-sustanzi kimiċi, il-pjastri tal-assaġġ għandhom ikunu inkubati f'inkubatur tas-CO<sub>2</sub> ta' 5 % f'37±1°C għal 20-24 siegħa biex jinduċu l-prodotti tal-gene indikatur.
31. Se jkollhom bżonn jiġu applikati kunsiderazzjonijiet speċjali għal dawk il-komposti li jkunu volatili hafna. F'każijiet bħal dawn, il-bwejrjet tal-kontroll fil-qrib jistgħu jiġġeneraw pożittivi foloz u dan għandu jiġi kkunsidrat fid-dawl tal-valuri tal-kontroll mistennija u storiċi. Fil-ftit każijiet li fihom il-volatilità tista' tkun ta' thassib, l-użu ta' “sigillaturi tal-pjastri” jista' jgħin biex jiżola b'mod effettiv il-bwejrjet individwali matul l-ittestjar, u għaldaqstant hu rakkomandat f'każijiet bħal dawn.

32. Testijiet definittivi ripetuti għall-istess sustanza kimika għandhom jitwettqu f'jiem differenti, biex tiġi żgurata indipendenza.

### **Assaġġ tal-luċiferażi**

33. Għall-assaġġ jistgħu jintużaw reagent kummerċjali tal-assaġġ tal-luċiferażi [eż. Steady-Glo® Luciferase Assay System (Promega, E2510, jew ekwivalenti)] jew sistema standard ta' assaġġ tal-luċiferażi (eż. Promega, E1500, jew ekwivalenti), dment li ma jiġux ssodisfati l-kriterji ta' aċċettabbiltà. Ir-reagenti tal-assaġġ għandhom jintgħażlu fuq il-bażi tas-sensittività tal-luminometru li jkun se jintuża. Meta tintuża s-sistema standard ta' assaġġ tal-luċiferażi, għandu jintuża Reagent tal-Liżi tal-koltura taċ-Ċeloli (eż. Promega, E1531, jew ekwivalenti) qabel ma jiżdied is-substrat. Ir-reagent tal-luċiferażi għandu jiġi applikat skont l-istruzzjonijiet tal-manifatturi.

### **ANALIŻI TAD-DATA**

#### **Assaġġ tal-agonisti tal-ER**

34. Fil-każ tal-assaġġi tal-agonisti tal-ER, biex tinkiseb l-attività traskrizzjonali relattiva għall-PC (1 nM tal-E2), is-sinjali tal-lumenixxenza mill-istess pjastra jistgħu jiġu analizzati skont l-istadji li ġejjin (proċessi matematiċi ekwivalenti oħra huma aċċettabbli wkoll):

Stadju 1. Ikkalkola l-valur medju għall-VC.

Stadju 2. Naqqas il-valur medju tal-VC mill-valur ta' kull bwejra biex tinnormalizza d-data.

Stadju 3. Ikkalkola l-medja għall-PC normalizzat.

Stadju 4. Iddividi l-valur normalizzat ta' kull bwejra fil-pjastra bil-valur medju tal-PC normalizzat (PC=100 %).

Il-valur finali ta' kull bwejra hu l-attività traskrizzjonali relattiva għal dik il-bwejra meta mqabbla mar-rispons tal-PC.

Stadju 5. Ikkalkola l-valur medju tal-attività traskrizzjonali relattiva għal kull grupp tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test. Hemm żewġ dimensjonijiet għar-rispons: l-attività traskrizzjonali medja (rispons) u l-konċentrazzjoni li fiha jsehh ir-rispons (ara t-taqsimha li ġejja).

### Kunsiderazzjonijiet tal-induzzjoni tal-EC<sub>50</sub>, tal-PC<sub>50</sub> u tal-PC<sub>10</sub>

35. Il-kurva shiha konċentrazzjoni rispons hi meħtieġa għall-kalkolu tal-EC<sub>50</sub>, iżda din mhux dejjem tkun tista' tinkiseb jew prattika minhabba l-limitazzjonijiet tal-medda ta' konċentrazzjoni tat-test (pereżempju minhabba problemi ta' ċitotossicità jew ta' solubbiltà). Madankollu, peress li l-EC<sub>50</sub> u l-livell massimu ta' induzzjoni (li jikkorrispondi għall-ogħla valur tal-ekwazzjoni Hill) huma parametri informattivi, dawn il-parametri għandhom jiġu rapportati fejn possibbli. Għall-kalkolu tal-EC<sub>50</sub> u tal-livell ta' induzzjoni massima, għandu jintuża softwer statistiku xieraq (eż. softwer statistiku Graphpad Prism). Jekk l-ekwazzjoni logistika Hill tkun applikabbli għad-*data* ta' rispons għall-konċentrazzjoni, l-EC<sub>50</sub> għandu jiġi kkalkolat bl-ekwazzjoni li ġejja (7):

$$Y = Q_{iegh} + (Q_{uccata} - Q_{iegh}) / (1 + 10^{\exp((\log EC_{50} - X) \times \text{pendil ta' Hill})})$$
 Fejn:

X hi l-logaritmu tal-konċentrazzjoni; u,

Y hi r-rispons u Y tibda fil-Qiegh u titla' sal-Quccata f'kurva sigmojde. Il-qiegh hu fiss għal zero fl-ekwazzjoni logistika Hill.

36. Għal kull sustanza kimika tat-test, għandhom jiġu pprovduti dawn li ġejjin:

L-RPC<sub>Max</sub> li hu l-livell massimu ta' rispons indott minn sustanza kimika tat-test, espress bħala perċentwal tar-rispons indott minn 1 nM E2 fuq l-istess pjastra, kif ukoll il-PC<sub>Max</sub> (il-konċentrazzjoni assoċjata mal-RPC<sub>Max</sub>); u

Għal sustanzi kimiċi pożittivi, il-konċentrazzjonijiet li jinduċu l-PC<sub>10</sub> u, jekk xieraq, il-PC<sub>50</sub>.

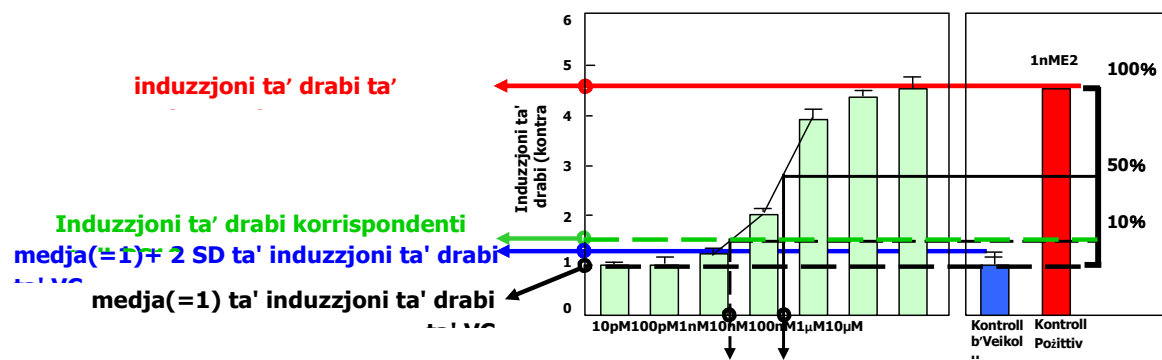
37. Il-valur tal-PC<sub>x</sub> jista' jiġi kkalkolat bl-interpolazzjoni bejn 2 punti fil-koordinat X-Y, wiehed eżatt fuq u l-iehor eżatt taħt valur tal-PC<sub>x</sub>. Meta l-punti tad-*data* li jinsabu eżatt fuq u taħt il-valur tal-PC<sub>x</sub> ikollhom il-koordinati (a,b) u (c,d) rispettivament, il-valur tal-PC<sub>x</sub> jista' jiġi kkalkolat bl-użu tal-ekwazzjoni li ġejja:

$$\log[PC_x] = \log[c] + (x-d)/(d-b)$$

38. Deskrizzjonijiet tal-valuri tal-PC huma pprovduti fil-Figura 1 ta' hawn taħt.

**Figura 1: Eżempju ta' kif jinkisbu l-valuri tal-PC. Il-PC (1 nM of E2) hi inkluża f'kull pjastra tal-assaġġ**





### Assaġġ tal-antagonisti tal-ER

39. Fil-każ tal-assaġġi tal-antagonisti tal-ER, biex tinkiseb l-attività traskrizzjonali relattiva (RTA) għaż-żieda fil-kontroll (25 pM tal-E2), is-sinjali tal-lumenixxenza mill-istess pjastra jistgħu jiġu analizzati skont l-istadji li ġejjin (proċessi matematiċi ekwivalenti oħra huma aċċettabbli wkoll):

Stadju 1. Ikkalkola l-valur medju għall-VC.

Stadju 2. Naqqas il-valur medju tal-VC mill-valur ta' kull bwejra biex tinnormalizza d-*data*.

Stadju 3. Ikkalkola l-medja għaż-żieda normalizzata fil-kontroll.

Stadju 4. Iddividi l-valur normalizzat ta' kull bwejra fil-pjastra bil-valur medju taż-żieda normalizzata fil-kontroll (żieda fil-kontroll=100 %).

Il-valur finali ta' kull bwejra hu l-attività traskrizzjonali relattiva għal dik il-bwejra meta mqabbla mar-rispons taż-żieda fil-kontroll.

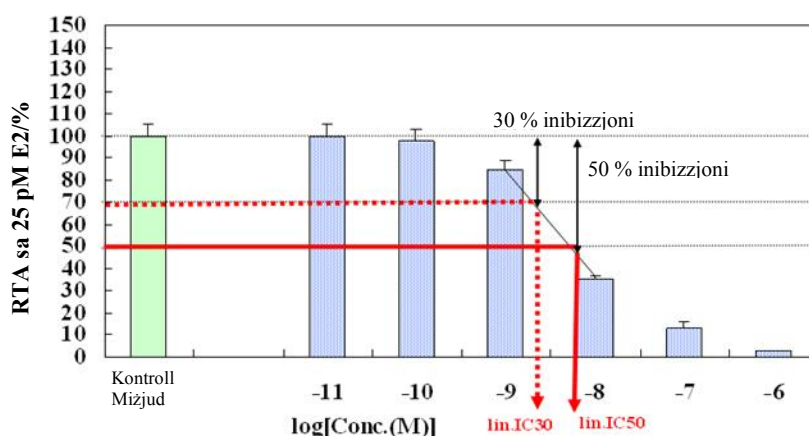
Stadju 5. Ikkalkola l-valur medju tal-attività traskrizzjonali relattiva għal kull trattament.

### Kunsiderazzjonijiet tal-induzzjoni tal-IC<sub>30</sub> u tal-IC<sub>50</sub>

40. Għal sustanzi kimiċi pożittivi, għandhom jiġu pprovduti l-konċentrazzjonijiet li jinduċu l-IC<sub>30</sub> u, jekk xieraq, l-IC<sub>50</sub>.
41. Il-valur tal-IC<sub>x</sub> jista' jiġi kkalkolat bl-interpolazzjoni bejn żewġ punti fil-koordinat X-Y, wieħed eżatt fuq u l-ieħor eżatt taħt valur tal-IC<sub>x</sub>. Meta l-punti tad-*data* li jinsabu eżatt fuq u taħt il-valur tal-IC<sub>x</sub> ikollhom il-koordinati (c,d) u (a,b) rispettivament, il-valur tal-IC<sub>x</sub> jista' jiġi kkalkolat bl-użu tal-ekwazzjoni li ġejja:

$$\ln IC_x = a - (b - (100 - x)) (a - c) / (b - d)$$

**Figura 2: Eżempju ta' kif jinkisbu l-valuri tal-IC. Iż-żieda fil-kontroll (25 pM of E2) hi inkluża f'kull pjastra tal-assaġġ**



RTA: attività traskrizzjonali relattiva

42. Ir-rizultati għandhom ikunu bbażati fuq żewġ (jew tliet) sessjonijiet indipendenti. Jekk żewġ sessjonijiet jagħtu riżultati komparabbli u, għalhekk, riproduċibbli, ma jkunx hemm bżonn li ssir it-tielet sessjoni. Biex ikunu aċċettabbli, ir-rizultati għandhom:

- Jissodisfaw il-kriterji ta' aċċettabbiltà (ara l-Kriterji ta' aċċettabbiltà para 14-20),
- Ikunu riproduċibbli.

## Il-Kriterji ta' Interpretazzjoni tad-Data

**Tabella 7:** Kriterji għal deċiżjonijiet pożittivi u negattivi fl-assaġġ tal-agonisti tal-ER

|                 |                                                                                                                                                                |
|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Pożittiv</b> | Jekk tinkiseb RPCMax li tkun ekwivalenti għal 10 % jew aktar tar-rispons tal-kontroll pożittiv f'tal-anqas tnejn minn żewġ sessjonijiet jew tnejn minn tlieta. |
| <b>Negattiv</b> | Jekk l-RPCMax ma tilhaqx tal-anqas l-10 % tar-rispons tal-kontroll pożittiv fi tnejn minn żewġ sessjonijiet jew fi tnejn minn tlieta.                          |

**Tabella 8:** Kriterji għal deċiżjonijiet pożittivi u negattivi fl-assaġġ tal-antagonisti tal-ER

|                 |                                                                                                |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Pożittiv</b> | Jekk l-IC30 tiġi kkalkolata f'tal-anqas tnejn minn żewġ sessjonijiet jew fi tnejn minn tlieta. |
| <b>Negattiv</b> | Jekk l-IC30 ma tiġix ikkalkolata f'żewġ sessjonijiet minn tnejn jew fi tnejn minn tlieta.      |

43. Il-kriterji ta' interpretazzjoni tad-data huma murija fit-Tabelli 7 u 8. Ir-rizultati pożittivi jiġu karatterizzati kemm mill-kobor tal-effett kif ukoll mill-konċentrazzjoni li fiha jsehh l-effett. L-espressjoni tar-rizultati bħala konċentrazzjoni li fiha jintlaħqu 50 % (PC50) jew 10 % (PC10) tal-valuri tal-PC għall-assaġġ tal-agonisti, u 50 % (IC50) jew 30 % (IC30) tal-valur

taż-żieda fil-kontroll hi inibita għall-assaġġ tal-antagonisti, u tilhaq dawn iż-żewġ għanijiet. Madankollu, sustanza kimika tat-test titqies li tkun pożittiva, jekk ir-rispons massimu indott mis-sustanza kimika tat-test (RPCMax) ikun ekwivalenti għal 10 % jew aktar tar-rispons tal-PC f'tal-anqas tnejn miż-żewġ sessjonijiet jew fi tnejn minn tlieta, filwaqt li sustanza kimika tat-test titqies negattiva jekk l-RPCMax ma tilhaqx tal-anqas l-10 % tar-rispons tal-kontroll pożittiv fi tnejn miż-żewġ sessjonijiet jew fi tnejn minn tlieta.

44. Il-kalkoli tal-PC10, tal-PC50 u tal-PCMax fl-assaġġ tal-agonisti tal-ER u tal-IC30 u tal-IC50 fl-assaġġ tal-antagonisti tal-ER jistgħu jsiru bl-użu ta' spreadsheet disponibbli mal-Linja Gwida tat-Test fuq is-sit web pubbliku tal-OECD<sup>1</sup>.
45. Għandu jkun biżżejjed li jinkisbu l-valuri tal-PC10 jew tal-PC50 u tal-IC30 jew tal-IC50 tal-anqas darbtejn. Madankollu, jekk il-linja bażi li tirriżulta għad-*data* fl-istess medda ta' konċentrazzjoni turi varjabbiltà b'koeffiċjent għoli b'mod inaċċettabbli ta' varjazzjoni (CV; %), id-*data* ma tistax titqies affidabbli u s-sors tal-varjabbiltà għolja għandu jiġi identifikat. Is-CV tat-triplikati tad-*data* mhux proċessata (jiġifieri *data* dwar l-intensità tal-luminexxenza) tal-punti ta' *data* li jintużaw għall-kalkolu tal-PC10 għandu jkun anqas minn 20 %.
46. L-ilhuq tal-kriterji ta' aċċettabbiltà jindika li s-sistema tal-assaġġ qed topera kif suppost, iżda ma jiżgurax li kwalunkwe sessjoni partikolari tipproduċi *data* preċiża. Id-duplikazzjoni tar-riżultati tal-ewwel sessjoni hi l-aħjar garanzija li tkun giet prodotta *data* preċiża.
47. Fil-każ ta' assaġġ tal-agonisti tal-ER, fejn tkun meħtieġa aktar informazzjoni minbarra l-iskopijiet ta' skrinjar u ta' prijoritizzazzjoni ta' din it-TG għal sustanzi kimiċi tat-test pożittivi, b'mod partikolari għal sustanzi kimiċi PC10-PC49, kif ukoll għal sustanzi kimiċi suspettati li jstimolaw eċċessivament il-luċiferażi, jista' jiġi kkonfermat li l-attività osservata tal-luċiferażi hi biss rispons speċifiku għall-ER $\alpha$ , bl-użu ta' antagonist tal-ER $\alpha$  (ara l-Appendiċi 2.1).

## RAPPORT TAT-TEST

48. Ara l-paragrafu 20 ta' "KOMPONENTI TAL-ASSAĠĠ TA TAL-ER".

---

<sup>1</sup> <http://www.oecd.org/env/testguidelines>

## DOKUMENTAZZJONI

- (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), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.
- (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. u 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. u 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.

## **Appendiċi 2.1**

### **POŻITTIVI FOLOZ: VALUTAZZJONI TA' SINJALI TAL-LUMINEXXENZA MEDJATI MHUX TAR-RIĊETTUR**

1. Pożittivi foloz fl-assaġġ tal-agonisti tal-ER jistgħu jiġu generati minn attivazzjoni medjata mhux mill-ER tal-gene luciferażi, jew minn attivazzjoni diretta tal-prodott ġeniku jew tal-fluworessenza mhux relatata. Effetti bħal dawn huma indikati minn kurva doża rispons mhux kompluta jew mhux tas-soltu. Jekk it-tali effetti jkunu suspettati, għandu jiġi eżaminat l-effett ta' antagonist tal-ER (eż. 4- idrossitamossifen (OHT) f'konċentrazzjoni mhux tossika) fuq ir-rispons. L-antagonist pur (ICI 182780 jaf ma jkunx xieraq għal dan l-għan peress li konċentrazzjoni suffiċjenti ta' ICI 182780 tista' tnaqqas il-valur tal-VC, u dan jaffettwa l-analiżi tad-*data*.
2. Biex tiġi żgurata l-validità ta' dan l-approċċ, dawn li ġejjin għandhom jiġu ttestjati fl-istess pjastra:
  - Attività agonistika tas-sustanza kimika mhux magħrufa b'10<sup>-10</sup> M OHT jew mingħajr
  - VC (fi triplikati)
  - OHT (fi triplikati)
  - 1 nM E2 (fi triplikati) bħala PC tal-agonist
  - 1 nM E2 + OHT (fi triplikati)

### **Kriterji ta' Interpretazzjoni tad-*Data***

Nota: Il-bwejrjet kollha għandhom ikunu trattati bl-istess konċentrazzjoni tal-veikolu.

- Jekk l-attività agonistika tas-sustanza kimika mhux magħrufa MHIX affettwata mit-trattament bl-antagonist tal-ER, din tiġi klassifikata bħala "Negattiva".
- Jekk l-attività agonistika tas-sustanza kimika mhux magħrufa tkun inibita għalkollox, applika l-kriterji ta' deċiżjoni.
- Jekk l-attività agonistika fl-anqas konċentrazzjoni tkun ekwivalenti għar-rispons tal-PC10 jew aktar minnu, is-sustanza kimika mhux magħrufa tkun inibita b'mod ekwivalenti għar-rispons tal-PC10 jew aktar minnu. Id-differenza fir-risponsi bejn il-bwejrjet mhux trattati u

dawk trattati bl-antagonist tal-ER hi kkalkolata u din id-differenza għandha titqies bħala r-rispons veru u għandha tintuża għall-kalkolu tal-parametri xierqa biex tkun tista' tittiehed deċiżjoni dwar il-klassifikazzjoni.

### **Analizi tad-data**

Ivverifika l-istandard tal-prestazzjoni.

Ivverifika s-CV bejn il-bwejriet trattati taħt l-istess kundizzjonijiet.

1. Ikkalkola l-medja tal-VC
2. Naqqas il-medja tal-VC mill-valur ta' kull bwejra **mhux** trattata bl-OHT
3. Ikkalkola l-medja tal-OHT
4. Naqqas il-medja tal-VC mill-valur ta' kull bwejra trattata bl-OHT
5. Ikkalkola l-medja tal-PC
6. Ikkalkola l-attività traskrizzjonali relattiva tal-bwejriet l-oħra kollha b'rabta mal-PC.

## **Appendiċi 2.2**

### **PREPARAZZJONI TAS-SERUM TRATTAT B'FAHAM MIKSI BID-DEKSTRAN (DCC)**

1. It-trattament ta' serum b'faħam miksi bid-dekstran (DCC) hu metodu ġenerali għat-tneħħija ta' komposti estrogeniċi mis-serum li jiżdied mal-medium taċ-ċelloli, biex jiġi eskluż ir-rispons preġudikat assoċjat mal-estrogeni residwi fis-serum. B'din il-proċedura jistgħu jiġu trattati 500 ml serum bovin fetal (FBS).

#### **Komponenti**

2. Se jkunu meħtieġa l-materjali u t-tagħmir li ġejjin:

#### *Materjali*

Faħam attivat

Dekstran:

Eżaidrat tal-klorur tal-manjeżju ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )

Sukrożju

Soluzzjoni mewwieta 1 M HEPES (pH 7,4)

Ilma ultrapur prodott minn sistema ta' filtri

#### *Tagħmir*

Kontenitur tal-ħġieġ awtoklavat (id-daqs għandu jiġi aġġustat kif xieraq) Ċentrifugu tal-Laboratorju Ġenerali (li jista' jissettja t-temperatura għal 4°C)

#### **Proċedura**

3. Il-proċedura li ġejja hi aġġustata għall-użu ta' tubi ċentrifugi tal-50 ml:



[Jum 1] Hejji s-sospensjoni ta' faħam miksi bid-dekstran b'1 l ilma ultrapur li fih 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,25 M sukrożju, 2,5 g faħam, 0,25 g dekstran u 5 mM HEPES u ħawdu f'4°C, matul il-lejl.

[Jum 2] Iddispensa s-sospensjoni f'tubi ċentrifugi tal-50 ml u ċcentrifuga f'10000 rpm f'4°C għal 10 minuti. Nehhi s-supernatant u aħžen nofs is-sediment tal-faħam f'4°C għall-użu fil-Jum 3. Issospendi n-nofs l-ieħor tal-faħam b'FBS li jkun thalla jinhall bil-galbu biex tiġi evitata preċipitazzjoni, u inattivat bis-shana f'56°C għal 30 minuta, imbagħad ittrasferixxi f'kontenitur tal-ħgieġ awtoklavat bħal flask Erlenmeyer. Hawwad din is-sospensjoni bil-galbu f'4°C, matul il-lejl.

[Jum 3] Iddispensa s-sospensjoni b'FBS f'tubi ċentrifugi għal ċentrifugazzjoni f'10000 rpm f'4°C għal 10 minuti. Igbor l-FBS u ttrasferixxi fis-sediment tal-faħam il-ġdid imhejji u maħzun fil-Jum 2. Issospendi s-sediment tal-faħam u ħawwad din is-sospensjoni bil-galbu f'kontenitur tal-ħgieġ awtoklavat f'4°C, matul il-lejl.

[Jum 4] Iddispensa s-sospensjoni għaċ-ċentrifugazzjoni f'10000 rpm f'4°C għal 10 minuti u sterilizza s-supernatant b'filtazzjoni permezz tal-filtru sterili ta' 0,2  $\mu\text{m}$ . Dan l-FBS trattat bid-DCC għandu jinħażen f'-20°C u jista' jintuża sa sena.

### APPENDIĊI 3

#### **ASSAĠĠ TA' TRANSATTIVAZZJONI TAR-RIĊETTUR TAL-ESTROĠENU VM7LUC GHALL-IDENTIFIKAZZJONI TAL-AGONISTI U TAL-ANTAGONISTI TAR-RIĊETTUR TAL-ESTROĠENU**

#### **KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET (ARA WKOLL INTRODUZZJONI ĠENERALI)**

1. Dan l-assaġġ juża l-linja ta' ċelloli VM7Luc4E2<sup>1</sup>. Ġie validat min-National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), u mill-Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) (1). Il-linji ta' ċelloli VM7Luc jesprimu b'mod predominanti ER $\alpha$  endoġenu u ammont minuri ta' ER $\beta$  endoġenu (2) (3) (4).
2. Dan l-assaġġ hu applikabbli għal firxa kbira ta' sustanzi, dment li ma jkunux jistgħu jiġu dissolti f'sulfossidu tad-dimetil (DMSO; CASRN 67-68-5), ma jirreaġixxux ma' DMSO jew mal-medium tat-tkabbir taċ-ċelloli, u ma jkunux ċitotossiċi fil-konċentrazzjonijiet li jkunu se jiġu ttestjati. Jekk l-użu tad-DMSO ma jkunx possibbli, jista' jintuża veikolu ieħor bħall-etanol jew l-ilma (ara l-paragrafu 12). Il-prestazzjoni murija tal-assaġġ tal-(ant)agonisti TA tal-ER VM7Luc tissuggerixxi li d-*data* generata b'dan l-assaġġ tista' tinforma mekkanizmi ta' azzjoni medjati bl-ER u tista' tiġi kkunsidrata għall-prijoritizzazzjoni tas-sustanzi għall-ittestjar ulterjuri.

---

<sup>1</sup> Qabel Ġunju 2016, din il-linja ta' ċelloli kienet imsejha l-linja ta' ċelloli BG1Luc. Iċ-ċelloli BG-1 oriġinarjament kienu deskritti minn Geisinger et al. (1998) (12) u aktar tard ġew karatterizzati mir-riċerkaturi fin-National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) (13). B'mod relattivament riċenti, ġie skopert li jeżistu żewġ varjanti differenti taċ-ċelloli BG-1 li jintużaw mir-riċerkaturi, BG-1 Fr u BG-1 NIEHS. Analizi approfondita, li tinkludi ttestjar tad-DNA, ta' dawn iż-żewġ linji ta' ċelloli varjanti tal-BG-1 saret minn Li u l-kollegi (2014) (14) uriet li l-BG-1 Fr kienet unika u li l-BG-1 NIEHS, jiġifieri l-linja ta' ċelloli oriġinali użata għall-iżvilupp tal-assaġġ, ma kinitx il-linja ta' ċelloli tal-karċinoma ovarjana umana BG1, iżda minflok kienet varjant tal-linja ta' ċelloli tal-kanċer tas-sider uman MCF7. Il-linja ta' ċelloli użata fl-assaġġ, oriġinarjament imsejha BG1Luc4E2 (15), issa se tibda tisfejjah VM7Luc4E2 ("V" = varjant; "M7" = ċelloli MCF7). Bl-istess mod, l-assaġġ issa se jibda jissejjah it-TA tal-ER VM7Luc. Filwaqt li dan ibiddel l-oriġini tal-linja ta' ċelloli li fuqha hu bbażat l-assaġġ, dan ma jaffettwax l-istudji ta' validazzjoni ppubblikati u lanqas l-utilità u l-applikazzjoni ta' dan l-assaġġ għall-iskrinjar ta' sustanzi kimiċi estroġeniċi/antiestroġeniċi.

3. Dan l-assaġġ hu mfassal b'mod speċifiku biex jindividwa TA medjata minn hER $\alpha$  u minn hER $\beta$  billi jkejjel il-kemiluminexxenza b'hal l-punt ta' tmiem. L-użu tal-kemiluminexxenza fil-bijoassaġġi hu mifrux minhabba li l-luminexxenza għandha proporzjon għoli ta' sinjal għall-isfond (10). Madankollu, l-attività tal-luċiferażi tal-firefly f'assaġġi bbażati fuq ċelloli tista' tiġi konfuża minn sustanzi li jinibixxu l-enzima luċiferażi, u tikkawża inibizzjoni apparenti jew inkella luminexxenza miżjuda minhabba l-istabbilizzazzjoni tal-proteini (10). Barra minn hekk, f'ċreti assaġġi tal-gene indikatur tal-ER ibbażati fuq il-luċiferażi, sinjali ta' luminexxenza medjata mhux minn riċettur ġew rapportati f'konċentrazzjonijiet ta' fitoestrogenu oġġla minn 1  $\mu$ M minhabba l-attivazzjoni eċċessiva tal-gene indikatur tal-luċiferażi (9) (11). Filwaqt li l-kurva ta' doża - rispons tindika li l-attivazzjoni vera tas-sistema tal-ER issehh f'konċentrazzjonijiet inferjuri, l-espressjoni tal-luċiferażi miksuba f'konċentrazzjonijiet oġġla ta' fitoestrogeni jew ta' komposti simili suspettati li jipproduċu attivazzjoni eċċessiva simili għal fitoestrogenu tal-gene indikatur tal-luċiferażi trid tiġi eżaminata bir-reqqa f'sistemi tal-assaġġ TA tal-ER transfettati b'mod stabbli (see Appendix 2).
4. Għandhom jinqraw “INTRODUZZJONI ĠENERALI” u “KOMPONENTI TAL-ASSAĠĠ TA TAL-ER” qabel ma dan l-assaġġ jintuża għal finijiet regolatorji. Id-definizzjonijiet u l-abbrevjazzjonijiet użati f'dan il-metodu ta' ttestjar huma deskritti fl-Appendiċi 1.

## PRINĊIPJU TAL-ASSAĠĠ (ARA WKOLL INTRODUZZJONI ĠENERALI)

5. L-assaġġ jintuża biex jindika l-irbit tal-ligand tal-ER, segwit minn traslokazzjoni tal-kumpless riċettur-ligand għan-nukleu. Fin-nukleu, il-kumpless riċettur-ligand jillega ma' elementi speċifiċi ta' rispons tad-DNA u jittransattiva l-gene rapportatur (*luc*), li jirriżulta fil-produzzjoni ta' luċiferażi u fl-emissjoni sussegwenti tad-dawl, li tista' tiġi kwantifikata bl-użu ta' luminometru. L-attività tal-luċiferażi tista' tiġi evalwata malajr u mingħajr ma jintefqu wisq flus b'numru ta' kits disponibbli kummerċjalment. It-TA tal-ER VM7Luc juża linja ta' ċelloli tal-adenokarċinoma tas-sider uman responsiva għall-ER, VM7, li giet transfettata b'mod stabbli b'binja indikatur tal-*luc* tal-firefly taħt il-kontroll ta' erba' elementi ta' rispons tal-estrogenu mqiegħda upstream mill-promotur tal-vajrus tat-tumur mammarju tal-ġrieden (MMTV), biex jiġu identifikati sustanzi b'attività agonista jew antagonista tal-ER *in vitro*. Dan il-promotur tal-MMTV jesibixxi biss reattività inkroċjata minuri ma' ormoni sterojdi u mhux sterojdi oħrajn (8). Il-kriterji għall-interpretazzjoni tad-*data* huma deskritti fid-dettall fil-paragrafu 41. Fil-qosor, rispons pożittiv jiġi identifikat minn kurva konċentrazzjoni rispons li jkun fiha tal-anqas tliet punti bi żbarri ta' errur mhux imrikkba (medja  $\pm$  SD), kif ukoll tibdil fl-amplitudni (unità tad-dawl relattiva normalizzata [RLU]) ta' tal-anqas 20 % tal-valur massimali għall-istandard referenzjarju (17 $\beta$ -estradiol [E2; CASRN

50-28-2] għall-assaġġ tal-agonisti, raloksifen HCl [Ral; CASRN 84449-90-1]/E2 għall-assaġġ tal-antagonisti).

## **PROĊEDURA**

### **Linja ta' Ċelloli**

6. Il-linja ta' ċelloli trasferita b'mod stabbli VM7Luc4E2 għandha tintuża għall-assaġġ. Il-linja ta' ċelloli bhalissa hi disponibbli biss bi ftehim ta' liċenzjar tekniku mill-University of California, Davis, California, l-Istati Uniti<sup>1</sup>, u minn Xenobiotic Detection Systems Inc., Durham, North Carolina, l-Istati Uniti<sup>2</sup>.

### **Stabbiltà tal-Linja ta' Ċelloli**

7. Biex jinżammu l-istabbiltà u l-integrità tal-linja ta' ċelloli, iċ-ċelloli għandhom jittkabbru għal aktar minn passaġġ wieħed mill-istokk friżat fil-media ta' żamma taċ-ċelloli (ara l-paragrafu 9). Iċ-ċelloli ma għandhomx jiġu kulturati għal aktar minn 30 passaġġ. Għal-linja ta' ċelloli VM7Luc4E2, 30 passaġġ se jkunu bejn wieħed u ieħor tliet xhur.

### **Kultura taċ-Ċelloli u Kundizzjonijiet tal-Pjastrament**

8. Il-proċeduri speċifikati fil-Gwida dwar Prattika Tjaba tal-Kultura taċ-Ċelloli (5) (6) għandhom jiġu segwiti biex tiġi żgurata l-kwalità tal-materjali u tal-metodi kollha biex jinżammu l-integrità, il-validità u r-riproducibbiltà ta' kwalunkwe hidma mwettqa.
9. Iċ-ċelloli VM7Luc4E2 jinżammu f'medium RPMI 1640 supplimentat b'0,9 % Pen-Strep u bi 8,0 % serum bovin fetali (FBS) f'inkubatur tal-kultura tat-tessuti dedikat f'37°C ± 1°C, 90 % ± 5 % umdità, u f'5,0 % ± 1 % CO<sub>2</sub>/arja.

---

<sup>1</sup> 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](mailto:msdenison@ucdavis.edu), (530) 754-8649

<sup>2</sup> Xenobiotic Detection Systems Inc. 1601 East Geer Street, Suite S, Durham NC, 27704 USA, posta elettronika: [info@dioxins.com](mailto:info@dioxins.com), Telefown: 919-688-4804, Fax: 919-688-4404

10. Malli jilhq konfluwenza ta' ~80 %, iċ-ċelloli VM7Luc4E2 jiġu subkolturati u kundizzjonati għal ambjent hieles minn estroġenu għal 48 siegħa qabel il-pjastrament taċ-ċelloli fi pjastri b'96 bwejra għall-esponiment għas-sustanzi kimiċi tat-test u għall-analiżi tal-induzzjoni dipendenti mill-estroġenu tal-attività ta' luċiferażi. Il-medium hieles mill-estroġenu (EFM) fih Modifika ta' Dulbecco tal-Medium ta' Eagle (DMEM) mingħajr fenol aħmar, supplimentat b'4,5 % FBS trattat bil-faħam/bid-dekstran, 1,9 % L-glutamina, u 0,9 % Pen-Strep. Kull oġġett tal-plastik għandu jkun hieles minn attività estroġenika [ara l-protokoll dettaljat (7)].

### **Kriterji ta' Aċċettabbiltà**

11. L-aċċettazzjoni jew ir-rifjut ta' test huma bbażati fuq l-evalwazzjoni ta' standard referenzjarju u r-riżultati tal-kontroll minn kull esperiment imwettaq fi pjastra b'96 bwejra. Kull standard referenzjarju jiġi ttestjat f'konċentrazzjonijiet multipli u hemm diversi kampjuni ta' kull konċentrazzjoni ta' referenza u ta' kontroll. Ir-riżultati jitqabblu mal-kontrolli tal-kwalità (QC) għal dawn il-parametri li ġew derivati mill-bażijiet ta' *data* storiċi dwar l-agonisti u l-antagonisti generati minn kull laboratorju matul il-wiri tal-profiċjenza. Il-bażijiet ta' *data* storiċi huma aġġornati b'valuri tal-istandards referenzjarji u tal-kontroll fuq bażi kontinwa. Tibdiliet fit-tagħmir jew fil-kundizzjonijiet tal-laboratorju jistgħu jesigū generazzjoni ta' bażijiet ta' *data* storiċi aġġornati.

### *Test tal-Agonisti*

#### Test għas-Sejbien tal-Medda

- Induzzjoni: L-induzzjoni tal-pjastri għandha titkejjel bid-divizjoni tal-ogħla valur medju tal-unità tad-dawl relattiva (RLU) tal-istandard referenzjarju E2 bil-valur medju tal-RLU tal-kontroll bid-DMSO. Normalment tinkiseb induzzjoni għal hames darbiet, iżda għall-fini ta' aċċettazzjoni, l-induzzjoni għandha tkun ekwivalenti għal erba' darbiet jew aktar.
- Riżultati tal-kontroll bid-DMSO: Il-valuri tal-RLU tal-kontroll b'solvent għandhom ikunu fi hdan 2,5 darbiet id-devjazzjoni standard tal-valur medju storiku tal-RLU tal-kontroll b'solvent.
- Esperiment li jonqos milli jilhaq wiehed mill-kriterji ta' aċċettazzjoni għandu jiġi injorat u ripetut.

#### Test Komprensiv

Dan jinkludi l-kriterji ta' aċċettabbiltà mit-test tas-sejba tal-medda tal-agonisti u dawn li ġejjin:

- Ir-rizultati tal-istandards referenzjarji: Il-kurva konċentrazzjoni rispons tal-istandard referenzjarju E2 għandha tkun ta' forma sigmojde u jkollha tal-anqas tliet valuri fi ħdan it-taqsimi lineari tal-kurva konċentrazzjoni rispons.
- Riżultati tal-kontroll pożittiv: Il-valuri tal-RLU tal-kontroll b'metossiklor għandhom ikunu akbar mill-medja tad-DMSO flimkien ma' tliet darbiet id-devjazzjoni standard mill-medja tad-DMSO.
- Esperiment li jonqos milli jilhaq xi wieħed mill-kriterji ta' aċċettazzjoni għandu jiġi injorat u ripetut.

### *Test tal-Antagonisti*

#### Test għas-Sejbien tal-Medda

- Tnaqqis: It-tnaqqis tal-pjastri jitkejjel bid-diviżjoni tal-ogħla valur medju tal-RAL/tal-istandard referenzjarju tal-E2 bil-valur medju tal-RLU tal-kontroll bid-DMSO. Normalment jinkiseb tnaqqis ta' hames darbiet, iżda għall-finijiet ta' aċċettazzjoni, it-tnaqqis għandu jkun ekwivalenti għal tliet darbiet jew aktar.
- Ir-rizultati tal-kontroll b'E2: Il-valuri tal-RLU tal-kontroll b'E2 għandhom ikunu fi ħdan 2,5 darbiet id-devjazzjoni standard tal-valur medju storiku tal-RLU tal-kontroll b'E2.
- Riżultati tal-kontroll bid-DMSO: Il-valuri tal-RLU tal-kontroll bid-DMSO għandhom ikunu fi ħdan 2,5 darbiet id-devjazzjoni standard tal-valur medju storiku tal-RLU tal-kontroll b'solvent.
- Esperiment li jonqos milli jilhaq xi wieħed mill-kriterji ta' aċċettazzjoni jiġi injorat u ripetut.

#### Test Komprensiv

Dan jinkludi l-kriterji ta' aċċettazzjoni mit-test tas-sejba tal-medda tal-antagonisti u dawn li ġejjin:

- Ir-rizultati tal-istandards referenzjarji: Il-kurva konċentrazzjoni rispons tal-istandard referenzjarju Ral/E2 għandha tkun ta' forma sigmojde u jkollha tal-anqas tliet valuri fi ħdan it-taqsimi lineari tal-kurva konċentrazzjoni rispons.
- Riżultati tal-kontroll pożittiv: Il-valuri tal-RLU tal-kontroll b'tamossifen/E2 għandhom ikunu anqas mill-medja tal-kontroll b'E2 nieqes tliet darbiet id-devjazzjoni standard mill-medja tal-kontroll b'E2.
- Esperiment li jonqos milli jilhaq xi wieħed mill-kriterji ta' aċċettazzjoni jiġi injorat u ripetut.

### **Standards ta' Referenza, Pożittivi, u Kontrolli b'Veikolu**

#### *Kontroll b'Veikolu (Assaġġi Agonisti u Antagonisti)*

12. Il-veikolu li jintuża biex is-sustanzi kimiċi tat-test jiġu dissolti għandu jiġi ttestjat bħala kontroll b'veikolu. Il-veikolu użat matul il-validazzjoni tal-assaġġ TA tal-ER VM7Luc kien ta' 1 % (v/v) dimetilsulfossidu (DMSO, CASRN 67-68-5) (ara l-paragrafu 24). Jekk jintuża

veikolu iehor li mhuwiex DMSO, l-istandards referenzjarji, il-kontrolli u s-sustanzi kimiċi tat-test kollha għandhom jiġu ttestjati fl-istess veikolu, jekk dan ikun xieraq.

*Standard ta' Referenza (Sejbien tal-Medda tal-Agonisti)*

13. L-istandard referenzjarju hu E2 (CASRN 50-28-2). Għall-ittestjar tas-sejbien tal-medda, l-istandard ta' referenza hu msawwar minn dilwizzjoni serjali ta' erba' konċentrazzjonijiet ta' E2 ( $1,84 \times 10^{-10}$ ,  $4,59 \times 10^{-11}$ ,  $1,15 \times 10^{-11}$  u  $2,87 \times 10^{-12}$  M), b'kull konċentrazzjoni ttestjata fi bwejriet duplikati.

*Standard Referenzjarju (Inklużi l-Agonisti)*

14. E2 għall-ittestjar komprensiv hu msawwar minn dilwizzjoni serjali ta' 1:2 li tikkonsisti fi 1 l-il konċentrazzjoni (li jvarjaw minn  $3,67 \times 10^{-10}$  sa  $3,59 \times 10^{-13}$  M) tal-E2 fi bwejriet duplikati.

*Standard ta' Referenza (Sejbien tal-Medda tal-Antagonisti)*

15. L-istandard referenzjarju hu taħlita tal-Ral (CASRN 84449-90-1) u tal-E2 (CASRN 50-28-2). Ral/E2 għall-ittestjar tas-sejbien tal-medda hu msawwar minn dilwizzjoni serjali ta' tliet konċentrazzjonijiet ta' Ral ( $3,06 \times 10^{-9}$ ,  $7,67 \times 10^{-10}$ , u  $1,92 \times 10^{-10}$  M) flimkien ma' konċentrazzjoni fissa ( $9,18 \times 10^{-11}$  M) ta' E2 fi bwejriet duplikati.

*Standard Referenzjarju (Inklużi l-Antagonisti)*

16. Ral/E2 għall-ittestjar komprensiv hu msawwar minn dilwizzjoni serjali ta' 1:2 ta' Ral (li tvarja minn  $2,45 \times 10^{-8}$  sa  $9,57 \times 10^{-11}$  M) flimkien ma' konċentrazzjoni fissa ( $9,18 \times 10^{-11}$  M) ta' E2 li tikkonsisti f'disa' konċentrazzjonijiet ta' Ral/E2 fi bwejriet duplikati.

*Kontroll Pożittiv Dgħajjef (Agonist)*

17. Il-kontroll pożittiv dgħajjef hu  $9,06 \times 10^{-6}$  M *p,p'*-metossiklor (metossiklor; CASRN 72-43-5) fl-EFM.

*Kontroll Pożittiv Dgħajjef (Antagonist)*

18. Il-kontroll pożittiv dgħajjef jikkonsisti f'tamossifen (CASRN 10540-29-1)  $3,36 \times 10^{-6}$  M b' $9,18 \times 10^{-11}$  M E2 fl-EFM.

*Kontroll tal-E2 (Assaġġ tal-Antagonisti Biss)*

19. Il-kontroll tal-E2 hu  $9,18 \times 10^{-11}$  M E2 fl-EFM u jintuża bħala kontroll negattiv tal-linja bażi.

*Induzzjoni tad-Drabi (Agonist)*

20. L-induzzjoni tal-attività ta' luciferażi tal-istandard referenzjarju (E2) titkejjel bid-diviżjoni tal-oghla valur medju tal-RLU tal-istandard referenzjarju b'E2 bil-valur medju tal-RLU tal-kontroll bid-DMSO, u r-risultat għandu jkun akbar minn erba' darbiet.

*Tnaqqis tad-Drabi (Antagonist)*

21. L-attività medja ta' luciferażi tal-istandard referenzjarju (Ral/E2) titkejjel bid-diviżjoni tal-oghla valur medju tal-RLU tal-istandard referenzjarju b'Ral/E2 bil-valur medju tal-RLU tal-kontroll bid-DMSO, u għandu jkun akbar minn tliet darbiet.

*Wiri tal-Profiċjenza tal-Laboratorju* (ara l-paragrafu 14 u t-Tabelli 3 u 4 f'“KOMPONENTI TAL-ASSAĠĠ TA TAL-ER” ta' dan il-metodu ta' ttestjar)

**Veikolu**

22. Is-sustanzi kimiċi tat-test għandhom jiġu dissolti f'solvent li jissolubilizza s-sustanza kimika tat-test u li jithallat mal-medium taċ-ċelloli. L-ilma, l-etanol (purità ta' 95 % sa 100 %) u d-DMSO huma veikoli xierqa. Jekk jintuża d-DMSO, il-livell ma għandux jaqbeż il-1 % (v/v). Għal kwalunkwe veikolu, għandu jintwera li l-volum massimu użat mhuwiex ċitotossiku u ma jinterferixx mat-twettiq tal-assaġġ. L-istandards referenzjarji u l-kontrolli jiġu dissolti f'solvent 100 % u mbagħad jiġi dilwiti f'konċentrazzjonijiet xierqa fl-EFM.

**Preparazzjoni tas-Sustanzi kimiċi tat-test**

23. Is-sustanzi kimiċi tat-test jiġu dissolti fid-DMSO 100 % (jew solvent xieraq), u mbagħad jiġu dilwiti f'konċentrazzjonijiet xierqa fl-EFM. Is-sustanzi kimiċi tat-test kollha għandhom jithallew jekwilibrar f'temperatura ambjentali qabel ma jiġu dissolti u dilwiti. Is-soluzzjonijiet tas-sustanzi kimiċi tat-test għandhom jithejjew friski għal kull esperiment. Is-soluzzjonijiet ma għandux ikollhom preċipitat jew dardir notevoli. L-istokks ta' standards referenzjarji u ta' kontroll jistgħu jithejjew bl-ingrossa; madankollu, l-istandard referenzjarju, id-dilwizzjonijiet ta' kontroll u s-sustanzi kimiċi tat-test finali għandhom jithejjew friski għal kull esperiment u jintużaw fi żmien 24 siegħa mit-thejjija.

**Solubbiltà u Ċitotossicità: Kunsiderazzjonijiet għas-Sejbien tal-Medda**

24. L-ittestjar għas-sejbien tal-medda jikkonsisti f'dilwizzjonijiet serjali ta' 1:10 b'seba' punti mwettqa f'duplikati. Għall-ewwel, is-sustanzi kimiċi tat-test jiġu ttestjati sal-konċentrazzjoni massima ta' 1 mg/ml (~1 mM) għall-ittestjar tal-agonisti u ta' 20 µg/ml (~10 µM) għall-ittestjar tal-antagonisti. Jintużaw esperimenti ta' sejbien tal-medda biex jiġu determinati dawn li ġejjin:



- Il-konċentrazzjonijiet tal-bidu tas-sustanza kimika tat-test li għandhom jintużaw matul l-ittestjar komprensiv
  - Id-dilwizzjonijiet (1:2 jew 1:5) tas-sustanza kimika tat-test li għandhom jintużaw matul l-ittestjar komprensiv
25. Valutazzjoni tal-vijabbiltà/taċ-ċitotossicità taċ-ċelloli hi inkluża fil-protokoll tal-assaġġ tal-agonisti u tal-antagonisti (7) u hi inkorporata fl-ittestjar għas-sejbien tal-medda u komprensiv. Il-metodu taċ-ċitotossicità li ntuża biex tiġi vvalutata l-vijabbiltà taċ-ċelloli matul il-validazzjoni tat-TA tal-ER VM7Luc (1) kien metodu ta' osservazzjoni viżwali kwalitattiva skalar; madankollu, jista' jintuża metodu kwantitattiv għad-determinazzjoni taċ-ċitotossicità (ara l-protokoll (7)). Ma tistax tintuża *data* minn konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test li jikkawżaw tnaqqis akbar minn 20 % fil-vijabbiltà.

### **Esponiment għas-Sustanza Kimika tat-Test u Organizzazzjoni tal-Pjastra tal-Assaġġ**

26. Iċ-ċelloli jingħaddu u jitqiegħdu fi pjastri tal-koltura tat-tessuti b'96 bwejra ( $2 \times 10^5$  ċelloli għal kull bwejra) f'EFM u jiġu inkubati għal 24 siegħa biex iċ-ċelloli jithallew jaqbd u mal-pjastra. L-EFM jitneħħa u jiġi sostitwit bis-sustanzi kimiċi tat-test u ta' referenza fl-EFM u jiġi inkubat għal 19-24 siegħa. Se jkollhom jiġu applikati kunsiderazzjonijiet speċjali għal dawg is-sustanzi li jkunu volatili ħafna peress li l-bwejriet tal-kontroll fil-viċin jistgħu jiġġeneraw riżultati pożittivi foloz. F'każijiet bħal dawn, "sigillanti tal-pjastri" jistgħu jgħinu biex effettivament jiżolaw il-bwejriet individwali matul l-ittestjar, u għalhekk huma rakkomandati.

### *Testijiet ta' Sejbien tal-Medda*

27. L-ittestjar tas-sejbien tal-medda juża l-bwejriet kollha tal-pjastra b'96 bwejra biex jittestja sa sitt sustanzi kimiċi tat-test bħala dilwizzjonijiet serjali 1:10 b'seba' punti f'duplikat (ara l-Figuri 1 u 2).
- L-ittestjar tas-sejbien tal-medda *tal-agonisti* juża erba' konċentrazzjonijiet ta' E2 f'duplikat bħala l-istandard referenzjarju u erba' bwejriet replikati għall-kontroll bid-DMSO.
  - L-ittestjar tas-sejbien tal-medda *tal-antagonisti* juża tliet konċentrazzjonijiet ta' Ral/E2 b' $9,18 \times 10^{-11}$  M E2 f'duplikat bħala l-istandard referenzjarju bi tliet bwejriet replikati għall-kontrolli b'E2 u bid-DMSO.

**Figura 1: Tifsila tal-Pjastra b'96 bwejra ghat-Test tas-Sejbien tal-Medda tal-Agonisti**

|          | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    | 12    |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <b>A</b> | 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>B</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 |
| <b>C</b> | TC1-3 | TC1-3 | TC2-3 | TC2-3 | TC3-3 | TC3-3 | TC4-3 | TC4-3 | TC5-3 | TC5-3 | TC6-3 | TC6-3 |
| <b>D</b> | TC1-4 | TC1-4 | TC2-4 | TC2-4 | TC3-4 | TC3-4 | TC4-4 | TC4-4 | TC5-4 | TC5-4 | TC6-4 | TC6-4 |
| <b>E</b> | TC1-5 | TC1-5 | TC2-5 | TC2-5 | TC3-5 | TC3-5 | TC4-5 | TC4-5 | TC5-5 | TC5-5 | TC6-5 | TC6-5 |
| <b>F</b> | TC1-6 | TC1-6 | TC2-6 | TC2-6 | TC3-6 | TC3-6 | TC4-6 | TC4-6 | TC5-6 | TC5-6 | TC6-6 | TC6-6 |
| <b>G</b> | TC1-7 | TC1-7 | TC2-7 | TC2-7 | TC3-7 | TC3-7 | TC4-7 | TC4-7 | TC5-7 | TC5-7 | TC6-7 | TC6-7 |
| <b>H</b> | E2-1  | E2-2  | E2-3  | E2-4  | VC    | VC    | VC    | VC    | E2-1  | E2-2  | E2-3  | E2-4  |

Abbrevjazzjonijiet: E2-1 sa E2-4 = konċentrazzjonijiet tal-istandard referenzjarju b'E2 (minn gholjin sa baxxi); TC1-1 sa TC1-7 = konċentrazzjonijiet (minn gholjin sa baxxi) tas-sustanza kimika tat-test 1 (TC1); TC2-1 sa TC2-7 = konċentrazzjonijiet (minn gholjin sa baxxi) tas-sustanza kimika tat-test 2 (TC2); TC3-1 sa TC3-7 = konċentrazzjonijiet (minn gholjin sa baxxi) tas-sustanza kimika tat-test 3 (TC3); TC4-1 sa TC4-7 = konċentrazzjonijiet (minn gholjin sa baxxi) tas-sustanza kimika tat-test 4 (TC4); TC5-1 sa TC5-7 = konċentrazzjonijiet (minn gholjin sa baxxi) tas-sustanza kimika tat-test 5 (TC5); TC6-1 sa TC6-7 = konċentrazzjonijiet (minn gholjin sa baxxi) tas-sustanza kimika tat-test 6 (TC6); VC = kontroll b'veikolu (DMSO [1 % v/v EFM.]).

**Figura 2: Tifsila tal-Pjastra b'96 bwejra ghat-Test tas-Sejbien tal-Medda tal-Antagonisti**

|          | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    | 12    |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <b>A</b> | 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>B</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 |
| <b>C</b> | TC1-3 | TC1-3 | TC2-3 | TC2-3 | TC3-3 | TC3-3 | TC4-3 | TC4-3 | TC5-3 | TC5-3 | TC6-3 | TC6-3 |
| <b>D</b> | TC1-4 | TC1-4 | TC2-4 | TC2-4 | TC3-4 | TC3-4 | TC4-4 | TC4-4 | TC5-4 | TC5-4 | TC6-4 | TC6-4 |
| <b>E</b> | TC1-5 | TC1-5 | TC2-5 | TC2-5 | TC3-5 | TC3-5 | TC4-5 | TC4-5 | TC5-5 | TC5-5 | TC6-5 | TC6-5 |
| <b>F</b> | TC1-6 | TC1-6 | TC2-6 | TC2-6 | TC3-6 | TC3-6 | TC4-6 | TC4-6 | TC5-6 | TC5-6 | TC6-6 | TC6-6 |
| <b>G</b> | TC1-7 | TC1-7 | TC2-7 | TC2-7 | TC3-7 | TC3-7 | TC4-7 | TC4-7 | TC5-7 | TC5-7 | TC6-7 | TC6-7 |
| <b>H</b> | Ral-1 | Ral-2 | Ral-3 | VC    | VC    | VC    | E2    | E2    | E2    | Ral-1 | Ral-2 | Ral-3 |

Abbrevjazzjonijiet: E2 = kontroll b'E2; Ral-1 sa Ral-3 = konċentrazzjonijiet tal-istandard referenzjarju b'Raloksifen/E2 (minn gholjin sa baxxi); TC1-1 sa TC1-7 = konċentrazzjonijiet (minn gholjin sa baxxi) tas-sustanza kimika tat-test 1 (TC1); TC2-1 sa TC2-7 = konċentrazzjonijiet (minn gholjin sa baxxi) tas-sustanza kimika tat-test 2 (TC2); TC3-1 sa TC3-7 = konċentrazzjonijiet (minn gholjin sa baxxi) tas-sustanza kimika tat-test 3 (TC3); TC4-1 sa TC4-7 = konċentrazzjonijiet (minn gholjin sa baxxi) tas-sustanza kimika tat-test 4 (TC4); TC5-1 sa TC5-7 = konċentrazzjonijiet (minn gholjin sa baxxi) tas-sustanza kimika tat-test 5 (TC5); TC6-1 sa TC6-7 = konċentrazzjonijiet (minn gholjin sa baxxi) tas-sustanza kimika tat-test 6 (TC6); VC = kontroll b'veikolu (DMSO [1 % v/v EFM.]).

Nota: Is-sustanzi kimiċi tat-test kollha jiġu ttestjati fil-preżenza ta'  $9,18 \times 10^{-11}$  M E2.

28. Il-volum finali rakkomandat tal-media meħtieġ għall kull bwejra hu ta' 200  $\mu$ l. Uża biss pjastri tat-test li fihom iċ-ċelloli fil-bwejriet kollha jagħtu vijabbiltà ta' 80 % u aktar.

29. Id-determinazzjoni tal-konċentrazzjonijiet tal-bidu għall-ittestjar komprensiv tal-**agonisti** hi deskritta fid-dettall fil-protokoll tal-agonisti (7). Fil-qosor, jintużaw il-kriterji li ġejjin:

- Jekk ma jkun hemm ebda punt fil-kurva tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li jkun akbar mill-medja flimkien ma' tliet darbiet id-devjazzjoni standard tal-kontroll bid-DMSO, l-ittestjar komprensiv isir bl-użu ta' dilwizzjoni serjali 1:2 bi 11-il punt li tibda bil-konċentrazzjoni solubbli massima.
- Jekk ikun hemm punti fil-kurva tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li jkunu akbar mill-medja flimkien ma' tliet darbiet id-devjazzjoni standard tal-kontroll bid-DMSO, il-konċentrazzjoni tal-bidu li tkun se tintuża għall-iskema ta' dilwizzjoni bi 11-il punt f'ittestjar komprensiv għandha tkun log oghla mill-konċentrazzjoni li tagħti l-ogħla valur aġġustat tal-RLU fis-sejbien tal-medda. L-iskema ta' dilwizzjoni bi 11-il punt se tkun ibbażata fuq dilwizzjonijiet 1:2 jew 1:5 skont il-kriterji li ġejjin:

Għandha tintuża dilwizzjoni serjali 1:2 bi 11-il punt jekk il-medda ta' konċentrazzjoni li tirriżulta tkopri l-medda sħiħa ta' risponsi fuq il-bażi tal-kurva ta' rispons tal-konċentrazzjoni ġenerata fit-test tas-sejbien tal-medda. Inkella, uża dilwizzjoni ta' 1:5.

- Jekk sustanza kimika tat-test turi kurva konċentrazzjoni rispons bifazika fit-test tas-sejbien tal-medda, iż-żewġ fażijiet għandhom ikunu solvuti fl-ittestjar komprensiv ukoll.

30. Id-determinazzjoni tal-konċentrazzjonijiet tal-bidu għall-ittestjar komprensiv tal-**antagonisti** hi deskritta fid-dettall fil-protokoll tal-antagonisti (7). Fil-qosor, jintużaw il-kriterji li ġejjin:

- Jekk ma jkun hemm ebda punt fil-kurva tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li jkun anqas mill-medja nieqes tliet darbiet id-devjazzjoni standard tal-kontroll b'E2, l-ittestjar komprensiv isir bl-użu ta' dilwizzjoni serjali 1:2 bi 11-il punt li tibda bil-konċentrazzjoni solubbli massima.
- Jekk ikun hemm punti fil-kurva tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li jkunu anqas mill-medja nieqes tliet darbiet id-devjazzjoni standard tal-kontroll b'E2, il-konċentrazzjoni tal-bidu li tkun se tintuża għall-iskema ta' dilwizzjoni bi 11-il punt f'ittestjar komprensiv għandha tkun waħda minn dawn li ġejjin:

- Il-konċentrazzjoni li tagħti l-anqas valur aġġustat tal-RLU fis-sejbien tal-medda

- Il-konċentrazzjoni solubbli massima (Ara l-protokoll tal-antagonisti (7), Figura 14-2)
- L-anqas konċentrazzjoni ċitotossika (Ara l-protokoll tal-antagonisti (7), Figura 14-3 għal eżempju relatat)
- L-iskema ta' dilwizzjoni bi 11-il punt se tkun ibbażata fuq serjali jew dilwizzjoni ta' 1:2 jew 1:5 skont il-kriterji li ġejjin:

Għandha tintuża dilwizzjoni serjali 1:2 bi 11-il punt jekk il-medda ta' konċentrazzjoni li tirriżulta tkopri l-medda sħiħa ta' rispons fuq il-bażi tal-kurva ta' rispons tal-konċentrazzjoni generata fit-test tas-sejbien tal-medda. Inkella għandha tintuża dilwizzjoni ta' 1:5.

### *Testijiet Komprensivi*

31. L-ittestjar komprensiv jikkonsisti f'dilwizzjonijiet serjali bi 11-il punt (dilwizzjonijiet serjali ta' 1:2 jew 1:5 fuq il-bażi tal-konċentrazzjoni tal-bidu għall-kriterji ta' ttestjar komprensiv) b'kull konċentrazzjoni ttestjata fi bwejriet triplikati tal-pjastra b'96 bwejra (ara l-Figuri 3 u 4).
- L-ittestjar komprensiv tal-*agonisti* juża 11-il konċentrazzjoni ta' E2 f'duplikat bħala l-istandard referenzjarju. Erba' bwejriet replikati għall-kontroll bid-DMSO u erba' bwejriet repliki għall-kontroll b'metossiklor ( $9,06 \times 10^{-6}$  M) jiġu inklużi f'kull pjastra.
- L-ittestjar komprensiv tal-*antagonisti* juża disa' konċentrazzjonijiet ta' Ral/E2 b' $9,18 \times 10^{-11}$  M E2 f'duplikat bħala l-istandard referenzjarju, b'erba' bwejriet repliki għall-kontroll b'E2  $9,18 \times 10^{-11}$  M, erba' bwejriet repliki għall-kontrolli bid-DMSO, u erba' bwejriet repliki għat-tamossifen  $3,36 \times 10^{-6}$  M.

**Figura 3: Tifsila tal-Pjastra b'96 bwejra ghat-Test Komprensiv tal-Agonisti**

|          | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10     | 11     | 12  |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|-----|
| <b>A</b> | TC1-1 | TC1-2 | TC1-3 | TC1-4 | TC1-5 | TC1-6 | TC1-7 | TC1-8 | TC1-9 | TC1-10 | TC1-11 | VC  |
| <b>B</b> | TC1-1 | TC1-2 | TC1-3 | TC1-4 | TC1-5 | TC1-6 | TC1-7 | TC1-8 | TC1-9 | TC1-10 | TC1-11 | VC  |
| <b>C</b> | TC1-1 | TC1-2 | TC1-3 | TC1-4 | TC1-5 | TC1-6 | TC1-7 | TC1-8 | TC1-9 | TC1-10 | TC1-11 | VC  |
| <b>D</b> | TC2-1 | TC2-2 | TC2-3 | TC2-4 | TC2-5 | TC2-6 | TC2-7 | TC2-8 | TC2-9 | TC2-10 | TC2-11 | VC  |
| <b>E</b> | TC2-1 | TC2-2 | TC2-3 | TC2-4 | TC2-5 | TC2-6 | TC2-7 | TC2-8 | TC2-9 | TC2-10 | TC2-11 | Met |
| <b>F</b> | TC2-1 | TC2-2 | TC2-3 | TC2-4 | TC2-5 | TC2-6 | TC2-7 | TC2-8 | TC2-9 | TC2-10 | TC2-11 | Met |
| <b>G</b> | E2-1  | E2-2  | E2-3  | E2-4  | E2-5  | E2-6  | E2-7  | E2-8  | E2-9  | E2-10  | E2-11  | Met |
| <b>H</b> | E2-1  | E2-2  | E2-3  | E2-4  | E2-5  | E2-6  | E2-7  | E2-8  | E2-9  | E2-10  | E2-11  | Met |

Abbrevjazzjonijiet: TC11-1 sa TC1-11 = konċentrazzjonijiet (minn għoljin sa baxxi) tas-sustanza kimika tat-test 1; TC2-1 sa TC2-11 = konċentrazzjonijiet (minn għoljin sa baxxi) tas-sustanza kimika tat-test 2; E2-1 sa E2-11 = konċentrazzjonijiet tal-istandard referenzjarju b'E2 (minn għoljin sa baxxi); Met = kontroll pożittiv dghajjef b'p,p' metossiklor; VC = kontroll b'veikolu tal-EFM bid-DMSO (1 % v/v)

**Figura 4: Tifsila tal-Pjastra b'96 bwejra ghat-Test Komprensiv tal-Antagonisti**

|          | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10     | 11     | 12  |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|-----|
| <b>A</b> | TC1-1 | TC1-2 | TC1-3 | TC1-4 | TC1-5 | TC1-6 | TC1-7 | TC1-8 | TC1-9 | TC1-10 | TC1-11 | VC  |
| <b>B</b> | TC1-1 | TC1-2 | TC1-3 | TC1-4 | TC1-5 | TC1-6 | TC1-7 | TC1-8 | TC1-9 | TC1-10 | TC1-11 | VC  |
| <b>C</b> | TC1-1 | TC1-2 | TC1-3 | TC1-4 | TC1-5 | TC1-6 | TC1-7 | TC1-8 | TC1-9 | TC1-10 | TC1-11 | VC  |
| <b>D</b> | TC2-1 | TC2-2 | TC2-3 | TC2-4 | TC2-5 | TC2-6 | TC2-7 | TC2-8 | TC2-9 | TC2-10 | TC2-11 | VC  |
| <b>E</b> | TC2-1 | TC2-2 | TC2-3 | TC2-4 | TC2-5 | TC2-6 | TC2-7 | TC2-8 | TC2-9 | TC2-10 | TC2-11 | Tam |
| <b>F</b> | TC2-1 | TC2-2 | TC2-3 | TC2-4 | TC2-5 | TC2-6 | TC2-7 | TC2-8 | TC2-9 | TC2-10 | TC2-11 | Tam |
| <b>G</b> | Ral-1 | Ral-2 | Ral-3 | Ral-4 | Ral-5 | Ral-6 | Ral-7 | Ral-8 | Ral-9 | E2     | E2     | Tam |
| <b>H</b> | Ral-1 | Ral-2 | Ral-3 | Ral-4 | Ral-5 | Ral-6 | Ral-7 | Ral-8 | Ral-9 | E2     | E2     | Tam |

Abbrevjazzjonijiet: E2 = kontroll b'E2; Ral-1 sa Ral-9 = konċentrazzjonijiet tal-istandard referenzjarju b'Raloksifen/E2 (minn għoljin sa baxxi); Tam = kontroll pożittiv dghajjef b'Tamossifen/E2; TC1-1 sa TC1-11 = konċentrazzjonijiet (minn għoljin sa baxxi) tas-sustanza kimika tat-test 1 (TC1); TC2-1 sa TC2-11 = konċentrazzjonijiet (minn għoljin sa baxxi) tas-sustanza kimika tat-test 2 (TC2); VC = kontroll b'veikolu (DMSO [1 % v/v EFM.]).

Nota: Kif innotat, kull bwejra ta' referenza u tat-test ikun fiha konċentrazzjoni fissa ta' E2 (9,18 x 10<sup>-11</sup>M)

32. Testijiet komprensivi ripetuti għall-istess sustanza kimika għandhom jitwettqu f'jiem differenti, biex tiġi żgurata indipendenza. Tal-anqas għandhom isiru żewġ testijiet komprensivi. Jekk ir-riżultati tat-testijiet jikkontradixxu lil xulxin (eż. test minnhom ikun pożittiv, u l-iehor negattiv), jew jekk wieħed mit-testijiet ikun inadegwat, għandu jsir it-tielet test addizzjonali.

### Kejl tal-Luminexxa

33. Il-luminexxa titkejjel fil-medda ta' 300 sa 650 nm, bl-użu ta' luminometru tal-injezzjoni u b'softwer li jikkontrolla l-volum tal-injezzjoni u l-intervall tal-kejl (7). L-emissjoni tad-dawl minn kull bwejra hi espressa bħala RLU għal kull bwejra.

## ANALIŻI TAD-DATA

### Determinazzjoni tal-EC<sub>50</sub> /IC<sub>50</sub>

34. Il-valur tal-EC<sub>50</sub> (il-konċentrazzjoni effettiva medjana ta' sustanza kimika tat-test [agonisti]) u l-valur tal-IC<sub>50</sub> (il-konċentrazzjoni inibitorja medjana ta' sustanza kimika tat-test [antagonisti]) huma determinati mid-*data* dwar ir-rispons għall-konċentrazzjoni. Għal sustanzi kimiċi tat-test li huma pożittivi f'waħda mill-konċentrazzjonijiet jew aktar, il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li tikkawża rispons medjana (IC<sub>50</sub> jew EC<sub>50</sub>) hi kkalkolata bl-użu ta' analizi tal-funzjoni Hill jew ta' alternattiva xierqa. Il-funzjoni Hill hi mudell matematiku logistiku b'erba' parametri relatat mal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test mar-rispons (tipikament skont kurva sigmojde) bl-użu tal-ekwazzjoni ta' hawn taħt:

$$Y = Qiegh + \frac{(Quccata - Qiegh)}{1 + 10^{(lgEC_{50} - X)Hill Slope}}$$

Fejn:

Y = rispons (jiġifieri RLUs);

X = il-logaritmu tal-konċentrazzjoni;

Il-qiegh = ir-rispons minimu;

Il-quccata = ir-rispons massimu;

lg EC<sub>50</sub> (jew lg IC<sub>50</sub>) = il-logaritmu ta' X bħala n-nofs tar-rispons bejn il-Quccata u l-Qiegh;

Hillslope = il-gradjent tal-kurva.

Il-mudell jikkalkola liema huma l-aktar xierqa għall-parametri tal-Quccata, tal-Qiegh, tal-Hillslope, u tal-IC<sub>50</sub> u tal-EC<sub>50</sub>. Għall-kalkolu tal-valuri tal-EC<sub>50</sub> u tal-IC<sub>50</sub>, għandu jintuża softwer statistiku xieraq (eż. softwer statistiku Graphpad Prism<sup>R</sup>).

## Determinazzjoni tal-Eċċezzjonijiet Estremi

35. Ġudizzju statistiku tajjeb jista' jiġi ffaċilitat billi jiġi inkluz it-test-Q (izda mhux limitat għalih biss) (ara l-protokoll tal-agonisti u tal-antagonisti (7) għad-determinazzjoni ta' bwejrjet "mhux utilizzabbli" li se jiġu esklużi mill-analiżi tad-*data*).
36. Għal repliki tal-istandard referenzjarju b'E2 (daqs ta' tnejn tal-kampjun), kwalunkwe valur aġġustat tal-RLU għal replika f'koncentrazzjoni partikolari ta' E2 jitqies eċċezzjoni estrema jekk il-valur tiegħu jkun aktar minn 20 % aktar jew anqas mill-valur tal-RLU aġġustat għal dik il-koncentrazzjoni fil-bażi ta' *data* storika.

## Il-Ġbir u l-Aġġustament tad-*Data* tal-Luminometru għall-Ittestjar tas-Sejbien tal-Medda

37. Id-*data* mhux proċessata mil-luminometru għandha tiġi trasferita fi spreadsheet mudell imfassla għall-assaġġ. Għandu jiġi determinat jekk hemmx punti ta' *data* li jkunu eċċezzjonijiet estremi li jridu jitnehhew. (Ara l-Kriterji ta' Aċċettazzjoni tat-Test għal parametri li huma determinati fl-analizijiet). Għandhom isiru l-kalkoli li ġejjin:

### *Agonist*

- Stadju 1 Ikkalkola l-valur medju għall-kontroll b'veikolu (VC) DMSO.
- Stadju 2 Naqqas il-valur medju tal-VC DMSO mill-valur ta' kull bwejra biex tinnormalizza d-*data*.
- Stadju 3 Ikkalkola l-induzzjoni medja tad-drabi għall-istandard referenzjarju (E2).
- Stadju 4 Ikkalkola l-valur medju tal-EC<sub>50</sub> għas-sustanzi kimiċi tat-test.

### *Antagonist*

- Stadju 1 Ikkalkola l-valur medju għall-VC DMSO.
- Stadju 2 Naqqas il-valur medju tal-VC DMSO mill-valur ta' kull bwejra biex tinnormalizza d-*data*.
- Stadju 3 Ikkalkola t-tnaqqis medju tad-drabi għall-istandard referenzjarju (Ra/E2).
- Stadju 4 Ikkalkola l-valur medju għall-istandard referenzjarju b'E2.
- Stadju 5 Ikkalkola l-valur medju tal-IC<sub>50</sub> għas-sustanzi kimiċi tat-test.

## Il-Ġbir u l-Aġġustament tad-*Data* tal-Luminometru għall-Ittestjar Komprensiv

38. *Data* mhux proċessata mil-luminometru għandha tiġi trasferita fi spreadsheet mudell imfassla għall-assaġġ. Għandu jiġi determinat jekk hemmx punti ta' *data* li jkunu eċċezzjonijiet estremi li jridu jitnehhew. (Ara l-Kriterji ta' Aċċettazzjoni tat-Test għal parametri li huma determinati fl-analizijiet). Isiru l-kalkoli li ġejjin:

### *Agonist*

- Stadju 1 Ikkalkola l-valur medju għall-VC DMSO.
- Stadju 2 Naqqas il-valur medju tal-VC DMSO mill-valur ta' kull bwejra biex tinnormalizza d-data.
- Stadju 3 Ikkalkola l-induzzjoni medja tad-drabi għall-istandard referenzjarju (E2).
- Stadju 4 Ikkalkola l-valur medju tal-EC<sub>50</sub> għall-E2 u għas-sustanzi kimiċi tat-test.
- Stadju 5 Ikkalkola l-valur medju agġustat tal-RLU għall-metossiklor.

### *Antagonist*

- Stadju 1 Ikkalkola l-valur medju għall-VC DMSO.
- Stadju 2 Naqqas il-valur medju tal-VC DMSO mill-valur ta' kull bwejra biex tinnormalizza d-data.
- Stadju 3 Ikkalkola l-induzzjoni medja tad-drabi għall-istandard referenzjarju (Ral/E2).
- Stadju 4 Ikkalkola l-valur medju tal-IC<sub>50</sub> għall-Ral/E2 u għas-sustanzi kimiċi tat-test.
- Stadju 5 Ikkalkola l-valur medju agġustat tal-RLU għat-tamossifen.
- Stadju 6 Ikkalkola l-valur medju għall-istandard referenzjarju b'E2.

### **Il-Kriterji ta' Interpretazzjoni tad-Data**

39. It-TA tal-ER VM7Luc hu maħsub bħala parti minn approċċ tal-piż tal-evidenza biex jgħin fil-prijoritizzazzjoni tas-sustanzi għall-ittestjar tal-ED *in vivo*. Parti minn din il-proċedura ta' prijoritizzazzjoni se tkun il-klassifikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test bħala pożittiva jew negattiva għall-attività agonista jew antagonista tal-ER. Il-kriterji ta' deċiżjoni pożittiva u negattiva użati fl-istudju ta' validazzjoni tat-TA tal-ER VM7Luc huma deskritti fit-Tabella 1.

**Tabella 1:** Kriterji ta' Deċiżjoni Pożittiva u Negattiva

|                          |
|--------------------------|
| <b>ATTIVITÀ AGONISTA</b> |
|--------------------------|



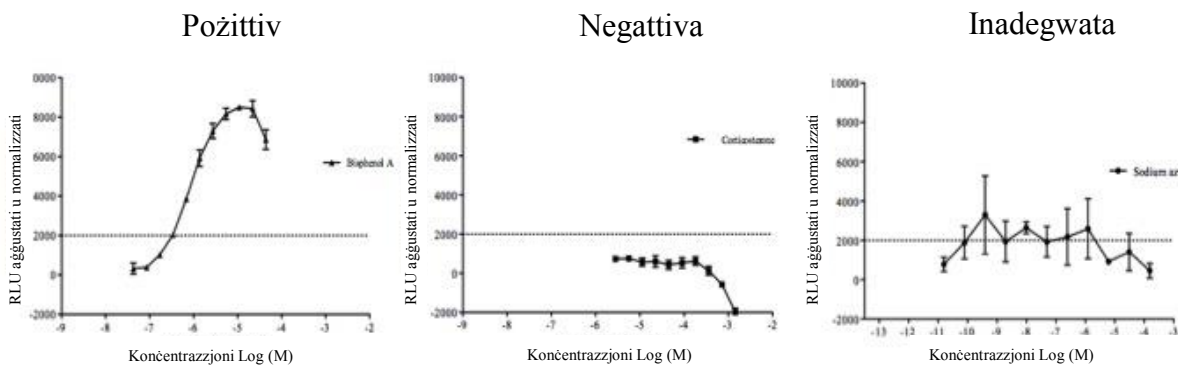
|                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|-----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Pożittiva</b>            | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Is-sustanzi kimiċi tat-test kollha klassifikati bħala <i>pożittivi għal</i> attività agonista tal-ER għandu jkollhom kurva konċentrazzjoni-rispons li tikkonsisti f'linja bażi, segwita minn pendil pożittiv, u li tikkonkludi fi plateau jew f'quċċata. F'xi każijiet, tnejn biss minn dawn il-karatteristiċi (linja bażi–pendil jew pendil–quċċata) ikunu jistgħu jiġu definiti.</li> <li>- Il-linja li tiddefinixxi l-pendil pożittiv għandu jkun fiha tal-anqas tliet punti bi żbarri ta' errur mhux imrikkba (medja <math>\pm</math> SD). Il-punti li jiffurmaw il-linja bażi huma esklużi, iżda l-parti lineari tal-kurva tista' tinkludi l-quċċata jew l-ewwel punt tal-plateau.</li> <li>- Klassifikazzjoni pożittiva teħtieġ amplitudni tar-rispons, id-differenza bejn il-linja bażi u l-quċċata, ta' tal-anqas 20 % tal-valur massimali għall-istandard referenzjarju, E2 (jiġifieri 2000 RLU jew aktar meta l-valur tar-rispons massimali tal-istandards referenzjarji [E2] ikun aġġustat għal 10,000 RLU).</li> <li>- Jekk possibbli, valur tal-EC<sub>50</sub> għandu jiġi kkalkolat għal kull sustanza kimika tat-test pożittiva.</li> </ul> |
| <b>Negattiv</b>             | L-RLU aġġustata medja għal konċentrazzjoni partikolari tkun fil-livell tal-valur medju tal-RLU tal-kontroll bid-DMSO flimkien ma' tliet darbiet id-devjazzjoni standard tal-RLU bid-DMSO jew aktar.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <b>Inadegwata</b>           | <i>Data</i> li ma tistax tiġi interpretata bħala valida għall-wiri tal-preżenza jew tal-assenza tal-attività minhabba limitazzjonijiet kwalitattivi jew kwantitattivi kbar titqies inadegwata u ma tistax tintuża biex jiġi determinat jekk is-sustanza kimika tat-test hix pożittiva jew negattiva. Is-sustanzi kimiċi għandhom jergħu jiġu ttestjati.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| <b>ATTIVITÀ ANTAGONISTA</b> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| <b>Pożittiva</b>            | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Id-<i>data</i> dwar is-sustanza kimika tat-test tipproduċi kurva konċentrazzjoni rispons li tikkonsisti f'linja bażi, li tkun segwita minn pendil negattiv.</li> <li>- Il-linja li tiddefinixxi l-pendil negattiv għandu jkun fiha tal-anqas tliet punti bi żbarri ta' errur mhux imrikkba; punti li jiffurmaw il-linja bażi huma esklużi, iżda l-parti lineari tal-kurva tista' tinkludi l-ewwel punt tal-plateau.</li> <li>- Għandu jkun hemm tnaqqis ta' tal-anqas 20 % fl-attività mill-valur massimali għall-istandard referenzjarju, Ral/E2 (jiġifieri 8000 RLU jew anqas meta l-valur tar-rispons massimali tal-istandard referenzjarju [Ral/E2] ikun aġġustat għal 10,000 RLU).</li> <li>- L-ogħla konċentrazzjonijiet mhux ċitotossiċi tas-sustanza kimika tat-test għandhom ikunu ekwivalenti għal <math>1 \times 10^{-5}</math> M jew anqas.</li> <li>- Jekk possibbli, valur tal-IC<sub>50</sub> għandu jiġi kkalkolat għal kull sustanza kimika tat-test pożittiva.</li> </ul>                                                                                                                                                                 |
| <b>Negattiva</b>            | Il-punti tad- <i>data</i> kollha huma oġġla mill-valur tal- ED <sub>80</sub> (80 % tar-rispons tal-E2, jew 8000 RLUs), f'konċentrazzjonijiet anqas minn $1,0 \times 10^{-5}$ M.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |

### Inadegwata

Id-*data* li ma tistax tiġi interpretata bħala valida għall-wiri tal-preżenza jew tal-assenza tal-attività minhabba limitazzjonijiet kwalitattivi jew kwantitattivi kbar titqies inadegwata u ma tistax tintuża biex jiġi determinat jekk is-sustanza kimika tat-test hix pożittiva jew negattiva. Is-sustanza kimika għandha terġa' tiġi ttestjata.

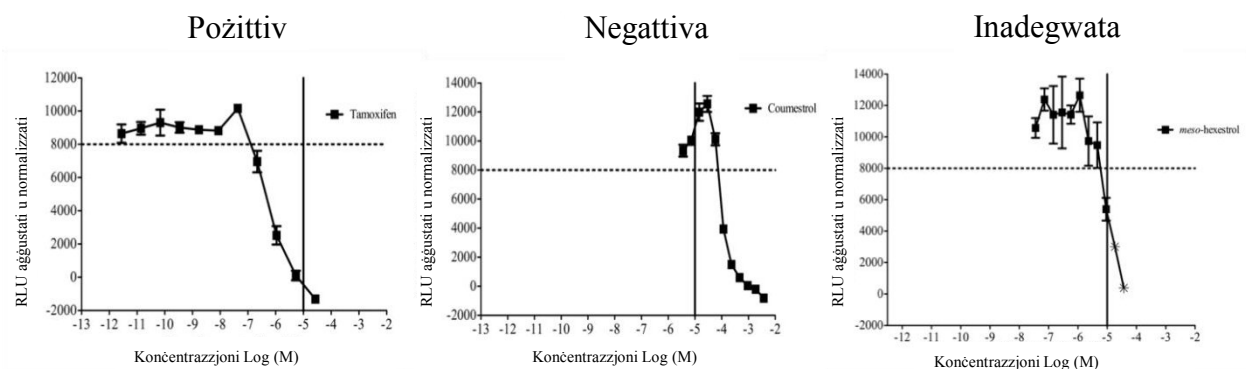
40. Ir-risultati pożittivi jiġu karatterizzati kemm mill-kobor tal-effett kif ukoll mill-koncentrazzjoni li fiha jsehh l-effett, fejn possibbli. L-eżempji ta' *data* pożittiva, negattiva u inadegwata huma murija fil-Figuri 5 u 6.

**Figura 5: Eżempji ta' Agonisti: *Data* Pożittiva, Negattiva u Inadegwata**



Linja ttikkjata tindika 20 % tar-rispons tal-E2, 2000 RLU aġġustati u normalizzati.

**Figura 6: Eżempji ta' Antagonisti: *Data* Pożittiva, Negattiva u Inadegwata**



Linja ttikkjata tindika 80 % tar-rispons tal-Ral/E2, 8000 RLU aġġustati u normalizzati.

Linja solida tindika  $1,00 \times 10^{-5}$  M. Biex rispons jitqies pożittiva, għandu jkun anqas mil-linja tat-8000 RLU, u f'koncentrazzjonijiet ta' anqas minn  $1,00 \times 10^{-5}$  M.

Il-koncentrazzjonijiet b'asterisk fil-graff mesoežestrol jindikaw punteġġi ta' vijabbiltà ta' "2" jew aktar.

Ir-rizultati tat-test għall-mesoeżestrol huma meqjusa *data* inadegwata għaliex l-uniku rispons li hu anqas minn 8,000 RLU isehh f' $1,00 \times 10^{-5}$ M.

41. Il-kalkoli tal-EC<sub>50</sub> u tal-IC<sub>50</sub> jistgħu jsiru bl-użu ta' Funzjoni Hill b'erba' parametri (ara l-protokoll tal-agonisti u l-protokoll tal-antagonisti għal aktar dettalji (7)). L-ilhuq tal-kriterji ta' aċċettabbiltà jindika li s-sistema qed topera kif suppost, iżda ma jiżgurax li kwalunkwe sessjoni partikolari tipproduċi *data* preċiża. Id-duplikazzjoni tar-rizultati tal-ewwel sessjoni hi l-aħjar garanzija li tkun giet prodotta *data* preċiża (ara l-paragrafu 19 tal-“KOMPONENTI TAL-ASSAĠĠ TA TAL-ER”).

## **RAPPORT TAT-TEST**

42. Ara l-paragrafu 20 ta' “KOMPONENTI TAL-ASSAĠĠ TA TAL-ER”.

## DOKUMENTAZZJONI

- (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  $\alpha$  and  $\beta$  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)  $\beta$ , a Modulator of ER $\alpha$  in the Uterus, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(11): 936-5941.
- (5) Balls M., *et al.* (2006). The Importance of Good Cell Culture Practice (GCCP), *ALTEX*, 23(Suppl): p. 270-273.
- (6) Coecke S., *et al.* (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice: a Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, *Alternatives to Laboratory Animals*, 33: p. 261-287.
- (7) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report, The LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals, NIH Publication No 11-7850.
- (8) Rogers J.M., Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In Vitro Mol. Toxicol.*, 13(1):67-82.
- (9) Escande A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol.*, 71(10):1459-69.

- (10) Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, Chemistry and Biology, 17(6):646-57.
- (11) Kuiper G.G, *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, Endocrinology, 139(10):4252-63.
- (12) Geisinger, *et al.* (1989). Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, Cancer 63, 280-288.
- (13) Baldwin, *et al.* (1998). BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, In Vitro Cell. Dev. Biol. – Animal, 34, 649-654.
- (14) Li, Y., *et al.* (2014). Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, Mol. Endo. 28, 2072-2081.
- (15) Rogers, J.M. u 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.

## **APPENDIĊI 4**

### **ASSAĠĠ TA' TRANSATTIVAZZJONI TAR-RICETTUR-A TAL-ESTROĠENU UMAN TRANSFETTAT B'MOD STABBLI GHAD-DETEZZJONI TA' ATTIVITÀ AGONISTA U ANTAGONISTA TA' SUSTANZI KIMIČI BL-UŻU TAL-LINJA TA' ĊELLOLI ERA CALUX**

#### **KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET (ARA WKOLL INTRODUZZJONI ĠENERALI)**

1. L-assaġġ tat-transattivazzjoni tal-ER $\alpha$  CALUX juża l-linja ta' ċelloli umana U2Os biex jindividwa attività agonista u antagonista estrogenika medjata permezz tal-alfa tar-riċettur tal-estrogeni uman (hER $\alpha$ ). L-istudju ta' validazzjoni tal-bijoassaġġ ER $\alpha$  CALUX transfettat b'mod stabbli minn BioDetection Systems BV (Amsterdam, in-Netherlands) wera r-rilevanza u l-affidabbiltà tal-assaġġ għall-iskop maħsub tiegħu (1). Il-linja ta' ċelloli ER $\alpha$  CALUX tesprimi ER $\alpha$  uman transfettat b'mod stabbli biss (2)(3).
2. Dan l-assaġġ hu mfassal b'mod speċifiku biex jindividwa transattivazzjoni medjata minn hER $\alpha$  billi jkejjel il-bijoluminexxenza bħala l-punt ta' tmiem. L-użu tal-bijoluminexxenza jintuża spiss fil-bijoassaġġi minħabba l-proporzjon għoli ta' sinjal għal storbu (4).
3. Konċentrazzjonijiet ta' fitoestrogeni oghla minn 1  $\mu$ M ġew rapportati li jattivaw b'mod eċċessiv il-gene indikatur tal-luċiferażi, li jirriżulta f' luminexxenza medjata mhux minn riċettur (5) (6) (7). Għaldaqstant, konċentrazzjonijiet oghla ta' fitoestrogeni jew ta' komposti simili ohra li jistgħu jattivaw b'mod eċċessiv l-espressjoni ta' luċiferażi, iridu jiġu eżaminati bir-reqqa f'assaġġi ta' transattivazzjoni tal-ER transfettati b'mod stabbli (ara l-Appendiċi 2).
4. Għandhom jinqraw “INTRODUZZJONI ĠENERALI” u “KOMPONENTI TAL-ASSAĠĠ TA TAL-ER” qabel ma dan l-assaġġ jintuża għal finijiet regolatorji. Id-definizzjonijiet u l-abbrevjazzjonijiet użati f'dan il-metodu ta' ttestjar huma deskritti fl-Appendiċi 1.

#### **PRINĊIPJU TAL-ASSAĠĠ (ARA WKOLL INTRODUZZJONI ĠENERALI)**

5. Il-bijoassaġġ jintuża biex jivvaluta l-irbit tal-ligand tal-ER u t-traslokazzjoni sussegwenti tal-kumplex riċettur-ligand għan-nukleu. Fin-nukleu, il-kumplex riċettur-ligand jillega elementi speċifiċi ta' rispons tad-DNA u jittransattiva gene indikatur tal-luċiferażi tal-firefly, li jirriżulta f'espressjoni ċellolari miżjuda tal-enzima luċiferażi. Wara ż-żieda tas-substrat tal-

luċiferażi, il-luċiferina, il-luċiferina tiġi trasformata fi prodott bijoluminexxenti. Id-dawl prodott faċilment jista' jiġi individwat u kwantifikat bl-użu ta' luminometru.

6. Is-sistema tat-test tuża ċelloli CALUX ER $\alpha$  transfettati b'mod stabbli. Iċ-ċelloli CALUX ER $\alpha$  oriġinaw mil-linja ta' ċelloli osteosarkoma osteoblastika umana U2OS. Iċ-ċelloli U2OS umani ġew transfettati b'mod stabbli bi 3xHRE-TATA-Luc u b'pSG5-neo-hER $\alpha$  bl-użu ta' metodu ta' kopreċipitazzjoni tal-fosfat tal-kalċju. Il-linja ta' ċelloli tal-U2OS intgħazlet bħala l-aħjar kandidat biex isservi bħala l-linja ta' ċelloli indikatur risponsiva tal-estrogeni (u ta' ormon ieħor ta' steroidi), fuq il-bażi tal-osservazzjoni li l-linja ta' ċelloli U2OS f'it li xejn uriet attività ta' riċettur endoġenu jew l-ebda attività affattu. L-assenza ta' riċetturi endoġeni għet ivvalutata bl-użu ta' plasmidi indikaturi tal-luċiferażi biss, li ma wrew ebda attività meta żdiedu l-ligandi tar-riċettur. Barra minn hekk, din il-linja ta' ċelloli sostniet risponsi b'saħħithom medjati bl-ormoni meta ġew introdotti b'mod tranżjenti r-riċetturi konjati (2) (3) (8).
7. L-ittestjar ta' sustanzi kimiċi għal attività estrogenika jew antiestrogenika bl-użu tal-linja ta' ċelloli CALUX ER $\alpha$  jinkludi sessjoni ta' qabel l-iskrinjar u sessjonijiet komprensivi. Matul is-sessjoni ta' qabel l-iskrinjar, jiġu determinati s-solubbiltà, iċ-ċitotossicità u medda ta' konċentrazzjoni rfinuta ta' sustanzi kimiċi tat-test għall-ittestjar komprensiv. Matul is-sessjonijiet komprensivi, il-medda ta' konċentrazzjoni rfinuta tas-sustanzi kimiċi tat-test jiġu ttestjati fil-bijoassaġġi ER $\alpha$  CALUX segwiti mill-klassifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi tat-test għall-agoniżmu jew għall-antagoniżmu.
8. Il-kriterji għall-interpretazzjoni tad-*data* huma deskritti fid-dettall fil-paragrafu 59. Fil-qosor, sustanza kimika tat-test titqies pożittiva għall-agoniżmu f'każ li tal-anqas żewġ konċentrazzjonijiet konsekuttivi tas-sustanza kimika tat-test juru rispons li jkun ekwivalenti għal 10 % jew oghla minn 10 % tar-rispons massimu tal-istandard referenzjarju 17 $\beta$ -estradijoli (PC<sub>10</sub>). Sustanza kimika tat-test titqies pożittiva għall-antagoniżmu f'każ li tal-anqas żewġ konċentrazzjonijiet konsekuttivi tas-sustanza kimika tat-test juru rispons li jkun ekwivalenti għal 80 % jew anqas minn 10 % tar-rispons massimu tal-istandard referenzjarju tamossifen (PC<sub>80</sub>).

## PROCĊEDURA

### Linji ta' ċelloli

9. Il-linja ta' ċelloli trasferita b'mod stabbli U2OS ER $\alpha$  CALUX għandha tintuża għall-assaġġ. Il-linja ta' ċelloli tista' tinkiseb mingħand BioDetection Systems BV, Amsterdam, in-Netherlands bi ftehim ta' liċenzjar tekniku.

10. Għandhom jintużaw kulturi ta' ċelloli hielsa minn mikoplażma biss. Il-lottijiet taċ-ċelloli użati għandhom ikunu ċċertifikati negattivi għall-kontaminazzjoni bil-mikoplażma, jew inkella għandu jsir test tal-mikoplażma qabel l-użu. Għandu jintuża RT-PCR (Reazzjoni Katina bil-Polimerazi f'Ħin Reali) għad-detezzjoni sensittiva ta' infezzjoni tal-mikoplażma (9).

### **Stabbiltà tal-linja ta' ċelloli**

11. Biex jinżammu l-istabbiltà u l-integrità taċ-ċelloli CALUX, iċ-ċelloli għandhom jinħażnu f'nitroġenu likwidu ( $-80^{\circ}\text{C}$ ). Wara li iċ-ċelloli jithallew jinħallu biex tinbeda kultura ġdida, iċ-ċelloli għandhom jiġu subkolturati tal-anqas darbtejn qabel ma jintużaw għall-valutazzjoni tal-attività agonista u antagonista estrogenika tas-sustanzi kimiċi. Iċ-ċelloli ma għandhomx jiġu subkolturati għal aktar minn 30 passaġġ.
12. Biex tiġi ssorveljata l-istabbiltà tal-linja ta' ċelloli maż-żmien, ir-risponsività tas-sistema tat-test agonistika u antagonistika għandha tiġi verifikata bl-evalwazzjoni tal- $\text{EC}_{50}$  jew tal- $\text{IC}_{50}$  tal-istandard referenzjarju. Barra minn hekk, l-induzzjoni relattiva tal-kampjun tal-kontroll pożittiv (PC) u tal-kampjun tal-kontroll negattiv (NC) għandha tiġi ssorveljata. Ir-riżultati għandhom ikunu jaqblu mal-kriterji ta' aċċettazzjoni għall-bijoassaġġ  $\text{ER}\alpha$  CALUX agonistiku (Tabella 3C) jew antagonistiku (Tabella 4C). L-istandards referenzjarji, il-kontrolli pożittivi u dawk negattivi huma mogħtija fit-Tabella 1 u fit-Tabella 2 għall-modalità agonistika u dik antagonistika rispettivament.

### **Kultura taċ-Ċelloli u kundizzjonijiet tal-pjastrament**

13. Iċ-ċelloli U2OS għandhom jiġu kolturati f'medium tat-tkabbir (DMEM/F12 (1:1) b'fenol aħmar bħala indikatur tal-pH, supplantat b'serum bovin fetali (7,5 %), amminoacidi mhux essenzjali (1 %), 10 Unitajiet/ml penicillina, streptomicina u ġeneticina (G-418) bħala markatur tal-ġhażla). Iċ-ċelloli għandhom jitqiegħdu f'inkubatur tas- $\text{CO}_2$  (5 %  $\text{CO}_2$ ) f' $37^{\circ}\text{C}$  u f'100 % umdità. Meta iċ-ċelloli jilhqnu konfluwenza ta' 85-95 %, iċ-ċelloli għandhom jiġu subkolturati jew jithejjew għaž-żriegħ fi pjastri għall-mikrotitraġġ b'96 bwejra. Fil-każ imsemmi l-aħhar, iċ-ċelloli għandhom jerġġhu jiġu sospiżi f' $1 \times 10^5$  ċelloli/ml f'medium tal-assaġġ hieles minn estrogeni (medium DMEM/F12 (1:1) mingħajr fenol aħmar, supplimentat b'serum bovin fetali trattat bil-Faham Miksi bid-Dekstran (5 % v/v), b'amminoacidi mhux essenzjali (1 % v/v), b'10 Units/ml ta' penicillina u streptomicina) u jiġu pjastrati fil-bwejriet tal-pjastri għall-mikrotitraġġ b'96 bwejra (sospensjoni ta' 100  $\mu\text{l}$  ċelloli omogenizzati). Iċ-ċelloli għandhom jiġu inkubati minn qabel f'inkubatur tas- $\text{CO}_2$  (5 %  $\text{CO}_2$ ,  $37^{\circ}\text{C}$ , 100 % umdità) għal 24 siegħa qabel l-esponiment. L-oġġetti tal-plastik għandhom ikunu hielsa minn estrogeni.



## Kriterji ta' aċċettabbiltà

14. L-attivitajiet agonistiċi u antagonistiċi tas-sustanza/i kimika/kimiċi tat-test jiġu ttestjati f'serje ta' testijiet. Serje ta' testijiet tikkonsisti f'massimu ta' sitt pjastri għall-mikrotitraġġ. Kull serje ta' testijiet fiha tal-anqas serje waħda shiha ta' dilwizzjonijiet ta' standard referenzjarju, kampjun tal-kontroll pożittiv, kampjun tal-kontroll negattiv u kontrolli b'solvent. Il-Figuri 1 u 2 jagħtu l-kompożizzjoni tal-pjastri għas-serje tat-testijiet agonistiċi u antagonistiċi.
15. Kull dilwizzjoni tal-istandards ta' refernza, tas-sustanzi kimiċi tat-test, tal-kontrolli b'solvent kollha, u tal-kontrolli pożittivi u negattivi għandha tiġi analizzata fi triplikati. Kull waħda mill-analizijiet tat-triplikat għandha tissodisfa r-rekwiżiti mogħtija fit-Tabella 3A u fit-Tabella 4A.
16. Serje kompluta ta' dilwizzjonijiet tal-istandard referenzjarju ( $17\beta$ -estradijoli għall-agoniżmu; tamossifen għall-antagoniżmu) titkejjel fl-ewwel pjastra f'kull serje ta' testijiet. Biex ikunu jistgħu jitqabblu r-risultati tal-analizi tal-ħames pjastri għall-mikrotitraġġ li jifdal bl-ewwel pjastra għall-mikrotitraġġ li fiha l-kurva konċentrazzjoni rispons shiha tal-istandard referenzjarju, il-pjastri kollha għandu jkun fihom tliet kampjuni tal-kontroll: kontroll b'solvent, l-oġġla konċentrazzjoni tal-istandard referenzjarju ttestjat, u l-konċentrazzjoni approssimata tal- $EC_{50}$  (agoniżmu) jew tal- $IC_{50}$  (antagoniżmu) tal-istandard referenzjarju. Il-proporzjon tal-kampjuni tal-kontroll medji fl-ewwel pjastra u fil-ħames pjastri li jifdal għandu jissodisfa r-rekwiżiti kif mogħtija fit-Tabella 3C (agoniżmu) jew fit-Tabella 4C (antagoniżmu).
17. Għal kull waħda mill-pjastri għall-mikrotitraġġ fi ħdan serje ta' testijiet, jiġi kkalkolat il-fattur-z (10). Il-fattur-z għandu jiġi kkalkolat bl-użu tar-risponsi fl-oġġla u fl-anqas konċentrazzjoni tal-istandard referenzjarju. Pjastra għall-mikrotitraġġ titqies valida f'każ li tkun tissodisfa r-rekwiżiti stipulati fit-Tabella 3C (agoniżmu) jew fit-Tabella 4C (antagoniżmu).
18. L-istandard referenzjarju għandu juri kurva doża-rispons sigmojdi. L- $EC_{50}$  jew l- $IC_{50}$  miksub mir-rispons tas-serje ta' dilwizzjonijiet tal-istandard referenzjarju għandu jissodisfa r-rekwiżiti kif indikati fit-Tabella 3C (agoniżmu) jew fit-Tabella 4C (antagoniżmu).
19. Kull serje ta' testijiet għandu jkun fiha kampjun tal-kontroll pożittiv u kampjun tal-kontroll negattiv. L-induzzjoni relattiva kkalkolata tal-kampjun tal-kontroll kemm pożittiv kif ukoll dak negattiv għandha tissodisfa r-rekwiżiti kif indikati fit-Tabella 3C (agoniżmu) jew fit-Tabella 4C (antagoniżmu).
20. Matul il-kejljiet kollha, il-fattur ta' induzzjoni tal-oġġla konċentrazzjoni tal-istandard referenzjarju għandu jitkejjel bid-diviżjoni tal-oġġla rispons medju tal-unità tad-dawl

relattiva (RLU) tal-istandard referenzjarju  $17\beta$ -estradijoli bir-rispons medju tal-RLU tal-kontroll b'solvent ta' referenza. Dan il-fattur ta' induzzjoni għandu jissodisfa r-rekwiżiti minimi għall-induzzjoni tad-drabi kif indikat fit-Tabella 3C (agoniżmu) jew fit-Tabella 4C (antagoniżmu).

21. Pjastri għall-mikrotitraġġ li jissodisfaw dawn il-kriterji ta' aċċettazzjoni msemija hawn fuq kollha biss jitqiesu validi u jistgħu jintużaw għall-evalwazzjoni tar-rispons tas-sustanzi kimiċi tat-test.
22. Il-kriterji ta' aċċettazzjoni huma applikabbli kemm għas-sessjonijiet ta' qabel l-iskrinjar kif ukoll għal dawk komprehensivi.

**Tabella 1:** Konċentrazzjonijiet tal-istandard referenzjarju, tal-kontroll pożittiv (PC) u tal-kontroll negattiv (NC) għall-bijoassaġġ agonistiku CALUX.

|                        | Sustanza                     | CAS RN  | Medda tat-test (M)                            |
|------------------------|------------------------------|---------|-----------------------------------------------|
| Standard ta' referenza | $17\beta$ -estradijoli       | 50-28-2 | $1,0 \times 10^{-13}$ - $1,0 \times 10^{-10}$ |
| Kontroll pożittiv (PC) | $17\alpha$ -metiltestosteron | 58-18-4 | $3,0 \times 10^{-6}$                          |
| Kontroll Negattiv (NC) | kortikosteron                | 50-22-6 | $1,0 \times 10^{-8}$                          |

**Tabella 2:** Konċentrazzjonijiet tal-istandard referenzjarju, tal-kontroll pożittiv (PC) u tal-kontroll negattiv (NC) għall-bijoassaġġ antagonistiku CALUX.

|                        | Sustanza            | CAS RN     | Medda tat-test (M)                          |
|------------------------|---------------------|------------|---------------------------------------------|
| Standard ta' referenza | tamossifen          | 10540-29-1 | $3,0 \times 10^{-9}$ - $1,0 \times 10^{-5}$ |
| Kontroll pożittiv (PC) | 4-idrossitamossifen | 68047-06-3 | $1,0 \times 10^{-9}$                        |
| Kontroll Negattiv (NC) | resveratrol         | 501-36-0   | $1,0 \times 10^{-5}$                        |

**Tabella 3:** Kriterji ta' aċċettazzjoni għall-bijoassaġġ agonistiku ER $\alpha$  CALUX

| A - kampjuni individwali fuq pjastra |                                                                                                                                          | Kriterji |
|--------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| 1                                    | %SD massimu tal-bwejriet triplikati (għal NC, PC, kull dilwizzjoni tas-sustanza kimika tat-test u tal-istandard referenzjarju, hlief C0) | < 15 %   |
| 2                                    | %SD massimu tal-bwejriet triplikati (għal standard referenzjarju u għal kontrolli b'solvent tas-sustanza kimika tat-test (C0, SC))       | < 30 %   |
| 3                                    | Tnixxija massima ta' LDH, bħala kejl ta' ċitotossicità                                                                                   | < 120 %  |

**B - fi hdan pjastra wahda għall-mikrotitraġġ**

|   |                                                                                                                                                                                                       |              |
|---|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 4 | Proporzjon tal-kontroll b'solvent tal-istandard referenzjarju (C0; pjastra 1) u l-kontroll b'solvent tas-sustanza kimika tat-test (SC; pjastr 2 sa x)                                                 | 0,5 sa 2,0   |
| 5 | Proporzjon tal-appr. EC50 u l-oghla konċentrazzjonijiet tal-istandard referenzjarju fil-pjastra 1 u l-appr. EC50 u l-oghla konċentrazzjonijiet tal-istandard referenzjarju fil-pjastr 2 sa x (C4, C8) | 0,70 sa 1,30 |
| 6 | Fattur-Z għal kull pjastra                                                                                                                                                                            | >0,6         |

**C - fi hdan sensiela wahda ta' analiżijiet (il-pjastr kollha fi hdan sensiela wahda)**

|    |                                                                                                                                          |                                             |
|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| 7  | Kurva sigmojde tal-istandard referenzjarju                                                                                               | Iva (17β-estradiol)                         |
| 8  | standard referenzjarju tal-medda ta' EC50 ta' 17β-estradiol                                                                              | 4*10 <sup>-12</sup> – 4*10 <sup>-11</sup> M |
| 9  | Induzzjoni minima tad-drabi tal-oghla konċentrazzjoni ta' 17β-estradiol, fir-rigward tal-kontroll b'solvent tal-istandard referenzjarju. | 5                                           |
| 10 | Induzzjoni relattiva ( %) PC                                                                                                             | > 30 %                                      |
| 11 | Induzzjoni relattiva ( %) NC                                                                                                             | <10 %                                       |

Appr.: approssimattiv; PC: kontroll pożittiv; NC: kontroll negattiv; SC: kontroll b'solvent tas-sustanza kimika tat-test; C0: kontroll b'solvent tal-istandard referenzjarju; SD: devjazzjoni standard; LDH: lattatdeidrogenaži

**Tabella 4:** Kriterji ta' aċċettazzjoni għall-bijoassaggi antagonistiku ERα CALUX

| <b>A - kampjuni individwali fuq pjastra</b> |                                                                                                                                                         | <b>Kriterji</b> |
|---------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| 1                                           | %SD massimu tal-bwejriet triplikati (għal NC, PC, kull dilwizzjoni tas-sustanza kimika tat-test u tal-istandard referenzjarju, kontroll b'solvent (C0)) | < 15 %          |
| 2                                           | %SD massimu ta' bwejriet triplikati (għall-kontroll b'veikolu (VC) u l-oghla konċentrazzjoni tal-istandard referenzjarju (C8))                          | < 30 %          |
| 3                                           | Tnixxija massima ta' LDH, bħala kejl ta' ċitotossicità                                                                                                  | < 120 %         |

**B - fi hdan pjastra wahda għall-mikrotitraġġ**

|   |                                                                                                                                                       |              |
|---|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 4 | Proporzjon tal-kontroll b'solvent tal-istandard referenzjarju (C0; pjastra 1) u l-kontroll b'solvent tas-sustanza kimika tat-test (SC; pjastr 2 sa x) | 0,70 sa 1,30 |
| 5 | Proporzjon tal-appr. konċentrazzjonijiet tal-istandard referenzjarju tal-                                                                             | 0,70 sa 1,30 |

IC50 fil-pjastra 1 u l-appr. konċentrazzjonijiet tal-istandard referenzjarju tal-IC50 fil-pjastru 2 sa x (C4, C8)

|   |                                                                                                                                                                      |             |
|---|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| 6 | Proporzjon tal-ogħla konċentrazzjonijiet tal-istandard referenzjarju fil-pjastra 1 u l-ogħla konċentrazzjonijiet tal-istandard referenzjarju fil-pjastru 2 sa x (C8) | 0,50 sa 2,0 |
| 7 | Fattur-Z għal kull pjastra                                                                                                                                           | >0,6        |

**C - fi hdan sensiela waħda ta' analizijiet (il-pjastru kollha fi hdan sensiela waħda)**

|    |                                                                                                                                       |                                         |
|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| 8  | Kurva sigmojde tal-istandard referenzjarju                                                                                            | Iva (Tamossifen)                        |
| 9  | standard referenzjarju tal-medda ta' IC50 (Tamossifen)                                                                                | $1 \cdot 10^{-8}$ - $1 \cdot 10^{-7}$ M |
| 10 | Induzzjoni minima t'a drabi tal-kontroll b'solvent tal-istandard referenzjarju, fir-rigward tal-ogħla konċentrazzjoni ta' Tamossifen. | 2,5                                     |
| 11 | Induzzjoni relattiva ( %) PC                                                                                                          | <70 %                                   |
| 12 | Induzzjoni relattiva ( %) NC                                                                                                          | >85 %                                   |

Appr.: approssimattiv; PC: kontroll pożittiv; NC: kontroll negattiv; VC: kontroll b'veikolu (kontroll b'solvent minghajr konċentrazzjoni fissa ta' standard referenzjarju agonist); SC: kontroll b'solvent tas-sustanza kimika tat-test; C0: kontroll b'solvent tal-istandard referenzjarju; SD: devjazzjoni standard; LDH: lattatdeidroġenasi

### **Kontroll b'solvent/b'veikolu, standards referenzjarji, kontrolli pożittivi, kontrolli negattivi**

23. Kemm ghas-sessjoni ta' qabel l-iskrinjar kif ukoll ghas-sessjonijiet komprensivi, ghandhom jintużaw l-istess kontroll b'solvent/b'veikolu, standards ta' referenza, kontrolli pożittivi u kontrolli negattivi. Barra minn hekk, il-konċentrazzjoni ta' standards referenzjarji, ta' kontrolli pożittivi u ta' kontrolli negattivi ghandha tkun l-istess.

#### *Kontrolli tas-solvent*

24. Is-solvent użat biex is-sustanzi kimiċi tat-test jiġu dissolti għandu jiġi ttestjat bħala kontroll b'solvent. Dimetilsulfossidu (DMSO, 1 % (v/v); CASRN 67-68-5) intuża bħala veikolu matul il-validazzjoni tal-bijoassaggi ER $\alpha$  CALUX. Jekk jintuża solvent ieħor li mhuwiex DMSO, l-istandards referenzjarji, il-kontrolli u s-sustanzi kimiċi tat-test kollha ghandhom jiġu ttestjati fl-istess veikolu. Jekk jogħġbok kun af li l-kontroll b'solvent għal studji antagonistiċi fih konċentrazzjoni fissa tal-istandard referenzjarju agonist 17 $\beta$ -estradijoli (konċentrazzjoni approssimattiva tal-EC<sub>50</sub>) Biex jiġi ttestjat is-solvent użat għall-istudji antagonistiċi, għandu jithejja u jiġi ttestjat kontroll b'veikolu.

#### *Kontroll b'veikolu (antagoniżmu)*

25. Għall-ittestjar tal-antagoniżmu, il-medium tal-assaggi hu supplimentat b'konċentrazzjoni fissa tal-istandard referenzjarju agonist 17 $\beta$ -estradijoli (konċentrazzjoni approssimattiva tal-EC<sub>50</sub>). Biex jiġi ttestjat is-solvent użat għad-dissoluzzjoni tas-sustanzi kimiċi tat-test għall-antagoniżmu, għandu jithejja medium tal-assaggi mingħajr konċentrazzjoni fissa tal-istandard referenzjarju agonist 17 $\beta$ -estradijoli. Dan il-kampjun tal-kontroll hu indikat bħala l-kontroll b'veikolu. Dimetilsulfossidu (DMSO, 1 % (v/v); CASRN 67-68-5) intuża bħala veikolu matul il-validazzjoni tal-bijoassaggi ER $\alpha$  CALUX. Jekk jintuża solvent ieħor li mhuwiex DMSO, l-istandards referenzjarji, il-kontrolli u s-sustanzi kimiċi tat-test kollha ghandhom jiġu ttestjati fl-istess veikolu.

#### *Standards ta' referenza*

26. L-istandard referenzjarju agonistiku hu 17 $\beta$ -estradijoli (Tabella 1). L-istandards referenzjarji jinkludu sensiela ta' dilwizzjonijiet ta' tmien konċentrazzjonijiet ta' 17 $\beta$ -estradijoli ( $1,0 \times 10^{-13}$ ,  $3,0 \times 10^{-13}$ ,  $1,0 \times 10^{-12}$ ,  $3,0 \times 10^{-12}$ ,  $6,0 \times 10^{-12}$ ,  $1,0 \times 10^{-11}$ ,  $3,0 \times 10^{-11}$ ,  $1,0 \times 10^{-10}$  M).
27. L-istandard referenzjarju antagonistiku hu tamossifen (Tabella 2). L-istandards referenzjarji jinkludu sensiela ta' dilwizzjonijiet ta' tmien konċentrazzjonijiet ta' tamossifen ( $3,0 \times 10^{-09}$ ,  $1,0 \times 10^{-08}$ ,  $3,0 \times 10^{-08}$ ,  $1,0 \times 10^{-07}$ ,  $3,0 \times 10^{-07}$ ,  $1,0 \times 10^{-06}$ ,  $3,0 \times 10^{-06}$ ,  $1,0 \times 10^{-05}$  M). Kull waħda mill-

konċentrazzjonijiet tal-istandard referenzjarju antagonistiku tiġi koinkubata b'konċentrazzjoni fissa tal-istandard referenzjarju agonistiku  $17\beta$ -estradiol ( $3,0 \cdot 10^{-12}$  M).

#### *Kontroll pożittiv*

28. Il-kontroll pożittiv għall-istudji agonistiċi hu  $17\alpha$ -metiltestosteron (Tabella 1).
29. Il-kontroll pożittiv għall-istudji antagonistiċi hu 4-idrossitamossifen (Tabella 2). Il-kontroll pożittiv antagonistiku jiġi koinkubat b'konċentrazzjoni fissa tal-istandard referenzjarju agonistiku  $17\beta$ -estradiol ( $3,0 \cdot 10^{-12}$  M).

#### *Kontroll negattiv*

30. Il-kontroll negattiv għall-istudji agonistiċi hu kortikosteron (Tabella 1).
31. Il-kontroll negattiv għall-istudji antagonistiċi hu resveratrol (Tabella 2). Il-kontroll negattiv antagonistiku jiġi koinkubat b'konċentrazzjoni fissa tal-istandard referenzjarju agonistiku  $17\beta$ -estradiol ( $3,0 \cdot 10^{-12}$  M).

Wiri tal-profiċjenza tal-laboratorju (ara l-paragrafu 14 u t-Tabelli 3 u 4 f'“KOMPONENTI TAL-ASSAĠĠ TA TAL-ER” ta' dan il-metodu ta' ttestjar)

#### **Veikolu**

32. Is-solvent użat biex jiġu dissolti s-sustanzi kimiċi tat-test għandu jissolubilizza s-sustanza kimika tat-test għalkollox u għandu jkun jithallat mal-medium taċ-ċellola. DMSO, ilma u etanol (purità ta' 95 % sa 100 %) huma solventi xierqa. F'każ li jintuża DMSO bħala solvent, il-konċentrazzjoni massima ta' DMSO matul l-inkubazzjoni ma għandhiex taqbeż il-1 % (v/v). Qabel l-użu, is-solvent għandu jiġi ttestjat għall-assenza ta' ċitotossicità u ta' interferenza mal-prestazzjoni tal-assaġġi.

#### **Preparazzjoni tal-istandards referenzjarji, tal-kontrolli pożittivi, tal-kontrolli negattivi u tas-sustanzi kimiċi tat-test**

33. L-istandards referenzjarji, il-kontrolli pożittivi, il-kontrolli negattivi u s-sustanzi kimiċi tat-test jiġu dissolti fid-DMSO 100 % (jew f'solvent xieraq). Imbagħad għandhom jithejjew dilwizzjonijiet (serjali) xierqa fl-istess solvent. Qabel ma jiġu dissolti, is-sustanzi kollha għandhom jithallew jekwilibrat għal temperatura ambjentali. Soluzzjonijiet ewlenin imhejjija friski tal-istandards referenzjarji, tal-kontrolli pożittivi, tal-kontrolli negattivi u tas-sustanzi kimiċi tat-test ma għandux ikollhom preċipitat jew dardir notevoli. L-istokks ta' standards referenzjarji u ta' kontroll jistgħu jithejjew bl-ingrossa. Is-soluzzjonijiet ewlenin

tas-sustanzi kimiċi tat-test għandhom jithejjew friski qabel kull esperiment. Id-dilwizzjonijiet finali tal-istandards referenzjarji, tal-kontrolli pożittivi, tal-kontrolli negattivi u tas-sustanzi kimiċi tat-test għandhom jithejjew friski għal kull esperiment u jintużaw fi żmien 24 siegħa mit-thejjija.

#### **Is-solubbiltà, iċ-ċitotossicità u s-sejbien tal-medda.**

34. Matul is-sessjoni ta' qabel l-iskrinjar, tiġi determinata s-solubbiltà tas-sustanzi kimiċi tat-test fis-solvent tal-ghazla. Tithejja konċentrazzjoni stokk massima ta' 0,1 M. F'każ li din il-konċentrazzjoni turi problemi ta' solubbiltà, għandhom jithejjew anqas soluzzjonijiet ta' stokk sakemm is-sustanzi kimiċi tat-test jiġu solubilizzati għalkollox. Matul is-sessjoni ta' qabel l-iskrinjar, jiġu ttestjati dilwizzjonijiet serjali ta' 1:10 tas-sustanza kimika tat-test. Il-konċentrazzjoni massima tal-assaġġ għall-ittestjar tal-agonisti jew tal-antagonisti hi ta' 1 mM. Wara l-iskrinjar ta' qabel, tinkiseb medda ta' konċentrazzjoni rfinata xierqa għas-sustanzi kimiċi tat-test li għandha tiġi ttestjata matul is-sessjonijiet komprensivi. Id-dilwizzjonijiet użati għall-ittestjar komprensiv għandhom ikunu ta' 1x, 3x, 10x, 30x, 100x, 300x, 1000x u 3000x.
35. L-ittestjar taċ-ċitotossicità hu inkluzi fil-protokoll tal-assaġġ tal-agonisti u tal-antagonisti (11). L-ittestjar taċ-ċitotossicità hu inkorporat kemm fis-sessjoni ta' qabel l-iskrinjar kif ukoll fis-sessjonijiet komprensivi. Il-metodu użat għall-valutazzjoni taċ-ċitotossicità matul il-validazzjoni tal-bijoassagġ ER $\alpha$  CALUX kien it-test tat-tnixxija tal-lattatdeidrogenaġi (LDH) flimkien ma' spezzjoni viżwali kwalitattiva taċ-ċelloli (ara l-Appendiċi 4.1) wara l-esponiment għas-sustanzi kimiċi tat-test. Madankollu, jistgħu jintużaw metodi kwantitattivi oħra għad-determinazzjoni taċ-ċitotossicità (eż. assaġġ kalorimetriku bbażat fuq it-tetrazolju (MTT) jew bijoassagġ CALUX taċ-ċitotossicità). B'mod ġenerali, il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test li juru tnaqqis akbar minn 20 % fil-vijabbiltà taċ-ċelloli jitqiesu ċitotossiċi u għalhekk ma jistgħux jintużaw għall-evalwazzjoni tad-*data*. Fir-rigward tal-assaġġ tat-tnixxija tal-LDG, il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test titqies ċitotossika meta l-perċentwal tat-tnixxija tal-LDH ikun oghla minn 120 %.

#### **Esponiment għas-sustanza kimika tat-test u organizzazzjoni tal-pjastra tal-assaġġ**

36. Wara t-tripsinizzazzjoni ta' flask konfluwenti ta' ċelloli kkolturati, iċ-ċelloli jerggħu jiġu sospizi f'1x10<sup>5</sup> ċelloli /ml f'medium tal-assaġġ hieles minn estrogeni. Mitt  $\mu$ l f'ċelloli sospizi mill-ġdid jiġu pjastrati fil-bwejriet interni ta' pjastra għall-mikrotitraġġ b'96 bwejra. Il-bwejriet ta' barra jimtlew b'200  $\mu$ l ta' Salina Baferjata tal-Fosfat (PBS) (ara l-Figuri 1 u 2). Iċ-ċelloli pjastrati jiġu inkubati minn qabel għal 24 siegħa f'inkubatur tas-CO<sub>2</sub> (5 % CO<sub>2</sub>, 37°C, 100 % umdità).

37. Wara l-inkubazzjoni minn qabel, il-pjastri jiġu spezzjonati għal ċitotossicità viżwali (ara l-Appendiċi 4.1) għal kontaminazzjoni u għal konfluwenza. Huma biss pjastri li ma juru ebda ċitotossicità, kontaminazzjoni u li jkollhom tal-anqas konfluwenza ta' 85 % li jintużaw għall-ittestjar. Il-medium għall-bwejrjet interni jitneħħa bil-galbu u jiġi sostitwit b'200 µl medium tal-assaġġ hieles mill-estrogenu li jkun fih serje ta' dilwizzjonijiet xierqa tal-istandards referenzjarji, tas-sustanzi kimiċi tat-test, tal-kontrolli pożittivi, tal-kontrolli negattivi u tal-kontrolli b'solvent (Tabella 5: studji agonisti; Tabella 6: studji antagonisti). L-istandards referenzjarji, is-sustanzi kimiċi tat-test, il-kontrolli pożittivi, il-kontrolli negattivi u l-kontrolli b'solvent kollha jiġu ttestjati fi triplikati. Fil-Figura 1 tingħata t-tifsila tal-pjastra għall-ittestjar tal-agonisti. Fil-Figura 2 tingħata t-tifsila tal-pjastra għall-ittestjar tal-antagonisti. It-tifsila tal-pjastra għall-ittestjar ta' qabel l-iskrinjar u għall-ittestjar komprensiv hi identika. Għall-ittestjar tal-antagonisti, il-bwejrjet interni kollha, hlief għall-bwejrjet tal-kontroll b'veikolu (VC), ikun fihom ukoll konċentrazzjoni fissa tal-istandard referenzjarju agonist 17β-estradiol ( $3,0 \times 10^{-12}$  M). Kun af li l-istandards referenzjarji C8 u C4 għandhom jiżdiedu ma' kull pjastra tat-TC.
38. Wara l-esponiment taċ-ċelloli għas-sustanzi kimiċi kollha, il-pjastri għall-mikrotitraġġ b'96 bwejra għandhom jiġu inkubati għal 24 siegħa oħra f'inkubatur tas-CO<sub>2</sub> (5 % CO<sub>2</sub>, 37°C, 100 % umdità).

**Figura 1: Tifsila tal-pjastri għall-mikrotitraġġ b'96 bwejra għall-iskrinjar ta' qabel u għall-valutazzjoni tal-effett agonistiku.**

**Pjastra 1**

|   | 1 | 2  | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11 | 12 |
|---|---|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----|----|
| A |   |    |       |       |       |       |       |       |       |       |    |    |
| B |   | C0 | C1    | C2    | C3    | C4    | C5    | C6    | C7    | C8    | PC |    |
| C |   | C0 | C1    | C2    | C3    | C4    | C5    | C6    | C7    | C8    | PC |    |
| D |   | C0 | C1    | C2    | C3    | C4    | C5    | C6    | C7    | C8    | PC |    |
| E |   | SC | TC1-1 | TC1-2 | TC1-3 | TC1-4 | TC1-5 | TC1-6 | TC1-7 | TC1-8 | NC |    |
| F |   | SC | TC1-1 | TC1-2 | TC1-3 | TC1-4 | TC1-5 | TC1-6 | TC1-7 | TC1-8 | NC |    |
| G |   | SC | TC1-1 | TC1-2 | TC1-3 | TC1-4 | TC1-5 | TC1-6 | TC1-7 | TC1-8 | NC |    |
| H |   |    |       |       |       |       |       |       |       |       |    |    |

**Pjastri sussegwenti**

|   | 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 (mass) |    |
| C |   | SC | TC2-1 | TC2-2 | TC2-3 | TC2-4 | TC2-5 | TC2-6 | TC2-7 | TC2-8 | C8 (mass) |    |
| D |   | SC | TC2-1 | TC2-2 | TC2-3 | TC2-4 | TC2-5 | TC2-6 | TC2-7 | TC2-8 | C8 (mass) |    |
| 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 = solvent tal-istandard referenzjarju.



C(1-8) = serje ta' dilwizzjonijiet (1-8, koncentrazzjonijiet baxxi sa gholjin) tal-istandard referenzjarju.

PC = kontroll pozittiv.

NC = kontroll negattiv.

TCx-(1-8) = dilwizzjonijiet (1-8, koncentrazzjonijiet baxxi sa gholjin) tas-sustanza kimika tat-test ghas-sessjoni ta' qabel l-iskrinjar u ghall-valutazzjoni tal-effett agonistiku tas-sustanza kimika tat-test x.

SC = kontroll b'solvent tas-sustanza kimika tat-test (idealment l-istess solvent bhal f'C0, izda jista' jkun minn lott iehor).

Ċelloli grizi: = Bwejriet ta' barra, mimlija b'200 µl PBS.

**Figura 2: Tifsila tal-pjastri ghall-mikrotitraġġ b'96 bwejra ghall-iskrinjar antagonistiku ta' qabel u ghall-valutazzjoni tal-effett antagonistiku.**

**Pjastra 1**

|   | 1 | 2  | 3    | 4     | 5     | 6  | 7     | 8    | 9    | 10   | 11 | 12 |
|---|---|----|------|-------|-------|----|-------|------|------|------|----|----|
| A |   |    |      |       |       |    |       |      |      |      |    |    |
| B |   | C0 | C1   | C2    | C3    | C4 | C5    | C6   | C7   | C8   | VC |    |
| C |   | C0 | C1   | C2    | C3    | C4 | C5    | C6   | C7   | C8   | VC |    |
| D |   | C0 | C1   | C2    | C3    | C4 | C5    | C6   | C7   | C8   | VC |    |
| E |   | NC | TC1- | TC1-2 | TC1-3 | TC | TC1-5 | TC1- | TC1- | TC1- | PC |    |
| F |   | NC | TC1- | TC1-2 | TC1-3 | TC | TC1-5 | TC1- | TC1- | TC1- | PC |    |
| G |   | NC | TC1- | TC1-2 | TC1-3 | TC | TC1-5 | TC1- | TC1- | TC1- | PC |    |
| H |   |    |      |       |       |    |       |      |      |      |    |    |

**Pjastri sussegwenti**

|   | 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 (mass) |    |
| C |   | SC        | TC2-1 | TC2-2 | TC2-3 | TC2-4 | TC2-5 | TC2-6 | TC2-7 | TC2-8 | C8 (mass) |    |
| D |   | SC        | TC2-1 | TC2-2 | TC2-3 | TC2-4 | TC2-5 | TC2-6 | TC2-7 | TC2-8 | C8 (mass) |    |
| E |   | C4 (IC50) | TCx-1 | TCx-2 | TCx-3 | TCx-4 | TCx-5 | TCx-6 | TCx-7 | TCx-8 | C8 (mass) |    |
| F |   | C4 (IC50) | TCx-1 | TCx-2 | TCx-3 | TCx-4 | TCx-5 | TCx-6 | TCx-7 | TCx-8 | C8 (mass) |    |
| G |   | C4 (IC50) | TCx-1 | TCx-2 | TCx-3 | TCx-4 | TCx-5 | TCx-6 | TCx-7 | TCx-8 | C8 (mass) |    |
| H |   |           |       |       |       |       |       |       |       |       |           |    |

C0 = solvent tal-istandard referenzjarju.

C(1-8) = serje ta' dilwizzjonijiet (1-8, koncentrazzjonijiet baxxi sa gholjin) tal-istandard referenzjarju.

NC = kontroll negattiv.

PC = kontroll pozittiv.

TCx-(1-8) = dilwizzjonijiet (1-8, koncentrazzjonijiet baxxi sa gholjin) tas-sustanza kimika tat-test ghas-sessjoni ta' qabel l-iskrinjar u ghall-valutazzjoni tal-effett agonistiku tas-sustanza kimika tat-test x.

SC = kontroll b'solvent tas-sustanza kimika tat-test (idealment l-istess solvent bhal f'C0, izda jista' jkun minn lott iehor).

VC = kontroll b'veikolu (kontroll b'solvent minghajr koncentrazzjoni fissa ta' standard referenzjarju agonist 17β-estradiol).

Ċelloli grizi: = Bwejriet ta' barra, mimlija b'200 µl PBS.

Nota: il-bwejriet interni kollha, hlief għall-bwejriet tal-kontroll b'veikolu (VC), ikun fihom ukoll konċentrazzjoni fissa tal-istandard referenzjarju agonist 17β-estradiol (3,0\*10<sup>-12</sup> M)

### **Kejl tal-luminexxenza**

39. Il-kejl tal-luminexxenza hu deskritt fid-dettall fil-protokoll tal-assaġġ tal-agonisti u tal-antagonisti (10). Il-medium mill-bwejriet għandu jitneħħa u ċ-ċelloli għandhom jiġu lizati wara 24 siegħa inkubazzjoni biex il-membrana taċ-ċelloli tinfetaħ u tkun tista' titkejjel l-attività tal-luċiferazi.
40. Għall-kejl tal-luminexxenza, din il-proċedura teħtieġ luminometru mġammar b'2 injezzuri. Ir-reazzjoni tal-luċiferazi tinbeda b'injezzjoni tal-substrat luċiferina. Ir-reazzjoni titwaqqaf biż-żieda ta' 0,2 M NaOH. Ir-reazzjoni titwaqqaf biex tipprevjeni l-ġarr tal-luminexxenza minn bwejra għall-oħra.
41. Id-dawl emess minn kull bwejra jiġi espress bħala Unitajiet tad-Dawl Relattivi (RLUs) għal kull bwejra.

### **Sessjoni ta' qabel l-iskrinjar**

42. Ir-riżultati tal-analiżi ta' qabel l-iskrinjar jintużaw biex tiġi determinata medda ta' konċentrazzjoni rfinuta ta' sustanzi kimiċi tat-test għall-ittestjar komprensiv. L-evalwazzjoni tar-riżultati tal-analiżi ta' qabel l-iskrinjar u d-determinazzjoni tal-medda ta' konċentrazzjoni rfinuta tas-sustanzi kimiċi tat-test għall-ittestjar komprensiv hi deskritta fil-fond fil-protokoll tal-assaġġ tal-agonisti u tal-antagonisti (10). Hawnekk jingħata sommarju qasir tal-proċeduri għad-determinazzjoni tal-medda ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanzi kimiċi tat-test għall-ittestjar tal-agonisti u tal-antagonisti. Ara t-Tabelli 5 u 6 għal gwida dwar it-tifsila tad-dilwizzjoni serjali.

### *L-għażla tal-konċentrazzjonijiet għall-valutazzjoni tal-effetti agonistiċi*

43. Matul is-sessjoni ta' qabel l-iskrinjar, is-sustanzi kimiċi tat-test għandhom jiġu ttestjati bl-użu tas-sensiliet ta' dilwizzjonijiet kif indikati fit-Tabelli 5 (agoniżmu) u 6 (antagoniżmu). Il-konċentrazzjonijiet kollha għandhom jiġu ttestjati fi bwejriet triplikati skont it-tifsila tal-pjastra kif indikata fil-Figura 1 (agoniżmu) jew 2 (antagoniżmu).
44. Huma biss ir-riżultati tal-analiżi li jissodisfaw il-kriterji ta' aċċettazzjoni (Tabella 3) li jitqiesu validi u jistgħu jintużaw għall-evalwazzjoni tar-rispons tas-sustanzi kimiċi tat-test. F'każ li pjastra waħda jew aktar għall-mikrotitraġġ f'sensiela ta' analiżi tonqos milli tissodisfa l-kriterji ta' aċċettazzjoni, il-pjastri rispettivi għall-mikrotitraġġ għandhom jerggħu jiġu analizzati. F'każ li l-ewwel pjastra li jkun fiha s-serje shiħ ta' dilwizzjonijiet tal-istandard referenzjarju tonqos milli tissodisfa l-kriterji ta' aċċettazzjoni, is-serje shiħ tat-test (sitt pjastri) ikollhom jerggħu jiġu analizzati.

45. Il-meded ta' konċentrazzjoni inizjali tas-sustanzi kimiċi tat-test għandhom jiġu aġġustati u s-sessjoni ta' qabel l-iskrinjar għandha tiġi ripetuta f'każ:

- li tiġi osservata ċitotossicità. Il-proċedura ta' qabel l-iskrinjar għandha terġa' ssir b'konċentrazzjonijiet mhux ċitotossiċi inferjuri tas-sustanza kimika tat-test.
- l-iskrinjar minn qabel tas-sustanza kimika tat-test ma jurix kurva ta' doża-rispons shiha għaliex il-konċentrazzjonijiet ittestjati jiġġeneraw induzzjoni massima. Is-sessjoni ta' qabel l-iskrinjar għandha terġa' ssir billi jintużaw konċentrazzjonijiet inferjuri tas-sustanza kimika tat-test.

46. Meta jiġi osservat rispons validu relatat mad-doża, għandha tingħażel (l-anqas) konċentrazzjoni li fiha tiġi osservata induzzjoni massima u li ma turix ċitotossicità. L-ogħla konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li għandha tiġi ttestjata fis-sessjonijiet komprensivi, għandha tkun 3 darbiet din il-konċentrazzjoni magħżula.

47. Serje shiha rfinuta ta' dilwizzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test għandha tithejja bl-istadji tad-dilwizzjonijiet kif indikati fit-Tabella 5, billi tibda mill-ogħla konċentrazzjoni kif determinata hawn fuq.

48. Sustanza kimika tat-test li ma twassalx għal xi effetti agonistiku għandha tiġi ttestjata fis-sessjonijiet komprensivi billi tibda mill-ogħla konċentrazzjoni mhux tossika identifikata matul l-iskrinjar ta' qabel.

*L-għażla tal-konċentrazzjonijiet għall-valutazzjoni tal-effetti antagonistici*

49. Huma biss ir-riżultati tal-analiżi li jissodisfaw il-kriterji ta' aċċettazzjoni (Tabella 4) li jitqiesu validi u jistgħu jintużaw għall-evalwazzjoni tar-rispons tas-sustanzi kimiċi tat-test. F'każ li pjastra waħda jew aktar għall-mikrotitraġġ f'sensiela ta' analiżi tonqos milli tissodisfa l-kriterji ta' aċċettazzjoni, il-pjastri rispettivi għall-mikrotitraġġ għandhom jerggħu jiġu analizzati. F'każ li l-ewwel pjastra li jkun fiha s-serje shiħ ta' dilwizzjonijiet tal-istandard referenzjarju tonqos milli tissodisfa l-kriterji ta' aċċettazzjoni, is-serje shah tat-test (sitt pjastri) ikollhom jerggħu jiġu analizzati.

50. Il-meded ta' konċentrazzjoni inizjali tas-sustanzi kimiċi tat-test għandhom jiġu aġġustati u s-sessjoni ta' qabel l-iskrinjar għandha tiġi ripetuta f'każ:

- li tiġi osservata ċitotossicità. Il-proċedura ta' qabel l-iskrinjar għandha terġa' ssir b'konċentrazzjonijiet mhux ċitotossiċi inferjuri tas-sustanza kimika tat-test.
- l-iskrinjar minn qabel tas-sustanza kimika tat-test ma jurix kurva ta' doża-rispons shiha għaliex il-konċentrazzjonijiet ittestjati jiġġeneraw inibizzjoni massima. Is-sessjoni ta' qabel

l-iskrinjar għandha terġa' ssir billi jintużaw konċentrazzjonijiet inferjuri tas-sustanza kimika tat-test.

51. Meta jinstab rispons validu relatat mad-doża, għandha tingħażel (l-anqas) konċentrazzjoni li fiha tiġi osservata inibizzjoni massima u li ma turix ċitotossicità. L-ogħla konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li għandha tiġi ttestjata fis-sessjonijiet komprensivi, għandha tkun tliet darbiet din il-konċentrazzjoni magħżula.
52. Serje shiħa rfinata ta' dilwizzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test għandha tithejja bl-istadji tad-dilwizzjonijiet kif indikati fit-Tabella 6, billi tibda mill-ogħla konċentrazzjoni kif determinata hawn fuq.
53. Is-sustanzi kimiċi tat-test li ma jwasslux għal xi effett antagonistiku għandhom jiġu ttestjati fis-sessjonijiet komprensivi billi tibda mill-ogħla konċentrazzjoni mhux tossika ttestjata matul l-iskrinjar ta' qabel.

### Sessjonijiet komprensivi

54. Wara l-għażla tal-meded ta' konċentrazzjonijiet irfinuti, is-sustanzi kimiċi tat-test għandhom jiġu ttestjati b'mod komprensiv bl-użu tas-sensiliet ta' dilwizzjonijiet kif indikati fit-Tabelli 5 (agoniżmu) u 6 (antagoniżmu). Il-konċentrazzjonijiet kollha għandhom jiġu ttestjati fi bwejriet triplikati skont it-tifsila tal-pjastra kif indikata fil-Figura 1 (agoniżmu) jew 2 (antagoniżmu).
55. Huma biss ir-riżultati tal-analiżi li jissodisfaw il-kriterji ta' aċċettazzjoni (Tabelli 3 u 4) li jitqiesu validi u jistgħu jintużaw għall-evalwazzjoni tar-rispons tas-sustanzi kimiċi tat-test. F'każ li pjastra waħda jew aktar għall-mikrotitraġġ f'sensiela ta' analiżi tonqos milli tissodisfa l-kriterji ta' aċċettazzjoni, il-pjastri rispettivi għall-mikrotitraġġ għandhom jerggħu jiġu analizzati. F'każ li l-ewwel pjastra li jkun fiha s-serje shiħ ta' dilwizzjonijiet tal-istandard referenzjarju tonqos milli tissodisfa l-kriterji ta' aċċettazzjoni, is-serje shiħ tat-test (sitt pjastri) ikollhom jerggħu jiġu analizzati.

**Tabella 5:** Il-konċentrazzjoni u d-dilwizzjonijiet tal-istandards referenzjarji, tal-kontrolli u tas-sustanzi kimiċi tat-test użati għall-ittestjar tal-agonisti

| Referenza 17β-estradijoli<br>konċ. (M) |                       | TCx - sessjoni ta' qabel<br>l-iskrinjar<br>dilwizzjoni |                 | TCx - sessjoni<br>komprensiva<br>dilwizzjoni |         | Kontrolli<br>konċ. (M) |                       |
|----------------------------------------|-----------------------|--------------------------------------------------------|-----------------|----------------------------------------------|---------|------------------------|-----------------------|
| C0                                     | 0                     | TCx-1                                                  | 10,000,000<br>x | TCx-1                                        | 3,000 x | PC                     | 3,0*10 <sup>-06</sup> |
| C1                                     | 1,0*10 <sup>-13</sup> | TCx-2                                                  | 1,000,000<br>x  | TCx-2                                        | 1,000 x | NC                     | 1,0*10 <sup>-08</sup> |
| C2                                     | 3,0*10 <sup>-13</sup> | TCx-3                                                  | 100,000 x       | TCx-3                                        | 300 x   | C0                     | 0                     |
| C3                                     | 1,0*10 <sup>-12</sup> | TCx-4                                                  | 10,000 x        | TCx-4                                        | 100 x   | SC                     | 0                     |

|    |                      |       |         |       |      |  |  |
|----|----------------------|-------|---------|-------|------|--|--|
| C4 | $3,0 \cdot 10^{-12}$ | TCx-5 | 1,000 x | TCx-5 | 30 x |  |  |
| C5 | $6,0 \cdot 10^{-12}$ | TCx-6 | 100 x   | TCx-6 | 10 x |  |  |
| C6 | $1,0 \cdot 10^{-11}$ | TCx-7 | 10 x    | TCx-7 | 3 x  |  |  |
| C7 | $3,0 \cdot 10^{-11}$ | TCx-8 | 1 x     | TCx-8 | 1 x  |  |  |
| C8 | $1,0 \cdot 10^{-10}$ |       |         |       |      |  |  |

TCx - sustanza kimika tat-test x

PC - kontroll pożittiv (17 $\alpha$ -metiltestosteron)

NC - kontroll negattiv (kortikosteron)

C0 - kontroll b'solvent tal-istandard referenzjarju

SC - kontroll b'solvent tas-sustanza kimika tat-test

**Tabella 6:** Il-konċentrazzjoni u d-dilwizzjonijiet tal-istandards referenzjarji, tal-kontrolli u tas-sustanzi kimiċi tat-test użati għall-ittejtjar tal-antagonisti

| Referenza tamossifen<br>konċ. (M) |                      | TCx - sessjoni ta' qabel<br>l-iskrinjar<br>dilwizzjoni |              | TCx - sessjoni<br>komprensiva<br>dilwizzjoni |         | Kontrolli<br>konċ. (M)                    |                      |
|-----------------------------------|----------------------|--------------------------------------------------------|--------------|----------------------------------------------|---------|-------------------------------------------|----------------------|
| C0                                | 0                    | TCx-1                                                  | 10,000,000 x | TCx-1                                        | 3,000 x | PC                                        | $1,0 \cdot 10^{-09}$ |
| C1                                | $3,0 \cdot 10^{-09}$ | TCx-2                                                  | 1,000,000 x  | TCx-2                                        | 1,000 x | NC                                        | $1,0 \cdot 10^{-05}$ |
| C2                                | $1,0 \cdot 10^{-08}$ | TCx-3                                                  | 100,000 x    | TCx-3                                        | 300 x   | C0                                        | 0                    |
| C3                                | $3,0 \cdot 10^{-08}$ | TCx-4                                                  | 10,000 x     | TCx-4                                        | 100 x   | SC                                        | 0                    |
| C4                                | $1,0 \cdot 10^{-07}$ | TCx-5                                                  | 1,000 x      | TCx-5                                        | 30 x    | <b>Agonist supplementat<br/>konċ. (M)</b> |                      |
| C5                                | $3,0 \cdot 10^{-07}$ | TCx-6                                                  | 100 x        | TCx-6                                        | 10 x    |                                           |                      |
| C6                                | $1,0 \cdot 10^{-06}$ | TCx-7                                                  | 10 x         | TCx-7                                        | 3 x     |                                           |                      |
| C7                                | $3,0 \cdot 10^{-06}$ | TCx-8                                                  | 1 x          | TCx-8                                        | 1 x     | 17 $\beta$ -<br>estradiol                 | $3,0 \cdot 10^{-12}$ |
| C8                                | $1,0 \cdot 10^{-05}$ |                                                        |              |                                              |         |                                           |                      |

TCx - sustanza kimika tat-test x

PC - kontroll pożittiv (4-idrossitamossifen)

NC - kontroll negattiv (resveratrol)

C0 - kontroll b'solvent tal-istandard referenzjarju

SC - kontroll b'solvent tas-sustanza kimika tat-test

VC - il-kontroll b'veikolu (ma fiha konċentrazzjoni fissa tal-istandard referenzjarju agonistiku 17 $\beta$ -estradiol ( $3,0 \cdot 10^{-12}$  M))

## Il-ġbir tad-data u l-analiżi tad-data

56. Wara s-sessjonijiet ta' skrinjar ta' qabel u komprensivi, għandhom jiġu determinati l-EC<sub>10</sub>, l-EC<sub>50</sub>, il-PC<sub>10</sub>, il-PC<sub>50</sub> u l-induzzjoni massima (TCx<sub>max</sub>) ta' sustanza kimika tat-test għall-ittejtjar agonistiku. Għall-ittejtjar antagonistiku, għandhom jiġu kkalkolati l-IC<sub>20</sub>, l-IC<sub>50</sub>, il-PC<sub>80</sub>, il-PC<sub>50</sub> u l-induzzjoni minima (TCx<sub>min</sub>). Fil-Figuri 3 (agoniżmu) u 4 (antagoniżmu) tingħata rappreżentazzjoni grafika ta' dawn il-parametri. Il-parametri meħtieġa huma kkalkolati fuq il-bażi tal-induzzjoni relattiva ta' kull sustanza kimika tat-test (relattiva għall-induzzjoni massima tal-istandard referenzjarju (=100 %)). Ir-rigressjoni mhux lineari (pendil

varjabbli, 4 parametri) għandha tintuża għall-evalwazzjoni tad-*data* skont l-ekwazzjoni li ġejja:

$$Y = Q_{iegh} + \frac{(Q_{ucata} - Q_{iegh})}{(1 + 10^{((lgEC_{50} - X) * Hill\ Slope)})}$$

Fejn:

X = Log tad-doża jew tal-koncentrazzjoni

Y = Rispons (induzzjoni relattiva ( %))

Quċcata = Induzzjoni massima ( %)

Qiegh = Induzzjoni minima ( %)

LogEC<sub>50</sub> = Log tal-koncentrazzjoni li fiha jiġi osservat 50 % tar-rispons massimu

HillSlope = Il-fattur tal-pendil Hill

57. Id-*data* mhux proċessata mil-luminometru, espressa bħala Unitajiet tad-Dawl Relattivi (RLUs), għandha tiġi trasferita għall-ispreadsheet tal-analiżi tad-*data* mfassla għas-sessjonijiet ta' qabel l-iskrinjar u komprensivi. Id-*data* mhux proċessata għandha tissodisfa l-kriterji ta' aċċettazzjoni kif indikati fit-Tabelli 3A u 3B (agoniżmu) jew 4A u 4B (antagoniżmu). Fil-każ li d-*data* mhux proċessata tissodisfa l-kriterji ta' aċċettazzjoni, jitwettqu l-istadji li ġejjin tal-kalkolu biex jiġu determinati l-parametri mehtieġa:

#### Agoniżmu

- Naqqas l-RLU medja tal-kontroll b'solvent tal-istandard referenzjarju minn kull *data* tal-analiżi mhux proċessata tal-istandards referenzjarji.
- Naqqas l-RLU medja għall-kontroll b'solvent tas-sustanza kimika tat-test minn kull *data* tal-analiżi mhux proċessata tas-sustanzi kimiċi tat-test.
- Ikkalkola l-induzzjoni relattiva ta' kull konċentrazzjoni tal-istandard referenzjarju. Issettja l-induzzjoni tal-ogħla konċentrazzjoni tal-istandard referenzjarju f' 100 %.
- Ikkalkola l-induzzjoni relattiva ta' kull konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test meta mqabbla mal-ogħla konċentrazzjoni tal-istandard referenzjarju bħala 100 %.
- Evalwa r-rizultati tal-analiżi skont rigressjoni mhux lineari (pendil varjabbli, erba' parametri).
- Iddetermina l-EC<sub>50</sub> u l-EC<sub>10</sub> tal-istandard referenzjarju.

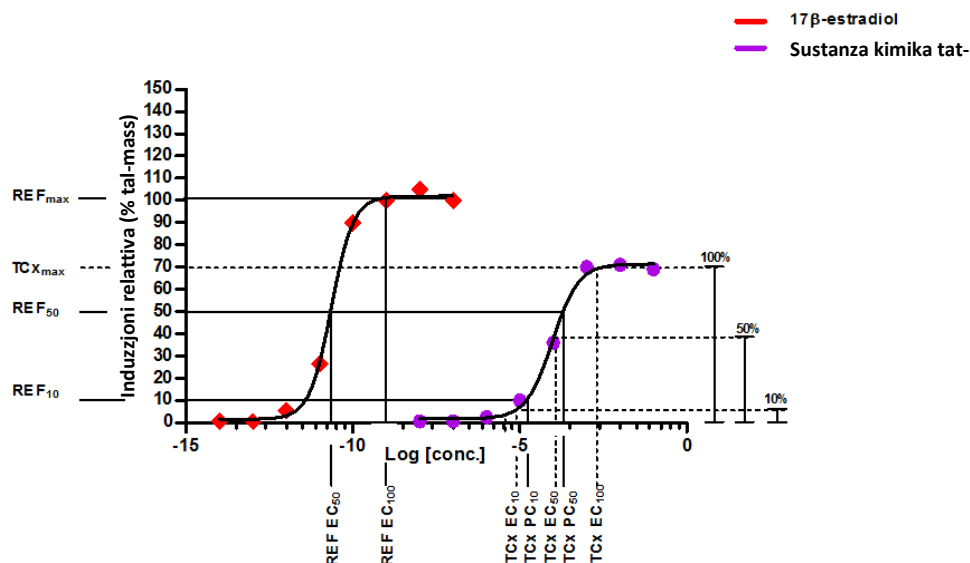
- Iddetermina l-EC<sub>50</sub> u l-EC<sub>10</sub> tas-sustanzi kimiċi tat-test.
- Iddetermina l-induzzjoni relattiva massima tas-sustanza kimika tat-test (TC<sub>max</sub>).
- Iddetermina l-PC<sub>10</sub> u l-PC<sub>50</sub> tas-sustanzi kimiċi tat-test.

Għas-sustanzi kimiċi tat-test, kurva ta' doża-rispons sħiħa mhux dejjem tkun tista' tinkiseb minhabba, eż., problemi ta' ċitotossicità jew ta' solubbiltà. B'hekk, l-EC<sub>50</sub>, l-EC<sub>10</sub> u l-PC<sub>50</sub> ma jkunux jistgħu jiġu determinati. F'dan, il-każ, il-PC<sub>10</sub> u t-TC<sub>max</sub> biss ikunu jistgħu jiġu determinati.

#### Antagoniżmu

- Naqqas l-RLU medja tal-ogħla konċentrazzjoni tal-istandard referenzjarju minn kull *data* tal-analiżi mhux proċessata tal-istandards referenzjarji.
- Naqqas l-RLU medja tal-ogħla konċentrazzjoni tal-istandard referenzjarju minn kull *data* tal-analiżi mhux proċessata tas-sustanzi kimiċi tat-test.
- Ikkalkola l-induzzjoni relattiva ta' kull konċentrazzjoni tal-istandard referenzjarju. Issettja l-induzzjoni tal-anqas konċentrazzjoni tal-istandard referenzjarju f'100 %.
- Ikkalkola l-induzzjoni relattiva ta' kull konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test meta mqabbla mal-anqas konċentrazzjoni tal-istandard referenzjarju bħala 100 %.
- Evalwa r-riżultati tal-analiżi skont rigressjoni mhux lineari (pendil varjabbli, erba' parametri).
- Iddetermina l-IC<sub>50</sub> u l-IC<sub>20</sub> tal-istandard referenzjarju.
- Iddetermina l-IC<sub>50</sub> u l-IC<sub>20</sub> tas-sustanzi kimiċi tat-test.
- Iddetermina l-induzzjoni relattiva minima tas-sustanza kimika tat-test (TC<sub>min</sub>).
- Iddetermina l-PC<sub>80</sub> u l-PC<sub>50</sub> tas-sustanzi kimiċi tat-test.

**Figura 3:** Harsa ġenerali lejn il-parametri determinati fl-assaġġ tal-agonisti



EC<sub>10</sub> = il-konċentrazzjoni ta' sustanza li fiha jiġi osservat 10 % tar-rispons massimu tagħha.

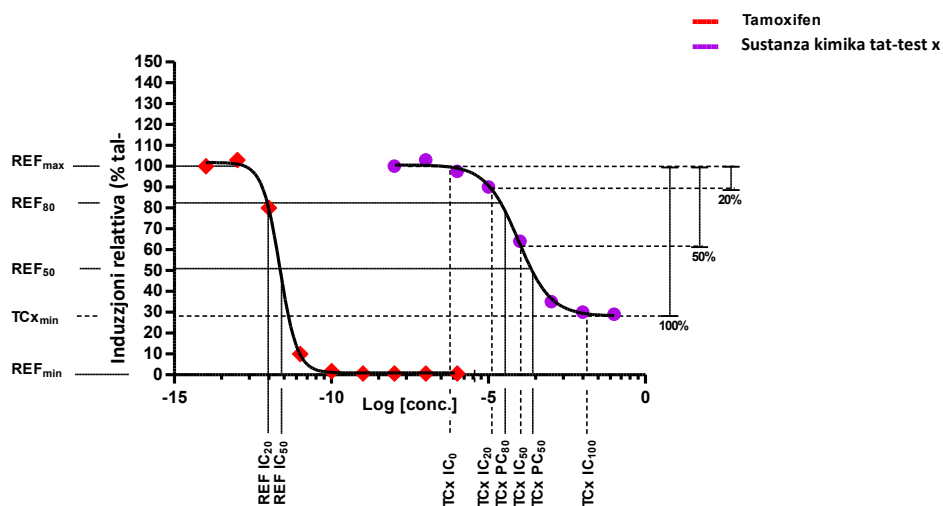
EC<sub>50</sub> = il-konċentrazzjoni ta' sustanza li fiha jiġi osservat 50 % tar-rispons massimu tagħha.

PC<sub>10</sub> = il-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li fiha r-rispons tagħha jkun daqs l-EC<sub>10</sub> tal-istandard referenzjarju.

PC<sub>50</sub> = il-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li fiha r-rispons tagħha jkun daqs l-EC<sub>50</sub> tal-istandard referenzjarju.

TCX<sub>max</sub> = l-induzzjoni relattiva massima tas-sustanza kimika tat-test.

**Figura 4:** Harsa ġenerali lejn il-parametri determinati fl-assaġġ tal-antagonisti



IC<sub>20</sub> = il-konċentrazzjoni ta' sustanza li fiha jiġi osservat 20 % tar-rispons massimu tagħha



(inibizzjoni ta' 20 %).

IC50 = il-konċentrazzjoni ta' sustanza li fiha jiġi osservat 50 % tar-rispons massimu tagħha (inibizzjoni ta' 50 %).

PC80 = il-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li fiha r-rispons tagħha jkun daqs l-IC20 tal-istandard referenzjarju.

PC50 = il-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li fiha r-rispons tagħha jkun daqs l-IC50 tal-istandard referenzjarju.

TC<sub>xmin</sub> = l-induzzjoni relattiva minima tas-sustanza kimika tat-test.

Għas-sustanzi kimiċi tat-test, kurva ta' doża-rispons sħiħa mhux dejjem tkun tista' tinkiseb minhabba, eż., problemi ta' ċitotossicità jew ta' solubbiltà. B'hekk, l-IC<sub>50</sub>, l-IC<sub>20</sub> u l-PC<sub>50</sub> ma jkunux jistgħu jiġu determinati. F'dan, il-każ, il-PC<sub>20</sub> u t-TC<sub>min</sub> biss ikunu jistgħu jiġu determinati.

58. Ir-riżultati għandhom ikunu bbażati fuq żewġ (jew tliet) sessjonijiet indipendenti. Jekk żewġ sessjonijiet jagħtu riżultati komparabbli u, għalhekk, riproducibbli, ma jkunx hemm bżonn li ssir it-tielet sessjoni. Biex ikunu aċċettabbli, ir-riżultati għandhom:

- Jissodisfaw il-kriterji ta' aċċettabbiltà (ara l-paragrafi 14-22 dwar il-Kriterji ta' aċċettabbiltà),
- Ikunu riproducibbli.

### Kriterji ta' Interpretazzjoni tad-*Data*

59. Għall-interpretazzjoni tad-*data* u d-deċiżjoni dwar jekk sustanza kimika tat-test titqiesx pożittiva jew negattiva, għandhom jintużaw il-kriterji li ġejjin:

#### Agoniżmu

Għal kull sessjoni komprensiva, sustanza kimika tat-test titqies **pożittiva** f'każ li:

- 1 It-TC<sub>max</sub> tkun ekwivalenti għal 10 % jew aktar tar-rispons massimu tal-istandard referenzjarju (REF<sub>10</sub>).
- 2 Tal-anqas żewġ konċentrazzjonijiet konsekuttivi tas-sustanza kimika tat-test ikunu ekwivalenti għall-REF<sub>10</sub> jew aktar minnha.

Għal kull sessjoni komprensiva, sustanza kimika tat-test titqies **negattiva** f'każ li:

- 1 It-TC<sub>max</sub> ma taqbiżx l-10 % tar-rispons massimu tal-istandard referenzjarju (REF<sub>10</sub>).
- 2 Anqas minn żewġ konċentrazzjonijiet konsekuttivi tas-sustanza kimika tat-test ikunu

ekwivalenti għall-REF10 jew aktar minnha.

#### Antagoniżmu

Għal kull sessjoni komprensiva, sustanza kimika tat-test titqies **pożittiva** f'każ li:

- 1 It-TC<sub>min</sub> tkun ekwivalenti għal 80 % jew anqas tar-rispons massimu tal-istandard referenzjarju (REF80 = inibizzjoni ta' 20 %).
- 2 Tal-anqas 2 konċentrazzjonijiet konsekuttivi tas-sustanza kimika tat-test ikunu ekwivalenti għall-REF80 jew anqas minnha.

Għal kull sessjoni komprensiva, sustanza kimika tat-test titqies **negattiva** f'każ li:

- 1 It-TC<sub>min</sub> taqbez it-80 % tar-rispons massimu tal-istandard referenzjarju (REF80 = inibizzjoni ta' 20 %).
  - 2 Anqas minn żewġ konċentrazzjonijiet konsekuttivi tas-sustanza kimika tat-test ikunu ekwivalenti għall-REF80 jew anqas minnha.
60. Biex tiġi karatterizzata l-potenza tar-rispons pożittiv ta' sustanza kimika tat-test, il-kobor tal-effett (agoniżmu: TC<sub>max</sub>; antagoniżmu: TC<sub>min</sub>) u l-konċentrazzjoni li fiha jsehh l-effett (agoniżmu: EC<sub>10</sub>, EC<sub>50</sub>, PC<sub>10</sub>, PC<sub>50</sub>; antagoniżmu: IC<sub>20</sub>, IC<sub>50</sub>, PC<sub>80</sub>, PC<sub>50</sub>) għandhom jiġu rapportati.

#### RAPPORT TAT-TEST

61. Ara l-paragrafu 20 ta' "KOMPONENTI TAL-ASSAĠĠ TA TAL-ER"

## DOKUMENTAZZJONI

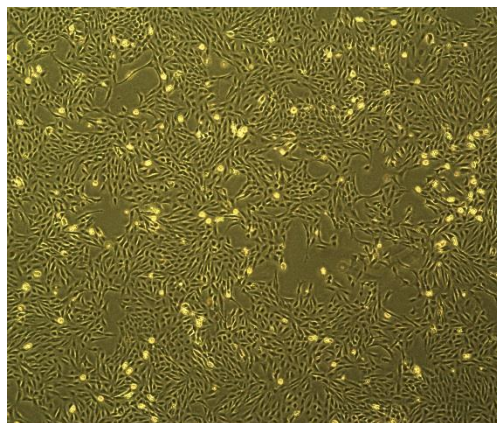
- (1) OECD (2016). Draft Validation report of the (anti-) ER $\alpha$  CALUX bioassay - transactivation bioassay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 240). Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi
- (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, u van der Burg B. (2001). 4-Hydroxytamoxifen trans-represses nuclear factor-kB Activity in human osteoblastic U2OS cells through estrogen receptor (ER) $\alpha$  and not through ER $\beta$ . *Endocrinology* 142(3), 1156-1166.
- (4) Thorne N, Inglese J u 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 u 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 u 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, u 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 u 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, u 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, u Felzel, E. (2014). Transactivation assay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential using ER $\alpha$  CALUX cells. BioDetection Systems BV (BDS). Amsterdam, in-Netherlands.

#### **Appendiċi 4.1: Spezzjoni viżwali tal-vijabbiltà taċ-ċelloli**

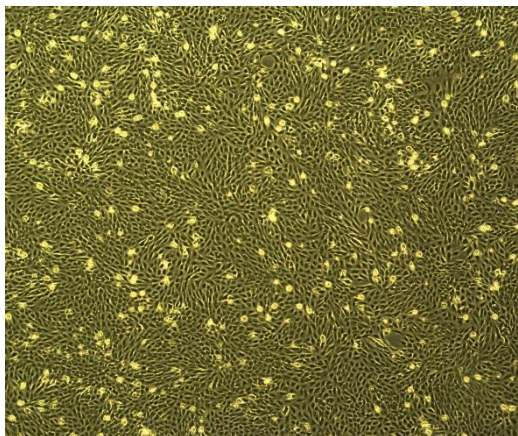


konfluwenza <5 %. Iċ-ċelloli għadhom kif jinżerghu. Vijabbiltà taċ-ċelloli ta' 100 %.  
Klassifikazzjoni: "ebda ċitotossicità"



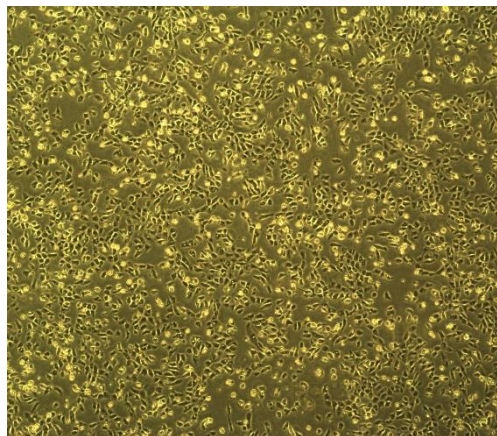
konfluwenza > 85 %. F'dan l-istadju, iċ-ċelloli jkunu esposti għas-sustanzi kimiċi tat-test. Vijabbiltà taċ-ċelloli ta' > 95 %.

Klassifikazzjoni: "ebda ċitotossicità"

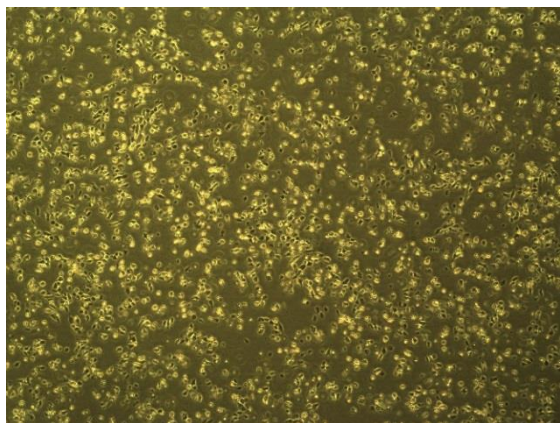


konfluwenza > 95 %. Iċ-ċelloli jkunu ppakkjati densament u jibdew jikbru b'mod eċċessiv. Vijabbiltà taċ-ċelloli ta' > 95 %.

Klassifikazzjoni: "ebda ċitotossicità"



Vijabbiltà taċ-ċelloli ta' < 25 %. Iċ-ċelloli jinqalghu minn ma' xulxin u l-kuntatt bejniethom jonqos. Iċ-ċelloli jittondjaw. Klassifikazzjoni: "ċitotossicità"



vijabbiltà taċ-ċelloli ta'  $< 5\%$ . Iċ-ċelloli jinqalghu minn ma' xulxin għalkollox u l-kuntatt bejniethom jispicċa. Iċ-ċelloli jittondjaw. Klassifikazzjoni: "ċitotossiċità"

## **B.67 TESTIJET *IN VITRO* TAL-MUTAZZJONI ĠENETIKA FUQ ĊELLOLI TAL-MAMMIFERI BL-UŻU TAL-ĠENE TIMIDINA KINAŽI**

### **INTRODUZZJONI**

1. Dan il-metodu ta' ttestjar (TM) hu ekwivalenti għal-linji gwida tat-test 490 tal-OECD (2016). Il-metodi ta' ttestjar jiġu rieżaminati u riveduti kull ċertu żmien fid-dawl tal-progress xjentifiku, tal-htigijiet regolatorji u tat-trattament xieraq tal-annimali. L-assaġġ tal-linfoma tal-ġrieden (MLA) u t-test TK6 bl-użu tal-lokus tat-timidina kinaži (TK) oriġinarjament kienu jinsabu fil-metodu ta' ttestjar B.17. Imbagħad, il-Grupp ta' Hidma ta' Esperti tal-MLA tal-Grupp ta' Hidma Internazzjonali dwar l-Ittestjar tal-Ġenotossicità (IWGT) żviluppa rakkomandazzjonijiet armonizzati fil-livell internazzjonali għall-kriterji ta' aċċettazzjoni tal-assaġġi u għall-interpretazzjoni tad-data għall-MLA (1)(2)(3)(4)(5), u dawn ir-rakkomandazzjonijiet huma inkorporati f'dan il-metodu ta' ttestjar il-ġdid B.67. Dan il-metodu ta' ttestjar hu miktub għall-MLA u, minhabba li juża wkoll il-lokus tat-TK, it-test TK6. Filwaqt li l-MLA ntuża hafna għal finijiet regolatorji, it-TK6 intuża ferm anqas spiss. Ta' min jinnota li minkejja s-similarità bejn il-punti ta' tmiem, iż-żewġ linji ta' ċelloli mhumieq interkambjabbli u l-programmi regolatorji jistgħu jesprimu validament preferenza għal wahda fuq l-oħra għal użu regolatorju partikolari. Pereżempju, il-validazzjoni tal-MLA wriet ix-xerqien ta' dan għad-detezzjoni mhux biss tal-mutazzjoni ġenika, iżda anki l-ħila ta' sustanza kimika tat-test li tinduċi ħsara kromożomika strutturali. Dan il-metodu ta' ttestjar hu parti minn sensiela ta' metodi ta' ttestjar dwar it-tossikoloġija ġenetika. L-OECD żviluppat dokument li jipprovdi informazzjoni sintetika fuq l-ittestjar dwar it-tossikoloġija ġenetika u harsa ġenerali lejn it-tibdiliet riċenti li sehew fil-linji gwida tat-test tal-OECD dwar it-tossicità ġenetika (6).
2. L-iskop tat-testijiet *in vitro* tal-mutazzjoni ġenetika fuq ċelloli tal-mammiferi hu li jindividwaw il-mutazzjonijiet ġenetiċi indotti mis-sustanzi kimiċi. Il-linji ta' ċelloli użati f'dawn it-testijiet ikejlu l-mutazzjonijiet 'il quddiem fil-ġeni indikaturi, speċifikament il-ġene timidina kinaži endoġena (TK għaċ-ċelloli tal-bniedem u *Tk* għaċ-ċelloli tar-roditori, kollettivament imsejha TK f'dan il-metodu ta' ttestjar). Dan il-metodu ta' ttestjar hu maħsub biex jintuża b'żewġ linji ta' ċelloli: il-linja ta' ċelloli tal-linfoma tal-ġrieden L5178Y TK<sup>+</sup>-3.7.2C (ġeneralment imsejha L5178Y) u l-linja ta' ċelloli linfoblastojde umana TK6 (ġeneralment imsejha TK6). Ghalkemm iż-żewġ linji ta' ċelloli jvarjaw minhabba l-oriġini tagħhom, it-tkabbir taċ-ċelloli, l-istatus tal-p53, eċċ., it-testijiet tal-mutazzjoni ġenika TK jistgħu jitwettqu b'mod simili fiż-żewġ tipi ta' ċelloli kif deskritt f'dan il-metodu ta' ttestjar.

3. In-natura awtosomali u eteroziguża tal-ġene timidina kinażi tippermetti d-detezzjoni ta' kolonji vijabbli li ċ-ċelloli tagħhom ikunu nieqsa mill-enzima timidina kinażi wara l-mutazzjoni minn  $TK^{+/-}$  għal  $TK^{-/-}$ . Dan in-nuqqas jista' jirriżulta minn avvenimenti ġenetiċi li jaffettwaw il-ġene  $TK$  inklużi ż-żewġ mutazzjonijiet ġeniċi (mutazzjonijiet puntwali, mutazzjonijiet li jibdli l-qari tal-kodiċi ġenetiku, tħassiriet żgħar, eċċ.) u avvenimenti kromożomiċi (tħassiriet kbar, riarranġamenti kromożomali u rikombinazzjoni mitotika). Dawn l-avvenimenti msemmija l-aħħar huma espressi bħala telf tal-eterozigożità, li hu tibdil ġenetiku komuni tal-ġeni suppressur tat-tumuri fit-tumorigenesi umana. Fit-teorija, telf tal-kromożoma shiħa li ġgħorr il-ġene  $TK$  li tirriżulta mill-indeboliment tal-fus u/jew minn nondisġunzjoni mitotika jista' jiġi individwat fl-MLA. Tabilhaqq, taħlita ta' analiżi ċitogenika u molekolari turi biċ-ċar li ċerti mutanti tat- $TK$  tal-MLA huma r-riżultat tan-nondisġunzjoni. Madankollu, il-piż tal-evidenza juri li t-testijiet tal-mutazzjoni ġenika  $TK$  ma jistgħux jindividwaw b'mod affidabbli anewġeni meta jiġu applikati kriterji standard taċ-ċitotossicità (kif deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar) u għaldaqstant, mhuwiex xieraq li jintużaw dawn it-testijiet biex jiġu individwati anewġeni (7)(8)(9).
4. Fit-testijiet tal-mutazzjoni ġenika tat- $TK$ , jiġu ġenerati żewġ klassijiet fenotipiċi distinti ta' mutanti tat- $TK$ ; il-mutanti li jikbru normali li jikbru bl-istess rata bħaċ-ċelloli eterozigużi tat- $TK$ , u l-mutanti li jikbru bil-mod li jikbru b'ħinijiet ta' rdoppjar imtawla. Il-mutanti li jikbru normali u daww li jikbru bil-mod huma rikonoxxuti bħala mutanti ta' kolonja kbira u ta' kolonja żgħira fl-MLA u bħala kolonja li tidher kmieni u bħala mutanti ta' kolonja li tidher tard fit- $TK6$ . In-natura molekolari u ċitogenetika ta' mutanti tal-MLA ta' kolonji kbar kif ukoll żgħar ġiet esplorata fid-dettall (8)(10)(11)(12)(13). In-natura molekolari u ċitogenetika tal-mutanti li jidhru kmieni u daww li jidhru tard tat- $TK6$  ġiet investigata fil-fond ukoll (14)(15)(16)(17). Mutanti li jikbru bil-mod għaž-żewġ tipi ta' ċelloli ġarrbu ħsara ġenetika li tinvolvi ġene/i regolatorju/i tat-tkabbir putattiv qrib il-locus tat- $TK$  li tirriżulta f'ħinijiet ta' rdoppjar imtawla u fil-formazzjoni ta' kolonji li jidhru tard jew żgħar (18). L-induzzjoni ta' mutanti li jikbru bil-mod ġiet assoċjata ma' sustanzi kimiċi li jinduċu tibdiliet strutturali kbar fil-livell kromożomiku. Ċelloli li l-ħsara tagħhom ma tinvolvix il-ġene/i regolatorju/i tat-tkabbir putattiv hdejn il-locus tat- $TK$  jikbru b'rati simili għaċ-ċelloli omm u jsiru mutanti li jikbru normali. L-induzzjoni ta' primarjament mutanti li jikbru b'mod normali hi assoċjata ma' sustanzi kimiċi li primarjament jaġixxu bħala mutageni puntwali. Konsegwentement, hu essenzjali li jingħaddu kemm il-mutanti li jikbru bil-mod kif ukoll daww li jikbru normali biex jiġu rkuprati l-mutanti kollha u tiġi pprovduta xi idea dwar it-tip(i) ta' ħsara (mutageni vs. klastoġeni) indotta mis-sustanza kimika tat-test (10)(12)(18)(19).



5. Il-metodu ta' ttestjar tal-Linja Gwida tat-Test hu organizzat biex jipprovdi informazzjoni ġenerali li tapplika kemm għall-MLA kif ukoll għat-TK6 u gwida speċjalizzata għat-testijiet individwali.
6. Id-definizzjonijiet użati huma pprovduti fl-Appendiċi 1.

## KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

7. Ġeneralment it-testijiet imwettqa *in vitro* jehtieġu l-użu ta' sors esoġenu ta' attivazzjoni metabolika. Is-sistema esoġena ta' attivazzjoni metabolika ma timitax għalkollox il-kundizzjonijiet *in vivo*.
8. Għandha tingħata attenzjoni biex jiġu evitati kundizzjonijiet li jistgħu jwasslu għal riżultati pożittivi artefattwali, (jiġifieri interazzjonijiet possibbli mas-sistema tat-test), mhux ikkawżati minn interazzjoni bejn is-sustanza kimika tat-test u l-materjal ġenetiku taċ-ċellola; tali kundizzjonijiet jinkludu tibdiliet fil-pH jew fl-ożmolalità, interazzjoni mal-komponenti tal-medium (20)(21) jew livelli eċċessivi ta' ċitotossicità (22)(23)(24). Ċitotossicità li taqbeż il-livelli massimi rakkomandati ta' ċitotossicità kif definiti fil-paragrafu 28 titqies eċċessiva għall-MLA u għat-TK6. Barra minn hekk, ta' min jinnota li s-sustanzi kimiċi tat-test li jkunu analogi tat-timidina, jew li jġibu ruhhom bħal analogi tat-timidina jistgħu jżidu l-frekwenza mutanti bit-tkabbir selettiv tal-mutanti ta' sfond spontanji matul it-trattament taċ-ċelloli u jehtieġu metodi ta' ttestjar addizzjonali għal evalwazzjoni adegwata (25).
9. Għal nanomaterjali manifatturati, jaf ikun hemm bżonn li jsiru adattamenti speċifiċi ta' dan il-metodu ta' ttestjar li ma jkunux deskritti fih.
10. Qabel ma jintuża dan il-metodu ta' ttestjar għall-ittestjar ta' taħlita għall-ġenerazzjoni ta' *data* għal skop regolatorju intiż, għandu jiġi kkunsidrat jekk jistax jipprovdi riżultati adegwati għal dak l-għan u, jekk iva, għaliex. Dawn il-kunsiderazzjonijiet mhumix meħtieġa meta jkun hemm rekwiżit regolatorju għall-ittestjar tat-taħlita.
11. Iċ-ċelloli mutanti nieqsa mill-attività enzimatika tat-timidina kinazi minhabba mutazzjoni  $TK^{+/-}$  għal  $TK^{-/-}$  huma reżistenti għall-effetti ċitostatiċi tat-trifluworotimidina (TFT) tal-analogu tal-pirimidina. Iċ-ċelloli profiċċjenti huma sensittivi għat-TFT, li toħloq l-inibizzjoni tal-metabolizmu ċellolari u twaqqaf aktar diviżjoni fiċ-ċelloli. B'hekk, iċ-ċelloli mutanti jkunu kapaċi jipproliferaw fil-preżenza tat-TFT u jiformaw kolonji viżibbli, filwaqt li iċ-ċelloli li fihom l-enzima TK ma jkunux.

## PRINĊIPJU TAT-TEST

12. Lè-ċelloli f'sospensjoni jiġu esposti għas-sustanza kimika tat-test, kemm b'sors esogen u ta' attivazzjoni metabolika kif ukoll mingħajr (ara l-paragrafu 19), għal perjodu xieraq ta' żmien (ara l-paragrafu 33), u mbagħad jiġu subkolturati biex tiġi determinata l-ċitotossicità u tithalla l-espressjoni fenotipika qabel l-għażla tal-mutant. L-ċitotossicità tiġi determinata bit-tkabbir totali relattiv (RTG—ara l-paragrafu 25) għall-MLA u mis-sopravivenza relattiva (Rs—ara l-paragrafu 26) għat-TK6. Il-kolturi ttrattati jinżammu f'medium tat-tkabbir għal perjodu ta' żmien suffiċjenti, karatteristika ta' kull tip ta' ċellola (ara l-paragrafu 37), biex jippermetti l-espressjoni fenotipika kwazi ottimali tal-mutazzjonijiet magħmula. Wara l-espressjoni fenotipika, il-frekwenza mutanti tiġi stabbilita biż-żriġ ta' għadd magħruf ta' ċelloli f'medium li jkun fih l-aġent selettiv biex jiġu żvelati l-kolonji mutanti, u f'medium mingħajr aġent selettiv biex tiġi żvelata l-effiċjenza tal-klonazzjoni (vijabbiltà). Wara perjodu xieraq ta' inkubazzjoni, jingħaddu l-kolonji. Il-frekwenza tal-mutanti tiġi kkalkolata fuq il-bażi tan-numru ta' kolonji mutanti kkoreġut bl-effiċjenza tal-klonazzjoni fil-mument tal-għażla tal-mutanti.

## DESKRIZZJONI TAL-METODU

### Preparamenti

#### Ċelloli

13. Għall-MLA: Minhabba li l-MLA gie żviluppat u karatterizzatb l-użu tas-sublinja  $TK^{+/-}$  -3.7.2C taċ-ċelloli L5178Y, din is-sublinja speċifika trid tintuża għall-MLA. Il-linja ta' ċelloli L5178Y giet derivata minn linfoma timika indotta mill-metilkolantren minn gurdien DBA-2 (26). Clive u l-kollegi ttrattaw ċelloli L5178Y (imsejha minn Clive bħala  $TK^{+/+}$  -3) bis-sulfonat tal-etilmetan u iżolaw klonu tat- $TK^{-/-}$  (imsejjah  $TK^{-/-}$  -3.7) billi użaw il-bromodeossiuridina bħala l-aġent selettiv. Mill-klonu tat- $TK^{-/-}$ , klonu spontanju  $TK^{+/-}$  (imsejjah  $TK^{+/-}$  -3.7.2.) u subklonu (imsejjah  $TK^{+/-}$  -3.7.2C) ġew iżolati u karatterizzati għall-użu fl-MLA (27). Il-karjotip għal-linja ta' ċelloli gie ppubblikat (28)(29)(30)(31). In-numru tal-kromożoma modali hu 40. Hemm kromożoma metaċentrika waħda (t12;13) li għandha tingħadd bħala kromożoma waħda. Il-lokus tat- $TK$  tal-gurdien jinsab fit-tarf distali tal-kromożoma 11. Il-linja ta' ċelloli L5178Y  $TK^{+/-}$  -3.7.2C għandha mutazzjonijiet fiż-żewġ alleli p53 u tipproduċi proteina p-53 mutanti (32) (33). L-istatus p53 tal-linja ta' ċelloli  $TK^{+/-}$  -3.7.2C aktarx li hu responsabbli għall-hila tat-test li jindividwa hsara fuq skala kbira (17).
14. Għat-TK6: It-TK6 hi linja ta' ċelloli linfoblastojde umana. Il-linja ta' ċelloli omm hi linja ta' ċelloli trasformata b'vajrus Epstein-Barr, WI-L2, li originarjament inkisbet minn tifel ta' hames snin bi sferoċitozi ereditarja. L-ewwel klonu iżolat, HH4, gie

mutaġenizzat b'ICR191 u ġiet ġenerata linja ta' ċelloli eterożiġuza tat-*TK* (34). Iċ-ċelloli TK6 huma kważi diplojdi u l-karjotip rappreżentattiv hu 47, XY, 13+, t(14; 20), t(3; 21) (35). Il-lokus tat-*TK* uman jinsab fil-fergħa twila tal-kromożoma 17. It-*TK6* hi linja ta' ċelloli kompetenti tal-p53, minhabba li għandha sekwenza p53 tat-tip selvaġġ fiż-żewġ alleli u tesprimi biss il-proteina p53 tat-tip selvaġġ (36).

15. Kemm għall-*MLA* kif ukoll għat-*TK6*, meta l-ewwel jiġi stabbilit jew rifornit stokk prinċipali, hu rakkomandat li l-laboratorju tal-ittestjar jiżgura n-nuqqas ta' kontaminazzjoni bil-*Mikoplasma*, jagħti karjotip liċ-ċelloli jew jiżbogħ il-kromożomi li jhaddnu l-lokus tat-*TK*, u jivverifikaw il-hinijiet ta' rdoppjar tal-popolazzjoni. It-tul normali taċ-ċiklu taċ-ċelloli għaċ-ċelloli użati fil-laboratorju tal-ittestjar għandu jkun stabbilit u konsistenti mal-karatteristiċi taċ-ċelloli ppubblikati (16)(19)(37). Dan l-istokk prinċipali għandu jinħażen f°-150° C jew anqas u jintuża biex jithejjew l-istokkijiet taċ-ċelloli operatorji kollha.
16. Jew qabel ma jiġi stabbilit numru kbir ta' stokkijiet operatorji krijopreservati jew inkella eżatt qabel l-użu f'esperiment, il-koltura jaf ikollha titnaddaf miċ-ċelloli mutanti preeżistenti [sakemm il-frekwenza tal-mutanti tal-kontroll b'solvent (MF) ma tkunx diġà fi hdan il-medda aċċettabbli—ara t-Tabella 2 għall-*MLA*]. Dan jinkiseb bl-użu tal-metotreksat (amminopterina) biex jintgħażlu kontra ċelloli nieqsa mit-*TK* u jiżdiedu t-timidina, l-ipossantina u l-gliċina (L5178Y) jew 2'-deossiċitidina (TK6) mal-koltura biex jiġi żgurat tkabbir ottimali taċ-ċelloli kompetenti tat-*TK* (19)(38)(39), u (40) għat-*TK6*. Parir ġenerali dwar il-prattika tajba għaž-żamma tal-kolturi taċ-ċelloli kif ukoll parir speċifiku għaċ-ċelloli L5178Y u TK6 jistgħu jinkisbu minn (19)(31)(37)(39)(41). Għal laboratorji li jehtieġu stokkijiet ta' ċelloli prinċipali biex jibdew l-*MLA* jew inkella t-*TK6* jew biex jiksbu stokkijiet ta' ċelloli prinċipali godda, hemm disponibbli repożitorju taċ-ċelloli ta' ċelloli karatterizzati sew (37).

### **Kundizzjonijiet tal-media tal-koltura**

17. Għaž-żewġ testijiet, għandhom jintużaw kundizzjonijiet xierqa tal-media tal-koltura u tal-inkubazzjoni (eż. reċipjenti tal-koltura, atmosfera umidifikata ta' 5 % CO<sub>2</sub>, temperatura ta' inkubazzjoni ta' 37°C) għaž-żamma tal-kolturi. Il-kolturi taċ-ċelloli dejjem għandhom jinżammu f'kundizzjonijiet li jiżguraw li jkun qed jikbru fil-fażi log. Hu partikolarment importanti li jintgħażlu kundizzjonijiet tal-media u tal-kolturi li jiżguraw l-iżvilupp ottimali taċ-ċelloli matul il-perjodu ta' espressjoni u klonazzjoni kemm għaċ-ċelloli mutanti kif ukoll għal dawk mhux mutanti. Għall-*MLA* u għat-*TK6*, hu importanti wkoll li l-kundizzjonijiet tal-koltura jiżguraw it-tkabbir ottimali kemm tal-mutanti tat-*TK* ta' kolonji kbar/li jidhru kmieni kif ukoll ta' kolonji żgħar/li jidhru tard. Aktar dettalji dwar il-koltura, inkluża l-htieġa li jissahħan kif suppost is-

serum taż-żwiemel inattivat jekk jintuża l-medium tal-RPMI matul l-ghażla tal-mutanti, jistgħu jinkisbu minn (19)(31)(38)(39)(40)(42).

### **Preparazzjoni tal-kolturi**

18. Iċ-ċelloli jiġu propagati minn kolturi omm, miżrugħa fil-medium tat-tkabbir b'densità tali li l-kolturi f'sospensjonijiet jibqgħu jikbru b'mod esponenzjali matul it-trattament u l-perjodi ta' espressjoni kollha kemm huma.

### **Attivazzjoni metabolika**

19. Għandhom jintużaw sistemi metabolizzanti esoġeni meta jintużaw ċelloli L5178Y u TK6 għaliex għandhom kapaċità metabolika endoġena inadegwata. L-aktar sistema użata spiss, li hi l-ewwel rakkomandata, sakemm ma jkunx ġustifikat mod ieħor, hi frazzjoni postmitokondrijali ssupplimentata minn kofatturi (S9) imhejjija mill-fwied ta' roditori (ġeneralment firien) trattati b'indutturi enzimatiċi bħal Aroclor 1254 (43)(44)(45) jew taħlita ta' fenobarbital u ta'  $\beta$ -naftoflavon (46)(47)(48)(49)(50)(51). Din it-taħlita msemija l-aħħar ma tmurx kontra l-Konvenzjoni ta' Stokkolma dwar Materjal Organiku Persistenti li Jnigges (52) u ntweri li hi effettiva daqs Aroclor 1254 għall-induzzjoni ta' ossidazzjonijiet b'funzjoni mħallta (45)(46)(47)(48)(49). Il-frazzjoni S9 normalment tintuża f'konċentrazzjonijiet li jvarjaw minn 1-2 % (v/v) iżda tista' tiżdied sa 10 % (v/v) fil-medium tat-test finali. L-ghażla tat-tip u l-konċentrazzjoni ta' sistema ta' attivazzjoni metabolika eżoġena jew induttur metaboliku użati tista' tkun influwenzata mill-klassi tas-sustanzi kimiċi tat-test.

### **Preparati tas-sustanza kimika tat-test**

20. Is-sustanzi kimiċi solidi tat-test għandhom jiġu ppreparati f'solventi xierqa u jiġu dilwiti, jekk dan ikun xieraq, qabel it-trattament taċ-ċelloli (ara l-paragrafu 21). Is-sustanzi kimiċi likwidi tat-test jistgħu jiżdiedu direttament mas-sistema tat-test u/jew jiġu dilwiti qabel it-trattament tas-sistema tat-test. Is-sustanzi kimiċi gassużi jew volatilji tat-test għandhom jiġu ttestjati b'modifiki xierqa fil-protokoll standard, bħat-trattament f'reċipjenti tal-koltura ssiġillati (53)(54)(55). Il-preparati tas-sustanza kimika tat-test għandhom isiru eżatt qabel it-trattament, sakemm id-*data* dwar l-istabbiltà ma turix l-aċċettabbiltà tal-ħżin.

## **KUNDIZZJONIJIET TAT-TEST**

### **Solventi**

21. Is-solvent għandu jingħażel biex tiġi ottimizzata s-solubbiltà tas-sustanza kimika tat-test mingħajr ma jithalla impatt avvers fuq it-twetliq tal-assaġġ, eż. tibdil fit-tkabbir taċ-ċelloli, effett fuq l-integrità tas-sustanza kimika tat-test, reazzjoni ma' reċipjenti tal-koltura, indeboliment tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika. Hu rakkomandat li, kull meta dan ikun possibbli, l-ewwel għandu jiġi kkunsidrat l-użu ta' solvent milwiem (jew medium tat-tkabbir). Fost is-solventi ferm stabbiliti hemm l-ilma jew is-sulfossidu tad-dimetil. Ġeneralment, is-solventi organiċi ma għandhomx jaqbżu l-1 % (v/v) u s-solventi milwiema (salina jew ilma) ma għandhomx jaqbżu l-10 % (v/v) fil-medium tat-trattament finali. Jekk jintużaw solventi li ma jkunux ferm stabbiliti (eż. etanol jew aċeton), l-użu tagħhom għandu jkun sostnut minn *data* li tindika l-kompatibbiltà tagħhom mas-sustanzi kimiċi tat-test, mas-sistema tat-test, u n-nuqqas tagħhom ta' tossiċità ġenetika bil-konċentrazzjoni użata. Fin-nuqqas ta' dik id-*data* ta' sostenn, importanti li jiġu inklużi kontrolli mhux trattati (ara l-Appendiċi 1, Definizzjonijiet) biex jintwera li s-solvent magħżul ma jinduċi ebda effett dannuż jew mutageniku.

## **KEJL TAĊ-ĊITOTOSSICITÀ U GHAŻLA TAL-KONĊENTRAZZJONIJIET TAT-TRATTAMENT**

22. Meta wiehed jistabbilixxi l-oġġla konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test, għandhom jiġu evitati konċentrazzjonijiet li għandhom il-kapaċità li jipproduċu rispons pożittiv artefattwali, bħal dawk li jipproduċu ċitotossicità eċċessiva (ara l-paragrafu 28), il-precipitazzjoni (ara l-paragrafu 29) fil-medium tat-tkabbir, jew bidliet ċari fil-pH jew ożmolalità (ara l-paragrafu 5). Jekk is-sustanza kimika tat-test tikkaġuna tibdil ċar fil-pH tal-medium fi żmien iż-żgħir, il-pH tista' tiġi aġġustata bl-ibbaferjar tal-medium tat-trattament finali biex jiġu evitati riżultati pożittivi artefattwali u biex jinżammu l-kundizzjonijiet xierqa tal-koltura.
23. L-għażla tal-konċentrazzjoni hi bbażata fuq iċ-ċitotossicità u fuq kunsiderazzjonijiet oħra (ara l-paragrafi 27-30). Filwaqt li l-evalwazzjoni taċ-ċitotossicità f'test inizjali tista' tkun siewja biex jiġu definiti aħjar il-konċentrazzjonijiet li jkunu se jintużaw fl-esperiment ewlieni, test inizjali mhuwiex meħtieġ. Anki jekk issir evalwazzjoni taċ-ċitotossicità inizjali, il-kejl taċ-ċitotossicità għal kull koltura xorta waħda jkun meħtieġ fl-esperiment ewlieni. Jekk isir esperiment għas-sejbien tal-medda, dan għandu jkopri firxa wiesgħa ta' konċentrazzjonijiet u jista' jew jiġi terminat fil-jum 1 wara t-trattament jew jibqa' għaddej matul l-espressjoni tal-jum 2 u l-għażla tal-mutanti (jekk jidher li l-konċentrazzjonijiet użati jkunu xierqa).
24. Iċ-ċitotossicità għandha tiġi determinata għal kull koltura tat-test u kull koltura tal-kontroll individwali: il-metodi għall-MLA (2) u għat-TK6 (15) huma definiti bi prattika miftiehma fil-livell internazzjonali.

25. Kemm għall-verżjoni tal-agar kif ukoll għall-verżjoni tal-mikropjastri tal-MLA: Iċ-ċitotossicità għandha tiġi evalwata bl-użu tat-tkabbir totali relattiv (RTG) li oriġinarjament ġie definit minn Clive u Spector fl-1975 (2). Dan il-kejl jinkludi l-iżvilupp relattiv f'sospensjoni (RSG: koltura tat-test vs. kontroll b'solvent) matul it-trattament taċ-ċelloli, il-hin tal-espressjoni u l-effiċjenza tal-klonazzjoni relattiva (RCE): koltura tat-test vs. kontroll b'solvent) fil-hin li fih jingħazlu l-mutanti (2). Ta' min jinnota li l-RSG jinkludi kwalunkwe telf ta' ċelloli li jsehh fil-koltura tat-test matul it-trattament (Ara l-Appendiċi 2 għall-formuli).
26. Għal TK6: Iċ-ċitotossicità għandha tiġi evalwata bl-użu tas-sopravivenza relattiva (RS), jiġifieri l-effiċjenza tal-klonazzjoni taċ-ċelloli pjastrati eżatt wara t-trattament, aġġustata għal kwalunkwe telf ta' ċelloli matul it-trattament, fuq il-bażi tal-għadd taċ-ċelloli, meta mqabbla mal-l-kontroll negattiv (assenjati sopravivenza ta' 100 %) (Ara l-Appendiċi 2 għall-formula).
27. Għandhom jiġu evalwati tal-anqas erba' konċentrazzjonijiet tat-test (mhux inkluzi l-kontrolli tas-solvent u pożittivi) li jissodisfaw il-kriterji ta' aċċettabbiltà (iċ-ċitotossicità xierqa, in-numru ta' ċelloli, eċċ.). Filwaqt li l-użu ta' kolturi duplikati hu rakkomandat, jistgħu jintużaw kolturi repliki jew trattati individwalment f'kull konċentrazzjoni ttestjata. Ir-riżultati miksuba għall-kolturi rreplikati f'konċentrazzjoni partikolari għandhom jiġu rrapportati b'mod separat iżda jistgħu jiġu aggregati għall-analizi tad-*data* (55). Għal sustanzi kimiċi tat-test li juru tossicità baxxa jew ebda tossicità, intervalli tal-konċentrazzjoni ta' madwar id-doppju jew it-triplu normalment ikunu xierqa. Meta ssehh ċitotossicità, il-konċentrazzjonijiet għandhom jintgħazlu biex ikopru l-medda ta' ċitotossicità minn dik iċ-ċitotossicità produttiva kif deskritta fil-paragrafu 28 u inkluzi konċentrazzjonijiet li fihom ikun hemm ċitotossicità moderata u baxxa jew ebda ċitotossicità. Hafna sustanzi kimiċi tat-test juru kurvi konċentrazzjoni rispons wiqfin u, biex tkun koperta l-medda shiha taċ-ċitotossicità jew biex jiġu studjati l-konċentrazzjoni u r-rispons fid-dettall, jaf ikun hemm bżonn li jintużaw konċentrazzjonijiet spazjati aktar qrib xulxin u aktar minn erba' konċentrazzjonijiet, speċjalment f'sitwazzjonijiet li fihom ikun hemm bżonn li jsir esperiment ripetut (ara l-paragrafu 43). L-użu ta' aktar minn erba' konċentrazzjonijiet jista' jkun partikolarment importanti meta jintużaw kolturi individwali.
28. Jekk il-konċentrazzjoni massima tkun ibbażata fuq iċ-ċitotossicità, l-ogħla konċentrazzjoni għandu jkollha l-għan li tilhaq bejn 20 u 10 % RTG għall-MLA, u bejn 20 u 10 % RS għat-TK6 (paragrafu 67).
29. Għal sustanzi kimiċi tat-test ftit li xejn solubbli li mhumiex ċitotossiċi f'konċentrazzjonijiet anqas mill-anqas konċentrazzjoni insolubbli, l-ogħla konċentrazzjoni analizzata għandha tipproduċi turbidità jew preċipitat vizibbli bl-ghajnejn jew bl-ghajnuna ta' mikroskopju invertit fi tmiem it-test bis-sustanza kimika

tat-test. Anki jekk iċ-ċitotossicità ssehh f'livelli inqas mill-inqas konċentrazzjoni insolubbli, huwa rakkomandat li l-ittestjar isir f'konċentrazzjoni waħda biss li tipproduċi turbidità jew bi preċipitat viżibbli għaliex jistgħu jirriżultaw effetti artifattwali mill-preċipitat. Peress li l-MLA u t-TK6 jużaw kulturi ta' sospensjoni, għandha tingħata attenzjoni biex jiġi żgurat li l-preċipitat ma jxekkilx it-twettiq tat-test. Id-determinazzjoni tas-solubbiltà fil-medium tat-tkabbir qabel l-esperiment tista' tkun utli wkoll.

30. Jekk ma jiġu osservati ebda preċipitat jew ċitotossicità li tillimita, l-oghla konċentrazzjoni tat-test għandha tkun tikkorrispondi għal 10 mM, 2 mg/ml jew 2 µl/ml, liema minnhom tkun l-anqas (57)(58). Meta s-sustanza kimika tat-test ma jkollhiex kompożizzjoni definita, eż. sustanza b'kompożizzjoni mhux magħrufa jew varjabbli, prodotti jew materjali bijoloġiċi b'reazzjoni kumplessa [jiġifieri Sustanzi Kimiċi b'Kompożizzjoni mhux magħrufa jew Varjabbli (UVCBs)], estratti ambjentali, eċċ., il-konċentrazzjoni massima jaf ikollha bżonn tkun oghla (eż. 5 mg/ml), fin-nuqqas ta' biżżejjed ċitotossicità, biex tiżdied il-konċentrazzjoni ta' kull wieħed mill-komponenti. Madankollu, ta' min jinnota li dawn ir-rekwiżiti jistgħu jvarjaw għall-prodotti farmaċewtiċi għall-bniedem (59).

## Kontrolli

31. Għal kull kundizzjoni sperimentali għandhom ikunu inklużi kontrolli negattivi konkorrenti (ara l-paragrafu 21) li jikkonsistu f'solvent waħdu fil-medium tat-trattament u mmanigġjati bl-istess mod bħall-kulturi tat-trattament.
32. Kontrolli pożittivi konkorrenti huma meħtieġa biex juru l-hila tal-laboratorju fl-identifikazzjoni ta' mutageni fil-kundizzjonijiet tal-protokoll tat-test użat, l-effikaċja tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika esoġena (meta applikabbli), u biex tintwera detezzjoni adegwata ta' mutanti tat-TK żgħar/li jidhru tard kif ukoll daww kbar/li jidhru kmieni. Fit-tabella 1 ta' hawn taht jingħataw eżempji ta' kontrolli pożittivi. Jistgħu jintużaw sustanzi ta' kontroll pożittiv oħra, jekk ikunu ġustifikati. Peress li t-testijiet *in vitro* taċ-ċelloli tal-mammiferi huma standardizzati biżżejjed għal trattamenti fuq terminu qasir (minn tlieta sa erba' sigħat) li jsiru b'mod parallel ma' u mingħajr attivazzjoni metabolika bl-użu tal-istess durata tat-trattament, l-użu tal-kontrolli pożittivi jista' jkun limitat għal mutageni li jeħtieġ attivazzjoni metabolika. F'dan il-każ, dan ir-rispons tal-kontroll pożittiv individwali se juri kemm l-attività tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika kif ukoll ir-risponsività tas-sistema tat-test. Madankollu, jekk jintuża, trattament fit-tul (jiġifieri 24 siegħa mingħajr S9) għandu jkollu l-kontroll pożittiv tiegħu stess peress li d-durata tat-trattament sejra tvarja mit-test bl-użu tal-attivazzjoni metabolika. Kull kontroll pożittiv għandu jintuża f'konċentrazzjoni waħda jew aktar li tkun mistennija tagħti żidiet riproduttivi u

individwabbli li jispikkaw biex tintwera s-sensittività tas-sistema tat-test, u r-rispons ma għandux ikun imxekkel miċ-ċitotossicità li taqbeż il-limiti speċifikati f'dan it-TM (ara l-paragrafu 28).

**Tabella 1:** Sustanzi ta' referenza rakkomandati għall-valutazzjoni tal-profiċjenza tal-laboratorju u għall-għażla tal-kontrolli pożittivi

| Kategorija                                                 | Sustanza               | CASRN |
|------------------------------------------------------------|------------------------|-------|
| <b>1. Mutageni attivi mingħajr attivazzjoni metabolika</b> |                        |       |
| Metansulfonat tal-metil                                    | 66-27-3                |       |
| Mitomiċina C                                               | 50-07-7                |       |
| 4-Nitrokinolina-N-Ossidu                                   | 56-57-5                |       |
| <b>2. Mutageni li jehtiegu attivazzjoni metabolika</b>     |                        |       |
| Benzo(a)piren                                              | 50-32-8                |       |
| Ċiklofosfamid (monoidrat)                                  | 50-18-0<br>(6055-19-2) |       |
| 7,12-Dimetilbenzantraċen                                   | 57-97-6                |       |
| 3-Metilkolantren                                           | 56-49-5                |       |

## PROCEDURA

### Trattament bis-sustanza kimika tat-test

33. Ċelloli li jipproliferaw huma ttrattati bis-sustanza tat-test fil-preżenza u fin-nuqqas ta' sistema ta' attivazzjoni metabolika. L-esponiment għandu jkun għal perjodu xieraq ta' żmien (normalment perjodu ta' bejn tlieta u erba' sigħat ikun adegwat). Madankollu, ta' min jinnota li dawn ir-rekwiżiti jistgħu jvarjaw għall-prodotti farmaċewtiċi għall-bniedem (59). Għall-MLA, f'każijiet li fihom it-trattament fuq terminu qasir irendi riżultati negattivi, u jkun hemm informazzjoni li tissuggerixxi l-htieġa ta' trattament itwal [eż. analogi nukleosidiċi, sustanzi kimiċi fit li xejn solubbli, (5)(59)], għandha tingħata kunsiderazzjoni għat-twettiq tat-test mingħajr trattament aktar fit-tul, jigifieri 24 siegħa mingħajr S9.
34. In-numru minimu ta' ċelloli użati għal kull kultura tat-test (tal-kontroll u trattata) f'kull stadju fit-test għandu jkun ibbażat fuq il-frekwenza mutanti spontanja. Gwida generali hi li jiġu trattati u passaġġati biżżejjed ċelloli f'kull kultura tal-esperiment biex jinżammu, tal-anqas, 10 iżda, idealment, 100 mutant spontanju f'kull fażi tat-test (trattament, espressjoni fenotipika u għażla tal-mutanti) (56).



35. Għall-MLA, il-frekwenza mutanti spontanja aċċettabbli rakkomandata hi ta' bejn  $35-140 \times 10^{-6}$  (il-verżjoni tal-agar) u  $50-170 \times 10^{-6}$  (il-verżjoni tal-mikropjastri) (ara t-Tabella 2). Biex tal-anqas ikun hemm 10 u, idealment, 100 mutant spontanju li jibqgħu ħajjin wara t-trattament għal kull kultura tat-test, hemm bżonn li tal-anqas jiġu trattati  $6 \times 10^6$  ċelloli. L-immirar għal dan in-numru ta' ċelloli, u ż-żamma ta' biżżejjed ċelloli matul l-espressjoni u l-klonazzjoni għall-ghażla tal-mutanti, jipprovdu għal numru suffiċjenti ta' mutanti spontanji (10 jew aktar) matul kull fażi tal-esperiment, anki għall-kolturi trattati f'konċentrazzjonijiet li jirriżultaw f'ċitotossicità ta' 90 % (kif imkejla minn RTG ta' 10 %) (19)(38)(39).
36. Għat-TK6, il-frekwenza mutanti spontanja generalment tkun ta' bejn 2 u  $10 \times 10^{-6}$ . Biex tal-anqas ikun hemm 10 mutanti spontanji li jibqgħu ħajjin wara t-trattament għal kull kultura, hemm bżonn li tal-anqas jiġu trattati  $20 \times 10^6$  ċelloli. It-trattament ta' dan in-numru ta' ċelloli jipprovdi għal numru suffiċjenti ta' mutanti spontanji (10 jew aktar) anki għall-kolturi trattati f'konċentrazzjonijiet li jikkawżaw ċitotossicità ta' 90 % matul it-trattament (10 % RS). Barra minn hekk, numru suffiċjenti ta' ċelloli jridu jiġu kulturati matul il-perjodu ta' espressjoni u pjastrati għall-ghażla tal-mutanti (60).

## **Il-hin tal-espressjoni fenotipika u l-kejl taċ-ċitotossicità u tal-frekwenza tal-mutanti**

37. Fi tmiem il-perjodu tat-trattament, iċ-ċelloli jiġu kulturati għal hin definit biex tinkiseb espressjoni fenotipika kważi ottimali tal-mutanti indotti godda; speċifiku għal kull linja ta' ċelloli. Għall-MLA, il-perjodu tal-espressjoni fenotipika hu ta' jumejn (2). Għat-TK6, il-perjodu tal-espressjoni fenotipika hu ta' bejn tlieta u erbat ijiem. Jekk jintuża trattament ta' 24 siegħa, il-perjodu ta' espressjoni jibda wara li jintemm it-trattament.
38. Matul il-perjodu tal-espressjoni fenotipika, iċ-ċelloli jiġu enumerati fuq bazi ta' kuljum. Għall-MLA, l-ghadd ta' kuljum taċ-ċelloli jintuża biex jiġi kkalkolati t-tkabbir ta' kuljum tas-sospensjoni (SG). Wara l-perjodu ta' espressjoni ta' jumejn (2), iċ-ċelloli jiġu sospizi f'medium b'agent selettiv u mingħajr għad-determinazzjoni tan-numri ta' mutanti (pjastri tal-ghażla) u għall-effiċjenza tal-klonazzjoni (pjastri tal-vijabbiltà), rispettivament. Għall-MLA hemm żewġ metodi aċċettabbli ndaqs għall-klonazzjoni tal-ghażla tal-mutanti; wiehed juża l-agar artab u l-iehor juża medium likwidu fi pjastri b'96 bwejra (19) (38) (39). Il-klonazzjoni fit-TK6 issir bl-użu ta' media likwida u bi pjastra b'96 bwejra (16).
39. It-trifluworotimidina (TFT) hi l-uniku agent selettiv rakkomandat għall-mutanti tat-TK (61).

40. Għall-MLA, il-pjastri tal-agar u l-mikropjastri jingħaddu wara inkubazzjoni ta' 10-12-il jum. Għat-TK6, il-kolonji f'mikropjastri jingħataw punteġġ wara 10-14-il jum għall-mutanti li jidhru kmieni. Biex jiġu rkuprati l-mutanti tat-TK6 li jikbru bil-mod (li jidhru tard), hemm bżonn li ċ-ċelloli jiġu magħlufa mill-ġdid b'medium tat-tkabbir u b'TFT wara l-għadd tal-mutanti li jidhru kmieni u mbagħad il-pjastri jridu jiġu inkubati għal 7-10 ijiem addizzjonali (62). Ara l-paragrafi 42 u 44 għal diskussjoni dwar l-enumerazzjoni tal-mutanti tat-TK li jikbru bil-mod u normali.
41. Il-kalkoli xierqa għaž-żewġ testijiet inklużi ż-żewġ metodi (agar u mikropjastri) għall-MLA jinsabu fl-Appendiċi 2. Għall-metodu tal-agar tal-MLA, il-kolonji jingħaddu u n-numru ta' kolonji ta' mutanti jiġu aġġustati skont l-effiċjenza tal-klonazzjoni biex tiġi kkalkolata MF. Għall-verzjoni tal-mikropjastri tal-MLA u tat-TK6, l-effiċjenza tal-klonazzjoni kemm għall-għažla kif ukoll għall-pjastri tal-effiċjenza tal-klonazzjoni tiġi determinata skont id-distribuzzjoni ta' Poisson (63). L-MF tiġi kkalkolata minn dawn iż-żewġ effiċjenzi tal-klonazzjoni.

#### **Karatterizzazzjoni tal-Kolonji tal-Mutanti**

42. Għall-MLA, jekk is-sustanza kimika tat-test tkun pożittiva (ara l-paragrafi 62-63), il-karatterizzazzjoni tal-kolonja skont id-daqs tal-kolonja jew it-tkabbir għandha ssir fuq tal-anqas waħda mill-kolturi tat-test (generalment l-ogħla konċentrazzjoni pożittiva aċċettabbli) u fuq il-kontrolli negattivi u pożittivi. Jekk is-sustanza kimika tat-test tkun negattiva (ara l-paragrafu 64), il-karatterizzazzjoni tal-kolonji mutanti għandha ssir fuq il-kontrolli negattivi u pożittivi. Għall-metodu tal-mikropjastri tal-MLA, il-mutanti tal-kolonji żgħar huma definiti bħala dawk li jkopru anqas minn 25 % tad-dijametru tal-bwejra u mutanti tal-kolonji kbar huma dawk li jkopru aktar minn 25 % tad-dijametru tal-bwejra. Għall-metodu tal-agar, jintuża mezz awtomatiku li jgħodd il-kolonji biex jiġu enumerati l-kolonji tal-mutanti u jittiehed id-daqs tal-kolonji. L-approċċi għat-tehid tad-daqs tal-kolonji huma spjegati fid-dettall fid-dokumentazzjoni (19)(38)(40). Il-karatterizzazzjoni tal-kolonji fuq il-kontroll negattiv u dak pożittiv hi meħtieġa biex jintwera li l-istudji jitwettqu b'mod adegwat.
43. Is-sustanza kimika tat-test ma tistax tiġi determinata bħala negattiva jekk kemm il-mutanti tal-kolonji kbar kif ukoll dawk żgħar ma jkunux individwati b'mod adegwat fil-kontroll pożittiv. Il-karatterizzazzjoni tal-kolonji tista' tintuża biex tiġi pprovduta informazzjoni ġenerali dwar il-hila tas-sustanza kimika tat-test li tikkawża mutazzjonijiet puntwali u/jew avvenimenti kromozomiċi (il-paragrafu 4).
44. TK6: Mutanti li jikbru normali u dawk li jikbru bil-mod huma differenzjati minn differenza fil-hin ta' inkubazzjoni (ara l-paragrafu 40). Għat-TK6, generalment kemm il-mutanti li jidhru kmieni kif ukoll dawk li jidhru tard jingħataw punteġġ għall-kolturi kollha inklużi l-kontrolli negattivi u pożittivi. Il-karatterizzazzjoni tal-kolonji

tal-kontroll negattiv u ta' dak pozittiv hi meħtieġa biex jintwera li l-istudji jitwettqu b'mod adegwat. Is-sustanza kimika tat-test ma tistax tiġi determinata bħala negattiva jekk kemm il-mutanti li jidhru kmieni kif ukoll dawk li jidhru tard ma jkunux individwati b'mod adegwat fil-kontroll pozittiv. Il-karatterizzazzjoni tal-kolonji tista' tintuża biex tiġi pprovduta informazzjoni ġenerali dwar il-ħila tas-sustanza kimika tat-test li tikkawża mutazzjonijiet puntwali u/jew avvenimenti kromożomiċi (il-paragrafu 4).

### **Profiċjenza tal-laboratorju**

45. Biex tintwera biżżejjed esperjenza bit-test qabel ma jintuża għall-ittestjar ta' rutina, il-laboratorju għandu jkun għamel sensiela ta' esperimenti b'sustanzi pozittivi ta' referenza li jaġixxu permezz ta' mekkaniżmi differenti (tal-anqas waħda b'attivazzjoni metabolika u waħda mingħajr magħżula mis-sustanzi elenkati fit-Tabella 1) u diversi kontrolli negattivi (inkluzi kolturi mhux trattati u diversi solventi/veikoli). Dawn ir-risponsi tal-kontroll pozittiv u negattiv reazzjonijiet għandhom ikunu konsistenti mad-dokumentazzjoni. Dan ir-rekwiżit mhuwiex applikabbli għal laboratorji li jkollhom esperjenza, jiġifieri li jkollhom bazi ta' *data* storika disponibbli kif definita fil-paragrafi 47-50. Għall-MLA, il-valuri miksuba għall-kontrolli pozittivi kif ukoll għal dawk negattivi għandhom ikunu konsistenti mar-rakkomandazzjonijiet tal-IWGT (ara t-Tabella 2).
46. Għażla ta' sustanzi tal-kontroll pozittiv (ara t-Tabella 1 fil-paragrafu 25) għandha tiġi investigata bi trattamenti qosra u twal (jekk jintużaw trattamenti twal) fin-nuqqas ta' attivazzjoni metabolika, u anki bit-trattament qasir fil-preżenza ta' attivazzjoni metabolika, biex tintwera l-profiċjenza fl-iżvelar ta' sustanzi kimiċi mutageniċi, biex tiġi ddeterminata l-effikaċja tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika u biex tintwera l-adeqwatezza tal-kundizzjonijiet tat-tkabbir taċ-ċelloli matul it-trattament, l-espressjoni fenotipika u l-għażla tal-mutanti u tal-proċeduri tal-għoti ta' punteġġ. Għandha tingħażel medda ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanzi magħżulin biex jingħataw židiet riproduttivi u marbutin mal-konċentrazzjoni li jispikkaw biex jintwerew is-sensittività u l-medda dinamika tas-sistema tat-test.

### **Data storika tal-kontroll**

47. Il-laboratorju għandu jistabbilixxi:

- Medda u distribuzzjoni storiċi tal-kontroll pozittiv,
- Medda u distribuzzjoni storiċi tal-kontroll negattiv (mhux trattat, solvent).

48. Meta għall-ewwel tinkiseb id-*data* għal distribuzzjoni storika tal-kontroll negattiv, il-kontrolli negattivi konkorrenti għandhom ikunu konsistenti mad-*data* tal-kontroll negattiv ippubblikata. Peress li tiżdied aktar *data* sperimentali mad-distribuzzjoni tal-kontroll, idealment il-kontrolli negattivi konkorrenti għandhom ikunu fi hdan il-limiti ta' kontroll ta' 95 % ta' dik id-distribuzzjoni (64)(65).
49. Il-bażi ta' *data* storika tal-kontrolli negattivi tal-laboratorju għall-ewwel għandha tinbena b'minimu ta' 10 esperimenti iżda idealment tkun tikkonsisti f'tal-anqas 20 esperiment imwettqin f'kundizzjonijiet sperimentali paragonabbli. Il-laboratorji għandhom jużaw metodi ta' kontroll tal-kwalità, bħal karti tal-kontroll (eż. C-charts jew X-bar charts (65), biex jidentifikaw kemm hija varjabbli d-*data* tal-kontroll pożittiv u negattiv tagħhom, u biex juru li l-metodologija hi "taħt kontroll" fil-laboratorju tagħhom (66). Aktar dettalji u rakkomandazzjonijiet dwar kif tibni u tuża d-*data* storika jistgħu jinkisbu mid-dokumentazzjoni (64).
50. Id-*data* ta' kontroll negattiv għandha tikkonsisti fi frekwenzi mutanti minn kulturi individwali jew idealment repliki kif deskritt fil-paragrafu 27. Idealment, il-kontrolli negattivi konkorrenti għandhom ikunu fi hdan il-limiti ta' kontroll ta' 95 % tad-distribuzzjoni tal-bażi ta' *data* storika tal-kontroll negattiv tal-laboratorju. Meta d-*data* tal-kontroll negattiv toħroġ mil-limitu ta' kontroll ta' 95 %, din tista' titqies aċċettabbli li tiddaħhal fid-distribuzzjoni storika tal-kontroll dment li din id-*data* ma tkunx eċċezzjoni estrema, ikun hemm evidenza li s-sistema tat-test tkun "taħt kontroll" (ara l-paragrafu 49) u jkun hemm evidenza ta' ebda żball tekniku jew uman.
51. Kwalunkwe bidla fil-protokoll tal-esperimenti għandha tiġi kkunsidrata fid-dawl tal-konsistenza tad-*data* mal-bażijiet ta' *data* tal-kontroll storiċi eżistenti tal-laboratorju. Kwalunkwe inkonsistenza kbira għandha tirriżulta fl-istabbiliment ta' bażi ta' *data* storika ġdida tal-kontroll.

## **DATA U RAPPORTAR**

### **Preżentazzjoni tar-riżultati**

52. Il-preżentazzjoni tad-*data* għall-MLA kif ukoll għat-TK6 għandha tinkludi, għall-kulturi trattati kif ukoll għal dawk tal-kontroll, id-*data* meħtieġa għall-kalkolu taċ-ċitotossicità (RTG jew RS, rispettivament) u tal-frekwenzi mutanti, kif deskritti hawn taħt.
53. Għall-MLA, id-*data* tal-kulturi individwali għandha tiġi pprovduta għall-RSG, għall-RTG, għall-effiċjenza tal-klonazzjoni fil-mument tal-għażla tal-mutanti u għan-numru ta' kolonji ta' mutanti (għall-verżjoni tal-agar) jew għan-numru ta' bwejriet vojta

(għall-verżjoni tal-mikropjastri). L-MF għandha tiġi espressa bħala numru ta' ċelloli mutanti għal kull miljun ċellola li tibqa' ħajja. Jekk ir-rispons ikun pożittiv, l-MFs ta' kolonji żgħar u kbar (u/jew il-perċentwal tal-MF totali) għandhom jingħataw għal tal-anqas konċentrazzjoni waħda tas-sustanza kimika tat-test (ġeneralment l-ogħla konċentrazzjoni pożittiva) u għall-kontrolli negattivi u pożittivi. Fil-każ ta' rispons negattiv, l-MF tal-kolonji żgħar u kbar għandha tingħata għall-kontroll negattiv u għall-kontroll pożittiv.

54. Għat-TK6, id-*data* dwar il-kolturi individwali għandha tiġi pprovduta għall-RS, għall-effiċjenza tal-klonazzjoni fil-mument tal-għażla tal-mutanti u għan-numru ta' bwejriet vojta għall-mutanti li jidhru kmieni u dawk li jidhru tard. L-MF għandha tiġi espressa bħala numru ta' ċelloli mutanti għal kull numru ta' ċelloli li jibqgħu ħajjin, u għandha tinkludi l-MF totali kif ukoll l-MF (u/jew il-perċentwal tal-MF totali) tal-mutanti li jidhru kmieni u tard.

#### **Kriterji ta' Aċċettabbiltà**

55. Kemm għall-MLA kif ukoll għat-TK6, għandhom jiġu ssodisfati l-kriterji li ġejjin qabel ma jiġu determinati r-riżultati ġenerali għal sustanza kimika tat-test speċifika:

- Saru żewġ kundizzjonijiet sperimentali (trattament qasir b'attivazzjoni metabolika u mingħajr - ara l-paragrafu 33) sakemm waħda ma rriżultatx f'riżultati pożittivi.
- Għandu jkun analizzabbli numru adegwat ta' ċelloli u ta' dożi (ara l-paragrafi 27, 34-36).
- Il-kriterji għall-għażla tal-ogħla konċentrazzjoni huma konsistenti ma' dawk deskritti fil-paragrafi 28-30.

#### *Il-kriterji ta' aċċettabbiltà għall-kontrolli negattivi u pożittivi*

56. L-analiżi mill-Grupp ta' Hidma ta' Esperti tal-MLA tal-IWGT ta' ammont estensiv ta' *data* dwar l-MLA sarrfet f'kunsens internazzjonali għal kriterji ta' aċċettabbiltà speċifiċi għall-MLA (1)(2)(3)(4)(5). Għaldaqstant, dan il-metodu ta' ttestjar jipprovdi rakkomandazzjonijiet speċifiċi għad-determinazzjoni tal-aċċettabbiltà tal-kontrolli negattivi u pożittivi u għall-evalwazzjoni tar-riżultati ta' sustanzi individwali fl-MLA. It-TK6 għandha bażi ta' *data* ferm iżgħar u ma saritilhiex evalwazzjoni minn grupp ta' hidma.

57. Għall-MLA, kull esperiment għandu jiġi evalwat dwar jekk il-kontroll mhux trattat/b'solvent jissodisfax il-kriterji ta' aċċetazzjoni tal-Grupp ta' Hidma dwar l-MLA tal-IWGT ((4) u t-Tabella 2, hawn taht): (1) għall-MF (kun af li l-MFs aċċettabbli tal-IWGT huma differenti għall-verżjonijiet tal-agar u tal-mikropjastri tal-

MLA), (2) għall-effiċjenza tal-klonazzjoni (CE) fil-hin tal-għażla tal-mutanti u (3) għall-iżvilupp f'sospensjoni (SG) għall-kontroll b'solvent (ara l-Appendiċi 2 għall-formuli).

**Tabella 2:** Il-kriterji ta' aċċettabbiltà għall-MLA

| Parametru                         | Metodu tal-Agar Artab                                                                            | Metodu tal-Mikropjastri                                                                          |
|-----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Frekwenza Mutanti</b>          | 35 – 140 x 10 <sup>-6</sup>                                                                      | 50 – 170 x10 <sup>-6</sup>                                                                       |
| <b>Effiċjenza tal-Klonazzjoni</b> | 65 - 120 %                                                                                       | 65 - 120 %                                                                                       |
| <b>Żvilupp f'Sospensjoni</b>      | 8 – 32 darba (trattament ta' 3-4 sigħat)<br>32 – 180 darba (trattament ta' 24 sigħat, jekk isir) | 8 – 32 darba (trattament ta' 3-4 sigħat)<br>32 – 180 darba (trattament ta' 24 sigħat, jekk isir) |

58. Għall-MLA, kull test għandu jkun evalwat ukoll dwar jekk il-kontroll(i) pożittiv(i) jissodisfax/jissodisfawx tal-anqas wiehed miż-żewġ kriterji ta' aċċettazzjoni li ġejjin żviluppati mill-grupp ta' hidma tal-IWGT:

- Il-kontroll pożittiv għandu juru zieda assoluta fl-MF totali, jiġifieri zieda ta' aktar mill-MF ta' sfond spontanja [MF indotta (IMF)] ta' tal-anqas 300 x 10<sup>-6</sup>. Tal-anqas 40 % tal-IMF għandha tkun riflessa fl-MF tal-kolonja ż-żgħira.
- Il-kontroll pożittiv għandu zieda fl-MF tal-kolonja ż-żgħira ta' tal-anqas 150 x 10<sup>-6</sup> oġġla minn dik li dehret fil-kontroll mhux trattat/b'solvent konkorrenti (IMF ta' kolonja żgħira ta' 150 x 10<sup>-6</sup>).

59. Għat-TK6, test ikun aċċettabbli jekk il-kontroll negattiv konkorrenti jitqies aċċettabbli għaż-żieda fil-baži ta' *data* storika tal-kontroll negattiv tal-laboratorju kif deskritt fil-paragrafi 48-49. Barra minn hekk, il-kontrolli negattivi konkorrenti (ara l-paragrafu 32) għandhom jinduċu risponsi li huma kompatibbli ma' daww iġġenerati fil-baži ta' *data* storika tal-kontroll pożittiv u jipproduċu zieda statistikament sinifikanti meta mqabblin mal-kontroll negattiv konkorrenti.

60. Għaż-żewġ testijiet, il-limitu superjuri taċ-ċitotossicità osservat fil-koltura tal-kontroll pożittiv għandu jkun l-istess bħal dak tal-kolturi sperimentali. Jiġifieri, l-RTG/RS ma għandhiex tkun anqas minn 10 %. Biżżejjed li tintuża konċentrazzjoni waħda (jew waħda mill-konċentrazzjonijiet tal-kolturi tal-kontroll pożittiv jekk tintuża aktar minn konċentrazzjoni waħda) biex jintwera li ġew issodisfati l-kriterji ta' aċċettazzjoni għall-kontroll pożittiv. Barra dan, l-MF tal-kontroll pożittiv trid tkun fi hdan il-medda aċċettabbli stabbilita għal-laboratorju.

## Evalwazzjoni u interpretazzjoni tar-riżultati

61. Għall-MLA, il-Grupp ta' Hidma Espert tal-IWGT dwar il-Linfoma fil-Ġrieden (4) għamel hidma importanti dwar ir-rilevanza bijoloġika u l-kriterji għal rispons pożittiv. Għaldaqstant, dan il-metodu ta' ttestjar jipprovdi rakkomandazzjonijiet speċifiċi għall-interpretazzjoni tar-riżultati tas-sustanzi kimiċi tat-test mill-MLA (ara l-paragrafi 62-64). It-TK6 għandha bażi ta' *data* ferm iżgħar u ma saritilhiex evalwazzjoni minn grupp ta' hidma. Għaldaqstant, ir-rakkomandazzjonijiet għall-interpretazzjoni tad-*data* għat-TK6 huma mogħtija f'termini aktar ġenerali (ara l-paragrafi 65-66). Rakkomandazzjonijiet addizzjonali japplikaw għaž-żewġ testijiet (ara l-paragrafi 67-71).

### MLA

62. Approċċ għad-definizzjoni tar-risponsi pożittiv u negattiv hu rakkomandat biex jiġi żgurat li l-MF miżjuda hi bijoloġikament rilevanti. Minflok l-analizi statistika ġeneralment użata għal testijiet oħra, dan jibbaża fuq l-użu ta' frekwenza mutanti indotta predefinita (jiġifieri zieda fl-MF oghla mill-kontroll konkorrenti), imsejha l-Fattur ta' Evalwazzjoni Globali (GEF), li hu bbażat fuq l-analizi tad-distribuzzjoni tad-*data* dwar l-MF tal-kontroll negattiv mil-laboratorji parteċipanti (4). Għall-verżjoni tal-agar tal-MLA, il-GEF hu ta'  $90 \times 10^{-6}$  u għall-verżjoni tal-mikropjastri tal-MLA, il-GEF hu ta'  $126 \times 10^{-6}$ .
63. Dment li ma jiġux issodisfati l-kriterji ta' aċċettabbiltà kollha, sustanza kimika tat-test titqies li tkun pożittiva biċ-ċar jekk, f'xi waħda mill-kundizzjonijiet sperimentali eżaminati (ara l-paragrafu 33), iż-żieda fl-MF oghla mill-isfond konkorrenti taqbeż il-GEF u ż-żied tkun relatata mal-konċentrazzjoni (eż. bl-użu ta' test tat-tendenzi). Imbagħad, is-sustanza kimika tat-test tiġi kkunsidrata li kapaċi tinduċi mutazzjoni f'din is-sistema tat-test.
64. Dment li ma jiġux issodisfati l-kriterji ta' aċċettabbiltà kollha, sustanza kimika tat-test titqies li tkun negattiva ċara jekk, fil-kundizzjonijiet sperimentali eżaminati kollha (ara l-paragrafu 33), ma jkun hemm ebda rispons relatat mal-konċentrazzjoni jew, jekk ikun hemm zieda fl-MF, din ma taqbiżx il-GEF. Imbagħad, is-sustanza kimika tat-test tiġi kkunsidrata li mhijiex kapaċi tinduċi mutazzjonijiet f'din is-sistema tat-test.

### TK6

65. Dment li ma jiġux issodisfati l-kriterji ta' aċċettabbiltà kollha, sustanza kimika tat-test titqies li hi pożittiva ċara jekk, fi kwalunkwe waħda mill-kundizzjonijiet sperimentali analizzati (ara l-paragrafu 33):

- tal-anqas waħda mill-konċentrazzjonijiet tat-test turi żieda statistikament sinifikanti meta mqabbla mal-kontroll negattiv konkorrenti
- iż-żieda hi relatata mal-konċentrazzjoni meta tiġi evalwata b'test xieraq tat-tendenzi (ara l-paragrafu 33)
- kwalunkwe wieħed mir-riżultati jaqa' barra mid-distribuzzjoni tad-*data* storika tal-kontroll negattiv (eż. limitu tal-kontroll ta' 95 % fuq il-bażi ta' Poisson; ara l-paragrafu 48).

Meta jiġu ssodisfati dawn il-kriterji kollha, is-sustanza kimika tat-test imbagħad tiġi kkunsidrata kapaċi tinduċi mutazzjoni f'din is-sistema tat-test. Ir-rakkomandazzjonijiet għall-aktar metodi statistiċi xierqa jistgħu jinkisbu mid-dokumentazzjoni (66)(67).

66. Dment li ma jiġux issodisfati l-kriterji ta' aċċettabbiltà kollha, sustanza kimika tat-test titqies li hi negattiva ċara jekk, fil-kundizzjonijiet sperimentali eżaminati kollha (ara l-paragrafu 33):

- l-ebda waħda mill-konċentrazzjonijiet tat-test ma turi żieda statistikament sinifikanti meta mqabbla mal-kontroll negattiv konkorrenti,
- ma hemm l-ebda żieda marbuta mal-konċentrazzjoni meta tiġi evalwata b'test xieraq tat-tendenzi
- ir-riżultati kollha jaqgħu fid-distribuzzjoni tad-*data* storika tal-kontroll negattiv (eż. limitu tal-kontroll ta' 95 % fuq il-bażi ta' Poisson; ara l-paragrafu 48).

Imbagħad, is-sustanza kimika tat-test tiġi kkunsidrata li mhijiex kapaċi tinduċi mutazzjonijiet f'din is-sistema tat-test.

*Għall-MLA kif ukoll għat-TK6:*

67. Jekk il-konċentrazzjoni massima tkun ibbażata fuq iċ-ċitotossicità, l-ogħla konċentrazzjoni għandu jkollha l-għan li tilhaq RTG/RS ta' bejn 20 u 10 %. Il-kunsens hu li għandha tingħata attenzjoni meta jiġu interpretati riżultati pożittivi li jinstabu biss f'RTG/RS ta' bejn 20 u 10 % u riżultat ma jitqiesx pożittiv jekk iż-żieda fl-MF tkun seħħet biss f'RTG/RS ta' 10 % jew anqas (jekk evalwati) (2) (59).
68. Hemm xi ċirkustanzi li fihom informazzjoni addizzjonali tista' tassisti fid-determinazzjoni li sustanza kimika tat-test ma tkunx mutagenika meta ma jkun hemm ebda kultura li turi valur tal-RTG ta' bejn 10-20 % RTG/RS. Dawn is-sitwazzjonijiet huma spjegati kif ġej: (1) Ma jkun hemm ebda evidenza ta' mutageniċità (eż. ebda rispons għad-doża, ebda frekwenza mutanti oghla minn dawk li deħru fil-meded tal-kontroll negattiv konkorrenti jew tal-isfond storiku, eċċ.) f'sensiela ta' punti ta' *data*



fi hdan RTG/RS ta' 100 % sa 20 % u jkun hemm tal-anqas punt ta' *data* wiehed bejn RTG/RS ta' 20 u 25 %. (2) Ma jkun hemm ebda evidenza ta' mutagenicità (eż. ebda rispons għad-doża, ebda frekwenza mutanti oghla minn dawk li dehru fil-meded tal-kontroll negattiv konkorrenti jew tal-isfond storiku, eċċ.) f'sensiela ta' punti ta' *data* bejn RTG/RS ta' 100 % sa 25 % u jkun hemm ukoll punt ta' *data* negattiv ftit anqas minn RTG/RS ta' 10 %. F'dawn iż-żewġ sitwazzjonijiet, ikun jista' jiġi konkluż li s-sustanza kimika tat-test hi negattiva.

69. Ma hemm l-ebda hteġa għall-verifika ta' rispons positiv jew negattiv ċar.

70. F'każijiet li fihom ir-rispons la jkun negattiv ċar u lanqas pożittiv ċar kif spjegat hawn fuq u/jew biex tgħin fl-istabbiliment tar-rilevanza bijoloġika ta' riżultat, id-*data* għandha tiġi evalwata b'gudizzju espert u/jew b'investigazzjonijiet ulterjuri. It-twettiq ta' esperiment ripetut possibilmint bl-użu tal-kundizzjonijiet sperimentali [eż. spazjar tal-koncentrazzjonijiet biex tiżdied il-probabbiltà ta' kisba ta' punti ta' *data* fi hdan il-medda ta' RTG/RS ta' 10-20 %, l-użu ta' kundizzjonijiet oħra tal-attivazzjoni metabolika (jiġifieri l-koncentrazzjoni tal-S9 jew l-origini tal-S9) u d-durata tat-trattament] jista' jkun utli.

71. F'każijiet rari, anki wara investigazzjonijiet ulterjuri, is-sett ta' *data* jipprekludi milli tinhareġ konklużjoni ta' riżultati pożittivi jew negattivi. Għaldaqstant, ir-rispons tas-sustanza kimika tat-test għandu jiġi konkluż bħala ekwivoku (interpretat bħala bl-istess probabbiltà li jkun pożittiv jew negattiv).

## RAPPORT TAT-TEST

72. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

### *Sustanza kimika tat-test:*

- is-sors, in-numru tal-lott, id-data ta' limitu għall-użu, jekk disponibbli;
- l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test stess, jekk magħrufa;
- is-solubbiltà u l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test fis-solvent, jekk magħrufin;
- il-kejl tal-pH, tal-ożmolalità u tal-preċipitat fil-medium tat-tkabbir li miegħu żdiedet is-sustanza kimika tat-test, kif xieraq.

### *Sustanza monokostitwenti:*

- id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma, u l-proprietajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali;

- l-identifikazzjoni kimika, bhall-isem IUPAC jew CAS, in-numru CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.

Sustanza multikostitwenti, UVCBs u taħlitiet:

- ikkaratterizzati sa fejn possibbli mill-identità kimika (ara aktar 'il fuq), l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti.

*Solvent:*

- ġustifikazzjoni għall-ghażla tas-solvent;
- il-perċentwal ta' solvent fil-medium tat-tkabbir finali.

*Ċelloli:*

Għal kulturi prinċipali tal-Laboratorju:

- it-tip u s-sors taċ-ċelloli, u l-istorja fil-laboratorju tal-ittejtjar;
- il-karatteristiċi tal-karjotip u/jew in-numru modali tal-kromożomi;
- il-metodi għaż-żamma tal-kulturi taċ-ċelloli;
- l-assenza tal-mikoplażma;
- il-hinijiet għall-irdoppjar taċ-ċelloli.

*Il-kundizzjonijiet tat-test:*

- il-hsieb wara l-ghażla tal-konċentrazzjonijiet u n-numru ta' kulturi taċ-ċelloli; inklużi, eż., *data* dwar iċ-ċitotossicità u limitazzjonijiet għas-solubbiltà;
- il-kompożizzjoni tal-media, il-konċentrazzjoni ta' CO<sub>2</sub>, il-livell ta' umdità;
- il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test espressa bħala konċentrazzjoni finali fil-medium tat-tkabbir (eż. µg jew mg/ml jew mM tal-medium tat-tkabbir);
- il-konċentrazzjoni (u/jew il-volum) ta' solvent u s-sustanza kimika tat-test miżjuda fil-medium tat-tkabbir;
- it-temperatura ta' inkubazzjoni;

- il-*hin* ta' inkubazzjoni;
- id-durata tat-trattament;
- id-densità tač-čellula waqt it-trattament;
- it-tip u l-kompożizzjoni tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika (is-sors ta' S9, il-metodu ta' preparazzjoni tat-taħlita ta' S9, il-koncentrazzjoni jew il-volum ta' taħlita ta' S9 u l-S9 fil-medium tat-tkabbir finali, il-kontrolli tal-kwalità tal-S9);
- is-sustanzi tal-kontroll pożittiv u negattiv, il-koncentrazzjonijiet finali għal kull kundizzjoni tat-trattament;
- it-tul tal-perjodu ta' espressjoni (inkluż in-numru ta' čelluli miżrugħa, u skedi ta' subkolturi u ta' tagħlif, jekk ikun xieraq);
- l-identità tal-aġent selettiv u l-koncentrazzjoni tiegħu;
- għall-MLA, il-verżjoni użata (tal-agar jew tal-mikropjastri) għandha tkun indikata
- il-kriterji għall-aččettabbiltà tat-testijiet;
- il-metodi użati biex jingħadd in-numru ta' čellooli vijabbli u mutanti;
- il-metodi użati għall-kejl tač-čitotossicità;
- kwalunkwe informazzjoni supplimentari rilevanti għač-čitotossicità u l-metodu użat;
- id-durata tal-*hin*ijiet ta' inkubazzjoni wara l-pjastrament;
- definizzjoni ta' kolonji li dwarhom jitqiesu l-qies u t-tip (inklużi kriterji għal kolonji “żgħar” u “kbar”, kif xieraq);
- il-kriterji biex l-istudji jitqiesu bħala pożittivi, negattivi jew ekwivoči;
- il-metodi użati biex jiġu stabbiliti l-pH, l-ożmolalità, jekk issir, u l-prečipitazzjoni, jekk rilevanti.

*Ir-riżultati:*

- in-numru ta' čellooli ttrattati u n-numru ta' čellooli subkolturati għal kull kultura;
- il-parametri tat-tossicità (RTG għall-MLA u RS għat-TK6);
- is-sinjali ta' prečipitazzjoni u l-*hin* tad-determinazzjoni;

- in-numru ta' ċelloli pjastrati f'medium selettiv u mhux selettiv;
- in-numru ta' kolonji f'medium mhux selettiv u n-numru ta' kolonji rezistenti f'medium selettiv, u l-frekwenzi mutanti relatati;
- is-sejbien tal-qies tal-kolonja għall-kontrolli negattivi u pożittivi u jekk is-sustanza kimika tat-test tkun pożittiva, tal-anqas konċentrazzjoni waħda, u l-frekwenzi mutanti relatati;
- ir-relazzjoni konċentrazzjoni rispons, fejn possibbli,
- id-*data* tal-kontroll negattiv (solvent) u pożittiv (konċentrazzjonijiet u solventi) konkorrenti;
- id-*data* tal-kontroll negattiv storiku (solvent) u pożittiv (konċentrazzjonijiet u solventi) bil-meded, bil-medji u bid-devjazzjonijiet standard; in-numru ta' testijiet li fuqhom huma bbażati l-kontrolli storiċi;
- analiżijiet statistiċi (għal kulturi individwali u għal repliki raggruppati jekk xieraq), u l-valuri p jekk ikun hemm; u għall-MLA, l-evalwazzjoni tal-GEF.

#### *Diskussjoni tar-riżultati*

#### *Konklużjoni*

## DOKUMENTAZZJONI

- (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. u 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. u 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. u 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. u 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. u 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. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Parigi.
- (7) Fellows M.D., Luker, T., Cooper, A. u 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. u 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. u 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., u 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. u Clive, D. (1981). Cytogenetic Analysis of the L5178Y/TK<sup>+/-</sup> Leads to TK<sup>-/-</sup> Mouse Lymphoma Mutagenesis Assay System, *Mutation Res.*, 84 (1): 169-181.
- (12) Hozier, J., Sawyer, J., Clive, D. u Moore, M.M. (1985). Chromosome 11 Aberrations in Small Colony L5178Y TK<sup>-/-</sup> 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. u Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFTr) Mutants of L5178Y/TK<sup>+/-</sup> Mouse Lymphoma Cells. *Mutation Res.*, 151 (1): 161-174.
- (14) Liber H.L., Call K.M. u 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. u 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. u 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. u Hayashi, M. (2000). Requirement of Wild-Type P53 Protein for Maintenance of Chromosomal Integrity. *Mol. Carcinogen.*, 28 (4): 203-14.
- (18) Amundson S.A. u 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. u Gollapudi B.B. (2013). *In Vitro* Mouse Lymphoma (L5178Y TK<sup>+/+</sup>-3.7.2C) Forward Mutation Assay. In *Protocols in Genotoxicity Assessment* A. Dhawan u M. Bajpayee (Eds.), Springer Protocols, Humana Press: 27-50.
- (20) Long, L.H., Kirkland, D., Whitwell, J. u 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) Nessler, F., Simar-Meintieres, S., Watzinger, M., Talahari, I. u 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. u 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. u 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. u 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. u Brown, M.M.M. (1979). Validation and Characterization of the L5178Y/TK<sup>±</sup> - Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. *Mutation Res.*, 59(1): 61-108.
- (28) Sawyer, J., Moore, M.M., Clive, D. u Hozier, J. (1985). Cytogenetic Characterization of the L5178Y TK<sup>±</sup> 3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, *Mutation Res.*, 147 (5): 243-253.
- (29) Sawyer J.R., Moore M.M. u Hozier J.C. (1989). High-Resolution Cytogenetic Characterization of the L5178Y TK<sup>±</sup> Mouse Lymphoma Cell Line, *Mutation Res.*, 214 (2): 181-193.
- (30) Sawyer, J.R., Binz, R.L., Wang, J. u Moore, M.M. (2006). Multicolor Spectral Karyotyping of the L5178Y TK<sup>±</sup>-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. u Aardema, M.J. (2014). The Spectral Karyotype of L5178Y TK<sup>±</sup> 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. u DeLuca, J.G. (1997). The Mouse Lymphoma L5178Y TK<sup>±</sup> 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. u 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. u 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. u 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. (Il-manuskritt għadu qed jithejja).
- (38) Lloyd M. u 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. u Moore M.M. (2014). Methods for Using the Mouse Lymphoma Assay to Screen for Chemical Mutagenicity and Photo-Mutagenicity. Fi: Optimization in Drug Discover: *In Vitro* Methods: Yan Z u Caldwell(Eds) , 2nd Edition, GW; Humana Press, Totowa, NJ.
- (40) Liber H.L. u 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. u 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. u 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. u 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. u Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 113 (3-4): 173-215.

- (45) Natarajan, A.T., Tate, A.D., Van Buul, P.P.W., Meijers, M. u 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. u 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. u 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. u Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. Fi: *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. u 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). Il-Konvenzjoni ta' Stokkolma dwar Materjal Organiku Persistenti li Jnigges, Programm tan-Nazzjonijiet Uniti għall-Ambjent (UNEP).
- (53) Krahm D.F., Barsky F.C. u McCooey K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. Fi: *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. u 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. u 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. *Fi: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (Ed.), Cambridge University Press, pp. 66-101.
- (57) Morita T., Honma M. u 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. u 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. Disponibbli fuq: [<https://www.federalregister.gov/a/2012-13774>].
- (60) Honma M. u 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. u Johnson, K.O. (1981). The Utilization of Trifluorothymidine (TFT) to Select for Thymidine Kinase-Deficient (TK<sup>-/-</sup>) Mutants from L5178Y/TK<sup>+/-</sup> Mouse Lymphoma Cells, *Mutation Res.*, 85 (5): 363-378.
- (62) Liber H.L., Yandell D.W. u 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. u 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. u 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.)*, Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.
- (67) Fleiss J.L., Levin B. u Paik M.C. (2003). *Statistical Methods for Rates and Proportions*, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

## **Appendiċi 1**

### **DEFINIZZJONIJIET**

Anewġenu: Kwalunkwe sustanza kimika jew proċess li, meta jinteraġġixxu mal-komponenti taċ-ċiklu tad-diviżjoni taċ-ċellola mitotika u mejotika, iwasslu għal aneuploidja f'ċelloli jew f'organizmi.

Aneuploidja: Kwalunkwe devjazzjoni mill-għadd ta' diploidji (jew aploidji) normali ta' kromożomi minn kromożomu wieħed jew aktar, iżda mhux mis-sett(ijiet) kollu/kollha ta' kromożomi (poliploidja).

Mutaġeni li jissostitwixxu l-koppji tal-bażijiet: Sustanzi kimiċi li jikkawżaw sostituzzjoni tal-koppji tal-bażijiet fid-DNA.

Sustanza kimika: Sustanza jew tahlita.

Effiċjenza tal-klonazzjoni: Il-perċentwal ta' ċelloli pjastrati f'densità baxxa li kapaci jikbru f'kolonja li tista' tingħadd.

Klastoġenu: Kwalunkwe sustanza kimika jew proċess li jikkawżaw aberrazzjonijiet kromożomiċi f'popolazzjonijiet ta' ċelloli jew ta' organizmi.

Ċitotossiċità: Għall-assaġġi koperti f'dan il-metodu ta' ttestjar, iċ-ċitotossiċità hi identifikata bħala tnaqqis fit-tkabbir totali relattiv (RTG) jew fis-sopravivenza relattiva (RS) għall-MLA u għat-TK6, rispettivament.

Mutazzjoni 'l quddiem: Mutazzjoni ta' gene mit-tip parentali għall-forma mutanti li tkun tohloq alterazzjoni jew telf tal-attività enzimatika jew tal-funzjoni tal-proteina kodifikata.

Mutaġeni li jibdlu l-qari tal-kodiċi ġenetiku: Sustanzi li jikkawżaw iż-żieda jew it-tħassir ta' koppji tal-bażijiet individwali jew multipli fil-molekula tad-DNA.

Ġenotossiċi: Terminu ġenerali li jinkludi kull tip ta' ħsara fid-DNA jew kromożomika, inkluż ksur tad-DNA, addotti, riarranġamenti, mutazzjonijiet, aberrazzjonijiet

kromożomiċi, u aneuploidija. Mhux it-tipi kollha ta' effetti ġenotossiċi jirriżultaw f' mutazzjonijiet jew fi ħsara kromożomika stabbli.

Rikombinament mitotiku: Matul il-mitożi, ir-rikombinament bejn kromatidi omologi li possibilmint jirriżulta fl-induzzjoni ta' ksur tal-ħajta doppja tad-DNA jew f'telf ta' eterożigożità.

Mutaġeniċi: Jipproduċu tibdil ereditarju ta' sekwenza/i tal-koppja ta' bażijiet tad-DNA f' ġeni jew tal-istruttura tal-kromożomi (aberrazzjonijiet kromożomiċi).

Frekwenza mutanti (MF): L-ġhadd ta' ċelloli mutanti osservati diviż bl-ġhadd ta' ċelloli vijabbli.

Ħin tal-espressjoni fenotipika: Il-ħin wara t-trattament li matulu l-alterazzjoni ġenetika tkun fissa fi ħdan il-ġenom u kwalunkwe prodott tal-ġeni preeżistenti jitbattal sal-punt li l-karatteristika fenotipika tinbidel.

Sopravivenza relattiva (RS): RS tintuża bħala l-kejl taċ-ċitotossicità relatata mat-trattament fit-TK6. Din hi l-effiċjenza tal-klonazzjoni (CE) relattiva taċ-ċelloli pjastrati eżatt wara t-trattament taċ-ċelloli aġġustata skont kwalunkwe telf ta' ċelloli matul it-trattament meta mqabbla mal-effiċjenza tal-klonazzjoni tal-kontroll negattiv.

Żvilupp relattiv f'sospensjoni (RSG): Għall-MLA, l-iżvilupp relattiv f'sospensjoni totali fuq jumejn tal-koltura tat-test meta mqabbel mal-iżvilupp f'sospensjoni totali fuq jumejn tal-kontroll negattiv/b'solvent (Clive u Spector, 1975). L-RSG għandu jinkludi l-iżvilupp relattiv tal-koltura tat-test meat mqabbla mal-kontroll negattiv/b'solvent matul il-perjodu tat-trattament.

Żvilupp totali relattiv (RTG): L-RTG jintuża bħala l-kejl taċ-ċitotossicità relatata mat-trattament fl-MLA. Hu kejl tal-iżvilupp relattiv (għall-kontroll tal-veikolu) tal-kolturi tat-test matul il-fażijiet tat-trattament, tal-espressjoni fuq jumejn u tal-klonazzjoni tal-għażla tal-mutanti tat-test. L-RSG ta' kull koltura tat-test jiġi multiplikat bl-effiċjenza tal-klonazzjoni relattiva tal-koltura tat-test fil-ħin tal-għażla tal-mutanti u hu espress relattiv għall-effiċjenza tal-klonazzjoni tal-kontroll negattiv/b'solvent (Clive u Spector, 1975).

Frazzjoni tal-fwied S9: Supernatant ta' omogenat tal-fwied wara ċentrifugazzjoni ta' 9000g, jiġifieri estratt minn fwied mhux proċessat

Tahlita ta' S9: Tahlita tal-frazzjoni S9 tal-fwied u tal-kofatturi neċessarji għall-attività tal-enzimi metabolici.

Żvilupp f'sospensjoni (SG): Iż-żieda tad-drabi fin-numru ta' ċelloli matul il-fażijiet tat-trattament u tal-espressjoni tal-MLA. L-SG hu kkalkolat bil-multiplikazzjoni taż-

żieda tad-drabi fil-jum 1 biż-żieda tad-drabi fil-jum 2 għat-trattament qasir (tlieta jew erba' sigħat). Jekk jintuża trattament fuq 24 siegħa, l-SG ikun iż-żieda tad-drabi matul it-trattament fuq 24 siegħa multiplikata biż-żidiet tad-drabi fil-jum 1 u 2 tal-espressjoni.

Kontroll b'solvent: Terminu ġenerali li jiddefinixxi l-kolturi tal-kontroll li jirċievu s-solvent waħdu użat biex jiddisolvi s-sustanza kimika tat-test.

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew tahlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

Kontrolli mhux trattati: Kontrolli mhux trattati huma kolturi li ma jirċievu ebda trattament (jiġifieri la sustanza kimika tat-test u lanqas solvent) iżda jiġu proċessati bl-istess mod bħall-kolturi li jirċievu s-sustanza kimika tat-test.

## Appendiċi 2

### FORMULI

#### Ċitotossicità

*Għaż-żewġ verżjonijiet (tal-agar u tal-mikropjastri) tal-MLA*

Iċ-ċitotossicità hi definita bħala l-Iżvilupp Totali Relattiv (RTG) li jinkludi l-Iżvilupp Relattiv f'Sospensjoni (RSG) matul il-perjodu ta' espressjoni ta' jumejn u l-Effiċjenza Relattiva tal-Klonazzjoni (RCE) miksuba fil-ħin tal-għażla tal-mutanti. RTG, RSG u RCE lkoll huma espressi bħala perċentwal.

**Kalkolu tal-RSG:** L-Iżvilupp f'Sospensjoni wiehed ( $SG_1$ ) hu r-rata ta' żvilupp bejn il-jum 0 u l-jum 1 (konċentrazzjoni taċ-ċelloli fil-jum 1 / konċentrazzjoni taċ-ċelloli fil-jum 0) u l-Iżvilupp f'Sospensjoni tnejn ( $SG_2$ ) hu r-rata ta' żvilupp bejn il-jum 1 u l-jum 2 (konċentrazzjoni taċ-ċelloli fil-jum 2 / konċentrazzjoni taċ-ċelloli fil-jum 1). L-RSG hu l-SG totali ( $SG_1 \times SG_2$ ) għall-koltura trattata meta mqabbla mal-kontroll mhux trattat/b'solvent. Jiġifieri:  $RSG = [SG_{1(test)} \times SG_{2(test)}] / [SG_{1(control)} \times SG_{2(control)}]$  L- $SG_1$  għandu jiġi kkalkolat mill-konċentrazzjoni taċ-ċelloli inizjali użata fil-bidu tat-trattament taċ-ċelloli. Dan jagħti rendikont għal kwalunkwe ċitotossicità differenzjali li sseħħ fil-koltura/i tat-test matul it-trattament taċ-ċelloli.

L-RCE hi l-effiċjenza relattiva tal-klonazzjoni tal-koltura tat-test meta mqabbla mal-effiċjenza relattiva tal-klonazzjoni tal-kontroll mhux trattat/b'solvent miksuba fil-ħin tal-għażla tal-mutanti.

**Żvilupp Totali Relattiv (RTG):**  $RTG = RSG \times RCE$

#### TK6

#### Sopravivenza Relattiva (RS):

Iċ-ċitotossicità hi evalwata bis-sopravivenza relattiva, jiġifieri l-effiċjenza tal-klonazzjoni (CE) taċ-ċelloli pjastrati eżatt wara t-trattament aġġustata skont kwalunkwe telf ta' ċelloli matul it-trattament meta mqabbla mal-effiċjenza tal-klonazzjoni f'kontrolli negattivi (assenjati sopravivenza ta' 100 %). L-aġġustament għat-telf ta' ċelloli matul it-trattament jista' jiġi kkalkolat bħala:



$$CE \text{ Aggustata} = CE \times \frac{\text{Numru ta' celloli fi tmiem it-trattament}}{\text{Numru ta' celloli fil-bidu tat-trattament}}$$

L-RS aggustata għal kultura ttrattata b'sustanza kimika tat-test tiġi kkalkolata bħala:

$$RS = \frac{CE \text{ aggustata fil - kultura trattata}}{CE \text{ aggustata fil - kontroll tas - solvent}} \times 100$$

### **IFrekwenza mutanti kemm għall-MLA kif ukoll għat-TK6**

Il-frekwenza mutanti (MF) hi l-effiċjenza tal-klonazzjoni tal-kolonji mutanti f'medium selettiv ( $CE_M$ ) aggustata bl-effiċjenza tal-klonazzjoni f'medium mhux selettiv fil-ħin tal-għażla tal-mutanti ( $CE_V$ ). Jiġifieri,  $MF = CE_M / CE_V$ . Il-kalkolu ta' dawn iż-żewġ effiċjenzi tal-klonazzjoni hu deskritt hawn taht għall-metodi ta' klonazzjoni tal-agar u tal-mikropjastri.

**Verżjoni tal-Agar tal-MLA:** Fil-verżjoni tal-agar artab tal-MLA, in-numru ta' kolonji fil-pjastra tal-għażla tal-mutanti ( $C_M$ ) u n-numru ta' kolonji fil-pjastra mhux magħżula jew tal-effiċjenza tal-klonazzjoni (għadd tal-vijabbli) ( $C_V$ ) jinkisbu bl-għadd dirett tal-kloni. Meta 600 ċellola jiġu pjastrati għall-effiċjenza tal-klonazzjoni ( $CE$ ) għall-pjastri tal-għażla tal-mutanti ( $CE_M$ ) u l-pjastri mhux magħżula jew tal-effiċjenza tal-klonazzjoni (għadd tal-vijabbli) ( $CE_V$ ) u  $3 \times 10^6$  ċelloli jintużaw għall-għażla tal-mutanti,

$$CE_M = C_M / (3 \times 10^6) = (C_M / 3) \times 10^{-6}$$

$$CE_V = C_V / 600$$

**Verżjoni tal-Mikropjastri tal-MLA u tat-TK6:** Fil-verżjoni tal-mikropjastri tal-MLA,  $C_M$  u  $C_V$  huma determinati bħala l-moltiplikazzjoni tan-numru totali ta' mikropjastri (TW) u n-numru probabbli ta' kolonji għal kull bwejra (P) fil-mikropjastri.

$$C_M = P_M \times TW_M$$

$$C_V = P_V \times TW_V$$

Mit-terminu żero tad-distribuzzjoni Poisson (Furth et al., 1981), il-P jingħata permezz ta'

$$P = - \ln (EW / TW)$$

Fejn, EW huma l-bwejriet vojta u TW huma l-bwejriet totali. Għalhekk,

$$CE_M = C_M / T_M = (P_M \times TW_M) / T_M$$

$$CE_V = C_V / T_V = (P_V \times TW_V) / T_V$$

Għall-verżjoni tal-mikropjastri tal-MLA, il-frekwenzi mutanti ta' kolonji żgħar u kbar jiġu kkalkolati b'mod identiku, bl-użu tan-numru rilevanti ta' bwejriet vojta għal kolonji żgħar u kbar.

Għat-TK6, il-frekwenzi mutanti ta' kolonji żgħar u kbar huma bbażati fuq il-mutanti li jidhru kmieni u li jidhru tard.

**B.68 METODU TA' TTESTJAR *IN VITRO* B'ESPONIMENT GHAL HIN QASIR GHALL-IDENTIFIKAZZJONI i) TA' SUSTANZI KIMIČI LI JINDUČU HSARA SERJA LILL-GHAJNEJN U ii) TA' SUSTANZI KIMIČI LI MA JEHTIĞUX KLASSIFIKAZZJONI GHALL-IRRITAZZJONI TAL-GHAJNEJN JEW GHAL HSARA SERJA LILL-GHAJNEJN**

**INTRODUZZJONI**

1. Dan il-metodu ta' ttestjar (TM) hu ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 491 tal-OECD (2017). Il-metodu ta' ttestjar b'Esponiment għal Hin Qasir (STE) hu metodu *in vitro* li jista' jintuża f'ċerti ċirkustanzi u b'limitazzjonijiet speċifiċi għall-klassifikazzjoni tal-periklu u għat-tikkettar tas-sustanzi kimiċi (sustanzi u taħlitiet) li jinduċu hsara serja lill-ghajnejn kif ukoll dawk li ma jehtigux klassifikazzjoni għal hsara serja lill-ghajnejn jew għal irritazzjoni tal-ghajnejn, kif definiti mis-Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi (GHS) tan-Nazzjonijiet Uniti (NU) (1) u mir-Regolament 1272/2008 tal-Unjoni Ewropea (UE) dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet (CLP)<sup>1</sup>.
2. Għal hafna snin, il-potenzjal ta' periklu għall-ghajnejn tas-sustanzi kimiċi ġie evalwat primarjament bl-użu ta' test *in vivo* fuq l-ghajnejn tal-fniek (TM B.5 (8), ekwivalenti għat-TG 405 tal-OECD). Ġeneralment hu aċċettat li, fil-futur qarib, ebda test alternattiv *in vitro* uniku mhu se jkun jista' jiehu post bis-shih it-test *in vivo* fuq l-ghajnejn tal-fniek biex ibassar il-medda shiha ta' risponsi ta' hsara serja lill-ghajnejn/irritazzjoni tal-ghajnejn għall-klassijiet differenti ta' sustanzi kimiċi. Madankollu, taħlitiet strateġiċi ta' metodi ta' ttestjar alternattivi użati fi hdan strateġija ta' ttestjar (sekwenzjali) jaf ikunu kapaċi jiehdu post it-test fuq l-ghajnejn tal-fniek (2). L-approċċ minn fuq għal isfel hu mfassal għall-ittestjar ta' sustanzi kimiċi li jistgħu jkunu mistennija, fuq il-bażi tal-informazzjoni eżistenti, li jkollhom

---

<sup>1</sup> Ir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tas-16 ta' Diċembru 2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet, li jemenda u jħassar id-Direttivi 67/548/KEE u 1999/45/KE, u li jemenda r-Regolament (KE) Nru 1907/2006, ĠU L 353/1, 31.12.2008

potenzjal għoli ta' irritazzjoni jew li jinduċu ħsara serja lill-għajnejn. Għall-kuntrarju, l-approċċ minn isfel għal fuq hu mfassal għall-ittestjar ta' sustanzi kimiċi li jistgħu jkunu mistennija, fuq il-bażi tal-informazzjoni eżistenti, li ma jikkawżawx irritazzjoni tal-għajnejn suffiċjenti biex ikunu jehtieġu klassifikazzjoni. Filwaqt li l-metodu ta' ttestjar tal-STE mhuwiex meqjus li hu sostitut assolut għat-test *in vivo* fuq l-għajnejn tal-fniek, hu xieraq biex jintuża bħala parti minn strateġija ta' ttestjar sekwenzjali għall-klassifikazzjoni u għat-tikkettar regolatorji, bħall-approċċ minn fuq għal isfel/minn isfel għal fuq, biex jiġu identifikati minghajr testijiet ulterjuri (i) sustanzi kimiċi li jinduċu ħsara serja lill-għajnejn (GHS tan-NU/Kategorija 1 tas-CLP) u (ii) sustanzi kimiċi (eskluzi sustanzi ferm volatili u kull sustanza kimika solida oħra li mhix tensjoattiva) li ma jehtigux klassifikazzjoni għall-irritazzjoni tal-għajnejn jew għall-ħsara serja lill-għajnejn (GHS tan-NU/Ebda Kategorija tas-CLP) (1)(2). Madankollu, sustanza kimika li la tkun imbassra li tikkawża ħsara serja lill-għajnejn (GHS tan-NU/Kategorija 1 tas-CLP) u lanqas tal-GHS tan-NU/tal-Ebda Kategorija tas-CLP (ma tinduċix ħsara serja lill-għajnejn u lanqas irritazzjoni tal-għajnejn) skont il-metodu ta' ttestjar STE tkun tehtieġ testijiet addizzjonali biex tiġi stabbilita klassifikazzjoni definittiva. Barra minn hekk, għandhom jiġu kkonsultati l-awtoritajiet regolatorji xierqa qabel l-użu tal-STE f'approċċ minn isfel għal fuq skont skemi ta' klassifikazzjoni oħrajn li mhumex il-GHS tan-NU/is-CLP. L-għażla tal-aktar metodu ta' ttestjar xieraq u l-użu ta' dan il-metodu ta' ttestjar għandhom jiġu kkunsidrati fil-kuntest tad-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar Approċċi Integrati dwar l-Ittestjar u l-Valutazzjoni għal Ħsara Serja lill-Għajnejn u l-Irritazzjoni tal-għajnejn (14).

3. L-iskop ta' dan il-metodu ta' ttestjar hu li jiddeskrivi l-proċeduri użati għall-evalwazzjoni tal-potenzjal li sustanza kimika tat-test tikkawża periklu għall-għajnejn fuq il-bażi tal-hila tagħha li tinduċi ċitotossicità fil-Metodu ta' ttestjar b'Esponiment għal Hin Qasir. L-effett ċitotossiku tas-sustanzi kimiċi fuq iċ-ċelloli epiteljali korneali hu modalità ta' azzjoni (MOA) importanti li twassal għal ħsara fl-epitelju korneali u għal irritazzjoni tal-għajnejn. Il-vijabbiltà taċ-ċelloli fil-metodu ta' ttestjar tal-STE hi vvalutata bil-kejl kwantitattiv, wara l-estrazzjoni miċ-ċelloli, ta' melh tal-formażan blu prodott miċ-ċelloli hajjin b'konverżjoni enzimatika tal-kolorant vitali MTT (bromur tat-3-(4,5-Dimetiltjażol-2-il)-2,5-difeniltetrażolju), magħruf ukoll bħala Bromur tat-Tetrażolju Blu Tjoažolil (3). Il-vijabbiltà taċ-ċelloli miksuba titqabbel mal-kontroll b'solvent (vijabbiltà relattiva) u tintuża biex jiġi stmat il-periklu potenzjali għall-għajnejn tas-sustanza kimika tat-test. Sustanza kimika tat-test tiġi klassifikata bħala tal-Kategorija 1 tal-GHS tan-NU/tas-CLP meta ż-żewġ konċentrazzjonijiet ta' 5 % u ta' 0,05 % jirriżultaw f'vijabbiltà taċ-ċelloli ta' 70 % jew anqas ( $\leq$ ). Għall-kuntrarju, sustanza kimika tiġi mbassra bħala ta' Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU/tas-CLP meta ż-żewġ konċentrazzjonijiet ta' 5 % u ta' 0,05 % jirriżultaw f'vijabbiltà taċ-ċelloli ta' aktar minn ( $>$ ) 70 %.

4. It-terminu “sustanza kimika tat-test” jintuża f’dan il-metodu ta’ ttestjar biex jirreferi għal dak li jiġi ttestjat u mhux b’rabta mal-applikabbiltà tal-metodu ta’ ttestjar tal-STE għall-ittestjar ta’ sustanzi u/jew ta’ taħlitiet. Id-definizzjonijiet huma pprovduti f’dan l-Appendiċi.

## KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

5. Dan il-metodu ta’ ttestjar hu bbażat fuq protokoll żviluppat minn Kao Corporation (4), u kien is-sugġett ta’ żewġ studji ta’ validazzjoni differenti: wieħed mill-Validation Committee of the Japanese Society for Alternative to Animal Experiments (JSAAE) (5) u l-iehor mill-Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) (6). NICEATM/ICCVAM għamlu rieżami bejn il-pari fuq il-bażi tar-rapporti tal-istudji ta’ validazzjoni u dokumenti ta’ rieżami ta’ sfond fuq il-metodu ta’ ttestjar (7).
6. Meta dan jintuża biex jiġu identifikati sustanzi kimiċi (sustanzi u taħlitiet) li jinduċu ħsara serja lill-ġhajnejn (Kategorija 1 tal-GHS tan-NU/tas-CLP (1), id-*data* miksuba bil-metodu ta’ ttestjar tal-STE fuq 125 sustanza kimika (inklużi sustanzi kif ukoll taħlitiet), uriet akkuratezza ġenerali ta’ 83 % (104/125), rata ta’ pożittivi foloz ta’ 1 % (1/86), u rata ta’ negattivi foloz ta’ 51 % (20/39) meta mqabbel mat-test *in vivo* fuq l-ġhajnejn tal-fniek (7). Ir-rata ta’ negattivi foloz miksuba mhix kritika f’dan il-kuntest, peress li s-sustanzi kimiċi tat-test kollha li jinduċu vijabbiltà taċ-ċellooli ta’  $\leq 70$  % f’koncentrazzjoni ta’ 5 % u  $> 70$  % f’0,05 % ikunu ttestjati b’mod sussegwenti b’metodi ta’ ttestjar *in vivo* oħra validati b’mod adegwat jew, bħala l-aħħar istanza, fit-test *in vivo* fuq l-ġhajnejn tal-fniek, skont ir-rekwiżiti regolatorji u skont l-istrategija ta’ ttestjar sekwenzjali u l-approċċi tal-piż tal-evidenza rakkomandati bħalissa (1) (8). Primarjament ġew ittestjati sustanzi monokostitwenti, għalkemm jeżisti wkoll ammont limitat ta’ *data* fuq l-ittestjar ta’ taħlitiet. Il-metodu ta’ ttestjar xorta waħda hu teknikament applikabbli għall-ittestjar ta’ sustanzi u ta’ taħlitiet multikostitwenti. Madankollu, qabel ma jintuża dan il-metodu ta’ ttestjar fuq taħlita għall-ġenerazzjoni ta’ *data* għal skop regolatorju intiż, għandu jiġi kkunsidrat jekk jistax jipprovi riżultati adegwati għal dak l-għan u, jekk iva, għaliex. Dawn il-kunsiderazzjonijiet ma jkunux meħtieġa meta jkun hemm rekwiżit regolatorju għall-ittestjar tat-taħlita. Il-metodu ta’ ttestjar tal-STE ma wera ebda nuqqas speċifiku ieħor meta ntuża biex jiġu identifikati sustanzi kimiċi tat-test bħall-Kategorija 1 tal-GHS tan-NU/is-CLP. L-investigaturi jistgħu jikkunsidraw li jużaw dan il-metodu ta’ ttestjar fuq sustanzi kimiċi tat-test, li fih vijabbiltà taċ-ċellooli ta’  $\leq 70$  % kemm fil-koncentrazzjoni ta’ 5 % kif ukoll ta’ 0,05 % għandha tiġi aċċettata bħala indikatur ta’ rispons li jinduċi ħsara serja lill-ġhajnejn li għandu jiġi klassifikat bħala Kategorija 1 tal-GHS tan-NU/tas-CLP mingħajr testijiet ulterjuri.

7. Meta dan jintuża biex jiġu identifikati sustanzi kimiċi (sustanzi u taħlitiet) li ma jeħtiġux klassifikazzjoni għal irritazzjoni tal-ġhajnejn u għal ħsara serja lill-ġhajnejn (jiġifieri Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU/tas-CLP), id-*data* miksuba bil-metodu ta' ttestjar tal-STE fuq 130 sustanza kimika (inklużi sustanzi kif ukoll taħlitiet), uriet akkuratezza ġenerali ta' 85 % (110/130), rata ta' negattivi foloz ta' 12 % (9/73), u rata ta' pożittivi foloz ta' 19 % (11/57) meta mqabbel mat-test *in vivo* fuq l-ġhajnejn tal-fniek (7). Jekk sustanzi ferm volatili u sustanzi solidi ġhajr it-tensjoattivi jiġu esklużi mis-sett tad-*data*, l-akkuratezza ġenerali titjeb għal 90 % (92/102), ir-rata ta' negattivi foloz għal 2 % (1/54), u l-pożittivi foloz għal 19 % (9/48) (7). Konsegwentement, in-nuqqasijiet potenzjali tal-metodu ta' ttestjar tal-STE, meta jintuża biex jidentifika sustanzi kimiċi tat-test li ma jeħtiġux klassifikazzjoni għal irritazzjoni tal-ġhajnejn u għal ħsara serja lill-ġhajnejn (Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU/tas-CLP) huma rata għolja ta' negattivi foloz għal i) sustanzi volatili ħafna bi pressjoni tal-fwar ta' aktar minn 6 kPa u ii) Sustanzi kimiċi solidi (sustanzi u taħlitiet) ġhajr tensjoattivi u taħlitiet komposti minn tensjoattivi biss. Sustanzi kimiċi bħal dawn huma esklużi mid-dominju tal-applikabbiltà tal-metodu ta' ttestjar tal-STE (7).
8. Minbarra s-sustanzi kimiċi msemmija fil-paragrafu 6 u 7, is-sett ta' *data* generat mill-metodu ta' ttestjar tal-STE fih ukoll *data* interna dwar 40 taħlita li, meta mqabbla mat-test tal-ġhajnejn *in vivo* Draize, wera akkuratezza ta' 88 % (35/40), rata ta' pożittivi foloz ta' 50 % (5/10), u rata ta' negattivi foloz ta' 0 % (0/30) għat-tbassir ta' taħlitiet li ma jeħtiġux klassifikazzjoni skont is-sistemi ta' klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU/tas-CLP (9). Għaldaqstant, il-metodu ta' ttestjar tal-STE jista' jiġi applikat biex jidentifika taħlitiet bħala Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU/tas-CLP f'approċċ minn isfel għal fuq bl-eċċezzjoni ta' taħlitiet ta' solidi ġhajr dawk komposti minn tensjoattivi biss bħala estensjoni tal-limitazzjoni tiegħu għal sustanzi solidi. Barra minn hekk, taħlitiet li fihom sustanzi bi pressjoni tal-fwar oġġla min 6kPa għandhom jiġu evalwati b'attenzjoni biex jiġu evitati sottopreviżjonijiet potenzjali, u għandhom ikunu ġustifikati fuq bażi ta' każ b'każ.
9. Il-metodu ta' ttestjar tal-STE ma jistax jintuża għall-identifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi tat-test bħall-Kategorija 2 tal-GHS tan-NU/tas-CLP, jew tal-Kategorija 2A (irritazzjoni tal-ġhajnejn) jew 2B (irritazzjoni ħafifa tal-ġhajnejn) tal-GHS tan-NU, minhabba n-numru konsiderevoli ta' sustanzi kimiċi tal-Kategorija 1 tal-GHS tan-NU/tas-CLP sottoprevisti bħala l-Kategorija 2, 2A, jew 2B u sustanzi kimiċi ta' Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU/tas-CLP previsti b'mod eċċessiv bħala tal-Kategorija 2, 2A, jew 2B (7). Għal dan il-ghan, jista' jkun hemm bżonn li jsiru iktar testijiet b'metodu xieraq ieħor.
10. Il-metodu ta' ttestjar tal-STE hu xieraq għal sustanzi kimiċi tat-test li jiġu dissolti jew sospizi b'mod uniformi għal tal-anqas ħames minuti f'salina fiżjoloġika, 5 %

sulfossidu tad-dimetil (DMSO) f'salina, jew f'zejt minerali. Il-metodu ta' ttestjar tal-STE mhuwiex xieraq għal sustanzi kimiċi tat-test li huma insolubbli jew li ma jistgħux jiġu sospiżi b'mod uniformi għal tal-anqas hames minuti f'salina fiżjoloġika, 5 % DMSO f'salina, jew f'zejt minerali. L-użu ta' zejt minerali fil-metodu ta' ttestjar tal-STE hu possibbli minhabba l-esponiment għal hin qasir. Għaldaqstant, il-metodu ta' ttestjar tal-STE hu xieraq għat-tbassir tal-potenzjal ta' periklu għall-ghajnejn ta' sustanzi kimiċi tat-test insolubbli fl-ilma (eż. alkohols jew ketoni xahmin b'katina twila) dment li dawn ma jkunux jistgħu jithalltu f'tal-anqas wiehed mit-tliet solvanti proposti hawn fuq (4).

11. It-terminu “sustanza kimika tat-test” jintuża f'dan il-metodu ta' ttestjar biex jirreferi għal dak li jkun qed jiġi ttestjat<sup>1</sup> u mhux b'rabta mal-applikabbiltà tal-metodu ta' ttestjar tal-STE għall-ittestjar ta' sustanzi u/jew ta' taħlitiet.

## PRINĊIPJU TAT-TEST

12. Il-metodu ta' ttestjar tal-STE hu bbażat fuq assaġġ *in vitro* bbażat fuq iċ-ċitotossicità li jsir fuq monosaff konfluwenti ta' ċelloli tal-Kornea tal-Fenek ta' Statens Seruminstitut (SIRC), kulturati f'mikropjastra tal-polikarbonat b'96 bwejra (4). Wara esponiment għal hames minuti għal sustanza kimika tat-test, iċ-ċitotossicità tiġi mkejla b'mod kwantitattiv bħala l-vijabbiltà relattiva taċ-ċelloli tal-SIRC bl-użu tal-assaġġ tal-MTT (4). Il-vijabbiltà mnaqqsa taċ-ċelloli tintuża biex tbassar l-effetti avversi potenzjali li jwasslu għal hsara okulari.
13. Gie rrapportat li 80 % ta' soluzzjoni mqattra f'ghajn fenek jiġi eliminat permezz tal-borża konguntivali fi żmien tliet sa erba' minuti, filwaqt li aktar minn 80 % ta' soluzzjoni mqattra f'ghajn bniedem jiġi eliminat fi żmien minuta sa tnejn (10). Il-metodu ta' ttestjar tal-STE jipprova japprossima dawn il-hinijiet ta' esponiment u jagħmel użu miċ-ċitotossicità bħala punt ta' tmiem għall-valutazzjoni tal-firxa tal-hsara għaċ-ċelloli tal-SIRC wara esponiment għal hames minuti għas-sustanza kimika tat-test.

---

<sup>1</sup> F'Ġunju 2013, il-Laqqgħa Kongunta qablet li, fejn possibbli, issa għandu jiġi applikat użu aktar konsistenti tat-terminu “sustanza kimika tat-test” li jiddeskrivi dak li jkun qed jiġi ttestjat f'metodi ta' ttestjar godda u aġġornati.

## WIRI TAL-PROFIĊJENZA

14. Qabel l-użu ta' rutina tal-metodu ta' ttestjar tal-STE deskritt f'dan il-metodu ta' ttestjar, li jaderixxi ma' dan il-metodu ta' ttestjar, il-laboratorji għandhom juru profiċjenza teknika billi jikklassifikaw kif suppost hdax-il sustanza rakkomandati fit-Tabella 1. Dawn is-sustanzi ntgħażlu biex jirrappreżentaw il-medda shiha ta' risponsi għal hsara serja lill-ġhajnejn jew għal irritazzjoni tal-ġhajnejn fuq il-baži tar-rizultati ta' testijiet *in vivo* fuq ġhajnejn il-fniek (TG 405) u s-sistema ta' klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU/tas-CLP (1). Kriterji tal-għażla oħra inkludew li s-sustanzi għandhom ikunu kummerċjalment disponibbli, li għandu jkun hemm *data* ta' referenza *in vivo* ta' kwalità għolja, u li għandu jkun hemm disponibbli *data in vitro* ta' kwalità għolja mill-metodu ta' ttestjar (3). F'sitwazzjonijiet li fihom sustanza elenkata ma tkunx disponibbli jew, fejn ġustifikabbli, tista' tintuża sustanza oħra li għaliha jkun hemm *data* ta' referenza adegwata *in vivo* u *in vitro* disponibbli dment li ma jintużawx l-istess kriterji bħal dawk deskritti hawn.

**Tabella 1:** Lista ta' Sustanzi ta' Profiċjenza

| Sustanza                               | CASRN      | Klassi kimika <sup>1</sup>                                   | Stat fiżiku | Kat. <i>In Vivo</i> tal-GHS tan-NU/tas-CLP <sup>2</sup> | Solvent fit-test tal-STE | Kat. tal-STE tal-GHS tan-NU/tas-CLP |
|----------------------------------------|------------|--------------------------------------------------------------|-------------|---------------------------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------|
| Klorur tal-benzalkonju (10 %, milwiem) | 8001-54-5  | Kompost tal-onju                                             | Likwidi     | Kategorija 1                                            | Salina                   | Kategorija 1                        |
| Triton X-100 (100 %)                   | 9002-93-1  | Eter                                                         | Likwidi     | Kategorija 1                                            | Salina                   | Kategorija 1                        |
| Aħmar Acidu 92                         | 18472-87-2 | Kompost eteroċikliku; Kompost tal-bromur; Kompost tal-klorur | Solidu      | Kategorija 1                                            | Salina                   | Kategorija 1                        |
| Idrossidu tas-sodju                    | 1310-73-2  | Alkali; Sustanza kimika inorganika                           | Solidu      | Kategorija 1 <sup>3</sup>                               | Salina                   | Kategorija 1                        |
| Butirolatton                           | 96-48-0    | Latton; Kompost eteroċikliku                                 | Likwidi     | Kategorija 2A (Kategorija 2 fis-CLP)                    | Salina                   | Ma tista' ssir ebda previzjoni      |
| 1-Ottanol                              | 111-87-5   | Alkoħol                                                      | Likwidi     | Kategorija 2A/B <sup>4</sup> (Kategorija 2 fis-CLP)     | Żejt Minerali            | Ma tista' ssir ebda previzjoni      |
| Ċiklopentanol                          | 96-41-3    | Alkoħol; Idrokarbur,                                         | Likwidi     | Kategorija 2A/B <sup>5</sup>                            | Salina                   | Ma tista' ssir ebda                 |



|                             |          | ċikliku                     |         | (Kategorija 2 fis-CLP) |               | previżjoni      |
|-----------------------------|----------|-----------------------------|---------|------------------------|---------------|-----------------|
| 2-Etossietil aċetat         | 111-15-9 | Alkoħol; Eter               | Likwidi | Ebda Kategorija        | Salina        | Ebda Kategorija |
| Dodekan                     | 112-40-3 | Idrokarbur, aċikliku        | Likwidi | Ebda Kategorija        | Żejt Minerali | Ebda Kategorija |
| Metilisobutylketon          | 108-10-1 | Ketone                      | Likwidi | Ebda Kategorija        | Żejt Minerali | Ebda Kategorija |
| n,n-Dimetilgwanidina sulfat | 598-65-2 | Amidina; Kompost tal-kubrit | Solidu  | Ebda Kategorija        | Salina        | Ebda Kategorija |

Abbrevjazzjonijiet: RN tas-CAS = Numru tar-Reġistru tas-Servizz tat-Taqsiriet tas-Sustanzi Kimiċi

<sup>1</sup>Il-klassijiet kimiċi ġew assenjati bl-użu tal-informazzjoni miksuba mill-pubblikazzjonijiet preċedenti tal-NICEATM u, jekk din ma kinitx disponibbli, bl-użu tal-Intestaturi tas-Sugġetti Mediċi (MeSH®) tal-Librerija Nazzjonali tal-Mediċina (permezz ta' ChemIDplus® [National Library of Medicine], disponibbli fuq <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>) u tad-determinazzjonijiet tal-istruttura magħmula minn NICEATM.

<sup>2</sup>Abbazi tar-riżultati mit-test *in vivo* fuq għajnejn il-fniek (OECD TG 405) u bl-użu tal-GHS tan-NU/tas-CLP (1).

<sup>3</sup>Klassifikazzjoni bhala l-Kat.1 hi bbażata fuq il-potenzjal ta' korrużjoni tal-ġilda tal-idrossidu tas-sodju 100 % (elenkat bhala sustanza kimika b'potenzjal ta' korrużjoni tal-ġilda fit-TG 435 tal-OECD) u l-kriterju għall-kategorija 1 tal-GHS tan-NU/tas-CLP (1).

<sup>4</sup>Klassifikazzjoni bhala 2A jew 2B tiddependi mill-interpretazzjoni tal-kriterju tal-GHS tan-NU għad-distinzjoni bejn dawn iż-żewġ kategoriji, jiġifieri tnejn minn sitta vs erbgħa minn sitt annimali b'effetti fil-jum 7 neċessarji biex tiġi ġenerata klassifikazzjoni tal-Kategorija 2A. Is-sett ta' *data in vivo* inkluda żewġ studji bi tliet annimali kull wiehed. Fi studju minnhom tnejn minn tliet annimali wrew effetti fil-jum 7 li kienu jiġġustifikaw klassifikazzjoni tal-Kat. 2A (11), filwaqt li fit-tieni studju l-punti ta' tmiem kollha fit-tliet annimali kollha kemm huma rkupraw għal punteġġ ta' zero sal-jum 7 li ġġustifika klassifikazzjoni tal-Kat. 2B (12).

<sup>5</sup>Klassifikazzjoni bhala 2A jew 2B tiddependi mill-interpretazzjoni tal-kriterju tal-GHS tan-NU għad-distinzjoni bejn dawn iż-żewġ kategoriji, jiġifieri wiehed minn tlieta vs tnejn minn tliet annimali b'effetti fil-jum 7 neċessarji biex tiġi ġenerata klassifikazzjoni tal-Kategorija 2A. L-istudju *in vivo* kien jinkludi tliet annimali. Il-punti ta' tmiem kollha apparati l-opacità korneali u l-hmura konguntivali f'annimal wiehed irkupraw għal punteġġ ta' zero sal-jum 7 jew qabel. L-annimal li ma rkupraw għalkollox sal-jum 7 kellu punteġġ ta' opacità korneali ta' wiehed u ta' hmura konguntivali ta' wiehed (fil-jum 7) li rkupra għalkollox fil-jum 14 (11).

## PROCEDURA

### Preparazzjoni tal-Monosaff Ċellolari

15. Il-linja ta' ċelloli tal-kornea tal-fniek, SIRC, għandha tintuża għat-twettiq tal-metodu ta' ttestjar tal-STE. Hu rakkomandat li ċ-ċelloli tal-SRC jinkisbu minn bank ta' ċelloli kwalifikat sew, bħall-American Type Culture Collection CCL60.
16. Iċ-ċelloli SRC huma kulturati f'37°C f'5 % CO<sub>2</sub> u atmosfera umidifikata fi flask tal-koltura li fih medium tat-tkabbir li jinvolvi medium essenzjali minimu ta' Eagle (MEM) supplimentat b'10 % serum bovin fetali (FBS), 2 mM L-glutamina, 50–100 unità/ml penicillina u 50–100 µg/ml streptomicina. Iċ-ċelloli li saru konfluwenti fil-

flask tal-koltura għandhom jiġu separati bl-użu tas-soluzzjoni tal-aċidu tripsina-etilendijamminatetraacetiku, bl-użu ta' scraper taċ-ċelloli jew mingħajr. Iċ-ċelloli jiġu propagati (eż. minn tnejn sa tliet passaġġi) fi flask tal-koltura qabel ma jintużaw għall-ittestjar ta' rutina, u ma għandhomx isirulhom aktar minn 25 passaġġ mit-tahlil.

17. Iċ-ċelloli li jkunu lesti biex jintużaw għat-test tal-STE mbagħad jithejjew fid-densità xierqa u jinżerġu fi pjastri b'96 bwejra. Id-densità rakkomandata tat-tiżriġ taċ-ċelloli hi ta'  $6,0 \times 10^3$  ċelloli għal kull bwejra meta ċ-ċelloli jintużaw erbat ijiem wara t-tiżriġ, jew  $3,0 \times 10^3$  ċelloli għal kull bwejra meta ċ-ċelloli jintużaw hamest ijiem wara t-tiżriġ, f'volum tal-koltura ta' 200 µl. Iċ-ċelloli użati għat-test tal-STE li jinżerġu f'medium tat-tkabbir fid-densità xierqa jilhqqu konfluwenza ta' aktar minn 80 % fil-hin tal-ittestjar, jiġifieri erba' jew hamest ijiem wara t-tiżriġ.

### **Applikazzjoni tas-Sustanzi Kimiċi tat-Test u tas-Sustanzi tal-Kontroll**

18. L-ewwel għażla tas-solvent għad-dissoluzzjoni jew għas-sospensjoni tas-sustanzi kimiċi tat-test hi s-salina fiżjoloġika. Jekk is-sustanza kimika tat-test turi solubbiltà baxxa jew ma tkunx tista' tiġi dissolta jew sospiża b'mod uniformi għal tal-anqas hames minuti f'salina, 5 % DMSO (CAS#67-68-5) f'salina tintuża bħala s-solvent tat-tieni għażla. Għal sustanzi kimiċi tat-test li ma jkunux jistgħu jiġu dissolti jew sospiżi b'mod uniformi għal tal-anqas hames minuti f'salina jew f'5 % DMSO f'salina, jintuża żejt minerali (CAS#8042-47-5) bħala solvent tat-tielet għażla.
19. Is-sustanzi kimiċi tat-test jiġu dissolti jew sospiżi b'mod uniformi fis-solvent magħżul f'konċentrazzjoni ta' 5 % (w/w) u jiġu dilwiti ulterjorment b'dilwizzjoni serjali ta' 10 darbiet għal konċentrazzjoni ta' 0,5 % u 0,05 %. Kull sustanza kimika tat-test għandha tiġi ttestjata f'konċentrazzjonijiet ta' 5 % kif ukoll ta' 0,05 %. Ċelloli kolturati fil-pjastra b'96 bwejra huma esposti għal 200 µl/bwejra f'konċentrazzjoni ta' 5 % jew ta' 0,05 % tas-soluzzjoni (jew sospensjoni) tas-sustanza kimika tat-test, għal hames minuti f'temperatura ambjentali. Is-sustanzi kimiċi tat-test (sustanzi monokostitwenti jew sustanzi jew tahlitiet multikostitwenti) jitqiesu bħala sustanzi nodfa u dilwiti jew sospiżi skont il-metodu, indipendentement mill-purità tagħhom.
20. Il-medium tat-tkabbir deskritt fil-paragrafu 16 jintuża bħala kontroll b'medium f'kull pjastra ta' kull ripetizzjoni. Barra minn hekk, iċ-ċelloli jiġu esposti wkoll għal kampjuni b'kontroll b'solvent f'kull pjastra ta' kull ripetizzjoni. Is-solventi elenkati fil-paragrafu 18 ġew ikkonfermati li ma għandhom ebda effett avvers fuq il-vijabbiltà taċ-ċelloli SIRC.
21. Fil-metodu ta' ttestjar tal-STE, għandu jintuża 0,01 % Sulfat tal-lauril tas-sodju (SLS) f'salina bħala kontroll pożittiv f'kull pjastra ta' kull ripetizzjoni. Biex tiġi kkalkolata

l-vijabbiltà taċ-ċelloli tal-kontroll pożittiv, kull pjastra ta' kull ripetizzjoni trid tinkludi wkoll kontroll b'solvent salina.

22. Inbjank hu neċessarju biex jiġi determinat il-kumpens għad-densità ottika u għandu jsir fuq bwejriet li jkun fihom salina baferjata bil-fosfat biss, iżda ebda kalċju u manjeżju (PBS-) jew ċelloli.
23. Kull kampjun (sustanza kimika tat-test f'5 % u f'0,05 %, il-kontroll b'medium, il-kontroll b'solvent, u l-kontroll pożittiv) għandu jiġi ttestjat f'kull ripetizzjoni bl-esponiment taċ-ċelloli għal 200 µl tas-sustanza kimika tat-test jew tal-kontroll xierqa għal hames minuti f'temperatura ambjentali.
24. Sustanzi ta' riferiment huma utli għall-evalwazzjoni tal-potenzjal li sustanzi kimiċi mhux magħrufa ta' klassi speċifika ta' sustanzi kimiċi jew ta' prodotti jikkawżaw irritazzjoni okulari, jew għall-evalwazzjoni tal-potenzjal ta' irritazzjoni relattiva ta' irritant okulari fi hdan medda speċifika ta' risponsi irritanti.

### **Kejl tal-Vijabbiltà taċ-Ċelloli**

25. Wara l-esponiment, iċ-ċelloli jinhaslu darbtejn b'200 µl PBS u tiżdied 200 µl soluzzjoni tal-MTT (0,5 mg MTT/ml medium tat-tkabbir). Wara hin ta' reazzjoni ta' sagħtejn f'inkubatur (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>), is-soluzzjoni tal-MTT tiġi dekantata, il-formażen MTT jiġi estratt billi jiżdiedu 200 µl aċidu isopropanol idrokloriku 0,04 N għal 60 minuta fid-dlam f'temperatura ambjentali, u l-assorbanza tas-soluzzjoni tal-formażen MTT titkejjel f'570 nm b'apparat għall-qari tal-pjastri. L-interferenza tas-sustanzi kimiċi tat-test mal-assaġġ tal-MTT (minn koloranti jew riduċenti diretti tal-MTT) isseħħ biss jekk jinżamm ammont sinifikanti ta' sustanzi kimiċi tat-test fis-sistema tat-test wara t-tlahliħ wara l-esponiment, li hu l-każ għall-kornea umana Rikostitwita 3D jew tat-Tessuti tal-epidermis uman rikostitwit iżda mhuwiex rilevanti għall-kolturi ta' ċelloli 2D użati għall-metodu ta' ttestjar tal-STE.

### **Interpretazzjoni tal-Mudell tar-Riżultati u tat-Tbassir**

26. Il-valuri tad-densità ottika (OD) miksuba għal kull sustanza kimika tat-test imbagħad jintużaw biex tiġi kkalkolata l-vijabbiltà taċ-ċelloli għall-kontroll b'solvent, li tiġi stabbilita għal 100 %. Il-vijabbiltà relattiva taċ-ċelloli tiġi espressa bħala perċentwal u tinkiseb bid-diviżjoni tal-OD tas-sustanza kimika tat-test bl-OD tal-kontroll b'solvent wara t-tnaqqis tal-OD tal-inbjank miż-żewġ valuri.

*Vijabbiltà taċ – ċelloli (%)*

$$= \frac{(OD_{570} \text{ tas - sustanza kimika tat - test}) - (OD_{570} \text{ tal - inbjank})}{(OD_{570} \text{ tal - kontroll b'solvent}) - (OD_{570} \text{ tal - inbjank})} \times 100$$

B'mod simili, il-vijabbiltà relattiva tač-ċelloli ta' kull kontroll b'solvent tiġi espressa b'ħala perċentwal u tinkiseb bid-diviżjoni tal-OD ta' kull kontroll b'solvent bl-OD tal-kontroll b'medium wara t-tnaqqis tal-OD tal-inbjank miż-żewġ valuri.

27. Għandhom isiru tliet ripetizzjonijiet indipendenti, b'kull waħda li jkun fiha tliet bwejriet repliki (jiġifieri, n=9). Il-medja aritmetika tat-tliet bwejriet għal kull sustanza kimika tat-test u kontroll b'solvent f'kull ripetizzjoni indipendenti tintuża biex tiġi kkalkolata l-medja aritmetika tal-vijabbiltà relattiva tač-ċelloli. Il-medja aritmetika finali tal-vijabbiltà tač-ċelloli tiġi kkalkolata mit-tliet ripetizzjonijiet indipendenti.
28. Il-valuri ta' limitu tal-vijabbiltà tač-ċelloli għall-identifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi tat-test li jinduċu ħsara serja lill-ġhajnejn (Kategorija 1 tal-GHS tan-NU/tas-CLP) u tas-sustanzi kimiċi li ma jehtigux klassifikazzjoni għal irritazzjoni tal-ġhajnejn jew għal ħsara serja lill-ġhajnejn (Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU/tas-CLP) jingħataw hawnhekk.

**Tabella 2:** Mudell tat-tbassir tal-metodu ta' ttestjar tal-STE

| Vijabbiltà tač-ċelloli |          | Klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU/tas-CLP | Applikabbiltà                                                                                                                                                                                                                                       |
|------------------------|----------|-----------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| F'5 %                  | F'0,05 % |                                         |                                                                                                                                                                                                                                                     |
| > 70 %                 | > 70 %   | Ebda Kategorija                         | Sustanzi u taħlitiet, bl-eċċezzjoni ta':<br>i) sustanzi ferm volatili bi pressjoni tal-fwar ta' aktar minn 6 kPa <sup>1</sup> u<br>ii) Sustanzi kimiċi solidi (sustanzi u taħlitiet) għajr tensjoattivi u taħlitiet komposti minn tensjoattivi biss |
| ≤ 70 %                 | > 70 %   | Ma tista' ssir ebda previzzjoni         | Mhux applikabbli                                                                                                                                                                                                                                    |
| ≤ 70 %                 | ≤ 70 %   | Kategorija 1                            | Sustanzi u taħlitiet <sup>2</sup>                                                                                                                                                                                                                   |

<sup>1</sup> Taħlitiet li fihom sustanzi bi pressjoni tal-fwar oghla min 6kPa għandhom jiġu evalwati b'attenzjoni biex jiġu evitati sottopreviżjonijiet potenzjali, u għandhom ikunu ġustifikati fuq bażi ta' każ b'każ.

<sup>2</sup> Fuq il-bażi tar-riżultati miksuba primarjament b'sustanzi monokositwenti, għalkemm jeżisti wkoll ammont ta' data dwar l-ittestjar ta' taħlitiet. Il-metodu ta' ttestjar xorta waħda hu teknikament applikabbli għall-ittestjar ta' sustanzi u ta' taħlitiet multikositwenti. Qabel ma jintuża dan il-metodu ta' ttestjar fuq taħlita għall-ġenerazzjoni ta' data għal skop regolatorju intiz, għandu jiġi kkunsidrat jekk jistax jipprovi riżultati adegwati għal dak l-għan u, jekk iva, għaliex. Dawn il-kunsiderazzjonijiet mhumiex meħtieġa meta jkun hemm rekwiżit regolatorju għall-ittestjar tat-taħlita.

### Kriterji tal-Aċċettazzjoni

29. Ir-riżultati tat-test huma ġudikati b'ħala aċċettabbli meta jiġu ssodisfati l-kriterji kollha li ġejjin:

- a) Id-densità ottika tal-kontroll b'medium (espost għal medium tat-tkabbir) għandha tkun ta' 0,3 jew aktar wara t-tnaqqis tad-densità ottika tal-inbjank.
- b) Il-vijabbiltà tal-kontroll b'solvent għandha tkun 80 % jew aktar relattiva għall-kontroll b'medium. Jekk jintużaw diversi kontrolli b'solvent f'kull ripetizzjoni, kull wiehied minn dawk il-kontrolli għandu juri vijabbiltà taċ-ċellooli akbar minn 80 % biex jiġu kwalitifikati s-sustanzi kimiċi tat-test ittestjati b'dawk is-solventi.
- c) Il-vijabbiltà taċ-ċellooli miksuba bil-kontroll pożittiv (0,01 % SLS) għandha tkun fi hdan żewġ devjazzjonijiet standard tal-medja storika. Il-limiti ta' aċċettazzjoni superjuri u inferjuri għall-kontroll pożittiv għandhom jiġu aġġornati b'mod frekwenti, jiġifieri kull tliet xhur, jew kull darba li jsir test aċċettabbli f'laboratorji fejn it-testijiet isiru b'mod mhux frekwenti (jiġifieri anqas minn darba f'xahar). Meta laboratorju ma jlestix numru suffiċjenti ta' esperimenti biex tiġi stabbilita distribuzzjoni statistikament robusta tal-kontroll pożittiv, hu aċċettabbli li jintużaw il-limiti ta' aċċettazzjoni superjuri u inferjuri stabbiliti mill-iżviluppatur tal-metodu, jiġifieri bejn 21,1 % u 62,3 % skont id-*data* storika tal-laboratorju tiegħu, filwaqt li tinbena distribuzzjoni interna matul l-ewwel testijiet ta' rutina.
- d) Id-devjazzjoni standard tal-vijabbiltà finali taċ-ċellooli derivata minn tliet ripetizzjonijiet indipendenti għandha tkun anqas minn 15 % għall-konċentrazzjoni ta' 5 % kif ukoll ta' 0,05 % tas-sustanza kimika tat-test.

Jekk ma jiġix issodisfat wiehied jew aktar minn dawn il-kriterji, ir-riżultati għandhom jiġu injorati u jsiru tliet ripetizzjonijiet indipendenti oħra.

## **DATA U RAPPORTAR**

### ***Data***

30. Id-*data* għal kull bwejra individwali (eż. il-valuri tal-vijabbiltà taċ-ċellooli) ta' kull ripetizzjoni kif ukoll il-medja generali, l-SD, u l-klassifikazzjoni jridu jiġu rapportati.

### **Rapport tat-Test**

31. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

#### ***Sustanza Kimika tat-Test u Sustanzi tal-Kontroll***

- Sustanza monokostitwenti: l-identifikazzjoni kimika, bhall-isem (jew ismijiet) IUPAC jew CAS, in-numru/i tar-registru tas-CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, u/jew identifikaturi oħra;

- Sustanza multikostitwenti, UVCB u taħlita: Karatterizzazzjoni sa fejn possibbli skont, pereżempju, l-identità kimika (ara aktar 'il fuq), il-purità, l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti (ara aktar 'il fuq) tal-kostitwenti, sa fejn disponibbli;
- L-istat fiżiku, il-volatilità, il-pH, il-LogP, il-piż molekolari, il-klassi kimika, u proprjetajiet fiżikokimiċi addizzjonali rilevanti għat-twettiq tal-istudju, sa fejn disponibbli;
- Il-purità, l-identità kimika tal-impuritatiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ;
- It-trattament qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (pereżempju tishin, thin);
- Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabbiltà, sa fejn ikunu disponibbli.

#### *Kundizzjonijiet u Proċeduri tal-Metodu ta' Ttestjar*

- L-isem u l-indirizz tal-isponser, tal-faċilità tat-test u tad-direttur tal-istudju;
- Deskrizzjoni tal-metodu ta' ttestjar użat;
- Il-linja ta' ċelloli użata, is-sors tagħha, in-numru ta' passaġġi u l-konfluwenza ta' ċelloli użati għall-ittestjar;
- Dettalji tal-proċedura tat-test użata;
- In-numru ta' ripetizzjonijiet u ta' repliki użati;
- Il-koncentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test użati (jekk differenti minn daww rakkomandati);
- Ġustifikazzjoni għall-għażla tas-solvent għal kull sustanza kimika tat-test;
- Id-durata tal-esponiment għas-sustanza kimika tat-test (jekk differenti minn dik rakkomandata);
- Deskrizzjoni ta' kwalunkwe modifika tal-proċedura tat-test;
- Deskrizzjoni tal-kriterji ta' evalwazzjoni u ta' deċiżjoni użati;
- Referenza għall-medja tal-kontroll pożittiv storiku u għad-Devjazzjoni Standard (SD);
- Wiri ta' profiċjenza tal-laboratorju fit-twettiq tal-metodu ta' ttestjar (eż. bl-ittestjar tas-

sustanzi ta' profiċjenza) jew bil-wiri ta' prestazzjoni riproducibbli tal-metodu ta' ttestjar maż-żmien.

#### *Riżultati*

- Għal kull sustanza kimika tat-test u sustanza tal-kontroll, u kull konċentrazzjoni ttestjata, it-tabulazzjoni għandha tingħata għall-valuri individwali tal-OD għal kull bwejra replikata, għall-valuri medji aritmetiċi tal-OD għal kull ripetizzjoni indipendenti, il- % tal-vijabbiltà taċ-ċelloli għal kull ripetizzjoni indipendenti, u l- % medju aritmetiku finali tal-vijabbiltà taċ-ċelloli u l-SD fit-tliet ripetizzjonijiet;
- Ir-riżultati għall-medium, għas-solvent u għall-kontroll pozittiv li juru kriterji xierqa ta' aċċettazzjoni tal-istudji;
- Deskrizzjoni ta' effetti oħra osservati;
- Il-klassifikazzjoni ġenerali derivata b'referenza għall-mudell ta' tbassir/għall-kriterji tad-deċiżjoni użati.

#### *Diskussjoni tar-Riżultati*

#### *Konklużjonijiet*

## **DOKUMENTAZZJONI**

- (1) Nazzjonijiet Uniti NU (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. Disponibbli fuq: [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) 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. Disponibbli fuq: [http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox\_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf].
- (8) Il-Kapitolu B.5 ta' dan l-Anness, Irritazzjoni/Korruzzjoni Akuta tal-Għajnejn.
- (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 u 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). Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.
- (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). Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

## Appendiċi

### DEFINIZZJONIJIET

**Akkuratezza:** Il-qrubija fil-livell ta' qbil bejn ir-rizultati tal-metodu ta' ttestjar u l-valuri referenzjarji aċċettati. Hi kejl tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar u wiehed mill-aspetti ta' rilevanza. Spiss it-terminu jintuża b'mod alternanti ma' "konkordanza" biex ifisser il-proporzjon ta' rizultati korretti ta' metodu ta' ttestjar (13).

**Sustanza ta' riferiment:** Sustanza użata bħala standard għall-paragun ma' sustanza kimika tat-test. Sustanza ta' riferiment għandu jkollha l-proprjetajiet li ġejjin; (i) sors(i) konsistenti u affidabbli; (ii) similarità strutturali u funzjonali għall-klassi ta' sustanzi ttestjati; (iii) karatteristiċi fiżiċi/kimiċi magħrufa; (iv) *data* ta' sostenn dwar l-effetti magħrufa, u (v) il-potenza magħrufa fil-medda tar-rispons mixtieq.

**Approċċ Minn Isfel Għal Fuq:** Approċċ sekwenzjali użat għal sustanza kimika tat-test suspettata li ma tehtieġx klassifikazzjoni għall-irritazzjoni tal-ghajnejn jew hsara serja lill-ghajnejn, li jibda bid-determinazzjoni ta' sustanzi kimiċi li ma jehtieġx klassifikazzjoni (eżitu negattiv) minn sustanzi kimiċi ohrajn (eżitu pożittiv)

**Sustanza kimika:** Sustanza jew tahlita.

**Irritazzjoni tal-ghajnejn:** Il-produzzjoni ta' tibdil fl-ghajnejn wara l-applikazzjoni ta' sustanza kimika tat-test fil-wieċ ta' wara tal-ghajn, li jkun kompletament reversibbli fi żmien 21 jum mill-applikazzjoni. Interkambjabbli ma' "effetti reversibbli fuq l-ghajnejn" u mal-Kategorija 2 tal-GHS tan-NU/tas-CLP.

**Rata ta' negattivi foloz:** Il-proporzjon ta' sustanzi kimiċi pożittivi kollha identifikati b'mod falz bħala negattivi minn metodu ta' ttestjar. Dan hu wiehed mill-indikaturi tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar.

**Rata ta' foloz pożittivi:** Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi negattivi kollha identifikati b'mod falz bħala pożittivi minn metodu ta' ttestjar. Dan hu wiehed mill-indikaturi tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar.

**Periklu:** Proprjetà inerenti ta' agent jew ta' sitwazzjoni li għandha l-potenzjal li tikkawża effetti avversi meta organiżmu, sistema jew (sub)popolazzjoni jiġu esposti għal dak l-agent.

**Kontroll b'medium:** Replika mhux trattata li fiha l-komponenti kollha ta' sistema tat-test. Dan il-kampjun jiġi proċessat b'kampjuni trattati bis-sustanza kimika tat-test u kampjuni tal-kontroll oħrajn biex jiġi determinat jekk is-solvent ikollux interazzjoni mas-sistema tat-test.

**Taħlita:** Taħlita jew soluzzjoni msawra minn żewġ sustanzi jew aktar.

**Sustanza monokostitwenti:** Sustanza, definita mill-kompożizzjoni kwantitattiva tagħha, li fiha kostitwent ewlieni wiehed ikun preżenti għal tal-anqas 80 % (w/w).

**MTT:** Bromur tat-3-(4,5-Dimetiltjażol-2-il)-2,5-difeniltetrażolju; Bromur tat-tetrażolju tal-blu tjażolil.

**Sustanza multikostitwenti:** Sustanza, definita mill-kompożizzjoni kwantitattiva tagħha, li fiha aktar minn kostitwent ewlieni wiehed ikunu preżenti f'konċentrazzjoni  $\geq 10$  % (w/w) u  $< 80$  % (w/w). Sustanza multikostitwenti hi r-riżultat ta' proċess tal-manifattura. Id-differenza bejn taħlita u sustanza multikostitwenti hi li taħlita tinkiseb bit-tħallit ta' żewġ sustanzi jew aktar mingħajr reazzjoni kimika. Sustanza multikostitwenti hi r-riżultat ta' reazzjoni kimika.

**OD:** Densità Ottika.

**Kontroll pożittiv:** Replika li jkun fiha l-komponenti kollha ta' sistema tat-test u trattata b'sustanza li jkun magħruf li tinduċi rispons pożittiv. Biex jiġi żgurat li l-varjabbiltà fir-rispons tal-kontroll pożittiv tkun tista' tiġi vvalutata tul iż-żmien, id-daqs tar-rispons pożittiv ma għandux ikun eċċessiv.

**Rilevanza:** Deskrizzjoni tar-relazzjoni tat-test mal-effett ta' interess u jekk huwiex sinifikanti u utli għal skop partikolari. Din tiddetermina kemm it-test għandu l-hila jkejjel jew ibassar b'mod korrett l-effett bijoloġiku ta' interess. Ir-rilevanza tinkorpora l-kunsiderazzjoni tal-akkuratezza (konkordanza) ta' metodu ta' ttestjar (10).

**Affidabbiltà:** Kejljiġet ta' kemm metodu ta' ttestjar jista' jitwettaq b'mod riproduċibbli fil-laboratorji u bejn il-laboratorji tul iż-żmien, meta jitwettaq billi jintuza l-istess protokoll. Din tiġi evalwata billi tkun ikkalkolata r-riproduċibbiltà fl-istess u bejn il-laboratorji u r-ripetibbiltà fl-istess laboratorju (13).

**Sensittività:** Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi pożittivi/attivi kollha li huma klassifikati kif suppost mit-test. Hi kejl tal-preċiżjoni għal metodu ta' ttestjar li jipproduċi riżultati kategorici, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' metodu ta' ttestjar (10).

**Hsara serja lill-ghajnejn:** Il-produzzjoni ta' hsara fit-tessut fl-ghajnejn, jew ta' tnaqqis fiziku serju tal-vista, wara li tiġi applikata sustanza kimika tat-test fuq is-superfiċje tal-ghajn, li ma jkunux riversibbli għalkollox fi żmien 21 jum mill-applikazzjoni. Interkambjabbli ma' "effetti irreversibbli fuq l-ghajn" u mal-Kategorija 1 tal-GHS tan-NU/tas-CLP.

**Kontroll b'solvent/veikolu:** Kampjun mhux trattat li fih il-komponenti kollha ta' sistema tat-test, inkluż is-solvent jew il-veikolu li jiġi proċessat mal-kampjuni trattati bis-sustanza kimika tat-test u kampjuni tal-kontroll oħra biex jiġi stabbilit ir-rispons bażi għall-kampjuni trattati bis-sustanza kimika tat-test dissolta fl-istess solvent jew veikolu. Meta jiġi ttestjat ma' kontroll b'medium konkorrenti, dan il-kampjun juri wkoll jekk is-solvent jew il-veikolu jkollux interazzjoni mas-sistema tat-test.

**Speċifità:** Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi negattivi/inattivi kollha li huma klassifikati kif suppost mit-test. Hi kejl tal-preċiżjoni għal metodu ta' ttestjar li jipproduċi riżultati kategorici, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' metodu ta' ttestjar (13).

**Sustanza:** Element kimiku u l-komposti tiegħu fl-istat naturali jew mislut minn kwalunkwe proċess ta' produzzjoni, li jinduci kull addittiv neċessarju għall-preżervazzjoni tal-istabbiltà tiegħu u kwalunkwe impurità li tirriżulta mill-proċess użat, iżda bl-esklużjoni ta' kull solvent li jista' jkun separat mingħajr ma tkun effettwata l-istabbiltà tas-sustanza jew mibdula l-kompożizzjoni tagħha.

**Tensjoattiv:** Imsejjah ukoll agent tensjoattiv, dan hu sustanza kimika, bħal detergent, li tista' tnaqqas it-tensjoni tas-superfiċje ta' likwidu u b'hekk tippermettilu jtellja' r-ragħwa jew jippenetra solidi; hu magħruf ukoll bħala agent li jxarrab.

**Sustanza kimika tat-test:** Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar.

**Strateġija ta' ttestjar sekwenzjali:** Strateġija ta' ttestjar gradwali li biha l-informazzjoni eżistenti kollha dwar sustanza kimika tat-test tiġi rieżaminata, f'ordni speċifiku, permezz ta' proċess tal-piż tal-evidenza f'kull livell biex jiġi determinat jekk hemmx biżżejjed informazzjoni disponibbli għal deċiżjoni dwar il-klassifikazzjoni tal-periklu, qabel ma wiehed jgħaddi għal-livell li jmiss. Jekk il-potenzjal ta' irritazzjoni ta' sustanza kimika tat-test jista' jiġi assenjat fuq il-bażi tal-informazzjoni eżistenti, ma jkun meħtieġ l-ebda ttestjar ieħor. Jekk il-potenzjal ta' irritazzjoni ta' sustanza kimika tat-test ma jkunx jista' jiġi assenjat fuq il-bażi tal-informazzjoni eżistenti, għandha ssir proċedura ta' ttestjar sekwenzjali fuq l-annimali sakemm tkun tista' ssir klassifikazzjoni mhux ekwivoka.

**Approċċ Minn Fuq Għal Isfel:** approċċ sekwenzjali użat għal sustanza kimika tat-test suspettata li tikkawża ħsara serja lill-ghajnejn, li jibda bid-determinazzjoni ta' sustanzi kimiċi li jinduċu ħsara serja lill-ghajnejn (eżitu pożittiv) minn sustanzi kimiċi oħra (eżitu negattiv).

**Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi tan-Nazzjonijiet Uniti (GHS tan-NU):** Sistema li tipproponi l-klassifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi (sustanzi u taħlitiet) skont it-tipi u l-livelli standardizzati ta' perikli fiżiċi, sanitarji u ambjentali, u tindirizza l-elementi ta' komunikazzjoni korrispondenti, bħal pittogrammi, kliem ta' twissija, dikjarazzjonijiet ta' periklu, dikjarazzjonijiet ta' prekawzjoni u skedi ta' *data* dwar is-sikurezza, biex jitwassal tagħrif dwar l-effetti avversi bil-ghan li n-nies ikunu protetti (inklużi min iħaddem, il-ħaddiema, it-trasportaturi, il-konsumaturi u min jintervjeni f'emergenza) u l-ambjent (1).

**Kategorija 1 tal-GHS tan-NU/tas-CLP:** Ara “Ħsara serja lill-ghajnejn”.

**Kategorija 2 tal-GHS tan-NU/tas-CLP:** Ara “Irritazzjoni tal-ghajnejn”.

**Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU/tas-CLP:** Sustanzi kimiċi li mhumiex klassifikati bħala tal-Kategorija 1 jew 2 tal-GHS tan-NU/tas-CLP (jew tal-Kategorija 2A jew 2B tal-GHS tan-NU).

**UVCB:** sustanzi b'kompożizzjoni varjabbli jew mhux magħrufa, prodotti jew materjali bijoloġiċi b'reazzjoni kumplessa.

## **B.69 METODU TA' TTESTJAR TAL-EPITELJU BHALL-KORNEA UMANA RIKOSTITWITA (RhCE) GHALL-IDENTIFIKAZZJONI TA' SUSTANZI KIMIČI LI MA JEHTIĠUX KLASSIFIKAZZJONI U TIKKETJAR GHALL-IRRITAZZJONI TAL-GHAJNEJN JEW GHAL HSARA SERJA LILL-GHAJNEJN**

### **INTRODUZZJONI**

1. Dan il-metodu ta' ttestjar (TM) hu ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 492 tal-OECD (2017). *Hsara serja lill-għajnejn* tirreferi għall-produzzjoni ta' hsara fit-tessut tal-għajnejn, jew tnaqqis fiżiku serju tal-vista, wara l-applikazzjoni ta' sustanza kimika tat-test fuq is-superfiċje anterjuri tal-għajn, li ma jkunux reversibbli għalkollox fi żmien 21 jum mill-applikazzjoni, kif definita mis-Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi tan-Nazzjonijiet Uniti (GHS tan-NU) (1) u mir-Regolament tal-Unjoni Ewropea (UE) 1272/2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet (CLP)<sup>1</sup>. Skont il-GHS tan-NU u s-CLP ukoll, *irritazzjoni tal-għajnejn* tirreferi għall-produzzjoni ta' tibdil fl-għajnejn wara l-applikazzjoni ta' sustanza kimika tat-test fil-wieċ ta' wara tal-għajn, li jkun kompletament reversibbli fi żmien 21 jum mill-applikazzjoni. Sustanzi kimiċi tat-test li jinduċu hsara serja lill-għajnejn huma klassifikati bhala tal-Kategorija 1 tal-GHS tan-NU u tas-CLP, filwaqt li dawk li jinduċu irritazzjoni tal-għajnejn huma klassifikati bhala tal-Kategorija 2 tal-GHS tan-NU u tas-CLP. Is-sustanzi kimiċi tat-test mhux klassifikati għal irritazzjoni tal-għajnejn jew għal hsara serja lill-għajnejn huma definiti bhala dawk li ma jissodisfawx ir-rekwiżiti għall-klassifikazzjoni fil-Kategorija 1 jew 2 (2A jew 2B) tal-GHS tan-NU u tas-CLP, jigiġifieri huma msejha bhala tal-Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU u tas-CLP.
2. Il-valutazzjoni ta' hsara serja lill-għajnejn/irritazzjoni tal-għajnejn tipikament kienet tinvolvi l-użu ta' annimali tal-laboratorju (TM B.5 (2)). L-għażla tal-aktar metodu ta' ttestjar xieraq u l-użu ta' dan il-metodu ta' ttestjar għandhom jiġu kkunsidrati fil-

---

<sup>1</sup> Ir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tas-16 ta' Diċembru 2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet, li jemenda u jhassar id-Direttivi 67/548/KEE u 1999/45/KE, u li jemenda r-Regolament (KE) Nru 1907/2006, ĠU L 353/1, 31.12.2008

kuntest tad-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar Approċċi Integrati dwar l-Ittestjar u l-Valutazzjoni għal Hsara Serja lill-Għajnejn u l-Irritazzjoni tal-għajnejn (39).

3. Dan il-metodu ta' ttestjar jiddeskrivi proċedura *in vitro* li tippermetti li jiġu identifikati sustanzi kimiċi (sustanzi u taħlitiet) li ma jeħtigux klassifikazzjoni u tikkettar għall-irritazzjoni tal-għajnejn jew għal hsara serja lill-għajnejn skont il-GHS tan-NU u s-CLP. Juża l-epitelju bħall-kornea umana rikostitwita (RhCE) li jimita mill-qrib il-proprjetajiet istoloġiċi, morfoloġiċi, bijokimiċi u fiżjoloġiċi tal-epitelju korneali uman. Ġew validati erba' metodi ta' ttestjar *in vitro* oħra, meqjusa xjentifikament validi u adottati bħala t-TM B.47 (3), B.48 (4), B.61 (5) u B.68 (6) biex jindirizzaw il-punt ta' tmiem tas-saħħa tal-bniedem ta' hsara serja lill-għajnejn/irritazzjoni tal-għajnejn.
4. F'dan il-metodu ta' ttestjar huma inklużi żewġ testijiet validati li jużaw mudelli RhE kummerċjalment disponibbli. Saru studji ta' validazzjoni għall-valutazzjoni ta' irritazzjoni tal-għajnejn/hsara serja lill-għajnejn (7)(8)(9)(10)(11)(12)(13) bl-użu ta' EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) u ta' SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). Kull wiehied minn dawn it-testijiet jagħmel użu minn binjiet ta' tessut tal-RhCE kummerċjalment disponibbli bħala sistema tat-test, li huma riferiti fit-test li ġej bħala l-Metodi ta' Referenza Validati – VRM 1 u VRM2, rispettivament. Minn dawn l-istudji ta' validazzjoni u mir-rieżami bejn il-pari indipendenti tagħhom (9)(12), ġie konkluż li EpiOcular™ EIT u SkinEthic™ HCE EIT kapaċi jidentifikaw kif suppost sustanzi kimiċi (kemm sustanzi kif ukoll taħlitiet) li ma jeħtigux klassifikazzjoni u tikkettar għall-irritazzjoni tal-għajnejn jew għall-hsara serja lill-għajnejn skont il-GHS tan-NU, u t-testijiet ġew rakkomandati bħala xjentifikament validi għal dak l-iskop (13).
5. Bhalissa ġeneralment hu aċċettat li, fil-futur qarib, ebda metodu ta' ttestjar *in vitro* uniku mhu se jkun jista' jiehu post bis-sħiħ it-test tal-għajnejn *in vivo* Draize (2)(14) biex ibassar il-medda sħiħa ta' risponsi ta' hsara serja lill-għajnejn/irritazzjoni tal-għajnejn għall-klassijiet differenti ta' sustanzi kimiċi. Madankollu, taħlitiet strateġiċi ta' diversi metodi ta' ttestjar alternattivi fi hdan strateġiji ta' ttestjar (sekwenzjali) bħall-approċċ minn Isfel għal Fuq/minn Fuq għal Isfel jaf ikunu kapaċi jieħdu post it-test Draize tal-għajnejn għalkollox (15). L-approċċ minn Isfel għal Fuq (15) hu mfassal biex jintuża meta, fuq il-bażi tal-informazzjoni eżistenti, sustanza kimika tkun mistennija ma tikkawżawx irritazzjoni tal-għajnejn suffiċjenti biex teħtieġ klassifikazzjoni, filwaqt li l-approċċ minn Fuq għal Isfel (15) hu mfassal biex jintuża meta, fuq il-bażi tal-informazzjoni eżistenti, sustanza kimika tkun mistennija tikkawża hsara serja lill-għajnejn. EpiOcular™ EIT u SkinEthic™ HCE EIT huma rakkomandati biex jiġu identifikati sustanzi kimiċi li ma jeħtigux klassifikazzjoni għall-irritazzjoni tal-għajnejn jew għall-hsara serja lill-għajnejn skont (Ebda

Kategorija) il-GHS tan-NU/is-CLP mingħajr ittestjar ulterjuri, fi hdan strategija ta' ttestjar bhall-approċċ minn Isfel għal Fuq/minn Fuq għal Isfel sugġerit minn Scott *et al.* eż. bhala pass inizjali f'approċċ minn Isfel għal Fuq jew bhala wiehed mill-aħħar passi f'approċċ minn Fuq għal Isfel (15). Madankollu, EpiOcular™ EIT u SkinEthic™ HCE EIT mhumie x maħsuba biex jagħmlu distinzjoni bejn il-Kategorija 1 tal-GHS tan-NU/tas-CLP (hsara serja lill-ghajnejn) u l-Kategorija 2 tal-GHS tan-NU/tas-CLP (irritazzjoni tal-ghajnejn). Din id-differenzazzjoni se jkollha bżonn tiġi indirizzata minn saff iehor ta' strategija tat-test (15). B'hekk, sustanza kimika tat-test li tiġi identifikata bhala wahda li tehtieg klassifikazzjoni għal irritazzjoni tal-ghajnejn/hsara serja lill-ghajnejn b'EpiOcular™ EIT jew SkinEthic™ HCE EIT se tkun tehtieg ittestjar addizzjonali (*in vitro* u/jew *in vivo*) biex tinkiseb konkluzjoni definittiva (Ebda Kategorija, Kategorija 2 jew Kategorija 1 tal-GHS tan-NU/tas-CLP), billi jintuza, eż., it-TM B.47, B.48, B.61 jew B.68.

6. L-iskop ta' dan il-metodu ta' ttestjar hu li jiddeskrivi l-proċedura użata għall-evalwazzjoni tal-potenzjal li sustanza kimika tat-test tikkawża periklu għall-ghajnejn fuq il-bażi tal-ħila tagħha li tinduċi ċitotossicità f'binja tat-tessut tal-RhCE, kif imkejla mill-assaġġ tal-MTT (16) (ara l-paragrafu 21). Il-vijabbiltà tat-tessut tal-RhCE wara l-esponiment għal sustanza kimika tat-test hi determinata meta dawn jitqabblu ma' tessuti trattati bis-sustanza tal-kontroll negattiv ( % vijabbiltà), u mbagħad tintuza biex jitbassar il-potenzjal ta' periklu tas-sustanza kimika tat-test għall-ghajnejn.
7. Hemm standards tal-prestazzjoni (17) disponibbli biex jiffaċilitaw il-validazzjoni ta' testijiet *in vitro* godda jew modifikati bbażati fuq l-RhCE simili għal EpiOcular™ EIT u għal SkinEthic™ HCE EIT, skont il-prinċipji tad-Dokument ta' Gwida tal-OECD Nru 34 (18), u jippermettu għall-emendar puntwali tat-TG 492 tal-OECD għall-inklużjoni tagħhom. Aċċettazzjoni Reċiproka tad-Data (MAD) skont il-ftehim tal-OECD se tkun garantita biss għal testijiet validati skont l-istandards tal-prestazzjoni, jekk dawn it-testijiet ikunu ġew rieżaminati u inklużi fil-linja gwida tat-test korrispondenti mill-OECD.

## DEFINIZZJONIJIET

8. Id-definizzjonijiet huma pprovduti fl-Appendiċi 1.

## KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

9. Dan il-metodu ta' ttestjar hu bbażat fuq binjiet tat-tessuti tal-RhCE tridimensjonali kummerċjali li huma prodotti bl-użu ta' keratinoċiti epidermali umani primarji



(jiġifieri EpiOcular™ OCL-200) jew ċelloli epiteljali korneali immortalizzati umani (jiġifieri SkinEthic™ HCE/S). Il-binjiet tat-tessuti EpiOcular™ OCL-200 u SkinEthic™ HCE/S RhCE huma simili għall-istruttura tridimensjonali tal-epitelju korneali *in vivo* u huma prodotti bl-użu ta' ċelloli mill-ispeċijiet ta' interess (19)(20). Barra minn hekk, it-testijiet ikejlu b'mod dirett iċ-ċitotossicità li tirriżulta mill-penetrazzjoni tas-sustanza kimika permezz tal-kornea u mill-produzzjoni ta' ħsara fiċ-ċelloli u fit-tessuti; ir-rispons ċitotossiku mbagħad jiddetermina l-eżitu *in vivo* generali ta' ħsara serja lill-għajnejn/ta' irritazzjoni tal-għajnejn. Il-ħsara fiċ-ċelloli tista' ssehh b'diversi modalitajiet ta' azzjoni (ara l-paragrafu 20), iżda iċ-ċitotossicità taqdi rwol mekkanistiku importanti, jekk mhux dak primarju, fid-determinazzjoni tar-rispons generali ta' ħsara serja lill-għajnejn/irritazzjoni tal-għajnejn ta' sustanza kimika, muri *in vivo* primarjament minn opaċità korneali, irite, ħmura konguntivali u/jew kemożi konguntivali, indipendentement mill-proċessi fiżikokimiċi li huma fil-bażi tal-ħsara fit-tessuti.

10. Medda wiesgħa ta' sustanzi kimiċi, li tkopri varjetà kbira ta' tipi ta' sustanzi kimiċi, ta' klassijiet ta' sustanzi kimiċi, ta' piżijiet molekolari, ta' LogPs, ta' strutturi ta' sustanzi kimiċi, eċċ., ġiet ittestjata fl-istudju ta' validazzjoni li hu l-bażi ta' dan il-metodu ta' ttestjar. Il-bażi ta' *data* ta' validazzjoni ta' EpiOcular™ EIT kien fiha 113-il sustanza kimika b'kollox, li jkopru 95 grupp funzjonali organiku differenti skont analiżi tas-sett ta' għodod tal-QSAR tal-OECD (8). Il-maġġoranza ta' dawn is-sustanzi kimiċi kienet tirrappreżenta sustanzi monokostitwenti, iżda diversi sustanzi multikostitwenti (inklużi 3 omopolimeri, 5 kopolimeri u 10 kważi polimeri) ġew inklużi wkoll fl-istudju. F'termini tal-istat fiżiku u tal-Kategoriji tal-GHS tan-NU/tas-CLP, il-113-il sustanza kimika ttestjati ġew distribwiti kif ġej: 13-il likwidu tal-Kategorija 1, 15-il solidu tal-Kategorija 1, 6 likwidi tal-Kategorija 2A, 10 solidi tal-Kategorija 2A, 7 likwidi tal-Kategorija 2B, 7 solidi tal-Kategorija 2B, 27 likwidu ta' Ebda Kategorija u 28 solidu ta' Ebda Kategorija (8). Il-bażi ta' *data* ta' validazzjoni ta' SkinEthic™ HCE EIT kien fiha 200 sustanza kimika b'kollox, li jkopru 165 grupp funzjonali organiku differenti (8)(10)(11). Il-maġġoranza ta' dawn is-sustanzi kimiċi kienet tirrappreżenta sustanzi monokostitwenti, iżda diversi sustanzi multikostitwenti (inklużi 10 polimeri) ġew inklużi wkoll fl-istudju. F'termini tal-istat fiżiku u tal-Kategoriji tal-GHS tan-NU/tas-CLP, il-200-il sustanza kimika ttestjati ġew distribwiti kif ġej: 27 likwidu tal-Kategorija 1, 24 solidu tal-Kategorija 1, 19-il likwidu tal-Kategorija 2A, 10 solidi tal-Kategorija 2A, 9 likwidi tal-Kategorija 2B, 8 solidi tal-Kategorija 2B, 50 likwidu ta' Ebda Kategorija u 53 solidu ta' Ebda Kategorija (10)(11).
11. Dan il-metodu ta' ttestjar hu applikabbli għal sustanzi u għal taħlitiet, u għal solidi, għal likwidi, għal semisolidi u għal xama'. Il-likwidi jistgħu jkunu jew ma jkunux milwiema; is-solidi jistgħu jkunu jew ma jkunux solubbli fl-ilma. Kull meta dan ikun

possibbli, is-solidi għandhom jiġu mithuna fi trab fin qabel ma jiġu applikati; mhu meħtieġ ebda pretrattament ieħor tal-kampjun. Il-gassijiet u l-aerosols ma ġewx ivvalutati fi studju ta' validazzjoni. Filwaqt li huwa mifhum li dawn jistgħu jiġu ttestjati billi tintuża t-teknoloġija tal-RhCE, il-metodu ta' ttestjar attwali ma jippermettix l-ittestjar ta' gassijiet u ta' aerosols.

12. Is-sustanzi kimiċi tat-test li jassorbu d-dawl fl-istess medda bħal MTT formażan (naturalment jew wara t-trattament) u s-sustanzi kimiċi tat-test li kapaċi jnaqqsu direttament l-MTT tal-kulurant vitali (għal MTT formażan) jistgħu jinterferixxu mal-kejljiet tal-vijabbiltà tat-tessut u jkollhom bżonn l-użu ta' kontrolli adattati għall-korrezzjonijiet. It-tip ta' kontrolli adattati li jistgħu jkunu meħtieġa se jvarja skont it-tip ta' interferenza prodotta mis-sustanza kimika tat-test u l-proċedura użata biex jiġi kwantifikat l-MTT formażan (ara l-paragrafi 36-42).
13. Ir-rizultati generati fl-istudji ta' prevalidazzjoni (21)(22) u ta' validazzjoni shiħa (8)(10)(11) urew li kemm EpiOcular™ EIT kif ukoll SkinEthic™ HCE EIT huma trasferibbli għal laboratorji meqjusa li jkunu għadhom ġodda fit-twettiq tal-assaġġi u li huma wkoll riproducibbli fi hdan u bejn il-laboratorji. Fuq il-bażi ta' dawn l-istudji, il-livell ta' riproducibbiltà f'termini ta' konkordanza tat-tbassiriet li jistgħu jkunu mistennija minn EpiOcular™ EIT minn *data* dwar 113-il sustanza kimika hu fl-ordni ta' 95 % fi hdan il-laboratorji u ta' 93 % bejn il-laboratorji. Il-livell ta' riproducibbiltà f'termini ta' konkordanza tat-tbassiriet li jistgħu jkunu mistennija minn SkinEthic™ HCE EIT minn *data* dwar 120 sustanza kimika hu fl-ordni ta' 92 % fi hdan il-laboratorji u ta' 95 % bejn il-laboratorji.
14. EpiOcular™ EIT jista' jintuża biex jidentifika sustanzi kimiċi li ma jeħtigux klassifikazzjoni għall-irritazzjoni tal-ġhajnejn jew ħsara serja lill-ġhajnejn skont is-sistema ta' klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU u s-CLP. Fid-dawl tad-*data* miksuba fl-istudju ta' validazzjoni (8), EpiOcular™ EIT għandu akkuratezza ġenerali ta' 80 % (fuq il-bażi ta' 112-il sustanza kimika), sensitività ta' 96 % (fuq il-bażi ta' 57 sustanza kimika), rata ta' negattivi foloz ta' 4 % (fuq il-bażi ta' 57 sustanza kimika), speċifità ta' 63 % (fuq il-bażi ta' 55 sustanza kimika) u rata ta' pożittivi foloz ta' 37 % (fuq il-bażi ta' 55 sustanza kimika), meta mqabbel mad-*data* ta' referenza tat-test *in vivo* fuq ġhajnejn il-fniek (TM B.5) (2)(14) klassifikata skont is-sistema ta' klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU u tas-CLP. Studju li fih 97 formulazzjoni agrokimika likwida ġew ittestjati b'EpiOcular™ EIT wera prestazzjoni simili tal-metodu ta' ttestjar għal dan it-tip ta' taħlitiet kif miksuba fl-istudju ta' validazzjoni (23). Is-97 formulazzjoni kienu distribwiti kif ġej: 21 tal-Kategorija 1, 19 tal-Kategorija 2A, 14 tal-Kategorija 2B u 43 tal-Ebda Kategorija, klassifikati skont is-sistema ta' klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU fuq il-bażi ta' *data* ta' referenza tat-test *in vivo* fuq ġhajnejn il-fniek (TM B.5) (2)(14). Inkisbu akkuratezza ġenerali ta' 82 % (fuq il-bażi

ta' 97 formulazzjoni), sensitività ta' 91 % (fuq il-bażi ta' 54 formulazzjoni), rata ta' negattivi foloz ta' 9 % (fuq il-bażi ta' 54 formulazzjoni), speċifità ta' 72 % (fuq il-bażi ta' 43 formulazzjoni) u rata ta' pożittivi foloz ta' 28 % (fuq il-bażi ta' 43 formulazzjoni) (23).

15. SkinEthic™ HCE EIT jista' jintuża biex jidentifika sustanzi kimiċi li ma jehtigux klassifikazzjoni għall-irritazzjoni tal-ghajnejn jew hsara serja lill-ghajnejn skont is-sistema ta' klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU u s-CLP. Fid-dawl tad-*data* miksuba fl-istudju ta' validazzjoni (10)(11), SkinEthic™ HCE EIT għandu akkuratezza ġenerali ta' 84 % (fuq il-bażi ta' 200 sustanza kimika), sensitività ta' 95 % (fuq il-bażi ta' 97 sustanza kimika), rata ta' negattivi foloz ta' 5 % (fuq il-bażi ta' 97 sustanza kimika), speċifità ta' 72 % (fuq il-bażi ta' 103 sustanzi kimiċi) u rata ta' pożittivi foloz ta' 28 % (fuq il-bażi ta' 103 sustanzi kimiċi), meta mqabbel mad-*data* ta' referenza tat-test *in vivo* fuq ghajnejn il-fniek (TM B.5) (2)(14) klassifikata skont is-sistema ta' klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU u tas-CLP.
16. Ir-rati ta' negattivi foloz miksuba biż-żewġ testijiet tal-RhCE, b'sustanzi jew inkella b'tahlitiet, jaqgħu fi hdan il-probabbiltà ġenerali ta' 12 % li s-sustanzi kimiċi jigu identifikati bħala tal-Kategorija 2 tal-GHS tan-NU u tas-CLP u tal-Ebda Kategorija tas-CLP mit-test *in vivo* tal-ghajnejn Draize, f'testijiet ripetuti; dan hu dovut għall-varjabbiltà inerenti fi hdan it-test tal-metodu (24). Ir-rati ta' pożittivi foloz miksuba biż-żewġ metodi ta' ttestjar tal-RhCE b'sustanzi jew inkella b'tahlitiet mhumix kritiċi fil-kuntest ta' dan il-metodu ta' ttestjar peress li s-sustanzi kimiċi tat-test kollha li jipproduċu vijabbiltà tat-tessuti daqs jew anqas mil-limiti stabbiliti (ara l-paragrafu 44) se jkunu jehtieġu ttestjar ulterjuri b'metodi ta' ttestjar *in vitro* ohra, jew bħala l-aħħar rikors fil-fniek, skont ir-rekwiziti regolatorji, bl-użu ta' strategija ta' ttestjar sekwenzjali f'approċċ ta' piż tal-evidenza. Dawn il-metodi ta' ttestjar jistgħu jintużaw għat-tipi kollha ta' sustanzi kimiċi, li bihom għandu jinkiseb riżultat negattiv talli sustanza kimika ma tiġix klassifikata għal irritazzjoni tal-ghajnejn u għal hsara serja lill-ghajnejn (Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU u tas-CLP). Għandhom jigu kkonsultati l-awtoritajiet regolatorji xierqa qabel l-użu ta' EpiOcular™ EIT u ta' SkinEthic™ HCE EIT skont skemi ta' klassifikazzjoni ohrajn li mhumix il-GHS tan-NU/is-CLP.
17. Limitazzjoni ta' dan il-metodu ta' ttestjar hu li ma jippermettix għal diskriminazzjoni bejn irritazzjoni tal-ghajn/effetti reversibbli fuq l-ghajn (Kategorija 2) u hsara serja lill-ghajn/effetti irriversibbli fuq l-ghajn (Kategorija 1) kif definiti mill-GHS tan-NU u mis-CLP, u lanqas bejn irritanti tal-ghajn (Kategorija 2A fakultattiva) u irritanti ħfief tal-ghajn (Kategorija 2B fakultattiva), kif definiti mill-GHS tan-NU (1). Għal dawn l-ghanijiet ikun mehtieġ ittestjar ulterjuri b'metodi ta' ttestjar *in vitro* ohra.

18. It-terminu “sustanza kimika tat-test” jintuza f’dan il-metodu ta’ ttestjar biex jirreferi għal dak li jkun qed jiġi ttestjat<sup>1</sup> u mhux b’rabta mal-applikabbiltà tal-metodu ta’ ttestjar tal-RhCE għall-ittestjar ta’ sustanzi u/jew ta’ taħlitiet.

## PRINĊIPJU TAT-TEST

19. Is-sustanza kimika tat-test tiġi applikata fuq il-ġilda ta’ tal-anqas żewġ binjiet tat-tessut tal-RhCE tridimensjonali u l-vijabbiltà tat-tessuti titkejjel wara l-esponiment u perjodu inkubazzjoni ta’ wara t-trattament. It-tessuti tal-RhCE jiġu rikostitwiti minn keratinociti epidermali umani primarji jew minn ċelloli epiteljali korneali immortalizzati umani, li jkunu ġew kulturati għal diversi granet biex jiffurmaw epitelju skwamuż differenzjat hafna u stratifikat li jkun morfoloġikament simili għal dak li jinstab fil-kornea umana. Il-binja tat-tessut tal-RhCE EpiOcular™ tikkonsisti f’tal-anqas 3 saffi vijabbli ta’ ċelloli u f’wiċċ mhux keratinizzat, u turi struttura bħall-kornea analoga għal dik misjuba *in vivo*. Il-binja tat-tessuti tal-RhCE SkinEthic™ HCE tikkonsisti f’tal-anqas 4 saffi vijabbli ta’ ċelloli li jinkludu ċelloli bażali kolonnari, ċelloli transizzjonali tal-ġwienah u ċelloli skwamużi superficjali simili għal dawk tal-epitelju korneali uman normali (20)(26).
20. Hsara serja lill-ghajnejn/irritazzjoni tal-ghajnejn indotta kimikament, manifestata *in vivo* primarjament minn opaċità korneali, minn irite, minn hmura konguntivali u/jew minn kemożi konguntivali, hi r-risultat ta’ diversi avvenimenti li jibdew bil-penetrazzjoni tas-sustanza kimika fil-kornea u/jew fil-konguntiva u bil-produzzjoni ta’ hsara fiċ-ċelloli. Il-hsara fiċ-ċelloli tista’ ssehh b’diversi modalitajiet ta’ azzjoni, li jinkludu: liżi tal-membrana taċ-ċelloli (eż. minn tensjoattivi, minn solventi organiċi); koagulazzjoni ta’ makromolekoli (b’mod partikolari proteini) (eż. minn tensjoattivi, minn solventi organiċi, minn alkalis u minn aċidi); saponifikazzjoni ta’ lipidi (eż. minn alkali); u alkilazzjoni jew interazzjonijiet kovalenti oħra b’makromolekoli (eż. minn bliċis, perossidi u alkilaturi) (15)(27)(28). Madankollu, intwera li ċ-ċitotossicità taqdi rwol mekkanistiku importanti, jekk mhux primarju, fid-determinazzjoni tar-rispons ġenerali għall-hsara serja lill-ghajnejn/ghall-irritazzjoni tal-ghajnejn ta’ sustanza kimika, indipendentement mill-proċessi fizikokimiċi li huma l-bażi tal-hsara

---

<sup>1</sup> F’Ġunju 2013, il-Laqgħa Kongunta tal-OECD qablet li, fejn possibbli, issa għandu jiġi applikat użu aktar konsistenti tat-terminu “sustanza kimika tat-test” li jiddeskrivi dak li jkun qed jiġi ttestjat f’linji gwida tat-test godda u aġġornati tal-OECD.

fit-tessut (29)(30). Barra minn hekk, il-potenzjal ta' hsara serja lill-ghajnejn/irritazzjoni tal-ghajnejn ta' sustanza kimika hu primarjament determinat mill-firxa ta' korriment inizjali (31), li tikkorrelata mal-firxa ta' mewt ta' ċelloli (29) u mal-firxa tar-risponsi sussegwenti u tal-eżiti eventwali (32). B'hekk, irritanti ħfief generalment jaffettwat biss l-epitelju korneali superfiċjali, l-irritanti ħfief u moderata jagħmlu hsara primarjament lill-epitelju u lill-istroma superfiċjali u l-irritanti severi jagħmlu hsara lill-epitelju, lill-istroma fonda u kultant lill-endotelju korneali (30)(33). Il-kejl tal-vijabbiltà tal-binja tat-tessuti tal-RhCE wara l-esponiment topiku għal sustanza kimika tat-test biex jiġu identifikati sustanzi kimiċi li ma jehtigux klassifikazzjoni għal hsara serja lill-ghajnejn/irritazzjoni tal-ghajnejn (Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU u tas-CLP) hu bbażat fuq is-suppożizzjoni li s-sustanzi kimiċi kollha li jinduċu hsara serja lill-ghajnejn jew irritazzjoni tal-ghajnejn jinduċu ċitotossicità fl-epitelju korneali u/jew fil-konguntiva.

21. Il-vijabbiltà tat-tessuti tal-RhCE titkejjel b'konverżjoni enzimatika tal-kulurant vitali MTT [Bromur tat-3-(4,5-Dimetiltjazo-2-il)-2,5- difeniltetrazolu; Bromur tat-tetrazolu tal-blu tjazolil; Numru CAS 298-93-1] miċ-ċelloli vijabbli tat-tessut f'melħ tal-formažan MTT blu li jitkejjel b'mod kwantitattiv wara l-estrazzjoni mit-tessuti (16). Sustanzi kimiċi li ma jehtigux klassifikazzjoni u tikkettar (Ebda Kategorija) tal-GHS tan-NU/tas-CLP huma identifikati bħala dawk li ma jnaqqsx il-vijabbiltà tat-tessuti f'livell anqas minn limitu definit (jiġifieri vijabbiltà tat-tessuti ta' > 60 %, f'EpiOcular™ EIT u fi SkinEthic™ HCE EITL<sup>1</sup>, jew ta' > 50 %, fi SkinEthic™ HCE EITS<sup>2</sup>) (ara l-paragrafu 44).

## WIRI TAL-PROFIĊJENZA

22. Qabel l-użu ta' rutina ta' testijiet tal-RhCE għal finijiet regolatorji, il-laboratorji għandhom juru profiċjenza teknika billi jfassru kif suppost il-hmistax-il sustanza kimika ta' profiċjenza elenkati fit-Tabella 1. Dawn is-sustanzi kimiċi ntgħażlu mis-sustanzi kimiċi użati fl-istudji ta' validazzjoni tal-VRMs (8)(10)(11). L-għażla, sa fejn possibbli, tinkludi sustanzi kimiċi li: (i) ikopru stati fiżiċi differenti; (ii) ikopru l-

---

<sup>1</sup> EITL: EIT għal likwidi fil-każ ta' SkinEthic™ HCE

<sup>2</sup> EITS: EIT għal solidi fil-każ ta' SkinEthic™ HCE

medda shiħa ta' risponsi *in vivo* ta' ħsara serja lill-ghajnejn/irritazzjoni tal-ghajnejn fuq il-baži ta' riżultati ta' kwalità għolja miksba fit-test *in vivo* ta' referenza fuq ghajnejn il-fniek (TM B.5) (2)(14) u s-sistema ta' klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU (jigifieri l-Kategoriji 1, 2A, 2B jew Ebda Kategorija) (1) u s-sistema ta' klassifikazzjoni tas-CLP (jigifieri l-Kategoriji 1, 2 jew Ebda Kategorija); (iii) ikopru d-diversi fatturi *in vivo* tal-klassifikazzjoni (24)(25); (iv) huma rappreżentattivi tal-klassijiet kimiċi użati fl-istudju ta' validazzjoni (8)(10)(11); (v) ikopru rappreżentazzjoni tajba u wiesgħa ta' gruppi funzjonali organiċi (8)(10)(11); (vi) għandhom strutturi kimiċi li huma definiti sew (8)(10)(11); (vii) huma kkuluriti u/jew riduċenti diretti tal-MTT; (viii) ipproduċew riżultati riproducibbli fil-metodi ta' ttestjar tal-RhCE matul il-validazzjonijiet tagħhom; (ix) tbassru kif suppost mill-metodi ta' ttestjar tal-RhCE matul l-istudji ta' validazzjoni tagħhom; (x) ikopru l-medda shiħa ta' risponsi *in vitro* fuq il-baži ta' *data* ta' kwalità għolja tal-metodi ta' ttestjar tal-RhCE (vijabbiltà ta' 0 sa 100 %); (xi) huma kummerċjalment disponibbli; u (xii) mhumiex assoċjati ma' spejjeż projbittivi ta' xiri u/jew ta' rimi. F'sitwazzjonijiet li fihom sustanza kimika elenkata ma tkunx disponibbli jew ma tkunx tista' tintuża għal raġunijiet ġustifikati oħra, tista' tintuża sustanza kimika oħra li tissodisfa l-kriterji deskritti hawn fuq, eż. mis-sustanzi kimiċi użati fil-validazzjoni tal-VRM. Madankollu, devjazzjonijiet bħal dawn għandhom ikunu ġustifikati.

**Tabella 1:** Lista ta' sustanzi kimiċi ta' profiċjenza

| Isem Kimiku                                                                                                                 | CASRN      | Grupp Funzjonali Organiku <sup>1</sup>                                              | Stat Fiziku | Vijabbiltà tal-VRM1 (%) <sup>2</sup> | Vijabbiltà tal-VRM2 (%) <sup>3</sup> | Tbassir tal-VRM                | Riduċent tal-MTT | Interf. tal-kulur |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|------------------|-------------------|
| <b>Kategorija <i>In Vivo</i> 1<sup>4</sup></b>                                                                              |            |                                                                                     |             |                                      |                                      |                                |                  |                   |
| Metiltjoglikolat                                                                                                            | 2365-48-2  | Ester tal-aċidu karbossiliku; Tjoalkohol                                            | L           | 10,9±6,4                             | 5,5±7,4                              | Ma tista' ssir ebda previżjoni | Y (b'saħħtu)     | L                 |
| Akrlat tal-idrossietil                                                                                                      | 818-61-1   | Akrlat; Alkohol                                                                     | L           | 7,5±4,7 <sup>5</sup>                 | 1,6±1,0                              | Ma tista' ssir ebda previżjoni | L                | L                 |
| 2,5-Dimetil-2,5-eżanedjol                                                                                                   | 110-03-2   | Alkohol                                                                             | S           | 2,3±0,2                              | 0,2±0,1                              | Ma tista' ssir ebda previżjoni | L                | L                 |
| Ossalat tas-sodju                                                                                                           | 62-76-0    | Aċidu ossokarbossiliku                                                              | S           | 29,0±1,2                             | 5,3±4,1                              | Ma tista' ssir ebda previżjoni | L                | L                 |
| <b>Kategorija <i>In Vivo</i> 2A<sup>4</sup></b>                                                                             |            |                                                                                     |             |                                      |                                      |                                |                  |                   |
| 2,4,11,13-Tetraazatetradekan-diimidammid, N,N''-bis(4-klorofenil)-3,12-diimino-, di-D-glukonat (20 %, milwiem) <sup>6</sup> | 18472-51-0 | Aloġenur eteroċikliku aromatiku; Aloġenur tal-aril; Grupp tad-diidrossil; Gwanidina | L           | 4,0±1,1                              | 1,3±0,6                              | Ma tista' ssir ebda previżjoni | L                | Y (dghajjef)      |
| Benzoat tas-sodju                                                                                                           | 532-32-1   | Aril; Aċidu karbossiliku                                                            | S           | 3,5±2,6                              | 0,6±0,1                              | Ma tista' ssir ebda previżjoni | L                | L                 |
| <b>Kategorija <i>In Vivo</i> 2B<sup>4</sup></b>                                                                             |            |                                                                                     |             |                                      |                                      |                                |                  |                   |
| Dietil toluammid                                                                                                            | 134-62-3   | Benżammid                                                                           | L           | 15,6±6,3                             | 2,8±0,9                              | Ma tista' ssir ebda previżjoni | L                | L                 |

| Isem Kimiku                                                                   | CASRN       | Grupp Funzjonali Organiku <sup>1</sup>                                                                                                 | Stat Fiziku | Vijabbiltà tal-VRM1 (%) <sup>2</sup> | Vijabbiltà tal-VRM2 (%) <sup>3</sup> | Tbassir tal-VRM                | Riduċent tal-MTT | Interf. tal-kulur |
|-------------------------------------------------------------------------------|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|------------------|-------------------|
| 2,2-Dimetil-3-metilenbiċiklo [2.2.1] ettan                                    | 79-92-5     | Alkan, ramifikat b'karbonju terzjarju; Alken; Biċikloettan; Karboċikli bi ċrieki pont; Ċikloalkan                                      | S           | 4,7±1,5                              | 15,8±1,1                             | Ma tista' ssir ebda previżjoni | L                | L                 |
| <b>Ebda Kategorija In Vivo<sup>4</sup></b>                                    |             |                                                                                                                                        |             |                                      |                                      |                                |                  |                   |
| 1-Etil-3-metilimidazolju etilsulfat                                           | 342573-75-5 | Alkossi; Melh tal-ammonju; Aril; Imidazol; Sulfat                                                                                      | L           | 79,9±6,4                             | 79,4±6,2                             | Ebda Kat                       | L                | L                 |
| Eter tad-dikaprilil                                                           | 629-82-3    | Alkossi; Eter                                                                                                                          | L           | 97,8±4,3                             | 95,2±3,0                             | Ebda Kat                       | L                | L                 |
| Butossidu tal-piperonil                                                       | 51-03-6     | Alkossi; Benżodiossol; Benżil; Eter                                                                                                    | L           | 104,2±4,2                            | 96,5±3,5                             | Ebda Kat                       | L                | L                 |
| Żejt tar-riġnu idroġenat tal-glikol tal-polietilen (PEG-40)                   | 61788-85-0  | Aċilal; Alkohol; Allil; Eter                                                                                                           | Viskuż      | 77,6±5,4                             | 89,1±2,9                             | Ebda Kat                       | L                | L                 |
| 1-(4-Klorofenil)-3-(3,4-diklorofenil) urea                                    | 101-20-2    | Aloġenur eteroċikliku aromatik; Aloġenur tal-aril; Derivati tal-urea                                                                   | S           | 106,7±5,3                            | 101,9±6,6                            | Ebda Kat                       | L                | L                 |
| 2,2'-Metilen-bis-(6-(2H-benzotriazol-2-il)-4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenol) | 103597-45-1 | Alkan ramifikat b'karbonju kwaternarju; Aromatiku karboċikliku fuż; Eteroċikli saturati fużi; Komposti kwinojdi prekursori; terz-Butil | S           | 102,7±13,4                           | 97,7±5,6                             | Ebda Kat                       | L                | L                 |
| Tetrafluworoborat tal-potassju                                                | 14075-53-7  | Melh Inorganiku                                                                                                                        | S           | 88,6±3,3                             | 92,9±5,1                             | Ebda Kat                       | L                | L                 |

Abbrevjazzjonijiet: CASRN = Numru tar-Reġistru tas-Servizz tat-Taqsiriet tas-Sustanzi Kimiċi; GHS tan-NU = Is-Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi tan-Nazzjonijiet Uniti (1); VRM1 = Metodu ta' Referenza Validat, EpiOcular™ EIT; VRM2 = Metodu ta' Referenza Validat, SkinEthic™ HCE EIT; Interf. tal-kulur = interferenza tal-kulur bil-kejl tal-assorbanza standard (Densità Ottika (OD)) tal-formażan MTT.

<sup>1</sup>Grupp funzjonali organiku assenjat skont analiżi inkorporata tas-Sett ta' Ghodod 3.1 tal-OECD (8).

<sup>2</sup>Fuq il-bażi tar-riżultati miksuba b'EpiOcular™ EIT\_fil-EURL ECVAM/Cosmetics Europe Eye Irritation Validation Study (EIVS) (8).

<sup>3</sup> Fuq il-bażi tar-riżultati miksuba bi SkinEthic™ HCE EIT fl-istudju ta' validazzjoni (10)(11).

Fuq il-bażi tar-riżultati mit-test *in vivo* fuq għajnejn il-fniek (TM B.5/OECD TG 405) (2)(14) u bl-użu tal-GHS tan-NU.



<sup>5</sup>Fuq il-bażi tar-riżultati miksuba fis-CEFIC CONsortium for *in vitro* Eye Irritation testing strategy (CON4EI) Study.

<sup>6</sup>Klassifikazzjoni bhala 2A jew 2B tiddependi mill-interpretazzjoni tal-kriterju tal-GHS tan-NU għad-distinzjoni bejn dawn iż-żewġ kategoriji, jiġifieri 1 minn 3 vs 2 minn 3 annimali b'effetti fil-jum 7 neċessarji biex tiġi generata klassifikazzjoni tal-Kategorija 2A. L-istudju *in vivo* kien jinkludi 3 annimali. Il-punti ta' tmiem kollha apparati l-opacità korneali f'annimal wieħed irkupraw għal punteġġ ta' zero sal-jum 7 jew qabel. L-annimal li ma rkuprax għalkollox sal-jum 7 kellu punteġġ ta' opacità korneali ta' 1 (fil-jum 7) li rkupra għalkollox fil-jum 9.

23. Bħala parti mill-ittestjar tal-profiċjenza, hu rakkomandat li l-utenti jivverifikaw il-karatteristiċi ta' protezzjoni tat-tessuti wara li dawn jiġu riċevuti kif speċifikat mill-produttur tal-binja tat-tessuti tal-RhCE (ara l-paragrafi 25, 27 u 30). Dan hu ta' importanza partikolari jekk it-tessuti jintbagħtu minn distanzi twal / jekk idumu biex jaslu. Ladarba test ikun ġie stabbilit b'suċċess u tkun inkisbet u ntweriet profiċjenza fl-użu tiegħu, verifika bħal din ma għandhiex tkun meħtieġa fuq bażi ta' rutina. Madankollu, meta jintuża test b'rutina, hu rakkomandat li jibqgħu jiġu vvalutati l-karatteristiċi ta' protezzjoni f'intervalli regolari.

## PROCEDURA

24. It-testijiet li bħalissa huma koperti minn dan il-metodu ta' ttestjar huma l-metodi xjentifikament validi ta' EpiOcular™ EIT u ta' SkinEthic™ HCE EIT (9) (12)(13), imsejja bħala l-Metodu ta' Referenza Validat (VRM1 u VRM2, rispettivament). Il-Proċeduri Operattivi Standard (SOP) għall-metodi ta' ttestjar tal-RhCE huma disponibbli u għandhom jiġihaddmu meta jiġu implimentati u jintużaw il-metodi ta' ttestjar f'laboratorju (34)(35). Il-paragrafi li ġejjin u l-Appendiċi 2 jiddeskrivu l-komponenti u l-proċeduri ewlenin tat-testijiet tal-RhCE.

## KOMPONENTI TAL-METODU TA' TTESTJAR TAL-RHCE

### Kundizzjonijiet ġenerali

25. Iċ-ċelloli rilevanti miksuba mill-bniedem għandhom jintużaw biex jiġi rikostitwit it-tessut tridimensjonali tal-epitelju li jixbah il-kornea, li għandu jkun kompost minn ċelloli stratifikati b'mod progressiv iżda mhux kornifikati. Il-binja tat-tessuti tal-RhCE tithejja f'inserzjonijiet b'membrana sintetika poruża li minnha n-nutrijenti jkunu jistgħu jgħaddu għaċ-ċelloli. Għandu jkun hemm diversi saffi ta' ċelloli epiteljali vijabbli mhux keratinizzati fl-epitelju rikostitwit li jixbah il-kornea. Il-binja tat-tessuti tal-RhCE għandu jkollha s-superfiċje epiteljali f'kontatt dirett mal-arja biex ikun jista' jseħh esponiment topiku dirett tas-sustanzi kimiċi tat-test b'mod simili għal kif l-epitelju korneali jkun espost *in vivo*. Il-binja tat-tessuti tal-RhCE għandha tifforma barriera funzjonali b'robustezza suffiċjenti biex tirreżisti l-penetrazzjoni rapida ta' sustanzi ta' referenza ċitotossiċi, eż. Triton X-100 jew dodeċilsulfat tas-sodju (SDS). Il-funzjoni ta' protezzjoni għandha tintwera u tista' tiġi vvalidata b'determinazzjoni tal-hin ta' esponiment meħtieġ biex titnaqqas il-vijabbiltà tat-tessuti b'50 % (ET<sub>50</sub>) mal-applikazzjoni ta' sustanza ta' referenza f'konċentrazzjoni speċifikata u fissa (eż. 100 µl ta' 0,3 % (v/v) Triton X-100), jew il-konċentrazzjoni li fiha sustanza ta' referenza tnaqqas il-vijabbiltà tat-tessuti b'50 % (IC<sub>50</sub>) wara hin ta'

esponiment fiss (eż. trattament ta' 30 minuta b'50 µl SDS) (ara l-paragrafu 30). Il-proprietajiet ta' konteniment tal-binja tat-tessuti tal-RhCE għandhom jipprevjenu l-passaġġ tas-sustanza kimika tat-test madwar it-tarf tat-tessut vijabbli, li jista' jwassal għal mudellar hażin tal-esponiment korneali. Iċ-ċelloli derivati mill-bniedem użati biex tiġi stabbilita l-binja ta' tessuti tal-RhCE għandhom ikunu ħielsa minn kontaminazzjoni b' batterji, b'vajrusis, b'mikoplazma, u b'funġi. L-isterilità tal-binja tat-tessuti għandha tiġi verifikata mill-fornitur għall-assenza ta' kontaminazzjoni b'funġi u b'batterji.

## Kundizzjonijiet funzjonali

### *Vijabbiltà*

26. L-assaġġ użat għall-kwantifikazzjoni tal-vijabbiltà tat-tessut hu l-assaġġ MTT (16). Iċ-ċelloli vijabbli tal-mudell ta' tessut tal-RhCE jnaqqsu l-MTT tal-kuluranti vitali fi preċipitat tal-blu MTT formażan, li mbagħad jiġi estratt mit-tessut bl-użu tal-isopropanol (jew solvent simili). L-MTT formażan estratt jista' jiġi kwantifikat bl-użu ta' kejl tal-assorbanza standard (Densità Ottika (OD)) jew bi proċedura ta' spettrofotometrija tal-HPLC/UPLC (36). L-OD tas-solvent ta' estrazzjoni waħedha għandha tkun żgħira biżżejjed, jiġifieri  $OD < 0,1$ . L-utenti tal-binja tat-tessuti tal-RhCE għandhom jiżguraw li kull lott mill-binja tat-tessuti tal-RhCE użat jissodisfa l-kriterji definiti għall-kontroll negattiv. Il-meded ta' aċċettabbiltà għall-valuri tal-OD tal-kontroll negattiv għall-VRMs jingħataw fit-Tabella 2. Utent tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC għandu juża l-meded tal-OD tal-kontroll negattiv ipprovduti fit-Tabella 2 bħala l-kriterju ta' aċċettazzjoni għall-kontroll negattiv. Għandu jiġi dokumentat fir-rapport tat-test li t-tessuti ttrattati bis-sustanza tal-kontroll negattiv huma stabbli fil-kultura (jipprovdut kejl tal-vijabbiltà tat-tessuti simili) sakemm idur il-perjodu ta' esponiment tat-test. Il-produttur tat-tessuti għandu jsegwi proċedura simili bħala parti mir-rilaxx tal-lott tat-tessuti tal-kontroll tal-kwalità, iżda f'dan il-każ jistgħu jkunu japplikaw kriterji ta' aċċettazzjoni differenti minn dawk speċifikati fit-Tabella 2. Medda ta' aċċettabbiltà (limitu superjuri u inferjuri) għall-valuri tal-OD tal-kontroll negattiv (fil-kundizzjonijiet tal-metodu ta' ttestjar tal-QC) għandha tiġi stabbilita mill-iżviluppatur/fornitur tal-binja tat-tessuti tal-RhCE.

**Tabella 2:** Il-meded ta' aċċettabbiltà għall-valuri tal-OD tal-kontroll negattiv (għall-utenti tat-test)

| Test                                                                                | Limitu inferjuri ta' aċċettabbiltà | Limitu superjuri ta' aċċettabbiltà |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM1<br>(kemm għall-protokoll tal-likwidi kif ukoll tas- | $> 0,8^1$                          | $< 2,5$                            |

|                                                                                              |       |       |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------|
| solidi)                                                                                      |       |       |
| SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM2<br>(kemm għall-protokoll tal-likwidi kif ukoll tas-solidi) | > 1,0 | ≤ 2,5 |

<sup>1</sup>Dan il-limitu ta' aċċettazzjoni jqis il-possibbiltà li jiġi estiż iż-żmien tat-trasport għall-konsenja/tal-ħzin (eż. > erbat ijiem), li ntweri li ma jhallix impatt fuq il-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar (37).

### *Funzjoni ta' protezzjoni*

27. Il-binja tat-tessuti tal-RhCE għandha tkun folta u robusta biżżejjed biex tirreżisti l-penetrazzjoni rapida tas-sustanzi ta' referenza ċitotossiċi, kif stmati, eż., minn ET<sub>50</sub> (Triton X-100) jew minn IC<sub>50</sub> (SDS) (Tabella 3). Il-funzjoni ta' protezzjoni ta' kull lott tal-binja tat-tessuti tal-RhCE użat għandha tintwera mill-iżviluppatur/bejjiegħ tal-binja tat-tessuti tal-RhCE mal-provvista tat-tessuti lill-utent finali (ara l-paragrafu 30).

### *Morfoloġija*

28. L-eżaminazzjoni istoloġika tal-binja tat-tessuti tal-RhCE għandha turi l-istruttura tal-epitelju li tixbah il-kornea umana (inklużi tal-anqas tliet saffi ta' ċelloli epiteljali vijabbli u superficje mhux keratinizzata). Għall-VRMs, il-morfoloġija xierqa għet stabbilita mill-iżviluppatur/fornitur u għalhekk ma għandhiex bżonn terġa' tintwera minn utent ta' metodu ta' ttestjar għal kull lott tat-tessut użat.

### *Riproduċibbiltà*

29. Ir-riżultati tal-kontrolli pożittivi u negattivi tal-metodu ta' ttestjar għandhom juru r-riproduċibbiltà maż-żmien.

### *Kontroll tal-kwalità (QC – Quality Control)*

30. Il-binja tat-tessuti tal-RhCE għandha tintuża biss jekk l-iżviluppatur/il-fornitur juri li kull lott mill-binja tat-tessuti tal-RhCE użat jissodisfa l-kriterji tat-tnedija tal-produzzjoni definiti, fosthom dawk għall-vijabbiltà (paragrafu 26) u l-funzjoni ta' protezzjoni (paragrafu 27) huma l-aktar rilevanti. Medda ta' aċċettabbiltà (limiti superjuri u inferjuri) għall-funzjonijiet ta' protezzjoni kif imkejla mill-EC<sub>50</sub> jew mill-IC<sub>50</sub> (ara l-paragrafi 25 u 26) għandha tiġi stabbilita mill-iżviluppatur/fornitur tal-binja tat-tessuti tal-RhCE. Il-medda ta' aċċettabbiltà tal-ET<sub>50</sub> u tal-IC<sub>50</sub> użata bħala kriterju għar-rilaxx tal-lottijiet tal-QC mill-iżviluppatur/fornitur tal-binjiet tat-tessuti tal-RhCE (użati fil-VRMs) hi mogħtija fit-Tabella 3. Id-*data* li turi konformità mal-kriterji kollha tar-rilaxx tal-produzzjoni għandha tiġi pprovduta mill-iżviluppatur/fornitur tal-binja tat-tessuti tal-RhCE lill-utenti tal-metodu ta' ttestjar biex dawn ikunu jistgħu jinkludu din l-informazzjoni fir-rapport tat-test. Huma biss riżultati prodotti b'tessuti li jissodisfaw dawn il-kriterji ta' rilaxx tal-produzzjoni

kollha li jistgħu jiġu aċċettati għat-tbassir affidabbli ta' sustanzi kimiċi li ma jehtigux klassifikazzjoni u tikkettar għall-irritazzjoni tal-għajnejn jew għall-ħsara serja lill-għajnejn skont il-GHS tan-NU/is-CLP.

**Tabella 3:** Kriterju tar-rilaxx tal-lottijiet tal-QC

| Test                                                                  | Limitu inferjuri ta' aċċettabbiltà | Limitu superjuri ta' aċċettabbiltà |
|-----------------------------------------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM1 (100 µl ta' 0,3 % (v/v) Triton X-100) | ET <sub>50</sub> = 12,2 min        | ET <sub>50</sub> = 37,5 min        |
| SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM2 (trattament ta' 30 b'50 µl SDS)     | IC <sub>50</sub> = 1 mg/ml         | IC <sub>50</sub> = 3,2 mg/ml       |

### Applikazzjoni tas-Sustanzi Kimiċi tat-Test u tal-Kontroll

31. Tal-anqas għandhom jintużaw żewġ repliki tat-tessuti għal kull sustanza kimika tat-test u għal kull sustanza tal-kontroll f'kull sessjoni. Jintużaw żewġ protokollu differenti tat-trattament, wiehded għal sustanzi kimiċi tat-test likwidi u wiehded għal sustanzi kimiċi tat-test solidi (34)(35). Kemm għall-metodi kif ukoll għall-protokollu, is-superfiċje tal-binja tat-tessuti għandha tiġi mxarrba b'Salina Baferjata tal-Fosfat ta' Dulbecco ħielsa minn kalċju u manjeżju (DPBS ħielsa minn Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>) qabel l-applikazzjoni tas-sustanzi kimiċi tat-test, biex jiġu imitati l-kundizzjonijiet imxarrba tal-għajn umana. It-trattament tat-tessuti titnieda bl-esponiment għas-sustanza/i kimika/kimiċi tat-test u għas-sustanzi tal-kontroll. Għaż-żewġ protokollu tat-trattament fiż-żewġ VRMs, għandu jiġi applikat ammont suffiċjenti tas-sustanza kimika tat-test jew tas-sustanza tal-kontroll biex tinkwesa b'mod uniformi s-superfiċje epiteljali filwaqt li tiġi evitata doża infinita (ara l-paragrafi 32 u 33) (Appendiċi 2).
32. Is-sustanzi kimiċi tat-test li jistgħu jiġu pipettati f'temperatura ta' 37°C jew f'temperaturi inferjuri (bl-użu ta' pipetta bi spostament pożittiv, jekk meħtieġa) jiġu trattati bħala likwidi fil-VRMs, inkella dawn għandhom jiġu trattati bħala solidi (ara l-paragrafu 33). Fil-VRMs, is-sustanzi kimiċi likwidi tat-test jitferrxu b'mod ugwali fuq is-superfiċje tat-tessut (jiġifieri applikazzjoni minima ta' 60 µl/cm<sup>2</sup>) (ara l-Appendiċi 2, (33)(34)). Effetti kapillari (effetti ta' tensjoattivi) li jistgħu jseħhu minhabba l-volumi baxxi applikati għall-inserzjoni (fuq is-superfiċje tat-tessuti) għandhom jiġu evitati sa fejn possibbli biex jiġi garantit id-dożagġ korrett tat-tessut. Tessuti trattati b'sustanzi kimiċi likwidi tat-test jiġu inkubati għal 30 min f'kundizzjonijiet standard tal-koltura (37±2°C, 5±1 % CO<sub>2</sub>, ≥95 % RH). Fi tmiem il-perjodu ta' esponiment, is-sustanza kimika likwida tat-test u s-sustanzi tal-kontroll għandhom jitneħħew bil-galbu mis-superfiċje tat-tessuti bi tlaħliħ estensiv b'DPBS ħielsa minn Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> f'temperatura ambjentali. Dan l-istadju ta' tlaħliħ jiġi segwit minn tgħaddis ta' wara l-esponiment f'medium frisk f'temperatura ambjentali (biex titneħħa kwalunkwe sustanza kimika tat-test assorbita fit-tessut) għal perjodu predefinit ta' zmien li jvarja

skont il-VRM użat. Għall-VRM1 biss, inkubazzjoni ta' wara l-esponiment f'medium frisk f'kundizzjonijiet tal-koltura standard tiġi applikata qabel it-twettiq tal-assaġġ MTT (ara l-Appendiċi 2, (34)(35)).

33. Is-sustanzi kimiċi tat-test li ma jistgħux jiġu pipettati f'temperaturi sa 37°C jiġu trattati b'ħala solidi fil-VRMs. L-ammont ta' sustanza kimika tat-test applikat għandu jkun suffiċjenti biex tiġi koperta s-superfiċje shiha tat-tessut, jiġifieri tal-anqas għandha tintuża applikazzjoni ta' 60 mg/cm<sup>2</sup> (Appendiċi 2). Kull meta dan ikun possibbli, is-solidi għandhom jiġu ttestjati b'ħala trab fin. Tessuti trattati b'sustanzi kimiċi solidi tat-test jiġu inkubati għal perjodu ta' żmien predefinit (skont il-VRM użat) f'kundizzjonijiet tal-koltura standard (ara l-Appendiċi 2, (34)(35)). Fi tmiem il-perjodu ta' esponiment, is-sustanza kimika solida tat-test u s-sustanzi tal-kontroll għandhom jitneħħew bil-galbu mis-superfiċje tat-tessuti bi tlaħliħ estensiv b'DPBS ħielsa minn Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> f'temperatura ambjentali. Dan l-istadju ta' tlaħliħ jiġi segwit minn tgħaddis ta' wara l-esponiment f'medium frisk f'temperatura ambjentali (biex titneħħa kwalunkwe sustanza kimika tat-test assorbita fit-tessut) għal perjodu predefinit ta' żmien li jvarja skont il-VRM użat, u inkubazzjoni ta' wara l-esponiment f'medium frisk f'kundizzjonijiet tal-koltura standard, qabel ma jitwettagħ tal-assaġġ tal-MTT (ara l-Appendiċi 2, (34)(35)).
34. Għandhom ikunu inklużi kontrolli negattivi u pożittivi konkorrenti f'kull sessjoni biex jintwera li l-vijabbiltà (determinata bil-kontroll negattiv) u s-sensittività (determinata bil-kontroll pożittiv) tat-tessuti huma fi hdan meded ta' aċċettazzjoni definiti fuq il-bażi ta' *data* storika. Il-kontroll negattiv konkorrenti jipprovdi wkoll il-linja bażi (vijabbiltà tat-tessuti ta' 100 %) bie tiġi kkalkolata l-vijabbiltà perċentwali relattiva tat-tessuti trattati bis-sustanza kimika tat-test ( %Viability<sub>test</sub>). Is-sustanzi tal-kontroll pożittiv rakkomandati biex tintuża bil-VRMs hi l-aċetat tal-metil nadif (Nru tas-CAS 79-20-9, kummerċjalment disponibbli mingħand eż. Sigma-Aldrich, Kat# 45997; likwidu). Is-sustanzi tal-kontroll negattiv rakkomandati biex jintużaw bil-VRM1 u bil-VRM2 huma H<sub>2</sub>O ultrapur u DPBS ħielsa minn Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>, rispettivament. Dawn kienu s-sustanzi tal-kontroll użati fl-istudji ta' validazzjoni tal-VRMs u huma dawk li għalihom teżisti l-aktar *data* storika. L-użu ta' sustanzi tal-kontroll pożittiv jew negattiv alternattivi xierqa għandu jkun ġustifikat b'mod xjentifiku u adegwat. Il-kontrolli negattivi u pożittivi għandhom jiġu ttestjati bl-istess protokoll(i) bħal dak/dawk użat(i) għas-sustanzi kimiċi tat-test inklużi fis-sessjoni (jiġifieri għal-likwidi u/jew għas-solidi). Din l-applikazzjoni għandha tiġi segwita mill-esponiment għat-trattament, mit-tlaħliħ, minn tgħaddis ta' wara l-esponiment, u minn inkubazzjoni ta' wara l-esponiment fejn applikabbli, kif deskritti għall-kontrolli mwettqa b'mod konkorrenti għas-sustanzi kimiċi likwidi tat-test (ara l-paragrafu 32) jew għal kontrolli mwettqa b'mod konkorrenti fuq sustanzi kimiċi solidi tat-test (ara l-paragrafu 33), qabel it-twettiq tal-assaġġ tal-MTT (ara l-paragrafu 35) (34)(35). Sett

wiehed biss ta' kontrolli negattivi u pozzittivi hu biżżejjed għas-sustanzi kimiċi tat-test kollha tal-istess stat fiżiku (likwidi jew solidi) inklużi fl-istess sessjoni.

### **Kejl tal-Vijabbiltà tat-Tessuti**

35. L-assaġġ tal-MTT hu metodu kwantitattiv standardizzat (16) li għandu jintuża biex ikejjel il-vijabbiltà tat-tessuti taht dan il-metodu ta' ttestjar. Hu kompatibbli mal-użu f'binja ta' tessut tridimensjonali. L-assaġġ tal-MTT jitwettaq wara l-perjodu ta' inkubazzjoni ta' wara l-esponiment. Fil-VRMs, il-kampjun tal-binja tat-tessuti tal-RhCE jitqiegħed f'soluzzjoni ta' 0,3 ml MTT f'1 mg/ml għal  $180 \pm 15$ -il min f'kundizzjonijiet standard tal-koltura. L-MTT tal-kulurant vitali jiġi ridott fi preċipitat tal-formażen MTT blu biċ-ċelloli vijabbli tal-binja tat-tessuti tal-RhCE. Imbagħad, il-prodott tal-formażen MTT blu preċipitat jiġi estratt mit-tessut bl-użu ta' volum xieraq ta' isopropanol (jew ta' solvent simili) (34)(35). It-tessuti ttestjati b'sustanzi kimiċi likwidi tat-test għandhom jiġu estratti mill-quċcata u mill-qiegħ tat-tessuti, filwaqt li t-tessuti ttestjati b'sustanzi kimiċi solidi tat-test u b'likwidi kkuluriti għandhom jiġu estratti mill-qiegħ tat-tessut biss (biex tiġi minimizzata kwalunkwe kontaminazzjoni potenzjali tas-soluzzjoni ta' estrazzjoni tal-isopropanol bi kwalunkwe sustanza kimika tat-test li tista' tkun għadha fuq it-tessut). It-tessuti ttestjati b'sustanzi kimiċi likwidi tat-test li ma jinqalghux minnufih jistgħu jiġu estratti wkoll mill-qiegħ tat-tessut biss. Is-sustanzi tal-kontroll negattiv u pozzittiv ittestjati b'mod konkorrenti għandhom jiġu trattati b'mod simili għas-sustanza kimika tat-test. Il-formażen MTT estratt jista' jiġi kwantifikat jew b'kejl tal-assorbanza standard (OD) f'570 nm bl-użu ta' filtru band pass ta' massimu ta'  $\pm 30$  nm jew bl-użu ta' proċedura ta' spettrofotometrija tal-HPLC/UPLC (ara l-paragrafu 42) (11)(36).
36. Il-proprietajiet ottiċi tas-sustanza kimika tat-test jew l-azzjoni kimika ta' din fuq l-MTT jistgħu jinterferixxu mal-kejl tal-formażen MTT u dan jista' jwassal għal stima falza tal-vijabbiltà tat-tessut. Is-sustanzi kimiċi tat-test jistgħu jinterferixxu mal-kejl tal-formażen MTT, jew bi tnaqqis dirett tal-MTT fi blu formażen MTT u/jew b'interferenza tal-kulur jekk is-sustanza kimika tat-test tassorbi, b'mod naturali jew minhabba l-proċeduri ta' trattament, fl-istess medda tal-OD bħall-formażen MTT (jiġifieri madwar 570 nm). Il-kontrolli minn qabel għandhom isiru qabel l-ittestjar biex ikunu jistgħu jiġu identifikati r-riduċenti potenzjali diretti tal-MTT u/jew is-sustanzi kimiċi li jinterferixxu mal-kulur u għandhom jintużaw kontrolli addizzjonali biex tiġi identifikata u kkoreġuta interferenza potenzjali mit-tali sustanzi kimiċi tat-test (ara l-paragrafi 37-41). Dan hu partikolarment importanti meta sustanza kimika speċifika tat-test ma titneħħiex għalkollox mill-binja tat-tessuti tal-RhCE bit-tlaħliħ jew meta din tippenetra l-epitelju li jixbah il-kornea u għalhekk tkun preżenti fil-binjiet tat-tessuti tal-RhCE meta jitwettaq l-assaġġ tal-MTT. Għal sustanzi kimiċi tat-test li jassorbu d-dawl fl-istess medda bħall-formażen MTT (b'mod naturali jew wara

t-trattament), li mhumex kompatibbli mal-kejl tal-assorbanza standard (OD) tal-formażan MTT minhabba interferenza qawwiya wisq, jiġifieri assorbiment qawwi f'570±30 nm, tista' tintuża proċedura ta' spettrofotometrija tal-HPLC/UPLC biex jitkejjel il-formażan MTT (ara l-paragrafi 41 u 42) (11)(36). Spjegazzjoni dettaljata dwar kif għandhom jiġu individwati u kkoreġuti tnaqqis u interferenzi diretti tal-MTT permezz ta' aġenti koloranti hi disponibbli fl-SOPs tal-VRMs (34)(35). Flowcharts illustrattivi li jipprovdu gwida dwar kif tidentifika u timmaniġġja riduċenti diretti tal-MTT u/jew sustanzi kimiċi interferenti tal-kulur għall-VRM1 u għall-VRM2 huma pprovduti wkoll fl-Appendiċijiet III u IV rispettivament.

37. Biex tiġi identifikata interferenza potenzjali mis-sustanzi kimiċi tat-test li jassorbu dawl fl-istess medda bħall-formażan MTT (b'mod naturali jew wara t-trattament) u tittiehed deċiżjoni dwar il-htieġa ta' kontrolli addizzjonali, is-sustanza kimika tat-test tiżdied mal-ilma u/jew mal-isopropanol u tiġi inkubata għal hin xieraq f'temperatura ambjentali (ara l-Appendiċi 2, (34)(35)). Jekk is-sustanza kimika tat-test fl-ilma u/jew fl-isopropanol tassorbi biżżejjed dawl fil-medda ta' 570±20 nm għall-VRM1 (ara l-Appendiċi 3), jew jekk tinkiseb soluzzjoni kkulurita meta s-sustanza kimika tat-test tithallat mal-ilma għall-VRM 2 (ara l-Appendiċi 4), is-sustanza kimika tat-test tiġi preżunta li tinterferixxi mal-kejl tal-assorbanza standard (OD) tal-formażan MTT u għandhom isiru kontrolli ulterjuri tal-koloranti jew, inkella, għandha tintuża proċedura ta' spettrofotometrija tal-HPLC/UPLC f'liema każ dawn il-kontrolli ma jkunux meħtieġa (ara l-paragrafi 41 u 42 u l-Appendiċijiet III u IV)(34)(35). Meta jsir il-kejl tal-assorbanza standard (OD), kull sustanza kimika tat-test interferenti għandha tiġi applikata fuq tal-anqas żewġ repliki tat-tessut vijabbli, li ssirilhom il-proċedura shiħa ta' ttestjar iżda jiġu inkubati b'medium minflok b'soluzzjoni tal-MTT matul l-istadju tal-inkubazzjoni tal-MTT biex jiġġeneraw kontroll tal-kulur mhux speċifiku f'tessuti ħajjin (NSC<sub>living</sub>) (34)(35). Il-kontroll tal-NSC<sub>living</sub> irid jitwettaq fl-istess hin bħall-ittestjar tas-sustanza kimika tat-test ikkulurita u, f'każ ta' ttestjar multiplu, irid jitwettaq kontroll indipendenti tal-NSC<sub>living</sub> li għandu jsir b'kull test imwettaq (f'kull sessjoni) minhabba l-varjabbiltà bijoloġika inerenti tat-tessuti ħajjin. Il-vijabbiltà vera tat-tessuti tiġi kkalkolata bħala: il-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali miksuba b'tessuti ħajjin esposti għas-sustanza kimika tat-test interferenti u inkubati bis-soluzzjoni MTT ( %Viability<sub>test</sub>) nieqes il-kulur mhux speċifiku perċentwali miksub bit-tessuti ħajjin esposti għas-sustanza kimika tat-test interferenti u inkubati b'medium mingħajr MTT, imwettqa fl-istess hin bħat-test li jkun qed jiġi kkoreġut (%NSC<sub>living</sub>), jiġifieri l-Vijabbiltà vera tat-tessut = [ %Viability<sub>test</sub>] - [%NSC<sub>living</sub>].
38. Biex jiġu identifikati r-ridutturi diretti tal-MTT, kull sustanza kimika tat-test għandha tiżdied ma' soluzzjoni MTT preparata ġdida. Jiżdied ammont xieraq tas-sustanza kimika tat-test ma' soluzzjoni tal-MTT u t-taħlita tiġi inkubata għal madwar tliet sigħat f'kundizzjonijiet standard tal-koltura (ara l-Appendiċijiet III u IV)(34)(35).



Jekk it-tahlita ta' MTT li fiha s-sustanza kimika tat-test (jew is-sospensjoni għal sustanzi kimiċi tat-test insolubbli) issir blu/vjola, is-sustanza kimika tat-test tkun preżunta li tnaqqas b'mod dirett l-MTT u għandha ssir verifika funzjonali oħra fuq il-binjiet tat-tessuti tal-RhCE mhux vijabbli, indipendentement mill-użu tal-kejl tal-assorbanza standard (OD) jew ta' proċedura tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC. Din il-verifika funzjonali addizzjonali tħaddem tessuti maqtula li jkollhom biss attività metabolika residwa iżda jassorbu u jżommu s-sustanza kimika tat-test b'mod simili bħal tessuti vijabbli. It-tessuti maqtula tal-VRM1 jithejjew b'esponiment għal temperatura baxxa ("qtil bil-friża"). It-tessuti maqtula tal-VRM2 jithejjew b'inkubazzjoni fit-tul (eż. tal-anqas  $24 \pm 1$  siegħa) f' ilma segwita minn hżin f' temperatura baxxa ("maqtula bl-ilma"). Kull sustanza kimika tat-test li tnaqqas l-MTT tiġi applikata fuq tal-anqas żewġ repliki tat-tessut maqtula li ssirilhom il-proċedura shiħa ta' ttestjar biex jiġi generat kontroll ta' tnaqqis mhux speċifiku tal-MTT (NSMTT) (34)(35). Kontroll tal-NSMTT wiehed hu biżżejjed għal kull sustanza kimika tat-test indipendentement min-numru ta' testijiet/sessjonijiet indipendenti mwettqa. Il-vijabbiltà vera tat-tessuti tiġi kkalkolata bħala: il-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali miksuba b'tessuti ħajjin esposti għar-riduċent tal-MTT ( %Viability<sub>test</sub>) nieqes it-tnaqqis tal-MTT mhux speċifiku perċentwali miksub bit-tessuti maqtula esposti għall-istess riduttur tal-MTT, ikkalkolat b'rabta mas-sessjoni ta' kontroll negattiv b'mod konkorrenti għat-test li jkun qed jiġi kkoreġut ( %NSMTT), jiġifieri l-Vijabbiltà vera tat-tessut = [ %Viability<sub>test</sub>] - [ %NSMTT].

39. Is-sustanzi kimiċi tat-test li jiġu identifikati bħala li jipproduċu kemm interferenza tal-kulur (ara l-paragrafu 37) kif ukoll tnaqqis dirett tal-MTT (ara l-paragrafu 38) se jkunu jehtieġu wkoll it-tielet sett ta' kontrolli meta jitwettagħ il-kejl tal-assorbanza standard (OD), minbarra l-kontrolli tal-NSMTT u tal-NSC<sub>living</sub> deskritti fil-paragrafi ta' qabel. Normalment dan ikun il-każ b'sustanzi kimiċi tat-test ikkuluriti skuri li jassorbu dawl fil-medda ta'  $570 \pm 30$  nm (eż. blu, vjola, suwed) minhabba li l-kulur intrinsiku tagħhom ixekkel il-valutazzjoni tal-kapaċità tagħhom li jnaqqsu b'mod dirett l-MTT kif deskritt fil-paragrafu 38. Dan igieghel l-użu ta' kontrolli tal-NSMTT, b'mod predefinit, flimkien mal-kontrolli tal-NSC<sub>living</sub>. Is-sustanzi kimiċi tat-test li għalihom jitwettqu kemm il-kontrolli tal-NSMTT u tal-NSC<sub>living</sub> jistgħu jiġu assorbiti u jinżammu kemm minn tessuti ħajjin kif ukoll minn dawg maqtula. Għalhekk, f'dan il-każ, il-kontroll tal-NSMTT jaf ma jikkoreġix biss għat-tnaqqis potenzjali dirett tal-MTT mis-sustanza kimika tat-test, iżda anki għall-interferenza tal-kulur li tirriżulta mill-assorbiment u miż-żamma tas-sustanza kimika tat-test mit-tessuti maqtula. Dan jista' jwassal għal korrezzjoni doppja għall-interferenza tal-kulur peress li l-kontroll tal-NSC<sub>living</sub> diġà jikkoreġi għall-interferenza tal-kulur li tirriżulta mill-assorbiment u miż-żamma tas-sustanza kimika tat-test mit-tessuti ħajjin. Biex tiġi evitata korrezzjoni doppja possibbli għall-interferenza tal-kulur, irid isir it-tielet kontroll għal kulur mhux speċifiku f'tessuti maqtula (NSC<sub>killed</sub>) (ara l-Appendicijiet III u IV)(34)(35). F'dan il-

kontroll addizzjonali, is-sustanza kimika tat-test tiġi applikata fuq tal-anqas żewġ repliki tat-tessuti maqtula, li ssirilhom il-proċedura tal-ittestjar shiġha iżda jiġu inkubati b'medium minflok is-soluzzjoni tal-MTT matul l-istadju tal-inkubazzjoni tal-MTT. Kontroll tal-NSC<sub>killed</sub> wieħed hu biżżejjed għal kull sustanza kimika tat-test indipendentement min-numru ta' testijiet/sessjonijiet indipendenti mwettqa, iżda għandu jsir fl-istess hin mal-kontroll tal-NSMTT u bl-istess lott ta' tessuti. Il-vijabbiltà vera tat-tessuti tiġi kkalkolata b'hekk: il-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali miksba b'tessuti ħajjin esposti għas-sustanza kimika tat-test ( %Viability<sub>test</sub>) nieqes %NSMTT nieqes %NSC<sub>living</sub> biż-żieda tal-kulur mhux speċifiku perċentwali miksub bit-tessuti maqtula esposti għas-sustanza kimika tat-test interferenti u inkubati b'medium mingħajr MTT, ikkalkolati b'rabta mas-sessjoni tal-kontroll negattiv imwettqa fl-istess hin b'hekk-test li jkun qed jiġi kkoreġut (%NSC<sub>killed</sub>), jiġifieri l-Vijabbiltà vera tat-tessut = [ %Viability<sub>test</sub>] - [ %NSMTT] - [%NSC<sub>living</sub>] + [%NSC<sub>killed</sub>].

40. Hu importanti li jiġi nnotat li r-riduzzjoni mhux speċifika tal-MTT u l-interferenzi mhux speċifiċi tal-kulur jistgħu jiżiedu meta l-OD (meta jsiru kejljiet tal-assorbanza standard) tal-estratt tat-tessuti oġġla mill-medda ta' linearità tal-ispettrofotometru u li r-riduzzjoni mhux speċifika tal-MTT tista' wkoll iżżid l-erja tal-quċċata tal-formażan MTT (meta jsiru kejljiet tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC) tal-estratt tat-tessut f'livell oġġla mill-medda ta' linearità tal-ispettrofotometru. Fuq din il-bażi, hu importanti li kull laboratorju jiddetermina l-medda tal-linearità tal-OD/tal-erja tal-quċċata tal-ispettrofotometru tiegħu, eż., bil-formażan tal-MTT (CAS # 57360-69-7), disponibbli kummerċjalment mingħand, eż. Sigma-Aldrich (Kat# M2003), qabel il-bidu tal-ittestjar tas-sustanzi kimiċi tat-test għal finijiet regolatorji.
41. Il-kejl tal-assorbanza standard (OD) bl-użu ta' spettrofotometru hu xieraq biex jiġu vvalutati r-riduċenti diretti tal-MTT u s-sustanzi kimiċi tat-test interferenti tal-kulur, meta l-interferenza osservata mal-kejl tal-formażan MTT ma tkunx qawwija wisq (jiġifieri l-ODs tal-estratti tat-tessut miksba bis-sustanza kimika tat-test mingħajr ebda korrezzjoni għal riduzzjoni diretta tal-MTT u/jew għal interferenza tal-kulur ikunu fi hdan il-medda lineari tal-ispettrofotometru). Minkejja dan, ir-rizultati għas-sustanzi kimiċi tat-test li jipproduċu %NSMTT u/jew %NSC<sub>living</sub> ≥ 60 % (VRM1, u VRM2 għall-protokoll tal-likwidi) jew 50 % (VRM2 għall-protokoll tas-solidi) tal-kontroll negattiv għandhom jittiehdu b'attenzjoni peress li dan hu l-limitu stabbilit użat fil-VRMs biex jiġu distinti s-sustanzi kimiċi klassifikati minn dawh mhux klassifikati (ara l-paragrafu 44). Madankollu, l-assorbanza standard (OD) ma tistax titkejjel meta l-interferenza mal-kejl tal-formażan MTT tkun qawwija wisq (jiġifieri twassal għal ODs mhux ikkoreġuti tal-estratti tat-tessut tat-test li jaqgħu barra mill-medda lineari tal-ispettrofotometru). Sustanzi kimiċi tat-test kuluriti jew sustanzi kimiċi tat-test li jieħdu l-kulur f'kontatt mal-ilma jew mal-isopropanol li jinterferixxu

b'wisq qawwa mal-kejl tal-assorbanza standard (OD) tal-formażan MTT xorta wahda jistgħu jiġu vvalutati bl-użu tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC (ara l-Appendicijiet III u IV). Dan għaliex is-sistema tal-HPLC/UPLC tippermetti s-separazzjoni tal-formażan MTT mis-sustanza kimika qabel il-kwantifikazzjoni tiegħu (36). Għal din ir-raġuni, il-kontrolli tal-NSC<sub>living</sub> jew tal-NSC<sub>killed</sub> qatt ma jkunu meħtieġa meta tintuża l-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC, indipendentement mis-sustanza kimika li tkun qed tiġi ttestjata. Il-kontrolli tal-NSMTT xorta wahda għandhom jintużaw jekk is-sustanza kimika tat-test tkun suspettata li tnaqqas l-MTT b'mod dirett (wara l-proċedura deskritta fil-paragrafu 38). Il-kontrolli tal-NSMTT għandhom jintużaw ukoll bis-sustanzi kimiċi tat-test li jkollhom (intrinsiku jew li jidher meta jkunu fl-ilma) kulur li jimpedixxi l-valutazzjoni tal-kapaċità tagħhom ta' tnaqqis dirett tal-MTT kif deskritta fil-paragrafu 38. Meta tintuża l-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC biex jitkejjel il-formażan MTT, il-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali tiġi kkalkolata bħala l-ogħla erja perċentwali tal-formażan MTT miksuba b'tessuti ħajjin esposti għas-sustanza kimika tat-test meta mqabbla mal-ogħla erja tal-formażan MTT miksuba bil-kontroll negattiv konkorrenti. Għal sustanzi kimiċi tat-test li kapaċi jnaqqsu l-MTT b'mod dirett, il-vijabbiltà vera tat-tessut tiġi kkalkolata bħala: %Viability<sub>test</sub> nieqes %NSMTT, kif deskritta fl-aħħar sentenza tal-paragrafu 38. Finalment, ta' min jinnota li r-riduċenti diretti tal-MTT jew riduċenti diretti tal-MT li jkunu interferenti tal-kulur ukoll, li jinżammu fit-tessuti wara t-trattament u jnaqqsu l-MTT b'tant saħħa li jwasslu għal ODs (bl-użu ta' kejl standard tal-ODs) jew l-ogħla erjas (bl-użu tal-ispettrofotometrija tal-UPLC/HPLC) tal-estratti tat-tessuti ttestjati li jaqgħu barra mill-medda tal-linearità tal-ispettrofotometru ma jistgħux jiġu vvalutati b'metodi ta' ttestjar tal-RhCE, għalkemm dawn ikunu mistennija jseħhu f'sitwazzjonijiet rari ħafna biss.

42. L-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC tista' tintuża bit-tipi kollha ta' sustanzi kimiċi tat-test (ikkuluriti, mhux ikkuluriti, riduċenti tal-MTT u mhux riduċenti tal-MTT) għall-kejl tal-formażan MTT (11)(36). Minhabba d-diversità tas-sistema tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC, mhuwiex fattibbli li kull utent jistabbilixxi l-istess eżatt kundizzjonijiet tas-sistema. B'hekk, il-kwalifikazzjoni tas-sistema tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC għandha tintwera qabel l-użu tagħha għall-kwantifikazzjoni tal-formażan MTT mill-estratti tat-tessuti bl-issodisfar tal-kriterji ta' aċċettazzjoni għal sett ta' parametri standard ta' kwalifikazzjoni fuq il-bażi ta' dawk deskritti fil-gwida tal-Food and Drug Administration tal-Istati Uniti għall-industrija fuq il-validazzjoni tal-metodi bjoanalitiċi (36) (38). Dawn il-parametri importanti u l-kriterji ta' aċċettazzjoni tagħhom jintwerew fl-Appendiċi 5. Ladarba jiġu ssodisfati l-kriterji ta' aċċettazzjoni definiti fl-Appendiċi 5, is-sistema tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC titqies kwalifikata u lesta biex tkejjel il-formażan MTT fil-kundizzjonijiet sperimentali deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar.

## Kriterji ta' Aċċettazzjoni

43. Għal kull sessjoni li tuża l-lottijiet tat-tessut tal-RhCE li ssodisfaw il-kontroll tal-kwalità (ara l-paragrafu 30), tessuti relatati mas-sustanza tal-kontroll negattiv għandhom jesibixxu OD li tirrifletti l-kwalità tat-tessuti li segwew il-konsenja, l-istadji tar-riċevuta u l-proċessi tal-protokolli kollha u ma għandhomx ikunu barra mill-limiti stabbiliti storikament deskritti fit-Tabella 2 (ara l-paragrafu 26). B'mod simili, tessuti trattati bis-sustanzi tal-kontroll pożittiv, jiġifieri l-aċetat tal-metil, għandhom juru vijabbiltà medja tat-tessut ta'  $< 50 \%$  meta mqabbla mal-kontroll negattiv fil-FRM1 bi protokolli tal-likwidi jew tas-solidi, u ta'  $\leq 30 \%$  (protokoll tal-likwidi) jew ta'  $\leq 20 \%$  (protokoll tas-solidi) meta mqabbla mal-kontroll negattiv fil-VRM2, u b'hekk jirriflettu l-ħila tat-tessuti li jwieġbu għal sustanza kimika tat-test irritanti fil-kundizzjonijiet tal-metodu ta' ttestjar (34)(35). Il-varjabbiltà bejn ir-repliki tat-tessuti tas-sustanzi kimiċi tat-test u tas-sustanzi tal-kontroll għandha taqa' fi ħdan il-limiti aċċettati (jiġifieri d-differenza tal-vijabbiltà bejn żewġ repliki ta' tessuti għandha tkun anqas minn  $20 \%$  jew id-devjazzjoni standard (SD) bejn tliet repliki tat-tessuti ma għandhiex taqbeż it- $18 \%$ ). Jekk il-kontroll negattiv jew il-kontroll pożittiv inkluż f'sessjoni jkun barra mill-meded aċċettati, is-sessjoni titqies "mhix kwalifikata" u għandha tiġi ripetuta. Jekk il-varjabbiltà bejn ir-repliki tat-tessuti ta' sustanza kimika tat-test tkun barra mill-medda aċċettata, it-test irid jitqies "mhux kwalifikat" u s-sustanza kimika tat-test għandha terġa' tiġi ttestjata.

## Interpretazzjoni tal-Mudell tar-Riżultati u Tbassir

44. Il-valuri tal-OD/il-quċċata tal-erjas miksuba bl-estratti tat-tessut tar-repliki għal kull sustanza kimika tat-test għandhom jintużaw biex tiġi kkalkolata l-vijabbiltà medja perċentwali tat-tessut (medja bejn ir-repliki tat-tessut) normalizzata għall-kontroll negattiv, li hi stabbilita għal  $100 \%$ . Il-valur ta' limitu perċentwali għall-vijabbiltà tat-tessut għall-identifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi tat-test li ma jehtigux klassifikazzjoni għal irritazzjoni tal-ġajnejn jew għal ħsara serja lill-ġajnejn (Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU u tas-CLP) hu mogħti fit-Tabella 4. B'hekk, ir-riżultati għandhom jiġu interpretati kif ġej:
- Is-sustanza kimika tat-test tiġi identifikata bħala li ma tehtiegħ klassifikazzjoni u tikkettar (Ebda Kategorija) tal-GHS tan-NU/tas-CLP jekk il-vijabbiltà perċentwali medja tat-tessuti wara l-esponiment u l-inkubazzjoni ta' wara l-esponiment tkun aktar ( $>$ ) mill-valur ta' limitu perċentwali stabbilit tal-vijabbiltà tat-tessut, kif muri fit-Tabella 4. F'dan il-każ, ma jkun mehtieg ebda ttestjar ulterjuri f'metodi ta' ttestjar oħra.
  - Jekk il-vijabbiltà perċentwali medja tat-tessuti wara l-esponiment u l-inkubazzjoni ta' wara l-esponiment tkun anqas minn jew daqs ( $\leq$ ) il-valur ta' limitu perċentwali

stabbilit tal-vijabbiltà tat-tessut, ma jkun jista' jsir ebda tbassir, kif muri fit-Tabella 4. F'dan il-każ, ittestjar ulterjuri b'metodi ta' ttestjar oħra jkun meħtieġ minhabba li l-metodi ta' ttestjar tal-RhCE juru ċertu numru ta' riżultati tal-pożittivi foloz (ara l-paragrafi 14-15) u ma jistgħux jiddistingwu bejn il-Kategoriji 1 u 2 tal-GHS tan-NU u tas-CLP (ara l-paragrafu 17).

**Tabella 4:** Mudelli tat-Tbassir skont il-klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU u tas-CLP

| VRM                                                         | Ebda Kategorija                        | Ma tista' ssir ebda previżjoni         |
|-------------------------------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|
| VRM 1 - EpiOcular™ EIT<br>(għaż-żewġ protokoll)             | Vijabbiltà medja tat-tessut ta' > 60 % | Vijabbiltà medja tat-tessut ta' ≤ 60 % |
| VRM 2 - SkinEthic™ HCE EIT<br>(għall-protokoll tal-likwidi) | Vijabbiltà medja tat-tessut ta' > 60 % | Vijabbiltà medja tat-tessut ta' ≤ 60 % |
| VRM2 - SkinEthic™ HCE EIT<br>(għall-protokoll tas-solidi)   | Vijabbiltà medja tat-tessut ta' > 50 % | Vijabbiltà medja tat-tessut ta' ≤ 50 % |

45. Test wiehed magħmul minn tal-anqas żewġ repliki tat-tessuti għandu jkun biżżejjed għal sustanza kimika tat-test meta r-riżultat ikun inekwivokabbli. Madankollu, f'każijiet ta' riżultati li joqorbu hafna lejn il-limitu, bħal pereżempju kejl irreplikat mhux konkordanti u/jew il-vijabbiltà perċentwali medja tat-tessut ugwali għal 60±5 % (VRM1, u VRM2 għall-protokoll tal-likwidi) jew 50±5 % (VRM2 għall-protokoll tas-solidi), għandu jiġi kkunsidrat it-tieni test, kif ukoll it-tielet wiehed f'każ ta' riżultati mhux konkordanti bejn l-ewwel żewġ testijiet.
46. Valuri ta' limitu perċentwali differenti tal-vijabbiltà tat-tessut li jiddistingwu s-sustanzi kimiċi tat-test klassifikati minn dawk mhux klassifikati jistgħu jiġu kkunsidrati għal tipi speċifiċi ta' taħlitiet, fejn xieraq u ġustifikabbli, biex tiżdied il-prestazzjoni generali tal-metodu ta' ttestjar għal dawk it-tipi ta' taħlitiet (ara l-paragrafu 14). Is-sustanzi kimiċi ta' referenza jistgħu jkunu siewja għall-evalwazzjoni tal-potenzjal ta' ħsara serja lill-għajnejn/ta' irritazzjoni tal-għajnejn ta' sustanzi kimiċi tat-test jew ta' klassi ta' prodotti mhux magħrufa, jew għall-evalwazzjoni tal-potenzjal relattiv ta' tossiċità okulari ta' sustanza kimika klassifikata fi hdan medda speċifika ta' risponsi pożittivi.

## DATA U RAPPORTAR

### Data

47. Id-data minn tessuti ta' repliki individwali f'sessjoni (eż. valuri tal-OD/erjas tal-quċcata tal-formażan MTT u d-data tal-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali kkalkolata għas-sustanza kimika tat-test u għall-kontrolli, u t-tbassir finali tal-metodu ta' ttestjar

tal-RhCE) għandha tiġi rapportata f'forma tabulari għal kull sustanza kimika tat-test, inkluża d-*data* minn testijiet ripetuti, kif xieraq. Barra minn hekk, għandha tiġi rapportata l-vijabbiltà perċentwali medja tat-tessut u d-differenza fil-vijabbiltà bejn żewġ repliki ta' tessuti (jekk n=2 tessuti replikati) għal kull sustanza kimika tat-test u kontroll individwali. Kwalunkwe interferenza osservata ta' sustanza kimika tat-test mal-kejl tal-formażen MTT permezz tat-tnaqqis dirett tal-MTT u/jew tal-interferenza kkulurita għandha tiġi rapportata għal kull sustanza kimika ttestjata.

## Rapport tat-Test

48. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

### *Sustanza Kimika tat-Test*

#### Sustanza monokostitwenti

- L-identifikazzjoni kimika, bhall-isem (jew ismijiet) IUPAC jew CAS, in-numru/i tar-registru tas-CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, u/jew identifikaturi oħra;
- L-istat fiżiku, il-volatilità, il-pH, il-LogP, il-piż molekulari, il-klassi kimika, u proprjetajiet fizikokimiċi addizzjonali rilevanti għat-twettiq tal-istudju, sa fejn disponibbli;
- Il-purità, l-identità kimika tal-impurità jiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, *eċċ.*;
- It-trattament qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (eż. tishin, thin);
- Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabbiltà, sa fejn ikunu disponibbli.

#### Sustanza multikostitwenti, UVCB u taħlita

- Karatterizzazzjoni sa fejn possibbli skont, pereżempju, l-identità kimika (ara aktar 'il fuq), il-purità, l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fizikokimiċi rilevanti (ara aktar 'il fuq) tal-kostitwenti, sa fejn disponibbli;
- L-istat fiżiku u proprjetajiet fizikokimiċi addizzjonali rilevanti għat-twettiq tal-istudju, sa fejn disponibbli;
- Il-purità, l-identità kimika tal-impurità jiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, *eċċ.*;
- Trattament qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (pereżempju tishin, thin);

- Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabbiltà, sa fejn ikunu disponibbli.

#### *Sustanzi tal-Kontroll Pożittiv u Negattiv*

- L-identifikazzjoni kimika, bħall-isem (jew ismijiet) IUPAC jew CAS, in-numru/i tar-registru tas-CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, u/jew identifikaturi oħra;
- L-istat fiżiku, il-volatilità, il-piż molekolari, il-klassi kimika, u proprjetajiet fiżikokimiċi addizzjonali rilevanti għat-twettiq tal-istudju, sa fejn disponibbli;
- Il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.;
- Trattament qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (pereżempju tishin, thin);
- Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabbiltà, sa fejn ikunu disponibbli;
- Ġustifikazzjoni għall-użu ta' kontroll negattiv differenti li mhuwiex H<sub>2</sub>O ultrapur jew DPBS hielsa minn Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>, jekk applikabbli;
- Ġustifikazzjoni għall-użu ta' kontroll pożittiv differenti li mhuwiex aċetat tal-metil nadif, jekk applikabbli;
- Referenza għar-riżultati storiċi tal-kontroll pożittiv u negattiv li juru kriterji xierqa ta' aċċettazzjoni tas-sessjoni.

#### *Informazzjoni dwar l-Ispenser u l-Faċilità tat-Test*

- L-isem u l-indirizz tal-isponser, tal-faċilità tat-test u tad-direttur tal-istudju.

#### *Il-Binja tat-Tessuti tal-RhCE u l-Protokoll Użati (filwaqt li tiġi pprovduta r-raġuni għall-għażliet, jekk applikabbli)*

##### *Il-Kundizzjonijiet tal-Metodu ta' Ttestjar*

- Il-binja tat-tessuti tal-RhCE użata, inkluż in-numru tal-lott;
- It-tul ta' mewġa u l-band pass (jekk applikabbli) użati għall-kwantifikazzjoni tal-formażen MTT, u l-medda tal-linearità tal-apparat tal-kejl (eż. spettrofotometru);
- Deskrizzjoni tal-metodu użat għall-kwantifikazzjoni tal-formażen MTT;
- Deskrizzjoni tas-sistema tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC użata, jekk applikabbli;

- Informazzjoni ta' appoġġ kompluta għall-binja tat-tessuti tal-RhCE speċifika użata inkluża l-prestazzjoni tagħha. Din għandha tinkludi, iżda ma għandhiex tkun limitata għal:
  - i) Il-kontroll tal-kwalità tal-vijabbiltà (fornitur)
  - ii) Il-vijabbiltà fil-kundizzjonijiet tal-metodu ta' ttestjar (utent);
  - iii) Il-kontroll tal-kwalità tal-funzjoni ta' protezzjoni;
  - iv) Il-morfologija, jekk disponibbli;
  - v) Ir-riproduċibbiltà u l-kapaċità ta' tbassir;
  - vi) Kontrolli oħra tal-kwalità (QC) tal-binja tat-tessuti tal-RhCE, jekk disponibbli;
- Referenza għad-*data* storika tal-binja tat-tessuti tal-RhCE. Din għandha tinkludi, iżda ma għandhiex tkun limitata għal: Aċċettabbiltà tad-*data* dwar il-QC b'referenza għad-*data* storika tal-lott;
- Dikjarazzjoni li l-faċilità ta' ttestjar uriet profiċjenza fl-użu tal-metodu ta' ttestjar qabel l-użu ta' rutina bl-ittestjar tas-sustanzi kimiċi ta' profiċjenza;

#### *Kriterji ta' Aċċettazzjoni tas-Sessjoni u tat-Test*

- Il-medji tal-kontrolli pożittivi u negattivi u l-meded tal-aċċettazzjoni fuq il-bażi tad-*data* storika;
- Il-varjabbiltà aċċettabbli bejn ir-repliki tat-tessuti għall-kontrolli pożittivi u negattivi;
- Il-varjabbiltà aċċettabbli bejn ir-repliki tat-tessuti għas-sustanza kimika tat-test;

#### *Proċedura tat-Test*

- Id-ettalji tal-proċedura tat-test użata,
- Id-ożi tas-sustanza kimika tat-test u tas-sustanzi tal-kontroll użati;
- Id-urata u temperatura tal-perjodi ta' esponiment, tat-tgħaddis ta' wara l-esponiment u tal-inkubazzjoni ta' wara l-esponiment (fejn applikabbli);
- Id-eskrizzjoni ta' kwalunkwe modifika fil-proċedura tat-test;
- L-indikazzjoni tal-kontrolli użati għal riduċenti diretti tal-MTT u/jew sustanzi kimiċi tat-test li jerġu l-kulur, jekk applikabbli;
- In-numru ta' repliki tat-tessuti użati għal kull sustanza kimika tat-test u kontroll (kontroll pożittiv, kontroll negattiv, NSMTT, NSCliving u NSCKilled, jekk applikabbli);



### *Riżultati*

- Tabultazzjoni tad-*data* minn sustanzi kimiċi tat-test u minn sustanzi tal-kontroll individwali, għal kull sessjoni (inklużi esperimenti ripetuti fejn applikabbli) u kull kejl tar-repliki, inklużi l-valur tal-OD jew l-ogħla erja tal-formażan MTT, il-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali, il-vijabbiltà perċentwali medja tat-tessuti, id-Differenza bejn ir-repliki tat-tessuti jew l-SD, u t-tbassir finali;
- Jekk applikabbli, ir-riżultati tal-kontrolli użati għar-riduċenti diretti tal-MTT u/jew is-sustanzi kimiċi tat-test ikkuluriti inklużi l-valur tal-OD jew l-ogħla erja tal-formażan MTT, %NSMTT, %NSCliving, %NSCKilled, id-Differenza bejn ir-repliki tat-tessuti jew l-SD, il-vijabbiltà perċentwali korretta finali tat-tessut, u t-tbassir finali;
- Ir-riżultati miksuba bis-sustanza/i kimika/kimiċi tat-test u bis-sustanzi tal-kontroll b'rabta mas-sessjoni definita u mal-kriterji ta' aċċettazzjoni tat-test;
- Deskrizzjoni ta' effetti oħra osservati, eż. il-kolorazzjoni tat-tessuti minn sustanza kimika tat-test ikkulurita;

### *Diskussjoni tar-Riżultati*

### *Konklużjoni*

## DOKUMENTAZZJONI

- (1) NU (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. Disponibbli fuq: [http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf](http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf).
- (2) Il-Kapitolu B.5 ta' dan l-Anness, Irritazzjoni/Korrużjoni Akuta tal-Għajnejn.
- (3) Il-Kapitolu B.47 ta' dan l-Anness, Metodu ta' Ttestjar tal-Opaċità u l-Permeabbiltà tal-Kornea fil-Bovini għall-Identifikazzjoni ta' i) Sustanzi Kimiċi li Jinduċu Hsara Serja lill-Għajnejn u ii) Sustanzi Kimiċi li ma Jehtigux Klassifikazzjoni għal Irritazzjoni tal-Għajnejn jew Hsara Serja lill-Għajnejn.
- (4) Il-Kapitolu B.48 ta' dan l-Anness, Metodu ta' Ttestjar tal-Għajnejn tat-Tigieġ Izolati għall-Identifikazzjoni ta' i) Sustanzi Kimiċi li Jinduċu Hsara Serja lill-Għajnejn u ii) Sustanzi Kimiċi li ma Jehtigux Klassifikazzjoni.
- (5) Il-Kapitolu B.61 ta' dan l-Anness, Il-Metodu ta' Ttestjar tat-Tnixxija ta' Fluworexxina għall-Identifikazzjoni ta' Korrużivi Okulari u ta' Irritanti Severi.
- (6) Il-Kapitolu B.68 ta' dan l-Anness, Metodu ta' Ttestjar *In Vitro* b'Esponiment għal Hin Qasir għall-Identifikazzjoni ta' i) Sustanzi Kimiċi li Jinduċu Hsara Serja lill-Għajnejn u ii) Sustanzi Kimiċi li ma Jehtigux Klassifikazzjoni għal Irritazzjoni tal-Għajnejn jew Hsara Serja lill-Għajnejn.
- (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. Disponibbli fuq: <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC100280>.
- (9) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2014). ESAC Opinion on the EURL ECVAM Eye Irritation Validation Study (EIVS) on EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE u studju relatat ta' Cosmetics Europe dwar HPLC/UPLC-spectrophotometry as an alternative endpoint detection system

for MTT-formazan. Opinioni tal-ESAC Nru 2014-03 tas-17 ta' Novembru 2014; EUR 28173 EN; doi: 10.2787/043697 Thassir Disponibbli fuq: <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). Opinioni tal-ESAC Nru 2016-02 tal-24 ta' Ġunju 2016; EUR 28175 EN; doi : 10.2787/390390 Thassir Disponibbli fuq: <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. (Il-Manuskritt Ghadu Qed Jitthejja).
- (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. Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.
- (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. Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.
- (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. Fi: 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. F' *Advances in Modern Toxicology: Dermatoxicology* Marzulli F.N.u Maibach H.I. (Eds.), 4<sup>th</sup> 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.), 7<sup>th</sup> 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 (5 ta' Marzu 2013). EpiOcular™ EIT for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Disponibbli fuq: [\[https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index\]](https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index).
- (35) SkinEthic™ HCE EIT SOP, Version 1. (20 ta' Lulju 2015). SkinEthic™ HCE Eye Irritation Test (EITL for Liquids, EITS for Solids) for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Disponibbli fuq: <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. Mejju 2001. Disponibbli fuq: <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, Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

## **Appendiċi 1**

### **DEFINIZZJONIJIET**

**Akkuratezza:** Il-qrubija fil-livell ta' qbil bejn ir-riżultati tal-metodu ta' ttestjar u l-valuri referenzjarji aċċettati. Hi kejl tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar u wiehed mill-aspetti ta' "rilevanza". Spiss it-terminu jintuża b'mod alternanti ma' "konkordanza" biex ifisser il-proporzjon ta' riżultati korretti ta' metodu ta' ttestjar (18).

**Sustanza kimika ta' referenza:** Sustanza kimika użata bħala standard għall-paragun ma' sustanza kimika tat-test. Sustanza kimika ta' riferiment għandu jkollha l-proprjetajiet li ġejjin; (i) sors(i) konsistenti u affidabbli għall-identifikazzjoni u għall-karatterizzazzjoni tagħhom; (ii) similarità strutturali, funzjonali u/jew tal-klassi tas-sustanza kimika jew tal-prodott għas-sustanza/i kimika/kimiċi li tkun/ikunu qed tiġi/jiġu ttestjata/i; (iii) il-karatteristiċi fiżikokimiċi magħrufa; (iv) *data* ta' appoġġ dwar effetti magħrufa; u (v) il-potenza magħrufa fl-iskala tar-rispons mixtieq.

**Approċċ Minn Isfel għal Fuq;** Approċċ sekwenzjali użat għal sustanza kimika tat-test suspettata li ma tehtiegħ klassifikazzjoni u tikkettar għall-irritazzjoni tal-ġhajnejn jew hsara serja lill-ġhajnejn, li jibda bid-determinazzjoni ta' sustanzi kimiċi li ma jehtigux klassifikazzjoni u tikkettar (eżitu negattiv) minn sustanzi kimiċi oħrajn (eżitu pożittiv).

**Sustanza kimika:** Sustanza jew tahlita.

**Konkordanza:** Ara "Akkuratezza".

**Kornea:** Il-parti trasparenti tal-parti ta' quddiem tal-boċċa tal-ġhajn li tiksi l-iris u l-pupilla u thalli d-dawl jgħaddi għal ġol-parti interna tal-ġhajn.

**CV:** Koeffiċjent ta' Varjazzjoni.

**Dev:** Devjazzjoni.

**EIT:** Test tal-Irritazzjoni tal-Ghajnejn.

**EURL ECVAM:** Laboratorju ta' Referenza tal-Unjoni Ewropea għal Alternattivi għall-

Ittestjar fuq l-Annimali.

**Irritazzjoni tal-ghajnejn:** Il-produzzjoni ta' tibdiliet fl-ghajnejn wara l-applikazzjoni ta' sustanza kimika tat-test fil-wieċ ta' wara tal-ghajn, li jkunu kompletament reversibbli fi zmien 21 jum mill-applikazzjoni. Interkambjabbli ma' "Effetti reversibbli fuq l-ghajnejn" u mal-Kategorija 2 tal-GHS tan-NU/tas-CLP".

**ET<sub>50</sub>:** Hin tal-esponiment mehtieg biex il-vijabbiltà tat-tessuti titnaqqas b'50 % mal-applikazzjoni ta' sustanza kimika ta' riferiment f'koncentrazzjoni speċifikata fissa.

**Rata ta' negattivi foloz:** Il-proporzjon ta' sustanzi pozzittivi kollha identifikati b'mod falz bhala negattivi minn metodu ta' ttestjar. Dan hu wiehed mill-indikaturi tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar.

**Rata ta' pozzittivi foloz:** Il-proporzjon tas-sustanzi negattivi kollha identifikati b'mod falz bhala pozzittivi minn metodu ta' ttestjar. Dan hu wiehed mill-indikaturi tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar.

**Periklu:** Proprjetà inerenti ta' agent jew ta' sitwazzjoni li ghandha l-potenzjal li tikkawża effetti avversi meta organizmu, sistema jew (sub)popolazzjoni jigu esposti ghal dak l-agent.

**HCE:** Epitelju Korneali Uman ta' SkinEthic™.

**HPLC:** Kromatografija Likwida ta' Prestazzjoni Gholja.

**IC<sub>50</sub>:** Koncentrazzjoni li fiha sustanza kimika ta' riferiment tnaqqas il-vijabbiltà tat-tessuti b'50 % wara hin ta' esponiment fis (eż. trattament ta' 30 minuta bl-SDS).

**Doża infinita:** Ammont tas-sustanza kimika tat-test applikata ghall-binja tat-tessuti tal-RhCE lil hinn mill-ammont mehtieg biex tinkesa b'mod shih u uniformi s-superficje tal-epiteljali.

**Effetti irreversibbli fuq l-ghajnejn:** Ara "Hsara serja lill-ghajnejn".

**LLOQ:** Limitu Inferjuri ta' Kwantifikazzjoni.

**LogP:** Logaritmu tal-koefficjent ta' partizzjoni tal-ottanol/ilma



**Tahlita:** Tahlita jew soluzzjoni msawra minn żewġ sustanzi jew aktar.

**Sustanza monokostitwenti:** Sustanza, definita mill-kompożizzjoni kwantitattiva tagħha, li fiha kostitwent ewlieni wiehed ikun preżenti għal tal-anqas 80 % (w/w).

**Sustanza multikostitwenti:** Sustanza, definita mill-kompożizzjoni kwantitattiva tagħha, li fiha aktar minn kostitwent ewlieni wiehed ikunu preżenti f'koncentrazzjoni  $\geq 10$  % (w/w) u  $< 80$  % (w/w). Sustanza multikostitwenti hi r-riżultat ta' proċess tal-manifattura. Id-differenza bejn tahlita u sustanza multikostitwenti hi li tahlita tinkiseb bit-thallit ta' żewġ sustanzi jew aktar mingħajr reazzjoni kimika. Sustanza multikostitwenti hi r-riżultat ta' reazzjoni kimika.

**MTT:** Bromur tat-3-(4,5-Dimetiltjazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolju; Bromur tat-tetrazolju tal-blu tjazolil.

**Kontroll negattiv:** Kampjun li jkun fih il-komponenti kollha ta' sistema tat-test u trattata b'sustanza li jkun magħruf li ma tinduċix rispons pożittiv fis-sistema tat-test. Dan il-kampjun jiġi proċessat b'kampjuni ttrattati bis-sustanza kimika tat-test u kampjuni tal-kontroll oħrajn u jintuza biex tiġi determinata l-vijabbiltà tat-tessut ta' 100 %.

**Mhux ikklassifikati:** Sustanzi kimiċi li mhumiex klassifikati għall-Irritazzjoni tal-ġhajnejn (Kategorija 2 tal-GHS tan-NU/tas-CLP, Kategorija 2A jew 2B tal-GHS tan-NU) jew Ħsara serja lill-ġhajnejn (Kategorija 1 tal-GHS tan-NU/tas-CLP). Interkambjabbli ma' "Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU/tas-CLP".

**NSC<sub>killed</sub>:** Kulur Mhux Speċifiku f'tessuti maqtula.

**NSC<sub>living</sub>:** Kulur Mhux Speċifiku f'tessuti hajjin.

**NSMTT:** Tnaqqis fl-MTT Mhux Speċifiku.

**OD:** Densità Ottika.

**Standards tal-prestazzjoni:** Standards, ibbażati fuq metodu ta' ttestjar validat li tqies xjentifikament validu, li jipprovdu bażi għall-evalwazzjoni tal-komparabbiltà ta' metodu ta' ttestjar propost li hu simili b'mod funzjonali u mekkanistiku. Hemm inklużi: (i) il-komponenti essenzjali tal-metodi ta' ttestjar; (ii) lista minima ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza magħzula minn fost is-sustanzi kimiċi użati biex tintwera l-prestazzjoni aċċettabbli tal-metodu ta' ttestjar validat; u (iii) il-livelli komparabbli ta' akkuratezza u ta' affidabbiltà, fuq il-bażi ta' dak li nkiseb għall-metodu ta' ttestjar validat, li l-metodu ta'

ttestjar propost għandu juri meta evalwat bl-użu tal-lista minima ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza (18).

**Kontroll pożittiv:** Kampjun li jkun fih il-komponenti kollha ta' sistema tat-test u trattata b'sustanza li jkun magħruf li tinduċi rispons pożittiv fis-sistema tat-test. Dan il-kampjun jiġi proċessat b'kampjuni ttrattati bis-sustanza kimika tat-test u kampjuni tal-kontroll oħrajn. Biex jiġi żgurat li l-varjabbiltà fir-rispons tal-kontroll pożittiv tkun tista' tiġi vvalutata tul iż-żmien, id-daqs tar-rispons pożittiv ma għandux ikun eċċessiv.

**Rilevanza:** Deskrizzjoni tar-relazzjoni tat-test mal-effett ta' interess u jekk huwiex sinifikanti u utli għal skop partikolari. Din tiddetermina kemm it-test għandu l-hila jkejjel jew ibassar b'mod korrett l-effett bijoloġiku ta' interess. Ir-rilevanza tinkorpora l-kunsiderazzjoni tal-akkuratezza (konkordanza) ta' metodu ta' ttestjar (18).

**Affidabbiltà:** Kejljiet ta' kemm metodu ta' ttestjar jista' jitwettaq b'mod riproducibbli fil-laboratorji u bejn il-laboratorji tul iż-żmien, meta jitwettaq billi jintuza l-istess protokoll. Din tiġi evalwata billi tkun ikkalkolata r-riproducibbiltà fl-istess u bejn il-laboratorji u r-ripetibbiltà fl-istess laboratorju (18).

**Test ta' sostituzzjoni:** Test li hu mfassal biex jiehu post test li hu f'użu ta' rutina u aċċettat għall-identifikazzjoni tal-perikli u/jew għall-valutazzjoni tar-riskji, u li ġie determinat li jipprovi protezzjoni ekwivalenti jew imtejba tas-saħħa tal-bniedem jew tal-annimali jew tal-ambjent, skont kif ikun applikabbli, meta mqabbel mat-test aċċettat, għas-sitwazzjonijiet u għas-sustanzi kimiċi ta' ttestjar possibbli kollha (18).

**Riproducibbiltà:** Il-qbil bejn ir-riżultati miksub mill-ittestjar ripetut tal-istess sustanza kimika tat-test bl-użu tal-istess protokoll tat-test (Ara "Affidabbiltà") (18).

**Effetti reversibbli fuq l-ghajnejn:** Ara "Irritazzjoni tal-ghajnejn".

**RhCE:** Epitelju bħall-Kornea Umana Rikostitwit.

**Sessjoni:** Sessjoni tikkonsisti f'sustanza kimika tat-test waħda jew aktar ittestjata flimkien ma' kontroll negattiv u ma' kontroll pożittiv.

**SD:** Devjazzjoni Standard.

**Sensittività:** Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi tat-test pożittivi/attivi kollha li huma klassifikati kif suppost mit-test. Hi kejl tal-preċiżjoni għal metodu ta' ttestjar li jipproduċi riżultati kategorjiċi, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' metodu

ta' ttestjar (18).

**Ħsara serja lill-ghajnejn:** Il-produzzjoni ta' ħsara fit-tessut fl-ghajnejn, jew ta' tnaqqis fiżiku serju tal-vista, wara li tiġi applikata sustanza tat-test fuq is-superfiċje anterjuri tal-ghajnejn, li ma jkunx riversibbli għalkollox fi żmien 21 jum mill-applikazzjoni. Interkambjabbli ma' "Effetti irreversibbli fuq l-ghajnejn" u mal-Kategorija 1 tal-GHS tan-NU u tas-CLP".

**Proċeduri Operattivi Standard (SOP):** Proċeduri formali miktuba li jiddeskrivu fid-dettall kif għandhom jitwettqu operazzjonijiet speċifiċi ta' rutina, u speċifiċi għat-testijiet, tal-laboratorju. Dawn huma meħtieġa mill-GLP.

**Speċifiċità:** Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi tat-test negattivi/inattivi kollha li huma klassifikati kif suppost mit-test. Hi kejl tal-preċiżjoni għal metodu ta' ttestjar li jipproduċi riżultati kategorjiċi, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' metodu ta' ttestjar (18).

**Sustanza:** Element kimiku u l-komposti tiegħu fl-istat naturali jew mislut minn kwalunkwe proċess ta' produzzjoni, li jinduċi kull addittiv neċessarju għall-preżervazzjoni tal-istabbiltà tiegħu u kwalunkwe impurità li tirriżulta mill-proċess użat, iżda bl-esklużjoni ta' kull solvent li jista' jkun separat mingħajr ma tkun effettwata l-istabbiltà tas-sustanza jew mibdula l-kompożizzjoni tagħha.

**Test:** Sustanza kimika tat-test waħda testjata b'mod konkorrenti f'minimu ta' żewġ repliki ta' tessuti kif definiti fl-SOP korrispondenti.

**Vijabbiltà tat-tessuti:** Il-parametru li jkejjel l-attività shiha tal-popolazzjoni ċellulari f'tessut rikostitwit bħala l-hila tagħha li tnaqqas l-MTT tal-kolorant vitali, li, skont il-punt ta' tmiem imkejjel u d-disinn tat-test użat, jikkorrispondi għall-ghadd totali u/jew għall-vitalità taċ-ċelloli ħajjin.

**Approċċ Minn Fuq Għal Isfel:** Approċċ sekwenzjali użat għal sustanza kimika suspettata li tikkawża ħsara serja lill-ghajnejn, li jibda bid-determinazzjoni ta' sustanzi kimiċi li jinduċu ħsara serja lill-ghajnejn (eżitu pożittiv) minn sustanzi kimiċi oħra (eżitu negattiv).

**Sustanza kimika tat-test:** Kwalunkwe sustanza jew tahlita testjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

**Strategija ta' ttestjar sekwenzjali:** Strategija ta' ttestjar sekwenzjali, li tuża l-metodi ta' ttestjar f'sekwenza. L-informazzjoni eżistenti kollha dwar sustanza kimika tat-test tiġi rieżaminata, f'kull saff, permezz ta' proċess tal-piż tal-evidenza f'kull livell biex jiġi

ddeterminat jekk hemmx biżżejjed informazzjoni disponibbli għal deċiżjoni dwar il-klassifikazzjoni tal-periklu, qabel ma wiehed jgħaddi għal-livell li jmiss fl-istrategija. Jekk il-potenzjal/potenza ta' periklu ta' sustanza kimika tat-test jista' jigi assenjat fuq il-bażi tal-informazzjoni eżistenti f'saff partikolari, ma jkun meħtieġ l-ebda ttestjar ieħor (18).

**ULOQ:** Limitu Superjuri ta' Kwantifikazzjoni.

**Is-Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi tan-Nazzjonijiet Uniti (GHS tan-NU):** Sistema li tipproponi l-klassifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi (sustanzi u taħlitiet) skont it-tipi u l-livelli standardizzati ta' perikli fiżiċi, sanitarji u ambjentali, u tindirizza l-elementi ta' komunikazzjoni korrispondenti, bħal pittogrammi, kliem ta' twissija, dikjarazzjonijiet ta' periklu, dikjarazzjonijiet ta' prekawzjoni u skedi ta' *data* dwar is-sikurezza, biex jitwassal tagħrif dwar l-effetti avversi bil-għan li n-nies ikunu protetti (inklużi min iħaddem, il-ħaddiema, it-trasportaturi, il-konsumaturi u min jintervjeni f'emergenza) u l-ambjent (1).

**Kategorija 1 tal-GHS tan-NU u tas-CLP:** Ara “Ħsara serja lill-ġhajnejn”.

**Kategorija 2 tal-GHS tan-NU u tas-CLP:** Ara “Irritazzjoni tal-ġhajnejn”.

**Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU u tas-CLP:** Sustanzi kimiċi li ma jissodisfawx ir-rekwiżiti għall-klassifikazzjoni bħala tal-Kategorija 1 jew 2 tal-GHS tan-NU/tas-CLP (jew tal-Kategorija 2A jew 2B tal-GHS tan-NU). Interkambjabbli ma' “Mhux Klassifikati”.

**UPLC:** Kromatografija Likwida ta' Prestazzjoni Għolja Hafna.

**UVCB:** sustanzi b'kompożizzjoni varjabbli jew mhux magħrufa, prodotti jew materjali bijoloġiċi b'reazzjoni kumplessa.

**Metodu ta' ttestjar validu:** Metodu ta' ttestjar meqjus li għandu biżżejjed rilevanza u affidabbiltà għal skop speċifiku u li hu bbażat fuq prinċipji xjentifiċi sodi. Metodu ta' ttestjar qatt ma jkunx validu f'sens assolut, iżda biss b'rabta ma' skop definit (18).

**Metodu ta' ttestjar validat:** Metodu ta' ttestjar li għalih ikunu tlestew studji ta' validazzjoni biex jiġu determinati r-rilevanza (inkluża l-akkuratezza) u l-affidabbiltà għal għan speċifiku. Ta' min jinnota li jista' jkun li metodu ta' ttestjar validat ma jkollux prestazzjoni tajba biżżejjed f'termini ta' akkuratezza u ta' affidabbiltà biex jitqies aċċettabbli għall-għan propost (18).

**VRM:** Metodu ta' Riferiment Validat.

**VRM1:** EpiOcular™ EIT jissejjah il-Metodu ta' Riferiment Validat 1.

**VRM2:** SkinEthic™ HCE EIT jissejjah il-Metodu ta' Riferiment Validat 2.

**Piż tal-evidenza:** Il-proċess ta' kunsiderazzjoni tal-aspetti pożittivi u negattivi ta' diversi biċċiet ta' informazzjoni biex tinħareġ u tiġi appoggata konkluzjoni rigward il-potenzjal ta' periklu ta' sustanza kimika.

## Appendiċi 2

**KOMPONENTI EWLENIN TAT-TEST GHAT-TESTIJET TAL-RHCE VALIDATI GHALL-IDENTIFIKAZZJONI TA' SUSTANZI KIMIČI LI MA JEHTIĠUX KLASSIFIKAZZJONI U TIKKETTA GHALL-IRRITAZZJONI TAL-GHAJNEJN JEW GHAL HSARA SERJA LILL-GHAJNEJN**

| Komponenti tat-Test           | EpiOcular™ EIT (VRM 1)                                                   |                              | SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)         |                              |
|-------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|------------------------------|------------------------------------|------------------------------|
|                               | Likwidi<br>(pipettabbli f'37±1°C jew f'temperaturi anqas għal 15-il min) | Solidi<br>(mhux pipettabbli) | Likwidi u viskużi<br>(pipettabbli) | Solidi<br>(mhux pipettabbli) |
| Protokolli                    |                                                                          |                              |                                    |                              |
| Superfiċje tal-mudell         | 0,6 cm <sup>2</sup>                                                      | 0,6 cm <sup>2</sup>          | 0,5 cm <sup>2</sup>                | 0,5 cm <sup>2</sup>          |
| Numru ta' repliki tat-tessuti | Tal-anqas 2                                                              | Tal-anqas 2                  | Tal-anqas 2                        | Tal-anqas 2                  |

| Komponenti tat-Test                                    | EpiOcular™ EIT (VRM 1)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Kontroll ta' qabel għall-interferenza tal-kulur</b> | <p>50 µl + 1 ml H<sub>2</sub>O għal 60 min f'37±2°C, 5±1 % CO<sub>2</sub>, ≥95 % RH (sustanzi kimiċi tat-test mhux ikkuluriti), jew 50 µl + 2 ml isopropanol imħallat għal 2-3h f'RT ((sustanzi kimiċi tat-test ikkuluriti)</p> <p>→ jekk l-OD tas-sustanza kimika tat-test f'570±20 nm, wara t-tnaqqis tal-OD għall-isopropanol jew għall-ilma tkun &gt; 0,08 (li tikkorrispondi għal madwar 5 % tal-OD medja tal-kontroll negattiv), għandhom isiru kontrolli adattati ħajjin.</p> | <p>50 mg + 1 ml H<sub>2</sub>O għal 60 min f'37±2°C, 5±1 % CO<sub>2</sub>, ≥95 % RH (sustanzi kimiċi tat-test mhux ikkuluriti) u/jew 50 mg + 2 ml isopropanol imħallat għal 2-3h f'RT (sustanzi kimiċi tat-test ikkuluriti u mhux ikkuluriti)</p> <p>→ jekk l-OD tas-sustanza kimika tat-test f'570±20 nm wara t-tnaqqis tal-OD għall-isopropanol jew għall-ilma tkun &gt; 0,08 (li tikkorrispondi għal madwar 5 % tal-OD medja tal-kontroll negattiv), għandhom isiru kontrolli adattati ħajjin.</p> | <p>10 µl + 90 µl H<sub>2</sub>O imħallta għal 30±2 min f'Temperatura Ambjentali (RT, 18-28°C)</p> <p>→ jekk is-sustanza kimika tat-test tiegħi l-kulur, għandhom isiru kontrolli adattati ħajjin</p>                                                                                             | <p>10 mg + 90 µl H<sub>2</sub>O imħallta għal 30±2 min f'RT</p> <p>→ jekk is-sustanza kimika tat-test tiegħi l-kulur, għandhom isiru kontrolli adattati ħajjin</p>                                                                                                                               |
| <b>Kontroll ta' qabel għat-tnaqqis dirett tal-MTT</b>  | <p>soluzzjoni ta' 50 µl + 1 ml MTT 1 mg/ml għal 180±15-il min f'37±2°C, 5±1 % CO<sub>2</sub>, ≥95 % RH</p> <p>→ jekk is-soluzzjoni ssir blu/vjola, għandhom isiru kontrolli adattati maqtula bil-friża (bħala kontroll negattiv jintuża 50 µl ilma dejonizzat sterili f'soluzzjoni ta' MTT)</p>                                                                                                                                                                                      | <p>soluzzjoni ta' 50 mg+ 1 ml MTT 1 mg/ml għal 180±15-il min f'37±2°C, 5±1 % CO<sub>2</sub>, ≥95 % RH</p> <p>→ jekk is-soluzzjoni ssir blu/vjola, għandhom isiru kontrolli adattati maqtula bil-friża (bħala kontroll negattiv jintuża 50 µl ilma dejonizzat sterili f'soluzzjoni ta' MTT)</p>                                                                                                                                                                                                        | <p>soluzzjoni ta' 30 µl + 300 µl MTT 1 mg/ml għal 180± 15-il min f'37±2°C, 5±1 % CO<sub>2</sub>, ≥95 % RH</p> <p>→ jekk is-soluzzjoni ssir blu/vjola, għandhom isiru kontrolli adattati maqtula bl-ilma (bħala kontroll negattiv jintuża 30 µl ilma dejonizzat sterili f'soluzzjoni ta' MTT)</p> | <p>30 mg + 300 µl MTT soluzzjoni ta' 1 mg/ml għal 180± 15-il min f'37±2°C, 5±1 % CO<sub>2</sub>, ≥95 % RH</p> <p>→ jekk is-soluzzjoni ssir blu/vjola, għandhom isiru kontrolli adattati maqtula bl-ilma (bħala kontroll negattiv jintuża 30 µl ilma dejonizzat sterili f'soluzzjoni ta' MTT)</p> |

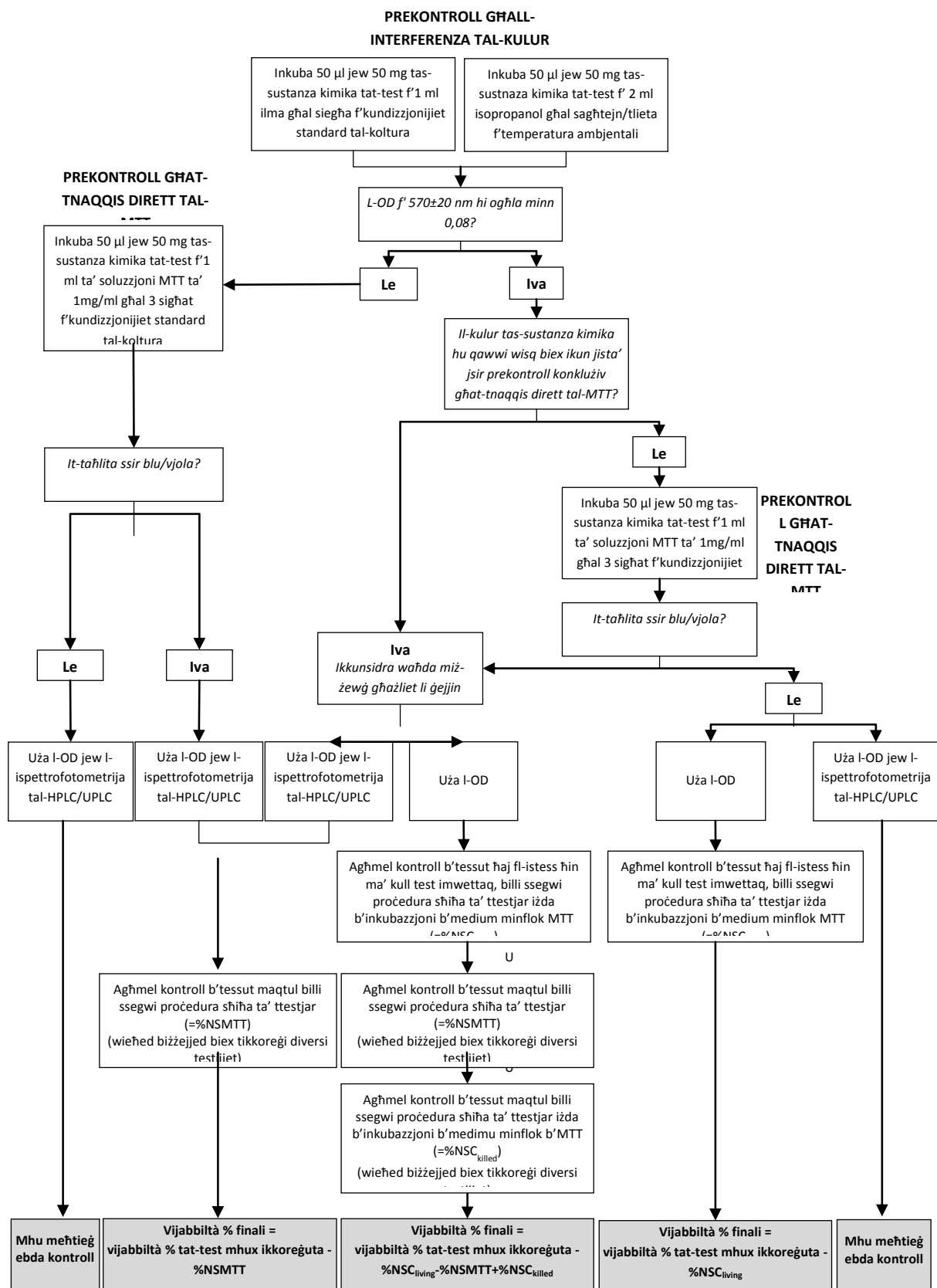
| Komponenti tat-Test                        | EpiOcular™ EIT (VRM 1)                                                                                                                   |                                                                                                                                          | SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)                                                                                                               |                                                                                                 |
|--------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Qabel it-trattament</b>                 | 20 µl DPBS hielsa minn Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> għal 30 ± 2 min f'37±2°C, 5±1 % CO <sub>2</sub> , ≥95 % RH, protetta mid-dawl. | 20 µl DPBS hielsa minn Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> għal 30 ± 2 min f'37±2°C, 5±1 % CO <sub>2</sub> , ≥95 % RH, protetta mid-dawl. | -                                                                                                                                        | -                                                                                               |
| <b>Doži u applikazzjoni tat-trattament</b> | 50 µl (83,3 µl/cm <sup>2</sup> )                                                                                                         | 50 mg (83,3 mg/cm <sup>2</sup> ) bl-użu ta' għodda kalibrata (eż. mgħarfa livellata kalibrata biex iżżomm 50 mg klorur tas-sodju).       | 10 µl DPBS hielsa minn Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> + 30 ± 2 µl (60 µl/cm <sup>2</sup> )<br><br>Għal viskużi, uża xibka tan-najlon | 30 µl DPBS hielsa minn Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> + 30 ± 2 mg (60 mg/cm <sup>2</sup> )  |
| <b>Hin u temperatura tal-esponiment</b>    | 30 min (± 2 min) f'medium tat-tkabbir f'37±2°C, 5±1 % CO <sub>2</sub> , ≥95 % RH                                                         | 6 sigħat (± 0,25 h) f'medium tat-tkabbir f'37±2°C, 5±1 % CO <sub>2</sub> , ≥95 % RH                                                      | 30 min (± 2 min) f'medium tat-tkabbir f'37±2°C, 5±1 % CO <sub>2</sub> , ≥95 % RH                                                         | 4 sigħat (± 0,1 h) f'medium tat-tkabbir f'37±2°C, 5±1 % CO <sub>2</sub> , ≥95 % RH              |
| <b>Tlahliħ f'temperatura ambjentali</b>    | tliet darbiet f'100 ml DPBS hielsa minn Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>                                                               | tliet darbiet f'100 ml DPBS hielsa minn Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>                                                               | 20 ml DPBS hielsa minn Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>                                                                                | 25 ml DPBS hielsa minn Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>                                       |
| <b>Tgħaddis ta' wara l-esponiment</b>      | 12-il min (± 2 min) f'RT f'medium tat-tkabbir                                                                                            | 25 min (± 2 min) f'RT f'medium tat-tkabbir                                                                                               | 30 min (± 2 min) f'37°C, 5 % CO <sub>2</sub> , 95 % RH f'medium tat-tkabbir                                                              | 30 min (± 2 min) f'RT f'medium tat-tkabbir                                                      |
| <b>Inkubazzjoni ta' wara l-esponiment</b>  | 120 min (± 15-il min) f'medium tat-tkabbir f'37±2°C, 5±1 % CO <sub>2</sub> , ≥95 % RH                                                    | 18-il siegħa (± 0,25 ta' siegħa) f'medium tat-tkabbir f'37±2°C, 5±1 % CO <sub>2</sub> , ≥95 % RH                                         | ebda                                                                                                                                     | 18-il siegħa (± 0,5 ta' siegħa) f'medium tat-tkabbir f'37±2°C, 5±1 % CO <sub>2</sub> , ≥95 % RH |
| <b>Kontroll negattiv</b>                   | 50 µl H <sub>2</sub> O<br>Ittestjat b'mod konkorrenti                                                                                    | 50 µl H <sub>2</sub> O<br>Ittestjat b'mod konkorrenti                                                                                    | 30 ± 2µl DPBS hielsa minn Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup><br>Ittestjat b'mod konkorrenti                                              | 30 ± 2µl DPBS hielsa minn Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup><br>Ittestjat b'mod konkorrenti     |
| <b>Kontroll pożittiv</b>                   | 50 µl Aċetat tal-metil<br>Ittestjat b'mod konkorrenti                                                                                    | 50 µl Aċetat tal-metil<br>Ittestjat b'mod konkorrenti                                                                                    | 30 ± 2µl Aċetat tal-metil<br>Ittestjat b'mod konkorrenti                                                                                 | 30 ± 2µl Aċetat tal-metil<br>Ittestjat b'mod konkorrenti                                        |



| Komponenti tat-Test                      | EpiOcular™ EIT (VRM 1)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Soluzzjoni MTT</b>                    | 300 µl 1 mg/ml                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 300 µl 1 mg/ml                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 300 µl 1 mg/ml                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 300 µl 1 mg/ml                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| <b>Hin u temperatura tal-esponiment</b>  | 180 min (± 15-il min) f°37±2°C, 5±1 % CO <sub>2</sub> , ≥95 % RH                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 180 min (± 15-il min) f°37±2°C, 5±1 % CO <sub>2</sub> , ≥95 % RH                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 180 min (± 15-il min) f°37±2°C, 5±1 % CO <sub>2</sub> , ≥95 % RH                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 180 min (± 15-il min) f°37±2°C, 5±1 % CO <sub>2</sub> , ≥95 % RH                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| <b>Solvent ta' estrazzjoni</b>           | 2 ml isopropanol (estrazzjoni mill-quċċata u mill-qiegħ tal-inserzjoni b'perforazzjoni tat-tessut)                                                                                                                                                                                                                                                      | 2 ml isopropanol (estrazzjoni mill-qiegħ tal-inserzjoni b'perforazzjoni tat-tessut)                                                                                                                                                                                                                                                                       | 1,5 ml isopropanol (estrazzjoni mill-quċċata u mill-qiegħ tal-inserzjoni)                                                                                                                                                                                                                                                                               | 1,5 ml isopropanol (estrazzjoni mill-qiegħ tal-inserzjoni)                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| <b>Hin u temperatura tal-estrazzjoni</b> | 2-3 h bit-thawwid (~120 rpm) f°RT jew matul il-lejl f°4-10°C                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 2-3 h bit-thawwid (~120 rpm) f°RT jew matul il-lejl f°4-10°C                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 4 h bit-thawwid (~120 rpm) f°RT jew tal-anqas matul il-lejl minghajr thawwid f°4-10°C                                                                                                                                                                                                                                                                   | Tal-anqas saghtejn (2 h) bit-thawwid (~120 rpm) f°RT                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| <b>Qari tal-OD</b>                       | 570 nm (550 - 590 nm) minghajr filtru ta' riferiment                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 570 nm (550-590 nm) minghajr filtru ta' riferiment                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 570 nm (540 - 600 nm) minghajr filtru ta' riferiment                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 570 nm (540 - 600 nm) minghajr filtru ta' riferiment                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| <b>Kontroll tal-Kwalità tat-Tessuti</b>  | Trattament b'100 µl ta' 0,3 % (v/v) Triton X-100<br>12,2 min ≤ ET <sub>50</sub> ≤ 37,5 min                                                                                                                                                                                                                                                              | Trattament b'100 µl ta' 0,3 % (v/v) Triton X-100<br>12,2 min ≤ ET <sub>50</sub> ≤ 37,5 min                                                                                                                                                                                                                                                                | Trattament ta' 30 min b'SDS (50 µl)<br>1,0 mg/ml ≤ IC <sub>50</sub> ≤ 3,5 mg/ml                                                                                                                                                                                                                                                                         | Trattament ta' 30 min b'SDS (50 µl)<br>1,0 mg/ml ≤ IC <sub>50</sub> ≤ 3,2 mg/ml                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| <b>Kriterji tal-Aċċettazzjoni</b>        | 1. L-OD medja tar-repliki tat-tessuti trattati bil-kontroll negattiv għandha tkun > 0,8 u < 2,5<br>2. Il-vijabbiltà medja tar-repliki tat-tessuti esposti għal 30 min bil-kontroll pożittiv, espressa bħala % tal-kontroll negattiv, għandha tkun < 50 %<br>3. Id-differenza tal-vijabbiltà bejn żewġ repliki ta' tessuti għandha tkun anqas minn 20 %. | 1. L-OD medja tar-repliki tat-tessuti trattati bil-kontroll negattiv għandha tkun > 0,8 u < 2,5<br>2. Il-vijabbiltà medja tar-repliki tat-tessuti esposti għal 6 sigħat bil-kontroll pożittiv, espressa bħala % tal-kontroll negattiv, għandha tkun < 50 %<br>3. Id-differenza tal-vijabbiltà bejn żewġ repliki ta' tessuti għandha tkun anqas minn 20 %. | 1. L-OD medja tar-repliki tat-tessuti trattati bil-kontroll negattiv għandha tkun > 1,0 u ≤ 2,5<br>2. Il-vijabbiltà medja tar-repliki tat-tessuti esposti għal 30 min bil-kontroll pożittiv, espressa bħala % tal-kontroll negattiv, għandha tkun ≤ 30 %<br>3. Id-differenza tal-vijabbiltà bejn żewġ repliki ta' tessuti għandha tkun anqas minn 20 %. | 1. L-OD medja tar-repliki tat-tessuti trattati bil-kontroll negattiv għandha tkun > 1,0 u ≤ 2,5<br>2. Il-vijabbiltà medja tar-repliki tat-tessuti esposti għal 4 sigħat bil-kontroll pożittiv, espressa bħala % tal-kontroll negattiv, għandha tkun ≤ 20 %<br>3. Id-differenza tal-vijabbiltà bejn żewġ repliki ta' tessuti għandha tkun anqas minn 20 %. |

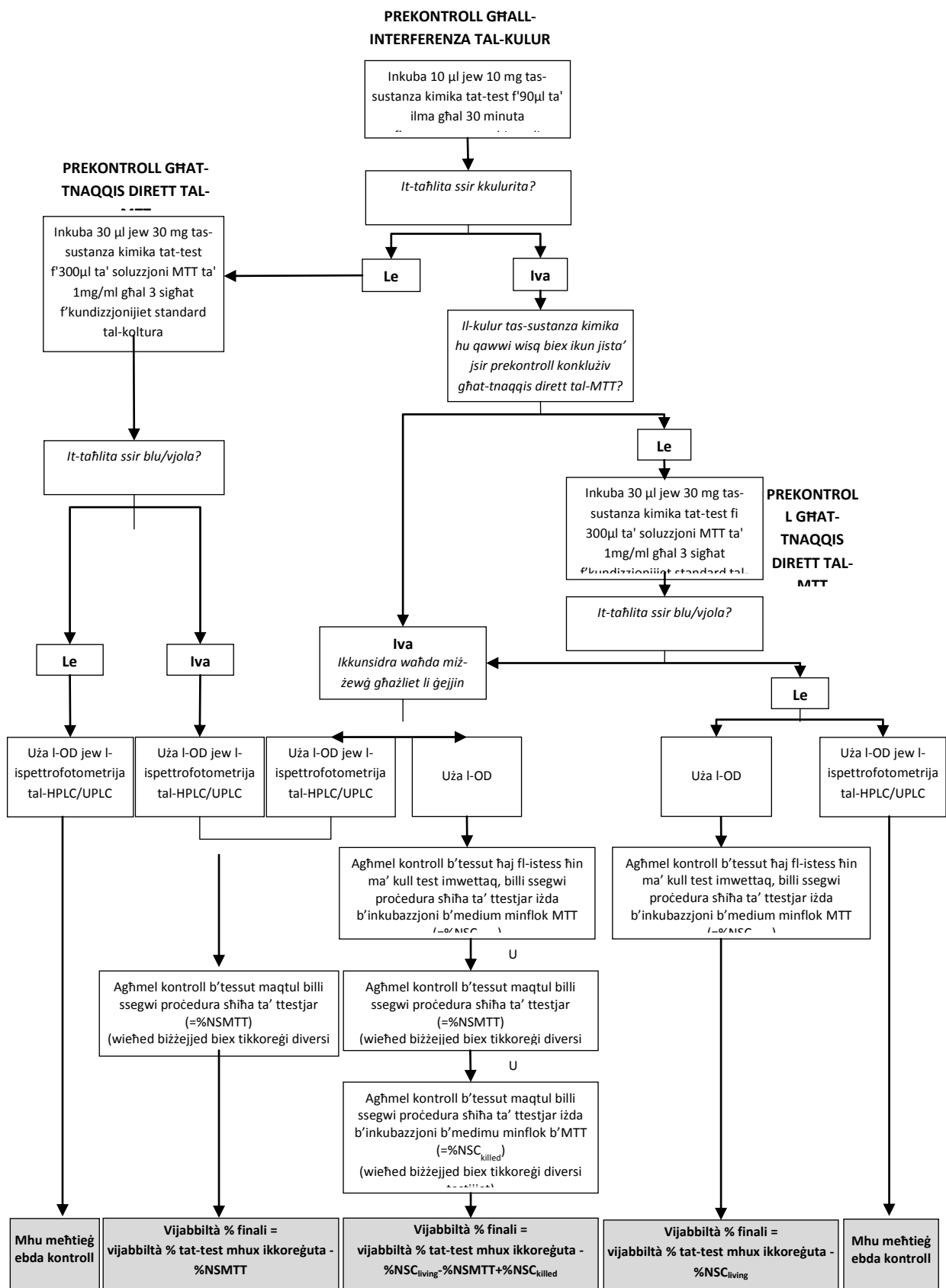
### **Appendiċi 3**

**FLOWCHART ILLUSTRATTIVA LI TIPPROVDI GWIDA DWAR KIF TIDENTIFIKA U  
TIMMANIĠĠJA RIDUĊENTI DIRETTI TAL-MTT U/JEW SUSTANZI KIMIĊI  
INTERFERENTI TAL-KULUR, FUQ IL-BAŻI TAL-SOP TAL-VRM1**



#### Appendiċi 4

**FLOWCHART ILLUSTRATTIVA LI TIPPROVDI GWIDA DWAR KIF TIDENTIFIKA U  
TIMMANIĠĠJA RIDUĊENTI DIRETTI TAL-MTT U/JEW SUSTANZI KIMIĊI  
INTERFERENTI TAL-KULUR, FUQ IL-BAŻI TAL-SOP TAL-VRM2**



## Appendiċi 5

### PARAMETRI EWLENIN U KRITERJI TA' AĊĊETTAZZJONI GHALL-KWALIFIKAZZJONI TA' SISTEMA TA' SPETTROFOTOMETRIJA TAL-HPLC/UPLC GHALL-KEJL TAL-FORMAŻAN MTT ESTRATT MILL-BINJET TAT-TESSUTI TAL-RHCE

| Parametru                                                                         | Protokoll Derivat mill-Gwida tal-FDA (36)(38)                                                                                                                                                                                                                                 | Kriterji tal-Aċċettazzjoni                                                                                                                                            |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Selettività                                                                       | Analizi tal-isopropanol, inbjank ħaj (estratt tal-isopropanol minn binjet tat-tessuti tal-RhCE ħajjin mingħajr ebda trattament), inbjank mejjet (estratt tal-isopropanol minn binjet tat-tessuti tal-RhCE maqtula mingħajr ebda trattament), u ta' kolorant (eż. blu metilen) | $Area_{interference} \leq 20 \% \text{ ta' } Area_{LLOQ}^1$                                                                                                           |
| Preċiżjoni                                                                        | Kontrolli tal-Kwalità (jiġifieri formażan MTT f'1,6 µg/ml, 16 µg/ml u 160 µg/ml) fl-isopropanol (n=5)                                                                                                                                                                         | $CV \leq 15 \% \text{ jew } \leq 20 \% \text{ għal-LLOQ}$                                                                                                             |
| Preċiżjoni                                                                        | Kontrolli tal-Kwalità fl-isopropanol (n=5)                                                                                                                                                                                                                                    | $\%Dev \leq 15 \% \text{ jew } \leq 20 \% \text{ għal-LLOQ}$                                                                                                          |
| Effett tal-Matriċi                                                                | Kontrolli tal-Kwalità fl-inbjank ħaj (n=5)                                                                                                                                                                                                                                    | $85 \% \leq \text{Effett tal-Matriċi} \% \leq 115 \%$                                                                                                                 |
| Riport                                                                            | Analizi tal-isopropanol wara ULOQ <sup>2</sup> standard                                                                                                                                                                                                                       | $Area_{interference} \leq 20 \% \text{ tal-} Area_{LLOQ}$                                                                                                             |
| Riproduċibbiltà (dakinhar)                                                        | 3 kurvi tal-kalibrar indipendenti (fuq il-bażi ta' 6 dilwizzjonijiet ta' 1/3 konsekkutivi ta' formażan MTT fl-isopropanol mill-ULOQ, jiġifieri 200 µg/ml);<br>Kontrolli tal-Kwalità fl-isopropanol (n=5)                                                                      | Kurvi ta' Kalibrazzjoni:<br>$\%Dev \leq 15 \% \text{ jew } \leq 20 \% \text{ għal-LLOQ}$<br><br>Kontrolli tal-Kwalità:<br>$\%Dev \leq 15 \% \text{ u } CV \leq 15 \%$ |
| Riproduċibbiltà (bejn granet differenti)                                          | Jum 1: Kurva ta' kalibrazzjoni 1 u Kontrolli tal-Kwalità fl-isopropanol (n=3)<br>Jum 2: Kurva ta' kalibrazzjoni 1 u Kontrolli tal-Kwalità fl-isopropanol (n=3)<br>Jum 3: Kurva ta' kalibrazzjoni 1 u Kontrolli tal-Kwalità fl-isopropanol (n=3)                               |                                                                                                                                                                       |
| Stabbiltà fuq Terminu Qasir tal-Formażan MTT fl-Estratt tat-Tessuti tal-RhCE      | Kontrolli tal-Kwalità fl-inbjank ħaj (n=3) analizzati dakinhar tal-preparazzjoni u wara 24 siegħa ta' ħzin f'temperatura ambjentali                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                       |
| Stabbiltà fit-Tul tal-Formażan MTT fl-Estratt tat-Tessuti tal-RhCE, jekk meħtieġa | Kontrolli tal-Kwalità fl-inbjank ħaj (n=3) analizzati dakinhar tal-preparazzjoni u wara diversi jiem ta' ħzin f'-20°C                                                                                                                                                         | $\%Dev \leq 15 \%$                                                                                                                                                    |

<sup>1</sup> LLOQ: Limitu Inferjuri ta' Kwantifikazzjoni, definit biex ikopri vijabbiltà tat-tessuti ta' 1-2 %, jiġifieri 0,8 µg/ml.

<sup>2</sup> ULOQ: Limitu Superjuri ta' Kwantifikazzjoni, definit biex ikun tal-anqas id-doppju tal-ogħla konċentrazzjoni mistennija ta' formażan MTT fl-estratti tal-isopropanol mill-kontrolli negattivi (~70 µg/ml fil-VRM), jiġifieri 200 µg/ml.

## **B.70 ASSAĠĠI *IN VITRO* TAR-RIĊETTUR TAL-ESTROĠENU RIKOMBINANTI UMAN (hrER) BIEX JIĠU INDIVIDWATI SUSTANZI KIMIĊI B’AFFINITÀ GHALL-IRBIT TAL-ER**

### **INTRODUZZJONI ĠENERALI**

#### **Linja Gwida tat-Test Ibbażata fuq il-Prestazzjoni tal-OECD**

1. Dan il-metodu ta’ ttestjar hu ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 493 tal-OECD (2015). It-TG 493 hi linja gwida tat-test ibbażata fuq il-prestazzjoni (PBTG), li tiddeskrivi l-metodologija għall-assaġġi *in vitro* rikombinanti umani biex jiġu individwati sustanzi b’affinità għall-irbit tar-riċettur tal-estrogenu (assaġġi tal-irbit tal-hrER). Din tinkludi żewġ assaġġi mekkanistikament u funzjonalment simili għall-identifikazzjoni tal-agonisti u tal-antagonisti riċetturi tal-estrogenu (jiġifieri ER $\alpha$ ) u għandha tiffaċilita l-iżvilupp ta’ assaġġi simili jew modifikati godda skont il-prinċipji għall-validazzjoni stabbiliti fl-OECD Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment (1). Il-metodi ta’ ttestjar ta’ riferiment validati bis-shiħ (Appendiċi 2 u Appendiċi 3) li jipprovdu l-bażi għal din il-PBTM huma:

- L-Assaġġ tal-Irbit tar-Riċettur tal-Estrogenu (ER) *In Vitro* ta’ Freyberger-Wilson (FW) bl-Użu ta’ ER $\alpha$  Rikombinanti Uman b’Tul Shiħ (2), u
- L-Assaġġ tal-Irbit tar-Riċettur tal-Estrogenu *In Vitro* bl-Użu ta’ Proteina tad-Dominju tal-Irbit tal-Ligand Rikombinanti tal-Chemical Evaluation and Research Institute (CERI) (2).

L-istandards tal-prestazzjoni (PS) (3) huma disponibbli biex jiffaċilitaw l-iżvilupp u l-validazzjoni ta’ metodi ta’ ttestjar simili għall-istess punt ta’ tmiem tal-periklu u jippermettu għall-emendar puntwali tal-PBTG 493 biex assaġġi simili godda jkunu jistgħu jiżdiedu ma’ PBTG aġġornata. Madankollu, assaġġi ta’ testijiet simili jiżdiedu biss wara rieżami u qbil mill-OECD li ntlahqu l-istandards tal-prestazzjoni. L-assaġġi inklużi fit-TG 493 jistgħu jintużaw b’mod indiskriminat biex jiġu indirizzati r-rekwiziti tal-pajjiżi membri tal-OECD għar-riżultati tat-testijiet dwar l-irbit tar-riċettur tal-estrogenu filwaqt li jinkiseb benefiċċju mill-Aċċettazzjoni Reċiproka tad-*Data* tal-OECD.

#### **Sfond u prinċipji tal-assaġġi inklużi f’dan il-metodu ta’ ttestjar**

2. Fl-1998, l-OECD nediet attività ta’ prijorità għolja biex tirrevedi l-linji gwida dwar it-testijiet ezistenti, u tiżviluppa linji gwida godda, għall-iskrinjar u għall-ittestjar ta’ sustanzi

kimiċi interferenti endokrinali potenzjali. Il-qafas kunċettwali (CF) tal-OECD għall-ittestjar u għall-valutazzjoni ta' sustanzi kimiċi interferenti endokrinali potenzjali gie rivedut fl-2012. Is-CFs oriġinali u riveduti huma inklużi bħala Annessi fid-Dokument ta' Gwida dwar Linji Gwida tat-Testijiet Standardizzati għall-Evalwazzjoni ta' Sustanzi Kimiċi għall-Interferenza Endokrinali (4). Is-CF jinkludi hames livelli, b'kull livell li jikkorrispondi għal livell differenti ta' kumplessità bijoloġika. L-assaġġi tal-irbit tal-ER deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar huma l-livell 2, li jinkludi "*assaġġi in vitro li jipprovdu data dwar il-mekkaniżmu/i/il-perkors(i) endokrinali magħżula*". Dan il-metodu ta' ttestjar hu għall-assaġġi tal-irbit tar-riċettur *in vitro* mfassla biex jidentifikaw ligandi għall-alfa tar-riċettur tal-estrogenu uman (ER $\alpha$ ).

3. Ir-rilevanza tal-assaġġ tal-irbit tal-ER *in vitro* għall-funzjonijiet bijoloġiċi ntweriet biċ-ċar. L-assaġġi tal-irbit tal-ER huma mfassla biex jidentifikaw sustanzi kimiċi li għandhom il-potenzjal li jinterferixxu l-perkors tal-ormon estrogenu, u ntużaw b'mod estensiv matul l-aħħar żewġ deċennji għall-karatterizzazzjoni tad-distribuzzjoni tat-tessut tal-ER kif ukoll biex jiġu identifikati l-agonisti/antagonisti tal-ER. Dawn l-assaġġi jirriflettu l-interazzjoni ligand-riċettur li hi l-ewwel pass tal-perkors ta' senjalar tal-estrogenu u essenzjali għall-funzjoni ta' riproduzzjoni fil-vertebrati kollha.
4. L-interazzjoni tal-estrogeni mal-ERs tista' taffettwa t-traskrizzjoni tal-ġeni kkontrollati mill-estrogenu u jinduċu effetti mhux ġenomiċi, li tista' twassal għall-induzzjoni jew għall-inibizzjoni ta' proċessi ċellolari, inklużi dawk neċessarji għall-proliferazzjoni taċ-ċelloli, għall-iżvilupp normali tal-fetu, u għall-funzjoni riproduttiva (5) (6) (7). Il-perturbazzjoni ta' sistemi estrogeniċi normali jista' jkollha l-potenzjal li tiskatta effetti avversi fuq l-iżvilupp normali (ontogenesi), is-saħħa riproduttiva u l-integrità tas-sistema riproduttiva. Senjalar mhux adatt tal-ER jista' jwassal għal effetti bħal riskju akbar ta' kanċer dipendenti fuq l-ormoni, fertilità indebolita, u alterazzjonijiet fit-tkabbir u fl-iżvilupp tal-fetu (8).
5. Assaġġi tal-irbit *in vitro* huma bbażati fuq interazzjoni diretta ta' sustanza ma' sit speċifiku ta' rbit tal-ligand tar-riċettur li jirregola t-traskrizzjoni tal-ġene. Il-komponent ewlieni tal-assaġġ tal-irbit tal-alfa tar-riċettur tal-estrogenu rikombinanti uman (hrER $\alpha$ ) ikejjel il-ħila ta' ligand radjotikkettat ( $[^3\text{H}]17\beta$ -estradiol) li jorbot mal-ER fil-preżenza ta' konċentrazzjonijiet dejjem akbar ta' sustanza kimika tat-test (jiġifieri kompetitur). Sustanzi kimiċi tat-test li fihom affinità għolja għall-ER jikkompetu mal-ligand radjotikkettat f'konċentrazzjoni inferjuri meta mqabbla ma' dawk is-sustanzi kimiċi b'affinità inferjuri għar-riċettur. Dan l-assaġġ jikkonsisti f'żewġ komponenti ewlenin: esperiment ta' rbit tas-saturazzjoni biex jiġu karatterizzati l-parametri ta' interazzjoni riċettur-ligand u tiġi dokumentata l-ispeċifità tal-ER, segwit minn esperiment tal-irbit kompetittiv li jikkaratterizza l-kompetizzjoni bejn sustanza kimika tat-test u ligand radjotikkettat għall-irbit mal-ER.



6. Studji ta' validazzjoni tas-CERI u l-assaġġi tal-irbit tal-FW urew ir-rilevanza u l-affidabbiltà tagħhom għall-iskop maħsub tagħhom (2).
7. Id-definizzjonijiet u l-abbrevjazzjonijiet użati f'dan il-metodu ta' ttestjar huma deskritti fl-Appendiċi 1.

#### **Ambitu u limitazzjonijiet relatati mal-assaġġi tal-irbit tar-riċettur**

8. Dawn l-assaġġi qed jiġu proposti għall-finijiet ta' skrinjar u ta' prijoritizzazzjoni, iżda jistgħu jipprovdu wkoll informazzjoni għal avveniment ta' inizjazzjoni molekulari (MIE) li tista' tintuża f'approċċ ta' piz tal-evidenza. Dawn jindirizzaw l-irbit kimiku mad-dominju tal-irbit tal-ligand tal-ER $\alpha$  f'sistema *in vitro*. B'hekk, ir-riżultati ma għandhomx jiġu estrapolati direttament għas-sinjalar u għar-regolamentazzjoni kumplessi tas-sistema endokrinali intatta *in vivo*.
9. L-irbit tal-ligand naturali, 17 $\beta$ -estradijoli, hu l-ewwel pass f'sensiela ta' avvenimenti molekulari li tattiva t-traskrizzjoni tal-ġeni fil-mira u, finalment, tintemm b'tibdil fiżjologiku (9). B'hekk, l-irbit mad-dominju tal-irbit tal-ligand tal-ER $\alpha$  hu meqjus wiehed mill-mekkanizmi ewlenin tal-interruzzjoni endokrinali (ED) medjata tal-ER, għalkemm hemm mekkanizmi oħra li permezz tagħhom tista' ssehh l-ED, inklużi (i) interazzjonijiet mas-siti tal-ER $\alpha$  li mhumieks iż-żona tal-irbit tal-ligand, (ii) interazzjonijiet ma' riċetturi oħra rilevanti għas-sinjalar tal-estrogenu, riċettur tal-estrogenu akkoppjat tal-ER $\beta$  u tal-proteina-G, riċetturi oħra u sistemi enzimatiċi fi hdan is-sistema endokrinali, (iii) sintezi tal-ormoni, (iv) attivazzjoni metabolika u/jew inattivazzjoni tal-ormoni, (v) distribuzzjoni tal-ormoni biex jimmiraw lejn tessuti, u (vi) ikklerjar tal-ormoni mill-ġisem. L-ebda wiehed mill-assaġġi taht dan il-metodu ta' ttestjar ma jindirizza dawn il-modalitajiet ta' azzjoni.
10. Dan il-metodu ta' ttestjar jindirizza l-hila tas-sustanzi li jorbtu mal-ER $\alpha$  umana u ma jagħmilx distinzjoni bejn agonisti jew antagonisti tal-ER $\alpha$ . Dawn l-assaġġi ma jindirizzawx avvenimenti downstream ulterjuri bħat-traskrizzjoni tal-ġeni jew tibdiliet fiżjologiċi. Peress li ntużaw sustanzi monokostitwenti singli biss matul il-validazzjoni, l-applikabbiltà għat-tahlitiet tat-test ma gietx indirizzata. L-assaġġi xorta waħda huma teorikament applikabbli għall-ittestjar ta' sustanzi multikostitwenti u tahlitiet. Qabel ma jintuża l-metodu ta' ttestjar fuq tahlita għall-ġenerazzjoni ta' *data* għal skop regolatorju intiż, għandu jiġi kkunsidrat jekk jistax jipprovdi riżultati adegwati għal dak l-għan u, jekk iva, għaliex. Dawn il-kunsiderazzjonijiet mhumieks mehtieġa meta jkun hemm rekwiżit regolatorju għall-ittestjar tat-tahlita.
11. Is-sistemi ta' riċetturi hielsa miċ-ċelloli ma għandhom ebda kapaċità metabolika intrinsika u ma ġewx validati flimkien mas-sistemi enzimatiċi metaboliki. Madankollu, jista' jkun possibbli li attività metabolika tiġi inkorporata f'disinn ta' studju iżda dan ikun jehtieġ sforzi ta' validazzjoni ulterjuri.

12. Sustanzi kimiċi li jistgħu jiddenaturaw il-proteina (jiġifieri proteina tar-riċettur), bħal tensjoattivi jew sustanzi kimiċi li jistgħu jbiddu l-pH tal-bafer tal-assaġġ, ma jistgħux jiġu ttestjati jew jistgħu jiġu ttestjati biss f'konċentrazzjonijiet nieqsa minn interazzjonijiet bħal dawn. Inkella, il-medda ta' konċentrazzjonijiet li tista' tiġi ttestjata fl-assaġġi għal sustanza kimika tat-test hi limitata mis-solubbiltà ta' din il-bafer tal-assaġġ.
13. Għal-finijiet ta' informazzjoni, it-Tabella 1 tipprovdi r-rizultati tat-test għall-24 sustanza li ġew ittestjati fiż-żewġ assaġġi validati bis-shih deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar. Minn dawn is-sustanzi, 17 huma klassifikati bħala leganti tal-ER u 6 bħala mhux leganti fuq il-bażi tar-rapporti ppubblikati, inklużi assaġġ tal-attivazzjoni traskrizzjonali tal-ER u/jew l-assaġġ uterotofiku (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). B'referenza għad-*data* miġbura fil-qosor fit-Tabella 1, kien hemm qbil ta' kważi 100 % bejn iż-żewġ assaġġi dwar il-klassifikazzjonijiet tas-sustanzi kollha sa  $10^{-4}$ M, u kull sustanza ġiet klassifikata kif suppost bħala legant tal-ER jew mhux legant tal-ER. Informazzjoni supplimentari dwar dan il-grupp ta' sustanzi kif ukoll sustanzi addizzjonali ttestjati fl-assaġġi tal-irbit tal-ER matul l-istudji ta' validazzjoni hi pprovduta fl-Istandards tal-Prestazzjoni għall-assaġġ tal-irbit tal-hrER (3), fl-Appendiċi 2 (Tabelli 1, 2 u 3).

**Tabella 1:** Klassifikazzjoni tas-sustanzi bħala leganti jew mhux leganti tal-ER meta ttestjati fl-Assaġġi tal-Irbid tal-hrER FW u CERi meta mqabbla mar-rispons mistenni

|    | Isem is-sustanza                                  | CAS RN     | Rispons Mistenni    | Assaġġ FW                              |                       | Assaġġ CERi                            |                   | Sustanza Kimika MESH Klassi          | Klassi tal-Prodott                |
|----|---------------------------------------------------|------------|---------------------|----------------------------------------|-----------------------|----------------------------------------|-------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|
|    |                                                   |            |                     | Konċentrazzjon i Medda (M)             | Klassifikazzjon i     | Konċentrazzjon i Medda (M)             | Klassifikazzjon i |                                      |                                   |
| 1  | 17β-Estradjol                                     | 50-28-2    | <i>Legant</i>       | $1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$ | Legant                | $1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$ | Legant            | Sterojde                             | Farmaċewtiku, Aġent Veterinarju   |
| 2  | Noretinodrel                                      | 68-23-5    | <i>Legant</i>       | $3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-4}$ | Legant                | $3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-4}$ | Legant            | Sterojde                             | Farmaċewtiku, Aġent Veterinarju   |
| 3  | Noretindron                                       | 68-22-4    | <i>Legant</i>       | $3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-4}$ | Legant                | $3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-4}$ | Legant            | Sterojde                             | Farmaċewtiku, Aġent Veterinarju   |
| 4  | Ftalat tad-di- <i>n</i> -butil                    | 84-74-2    | <i>Mhux legant*</i> | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$ | Mhux Legant**†        | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$ | Mhux Legant**†    | Idrokarbur (ċikliku), Ester          | Plastifikant, Sustanza Intermedja |
| 5  | DES                                               | 56-53-1    | <i>Legant</i>       | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | Legant                | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | Legant            | Idrokarbur (Ċikliku), Fenol          | Farmaċewtiku, Aġent Veterinarju   |
| 6  | 17α-etinilestradjol                               | 57-63-6    | <i>Legant</i>       | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | Legant                | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | Legant            | Sterojde                             | Farmaċewtiku, Aġent Veterinarju   |
| 7  | Mmeso-Ežestrol                                    | 84-16-2    | <i>Legant</i>       | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | Legant                | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | Legant            | Idrokarbur (Ċikliku), Fenol          | Farmaċewtiku, Aġent Veterinarju   |
| 8  | Ġenisteina                                        | 446-72-0   | <i>Legant</i>       | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | Legant                | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | Legant            | Idrokarbur (eteroċikliku), Flavonojd | Prodott Naturali                  |
| 9  | Ekwol                                             | 531-95-3   | <i>Legant</i>       | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | Legant                | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | Legant            | Metabolit tal-Fitoestrogenu          | Prodott Naturali                  |
| 10 | Butil paraben ( <i>n</i> -butil-4-idrossibenzoat) | 94-26-8    | <i>Legant</i>       | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | Legant                | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | Legant            | Paraben                              | Preservattiv                      |
| 11 | Nonilfenol (tahlita)                              | 84852-15-3 | <i>Legant</i>       | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | Legant                | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | Legant            | Alkilfenol                           | Kompost Intermedju                |
| 12 | <i>o,p'</i> -DDT                                  | 789-02-6   | <i>Legant</i>       | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | Legant                | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | Legant            | Organoklorur                         | Insettiċida                       |
| 13 | Kortikosteron                                     | 50-22-6    | <i>Mhux legant*</i> | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$ | Mhux legant           | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$ | Mhux Legant       | Sterojde                             | Prodott Naturali                  |
| 14 | Zearalenon                                        | 17924-92-4 | <i>Legant</i>       | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | Legant                | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | Legant            | Idrokarbur (eteroċikliku), Latton    | Prodott Naturali                  |
| 15 | Tamossifen                                        | 10540-29-1 | <i>Legant</i>       | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | Legant                | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | Legant            | Idrokarbur, (Ċikliku)                | Farmaċewtiku, Aġent Veterinarju   |
| 16 | 5α-diidrotestosteron                              | 521-18-6   | <i>Legant</i>       | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | Legant                | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | Legant            | Sterojde, Nonfenoliku                | Prodott Naturali                  |
| 17 | Bisfenol A                                        | 80-05-7    | <i>Legant</i>       | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | Legant                | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | Legant            | Fenol                                | Intermedjarju Kimiku              |
| 18 | 4- <i>n</i> -etilfenol                            | 1987-50-4  | <i>Legant</i>       | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | Ekwivoku <sup>a</sup> | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | Legant            | Alkilfenol                           | Intermedja                        |
| 19 | Kepon (Klordekron)                                | 143-50-0   | <i>Legant</i>       | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | Legant                | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | Legant            | Idrokarbur, (Aloġenat)               | Pestiċida                         |

|    |                   |            |              |                                        |                          |                                        |                          |                      |                           |
|----|-------------------|------------|--------------|----------------------------------------|--------------------------|----------------------------------------|--------------------------|----------------------|---------------------------|
| 20 | Benz(a)antraċen   | 56-55-3    | Mhux Legant  | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | Mhux Legant <sup>b</sup> | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | Mhux Legant <sup>b</sup> | Idrokarbur Aromatiku | Intermedja                |
| 21 | Enterolatto       | 78473-71-9 | Legant       | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | Legant                   | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | Legant                   | Fitoestrogeni        | Prodott Naturali          |
| 22 | Progesteron       | 57-83-0    | Mhux legant* | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$ | Mhux Legant              | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$ | Mhux Legant              | Steroidi             | Prodott Naturali          |
| 23 | Ottitrietossilani | 2943-75-1  | Mhux legant  | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | Mhux Legant              | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | Mhux Legant              | Silan                | Modifikatur tas-Superfċje |
| 24 | Atrazina          | 1912-24-9  | Mhux legant* | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$ | Mhux Legant              | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$ | Mhux Legant              | Kompost eteroċikliku | Erbċida                   |

\*Limitu tas-solubbiltà ta'  $< 1 \times 10^{-4} M$ .

<sup>a</sup>L-użu u l-klassifikazzjoni tal-ftalat tad-di-n-butyl (DBP) bhala mhux legant kienu bbażati fuq l-ittestjar sa  $10^{-4} M$  għaliex is-sustanza kienet giet osservata bhala insolubbli f'  $10^{-3} M$  (eż. turbidità) f'xi laboratorji matul l-istudji ta' qabel il-validazzjoni.

<sup>†</sup> Matul l-istudju ta' validazzjoni, il-ftalat tad-di-n-butyl (DBP) għe ttestjat bhala sustanza tat-test kodifikata f'konċentrazzjonijiet sa  $10^{-3} M$ . F'dawn il-kundizzjonijiet, ċerti laboratorji osservat tnaqqis fl-irbit radjologand fl-oghla konċentrazzjoni ( $10^{-3} M$ ) u/jew dhul ta' kurva ambigwi. Għal dawn is-sessjonijiet, id-DBP għe klassifikat bhala "ekwivoku" jew "legant" fi tlieta minn hames laboratorji li użaw l-assaġġ CERi u f'hamsa minn sitt laboratorji li użaw l-assaġġ FW (ara r-Referenza (2), Taqsimiet IV.B.3a,b u VI.A).

<sup>a</sup> Il-klassifikazzjoni ma kinitx konsistenti mal-klassifikazzjoni mistennija. Klassifikazzjoni ta' 4-n-ettilfenol bhala "ekwivoku" jew "mhux legant" fi tlieta minn hames laboratorji rriżultat fi klassifikazzjoni medja ta' ekwivoku. Spezzjoni aktar appfondita sabet li dan kien dovut għal limitazzjonijiet tas-solubbiltà kimika li pprevjenew il-produzzjoni ta' kurva tal-irbit shiha.

<sup>b</sup> Matul l-istudju ta' validazzjoni, il-benz(a)antraċen għe riklassifikat bhala mhux legant (jigifieri negattiv) fuq il-baži tad-dokumentazzjoni ippubblikata li wriet li l-attività estrogenika *in vitro* rapportata għal din is-sustanza (16) tiddependi primarjament mill-attivazzjoni metabolika tagħha (17)(18). L-attivazzjoni metabolika enzimatika tas-sustanza ma tkunx anticipata f'assaġġi tal-irbit tal-hrER hielsa miċ-ċelloli kif użati f'dan l-istudju ta' intervalidazzjoni. B'hekk, il-klassifikazzjoni korretta għal din is-sustanza hi "mhux legant" meta tintuża fil-kundizzjonijiet sperimentali għall-assaġġi FW u CERi.

## KOMPONENTI TAL-ASSAĠĠ TAL-IRBIT TAL-hrER

### Komponenti Essenzjali tal-Assaġġ

14. Dan il-metodu ta' ttestjar japplika għal assaġġi li jużaw riċettur tal-ER u ligand b'saħhtu biżżejjed għar-reċettur li jista' jintuża bhala markatur/traċċatur għall-assaġġ u jista' jiġi spostat b'konċentrazzjonijiet dejjem akbar ta' sustanza kimika tat-test. L-assaġġi leganti fihom iż-żewġ komponenti ewlenin li ġejjin: 1) irbit tas-saturazzjoni u 2) irbit kompetittiv. L-assaġġ tal-irbit tas-saturazzjoni jintuża biex jiġu kkonfermati l-ispeċifità u l-attività tal-preparati tar-riċettur, filwaqt li l-esperiment tal-irbit kompetittiv jintuża biex tiġi evalwata l-hila ta' sustanza kimika tat-test li torbot mal-hrER.

### Kontrolli

15. Il-baži għall-estrogeni u għall-kontrolli ta' riferiment konkorrenti proposti għandha tkun deskritta. Kontrolli konkorrenti (solvent (veikolu), pozittiv (legant tal-ER; affinità b'saħħitha u dgħajfa), negattiv (mhux legant)), kif xieraq, iservu bhala indikazzjoni li l-assaġġ hu operattiv skont il-kundizzjonijiet tat-test u jipprovdu baži għal tqabbil bejn esperiment u iehor; normalment dawn ikunu parti mill-kriterji ta' aċċettabbiltà għal esperiment partikolari

(1). Kurvi shaħ ta' konċentrazzjoni għall-estrogenu u għall-kontrolli ta' riferiment (jiġifieri legant dgħajjef u mhux legant) għandhom jintużaw fi pjastra waħda matul kull sessjoni. Il-pjastri l-oħra kollha għandu jkun fihom: 1) konċentrazzjoni għolja (bejn wieħed u ieħor spostament shiħ ta' ligand radjotikkettat) u medja (madwar  $1-IC_{50}$ ) ta' kull E2 u legant dgħajjef fit-triplikat; 2) kontroll b'solvent u irbit mhux speċifiku, kull wieħed fi triplikat.

### **Proċeduri Standard ta' Kontroll tal-Kwalità**

16. Il-proċeduri standard ta' kontroll tal-kwalità għandhom isiru kif deskritt għal kull assaġġ biex jiġu żgurati riċetturi attivi, il-konċentrazzjonijiet kimiċi korretti, li l-limiti ta' tolleranza jibqgħu stabbli f'diversi repliki, u li tinżamm il-ħila li jiġu pprovduti r-risponsi mistennija ta' rbit tal-ER maż-żmien.

### **Wiri tal-Profiċjenza tal-Laboratorju**

17. Qabel l-ittestjar ta' sustanza kimika mhux magħrufa bi kwalunkwe wieħed mill-assaġġi skont dan il-metodu ta' ttestjar, kull laboratorju għandu juri profiċjenza fl-użu tal-assaġġ billi jagħmel assaġġi tas-saturazzjoni biex jikkonferma l-ispeċifità u l-attività tal-preparazzjoni tal-ER, u l-assaġġi tal-irbit kompetittiv mal-estrogenu u mal-kontrolli ta' riferiment (legant dgħajjef u mhux legant). Bażi ta' *data* storika bir-riżultati għall-estrogenu u għall-kontrolli ta' riferiment generata minn bejn tlieta u ħames esperimenti indipendenti mwettqa f'jiem differenti għandha tkun stabbilita mil-laboratorju. Dawn l-esperimenti se jkunu l-baży għall-estrogenu ta' riferiment u għall-kontrolli storiċi għal-laboratorju u se jintużaw bħala valutazzjoni parzjali tal-aċċettabbiltà tal-assaġġ għal sessjonijiet futuri.

18. Ir-risponsività tas-sistema tat-test tiġi kkonfermata wkoll bl-ittestjar tas-sustanzi ta' profiċjenza elenkati fit-Tabella 2. Il-lista ta' sustanzi ta' profiċjenza hi subsett tas-sustanzi ta' riferiment pprovduti fl-Istandards tal-Prestazzjoni għall-assaġġi tal-irbit tal-ER (3). Dawn is-sustanzi huma kummerċjalment disponibbli, jirrappreżentaw il-klassijiet ta' sustanzi kimiċi assoċjati komunement mal-attività tal-irbit tal-ER, jesibixxu firxa xierqa ta' potenza mistennija għall-irbit tal-ER (jiġifieri b'saħħitu sa dgħajjef) u għal dawk mhux leganti (jiġifieri negattivi). Għal kull sustanza ta' profiċjenza, il-konċentrazzjonijiet ittestjati għandhom ikopru l-medda pprovduta fit-Tabella 2. Għandhom isiru tal-anqas tliet esperimenti għal kull sustanza u r-riżultati għandhom ikunu konformi mal-attività kimika mistennija. Kull esperiment għandu jsir b'mod indipendenti (jiġifieri b'dilwizzjonijiet friski ta' riċettur, ta' sustanzi kimiċi, u ta' reagent), bi tliet repliki għal kull konċentrazzjoni. Il-profiċjenza tintwera bil-klassifikazzjoni korretta (pożittiva/negattiva) ta' kull sustanza ta' profiċjenza. L-ittestjar tal-profiċjenza għandu jsir minn kull tekniku meta jkun qed jitgħallem l-assaġġi.

**Tabella 2:** Lista ta' kontrolli u ta' sustanzi ta' profiċjenza għall-assaġġi tal-irbit kompetittiv tal-hrER<sup>1</sup>

| Nru                                                                      | Isem is-sustanza                  | RN tas-CAS <sup>2</sup>  | Rispons Mistenni <sup>3,4</sup> | Medda tal-konċentrazzjonijiet tat-test (M) | Klassi kimika tal-MeSH <sup>5</sup> | Klassi tal-prodott <sup>6</sup> |
|--------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|---------------------------------|--------------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|
| <b>Kontrolli (Estroġenu ta' referenza, legant dgħajjef, mhux legant)</b> |                                   |                          |                                 |                                            |                                     |                                 |
| 1                                                                        | 17-εστραδιολ                      | 50-28-2                  | Legant                          | $1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$     | Sterojde                            | Farmaċewtiku, Aġent veterinarju |
| 2                                                                        | Noretinodrel (jew)<br>Noretindron | 68-23-5 (jew)<br>68-22-4 | Legant                          | $3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-6}$     | Sterojde                            | Farmaċewtiku, Aġent veterinarju |
| 3                                                                        | Ottitrietossisilan                | 2943-75-1                | Mhux legant                     | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$     | Silan                               | Modifikatur tas-superfiċje      |
| <b>Sustanzi ta' profiċjenza<sup>6</sup></b>                              |                                   |                          |                                 |                                            |                                     |                                 |
| 4                                                                        | Dietilstilbestrol                 | 56-53-1                  | Legant                          | $1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$     | Idrokarbur (ċikliku), Fenol         | Farmaċewtiku, Aġent veterinarju |
| 5                                                                        | 17α-etinilestradjol               | 57-63-6                  | Legant                          | $1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$     | Sterojde                            | Farmaċewtiku, Aġent veterinarju |
| 6                                                                        | meso-Ežestrol                     | 84-16-2                  | Legant                          | $1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$     | Idrokarbur (ċikliku), Fenol         | Farmaċewtiku, Aġent veterinarju |
| 7                                                                        | Tamossifen                        | 10540-29-1               | Legant                          | $1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$     | Idrokarbur (ċikliku)                | Farmaċewtiku, Aġent veterinarju |
| 8                                                                        | Ġenisteina                        | 446-72-0                 | Legant                          | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$     | Kompost eteroċikliku, Flavonojd,    | Prodott naturali                |
| 9                                                                        | Bisfenol A                        | 80-05-7                  | Legant                          | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$     | Fenol                               | Intermedjarju kimiku            |

|    |                                          |            |                          |                                        |                              |                                   |
|----|------------------------------------------|------------|--------------------------|----------------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|
| 10 | Żearalonon                               | 17924-92-4 | Legant                   | $1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-3}$ | Kompost eteroċikliku, Latton | Prodott Naturali                  |
| 11 | Butil paraben                            | 94-26-8    | Legant                   | $1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-3}$ | Aċidu karbossiliku, Fenol    | Preservattiv                      |
| 12 | Atrazina                                 | 1912-24-9  | Mhux legant              | $1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$ | Kompost eteroċikliku         | Erbċida                           |
| 13 | Ftalat tad-di-n-butyl (DBP) <sup>7</sup> | 84-74-2    | Mhux legant <sup>8</sup> | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$ | Idrokarbur (ċikliku), Ester  | Plastifikant, Sustanza intermedja |
| 14 | Kortikosteron                            | 50-22-6    | Mhux legant              | $1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-4}$ | Sterojde                     | Prodott naturali                  |

Jekk sustanza ta' profiċjenza ma għadhiex kummerċjalment disponibbli, tista' tintuża sustanza bl-istess klassifikazzjoni tal-irbit tal-ER, u b'potenza u bi klassi kimika komparabbli.

2 Abbrevjazzjonijiet: RN tas-CAS = Numru tar-Reġistru tas-Servizz tat-Taqsiriet tas-Sustanzi Kimiċi.

3 Klassifikazzjoni bħala Legant jew Mhux Legant tal-ER oġġet tal-istudju ta' validazzjoni għall-Assaġġi tal-Irbit tal-hrER CERi u FW (2).

<sup>4</sup> L-attività tal-irbit tal-ER kienet ibbażata fuq id-Dokumenti ta' Rieżami ta' Sfond (BRD) tal-ICCVAM għall-assaġġi tal-Irbit tal-ER u AT (9) kif ukoll fuq *data* empirika u informazzjoni oħra miksuba minn studji ta' riferiment ppubblikati u rieżaminati (10) (11) (12) (13) (14) (15).

<sup>5</sup> Is-sustanzi ġew assenjati fi klassi kimika wahda jew aktar bl-użu tal-Intestaturi tas-Suġġetti Mediċi (MeSH) tal-Librerija Nazzjonali tal-Mediċina tal-Istati Uniti, skema ta' klassifikazzjoni standardizzata rikonoxxuta fil-livell internazzjonali (disponibbli fuq: <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

<sup>6</sup> Is-sustanzi ġew assenjati fi klassi wahda jew aktar ta' prodott bl-użu tal-Baži ta' *Data* tas-Sustanzi Perikolużi tal-Librerija Nazzjonali tal-Mediċina tal-Istati Uniti (disponibbli fuq: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).

<sup>7</sup> Id-DPB jista' jintuża bħala mhux legant tal-kontroll alternattiv ittestjat b'konċentrazzjoni massima ta'  $10^{-4}$  M.

<sup>8</sup> Il-limitu tas-solubbiltà għal din is-sustanza hu ta'  $10^{-4}$  M. L-użu u l-klassifikazzjoni tal-ftalat tad-di-n-butyl (DBP) bħala mhux legant kienu bbażati fuq l-ittestjar sa  $10^{-4}$  M għaliex is-sustanza kienet ġiet osservata bħala insolubbli f'  $10^{-3}$  M (eż. turbidità) f'xi laboratorji matul l-istudji ta' qabel il-validazzjoni.

## **L-ittestjar tas-Solubbiltà u s-Sejbien tal-Medda ta' Konċentrazzjonijiet għas-Sustanzi Kimiċi tat-Test**

19. Għandu jsir test preliminari biex jiġi determinat il-limitu tas-solubbiltà għal kull sustanza kimika tat-test u biex tiġi identifikata l-medda ta' konċentrazzjoni xierqa li għandha tintuża meta jsir it-test. Il-limitu tas-solubbiltà ta' kull sustanza kimika tat-test għandu jiġi determinat inizjalment fis-solvent u jiġi kkonfermat b'mod ulterjuri fil-kundizzjonijiet tal-assaġġ. Il-konċentrazzjoni finali ttestjata fl-assaġġ ma għandhiex taqbeż il-1 mM. L-ittestjar għas-sejbien tal-medda jikkonsisti f'kontroll b'solvent flimkien ma' tmien dilwizzjonijiet serjali tal-log, li jibdeu bil-konċentrazzjoni massima aċċettabbli (eż. 1 mM jew anqas, fuq il-bażi tal-limitu tas-solubbiltà), u l-preżenza ta' dardir jew ta' preċipitat innotat. Il-konċentrazzjonijiet fit-tieni u fit-tielet esperimenti għandhom jiġu aġġustati kif xieraq biex tiġi karatterizzata aħjar il-kurva konċentrazzjoni rispons.

## **Kriterji ta' Aċċettabbiltà tas-Sessjoni tat-Test**

20. Aċċettazzjoni jew rifjut ta' sessjoni tat-test huma bbażati fuq l-evalwazzjoni tar-riżultati miksuba għall-estrogenu u għall-kontroll referenzjali użati għal kull esperiment. L-ewwel, għall-pjastra nru 1, il-kurvi shah tal-konċentrazzjoni għall-kontrolli ta' riferiment minn kull esperiment għandhom jissodisfaw il-miżuri tal-prestazzjoni b'parametri tad-dhul ta' kurva (eż.  $IC_{50}$  u Hillslope) fuq il-bażi tar-riżultati rapportati għall-protokoll rispettivi għall-assaġġi CERI u FW (Appendiċi 2 u 3), u d-*data* storika tal-kontroll mil-laboratorju li jwettaq it-test. Il-kontrolli kollha (estrogenu ta' referenza, legant dgħajjef, u mhux legant) għandhom jiġu klassifikati kif suppost għal kull esperiment. It-tieni, il-kontrolli fuq il-pjastri sussegwenti kollha jridu jiġu vvalutati għall-konsistenza mal-pjastra nru 1. Medda suffiċjenti ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test għandha tintuża biex tiġi definita biċ-ċar il-quċċata tal-kurva tal-irbit kompetittiv. Il-varjabbiltà bejn ir-repliki f'kull konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test kif ukoll bejn it-tliet sessjonijiet indipendenti għandha tkun raġonevoli u xjentifikament difendibbli. Il-hila ta' twettiq tal-assaġġ b'konsistenza għandha tintwera bl-iżvilupp u biż-żamma ta' bażi ta' *data* storika għall-estrogenu u għall-kontrolli referenzjali. Id-devjazzjonijiet standard (SD) jew il-koeffiċjenti ta' varjazzjoni (CV) għall-parametri ta' dhul tal-kurvi tal-estrogenu u tal-legant dgħajjef tal-kontroll referenzjali minn diversi esperimenti jistgħu jintużaw bħala kejl tar-riproduċibbiltà fi hdan il-laboratorju. Għandu jiġi applikat ġudizzju professjonali meta jiġu rieżaminati r-riżultati tal-kontroll tal-pjastra minn kull sessjoni kif ukoll għal kull sustanza kimika tat-test.

Barra minn hekk, għandhom jiġu rispettati l-prinċipji li ġejjin rigward il-kriterji ta' aċċettazzjoni:

- Id-*data* għandha tkun suffiċjenti biex issir valutazzjoni kwantitattiva tal-irbit tal-ER



- Il-konċentrazzjonijiet ittestjati għandhom jibqgħu fi hdan il-medda ta' solubbiltà tas-sustanza kimika tat-test.

### **Analizi tad-data**

21. Il-proċedura definita ta' analizi tad-*data* għas-saturazzjoni u d-*data* dwar l-irbit kompetittiv għandhom jaderixxu mal-prinċipji ewlenin għall-karatterizzazzjoni tal-interazzjonijiet riċettur-ligand. Tipikament, id-*data* dwar l-irbit tas-saturazzjoni tiġi analizzata bl-użu ta' mudell ta' rigressjoni mhux lineari li jqis l-irbit totali u mhux speċifiku. Tista' tkun meħtieġa korrezzjoni għat-tnaqqis tal-ligand (eż. Swillens, 1995 (19)) meta jiġu determinati l-B<sub>max</sub> u l-K<sub>d</sub>. Id-*data* minn assaġġi tal-irbit kompetittiv tipikament tiġi trasformata (eż. irbit speċifiku perċentwali u konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test) (log M)). Stimuli tal-log (IC<sub>50</sub>) għal kull sustanza kimika tat-test għandhom jiġu determinati bl-użu ta' softwer xieraq ta' dħul ta' kurva nonlineari għad-dħul f'ekwazzjoni ta' Hill b'erba' parametri. Wara analizi inizjali, għandhom isiru rieżami tal-parametri ta' dħul ta' kurva u rieżami viżwali ta' kemm id-*data* dwar l-irbit tidhol fil-kurva ta' rbit kompetittiv generata. F'ċerti każijiet, tista' tkun meħtieġa analizi addizzjonali biex jinkiseb l-aħjar dħul ta' kurva (eż. ristrezzjoni tal-quċċata u/jew tal-qiegħ tal-kurva, l-użu tar-regola tal-10 %, ara l-Appendiċi 4 u r-Referenza 2 (Taqsimha III.A.2)).
22. L-ilhuq tal-kriterji ta' aċċettabbiltà (paragrafu 20) jindika li s-sistema tal-assaġġ qed topera kif suppost, iżda ma jiżgurax li kwalunkwe test partikolari jipproduċi *data* preċiża. Ir-replikar tar-riżultati korretti tal-ewwel test hu l-aħjar indikazzjoni li tkun giet prodotta *data* preċiża.

### **Kriterji ta' Interpretazzjoni tad-Data Ġenerali**

23. Bhalissa ma hemm ebda metodu miftiehem f'livell universali għall-interpretazzjoni tad-*data* dwar l-irbit tal-ER. Madankollu, kemm il-valutazzjonijiet kwalitattivi (eż. legant/mhux legant) u/jew kwantitattivi (eż. log IC<sub>50</sub>, Affinità Relattiva għall-Irbit (RBA), eċċ.) tal-attività medjata bl-hrER għandhom ikunu bbażati fuq *data* empirika u ġudizzju xjentifiku solidu.

### **Rapport tat-Test**

24. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

#### *Assaġġ:*

- l-assaġġ użat;

#### *Il-kontroll/Ir-riferiment/Is-sustanza kimika tat-test*

- is-sors, in-numru tal-lott, id-*data* ta' limitu għall-użu, jekk disponibbli
- l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test stess, jekk magħrufa;

- is-solubbiltà u l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test fis-solvent, jekk magħrufin;
- il-kejl tal-pH, tal-ożmolalità u tal-preċipitat fil-medium tat-tkabbir li miegħu żdiedet is-sustanza kimika tat-test, kif xieraq.

Sustanza monokostitwenti:

- id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma, u l-proprietajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali;
- l-identifikazzjoni kimika, bhall-isem IUPAC jew CAS, in-numru tas-CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.

Sustanza multikostitwenti, UVCBs u taħlitiet:

- ikkaratterizzati sa fejn possibbli mill-identità kimika (ara aktar 'il fuq), l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprietajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti.

*Solvent/Veikolu:*

- il-karatterizzazzjoni (natura, fornitur u lott);
- il-ġustifikazzjoni għall-għażla tas-solvent/tal-veikolu;
- is-solubbiltà u l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test fis-solvent/veikolu, jekk magħrufin;

*Riċetturi:*

- is-sors tar-riċetturi (fornitur, Nru tal-katalogu, lott, speċi tar-riċettur, konċentrazzjoni attiva tar-riċettur ipprovduta mill-fornitur, ċertifikazzjoni mingħand il-fornitur)
- karatterizzazzjoni tar-riċetturi (inklużi r-riżultati tal-irbit tas-saturazzjoni): Kd, Bmax,
- hżin tar-riċetturi
- ligand radjotikkettat:
- fornitur, Nru tal-katalogu., lott, attività speċifika

*Il-kundizzjonijiet tat-test:*

- limitazzjonijiet tas-solubbiltà skont il-kundizzjonijiet tal-assaġġ;
- il-kompożizzjoni tal-bafer tal-irbit;
- il-konċentrazzjoni tar-riċettur;

- il-konċentrazzjoni tat-traċċatur (jiġifieri ligand radjotikkettat);
- il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test;
- il-veikolu perċentwali fl-assaġġ finali;
- it-temperatura u l-hin tal-inkubazzjoni;
- il-metodu tal-irbit/tas-separazzjoni libera;
- il-kontrolli pożittivi u negattivi/l-istandards referenzjarji;
- il-kriterji biex it-testijiet jitqiesu bħala pożittivi, negattivi jew ekwivoċi;

*Kontroll tal-aċċettabilità:*

- il-valuri attwali tal-IC<sub>50</sub> u tal-Hillslope għall-kontrolli pożittivi konkorrenti/ghas-sustanzi referenzjali;

*Ir-riżultati:*

- *data* mhux proċessata u marbuta/libera;
- kontroll tal-konferma tad-denaturazzjoni, jekk xieraq;
- jekk teżisti, l-anqas konċentrazzjoni effettiva (LEC);
- il-valuri tal-RBA u/jew tal-IC<sub>50</sub> kif xieraq;
- ir-relazzjoni konċentrazzjoni rispons, fejn possibbli,
- analizijiet statistiċi, jekk jeżistu, flimkien ma' kejl tal-errur u tal-kunfidenza (eż. SEM, SD, CV jew CI ta' 95 %) u deskrizzjoni ta' kif inkisbu dawn il-valuri;

*Diskussjoni tar-riżultati:*

- applikazzjoni tar-regola tal-10 %

*Konklużjoni*

## DOKUMENTAZZJONI

- (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), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.
- (2) OECD (2015). Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrER $\alpha$ ), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.
- (3) OECD (2015). Performance Standards for Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrER $\alpha$ ), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 222), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.
- (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), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.
- (5) Cavaillès V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept, Climacteric, 5 Suppl 2: p.20-6.
- (6) Welboren W.J., *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and How are they Regulated? *Endocr. Relat. Cancer.*, 16(4): p. 1073-89.
- (7) Younes M. u 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), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.
- (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): Ġappun. 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. Ittri*, 146: 111-120.
- (16) Kummer V; Maskova, J; Zrally, Z; Neca, J; Simeckova, P; Vondracek, J; Machala, M. (2008). Estrogenic Activity of Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Uterus of Immature Wistar Rats. *Toxicol. Ittri*, 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.

## Appendiċi 1

### DEFINIZZJONIJIET U ABBREVJAZZJONIJIET

**Ir-Regola tal-10 %:** L-ghażla li mill-analizijiet jiġu esklużi l-punti tad-*data* fejn il-medja tar-repliki għal-limitu speċifiku tal- $[^3\text{H}]17\beta$ -estradijoli tkun 10 % jew aktar minn dik osservata għall-valur medju f'konċentrazzjoni inferjuri (ara l-Appendiċi 4).

**Kriterji ta' aċċettabbiltà:** L-istandards minimi għat-tweġġ tal-kontrolli sperimentali u l-istandards referenzjarji. Il-kriterji ta' aċċettabbiltà kollha għandhom jiġu ssodisfati biex esperiment jitqies validu.

**Akkuratezza (konkordanza):** Il-qrubija fil-livell ta' qbil bejn ir-riżultati tal-assaġġ u l-valuri referenzjarji aċċettati. Hi kejl tal-prestazzjoni tal-assaġġ u wieħed mill-aspetti ta' rilevanza. Spiss it-terminu jintuża b'mod alternanti ma' "konkordanza" biex ifisser il-proporzjon ta' riżultati korretti ta' assaġġ (1).

**CF:** Il-Qafas Kunċettwali tal-OECD għall-Ittestjar u għall-Evalwazzjoni tal-Interferenti Endokinali.

**Sustanza kimika:** Sustanza jew tahlita.

**CV:** Koeffiċjent ta' varjazzjoni

**E2:**  $17\beta$ -estradijoli

**ED:** Interferenza endokrinale

**hER $\alpha$ :** Riċettur alfa tal-estrogenu uman

**ER:** Riċettur tal-Estrogenu

**Attività estrogenika:** Il-kapaċità ta' sustanza kimika li timita  $17\beta$ -estradijoli fil-hila tiegħu li jorbot riċetturi tal-estrogenu. L-irbit mal-hER $\alpha$  jista' jiġi individwat b'dan il-metodu ta' ttestjar.

**IC<sub>50</sub>:** Il-konċentrazzjoni effettiva medjana ta' sustanza kimika tat-test inibitorja.

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

**Riproduċibbiltà interlaboratorja:** Kejl ta' kemm laboratorji kwalifikati differenti, li jużaw l-istess protokoll u li jittestjaw l-istess sustanzi, jistgħu jipproduċu riżultati kwalitattivament u kwantitattivament simili. Ir-riproduċibbiltà interlaboratorja hi determinata matul il-proċessi ta' qabel il-validazzjoni u tal-validazzjoni, u tindika kemm assaġġ jista' jiġi trasferit b'suċċess bejn laboratorji, u din tissejjaħ ukoll riproduċibbiltà bejn laboratorji (1).

**Riproduċibbiltà intralaboratorja:** Determinazzjoni ta' kemm persuni kwalifikati fi hdan l-istess laboratorju jistgħu jirreplikaw b'suċċess ir-riżultati billi jużaw protokoll speċifiku f'hinijiet differenti. Din tissejjaħ ukoll "riproduċibbiltà fi hdan il-laboratorju" (1).

**LEC:** L-anqas konċentrazzjoni effettiva hi l-anqas konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li tipproduċi rispons (jiġifieri l-anqas konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li fiha l-induzzjoni tad-drabi tkun statistikament differenti mill-kontroll b'veikolu konkorrenti).

**Test me-too:** Espressjoni kollokwjali għal assaġġ li jkun strutturalment u funzjonalment simili għal metodu ta' ttestjar ta' riferiment validat u aċċettat. Jintuża b'mod alternanti ma' metodu ta' ttestjar simili

**PBTG:** Linja Gwida tat-Test Ibbazata fuq il-Prestazzjoni

**Standards tal-prestazzjoni:** Standards, ibbażati fuq metodu ta' ttestjar validat, li jipprovdu bażi għall-evalwazzjoni tal-komparabbiltà ta' assaġġ propost li hu simili b'mod funzjonali u mekkanistiku. Inklużi hemm (1) il-komponenti essenzjali tal-assaġġ; (2) lista minima ta' sustanzi kimiċi ta' riferiment magħżula minn fost is-sustanzi kimiċi użati biex tintwera l-prestazzjoni aċċettabbli tal-metodu ta' ttestjar validat; u (3) il-livelli komparabbli ta' akkuratizza u ta' affidabbiltà, fuq il-bażi ta' dak li nkiseb għall-assaġġ validat, li l-metodu ta' ttestjar propost għandu juri meta evalwat bl-użu tal-lista minima ta' sustanzi kimiċi ta' riferiment (1).

**Sustanzi ta' profiċjenza:** Subsett tas-Sustanzi ta' riferiment inklużi fl-Istandards tal-Prestazzjoni li jistgħu jintużaw mil-laboratorji biex tintwera kompetenza teknika b'assaġġ standardizzat. Il-kriterji tal-għażla għal dawn is-sustanzi tipikament jinkludu li daww jirrappreżentaw il-medda ta' risponsi, ikunu kummerċjalment disponibbli, u jkollhom *data* ta' riferiment ta' kwalità għolja disponibbli.

**Profiċjenza:** Il-hila muriġa biex jitwettaq assaġġ kif suppost qabel l-ittestjar ta' sustanza mhux magħrufa.

**Estroġenu ta' riferiment:** 17β-estradijoli (E2, CAS 50-28-2).

**Metodi ta' ttestjar ta' riferiment:** L-assaġġi li fuqhom hi bbażata PBTG 493.

**RBA:** Affinità Relattiva għall-Irbit. L-RBA ta' sustanza tiġi kkalkolata bħala perċentwal tal-log ( $IC_{50}$ ) għas-sustanza relattiva għal-log ( $IC_{50}$ ) għal 17 $\beta$ -estradijoli

**Rilevanza:** Deskrizzjoni tar-relazzjoni ta' assaġġ mal-effett ta' interess u jekk huwiex sinifikanti u utli għal skop partikolari. Din tiddetermina kemm l-assaġġ għandu l-ħila jkejjel jew ibassar b'mod korrett l-effett bijoloġiku ta' interess. Ir-rilevanza tinkorpora l-kunsiderazzjoni tal-preċiżjoni (konkordanza) ta' metodu ta' ttestjar (1).

**Affidabbiltà:** Kejl ta' kemm assaġġ jista' jitwettaq b'mod riproducibbli fil-laboratorji u bejn il-laboratorji tul iż-żmien, meta jitwettaq billi jintuza l-istess protokoll. Din tiġi evalwata billi tkun ikkalkolata r-riproduttività ta' fost u bejn il-laboratorji.

**SD:** Devjazzjoni standard.

**Sustanza kimika tat-test:** Kwalunkwe sustanza jew tahlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

**Metodu ta' ttestjar validat:** Assaġġ li għalih ikunu tlestew studji ta' validazzjoni biex tiġi determinata r-rilevanza (inkluża l-akkuratezza) u l-affidabbiltà għal għan speċifiku. Ta' min jinnota li jista' jkun li metodu ta' ttestjar validat ma jkollux prestazzjoni tajba biżżejjed f'termini ta' akkuratezza u ta' affidabbiltà biex jitqies aċċettabbli għall-għan propost (1).

**Validazzjoni:** Il-proċess li bih l-affidabbiltà u r-rilevanza ta' approċċ, ta' metodu, ta' assaġġ, ta' proċess jew ta' valutazzjoni partikolari jkunu stabbiliti għal għan definit (1).



## Appendiċi 2

### **L-ASSAĠĠI *IN VITRO* TAL-IRBIT TAS-SATURAZZJONI U KOMPETITTIV TAR-RICETTUR TAL-ESTROĠENU ( $ER\alpha$ ) TA' FREYBERGER-WILSON BL-UŻU TAL- $ER\alpha$ RIKOMBINANTI B'TUL SHIH**

#### **KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET (ARA WKOLL INTRODUZZJONI ĠENERALI)**

1. Dan l-assaġġ *in vitro* tal-irbit tas-saturazzjoni u kompetittiv tar-Ricettur tal-Estroġenu ( $ER\alpha$ ) juża r-ricettur uman b'tul shih  $ER\alpha$ (hr $ER\alpha$ ) li hu prodott f'ċelloli ta' insetti infettati bil-bakulovajrus u iżolat minnhom. Il-protokoll, żviluppat minn Freyberger u Wilson, għadda minn studju ta' validazzjoni multilaboratorju internazzjonali (2) li wera r-rilevanza u l-affidabbiltà tiegħu għall-iskop maħsub tal-assaġġ.
2. Dan l-assaġġ hu proċedura ta' skrinjar għall-identifikazzjoni ta' sustanzi li jistgħu jorbtu mal-hr $ER\alpha$  b'tul shih. Jintuża biex jiddetermina l-ħila ta' sustanza kimika tat-test li tikkompeti ma' 17 $\beta$ -estradijoli għall-irbit mal-hr $ER\alpha$ . Ir-riżultati kwantitattivi tal-assaġġ jistgħu jinkludu l-IC<sub>50</sub> (kejl tal-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test meħtieġa biex jiġi spostat nofs l-[<sup>3</sup>H]-17 $\beta$ -estradijoli mill-hr $ER\alpha$ ) u l-affinitajiet għall-irbit relattiv tas-sustanzi kimiċi tat-test għall-hr $ER\alpha$  meta mqabbel ma' 17 $\beta$ -estradijoli. Għall-finijiet ta' skrinjar tas-sustanzi kimiċi, ir-riżultati kwalitattivi aċċettabbli tal-assaġġ jistgħu jinkludu klassifikazzjonijiet tas-sustanzi kimiċi tat-test bħala leganti tal-hr $ER\alpha$ , mhux leganti, jew ekwivoċi fuq il-bażi tal-kriterji deskritti għall-kurvi tal-irbit.
3. L-assaġġ juża ligand radjuattiv li jeħtieġ liċenzja tal-materjali radjuattivi għal-laboratorju. Il-proċeduri kollha b'radjoisotopi u b'sustanzi kimiċi perikolużi għandhom isegwu r-regolamenti u l-proċeduri deskritti mil-legiżlazzjoni nazzjonali.
4. Għandhom jinqraw “**INTRODUZZJONI ĠENERALI**” u “**KOMPONENTI TAL-ASSAĠĠ TAL-IRBIT TAL-hrER**” qabel ma dan l-assaġġ jintuża għal finijiet regolatorji. Id-definizzjonijiet u l-abbrevjazzjonijiet użati f'din it-TG huma deskritti fl-Appendiċi 1.

#### **PRINĊIPJI TAL-ASSAĠĠ (ARA WKOLL INTRODUZZJONI ĠENERALI)**

5. L-assaġġ tal-irbit tal-hr $ER\alpha$  jkejjel il-ħila ta' ligand radjotikkettat ([<sup>3</sup>H]17 $\beta$ -estradijoli) li jorbot mal-ER fil-preżenza ta' konċentrazzjonijiet dejjem akbar ta' sustanza kimika tat-test (jiġifieri kompetitur). Sustanzi kimiċi tat-test li fihom affinità għolja għall-ER jikkompetu mal-ligand radjotikkettat f'konċentrazzjoni inferjuri meta mqabbla ma' dawg is-sustanzi kimiċi b'affinità inferjuri għar-ricettur.

6. Dan l-assaġġ jikkonsisti f'żewġ komponenti ewlenin: esperiment ta' rbit tas-saturazzjoni biex jiġu karatterizzati l-parametri ta' interazzjoni riċettur-ligand, segwit minn esperiment tal-irbit kompetittiv li jikkaratterizza l-kompetizzjoni bejn sustanza kimika tat-test u ligand radjotikkettat għall-irbit mal-ER.
7. L-iskop tal-esperiment tal-irbit tas-saturazzjoni hu li jikkaratterizza lott partikolari ta' riċetturi għall-affinità u n-numru tal-irbit bi thejjija għall-esperiment tal-irbit kompetittiv. L-esperiment tal-irbit tas-saturazzjoni jkejjel, taht kundizzjonijiet ta' ekwilibriju, l-affinità ta' konċentrazzjoni fissa tar-riċettur tal-estrogen u għal-ligand naturali tiegħu (rappreżentat mill-kostanti ta' dissoċjazzjoni,  $K_d$ ), u l-konċentrazzjoni tas-siti attivi tar-riċettur ( $B_{max}$ ).
8. L-esperiment tal-irbit kompetittiv ikejjel l-affinità ta' sustanza biex tikkompeti ma'  $[3H]17\beta$ -estradijoli għall-irbit mal-ER. L-affinità hi kwantifikata mill-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li, f'ekwilibriju, tinibixxi 50 % tal-irbit speċifiku tal- $[3H]17\beta$ -estradijoli (imsejha l-“konċentrazzjoni inibitorja 50 %” jew  $IC_{50}$ ). Din tista' tiġi evalwata wkoll bl-użu tal-affinità relattiva għall-irbit (RBA, relattiva għall- $IC_{50}$  tal-estradijoli imkejla b'mod separat fl-istess sessjoni). L-esperiment tal-irbit kompetittiv ikejjel l-irbit ta'  $[3H]17\beta$ -estradijoli f'konċentrazzjoni fissa fil-preżenza ta' firxa wiesgħa (tmien ordnijiet ta' kobor) tal-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test. Imbagħad id-*data* tiddaħħal, fejn possibbli, biex tiffurma l-ekwazzjoni ta' Hill (Hill, 1910) li tiddekrivi l-ispostament tar-radjoligand minn legant kompetittiv ta' sit wieħed. Il-firxa tal-ispostament tal-estradijoli radjotikkettat fl-ekwilibriju tintuża biex is-sustanza kimika tat-test tiġi karatterizzata bħala legant, mhux legant, jew waħda li tiġġenera rispons ekwivoku.

## PROCEDURA

### Wiri ta' Prestazzjoni Aċċettabbli tal-Proteina tal-hrER $\alpha$

9. Qabel it-tweġġ ta' rutina tal-assaġġi tal-irbit tas-saturazzjoni u kompetittiv, għandu jintwera li kull lott għdid tal-hrER $\alpha$  jkollu prestazzjoni korretta fil-laboratorju fejn se jintuża. Għandu jintuża proċess imqassam fuq żewġ stadji biex tintwera l-prestazzjoni. Dawn l-istadji huma dawn li ġejjin:
  - Aghmel assaġġ tal-irbit ta'  $[^3H]$ - $17\beta$ -estradijoli tas-saturazzjoni biex turi l-ispeċifità u s-saturazzjoni tal-hrER $\alpha$ . Analizi ta' rigressjoni nonlineari ta' din id-*data* (eż. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) u l-plott Scatchard sussegwenti għandha tiddokumenta l-affinità għall-irbit tal-hrER $\alpha$  ta'  $[^3H]$ - $17\beta$ -estradijoli ( $K_d$ ) u n-numru ta' riċetturi ( $B_{max}$ ) għal kull lott tal-hrER $\alpha$ .
  - Aghmel assaġġ tal-irbit kompetittiv billi tuża s-sustanzi tal-kontroll (estrogeni ta' riferiment ( $17\beta$ -estradijoli), legant dgħajjef (eż. noretinodrel jew noretindron), u mhux legant (ottiltrietossilan, OTES). Kull laboratorju għandu jistabbilixxi bazi ta' *data* storika biex

jiddokumenta l-konsistenza tal- $IC_{50}$  u ta' valuri rilevanti ohra għall-estrogenu ta' riferiment u għal-legant dghajjef fost l-esperimenti u l-lottijiet differenti tal-hrER $\alpha$ . Il-parametri tal-kurvi tal-irbit kompetittiv għas-sustanzi tal-kontroll għandhom ikunu fi hdan il-limiti tal-intervall ta' kunfidenza ta' 95 % (ara t-Tabella 1) li ġew żviluppati bl-użu tad-*data* mil-laboratorji li hadu sehem fl-istudju ta' validazzjoni għal dan l-assaġġ (2).

**Tabella 1:** Kriterji tal-prestazzjoni żviluppati għall-estrogenu ta' riferiment u għal-legant dgħajjef, Assaġġ FW tal-Irbit tal-hrER.

| Sustanza                       | Parametru                | Medja <sup>a</sup> | Devjazzjoni Standard X (n) | Intervall ta' Kunfidenza ta' 95 % <sup>b</sup> |                  |
|--------------------------------|--------------------------|--------------------|----------------------------|------------------------------------------------|------------------|
|                                |                          |                    |                            | Limitu Inferjuri                               | Limitu Superjuri |
| <b>17β-estradiol</b>           | Quċcata ( %)             | 100,44             | 10,84 (67)                 | 97,8                                           | 103,1            |
|                                | Qiegh ( %)               | 0,29               | 1,25 (67)                  | -0,01                                          | 0,60             |
|                                | Pendil ta' Hill          | -1,06              | 0,20 (67)                  | -1,11                                          | -1,02            |
|                                | LogIC <sub>50</sub> (M)  | -8,92 <sup>c</sup> | 0,18 (67)                  | -8,97                                          | -8,88            |
| <b>Noretinodrel</b>            | Quċcata ( %)             | 99,42              | 8,90 (68)                  | 97,27                                          | 101,60           |
|                                | Qiegh ( %)               | 2,02               | 3,42 (68)                  | 1,19                                           | 2,84             |
|                                | Pendil ta' Hill          | -1,01              | 0,38 (68)                  | -1,10                                          | -0,92            |
|                                | Log IC <sub>50</sub> (M) | -6,39              | 0,27 (68)                  | -6,46                                          | -6,33            |
| <b>Noretindron<sup>c</sup></b> | Quċcata ( %)             | 96,14              | 8,44 (27)                  | 92,80                                          | 99,48            |
|                                | Qiegh ( %)               | 2,38               | 5,02 (27)                  | 0,40                                           | 4,37             |
|                                | Pendil ta' Hill          | -1,41              | 0,32 (27)                  | -1,53                                          | -1,28            |
|                                | LogIC <sub>50</sub> (M)  | -5,73              | 0,27 (27)                  | -5,84                                          | -5,62            |

<sup>a</sup>Medja (n) ± Devjazzjoni Standard (SD) ġew ikkalkolati bl-użu tal-istimi tal-parametri ta' dhul ta' kurva (Ekwazzjoni ta' Hill b'erba' parametri) għas-sessjonijiet ta' kontroll imwettqa f'erba' laboratorji matul l-istudju ta' validazzjoni (ara l-Anness N tar-Referenza 2).

<sup>b</sup>L-intervalli ta' kunfidenza ta' 95 % huma pprovduti bhala gwida għall-kriterji ta' aċċettabbiltà.

<sup>c</sup>L-ittestjar tan-noretindron kien fakultattiv għas-Subkompitu matul l-istudju ta' validazzjoni (ara r-Referenza 2, ara s-Subkompitu 4). B'hekk, ± SD (n) medji ġew ikkalkolati bl-użu tal-istimi ta' dhul ta' kurva (ekwazzjoni ta' Hill b'4 parametri) għas-sessjonijiet ta' kontroll imwettqa f'żewġ laboratorji.

Il-medda għall-IC<sub>50</sub> se tkun dipendenti fuq il-Kd tal-preparazzjoni tar-riċettur u l-konċentrazzjoni tal-ligand radjotikkettat użati fi hdan kull laboratorju. Ikun aċċettabbli aġġustament xieraq għall-medda tal-IC<sub>50</sub> fuq il-bażi tal-kundizzjonijiet użati għat-twettiq tal-assaġġ.

## Wiri tal-profiċjenza tal-laboratorju

10. Ara l-paragrafi 17 u 18 u t-Tabella 2 f'“**KOMPONENTI TAL-ASSAĠĠ TAL-IRBIT TAL-hrER**” ta' dan il-metodu ta' ttestjar. Kull assaġġ (irbit tas-saturazzjoni u kompetittiv) għandu jikkonsisti fi tliet sessjonijiet indipendenti (jiġifieri b'dilwizzjonijiet friski ta' riċettur, ta' sustanzi kimiċi, u ta' reagenti) f'jiem differenti, u kull sessjoni għandu jkun fiha tliet repliki.

## Determinazzjoni tal-Konċentrazzjoni tar-Riċettur (hrERα)

11. Il-konċentrazzjoni tar-riċettur attiv tvarja ftit skont il-lott u l-kundizzjonijiet tal-hżin. Għalhekk, għandha tiġi determinata l-konċentrazzjoni tar-riċettur attiv kif riċevuta

minghand il-fornitur. Din trendi l-konċentrazzjoni xierqa tar-riċettur attiv fil-hin tas-sessjoni.

12. Skont il-kundizzjonijiet li jikkorrispondu għall-irbit kompetittiv (jiġifieri 1 nM [<sup>3</sup>H]-estradijoli), konċentrazzjonijiet nominali ta' riċettur ta' 0,25, ta' 0,5, ta' 0,75, u ta' 1 nM għandhom jiġu inkubati fl-assenza (irbit totali) u fil-preżenza (irbit mhux speċifiku ta' 1 μM estradijoli mhux tikkettat. L-irbit speċifiku, ikkalkolat bħala d-differenza tal-irbit totali u mhux speċifiku, jiġi plottjat kontra l-konċentrazzjoni nominali tar-riċettur. Il-konċentrazzjoni tar-riċettur li tagħti valuri tal-irbit speċifiċi li jikkorrispondu għal 20 % tar-radjuattivita' miżjuda hi relatata mal-konċentrazzjoni nominali korrispondenti tar-riċettur, u din il-konċentrazzjoni tar-riċettur għandha tintuża għall-esperimenti tal-irbit tas-saturazzjoni u kompetittiv. Spiss, konċentrazzjoni finali tal-hrER ta' 0,5 nM se tkun konformi ma' din il-kundizzjoni.
13. Jekk il-kriterju ta' 20 % ma jkunx jista' jiġi ssodisfat ripetutament, il-kompożizzjoni tal-esperiment għandha tiġi verifikata għal żbalji potenzjali. Nuqqas ta' l-huq tal-kriterju ta' 20 % jista' jindika li f'tit li xejn ikun hemm riċettur attiv fil-lott rikombinanti, u mbagħad ikollu jiġi kkunsidrat l-użu ta' lott ieħor tar-riċettur.

#### **Assaġġ tas-saturazzjoni**

14. Tmien konċentrazzjonijiet li jiżdiedu dejjem aktar ta' [<sup>3</sup>H]17β-estradijoli għandhom jiġu evalwati f' tripplikati, skont it-tliet kundizzjonijiet li ġejjin (ara t-Tabella 2):
  - Fin-nuqqas ta' 17β-estradijoli mhux tikkettat u l-preżenza ta' ER. Din hi d-determinazzjoni tal-irbit totali skont il-kejl tar-radjuattività fil-bwejriet li jkollhom [<sup>3</sup>H]17β-estradijoli biss.
  - Fil-preżenza ta' konċentrazzjoni eċċessiva għal 1000 darba ta' 17β-estradijoli mhux tikkettat fuq 17β-estradijoli tikkettat u fil-preżenza tal-ER. L-intenzjoni ta' din il-kundizzjoni hi li tissatura s-siti attivi tal-irbit b'17β-estradijoli mhux tikkettat, u bil-kejl tar-radjuattività fil-bwejriet, tiddetermina l-irbit mhux speċifiku. Kwalunkwe estradijoli jahraq li jifdal li jista' jorbot mar-riċettur jitqies li jkun jorbot ma' sit mhux speċifiku peress li l-estradijoli kiesah għandu jkun f'konċentrazzjoni għolja tant li jintrabat mas-siti speċifiċi disponibbli kollha fuq ir-riċettur.
  - Fin-nuqqas ta' 17β-estradijoli mhux tikkettat u l-assenza tal-ER (determinazzjoni tar-radjuattività totali)

#### *Preparazzjoni ta' [<sup>3</sup>H]-17β-estradijoli u ta' soluzzjonijiet ta' 17β-estradijoli mhux tikkettati*

15. Id-dilwizzjonijiet ta' [<sup>3</sup>H]-17β-estradijoli għandhom jithejjew billi jiżdied bafer tal-assaġġ sa soluzzjoni ewlenija ta' 12-il nM ta' [<sup>3</sup>H]-17β-estradijoli biex jinkisbu konċentrazzjonijiet li inizjalment ivarjaw minn 0,12nM sa 12 nM. Billi jiżdiedu 40 μl ta' dawn is-soluzzjonijiet

għall-bwejrjet tal-assaġġ rispettivi ta' pjastra għall-mikrotitraġġ b'96 bwejra (f'volum finali ta' 160 µl), jinkisbu l-konċentrazzjonijiet tal-assaġġ finali, li jvarjaw bejn 0,03 u 3,0 nM. Preparazzjoni tal-bafer tal-assaġġ, tas-soluzzjoni ewlenija ta' [<sup>3</sup>H]-17β-estradijoli u tad-dilwizzjonijiet u d-determinazzjoni tal-konċentrazzjonijiet huma deskritti fid-dettall fil-protokoll FW (2).

16. Id-dilwizzjonijiet ta' soluzzjonijiet etanoloġiċi ta' 17β-estradijoli għandhom jithejjew billi jiżdied bafer tal-assaġġ biex jinkisbu tmien konċentrazzjonijiet waħda akbar mill-oħra li inizjalment iwarjaw bejn 0,06 µM u 6 µM. Billi jiżdiedu 80 µl ta' dawn is-soluzzjonijiet fil-bwejrjet tal-assaġġ rispettivi ta' pjastra għall-mikrotitraġġ b'96 bwejra (f'volum finali ta' 160 µl), jinkisbu l-konċentrazzjonijiet tal-assaġġ finali, li jvarjaw bejn 0,03µM u 3µM. Il-konċentrazzjoni finali ta' 17β-estradijoli mhux tikkettat fil-bwejrjet individwali tal-assaġġ tal-irbit mhux speċifiku għandha tkun 1000 darba l-konċentrazzjoni ta' [<sup>3</sup>H]-17β- estradijoli tikkettat. Il-preparazzjoni tad-dilwizzjonijiet ta' 17β-estradijoli mhux tikkettat hi deskritta fid-dettall fil-protokoll FW (2).
17. Għandha tintuża l-konċentrazzjoni nominali tar-riċettur li tagħti l-irbit speċifiku ta' 20±5 % (ara l-paragrafi 12-13). Is-soluzzjoni tal-hrERα għandha tithejja eżatt qabel l-użu.
18. Il-pjastri għall-mikrotitraġġ b'96 bwejra jithejjew kif muri fit-Tabella 2, bi tliet repliki għal kull konċentrazzjoni. Eżempju ta' konċentrazzjoni tal-pjastri u ta' assenjament tal-volum ta' [<sup>3</sup>H]-17β-estradijoli, ta' 17β-estradijoli mhux tikkettat, tal-bafer u tar-riċettur hu pprovdut fl-Appendiċi 2.2.

**Tabella 2:** Tifsila tal-Pjastra għall-Mikrotitraġġ tal-Assaġġ tal-Irbit tas-Saturazzjoni

|   | 1                                                                         | 2 | 3 | 4                                                                         | 5 | 6 | 7                                                                         | 8 | 9 | 10                                                                        | 11 | 12 |                            |
|---|---------------------------------------------------------------------------|---|---|---------------------------------------------------------------------------|---|---|---------------------------------------------------------------------------|---|---|---------------------------------------------------------------------------|----|----|----------------------------|
| A | 0,03 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER                             |   |   | 0,06 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER                             |   |   | 0,08 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER                             |   |   | 0,10 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER                             |    |    | Irbit Totali<br>(Solvent)  |
| B | 0,30 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER                             |   |   | 0,60 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER                             |   |   | 1,0 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER                              |   |   | 3,0 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER                              |    |    |                            |
| C |                                                                           |   |   |                                                                           |   |   |                                                                           |   |   |                                                                           |    |    |                            |
| D | 0,03 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER +<br>0,03 μM E <sub>2</sub> |   |   | 0,06 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER +<br>0,06 μM E <sub>2</sub> |   |   | 0,08 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER +<br>0,08 μM E <sub>2</sub> |   |   | 0,10 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER<br>+ 0,10 μM E <sub>2</sub> |    |    | Irbit<br>Mhux<br>Specifiku |
| E | 0,30 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER<br>+ 0,30 μM E <sub>2</sub> |   |   | 0,60 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER<br>+ 0,60 μM E <sub>2</sub> |   |   | 1,0 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER<br>+ 1,0 μM E <sub>2</sub>   |   |   | 3,0 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER +<br>3,0 μM E <sub>2</sub>   |    |    |                            |
| F |                                                                           |   |   |                                                                           |   |   |                                                                           |   |   |                                                                           |    |    |                            |
| G |                                                                           |   |   |                                                                           |   |   |                                                                           |   |   |                                                                           |    |    |                            |
| H |                                                                           |   |   |                                                                           |   |   |                                                                           |   |   |                                                                           |    |    |                            |

[<sup>3</sup>H] E<sub>2</sub>: [<sup>3</sup>H]-17β-estradijoli

ER: riċettur tal-estrogenu

E<sub>2</sub>: 17β-estradijoli mhux tikkettat

19. Il-pjastri għall-mikrotitraġġ tal-assaġġ għandhom jiġu inkubati f'2° sa 8°C għal 16 sa 20 siegħa u jitqiegħdu fuq rotatur matul il-perjodu ta' inkubazzjoni.

*Kejl ta' [3H]-17β-Estradjol marbut mal-hrERα*

20. [3H]-17β-Estradjol marbut mal-hrERα għandu jiġi separat minn [3H]-17β-Estradjol hieles billi tizdied sospensjoni ta' 80 μl DCC kiesah f'kull pjastra, filwaqt li l-pjastri għall-mikrotitraġġ jithawdu għal 10 minuti u jiġu ċentrifugati għal 10 minuti f'madwar 2500 RPM. Biex tiġi minimizzata d-dissoċjazzjoni tal-[3H]-17β-estradjol marbut mill-hrERα matul dan il-proċess, hu estremament importanti li l-bafers u l-bwejriet tal-assaġġ jinżammu f'bejn 2 u 8°C u li kull stadju jitwettaq malajr. Xejker għall-pjastri għall-mikrotitraġġ hu neċessarju biex il-pjastri jiġu proċessati b'mod effiċjenti u veloċi.

21. Imbagħad 50 μl supernatant li fih [3H]-17β-estradjol marbut mal-hrERα għandu jittiehed b'attenzjoni estrema, biex tiġi evitata kwalunkwe kontaminazzjoni tal-bwejriet bil-mess tad-DCC, u għandu jitqiegħed fuq it-tieni pjastra għall-mikrotitraġġ.

22. Imbagħad 200 μl fluwidu ta' xintillazzjoni, li kapaċi jikkonverti l-enerġija kinetika tal-emissjonijiet nukleari f'enerġija tad-dawl, għandu jiżdied f'kull bwejra (A1-B12 u D1 sa E12). Il-bwejriet G1-H12 (identifikati bħala dpms totali) jirrappreżentaw dilwizzjonijiet serjali ta' [3H]-17β-estradjol (40 μl) li għandhom jitwasslu direttament fil-fluwidu ta' xintillazzjoni fil-bwejriet tal-pjastra tal-kejl kif indikat fit-Tabella 3, jiġifieri dawn il-bwejriet fihom biss 200 μl fluwidu ta' xintillazzjoni u d-dilwizzjoni xierqa ta' [3H]-17β-estradjol. Dawn il-miżuri juru kemm [3H]-17β-estradjol f'dpms ždied ma' kull sett ta' bwejriet għall-irbit totali u għall-irbit mhux speċifiku.

**Tabella 3:** Tifsila tal-Pjastra għall-Mikrotitraġġ tal-Assaġġ tal-Irbit tas-Saturazzjoni, Kejl tar-Radjuattività

|          | 1                                                                         | 2 | 3 | 4                                                                         | 5 | 6 | 7                                                                         | 8 | 9 | 10                                                                        | 11 | 12 |                              |
|----------|---------------------------------------------------------------------------|---|---|---------------------------------------------------------------------------|---|---|---------------------------------------------------------------------------|---|---|---------------------------------------------------------------------------|----|----|------------------------------|
| <b>A</b> | 0,03 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER                             |   |   | 0,06 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER                             |   |   | 0,08 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER                             |   |   | 0,10 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER                             |    |    | Irbit<br>Totali<br>(Solvent) |
| <b>B</b> | 0,30 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER                             |   |   | 0,60 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER                             |   |   | 1,0 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER                              |   |   | 3,0 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER                              |    |    |                              |
| <b>C</b> |                                                                           |   |   |                                                                           |   |   |                                                                           |   |   |                                                                           |    |    |                              |
| <b>D</b> | 0,03 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER +<br>0,03 μM E <sub>2</sub> |   |   | 0,06 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER +<br>0,06 μM E <sub>2</sub> |   |   | 0,08 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER +<br>0,08 μM E <sub>2</sub> |   |   | 0,10 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER<br>+ 0,10 μM E <sub>2</sub> |    |    | Irbit<br>Mhux<br>Speċifiku   |
| <b>E</b> | 0,30 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER<br>+ 0,30 μM E <sub>2</sub> |   |   | 0,60 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER<br>+ 0,60 μM E <sub>2</sub> |   |   | 1,0 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER<br>+ 1,0 μM E <sub>2</sub>   |   |   | 3,0 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER +<br>3,0 μM E <sub>2</sub>   |    |    |                              |
| <b>F</b> |                                                                           |   |   |                                                                           |   |   |                                                                           |   |   |                                                                           |    |    |                              |
| <b>G</b> | 0,03 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub><br>(dpms totali)                 |   |   | 0,06 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub>                                  |   |   | 0,08 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub>                                  |   |   | 0,10 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub>                                  |    |    | Dpms<br>totali*              |

|          |                                          |                                          |                                         |                                         |  |
|----------|------------------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|--|
| <b>H</b> | 0,30 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> | 0,60 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> | 1,0 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> | 3,0 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> |  |
|----------|------------------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|--|

[<sup>3</sup>H] E<sub>2</sub>: [<sup>3</sup>H]-17β-estradiol

ER: ricettur tal-estrogenu

E<sub>2</sub>: 17β-estradiol mhux tikkettat

dpms: diintegrazzjonijiet fil-minuta

\*Hawnhekk, id-dilwizzjonijiet serjali jaharqu ta' estradiol tikkettat [<sup>3</sup>H] ghandhom jizdiedu direttament f'200 μl fluwidu ta' xintillazzjoni fil-bwejrjet G1 – H12.

23. Il-kejl għandu jibda wara tal-anqas sagħtejn u l-hin tal-għadd għandu jkun ta' 40 minuta għal kull bwejra. L-apparat li jkejjel ix-xintillazzjoni tal-pjastri għall-mikrotitraġġ għandu jintuża għad-determinazzjoni tad-dpm/bwejra b'korrezzjoni għall-estinzjoni. Inkella, jekk ma jkunx hemm apparat disponibbli għall-kejl tax-xintillazzjoni għal pjastra għall-mikrotitraġġ, il-kampjuni jistgħu jitkejlu f'apparat konvenzjonali għall-kejl. F'dawn il-kundizzjonijiet, jista' jiġi kkunsidrat tnaqqis fil-hin tal-għadd.

### Assaġġ tal-irbit kompetittiv

24. L-assaġġ tal-irbit kompetittiv ikejjel l-irbit ta' konċentrazzjoni waħda ta' [<sup>3</sup>H]-17β-estradiol fil-preżenza ta' konċentrazzjonijiet dejjem akbar ta' sustanza kimika tat-test. Għandhom jintużaw tliet repliki konkorrenti f'kull konċentrazzjoni fi hdan sessjoni waħda. Barra minn hekk, għandhom isiru tliet sessjonijiet mhux konkorrenti għal kull sustanza kimika ttestjata. L-assaġġ għandu jsir fi pjastra waħda jew aktar għall-mikrotitraġġ b'96 bwejra

### Kontrolli

25. Meta jsir l-assaġġ, is-solvent u l-kontrolli konkorrenti (jiġifieri l-estrogenu referenzjarju, il-legant dghajjef, u dak mhux legant) għandhom ikunu inklużi f'kull esperiment. Kurvi shaħ ta' konċentrazzjoni għall-estrogenu u għall-kontrolli ta' riferiment (jiġifieri legant dghajjef u mhux legant) għandhom jintużaw fi pjastra waħda matul kull sessjoni. Il-pjastri l-oħra kollha għandu jkun fihom (i) konċentrazzjoni għolja (spostament massimu) u medja (bejn wiehed u ieħor l-IC<sub>50</sub>) kull waħda ta' E<sub>2</sub> u ta' legant dghajjef fi triplikati; (ii) kontroll b'solvent u irbit mhux speċifiku, tal-anqas kull wiehed fi triplikati. Il-proċeduri għat-thejjija tal-bafer tal-assaġġ, tal-kontrolli, ta' [<sup>3</sup>H]-17β-estradiol, ta' hrERα u tas-soluzzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test huma deskritti fir-Referenza 2 (Anness K, ara l-Protokoll tal-Assaġġ FW).

### Kontroll b'solvent:

26. Il-kontroll b'solvent jindika li s-solvent ma jinteraġixx mas-sistema tat-test u jkejjel ukoll l-irbit totali (TB). L-etanol hu s-solvent preferut. Inkella, jekk l-oġġla konċentrazzjoni tas-



sustanza kimika tat-test ma tkunx solubbli fl-etanol, jista' jintuza DMSO. Il-konċentrazzjoni ta' etanol jew ta' DMSO, jekk użat, fil-bwejrjet finali hi ta' 1,5 % u ma tistax taqbez it-2 %.

#### *Kontroll bil-bafer:*

27. Il-kontroll bil-bafer (BC) la għandu jkun fih solvent u lanqas is-sustanza kimika tat-test, iżda għandu jkun fih il-komponenti l-oħra kollha tal-assaġġ. Ir-rizultati tal-kontroll bil-bafer jitqabblu mal-kontroll b'solvent biex jiġi verifikat li s-solvent użat ma jaffettwax is-sistema tal-assaġġ.

#### *Legant b'saħħtu (estrogenu ta' riferiment)*

28. 17 $\beta$ -estradijoli (CAS 50-28-2) hu l-ligand endoġenu u jorbot b'affinità għolja mal-ER, subtip tal-alfa. Kurva standard li tuża 17 $\beta$ -estradijoli mhux tikkettat għandha tithejja għal kull assaġġ tal-irbit kompetittiv tal-hrER $\alpha$ , biex tkun tista' ssir valutazzjoni tal-varjabbiltà meta jsir l-assaġġ maż-żmien fi hdan l-istess laboratorju. Tmien soluzzjonijiet ta' 17 $\beta$ -estradijoli mhux tikkettat għandhom jithejjew fl-etanol, bil-konċentrazzjonijiet fil-bwejrjet tal-assaġġ li jvarjaw minn 100 nM – 10 pM (-7[logM] sa -11[logM]), imqassma kif ġej: (-7[logM], -8[logM], -8,5[logM], -9[logM], -9,5[logM], -10[logM], -11[logM]). L-ogħla konċentrazzjoni ta' 17 $\beta$ -estradijoli mhux tikkettat (1  $\mu$ M) isservi wkoll bħala l-indikatur tal-irbit mhux speċifiku. Din il-konċentrazzjoni hi distinta bit-tikketta "NSB" fit-Tabella 4 għalkemm hi wkoll parti mill-kurva standard.

#### *Legant dgħajjef*

29. Legant dgħajjef (noretinodrel (CAS68-23-5) jew noretindron (CAS 68-22-4)) għandu jkun inkluż biex tintwera s-sensittività ta' kull esperiment u tkun tista' ssir valutazzjoni tal-varjabbiltà meta jsir l-assaġġ maż-żmien. Tmien soluzzjonijiet tal-legant dgħajjef għandhom jithejjew fl-etanol, bil-konċentrazzjonijiet fil-bwejrjet tal-assaġġ li jvarjaw minn 3 nM sa 30  $\mu$ M (-8,5[logM] sa -4,5[logM]), imqassma kif ġej: -4,5[logM], -5[logM], -5,5[logM], -6[logM], -6,5[logM], -7[logM], -7,5[logM], -8,5[logM].

#### *Mhux legant*

30. Ottiltrietossisilan (OTES, CAS 2943-75-1) għandu jintuza bħala l-kontroll negattiv (mhux legant). Dan jipprovdi garanzija li l-assaġġ kif imwettaq isib meta s-sustanzi kimiċi tat-test ma jorbtux mal-hrER $\alpha$ . Tmien soluzzjonijiet ta' mhux legant għandhom jithejjew fl-etanol, bil-konċentrazzjonijiet fil-bwejrjet tal-assaġġ li jvarjaw minn 0,1nM sa 1000  $\mu$ M (-10[logM] sa -3[logM]), f'inkrementi tal-log. Il-ftalat tad-di-n-butyl (DBP) jista' jintuza bħala mhux legant tal-kontroll alternattiv. Is-solubbiltà massima tiegħu ntweriet li hi -4[logM].

### *Konċentrazzjoni tal-hrERα*

31. Għandu jintuża l-ammont tar-riċettur li jagħti l-irbit speċifiku ta'  $20 \pm 5$  % ta' 1 nM radjoligand (ara l-paragrafi 12-13 tal-Appendiċi 2). Is-soluzzjoni tal-hrERα għandha tithejja eżatt qabel l-użu.

### *[3H]-17β-estradijoli*

32. Il-konċentrazzjoni ta' [3H]-17β-estradijoli fil-bwejriet tal-assaġġ għandha tkun ta' 1,0 nM.

### *Sustanzi Kimiċi tat-Test*

33. L-ewwel nett, hemm bżonn li jsir test tas-solubbiltà biex jiġi determinat il-limitu tas-solubbiltà għal kull sustanza kimika tat-test u biex tiġi identifikata l-medda ta' konċentrazzjoni xierqa li għandha tintuża meta jsir il-protokoll tat-test. Il-limitu tas-solubbiltà ta' kull sustanza kimika tat-test għandu jiġi determinat inizjalment fis-solvent u jiġi kkonfermat b'mod ulterjuri fil-kundizzjonijiet tal-assaġġ. Il-konċentrazzjoni finali ttestjata fl-assaġġ ma għandhiex taqbeż il-1 mM. L-ittestjar għas-sejbien tal-medda jikkonsisti f'kontroll b'solvent flimkien ma' tmien dilwizzjonijiet serjali tal-log, li jibdw bil-konċentrazzjoni massima aċċettabbli (eż. 1 mM jew anqas, fuq il-bażi tal-limitu tas-solubbiltà), u l-preżenza ta' dardir jew ta' preċipitat innotat (ara wkoll il-paragrafu 35). Is-sustanza kimika tat-test għandha tiġi ttestjata bl-użu tal-kurvi spazjati tal-konċentrazzjoni bi tmien logs kif definiti mit-test preċedenti ta' sejbien tal-medda. Il-konċentrazzjonijiet fit-tieni u fit-tielet esperimenti għandhom jiġu aġġustati kif xieraq biex tiġi karatterizzata aħjar il-kurva konċentrazzjoni rispons.
34. Id-dilwizzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test għandhom jithejjew fis-solvent xieraq (ara l-paragrafu 26 tal-Appendiċi 2). Jekk l-ogħla konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test ma tkunx solubbli fl-etanol jew fid-DMSO, u ż-żieda ta' aktar solvent tkun tirriżulta f'konċentrazzjoni tas-solvent oġġla mil-limitu aċċettabbli fit-tubu finali, l-ogħla konċentrazzjoni tista' titnaqqas għall-anqas konċentrazzjoni li jmiss. F'dan il-każ, konċentrazzjoni addizzjonali tista' tiżdied fil-limitu inferjuri tas-serje ta' konċentrazzjonijiet. Konċentrazzjonijiet oħra fis-serje għandhom jibqgħu l-istess.
35. Is-soluzzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test għandhom jiġu ssorveljati bir-reqqa meta jiżdiedu mal-bwejra tal-assaġġ, peress li s-sustanza kimika tat-test tista' tfur barra maż-żieda fil-bwejra tal-assaġġ. Id-*data* għall-bwejriet kollha li fihom il-preċipitat għandha tkun eskluża mid-dhul ta' kurva, u r-raġuni għall-eskluzjoni tad-*data* għandha tiġi nnotata.
36. Jekk hemm informazzjoni eżistenti preċedenti minn sorsi oħra li jipprovdu  $\log(\text{IC}_{50})$  ta' sustanza kimika tat-test, jista' jkun xieraq li d-dilwizzjonijiet jitqassmu ġeometrikament (jiġifieri 0,5 unitajiet ta' log madwar il-log mistenni  $\log(\text{IC}_{50})$ ). Ir-riżultat finali għandu jirrifletti tifrix suffiċjenti tal-konċentrazzjonijiet fuq iż-żewġ naħat tal- $\log(\text{IC}_{50})$ , inklużi l-

“quċċata” u l-“qiegħ”, b’tali mod li l-kurva tal-irbit tkun tista’ tigi karatterizzata b’mod adegwat.

#### Organizzazzjoni tal-pjastra tal-assaġġ

37. Il-pjastri għall-mikrotitraġġ tikkettatti għandhom jithejjew b’kunsiderazzjoni ta’ inkubazzjonijiet sestupli b’kodiċijiet għall-kontroll b’solvent, bl-ogħla konċentrazzjoni tal-estrogenu referenzjarju li sservi wkoll bħala l-indikatur tal-irbit mhux speċifiku (NSB), u bil-kontroll b’bafer u b’kunsiderazzjoni tal-inkubazzjonijiet triplikati bil-kodiċijiet għal kull waħda mit-tmien konċentrazzjonijiet tal-kontroll li ma jorbotx (ottiltrietossisilan), bis-seba’ konċentrazzjonijiet inferjuri għall-estrogenu referenzjarju, bit-tmien livelli tad-doża tal-konċentrazzjonijiet tal-legant dghajjef, u bit-tmien konċentrazzjonijiet ta’ kull sustanza kimika tat-test (TC). Tifsila indikattiva tad-dijagramma tal-pjastra għall-kurvi shah tal-konċentrazzjoni għall-estrogenu u għall-kontroll referenzjarji hi mogħtija hawn taħt fit-Tabella 4. Jintużaw pjastri addizzjonali għall-mikrotitraġġ għas-sustanzi kimiċi tat-test u dawn għandhom jinkludu kontrolli tal-pjastra (jiġifieri 1) u konċentrazzjoni għolja (spostament massimu) u medja (madwar  $1\text{-IC}_{50}$ ) kull waħda ta’ E2 u legant dghajjef fi triplikati; 2) kontroll b’solvent u irbit mhux speċifiku, kull wiehied f’sestuplu (Tabella 5). Eżempju ta’ worksheet tat-tifsila tal-pjastra għall-mikrotitraġġ tal-assaġġ kompetittiv bl-użu ta’ tliet sustanzi kimiċi tat-test mhux magħrufa hu pprovdut fl-Appendiċi 2.3. Il-konċentrazzjonijiet indikati fit-Tabelli 4 u 5 huma l-konċentrazzjonijiet finali tal-assaġġ. Il-konċentrazzjoni masisma għall-E2 għandha tkun ta’  $1 \times 10^{-7}$  M u għal-legant dghajjef għandha tintuża l-ogħla konċentrazzjoni użata għal-legant dghajjef fil-pjastra 1. Il-konċentrazzjoni tal- $\text{IC}_{50}$  trid tigi determinata mil-laboratorju fuq il-baži tal-baži ta’ *data* tal-kontroll storiku tiegħu. Hu mistenni li dan il-valur ikun simili għal dak osservat fl-istudji ta’ validazzjoni (ara t-Tabella 1).

**Tabella 4:** Tifsila tal-Pjastra għall-Mikrotitraġġ tal-Assaġġ tal-Irbit Kompetittiv, Kurvi Shah ta’ Konċentrazzjoni għal Estrogenu u għal Kontrolli Referenzjarji (Pjastra 1).

|          | 1                           | 2 | 3 | 4                           | 5 | 6 | 7                           | 8 | 9 | 10                           | 11 | 12 |
|----------|-----------------------------|---|---|-----------------------------|---|---|-----------------------------|---|---|------------------------------|----|----|
| <b>A</b> | TB (Solvent biss)           |   |   | TB (Solvent biss)           |   |   | NSB                         |   |   | NSB                          |    |    |
| <b>B</b> | E2 ( $1 \times 10^{-7}$ )   |   |   | E2 ( $1 \times 10^{-8}$ )   |   |   | E2 ( $1 \times 10^{-8,5}$ ) |   |   | E2 ( $1 \times 10^{-9}$ )    |    |    |
| <b>C</b> | E2 ( $1 \times 10^{-9,5}$ ) |   |   | E2 ( $1 \times 10^{-10}$ )  |   |   | E2 ( $1 \times 10^{-11}$ )  |   |   | Inbjanċ*                     |    |    |
| <b>D</b> | NE ( $1 \times 10^{-4,5}$ ) |   |   | NE ( $1 \times 10^{-5}$ )   |   |   | NE ( $1 \times 10^{-5,5}$ ) |   |   | NE ( $1 \times 10^{-6}$ )    |    |    |
| <b>E</b> | NE ( $1 \times 10^{-6,5}$ ) |   |   | NE ( $1 \times 10^{-7}$ )   |   |   | NE ( $1 \times 10^{-7,5}$ ) |   |   | NE ( $1 \times 10^{-8,5}$ )  |    |    |
| <b>F</b> | OTES ( $1 \times 10^{-3}$ ) |   |   | OTES ( $1 \times 10^{-4}$ ) |   |   | OTES ( $1 \times 10^{-5}$ ) |   |   | OTES ( $1 \times 10^{-6}$ )  |    |    |
| <b>G</b> | OTES ( $1 \times 10^{-7}$ ) |   |   | OTES ( $1 \times 10^{-8}$ ) |   |   | OTES ( $1 \times 10^{-9}$ ) |   |   | OTES ( $1 \times 10^{-10}$ ) |    |    |
| <b>H</b> | Inbjanċ (għal dak jahraq)** |   |   | Inbjanċ (għal dak jahraq)** |   |   | Kontroll bil-bafer          |   |   | Kontroll bil-bafer           |    |    |

F’dan l-eżempju, il-legant dghajjef hu noretinodrel (NE)

\* inbjank veru, bwejra mhux użata

\*\* inbjank mhux użat matul l-inkubazzjoni, iżda użat biex tiġi kkonfermata r-radjuattività totali miżjuda.

**Tabella 5:** Tifsila tal-Pjastra għall-Mikrotitraġġ tal-Assaġġ tal-Irbit Kompetittiv, Kurvi Shah ta' Koncentrazzjoni għas-Sustanzi Kimiċi tat-Test u għall-Kontrolli tal-Pjastri.

|          | 1                         | 2 | 3 | 4                          | 5 | 6 | 7                         | 8 | 9 | 10                         | 11 | 12 |
|----------|---------------------------|---|---|----------------------------|---|---|---------------------------|---|---|----------------------------|----|----|
| <b>A</b> | TB (Solvent biss)         |   |   | TB (Solvent biss)          |   |   | NSB                       |   |   | NSB                        |    |    |
| <b>B</b> | TC1 (1×10 <sup>-3</sup> ) |   |   | TC1 (1×10 <sup>-4</sup> )  |   |   | TC1 (1×10 <sup>-5</sup> ) |   |   | TC1 (1×10 <sup>-6</sup> )  |    |    |
| <b>C</b> | TC1 (1×10 <sup>-7</sup> ) |   |   | TC1 (1×10 <sup>-8</sup> )  |   |   | TC1 (1×10 <sup>-9</sup> ) |   |   | TC1 (1×10 <sup>-10</sup> ) |    |    |
| <b>D</b> | TC2 (1×10 <sup>-3</sup> ) |   |   | TC2 (1×10 <sup>-4</sup> )  |   |   | TC2 (1×10 <sup>-5</sup> ) |   |   | TC2 (1×10 <sup>-6</sup> )  |    |    |
| <b>E</b> | TC2 (1×10 <sup>-7</sup> ) |   |   | TC2 (1×10 <sup>-8</sup> )  |   |   | TC2 (1×10 <sup>-9</sup> ) |   |   | TC2 (1×10 <sup>-10</sup> ) |    |    |
| <b>F</b> | TC3 (1×10 <sup>-3</sup> ) |   |   | TC3 (1×10 <sup>-4</sup> )  |   |   | TC3 (1×10 <sup>-5</sup> ) |   |   | TC3 (1×10 <sup>-6</sup> )  |    |    |
| <b>G</b> | TC3 (1×10 <sup>-7</sup> ) |   |   | TC3 (1×10 <sup>-8</sup> )  |   |   | TC3 (1×10 <sup>-9</sup> ) |   |   | TC3 (1×10 <sup>-10</sup> ) |    |    |
| <b>H</b> | NE (IC <sub>50</sub> )    |   |   | NE (1×10 <sup>-4,5</sup> ) |   |   | E2 (IC <sub>50</sub> )    |   |   | E2 (1×10 <sup>-7</sup> )   |    |    |

F'dan l-eżempju, il-legant dgħajjef hu noretinodrel (NE)

#### *Tlestija tal-assaġġ tal-irbit kompetittiv*

38. Kif muri fit-Tabella 6, għandhom jiżdiedu fil-bwejriet 80 µl tal-kontroll b'solvent, tal-kontroll bil-bafer, tal-estrogenu referenzjarju, tal-legant dgħajjef, tal-mhux legant, u tas-sustanzi kimiċi tat-test imħejjija f'bafer tal-assaġġ. Imbagħad, f'kull bwejra għandha tiżdied soluzzjoni ta' 4 nM [<sup>3</sup>H]-17β-estradjol. Wara rotazzjoni bil-galbu għal 10 sa 15-il minuta bejn 2° sa 8°C, għandha tiżdied soluzzjoni ta' 40 µl hrERα. Il-pjastri għall-mikrotitraġġ tal-assaġġ għandhom jiġu inkubati f'2° sa 8°C għal 16 sa 20 siegħa u jitqieghdu fuq rotatur matul il-perjodu ta' inkubazzjoni.

**Tabella 6:** Volum tal-Komponenti tal-Assaġġ għall-Assaġġ tal-Irbit Kompetittiv tal-hrER, Pjastri għall-Mikrotitraġġ

| Volum (µl) | Kostitwent                                                                                    |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| 80         | 17β-estradjol mhux tikkettat, noretinodrel, OTES, sustanzi kimiċi tat-test, solvent jew bafer |
| 40         | soluzzjoni ta' 4 nM [ <sup>3</sup> H]-17β-estradjol                                           |
| 40         | soluzzjoni ta' hrERα, koncentrazzjoni kif determinata                                         |
| <b>160</b> | <b>Volum totali f'kull bwejra tal-assaġġ</b>                                                  |

39. Imbagħad għandha ssir il-kwantifikazzjoni ta'  $[^3\text{H}]\text{-}17\beta\text{-Estradjol}$  marbut mal- $\text{hrER}\alpha$ , wara separazzjoni ta'  $[^3\text{H}]\text{-}17\beta\text{-Estradjol}$  marbut mal- $\text{hrER}\alpha$  minn  $[^3\text{H}]\text{-}17\beta\text{-Estradjol}$  hieles billi tizzied sospensjoni ta' 80  $\mu\text{l}$  DCC kiesaħ f'kull bwejra, kif deskritt fil-paragrafi 20-23 għall-assaġġ tal-irbit tas-saturazzjoni.
40. Il-bwejriet H1-6 (identifikati bħala inbjank (għal dawk jaharqu) fit-tabella 4) jirrappreżentaw id-dpms tal-estradjol tikkettat  $[^3\text{H}]$  f'40  $\mu\text{l}$ . L-alikwota ta' 40  $\mu\text{l}$  għandha titwassal direttament fil-fluwidu ta' xintillazzjoni fil-bwejriet H1 – H6.

### **Kriterji ta' aċċettabbiltà**

#### *Assaġġ tal-irbit tas-saturazzjoni*

41. Il-kurva tal-irbit speċifiku għandha tilhaq plateau hekk kif jintużaw konċentrazzjonijiet dejjem akbar ta'  $[^3\text{H}]\text{-}17\beta\text{-estradjol}$ , li tindika saturazzjoni tal- $\text{hrER}\alpha$  bil-ligand.
42. Il-ligand speċifiku f'1 nM  $[^3\text{H}]\text{-}17\beta\text{-estradjol}$  għandu jkun ġewwa l-medda aċċettabbli ta' 15 % sa 25 % tar-radjuattività totali mkejla medja miżjuda fis-sessjonijiet. Hruġ hafif okkażjonali barra minn din il-medda hu aċċettabbli, iżda jekk is-sessjonijiet ikunu konsistentement barra din il-medda jew medda partikolari tkun ferm barra din il-medda, il-konċentrazzjoni tal-proteina għandha tiġi aġġustata u l-assaġġ tas-saturazzjoni għandu jerga' jsir.
43. Id-*data* għandha tipproduci plott Scatchard lineari.
44. L-irbit mhux speċifiku ma għandux ikun eċċessiv. Il-valur għall-irbit mhux speċifiku tipikament għandu jkun ta' <35 % tal-irbit totali. Madankollu, il-proporzjon jista' kultant jaqbeż dan il-limitu meta titkejjel dpm baxxa hafna għall-anqas konċentrazzjoni ta'  $17\beta\text{-Estradjol}$  radjotikkettat ittestjat.

#### *Assaġġ tal-irbit kompetittiv*

45. Konċentrazzjonijiet dejjem akbar ta'  $17\beta\text{-estradjol}$  mhux tikkettat għandhom jispotaw  $[^3\text{H}]\text{-}17\beta\text{-estradjol}$  mir-riċettur b'mod konsistenti b'irbit kompetittiv f'sit wiehed.
46. Il-valur tal- $\text{IC}_{50}$  għall-estrogenu ta' riferiment (jiġifieri  $17\beta\text{-estradjol}$ ) għandu jkun bejn wiehed u iehor daqs il-konċentrazzjoni molar ta'  $[^3\text{H}]\text{-}17\beta\text{-estradjol}$  flimkien ma' Kd determinat mill-assaġġ tal-irbit tas-saturazzjoni.
47. L-irbit speċifiku totali għandu jkun konsistentement fi hdan il-medda aċċettabbli ta'  $20 \pm 5$  % meta l-konċentrazzjoni mkejla medja tar-radjuattività totali miżjuda f'kull bwejra tkun ta' 1 nM fis-sessjonijiet. Hruġ hafif okkażjonali barra minn din il-medda hu aċċettabbli, iżda jekk is-sessjonijiet ikunu konsistentement barra din il-medda jew medda partikolari tkun ferm barra din il-medda, il-konċentrazzjoni tal-proteina għandha tiġi aġġustata.

48. Is-solvent ma għandux ibiddel is-sensittività jew ir-riproducibbiltà tal-assaġġ. Ir-rizultati tal-kontroll bis-solvent (bwejriet tat-TB) jitqabblu mal-kontroll bil-bafer biex jiġi verifikat li s-solvent użat ma jaffettwax is-sistema tal-assaġġ. Ir-rizultati tat-TB u tal-kontroll bil-Bafer għandhom ikunu komparabbli jekk ma jkun hemm ebda effett tas-solvent fuq l-assaġġ.
49. Il-mhux vinkolant ma għandux jispsota aktar minn 25 % tal- $[^3\text{H}]$ -17 $\beta$ -estradijoli mill-hrER $\alpha$  meta jiġi ttestjat sa  $10^{-3}$  M (OTES) jew  $10^{-4}$  M (DBP).
50. Il-krierji tal-prestazzjoni ġew żviluppati għall-estrogeni ta' referenza u għal żewġ leganti dgħajfin (eż. noretinodrel, noretindron) bl-użu tad-*data* mill-istudju ta' validazzjoni tal-Assaġġ FW tal-Irbit tal-hrER (Anness N ta' Riferiment 2). L-intervalli ta' kunfidenza ta' 95 % huma pprovduti għal (n)  $\pm$  SD medja għas-sessjonijiet tal-kontroll kollha bejn il-laboratorji li jiehdu sehem fl-istudju ta' validazzjoni. L-intervalli ta' kunfidenza ta' 95 % ġew ikkalkolati għall-parametri ta' dhul ta' kurva (jiġifieri l-quċcata, il-qiegħ, Hillslope, logIC<sub>50</sub>) għall-estrogeni referenzjarju u għal-leganti dgħajfin u għal-log<sub>10</sub>RBA tal-leganti dgħajfin relattivi għall-estrogeni referenzjarju u huma pprovduti bħala kriterji tal-prestazzjoni għall-kontrolli pożittivi. It-Tabella 1 tipprovdi l-meded mistennija għall-parametri ta' dhul ta' kurva li jistgħu jintużaw bħala kriterji tal-prestazzjoni. Fil-prattika, il-medda tal-IC<sub>50</sub> tista' tvarja ftit fuq il-bażi tal-Kd tal-preparazzjoni tar-riċettur u tal-konċentrazzjoni tal-ligand.
51. Ma ġie żviluppat ebda kriterju tal-prestazzjoni għall-parametri ta' dhul ta' kurva għas-sustanzi kimiċi tat-test minhabba l-firxa vasta ta' sustanzi kimiċi tat-test potenzjali eżistenti u l-varjazzjoni fl-affinitajiet u fl-eżiti potenzjali (eż. Kurva shiħa, kurva parzjali, ebda dhul ta' kurva). Madankollu, għandu jiġi applikat ġudizzju professjonali meta jiġu rieżaminati r-rizultati minn kull sessjoni għal kull sustanza kimika tat-test. Medda suffiċjenti ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test għandha tintuża biex tiġi definita biċ-ċar il-quċcata (eż. 90 - 100 % tal-irbit) tal-kurva kompetittiva. Il-varjabbiltà bejn ir-repliki f'kull konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test kif ukoll bejn it-3 sessjonijiet mhux konkorrenti għandha tkun raġonevoli u xjentifikament difendibbli. Il-kontrolli minn kull sessjoni għal sustanza kimika tat-test għandhom joqorbu lejn il-kejljiet tal-prestazzjoni rrapportati għal dan l-assaġġ FW u jkunu konsistenti mad-*data* storika tal-kontrolli minn kull laboratorju rispettiv.

## ANALIŻI TAD-DATA

### Assaġġ tal-irbit tas-saturazzjoni

52. Jitkejjel l-irbit totali kif ukoll dak mhux speċifiku. Minn dawn il-valuri, l-irbit speċifiku tal-konċentrazzjonijiet dejjem akbar ta'  $[^3\text{H}]$ -17 $\beta$ -estradijoli f'kundizzjonijiet ta' ekwilibriju jiġi kkalkolat bit-tnaqqis tal-mhux speċifiku mit-total. Graff tal-irbit speċifiku kontra l-

konċentrazzjoni ta'  $[^3\text{H}]$ -17 $\beta$ -estradijoli għandha tilhaq plateau għall-irbit speċifiku massimu li tindika saturazzjoni tal-hrER $\alpha$  bl- $[^3\text{H}]$ -17 $\beta$ -estradijoli. Barra minn hekk, l-analiżi tad-*data* għandha tiddokumenta l-irbit ta'  $[^3\text{H}]$ -17 $\beta$ -estradijoli ma' sit ta' rbit wiehed b'affinità għolja. L-irbit mhux speċifiku, totali u speċifiku għandu jintwera fuq kurva tal-irbit tas-saturazzjoni. Analizi ulterjuri ta' din id-*data* għandha tuża analizi ta' rigressjoni mhux lineari (eż. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) b'wiri finali tad-*data* bħala plot Scatchard.

53. L-analiżi tad-*data* għandha tiddetermina l-Bmax u l-Kd mid-*data* dwar l-irbit totali biss, bl-użu tas-suppożizzjoni li l-irbit mhux speċifiku hu lineari, sakemm ma tingħatax ġustifikazzjoni għall-użu ta' metodu differenti. Barra minn hekk, ir-rigressjoni robusta għandha tintuża meta jiġi determinat l-aħjar dhul sakemm ma tingħatax ġustifikazzjoni. Il-metodu magħżul għar-rigressjoni robusta għandu jiġi ddikjarat. Il-korrezzjoni għat-tnaqqis tal-ligand (eż. bl-użu tal-metodu ta' Swillens 1995) dejjem għandha tintuża meta jiġi determinati l-Bmax u l-Kd mid-*data* dwar l-irbit tas-saturazzjoni.

#### **Assaġġ tal-irbit kompetittiv**

54. Il-kurva tal-irbit kompetittiv tiġi plottjata bħala irbit speċifiku ta'  $[^3\text{H}]$ -17 $\beta$ -estradijoli kontra l-konċentrazzjoni (unitajiet tal-log<sub>10</sub>) tal-kompetitur. Il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li tinibixxi 50 % tal-irbit speċifiku massimu ta'  $[^3\text{H}]$ -17 $\beta$  hi l-valur tal-IC<sub>50</sub>.
55. Stimuli tal-valuri tal-log (IC<sub>50</sub>) għall-kontrolli pozittivi (eż. estrogeni referenzjarju u legant dgħajjef) għandhom jiġu determinati bl-użu ta' softwer xieraq ta' dhul ta' kurva nonlineari għad-dhul f'ekwazzjoni ta' Hill b'erba' parametri (eż. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). Il-quċcata, il-qiegh, il-pendil u l-log(IC<sub>50</sub>) generalment għandhom jithallew mhux ristretti meta jiddaħħlu dawn il-kurvi. Ir-rigressjoni robusta għandha tintuża meta jiġi determinat l-aħjar dhul sakemm ma tingħatax ġustifikazzjoni. Ma għandhiex tintuża korrezzjoni għat-tnaqqis tal-ligand. Wara l-analiżi inizjali, kull kurva tal-irbit għandha tiġi rieżaminata biex jiġi żgurat dhul xieraq fil-mudell. L-affinità relattiva għall-irbit (RBA) għal-legant dgħajjef għandha tiġi kkalkolata bħala perċentwal tal-log (IC<sub>50</sub>) għal-legant dgħajjef relattiv għal-log (IC<sub>50</sub>) għal 17 $\beta$ -estradijoli. Ir-riżultati mill-kontrolli pozittivi u mill-kontroll mhux legant għandhom jiġu evalwati bl-użu tal-miżuri tal-prestazzjoni tal-assaġġ fil-paragrafi 45-50 f'dan l-Appendiċi 2.
56. Id-*data* għas-sustanzi kimiċi tat-test kollha għandha tiġi analizzata bl-użu ta' approċċ skont l-istadju biex jiġi żgurat li d-*data* tiġi analizzata kif xieraq u li kull kurva tal-irbit kompetittiv tiġi klassifikata kif suppost. Hu rakkomandat li kull sessjoni għal sustanza kimika tat-test għall-ewwel isirilha analizi tad-*data* standardizzata li tkun identika għal dik użata għall-estrogeni referenzjarju u għall-kontrolli tal-irbit dgħajjef (ara l-paragrafu 55 aktar 'il fuq). Ladarba titlesta, għandhom isiru rieżami tekniku tal-parametri ta' dhul tal-kurva kif ukoll rieżami viżwali ta' kemm qed tidhol sew id-*data* fil-kurva tal-irbit kompetittiv generata għal kull sessjoni. Matul dan ir-rieżami tekniku, l-osservazzjonijiet ta'

tnaqqis dipendenti fuq il-konċentrazzjoni fil-perċentwal ta' [<sup>3</sup>H]-17β-estradijoli marbut b'mod speċifiku, varjabbiltà baxxa fost ir-repliki tekniċi f'kull konċentrazzjoni kimika, u l-konsistenza fil-parametri mdaħħla fost it-tliet sessjonijiet huma indikazzjoni tajba li l-assaġġ u l-analizzjiet tad-*data* saru kif suppost.

### Interpretazzjoni tad-*data*

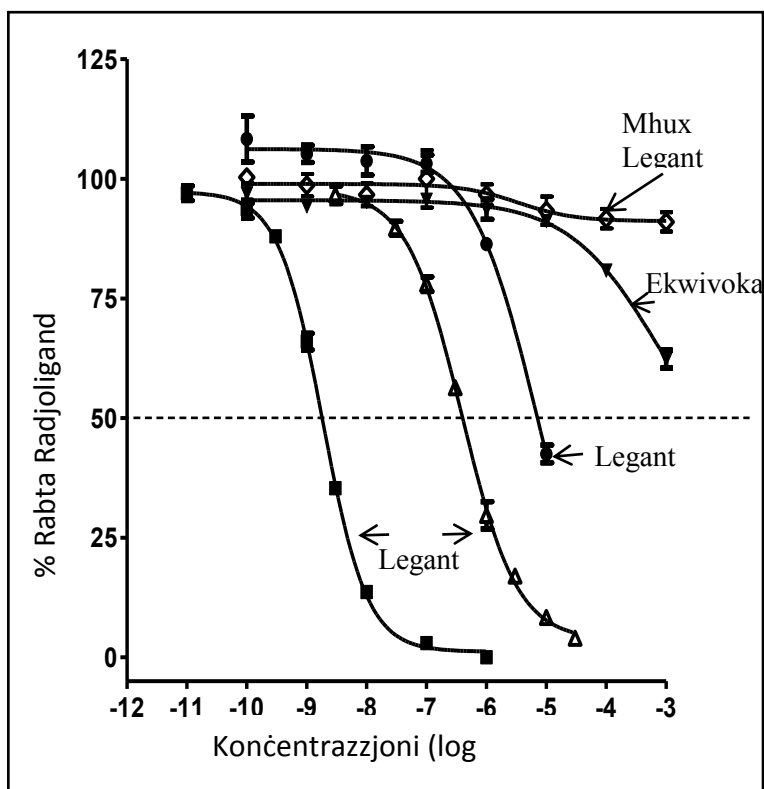
57. Dment li ma jiġux issodisfati l-kriterji ta' aċċettabbiltà, sustanza kimika tat-test titqies li tkun legant għall-hrERα jekk kurva tal-irbit tkun tista' tiddaħhal u l-anqas punt fil-kurva tar-rispons fi hdan il-medda tad-*data* jkun anqas minn 50 % (Figura 1).
58. Dment li ma jiġux issodisfati l-kriterji ta' aċċettabbiltà kollha, sustanza kimika tat-test titqies li mhix legant għall-hrERα jekk:
  - Kurva tal-irbit tkun tista' tiddaħhal u l-anqas punt fil-kurva tar-rispons imdaħħla fi hdan il-medda tad-*data* jkun oghla minn 75 %, jew
  - Kurva tal-irbit ma tkunx tista' tiddaħhal u l-anqas irbit perċentwali medju mhux illixxat fost il-gruppi ta' konċentrazzjoni fid-*data* jkun oghla minn 75 %.
59. Is-sustanzi kimiċi tat-test jitqiesu ekwivoċi jekk ma tiġi ssodisfata l-ebda waħda mill-kundizzjonijiet ta' hawn fuq (eż. l-anqas punt fil-kurva tar-rispons imdaħħla jkun bejn 76 – 51 %).

**Tabella 7:** Kriterji għall-assenjazzjoni tal-klassifikazzjoni fuq il-bażi tal-kurva tal-irbit kompetittiv għal sustanza kimika tat-test.

| Klassifikazzjoni         | Kriterji                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|--------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Legant <sup>a</sup>      | Kurva tal-irbit tista' tiddaħhal.<br><b>L-anqas punt fil-kurva tar-rispons fi hdan il-medda tad-<i>data</i> hu anqas minn 50 %.</b>                                                                                                                                                                                               |
| Mhux Legant <sup>b</sup> | Jekk tista' tiddaħhal kurva tal-irbit,<br><b>l-anqas punt fil-kurva tar-rispons imdaħħla fi hdan il-medda tad-<i>data</i> hu akbar minn 75 %.</b><br><br>Jekk ma tistax tiddaħhal kurva tal-irbit,<br><b>l-anqas irbit perċentwali medju mhux illixxat fost il-gruppi ta' konċentrazzjoni fid-<i>data</i> hu oghla minn 75 %.</b> |
| Ekwivoka <sup>c</sup>    | Kwalunkwe sessjoni li tista' tiġi ttestjata la hi legant u lanqas mhux legant (eż. L-anqas punt fil-kurva mdaħħla tar-rispons hu bejn 76 – 51 %).                                                                                                                                                                                 |

**Figura 1:** Eżempji ta' klassifikazzjoni ta' sustanza kimika tat-test bl-użu ta' kurva tal-irbit kompetittiv.





60. Diversi sessjonijiet imwettqa fi hdan laboratorju għal sustanza kimika tat-test jigu kombinati bl-assenjazzjoni ta' valuri numeriċi għal kull sessjoni u bit-teħid tal-medja bejn is-sessjonijiet kif muri fit-Tabella 8. Ir-rizultati għas-sessjonijiet kombinati fi hdan kull laboratorju jitqabblu mal-klassifikazzjoni mistennija għal kull sustanza kimika tat-test.

**Tabella 8:** Il-metodu għall-klassifikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test bl-użu ta' diversi sessjonijiet fi hdan laboratorju

| Biex jiġi assenjat valur għal kull sessjoni:                              |                               |
|---------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| Klassifikazzjoni                                                          | Valur Numeriku                |
| Legant                                                                    | 2                             |
| Ekwiwoka                                                                  | 1                             |
| Mhux legant                                                               | 0                             |
| Biex tiġi klassifikata medja ta' valur numeriku fuq diversi sessjonijiet: |                               |
| Klassifikazzjoni                                                          | Valur Numeriku                |
| Legant                                                                    | Medja $\geq 1,5$              |
| Ekwiwoka                                                                  | $0,5 \leq \text{Medja} < 1,5$ |
| Mhux legant                                                               | Medja $< 0,5$                 |

## **RAPPORT TAT-TEST**

61. Ara l-paragrafu 24 ta' "**KOMPONENTI TAL-ASSAĠĠ TAL-IRBIT TAL-hrER**" ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

## Appendiċi 2.1

### LISTA TA' TERMINI

**[<sup>3</sup>H]E2:** 17β-Estradjol radjotikkettat bi tritju

**DCC:** Faħam miksi bid-dekstran

**E2:** 17β-estradjol mhux tikkettat (inert)

**Bafer tal-assaġġ:** 10 mM Tris, 10 mg Albumina tas-Serum tal-Bovini /ml, 2 mM DTT, 10 % glicerol, 0,2 mM lewpeptina, pH 7,5

**hrERα:** Alfa tar-riċettur tal-estrogenu rikombinanti uman (dominju li jorbot tal-ligand)

**Replika:** Waħda mid-diversi bwejriet li jkun fihom l-istess kontenut fl-istess konċentrazzjonijiet u li jiġu ttestjati b'mod konkorrenti fi ħdan sessjoni waħda. F'dan il-protokoll, kull konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test tiġi ttestjata fi triplikati; jiġifieri, hemm tliet repliki li jiġu assaġġati fl-istess hin f'kull konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test.

**Sessjoni:** Sett shiħ ta' bwejriet ta' assaġġ ta' pjastra għall-mikrotitraġġ f'sessjoni konkorrenti li jipprovdi l-informazzjoni neċessarja kollha biex jiġi karatterizzat l-irbit ta' sustanza kimika tat-test mal-hrERα (viz., it-total [<sup>3</sup>H]-17β-estradjol miżjud fil-bwejra tal-assaġġ, l-irbit massimu ta' [<sup>3</sup>H]-17β-estradjol mal-hrERα, l-irbit mhux speċifiku, u l-irbit totali f'diversi konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test). Sessjoni tista' tikkonsisti fi bwejra tal-assaġġ waħda biss (jiġifieri replika) għal kull konċentrazzjoni, iżda peress li dan il-protokoll jeħtieġ assaġġar fi triplikati, sessjoni waħda tikkonsist fi tliet bwejriet tal-assaġġ għal kull konċentrazzjoni. Barra minn hekk, dan il-protokoll jeħtieġ tliet sessjonijiet indipendenti (jiġifieri mhux konkorrenti) għal kull sustanza kimika.

## Appendiċi 2.2

### ASSAĠĠ TIPIKU TAS-SATURAZZJONI TA' $[^3\text{H}]$ -17B-ESTRADJOL BI TLIET BWEJRIET REPLIKI

| Assaġġ Tipiku tas-Saturazzjoni ta' $[^3\text{H}]$ -17 $\beta$ -Estradjol bi Tliet Bwejriet Repliki |         |                           |                                              |                                       |                                            |                                              |                                       |                                            |                                   |                                      |                           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|---------------------------|----------------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------------|----------------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|---------------------------|
| Pożizzjoni                                                                                         | Replika | Kodiċi tat-Tip ta' Bwejra | Konċentrazzjo ni Inizjali ta' E2 Jahraq (nM) | Volum ta' E2 Jahraq ( $\mu\text{l}$ ) | Konċentrazzjo ni Finali ta' E2 Jahraq (nM) | Konċentrazzjo ni Inizjali ta' E2 Kiesah (nM) | Volum ta' E2 Kiesah ( $\mu\text{l}$ ) | Konċentrazzjo ni Finali ta' E2 Kiesah (uM) | Volum tal-Bafer ( $\mu\text{l}$ ) | Volum tar-Ricettur ( $\mu\text{l}$ ) | Volum totali fil-bwejriet |
| 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 |

**Assaġġ Tipiku tas-Saturazzjoni ta' [3H]-17β-Estradjol bi Tliet Bwejriet Repliki**

| Pożizzjoni | Replika | Kodiċi tat-Tip ta' Bwejra | Konċentrazzjon i Inizjali ta' E2 Jahraq (nM) | Volum ta' E2 Jahraq (μl) | Konċentrazzjon i Finali ta' E2 Jahraq (nM) | Konċentrazzjon i Inizjali ta' E2 Kiesah (μM) | Volum ta' E2 Kiesah (μl) | Konċentrazzjon i Finali ta' E2 Kiesah (μM) | Volum tal-Bafer (μl) | Volum tar-Ricettur (μl) | Volum totali fil-bwejriet |
|------------|---------|---------------------------|----------------------------------------------|--------------------------|--------------------------------------------|----------------------------------------------|--------------------------|--------------------------------------------|----------------------|-------------------------|---------------------------|
| 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       | Jahraq                    | 0,12                                         | 40                       | 0,03                                       | —                                            | —                        | —                                          | —                    | —                       | 40                        |
| G2         | 2       | Jahraq                    | 0,12                                         | 40                       | 0,03                                       | —                                            | —                        | —                                          | —                    | —                       | 40                        |
| G3         | 3       | Jahraq                    | 0,12                                         | 40                       | 0,03                                       | —                                            | —                        | —                                          | —                    | —                       | 40                        |
| G4         | 1       | Jahraq                    | 0,24                                         | 40                       | 0,06                                       | —                                            | —                        | —                                          | —                    | —                       | 40                        |
| G5         | 2       | Jahraq                    | 0,24                                         | 40                       | 0,06                                       | —                                            | —                        | —                                          | —                    | —                       | 40                        |
| G6         | 3       | Jahraq                    | 0,24                                         | 40                       | 0,06                                       | —                                            | —                        | —                                          | —                    | —                       | 40                        |
| G7         | 1       | Jahraq                    | 0,32                                         | 40                       | 0,08                                       | —                                            | —                        | —                                          | —                    | —                       | 40                        |
| G8         | 2       | Jahraq                    | 0,32                                         | 40                       | 0,08                                       | —                                            | —                        | —                                          | —                    | —                       | 40                        |
| G9         | 3       | Jahraq                    | 0,32                                         | 40                       | 0,08                                       | —                                            | —                        | —                                          | —                    | —                       | 40                        |
| G10        | 1       | Jahraq                    | 0,40                                         | 40                       | 0,10                                       | —                                            | —                        | —                                          | —                    | —                       | 40                        |
| G11        | 2       | Jahraq                    | 0,40                                         | 40                       | 0,10                                       | —                                            | —                        | —                                          | —                    | —                       | 40                        |
| G12        | 3       | Jahraq                    | 0,40                                         | 40                       | 0,10                                       | —                                            | —                        | —                                          | —                    | —                       | 40                        |
| H1         | 1       | Jahraq                    | 1,20                                         | 40                       | 0,30                                       | —                                            | —                        | —                                          | —                    | —                       | 40                        |
| H2         | 2       | Jahraq                    | 1,20                                         | 40                       | 0,30                                       | —                                            | —                        | —                                          | —                    | —                       | 40                        |
| H3         | 3       | Jahraq                    | 1,20                                         | 40                       | 0,30                                       | —                                            | —                        | —                                          | —                    | —                       | 40                        |
| H4         | 1       | Jahraq                    | 2,40                                         | 40                       | 0,60                                       | —                                            | —                        | —                                          | —                    | —                       | 40                        |
| H5         | 2       | Jahraq                    | 2,40                                         | 40                       | 0,60                                       | —                                            | —                        | —                                          | —                    | —                       | 40                        |
| H6         | 3       | Jahraq                    | 2,40                                         | 40                       | 0,60                                       | —                                            | —                        | —                                          | —                    | —                       | 40                        |
| H7         | 1       | Jahraq                    | 4,00                                         | 40                       | 1,00                                       | —                                            | —                        | —                                          | —                    | —                       | 40                        |
| H8         | 2       | Jahraq                    | 4,00                                         | 40                       | 1,00                                       | —                                            | —                        | —                                          | —                    | —                       | 40                        |
| H9         | 3       | Jahraq                    | 4,00                                         | 40                       | 1,00                                       | —                                            | —                        | —                                          | —                    | —                       | 40                        |
| H10        | 1       | Jahraq                    | 12,00                                        | 40                       | 3,00                                       | —                                            | —                        | —                                          | —                    | —                       | 40                        |
| H11        | 2       | Jahraq                    | 12,00                                        | 40                       | 3,00                                       | —                                            | —                        | —                                          | —                    | —                       | 40                        |
| H12        | 3       | Jahraq                    | 12,00                                        | 40                       | 3,00                                       | —                                            | —                        | —                                          | —                    | —                       | 40                        |

Kun af li l-bwejriet “jahraq” jkunu vojta matul l-inkubazzjoni. L-40 μl jizjedu biss għall-ghadd tax-xintillazzjoni.



### Appendiċi 2.3: Tifsila tal-Bwejriet tal-Assaġġ tal-Irbit Kompetittiv

| Pjastra | Pożizzjoni | Replika | Tip ta' bwejra    | Kodiċi tal-bwejra | Kodiċi tal-koncentrazzjoni | Koncentrazzjoni Inizjali tal-Kompetitur (M) | Stokk tal-hrER (µl) | Volum tal-Bafer (µl) | Volum tal-Traċċatur (E2) (µL) | Volum mill-pjastra tad-dilwizzjoni (µL) | Volum Finali (µl) | Koncentrazzjoni Finali tal-Kompetitur (M) |
|---------|------------|---------|-------------------|-------------------|----------------------------|---------------------------------------------|---------------------|----------------------|-------------------------------|-----------------------------------------|-------------------|-------------------------------------------|
| S       | A1         | 1       | irbit totali      | TB                | TB1                        | -                                           | 40                  |                      | 40                            | 80                                      | 160               | -                                         |
| S       | A2         | 2       | irbit totali      | TB                | TB2                        | -                                           | 40                  |                      | 40                            | 80                                      | 160               | -                                         |
| S       | A3         | 3       | irbit totali      | TB                | TB3                        | -                                           | 40                  |                      | 40                            | 80                                      | 160               | -                                         |
| S       | A4         | 1       | irbit totali      | TB                | TB4                        | -                                           | 40                  |                      | 40                            | 80                                      | 160               | -                                         |
| S       | A5         | 2       | irbit totali      | TB                | TB5                        | -                                           | 40                  |                      | 40                            | 80                                      | 160               | -                                         |
| S       | A6         | 3       | irbit totali      | TB                | TB6                        | -                                           | 40                  |                      | 40                            | 80                                      | 160               | -                                         |
| S       | A7         | 1       | E2 kiesah (gholi) | NSB               | S0                         | 2,00E-06                                    | 40                  | -                    | 40                            | 80                                      | 160               | 1,0E-06                                   |
| S       | A8         | 2       | E2 kiesah (gholi) | NSB               | S0                         | 2,00E-06                                    | 40                  | -                    | 40                            | 80                                      | 160               | 1,0E-06                                   |
| S       | A9         | 3       | E2 kiesah (gholi) | NSB               | S0                         | 2,00E-06                                    | 40                  | -                    | 40                            | 80                                      | 160               | 1,0E-06                                   |
| S       | A10        | 1       | E2 kiesah (gholi) | NSB               | S0                         | 2,00E-06                                    | 40                  | -                    | 40                            | 80                                      | 160               | 1,0E-06                                   |
| S       | A11        | 2       | E2 kiesah (gholi) | NSB               | S0                         | 2,00E-06                                    | 40                  | -                    | 40                            | 80                                      | 160               | 1,0E-06                                   |
| S       | A12        | 3       | E2 kiesah (gholi) | NSB               | S0                         | 2,00E-06                                    | 40                  | -                    | 40                            | 80                                      | 160               | 1,0E-06                                   |
| S       | B1         | 1       | E2 kiesah         | S                 | S1                         | 2,00E-07                                    | 40                  | -                    | 40                            | 80                                      | 160               | 1,0E-07                                   |
| S       | B2         | 2       | E2 kiesah         | S                 | S1                         | 2,00E-07                                    | 40                  | -                    | 40                            | 80                                      | 160               | 1,0E-07                                   |
| S       | B3         | 3       | E2 kiesah         | S                 | S1                         | 2,00E-07                                    | 40                  | -                    | 40                            | 80                                      | 160               | 1,0E-07                                   |
| S       | B4         | 1       | E2 kiesah         | S                 | S2                         | 2,00E-08                                    | 40                  | -                    | 40                            | 80                                      | 160               | 1,0E-08                                   |
| S       | B5         | 2       | E2 kiesah         | S                 | S2                         | 2,00E-08                                    | 40                  | -                    | 40                            | 80                                      | 160               | 1,0E-08                                   |
| S       | B6         | 3       | E2 kiesah         | S                 | S2                         | 2,00E-08                                    | 40                  | -                    | 40                            | 80                                      | 160               | 1,0E-08                                   |
| S       | B7         | 1       | E2 kiesah         | S                 | S3                         | 6,00E-09                                    | 40                  | -                    | 40                            | 80                                      | 160               | 3,0E-09                                   |
| S       | B8         | 2       | E2 kiesah         | S                 | S3                         | 6,00E-09                                    | 40                  | -                    | 40                            | 80                                      | 160               | 3,0E-09                                   |
| S       | B9         | 3       | E2 kiesah         | S                 | S3                         | 6,00E-09                                    | 40                  | -                    | 40                            | 80                                      | 160               | 3,0E-09                                   |
| S       | B10        | 1       | E2 kiesah         | S                 | S4                         | 2,00E-09                                    | 40                  | -                    | 40                            | 80                                      | 160               | 1,0E-09                                   |
| S       | B11        | 2       | E2 kiesah         | S                 | S4                         | 2,00E-09                                    | 40                  | -                    | 40                            | 80                                      | 160               | 1,0E-09                                   |
| S       | B12        | 3       | E2 kiesah         | S                 | S4                         | 2,00E-09                                    | 40                  | -                    | 40                            | 80                                      | 160               | 1,0E-09                                   |
| S       | C1         | 1       | E2 kiesah         | S                 | S5                         | 6,00E-10                                    | 40                  | -                    | 40                            | 80                                      | 160               | 3,0E-10                                   |
| S       | C2         | 2       | E2 kiesah         | S                 | S5                         | 6,00E-10                                    | 40                  | -                    | 40                            | 80                                      | 160               | 3,0E-10                                   |
| S       | C3         | 3       | E2 kiesah         | S                 | S5                         | 6,00E-10                                    | 40                  | -                    | 40                            | 80                                      | 160               | 3,0E-10                                   |
| S       | C4         | 1       | E2 kiesah         | S                 | S6                         | 2,00E-10                                    | 40                  | -                    | 40                            | 80                                      | 160               | 1,0E-10                                   |
| S       | C5         | 2       | E2 kiesah         | S                 | S6                         | 2,00E-10                                    | 40                  | -                    | 40                            | 80                                      | 160               | 1,0E-10                                   |
| S       | C6         | 3       | E2 kiesah         | S                 | S6                         | 2,00E-10                                    | 40                  | -                    | 40                            | 80                                      | 160               | 1,0E-10                                   |
| S       | C7         | 1       | E2 kiesah         | S                 | S7                         | 2,00E-11                                    | 40                  | -                    | 40                            | 80                                      | 160               | 1,0E-11                                   |
| S       | C8         | 2       | E2 kiesah         | S                 | S7                         | 2,00E-11                                    | 40                  | -                    | 40                            | 80                                      | 160               | 1,0E-11                                   |
| S       | C9         | 3       | E2 kiesah         | S                 | S7                         | 2,00E-11                                    | 40                  | -                    | 40                            | 80                                      | 160               | 1,0E-11                                   |
| S       | C10        | 1       | inbjank           | inbjank           | B1                         | -                                           | -                   | 160                  | -                             | -                                       | 160               | -                                         |
| S       | C11        | 2       | inbjank           | inbjank           | B2                         | -                                           | -                   | 160                  | -                             | -                                       | 160               | -                                         |
| S       | C12        | 3       | inbjank           | inbjank           | B3                         | -                                           | -                   | 160                  | -                             | -                                       | 160               | -                                         |
| S       | D1         | 1       | noretinodrel      | NE                | WP1                        | 6,00E-05                                    | 40                  | -                    | 40                            | 80                                      | 160               | 3,0E-05                                   |
| S       | D2         | 1       | noretinodrel      | NE                | WP1                        | 6,00E-05                                    | 40                  | -                    | 40                            | 80                                      | 160               | 3,0E-05                                   |
| S       | D3         | 1       | noretinodrel      | NE                | WP1                        | 6,00E-05                                    | 40                  | -                    | 40                            | 80                                      | 160               | 3,0E-05                                   |
| S       | D4         | 1       | noretinodrel      | NE                | WP2                        | 2,00E-05                                    | 40                  | -                    | 40                            | 80                                      | 160               | 1,0E-05                                   |
| S       | D5         | 1       | noretinodrel      | NE                | WP2                        | 2,00E-05                                    | 40                  | -                    | 40                            | 80                                      | 160               | 1,0E-05                                   |
| S       | D6         | 1       | noretinodrel      | NE                | WP2                        | 2,00E-05                                    | 40                  | -                    | 40                            | 80                                      | 160               | 1,0E-05                                   |
| S       | D7         | 1       | noretinodrel      | NE                | WP3                        | 6,00E-06                                    | 40                  | -                    | 40                            | 80                                      | 160               | 3,0E-06                                   |
| S       | D8         | 1       | noretinodrel      | NE                | WP3                        | 6,00E-06                                    | 40                  | -                    | 40                            | 80                                      | 160               | 3,0E-06                                   |
| S       | D9         | 1       | noretinodrel      | NE                | WP3                        | 6,00E-06                                    | 40                  | -                    | 40                            | 80                                      | 160               | 3,0E-06                                   |
| S       | D10        | 1       | noretinodrel      | NE                | WP4                        | 2,00E-06                                    | 40                  | -                    | 40                            | 80                                      | 160               | 1,0E-06                                   |
| S       | D11        | 1       | noretinodrel      | NE                | WP4                        | 2,00E-06                                    | 40                  | -                    | 40                            | 80                                      | 160               | 1,0E-06                                   |
| S       | D12        | 1       | noretinodrel      | NE                | WP4                        | 2,00E-06                                    | 40                  | -                    | 40                            | 80                                      | 160               | 1,0E-06                                   |

| Tifsila tal-Bwejriet tal-Assaġġ tal-Irbitt Kompetittiv |            |         |                    |                   |                            |                                             |                     |                      |                                    |                                         |                   |                                           |
|--------------------------------------------------------|------------|---------|--------------------|-------------------|----------------------------|---------------------------------------------|---------------------|----------------------|------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------|-------------------------------------------|
| Pjastra                                                | Pozizzjoni | Replika | Tip ta' bwejra     | Kodiċi tal-bwejra | Kodiċi tal-koncentrazzjoni | Koncentrazzjoni Inizjali tal-Kompetitur (M) | Stokk tal-hrER (μl) | Volum tal-Bafer (μl) | Volum tat-Tracatur (E2 Labra) (μL) | Volum mill-pjastra tad-dilwizzjoni (μL) | Volum Finali (μl) | Koncentrazzjoni Finali tal-Kompetitur (M) |
| S                                                      | E1         | 1       | noretinodrel       | NE                | WP                         | 6,00E-07-                                   | 40                  |                      | 40                                 | 80                                      | 160               | 3,0E-07                                   |
| S                                                      | E2         | 2       | noretinodrel       | NE                | WP                         | 6,00E-07-                                   | 40                  |                      | 40                                 | 80                                      | 160               | 3,0E-07                                   |
| S                                                      | E3         | 3       | noretinodrel       | NE                | WP                         | 6,00E-07-                                   | 40                  |                      | 40                                 | 80                                      | 160               | 3,0E-07                                   |
| S                                                      | E4         | 1       | noretinodrel       | NE                | WP                         | 2,00E-07-                                   | 40                  |                      | 40                                 | 80                                      | 160               | 1,0E-07                                   |
| S                                                      | E5         | 2       | noretinodrel       | NE                | WP                         | 2,00E-07-                                   | 40                  |                      | 40                                 | 80                                      | 160               | 1,0E-07                                   |
| S                                                      | E6         | 3       | noretinodrel       | NE                | WP                         | 2,00E-07-                                   | 40                  |                      | 40                                 | 80                                      | 160               | 1,0E-07                                   |
| S                                                      | E7         | 1       | noretinodrel       | NE                | WP                         | 6,00E-08-                                   | 40                  | -                    | 40                                 | 80                                      | 160               | 3,0E-08                                   |
| S                                                      | E8         | 2       | noretinodrel       | NE                | WP                         | 6,00E-08-                                   | 40                  | -                    | 40                                 | 80                                      | 160               | 3,0E-08                                   |
| S                                                      | E9         | 3       | noretinodrel       | NE                | WP                         | 6,00E-08-                                   | 40                  | -                    | 40                                 | 80                                      | 160               | 3,0E-08                                   |
| S                                                      | E10        | 1       | noretinodrel       | NE                | WP                         | 6,00E-09-                                   | 40                  | -                    | 40                                 | 80                                      | 160               | 3,0E-09                                   |
| S                                                      | E11        | 2       | noretinodrel       | NE                | WP                         | 6,00E-09-                                   | 40                  | -                    | 40                                 | 80                                      | 160               | 3,0E-09                                   |
| S                                                      | E12        | 3       | noretinodrel       | NE                | WP                         | 6,00E-09-                                   | 40                  | -                    | 40                                 | 80                                      | 160               | 3,0E-09                                   |
| S                                                      | F1         | 1       | OTES               | L                 | OTES                       | 2,00E-03                                    | 40                  | -                    | 40                                 | 80                                      | 160               | 1,0E-03                                   |
| S                                                      | F2         | 2       | OTES               | L                 | OTES                       | 2,00E-03                                    | 40                  | -                    | 40                                 | 80                                      | 160               | 1,0E-03                                   |
| S                                                      | F3         | 3       | OTES               | L                 | OTES                       | 2,00E-03                                    | 40                  | -                    | 40                                 | 80                                      | 160               | 1,0E-03                                   |
| S                                                      | F4         | 1       | OTES               | L                 | OTES                       | 2,00E-04                                    | 40                  | -                    | 40                                 | 80                                      | 160               | 1,0E-04                                   |
| S                                                      | F5         | 2       | OTES               | L                 | OTES                       | 2,00E-04                                    | 40                  | -                    | 40                                 | 80                                      | 160               | 1,0E-04                                   |
| S                                                      | F6         | 3       | OTES               | L                 | OTES                       | 2,00E-04                                    | 40                  | -                    | 40                                 | 80                                      | 160               | 1,0E-04                                   |
| S                                                      | F7         | 1       | OTES               | L                 | OTES                       | 2,00E-05                                    | 40                  | -                    | 40                                 | 80                                      | 160               | 3,0E-05                                   |
| S                                                      | F8         | 2       | OTES               | L                 | OTES                       | 2,00E-05                                    | 40                  | -                    | 40                                 | 80                                      | 160               | 3,0E-05                                   |
| S                                                      | F9         | 3       | OTES               | L                 | OTES                       | 2,00E-05                                    | 40                  | -                    | 40                                 | 80                                      | 160               | 3,0E-05                                   |
| S                                                      | F10        | 1       | OTES               | L                 | OTES                       | 2,00E-06                                    | 40                  | -                    | 40                                 | 80                                      | 160               | 1,0E-06                                   |
| S                                                      | F11        | 2       | OTES               | L                 | OTES                       | 2,00E-06                                    | 40                  | -                    | 40                                 | 80                                      | 160               | 1,0E-06                                   |
| S                                                      | F12        | 3       | OTES               | L                 | OTES                       | 2,00E-06                                    | 40                  | -                    | 40                                 | 80                                      | 160               | 1,0E-06                                   |
| S                                                      | G1         | 1       | OTES               | L                 | OTES                       | 2,00E-07                                    | 40                  | -                    | 40                                 | 80                                      | 160               | 3,0E-07                                   |
| S                                                      | G2         | 2       | OTES               | L                 | OTES                       | 2,00E-07                                    | 40                  | -                    | 40                                 | 80                                      | 160               | 3,0E-07                                   |
| S                                                      | G3         | 3       | OTES               | L                 | OTES                       | 2,00E-07                                    | 40                  | -                    | 40                                 | 80                                      | 160               | 3,0E-07                                   |
| S                                                      | G4         | 1       | OTES               | L                 | OTES                       | 2,00E-08                                    | 40                  | -                    | 40                                 | 80                                      | 160               | 1,0E-08                                   |
| S                                                      | G5         | 2       | OTES               | L                 | OTES                       | 2,00E-08                                    | 40                  | -                    | 40                                 | 80                                      | 160               | 1,0E-08                                   |
| S                                                      | G6         | 3       | OTES               | L                 | OTES                       | 2,00E-08                                    | 40                  | -                    | 40                                 | 80                                      | 160               | 1,0E-08                                   |
| S                                                      | G7         | 1       | OTES               | L                 | OTES                       | 2,00E-09                                    | 40                  | -                    | 40                                 | 80                                      | 160               | 1,0E-09                                   |
| S                                                      | G8         | 2       | OTES               | L                 | OTES                       | 2,00E-09                                    | 40                  | -                    | 40                                 | 80                                      | 160               | 1,0E-09                                   |
| S                                                      | G9         | 3       | OTES               | L                 | OTES                       | 2,00E-09                                    | 40                  | -                    | 40                                 | 80                                      | 160               | 1,0E-09                                   |
| S                                                      | G10        | 1       | OTES               | L                 | OTES                       | 2,00E-10                                    | 40                  | -                    | 40                                 | -                                       | 160               | 1,0E-10                                   |
| S                                                      | G11        | 2       | OTES               | L                 | OTES                       | 2,00E-10                                    | 40                  | -                    | 40                                 | -                                       | 160               | 1,0E-10                                   |
| S                                                      | G12        | 3       | OTES               | L                 | OTES                       | 2,00E-10                                    | 40                  | -                    | 40                                 | -                                       | 160               | 1,0E-10                                   |
| S                                                      | H1         | 1       | jahraq             | H                 | H                          | -                                           | -                   | -                    | 40                                 | -                                       | 40                | -                                         |
| S                                                      | H2         | 1       | jahraq             | H                 | H                          | -                                           | -                   | -                    | 40                                 | -                                       | 40                | -                                         |
| S                                                      | H3         | 1       | jahraq             | H                 | H                          | -                                           | -                   | -                    | 40                                 | -                                       | 40                | -                                         |
| S                                                      | H4         | 1       | jahraq             | H                 | H                          | -                                           | -                   | -                    | 40                                 | -                                       | 40                | -                                         |
| S                                                      | H5         | 1       | jahraq             | H                 | H                          | -                                           | -                   | -                    | 40                                 | -                                       | 40                | -                                         |
| S                                                      | H6         | 1       | jahraq             | H                 | H                          | -                                           | -                   | -                    | 40                                 | -                                       | 40                | -                                         |
| S                                                      | H7         | 1       | kontroll bil-bafer | BC                | BC                         | -                                           | 40                  | 80                   | 40                                 | -                                       | 160               | -                                         |
| S                                                      | H8         | 1       | kontroll bil-bafer | BC                | BC                         | -                                           | 40                  | 80                   | 40                                 | -                                       | 160               | -                                         |
| S                                                      | H9         | 1       | kontroll bil-bafer | BC                | BC                         | -                                           | 40                  | 80                   | 40                                 | -                                       | 160               | -                                         |
| S                                                      | H10        | 1       | kontroll bil-bafer | BC                | BC                         | -                                           | 40                  | 80                   | 40                                 | -                                       | 160               | -                                         |
| S                                                      | H11        | 1       | kontroll bil-bafer | BC                | BC                         | -                                           | 40                  | 80                   | 40                                 | -                                       | 160               | -                                         |
| S                                                      | H12        | 1       | kontroll bil-bafer | BC                | BC                         | -                                           | 40                  | 80                   | 40                                 | -                                       | 160               | -                                         |

Kun af li l-bwejriet "jaharqu" jkunu vojta matul l-inkubazzjoni. L-40 μl jiżiedu biss għall-ghadd tax-xintillazzjoni.



| Tifsila tal-Bwejriet tal-Assaġġ tal-Irbit Kompetittiv |            |         |                   |                   |                            |                                             |                     |                      |                               |                                        |                   |                                           |
|-------------------------------------------------------|------------|---------|-------------------|-------------------|----------------------------|---------------------------------------------|---------------------|----------------------|-------------------------------|----------------------------------------|-------------------|-------------------------------------------|
| Pjastra                                               | Posizzjoni | Replika | Tip ta' bwejra    | Kodiċi tal-Bwejra | Kodiċi tal-Koncentrazzjoni | Koncentrazzjoni Inizjali tal-Kompetitur (M) | Stokk tal-hrER (µL) | Volum tal-Bafer (µL) | Volum tat-Traċċatur (E2) (µL) | Volum tad-pjastra tad-dilwizzjoni (µL) | Volum Finali (µL) | Koncentrazzjoni Finali tal-Kompetitur (M) |
| P1                                                    | A1         | 1       | irbit totali      | TB                | TBB1B1                     | -                                           | 40                  | -                    | 40                            | 80                                     | 160               | -                                         |
| P1                                                    | A2         | 2       | irbit totali      | TB                | TB2                        | -                                           | 40                  | -                    | 40                            | 80                                     | 160               | -                                         |
| P1                                                    | A3         | 3       | irbit totali      | TB                | TB3                        | -                                           | 40                  | -                    | 40                            | 80                                     | 160               | -                                         |
| P1                                                    | A4         | 1       | irbit totali      | TB                | TB4                        | -                                           | 40                  | -                    | 40                            | 80                                     | 160               | -                                         |
| P1                                                    | A5         | 2       | irbit totali      | TB                | TB5                        | -                                           | 40                  | -                    | 40                            | 80                                     | 160               | -                                         |
| P1                                                    | A6         | 3       | irbit totali      | TB                | TB6                        | -                                           | 40                  | -                    | 40                            | 80                                     | 160               | -                                         |
| P1                                                    | A7         | 1       | E2 kiesah (gholi) | NSB               | S0                         | 2,00E-06                                    | 40                  | -                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-06                                   |
| P1                                                    | A8         | 2       | E2 kiesah (gholi) | NSB               | S0                         | 2,00E-06                                    | 40                  | -                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-06                                   |
| P1                                                    | A9         | 3       | E2 kiesah (gholi) | NSB               | S0                         | 2,00E-06                                    | 40                  | -                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-06                                   |
| P1                                                    | A10        | 1       | E2 kiesah (gholi) | NSB               | S0                         | 2,00E-06                                    | 40                  | -                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-06                                   |
| P1                                                    | A11        | 2       | E2 kiesah (gholi) | NSB               | S0                         | 2,00E-06                                    | 40                  | -                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-06                                   |
| P1                                                    | A12        | 3       | E2 kiesah (gholi) | NSB               | S0                         | 2,00E-06                                    | 40                  | -                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-06                                   |
| P1                                                    | B1         | 1       | Sustanza Kimika   | TC1               | 1                          | 2,00E-03                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-03                                   |
| P1                                                    | B2         | 2       | Sustanza Kimika   | TC1               | 1                          | 2,00E-03                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-03                                   |
| P1                                                    | B3         | 3       | Sustanza Kimika   | TC1               | 1                          | 2,00E-03                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-03                                   |
| P1                                                    | B4         | 1       | Sustanza Kimika   | TC1               | 2                          | 2,00E-04                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-04                                   |
| P1                                                    | B5         | 2       | Sustanza Kimika   | TC1               | 2                          | 2,00E-04                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-04                                   |
| P1                                                    | B6         | 3       | Sustanza Kimika   | TC1               | 2                          | 2,00E-04                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-04                                   |
| P1                                                    | B7         | 1       | Sustanza Kimika   | TC1               | 3                          | 2,00E-05                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-05                                   |
| P1                                                    | B8         | 2       | Sustanza Kimika   | TC1               | 3                          | 2,00E-05                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-05                                   |
| P1                                                    | B9         | 3       | Sustanza Kimika   | TC1               | 3                          | 2,00E-05                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-05                                   |
| P1                                                    | B10        | 1       | Sustanza Kimika   | TC1               | 4                          | 2,00E-06                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-06                                   |
| P1                                                    | B11        | 2       | Sustanza Kimika   | TC1               | 4                          | 2,00E-06                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-06                                   |
| P1                                                    | B12        | 3       | Sustanza Kimika   | TC1               | 4                          | 2,00E-06                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-06                                   |
| P1                                                    | C1         | 1       | Sustanza Kimika   | TC1               | 5                          | 2,00E-07                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-07                                   |
| P1                                                    | C2         | 2       | Sustanza Kimika   | TC1               | 5                          | 2,00E-07                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-07                                   |
| P1                                                    | C3         | 3       | Sustanza Kimika   | TC1               | 5                          | 2,00E-07                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-07                                   |
| P1                                                    | C4         | 1       | Sustanza Kimika   | TC1               | 6                          | 2,00E-08                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-08                                   |
| P1                                                    | C5         | 2       | Sustanza Kimika   | TC1               | 6                          | 2,00E-08                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-08                                   |
| P1                                                    | C6         | 3       | Sustanza Kimika   | TC1               | 6                          | 2,00E-08                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-08                                   |
| P1                                                    | C7         | 1       | Sustanza Kimika   | TC1               | 7                          | 2,00E-09                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-09                                   |
| P1                                                    | C8         | 2       | Sustanza Kimika   | TC1               | 7                          | 2,00E-09                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-09                                   |
| P1                                                    | C9         | 3       | Sustanza Kimika   | TC1               | 7                          | 2,00E-09                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-09                                   |
| P1                                                    | C10        | 1       | Sustanza Kimika   | TC1               | 8                          | 2,00E-10                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-10                                   |
| P1                                                    | C11        | 2       | Sustanza Kimika   | TC1               | 8                          | 2,00E-10                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-10                                   |
| P1                                                    | C12        | 3       | Sustanza Kimika   | TC1               | 8                          | 2,00E-10                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-10                                   |
| P1                                                    | D1         | 1       | Sustanza Kimika   | TC2               | 1                          | 2,00E-03                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-03                                   |
| P1                                                    | D2         | 2       | Sustanza Kimika   | TC2               | 1                          | 2,00E-03                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-03                                   |
| P1                                                    | D3         | 3       | Sustanza Kimika   | TC2               | 1                          | 2,00E-03                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-03                                   |
| P1                                                    | D4         | 1       | Sustanza Kimika   | TC2               | 2                          | 2,00E-04                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-04                                   |
| P1                                                    | D5         | 2       | Sustanza Kimika   | TC2               | 2                          | 2,00E-04                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-04                                   |
| P1                                                    | D6         | 3       | Sustanza Kimika   | TC2               | 2                          | 2,00E-04                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-04                                   |
| P1                                                    | D7         | 1       | Sustanza Kimika   | TC2               | 3                          | 2,00E-05                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-05                                   |
| P1                                                    | D8         | 2       | Sustanza Kimika   | TC2               | 3                          | 2,00E-05                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-05                                   |
| P1                                                    | D9         | 3       | Sustanza Kimika   | TC2               | 3                          | 2,00E-05                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-05                                   |
| P1                                                    | D10        | 1       | Sustanza Kimika   | TC2               | 4                          | 2,00E-06                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-06                                   |
| P1                                                    | D11        | 2       | Sustanza Kimika   | TC2               | 4                          | 2,00E-06                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-06                                   |
| P1                                                    | D12        | 3       | Sustanza Kimika   | TC2               | 4                          | 2,00E-06                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-06                                   |
| P1                                                    | E1         | 1       | Sustanza Kimika   | TC2               | 5                          | 2,00E-07                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-07                                   |
| P1                                                    | E2         | 2       | Sustanza Kimika   | TC2               | 5                          | 2,00E-07                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-07                                   |
| P1                                                    | E3         | 3       | Sustanza Kimika   | TC2               | 5                          | 2,00E-07                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-07                                   |

**Tifsila tal-Bwejrjet tal-Assaġġ tal-Irbit Kompetittiv**

| Pjastra | Pożizzjoni | Replika | Tip ta' bwejra  | Kodiċi tal-Bwejra | Kodiċi tal-Konċentrazzjoni | Konċentrazzjoni Inizjali tal-Kompetitur (M) | Stokk tal-hrER (μL) | Volum tal-Bafer (μL) | Volum tat-Traċċatur (E2) (μL) | Volum tal-pjastra tad-dilwizzjoni (μL) | Volum Finali (μl) | Konċentrazzjoni Finali tal-Kompetitur (M) |
|---------|------------|---------|-----------------|-------------------|----------------------------|---------------------------------------------|---------------------|----------------------|-------------------------------|----------------------------------------|-------------------|-------------------------------------------|
| P1      | E4         | 1       | Sustanza Kimika | TC2               | 6                          | -                                           | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-08                                   |
| P1      | E5         | 2       | Sustanza Kimika | TC2               | 6                          | -                                           | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-08                                   |
| P1      | E6         | 3       | Sustanza Kimika | TC2               | 6                          | -                                           | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-08                                   |
| P1      | E7         | 1       | Sustanza Kimika | TC2               | 7                          | 2,00E-06                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-09                                   |
| P1      | E8         | 2       | Sustanza Kimika | TC2               | 7                          | 2,00E-06                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-09                                   |
| P1      | E9         | 3       | Sustanza Kimika | TC2               | 7                          | 2,00E-06                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-09                                   |
| P1      | E10        | 1       | Sustanza Kimika | TC2               | 8                          | 2,00E-06                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-10                                   |
| P1      | E11        | 2       | Sustanza Kimika | TC2               | 8                          | 2,00E-06                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-10                                   |
| P1      | E12        | 3       | Sustanza Kimika | TC2               | 8                          | 2,00E-06                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-10                                   |
| P1      | F1         | 1       | Sustanza Kimika | TC3               | 1                          | 2,00E-03                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-03                                   |
| P1      | F2         | 2       | Sustanza Kimika | TC3               | 1                          | 2,00E-03                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-03                                   |
| P1      | F3         | 3       | Sustanza Kimika | TC3               | 1                          | 2,00E-03                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-03                                   |
| P1      | F4         | 1       | Sustanza Kimika | TC3               | 2                          | 2,00E-04                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-04                                   |
| P1      | F5         | 2       | Sustanza Kimika | TC3               | 2                          | 2,00E-04                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-04                                   |
| P1      | F6         | 3       | Sustanza Kimika | TC3               | 2                          | 2,00E-04                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-04                                   |
| P1      | F7         | 1       | Sustanza Kimika | TC3               | 3                          | 2,00E-05                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-05                                   |
| P1      | F8         | 2       | Sustanza Kimika | TC3               | 3                          | 2,00E-05                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-05                                   |
| P1      | F9         | 3       | Sustanza Kimika | TC3               | 3                          | 2,00E-05                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-05                                   |
| P1      | F10        | 1       | Sustanza Kimika | TC3               | 4                          | 2,00E-06                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-06                                   |
| P1      | F11        | 2       | Sustanza Kimika | TC3               | 4                          | 2,00E-06                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-06                                   |
| P1      | F12        | 3       | Sustanza Kimika | TC3               | 4                          | 2,00E-06                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-06                                   |
| P1      | G1         | 1       | Sustanza Kimika | TC3               | 5                          | 2,00E-07                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-07                                   |
| P1      | G2         | 2       | Sustanza Kimika | TC3               | 5                          | 2,00E-07                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-07                                   |
| P1      | G3         | 3       | Sustanza Kimika | TC3               | 5                          | 2,00E-07                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-07                                   |
| P1      | G4         | 1       | Sustanza Kimika | TC3               | 6                          | 2,00E-08                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-08                                   |
| P1      | G5         | 2       | Sustanza Kimika | TC3               | 6                          | 2,00E-08                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-08                                   |
| P1      | G6         | 3       | Sustanza Kimika | TC3               | 6                          | 2,00E-08                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-08                                   |
| P1      | G7         | 1       | Sustanza Kimika | TC3               | 7                          | 2,00E-09                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-09                                   |
| P1      | G8         | 2       | Sustanza Kimika | TC3               | 7                          | 2,00E-09                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-09                                   |
| P1      | G9         | 3       | Sustanza Kimika | TC3               | 7                          | 2,00E-09                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-09                                   |
| P1      | G10        | 1       | Sustanza Kimika | TC3               | 8                          | 2,00E-10                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-10                                   |
| P1      | G11        | 2       | Sustanza Kimika | TC3               | 8                          | 2,00E-10                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-10                                   |
| P1      | G12        | 3       | Sustanza Kimika | TC3               | 8                          | 2,00E-10                                    | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               | 1,0E-10                                   |
| P1      | H1         | 1       | noretinodrel    | NE                |                            | IC50                                        | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               |                                           |
| P1      | H2         | 2       | noretinodrel    | NE                |                            | IC50                                        | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               |                                           |
| P1      | H3         | 3       | noretinodrel    | NE                |                            | IC50                                        | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               |                                           |
| P1      | H4         | 1       | noretinodrel    | NE                |                            | 1,00E-4,5                                   | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               |                                           |
| P1      | H5         | 2       | noretinodrel    | NE                |                            | 1,00E-4,5                                   | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               |                                           |
| P1      | H6         | 3       | noretinodrel    | NE                |                            | 1,00E-4,5                                   | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               |                                           |
| P1      | H7         | 1       | E2 kiesah S     |                   |                            | IC50                                        | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               |                                           |
| P1      | H8         | 2       | E2 kiesah S     |                   |                            | IC50                                        | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               |                                           |
| P1      | H9         | 3       | E2 kiesah S     |                   |                            | IC50                                        | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               |                                           |
| P1      | H10        | 1       | E2 kiesah S     |                   |                            | 1,00E-7                                     | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               |                                           |
| P1      | H11        | 2       | E2 kiesah S     |                   |                            | 1,00E-7                                     | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               |                                           |
| P1      | H12        | 3       | E2 kiesah S     |                   |                            | 1,00E-7                                     | 40                  | 0                    | 40                            | 80                                     | 160               |                                           |

### Appendiċi 3

#### **L-ASSAĠĠ TAL-IRBIT TAR-RICETTUR TAL-ESTROĠENU *IN VITRO* BL-UŻU TA' PROTEINA TAD-DOMINJU TAL-IRBIT TAL-LIGAND TAL-ERA RIKOMBINANTI TAL-CHEMICAL EVALUATION AND RESEARCH INSTITUTE (CERI).**

#### **KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET (ARA WKOLL INTRODUZZJONI ĠENERALI)**

1. Dan l-assaġġ *in vitro* tal-irbit tas-saturazzjoni u kompetittiv tar-Ricettur tal-Estroġenu ( $ER\alpha$ ) juża dominju tal-irbit tal-ligand (LBD) tal- $ER\alpha$  uman (hr $ER\alpha$ ). Din il-binja tal-proteina giet prodotta mill-Chemicals Evaluation Research Institute (CERI), fil-Ġappun, u teżisti bħala proteina ta' fużjoni ta' glutatjon-S-transferaži (GST), u hi espressa fl-*E. coli*. Il-protokoll CERI għadda minn studju ta' validazzjoni multilaboratorju internazzjonali (2) li wera r-rilevanza u l-affidabbiltà tiegħu għall-iskop maħsub tal-assaġġ.
2. Dan l-assaġġ hu proċedura ta' skrinjar għall-identifikazzjoni ta' sustanzi li jistgħu jorbtu mal-hr $ER\alpha$ . Jintuża biex jiddetermina l-hila ta' sustanza kimika tat-test li tikkompeti ma' 17 $\beta$ -estradijoli għall-irbit mal-hr $ER\alpha$ -LBD. Ir-risultati kwantitattivi tal-assaġġ jistgħu jinkludu l-IC<sub>50</sub> (kejl tal-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test meħtieġa biex jiġi spostat nofs l-[<sup>3</sup>H]-17 $\beta$ -estradijoli mill-hr $ER\alpha$ ) u l-affinitajiet għall-irbit relattiv tas-sustanzi kimiċi tat-test għall-hr $ER\alpha$  meta mqabbel ma' 17 $\beta$ -estradijoli. Għall-finijiet ta' skrinjar tas-sustanzi kimiċi, ir-risultati kwalitattivi aċċettabbli tal-assaġġ jistgħu jinkludu klassifikazzjonijiet tas-sustanzi kimiċi tat-test bħala leganti tal-hr $ER\alpha$ , mhux leganti, jew ekwivoċi fuq il-bażi tal-kriterji deskritti għall-kurvi tal-irbit.
3. L-assaġġ juża ligand radjuattiv li jeħtieġ liċenzja tal-materjali radjuattivi għal-laboratorju. Il-proċeduri kollha b'radjoisotopi u b'sustanzi kimiċi perikolużi għandhom isegwu r-regolamenti u l-proċeduri deskritti mil-legiżlazzjoni nazzjonali.
4. Għandhom jinqraw “**INTRODUZZJONI ĠENERALI**” u “**KOMPONENTI TAL-ASSAĠĠ TAL-IRBIT TAL-hrER**” qabel ma dan l-assaġġ jintuża għal finijiet regolatorji. Id-definizzjonijiet u l-abbrevjazzjonijiet użati f'din it-TG huma deskritti fl-Appendiċi 1.

#### **PRINĊIPJI TAL-ASSAĠĠ (ARA WKOLL INTRODUZZJONI ĠENERALI)**

5. L-assaġġ tal-irbit tal-hr $ER\alpha$  jkejjel il-hila ta' ligand radjotikkettat ([<sup>3</sup>H]17 $\beta$ -estradijoli) li jorbot mal-ER fil-preżenza ta' konċentrazzjonijiet dejjem akbar ta' sustanza kimika tat-test (jiġifieri kompetitur). Sustanzi kimiċi tat-test li fihom affinità għolja għall-ER jikkompetu

mal-ligand radjotikkettat f'koncentrazzjoni inferjuri meta mqabbla ma' dawk is-sustanzi kimici b'affinità inferjuri għar-riċettur.

6. Dan l-assaġġ jikkonsisti f'żewġ komponenti ewlenin: esperiment ta' rbit tas-saturazzjoni biex jiġu karatterizzati l-parametri ta' interazzjoni riċettur-ligand, segwit minn esperiment tal-irbit kompetittiv li jikkaratterizza l-kompetizzjoni bejn sustanza kimika tat-test u ligand radjotikkettat għall-irbit mal-ER.
7. L-iskop tal-esperiment tal-irbit tas-saturazzjoni hu li jikkaratterizza lott partikolari ta' riċetturi għall-affinità u n-numru tal-irbit bi thejjija għall-esperiment tal-irbit kompetittiv. L-esperiment tal-irbit tas-saturazzjoni jkejjel, taħt kundizzjonijiet ta' ekwilibriju, l-affinità ta' konċentrazzjoni fissa tar-riċettur tal-estrogeni għal-ligand naturali tiegħu (rappreżentat mill-kostanti ta' dissoċjazzjoni,  $K_d$ ), u l-konċentrazzjoni tas-siti attivi tar-riċettur ( $B_{max}$ ).
8. L-esperiment tal-irbit kompetittiv ikejjel l-affinità ta' sustanza biex tikkompeti ma' [ $^3H$ ]17 $\beta$ -estradijoli għall-irbit mal-ER. L-affinità hi kwantifikata mill-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li, f'ekwilibriju, tinibixxi 50 % tal-irbit speċifiku tal-[ $^3H$ ]17 $\beta$ -estradijoli (imsejha l-"konċentrazzjoni inibitorja 50 %" jew  $IC_{50}$ ). Din tista' tiġi evalwata wkoll bl-użu tal-affinità relattiva għall-irbit (RBA, relattiva għall- $IC_{50}$  tal-estradijoli imkejla b'mod separat fl-istess sessjoni). L-esperiment tal-irbit kompetittiv ikejjel l-irbit ta' [ $^3H$ ]17 $\beta$ -estradijoli f'konċentrazzjoni fissa fil-preżenza ta' firxa wiesgħa (tmien ordnijiet ta' kobor) tal-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test. Imbagħad id-*data* tiddaħħal, fejn possibbli, biex tiffurma l-ekwazzjoni ta' Hill (Hill, 1910) li tiddekrivi l-ispostament tar-radjoligand minn legant kompetittiv ta' sit wieħed. Il-firxa tal-ispostament tal-estradijoli radjotikkettat fl-ekwilibriju tintuża biex is-sustanza kimika tat-test tiġi karatterizzata bħala legant, mhux legant, jew waħda li tiġġenera rispons ekwivoku.

## PROCEDURA

### Wiri ta' Prestazzjoni Aċċettabbli tal-Proteina tal-hrER $\alpha$

9. Qabel it-tweġġ ta' rutina tal-assaġġi tal-irbit tas-saturazzjoni u kompetittiv, għandu jintwera li kull lott ġdid tal-hrER $\alpha$  jkollu prestazzjoni korretta fil-laboratorju fejn se jintuża. Għandu jintuża proċess imqassam fuq żewġ stadji biex tintwera l-prestazzjoni. Dawn l-istadji huma dawn li ġejjin:
  - Aghmel assaġġ tal-irbit ta' [ $^3H$ ]-17 $\beta$ -estradijoli tas-saturazzjoni biex turi l-ispeċifità u s-saturazzjoni tal-hrER $\alpha$ . Analizi ta' rigressjoni nonlineari ta' din id-*data* (eż. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) u l-plott Scatchard sussegwenti għandha tiddokumenta l-affinità għall-irbit tal-hrER $\alpha$  ta' [ $^3H$ ]-17 $\beta$ -estradijoli ( $K_d$ ) u n-numru ta' riċetturi ( $B_{max}$ ) għal lott partikolari tal-hrER $\alpha$ .

- Aghmel assaġġ tal-irbit kompetittiv billi tuża s-sustanzi tal-kontroll (estroġenu ta' riferiment (17 $\beta$ -estradiol), legant dgħajjef (eż. noretinodrel jew noretindron), u mhux legant (ottiltrietossilan, OTES). Kull laboratorju għandu jstabilixxi bażi ta' *data* storika biex jiddokumenta l-konsistenza tal-IC50 u tal-valuri rilevanti għall-estroġenu ta' riferiment u għal-legant dgħajjef fost l-esperimenti u l-lottijiet differenti tal-hrER $\alpha$ . Barra minn hekk, il-parametri tal-kurvi tal-irbit kompetittiv għas-sustanzi tal-kontroll għandhom ikunu fi hdan il-limiti tal-intervall ta' kunfidenza ta' 95 % (ara t-Tabella 1) li ġew żviluppati bl-użu tad-*data* mil-laboratorji li haġu sehem fl-istudju ta' validazzjoni għal dan l-assaġġ (2).

**Tabella 1:** Kriterji tal-prestazzjoni żviluppati għall-estrogenu ta' riferiment u għal-legant dghajjef, Assaġġ CERI tal-Irbit tal-hrER.

| Sustanza                 | Parametru           | Medja <sup>a</sup> | Devjazzjoni Standard(n) | Intervall ta' Kunfidenza ta' 95 % <sup>b</sup> |                  |
|--------------------------|---------------------|--------------------|-------------------------|------------------------------------------------|------------------|
|                          |                     |                    |                         | Limitu Inferjuri                               | Limitu Superjuri |
| 17β-estradijoli          | Quċcata             | 104,74             | 13,12 (70)              | 101,6                                          | 107,9            |
|                          | Qiegh               | 0,85               | 2,41 (70)               | 0,28                                           | 1,43             |
|                          | HillSlope           | -1,22              | 0,20 (70)               | -1,27                                          | -1,17            |
|                          | LogIC <sub>50</sub> | -8,93              | 0,23 (70)               | -8,98                                          | -8,87            |
| Noretinodrel             | Quċcata             | 101,31             | 10,55 (68)              | 98,76                                          | 103,90           |
|                          | Qiegh               | 2,39               | 5,01 (68)               | 1,18                                           | 3,60             |
|                          | HillSlope           | -1,04              | 0,21 (68)               | -1,09                                          | -0,99            |
|                          | LogIC <sub>50</sub> | -6,19              | 0,40 (68)               | -6,29                                          | -6,10            |
| Noretindron <sup>c</sup> | Quċcata             | 92,27              | 7,79 (23)               | 88,90                                          | 95,63            |
|                          | Qiegh               | 16,52              | 10,59 (23)              | 11,94                                          | 21,10            |
|                          | Pendil ta' Hill     | -1,18              | 0,32 (23)               | -1,31                                          | -1,04            |
|                          | LogIC <sub>50</sub> | -6,01              | 0,54 (23)               | -6,25                                          | -5,78            |

<sup>a</sup> Medja ± Devjazzjoni Standard (SD) bid-daqs tal-kampjun (n) giet ikkalkolata bl-użu tal-istimi ta' dhul ta' kurva (ekwazzjoni ta' Hill b'erba' parametri) għas-sessjonijiet ta' kontroll imwettqa f'erba' laboratorji matul l-istudju ta' validazzjoni (ara l-Anness N tar-referenza 2).

<sup>b</sup> L-intervalli ta' kunfidenza ta' 95 % huma pprovduti bħala gwida għall-kriterji ta' aċċettabbiltà.

<sup>c</sup> L-ittestjar tan-noretindron kien fakultattiv għas-Subkompitu matul l-istudju ta' validazzjoni (ara r-Referenza 2, ara s-Subkompitu 4). B'hekk, ± SD (n) medji ġew ikkalkolati bl-użu tal-istimi ta' dhul ta' kurva (ekwazzjoni ta' Hill b'erba' parametri) għas-sessjonijiet ta' kontroll imwettqa f'żewġ laboratorji.

Il-medda għall-IC<sub>50</sub> se tkun dipendenti fuq il-Kd tal-preparazzjoni tar-riċettur u l-konċentrazzjoni tal-ligand radjotikkettat użati fi hdan kull laboratorju. Ikun aċċettabbli aġġustament xieraq għall-medda tal-IC<sub>50</sub> fuq il-bażi tal-kundizzjonijiet użati għat-twettiq tal-assaġġ.

## Wiri tal-profiċjenza tal-laboratorju

- Ara l-paragrafi 17 u 18 u t-Tabella 2 f'“**KOMPONENTI TAL-ASSAĠĠ TAL-IRBIT TAL-hrER**” ta' dan il-metodu ta' ttestjar. Kull assaġġ (irbit tas-saturazzjoni u kompetittiv) għandu jikkonsisti fi tliet sessjonijiet indipendenti (jiġifieri b'dilwizzjonijiet friski ta' riċettur, ta' sustanzi kimiċi, u ta' reaġenti) f'jiem differenti, u kull sessjoni għandu jkun fiha tliet repliki.

## Determinazzjoni tal-Konċentrazzjoni tar-Riċettur (hrERα)

- Il-konċentrazzjoni tar-riċettur attiv tvarja ftit skont il-lott u l-kundizzjonijiet tal-hzin. Għalhekk, għandha tiġi determinata l-konċentrazzjoni tar-riċettur attiv kif riċevuta mingħand il-fornitur. Din trendi l-konċentrazzjoni xierqa tar-riċettur attiv fil-hin tas-sessjoni.

12. Skont il-kundizzjonijiet li jikkorrispondu għall-irbit kompetittiv (jiġifieri 0,5 nM [<sup>3</sup>H]-estradijoli), konċentrazzjonijiet nominali ta' riċettur ta' 0,1, ta' 0,2, ta' 0,4, u ta' 0,6 nM għandhom jiġu inkubati fl-assenza (irbit totali) u fil-preżenza (irbit mhux speċifiku ta' 1 μM estradijoli mhux tikkettat. L-irbit speċifiku, ikkalkolat bħala d-differenza tal-irbit totali u mhux speċifiku, jiġi plottjat kontra l-konċentrazzjoni nominali tar-riċettur. Il-konċentrazzjoni tar-riċettur li tagħti valuri tal-irbit speċifiċi li jikkorrispondu għal 40 % tar-radjuantiketta miżjuda hi relatata mal-konċentrazzjoni korrispondenti tar-riċettur, u din il-konċentrazzjoni tar-riċettur għandha tintuża għall-esperimenti tal-irbit tas-saturazzjoni u kompetittiv. Spiss, konċentrazzjoni finali tal-hrER ta' 0,2 nM se tkun konformi ma' din il-kundizzjoni.
13. Jekk il-kriterju ta' 40 % ma jkunx jista' jiġi ssodisfat ripetutament, il-kompożizzjoni tal-esperiment għandha tiġi verifikata għal żbalji potenzjali. Nuqqas ta' lhuq tal-kriterju ta' 40 % jista' jindika li ftit li xejn ikun hemm riċettur attiv fil-lott rikombinanti, u mbagħad ikollu jiġi kkunsidrat l-użu ta' lott ieħor ta' riċettur.

### **Assaġġ tas-saturazzjoni**

14. Tmien konċentrazzjonijiet li jiżdiedu dejjem aktar ta' [<sup>3</sup>H]17β-estradijoli għandhom jiġu evalwati fi triplikati, skont it-tliet kundizzjonijiet li ġejjin (ara t-Tabella 2):
  - a. Fin-nuqqas ta' 17β-estradijoli mhux tikkettat u l-preżenza ta' ER. Din hi d-determinazzjoni tal-irbit totali skont il-kejl tar-radjuattività fil-bwejriet li jkollhom [<sup>3</sup>H]17β-estradijoli biss.
  - b. Fil-preżenza ta' konċentrazzjoni eċċessiva għal 2000 darba ta' 17β-estradijoli mhux tikkettat fuq 17β-estradijoli tikkettat u fil-preżenza tal-ER. L-intenzjoni ta' din il-kundizzjoni hi li tissatura s-siti attivi tal-irbit b'17β-estradijoli mhux tikkettat, u bil-kejl tar-radjuattività fil-bwejriet, tiddetermina l-irbit mhux speċifiku. Kwalunkwe estradijoli jahraq li jifdal li jista' jorbot mar-riċettur jitqies li jkun jorbot ma' sit mhux speċifiku peress li l-estradijoli kiesaħ għandu jkun f'konċentrazzjoni għolja tant li jintrabat mas-siti speċifiċi disponibbli kollha fuq ir-riċettur.
  - c. Fin-nuqqas ta' 17β-estradijoli mhux tikkettat u l-assenza tal-ER (determinazzjoni tar-radjuattività totali)

*Preparazzjoni ta' [<sup>3</sup>H]-17β-estradijoli, ta' soluzzjonijiet ta' 17β-estradijoli mhux tikkettati u tal-hrERα*

15. Soluzzjoni ta' 40 nM ta' [<sup>3</sup>H]-17β-estradijoli għandha tithejja minn soluzzjoni ewlenija ta' 1 μM ta' [<sup>3</sup>H]-17β-estradijoli fid-DMSO billi jiżdiedu DMSO (biex jithejjew 200 nM) u bafer tal-assaġġ f'temperatura ambjentali (biex jithejjew 40 nM). Bl-użu ta' din is-soluzzjoni ta' 40 nM, tithejja s-sensiela ta' dilwizzjonijiet ta' [<sup>3</sup>H]-17β-estradijoli, li jvarjaw minn 0,313

nM sa 40 nM b'bafer tal-assaġġ f' temperatura ambjenatli (kif rappreżentata fil-linja 12 tat-Tabella 2). Il-konċentrazzjonijiet finali tal-assaġġ, li jvarjaw minn 0,0313 sa 4,0 nM jinkisbu billi jiżdiedu 10 µl ta' dawn is-soluzzjonijiet fil-bwejrjet tal-assaġġ rispettivi ta' pjastra għall-mikrotitraġġ b'96 bwejra (ara t-Tabelli 2 u 3), Il-preparazzjoni tal-bafer tal-assaġġ, il-kalkolu tas-soluzzjoni ewlenija originali ta' [<sup>3</sup>H]-17β-estradijoli fuq il-baži tal-attività speċifika tagħha, il-preparazzjoni tad-dilwizzjonijiet u d-determinazzjoni tal-konċentrazzjonijiet huma deskritti fid-dettall fil-protokoll CERI (2).

16. Id-dilwizzjonijiet ta' soluzzjonijiet ta' 17β-estradijoli mhux tikkettat għandhom jithejjew minn soluzzjoni ewlenija ta' 1 nM 17β-estradijoli billi jiżdied bafer tal-assaġġ biex jinkisbu tmien konċentrazzjonijiet waħda akbar mill-oħra li inizjalment iwarjaw bejn 0,625 µM u 80 µM, Il-konċentrazzjonijiet finali tal-assaġġ, li jvarjaw minn 0,0625 sa 8 µM jinkisbu billi jiżdiedu 10 µl ta' dawn is-soluzzjonijiet fil-bwejrjet tal-assaġġ rispettivi ta' pjastra għall-mikrotitraġġ b'96 bwejra dedikata għall-kejl tal-irbit mhux speċifiku (ara t-Tabelli 2 u 3), Il-preparazzjoni tad-dilwizzjonijiet ta' 17β-estradijoli mhux tikkettat hi deskritta fid-dettall fil-protokoll CERI (2).
17. Għandha tintuża l-konċentrazzjoni tar-riċettur li tagħti l-irbit speċifiku ta' 40±10 % (ara l-paragrafi 12-13). Is-soluzzjoni tal-hrERα għandha tithejja b'bafer tal-assaġġ kiesaħ silġ eżatt qabel l-użu, jiġifieri wara li jkunu thejjew il-bwejrjet kollha għall-irbit totali, għall-irbit mhux speċifiku u għall-ligand jahraq waħdu.
18. Il-pjastrji għall-mikrotitraġġ b'96 bwejra jithejjew kif muri fit-Tabella 2, bi 3 repliki għal kull konċentrazzjoni ta' [<sup>3</sup>H]-17β-estradijoli. Assenjament tal-volum ta' [<sup>3</sup>H]-17β-estradijoli, ta' 17β-estradijoli mhux tikkettat, tal-bafer u tar-riċettur hu pprovdut fit-Tabella 3.

**Tabella 2:** Tifsila tal-Pjastra għall-Mikrotitraġġ tal-Assaġġ tal-Irbit tas-Saturazzjoni

|          | 1*                                              | 2* | 3* | 4*                                                            | 5* | 6* | 7*                                           | 8* | 9* | 10 | 11**                                                                  | 12**                                                                   |
|----------|-------------------------------------------------|----|----|---------------------------------------------------------------|----|----|----------------------------------------------|----|----|----|-----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
|          | Għall-kejl tat-TB                               |    |    | Għall-kejl tal-NSB                                            |    |    | Għad-determinazzjoni tal-ligand jahraq waħdu |    |    |    | Dilwizzjonijiet tal-E2 mhux tikkettati għall-kolonni 4-6 tal-pjastrji | Dilwizzjonijiet ta' [ <sup>3</sup> H]E2 għall-kolonni 1-9 tal-pjastrji |
| <b>A</b> | 0,0313 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER |    |    | 0,0313 nM [3H] E <sub>2</sub> + 0,0625 µM E <sub>2</sub> + ER |    |    | 0,0313 nM                                    |    |    |    | 0,625 µM                                                              | 0,313 nM                                                               |
| <b>B</b> | 0,0625 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER |    |    | 0,0625 nM [3H] E <sub>2</sub> + 0,125 µM E <sub>2</sub> + ER  |    |    | 0,0625 nM                                    |    |    |    | 1,25 µM                                                               | 0,625 nM                                                               |
| <b>C</b> | 30,125 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER |    |    | 0,125 nM [3H] E <sub>2</sub> + 0,25 µM E <sub>2</sub> + ER    |    |    | 0,125 nM                                     |    |    |    | 2,5 µM                                                                | 1,25 nM                                                                |
| <b>D</b> | 0,250 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER  |    |    | 0,250 nM [3H] E <sub>2</sub> + 0,5 µM E <sub>2</sub> + ER     |    |    | 0,250 nM                                     |    |    |    | 5 µM                                                                  | 2,5 nM                                                                 |



|          |                                                  |                                                                           |         |  |       |       |
|----------|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|---------|--|-------|-------|
| <b>E</b> | 0,50 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub><br>+ ER | 0,50 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub><br>+ 1 μM E <sub>2</sub><br>+ ER | 0,50 nM |  | 10 μM | 5 nM  |
| <b>F</b> | 1,00 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub><br>+ ER | 1,00 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub><br>+ 2 μM E <sub>2</sub><br>+ ER | 1,00 nM |  | 20 μM | 10 nM |
| <b>G</b> | 2,00 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub><br>+ ER | 2,00 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub><br>+ 4 μM E <sub>2</sub><br>+ ER | 2,00 nM |  | 40 μM | 20 nM |
| <b>H</b> | 4,00 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub><br>+ ER | 4,00 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub><br>+ 8 μM E <sub>2</sub><br>+ ER | 4,00 nM |  | 80 μM | 40 nM |

TB: irbit totali,

NSB: irbit mhux speċifiku

[<sup>3</sup>H] E<sub>2</sub>: [<sup>3</sup>H]17β-estradiol

E<sub>2</sub>: 17β-estradiol mhux tikkettat

\*Il-konċentrazzjonijiet indikati hawn huma l-konċentrazzjonijiet finali f'kull bwejra.

\*\*Id-dilwizzjonijiet ta' E<sub>2</sub> u ta' [<sup>3</sup>H]E<sub>2</sub> mhux tikkettati jistghu jithejjew fi pjastra differenti.

**Tabella 3:** Volumi tar-Reagent għall-Pjastra għall-Mikrotitraġġ tas-Saturazzjoni

| Numru tal-Linja                                                                |                                             | 1                                                | 2 | 3 | 4                | 5 | 6 | 7*                                                                               | 8* | 9* |
|--------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|--------------------------------------------------|---|---|------------------|---|---|----------------------------------------------------------------------------------|----|----|
| Stadji tal-Preparazzjoni                                                       |                                             | Bwejriet tat-TB                                  |   |   | Bwejriet tal-NSB |   |   | Ligand Jahraq                                                                    |    |    |
| Volum tal-komponenti għall-bwejriet ta' reazzjoni ta' fuq u l-ordni għaž-żieda | Bafer                                       | 60 µl                                            |   |   | 50 µl            |   |   | 90 µl                                                                            |    |    |
|                                                                                | E2 mhux tikkettat mil-linja 11 fit-Tabella2 | -                                                |   |   | 10 µl            |   |   | -                                                                                |    |    |
|                                                                                | [3H]E2 mil-linja12 fit-Tabella2             | 10 µl                                            |   |   | 10 µl            |   |   | 10 µl                                                                            |    |    |
|                                                                                | hrERα                                       | 30 µl                                            |   |   | 30 µl            |   |   | -                                                                                |    |    |
| Volum ta' reazzjoni totali                                                     |                                             | 100 µl                                           |   |   | 100 µl           |   |   | 100 µl                                                                           |    |    |
| Inkubazzjoni                                                                   |                                             | WARA REAZZJONI TA' INKUBAZZJONI TA' SAGHTEJN (2) |   |   |                  |   |   | Kwantifikazzjoni tar-radjuattività eżatt wara l-preparazzjoni. Ebda inkubazzjoni |    |    |
| Trattament b'0,4 % DCC                                                         |                                             | Iva                                              |   |   | Iva              |   |   | Nru                                                                              |    |    |
| Volum ta' 0,4 % DCC                                                            |                                             | 100 µl                                           |   |   | 100 µl           |   |   | -                                                                                |    |    |
| Filtrazzjoni                                                                   |                                             | Iva                                              |   |   | Iva              |   |   | Nru                                                                              |    |    |
| KEJL TAD-DPMS                                                                  |                                             |                                                  |   |   |                  |   |   |                                                                                  |    |    |
| Volum tal-kwantifikazzjoni miżjud mat-taħlita ta' xintillazzjoni               |                                             | 100 µl**                                         |   |   | 100 µl**         |   |   | 50 µl                                                                            |    |    |

\* Jekk tintuża LSC għall-mikropjastru għall-kejl tad-dpms, it-thejjija tal-ligand jahraq wahdu fl-istess pjastra tal-assaġġ tal-bwejriet tat-TB u tal-NSB ma tkunx adattata. Il-ligand jahraq wahdu ma għandux jithejja fi pjastra differenti.

\*\* Jekk tintuża ċ-ċentrifugrazzjoni għas-separazzjoni tad-DCC, il-50 µl tas-supernatant għandhom jitkejlu bl-LSC biex tiġi evitata kontaminazzjoni tad-DCC.

19. Pjastri għall-mikrotitraġġ tal-assaġġ għad-determinazzjoni tal-irbit totali u tal-irbit mhux speċifiku għandhom jiġu inkubati f'temperatura ambjentali (22°C sa 28°C) għal sagħtejn.

#### *Kejl ta' [<sup>3</sup>H]-17β-Estradjol marbut mal-hrERα*

20. Wara l-perjodu ta' inkubazzjoni ta' sagħtejn, [<sup>3</sup>H]-17β-Estradjol marbut mal-hrERα għandu jiġi separat minn [<sup>3</sup>H]-17β-Estradjol hieles billi tiżdied sospensjoni ta' 100µl 0,4 % DCC kiesaħ silġ fil-bwejriet. Imbagħad il-pjastri għandhom jitqiegħdu fuq is-silġ għal 10 minuti u t-taħlita ta' reazzjoni u s-sospensjoni ta' DCC għandhom jiġu ffiltrati, bi trasferiment f'filtru tal-pjastri għall-mikrotitraġġ, biex jitneħħa d-DCC. Imbagħad għandhom jiżdiedu 100 µl tal-filtrat mal-fluwidu ta' xintillazzjoni fil-kunjetti tal-LSC għad-determinazzjoni tad-disintegrazzjoni fil-minuta (dpms) għal kull kunjett bl-għadd tax-xintillazzjoni tal-likwidi.
21. Inkella, jekk ma jkunx hemm filtru tal-mikropjastri disponibbli, it-tneħħija tad-DCC tista' tinkiseb b'ċentrifugrazzjoni. Imbagħad 50 µl supernatant li fih [<sup>3</sup>H]-17β-estradjol marbut mal-hrERα għandu jittiehed b'attenzjoni estrema, biex tiġi evitata kwalunkwe kontaminazzjoni tal-bwejriet bil-mess tad-DCC, u għandu jintuża għall-għadd tax-xintillazzjoni.
22. Il-kundizzjoni tal-ligand jahraq waħdu tintuża għad-determinazzjoni tad-diżintegrazzjoni fil-minuta (dpm) ta' [<sup>3</sup>H]-17β-estradjol miżjud fil-bwejriet tal-assaġġ. Ir-radjuattività għandha tiġi kwantifikata eżatt wara l-preparazzjoni. Dawn il-bwejriet ma għandhomx jiġu inkubati u ma għandhomx jiġu ttrattati b'sospensjoni tad-DCC iżda l-kontenut tagħhom għandu jitwassal direttament fil-fluwidu tax-xintillazzjoni. Dawn il-miżuri juru kemm [<sup>3</sup>H]-17β-estradjol f'dpms żdied ma' kull sett ta' bwejriet għall-irbit totali u għall-irbit mhux speċifiku.

#### **Assaġġ tal-irbit kompetittiv**

23. L-assaġġ tal-irbit kompetittiv ikejjel l-irbit ta' konċentrazzjoni waħda ta' [<sup>3</sup>H]-17β-estradjol fil-preżenza ta' konċentrazzjonijiet dejjem akbar ta' sustanza kimika tat-test. Għandhom jintużaw tliet repliki konkorrenti f'kull konċentrazzjoni fi hdan sessjoni waħda. Barra minn hekk, għandhom isiru tliet sessjonijiet mhux konkorrenti għal kull sustanza kimika ttestjata. L-assaġġ għandu jsir fi pjastra waħda jew aktar għall-mikrotitraġġ b'96 bwejra.

#### *Kontrolli*

24. Meta jsir l-assaġġ, is-solvent u l-kontrolli konkorrenti (jiġifieri l-estrogenu referenzjarju, il-legant dgħajjef, u dak mhux legant) għandhom ikunu inklużi f'kull esperiment. Kurvi shaħ ta' konċentrazzjoni għall-estrogenu u għall-kontrolli ta' riferiment (jiġifieri legant dgħajjef

u mhux legant) għandhom jintużaw fi pjastra waħda matul kull sessjoni. Il-pjastri l-oħra kollha għandu jkun fihom (i) konċentrazzjoni għolja (spostament massimu, jiġifieri bejn wiehied u iehor spostament sħiħ tal-ligand radjotikkettat) u medja (bejn wiehied u iehor  $IC_{50}$ ) ta' E2 u ta' legant dgħajjef fi triplikati; (ii) kontroll b'solvent u irbit mhux speċifiku, kull wiehied fi triplikati. Il-proċeduri għat-thejjija tal-bafer tal-assaġġ, ta' [ $^3H$ ]-17 $\beta$ -estradijoli, ta' hrER $\alpha$  u tas-soluzzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test huma deskritti fil-fond fil-protokoll CERI (2).

#### *Kontrolli tas-solvent:*

25. Il-kontroll b'solvent jindika li s-solvent ma jinteraġixx mas-sistema tat-test u jkejje l-irbit totali (TB). DMSO hu s-solvent preferut. Inkella, jekk l-ogħla konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test ma tkunx solubbli fid-DMSO, jista' jintuża l-etanol. Il-konċentrazzjoni tad-DMSO fil-bwejriet tal-assaġġ finali għandha tkun ta' 2,05 % u tista' tiżdied sa 2,5 % fil-każ ta' nuqqas ta' solubbiltà tas-sustanza kimika tat-test. Konċentrazzjonijiet ta' DMSO oghla minn 2,5 % ma għandhomx jintużaw minhabba l-interferenza ta' konċentrazzjonijiet oghla tas-solvent mal-assaġġ. Għal sustanzi kimiċi tat-test li ma jkunux solubbli fid-DMSO, izda solubbli fl-etanol, jista' jintuża massimu ta' 2 % etanol fl-assaġġ mingħajr interferenza.

#### *Kontroll bil-bafer:*

26. Il-kontroll bil-bafer (BC) la għandu jkun fih solvent u lanqas is-sustanza kimika tat-test, izda għandu jkun fih il-komponenti l-oħra kollha tal-assaġġ. Ir-riżultati tal-kontroll bil-bafer jittqabblu mal-kontroll b'solvent biex jiġi verifikat li s-solvent użat ma jaffettwax is-sistema tal-assaġġ.

#### *Legant b'saħħtu (estroġenu ta' riferiment)*

27. 17 $\beta$ -estradijoli (CAS 50-28-2) hu l-ligand endoġenu u jorbot b'affinità għolja mal-ER, subtip tal-alfa. Kurva standard li tuża 17 $\beta$ -estradijoli mhux tikkettat għandha tithejja għal kull assaġġ tal-irbit kompetittiv tal-hrER $\alpha$ , biex tkun tista' ssir valutazzjoni tal-varjabbiltà meta jsir l-assaġġ maż-żmien fi hdan l-istess laboratorju. Tmien soluzzjonijiet ta' 17 $\beta$ -estradijoli mhux tikkettat għandhom jithejjew fid-DMSO u f'bafer tal-assaġġ, b'konċentrazzjonijiet finali fil-bwejriet tal-assaġġ li għandhom jintużaw għall-kurva standard imqasma kif ġej:  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-8,5}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-9,5}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-11}$  M. L-ogħla konċentrazzjoni ta' 17 $\beta$ -estradijoli (1  $\mu$ M) mhux tikkettat għandha sservi bħala l-indikatur tal-irbit mhux speċifiku. Din il-konċentrazzjoni hi distinta bit-tikketta "NSB" fit-Tabella 4 għalkemm hi wkoll parti mill-kurva standard.

#### *Legant dgħajjef*

28. Legant dgħajjef (noretinodrel (CAS68-23-5), jew inkella, noretindron (CAS 68-22-4)) għandu jkun inkluz biex tintwera s-sensittività ta' kull esperiment u tkun tista' ssir

valutazzjoni tal-varjabbiltà meta jsir l-assaġġ maż-żmien. Tmien soluzzjonijiet tal-legant dghajjef għandhom jithejjew fid-DMSO u f'bafer tal-assaġġ, b'konċentrazzjonijiet finali fil-bwejrjet tal-assaġġ kif ġej:  $10^{-4,5}$ ,  $10^{-5,5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-6,5}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-7,5}$ ,  $10^{-8}$  u  $10^{-9}$  M.

#### *Mhux legant*

29. L-ottitrietossisilan (OTES, CAS 2943-75-1) għandu jintuża bħala l-kontroll negattiv (mhux legant). Dan jipprovi garanzija li l-assaġġ kif imwettaq isib sustanzi kimiċi tat-test li ma jorbtux mal-hrER $\alpha$ . Tmien soluzzjonijiet tal-mhux legant għandhom jithejjew fid-DMSO u f'bafer tal-assaġġ, b'konċentrazzjonijiet finali fil-bwejrjet tal-assaġġ kif ġej:  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$  M. Il-ftalat tad-di-n-butyl (DBP, CAS 84-72-2) jista' jintuża bħala mhux legant alternattiv, iżda jiġi ttestjat sa  $10^{-4}$ M biss. Is-solubbiltà massima ta' DBP fl-assaġġ intweriet li hi  $10^{-4}$ M.

#### *Konċentrazzjoni tal-hrER $\alpha$*

30. Għandu jintuża l-ammont tar-riċettur li jagħti l-irbit speċifiku ta'  $40 \pm 10$  % (ara l-paragrafi 12-13 tal-Appendiċi 3). Is-soluzzjoni ta' hrER $\alpha$  għandha tithejja b'dilwizzjoni tal-hrER $\alpha$  funzjonali f'bafer tal-assaġġ kiesah silġ, eżatt qabel l-użu.

#### *[ $^3$ H]-17 $\beta$ -estradijoli*

31. Il-konċentrazzjoni finali ta' [ $^3$ H]-17 $\beta$ -estradijoli fil-bwejrjet tal-assaġġ għandha tkun ta' 0,5 nM.

#### *Sustanzi Kimiċi tat-Test*

32. L-ewwel nett, hemm bżonn li jsir test tas-solubbiltà biex jiġi determinat il-limitu tas-solubbiltà għal kull sustanza kimika tat-test u biex tiġi identifikata l-medda ta' konċentrazzjoni xierqa li għandha tintuża meta jsir il-protokoll tat-test. Il-limitu tas-solubbiltà ta' kull sustanza kimika tat-test għandu jiġi determinat inizjalment fis-solvent u mbagħad jiġi kkonfermat b'mod ulterjuri fil-kundizzjonijiet tal-assaġġ. Il-konċentrazzjoni finali ttestjata fl-assaġġ ma għandhiex taqbeż il-1mM. L-ittestjar għas-sejbien tal-medda jinkludi kontroll b'solvent flimkien ma' tal-anqas tmien dilwizzjonijiet serjali tal-log, li jibdwu bil-konċentrazzjoni massima aċċettabbli (eż. 1 mM jew anqas, fuq il-bażi tal-limitu tas-solubbiltà), u l-preżenza ta' dardir jew ta' preċipitat innotat (ara wkoll il-paragrafu 35 tal-Appendiċi 3). Ladarba tiġi determinata l-medda ta' konċentrazzjonijiet, sustanza kimika tat-test għandha tiġi ttestjata bl-użu ta' tmien konċentrazzjonijiet tal-log spazjati kif xieraq kif definit fit-test preċedenti tas-sejbien tal-medda. Il-konċentrazzjonijiet ittestjati fit-tieni u fit-tielet esperimenti għandhom jiġu aġġustati ulterjorment kif xieraq biex tiġi karatterizzata aħjar il-kurva konċentrazzjoni rispons, jekk ikun hemm bżonn.
33. Id-dilwizzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test għandhom jithejjew fis-solvent xieraq (ara l-paragrafu 25 tal-Appendiċi 3). Jekk l-oġġla konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test ma tkunx solubbli fid-DMSO jew fl-etanol, u ż-żieda ta' aktar solvent tkun tirriżulta

f'konċentrazzjoni tas-solvent oġġla mil-limitu aċċettabbli fit-tubu finali, l-oġġla konċentrazzjoni tista' titnaqqas għall-anqas konċentrazzjoni li jmiss. F'dan il-każ, konċentrazzjoni addizzjonali tista' tiżdied fil-limitu inferjuri tas-serje ta' konċentrazzjonijiet. Konċentrazzjonijiet oħra fis-serje għandhom jibqgħu l-istess.

34. Is-soluzzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test għandhom jiġu ssorveljati bir-reqqa meta jiżdiedu mal-bwejra tal-assaġġ, peress li s-sustanza kimika tat-test tista' tfur barra maż-żieda fil-bwejra tal-assaġġ. Id-*data* għall-bwejriet kollha li fihom il-preċipitat għandha tkun eskluża mid-dhul ta' kurva, u r-raġuni għall-eskluzjoni tad-*data* għandha tiġi nnotata.
35. Jekk hemm informazzjoni eżistenti preċedenti minn sorsi oħra li jipprovdu  $\log(\text{IC}_{50})$  ta' sustanza kimika tat-test, jista' jkun xieraq li d-dilwizzjonijiet jitqassmu ġeometrikament aktar qrib tal- $\log(\text{IC}_{50})$  mistenni (jiġifieri 0,5 unitajiet tal-log). Ir-riżultati finali għandhom juru biżżejjed tiffrix tal-konċentrazzjonijiet fuq iż-żewġ naħat tal- $\log(\text{IC}_{50})$ , inklużi l-“quċċata” u l-“qiegħ”, b'tali mod li l-kurva tal-irbit tkun tista' tiġi karatterizzata b'mod adegwat.

#### *Organizzazzjoni tal-pjastra tal-assaġġ*

36. Il-pjastru għall-mikrotitraġġ tikkettatti għandhom jithejjew bl-użu ta' inkubazzjonijiet sestupli għall-kontroll b'solvent, bl-oġġla konċentrazzjoni tal-estrogenu referenzjarju (E2) li sservi wkoll bħala l-indikatur tal-irbit mhux speċifiku (NSB), bil-kontroll b'bafer, bit-tmien konċentrazzjonijiet tal-kontroll li ma jorbotx (ottiltrietossisilan), bis-seba' konċentrazzjonijiet inferjuri għall-estrogenu referenzjarju (E2), bit-tmien konċentrazzjonijiet tal-legant dgħajef (noretinodrel jew noretindron), u bit-tmien konċentrazzjonijiet ta' kull sustanza kimika tat-test (TC). Tifsila indikattiva tad-dijagramma tat-tifsila tal-pjastra għall-kurvi shah tal-konċentrazzjoni għall-estrogenu u għall-kontrolli referenzjarji hi mogħtija hawn taħt fit-Tabella 4. Jintużaw pjastru addizzjonali għall-mikrotitraġġ għas-sustanza kimika tat-test u dawn għandu jkun fihom kontrolli tal-pjastra (jiġifieri (i) konċentrazzjoni għolja (spostament massimu) u medja (madwar l- $\text{IC}_{50}$ ) ta' E2 u legant dgħajef fi triplikati; ii) kontroll b'solvent (bħala rbit totali) u irbit mhux speċifiku, kull wiehied f'sestuplu (Tabella 5). Eżempju ta' worksheet tat-tifsila tal-pjastra għall-mikrotitraġġ tal-assaġġ kompetittiv bl-użu ta' tliet sustanzi kimiċi tat-test mhux magħrufa hu pprovdut fl-Appendiċi 3.3. Il-konċentrazzjonijiet indikati fil-worksheet kif ukoll fit-Tabelli 4 u 5 jirreferu għall-konċentrazzjonijiet finali użati f'kull bwejra tal-assaġġ. Il-konċentrazzjoni massima għall-E2 għandha tkun ta'  $1 \times 10^{-7}$  M u għal-legant dgħajef għandha tintuża l-oġġla konċentrazzjoni użata għal-legant dgħajef fil-pjastra 1. Il-konċentrazzjoni tal- $\text{IC}_{50}$  trid tiġi determinata mil-laboratorju fuq il-baži tal-baži ta' *data* tal-kontroll storiku tiegħu. L-aspettattiva hi li dan il-valur ikun simili għal dak osservat fl-istudji ta' validazzjoni (ara t-tabella 1).

**Tabella 4:** Tifsila tal-Pjastra għall-Mikrotitraġġ tal-Assaġġ tal-Irbit Kompetittiv<sup>1,2</sup>, Kurvi Shah ta' Konċentrazzjoni għal Estrogenu u għal Kontrolli Referenzjarji (Pjastra 1)

|   | 1                                              | 2 | 3 | 4                                   | 5 | 6 | 7                           | 8 | 9 | 10                                       | 11 | 12 |
|---|------------------------------------------------|---|---|-------------------------------------|---|---|-----------------------------|---|---|------------------------------------------|----|----|
|   | Kontroll bil-Bafer u<br>Kontroll Pożittiv (E2) |   |   | Pożittiv Dghajjef<br>(Noretinodrel) |   |   | Kontroll Negattiv<br>(OTES) |   |   | TB u NSB                                 |    |    |
| A | Inbjank*                                       |   |   | 1×10 <sup>-9</sup> M                |   |   | 1×10 <sup>-10</sup> M       |   |   | TB (kontroll b’solvent)<br>(2,05 % DMSO) |    |    |
| B | E2 (1×10 <sup>-11</sup> M)                     |   |   | 1×10 <sup>-8</sup> M                |   |   | 1×10 <sup>-9</sup> M        |   |   |                                          |    |    |
| C | E2 (1×10 <sup>-10</sup> M)                     |   |   | 1×10 <sup>-7,5</sup> M              |   |   | 1×10 <sup>-8</sup> M        |   |   | NSB (10 <sup>-6</sup> M E2)              |    |    |
| D | E2 (1×10 <sup>-9,5</sup> M)                    |   |   | 1×10 <sup>-7</sup> M                |   |   | 1×10 <sup>-7</sup> M        |   |   |                                          |    |    |
| E | E2 (1×10 <sup>-9</sup> M)                      |   |   | 1×10 <sup>-6,5</sup> M              |   |   | 1×10 <sup>-6</sup> M        |   |   | Kontroll bil-bafer                       |    |    |
| F | E2 (1×10 <sup>-8,5</sup> M)                    |   |   | 1×10 <sup>-6</sup> M                |   |   | 1×10 <sup>-5</sup> M        |   |   |                                          |    |    |
| G | E2 (1×10 <sup>-8</sup> M)                      |   |   | 1×10 <sup>-5,5</sup> M              |   |   | 1×10 <sup>-4</sup> M        |   |   | Inbjank (għal dak<br>jahraq)**           |    |    |
| H | E2 (1×10 <sup>-7</sup> M)                      |   |   | 1×10 <sup>-4,5</sup> M              |   |   | 1×10 <sup>-3</sup> M        |   |   |                                          |    |    |

<sup>1</sup> Kampjun stabbilit għall-pjastra għall-mikrotitraġġ tal-istandards li għandu jithaddem ma' kull esperiment.

<sup>2</sup> Kun af li din il-pjastra għall-mikrotitraġġ issir bl-użu tad-dilwizzjonijiet magħmula fil-pjastra tad-dilwizzjoni deskritta għall-istandards fit-taqsimiet preċedenti.

F'dan l-eżempju, il-legant dghajjef hu noretinodrel (NE)

\* inbjank veru, bwejra mhux użata

\*\* inbjank mhux użat matul l-inkubazzjoni, iżda użat biex tiġi kkonfermata r-radjuattività totali miżjuda.

**Tabella 5:** Tifsila tal-Pjastra għall-Mikrotitraġġ tal-Assaġġ tal-Irbid Kompetittiv, Pjastri Addizzjonali għas-Sustanzi Kimiċi tat-Test (TC) u għall-Kontrolli tal-Pjastri.

|          | 1                                     | 2 | 3 | 4                                     | 5 | 6 | 7                                     | 8 | 9 | 10                                 | 11 | 12 |
|----------|---------------------------------------|---|---|---------------------------------------|---|---|---------------------------------------|---|---|------------------------------------|----|----|
|          | Sustanza Kimika tat-<br>Test-1 (TC-1) |   |   | Sustanza Kimika tat-<br>Test-2 (TC-2) |   |   | Sustanza Kimika tat-<br>Test-3 (TC-3) |   |   | Kontrolli                          |    |    |
| <i>A</i> | TC-1 (1×10 <sup>-10</sup> M)          |   |   | TC-2 (1×10 <sup>-10</sup> M)          |   |   | TC-3 (1×10 <sup>-10</sup> M)          |   |   | E2 (1×10 <sup>-7</sup> M)          |    |    |
| <i>B</i> | TC-1 (1×10 <sup>-9</sup> M)           |   |   | TC-2 (1×10 <sup>-9</sup> M)           |   |   | TC-3 (1×10 <sup>-9</sup> M)           |   |   | E <sub>2</sub> (IC <sub>50</sub> ) |    |    |
| <i>C</i> | TC-1 (1×10 <sup>-8</sup> M)           |   |   | TC-2 (1×10 <sup>-8</sup> M)           |   |   | TC-3 (1×10 <sup>-8</sup> M)           |   |   | NE (1×10 <sup>-4.5</sup> M)        |    |    |
| <i>D</i> | TC-1 (1×10 <sup>-7</sup> M)           |   |   | TC-2 (1×10 <sup>-7</sup> M)           |   |   | TC-3 (1×10 <sup>-7</sup> M)           |   |   | NE (IC <sub>50</sub> )             |    |    |
| <i>E</i> | TC-1 (1×10 <sup>-6</sup> M)           |   |   | TC-2 (1×10 <sup>-6</sup> M)           |   |   | TC-3 (1×10 <sup>-6</sup> M)           |   |   | NSB (10 <sup>-6</sup> M E2)        |    |    |
| <i>F</i> | TC-1 (1×10 <sup>-5</sup> M)           |   |   | TC-2 (1×10 <sup>-5</sup> M)           |   |   | TC-3 (1×10 <sup>-5</sup> M)           |   |   |                                    |    |    |
| <i>G</i> | TC-1 (1×10 <sup>-4</sup> M)           |   |   | TC-2 (1×10 <sup>-4</sup> M)           |   |   | TC-3 (1×10 <sup>-4</sup> M)           |   |   | TB (Kontroll b'solvent)            |    |    |

| <i>H</i> | TC-1 ( $1 \times 10^{-3}$ M) | TC-2 ( $1 \times 10^{-3}$ M) | TC-3 ( $1 \times 10^{-3}$ M) |  |
|----------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|--|
|----------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|--|

F'dan l-eżempju, il-legant dgħajjef hu noretinodrel (NE)

#### *Tlestija tal-assaġġ tal-irbit kompetittiv*

37. Bwejriet tal-eċċezzjonar għall-irbit totali u inbjanki (għall-jaħarqu), kif murija fit-Tabella 6, 50  $\mu$ l tal-bafer tal-assaġġ għandhom jitqiegħdu f'kull bwejra, u għandhom jithalltu ma' 10  $\mu$ l kontroll b'solvent, estroġenu referenzjarju (E2), legant dgħajjef, mhux legant, u sustanzi kimiċi tat-test, rispettivament, 10  $\mu$ l ta' soluzzjoni ta' 5 nM [ $^3$ H]-17 $\beta$ -estradijoli. Imbagħad, soluzzjoni ta' 30  $\mu$ l riċettur kiesaħ silġ iddaħħlet f'kull pjastra u thalltet bil-galbu. Is-soluzzjoni tal-hrER $\alpha$  għandha tkun l-aħhar reagent mizjud. Il-pjastri għall-mikrotitraġġ tal-assaġġ għandhom jiġu inkubati f'temperatura ambjentali (22° sa 28°C) għal sagħtejn (2).

**Tabella 6:** Volum tal-Komponenti tal-Assaġġ għall-Assaġġ tal-Irbit Kompetittiv tal-hrER, Pjastri għall-Mikrotitraġġ

| <i>Stadji tat-Thejjiġa tan-Numru tal-Linja</i>                                 |                                                                                                      | Għajr bwejriet tat-TB | Bwejriet tat-TB | Inbjank (għal dak jahraq) |
|--------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|-----------------|---------------------------|
| Volum tal-komponenti għall-bwejriet ta' reazzjoni ta' fuq u l-ordni għaż-żieda | Bafer tal-assaġġ f'Temperatura Ambjentali                                                            | 50 $\mu$ l            | 60 $\mu$ l      | 90 $\mu$ l                |
|                                                                                | E2 mhux tikkettat, legant dgħajjef, mhux legant, solvent u sustanzi kimiċi tat-test*                 | 10 $\mu$ l            | -               | -                         |
|                                                                                | [ $^3$ H]-17 $\beta$ -estradijoli għall-kisba tal-konċentrazzjoni finali ta' 0,5 nM (jiġifieri 5 nM) | 10 $\mu$ l            | 10 $\mu$ l      | 10 $\mu$ l                |
|                                                                                | konċentrazzjoni tal-hrER $\alpha$ kif determinata (ara l-paragrafi 12-13)                            | 30 $\mu$ l            | 30 $\mu$ l      | -                         |
| Volum totali f'kull bwejra tal-assaġġ                                          |                                                                                                      | 100 $\mu$ l           | 100 $\mu$ l     | 100 $\mu$ l               |

\*imhejjija kif xieraq biex tinkiseb konċentrazzjoni finali fi hdan il-konċentrazzjoni aċċettabbli tas-solvent

38. Imbagħad għandha ssir il-kwantifikazzjoni ta' [ $^3$ H]-17 $\beta$ -Estradijoli marbut mal-hrER $\alpha$ , wara separazzjoni ta' [ $^3$ H]-17 $\beta$ -Estradijoli marbut mal-hrER $\alpha$  minn [ $^3$ H]-17 $\beta$ -Estradijoli hieles billi tizzied sospensjoni ta' 100  $\mu$ l DCC kiesaħ silġ f'kull bwejra, kif deskritt fil-paragrafi 21-23 tal-Appendiċi 3 għall-assaġġ tal-irbit tas-saturazzjoni.
39. Il-bwejriet G10-12 u H10-12 (identifikati bħala inbjank (għal dawk jaharqu) fit-Tabella 4) jirrappreżentaw id-dpms tal-estradijoli tikkettat [ $^3$ H] f'10  $\mu$ l. L-alikwota ta' 10  $\mu$ l għandha titwassal direttament fil-fluwidu ta' xintillazzjoni.

#### **Kriterji ta' aċċettabbiltà**

##### *Assaġġ tal-irbit tas-saturazzjoni*

40. Il-kurva tal-irbit speċifiku għandha tilhaq plateau hekk kif jintużaw konċentrazzjonijiet dejjem akbar ta' [ $^3$ H]-17 $\beta$ -estradijoli, li tindika saturazzjoni tal-hrER $\alpha$  bil-ligand.

41. Il-ligand speċifiku f'0,5 nM [<sup>3</sup>H]-17β-estradijoli għandu jkun ġewwa l-medda aċċettabbli ta' 30 % sa 50 % tar-radjuattività totali mkejla medja miżjuda fis-sessjonijiet. Hruġ haċif okkażjonali barra minn din il-medda hu aċċettabbli, iżda jekk is-sessjonijiet ikunu konsistentement barra din il-medda jew medda partikolari tkun ferm barra din il-medda, il-konċentrazzjoni tal-proteina għandha tiġi aġġustata u l-assaġġ tas-saturazzjoni għandu jerga' jsir.
42. Id-*data* għandha tipproduċi plott Scatchard lineari.
43. L-irbit mhux speċifiku ma għandux ikun eċċessiv. Il-valur għall-irbit mhux speċifiku tipikament għandu jkun ta' <35 % tal-irbit totali. Madankollu, il-proporzjon jista' kultant jaqbez dan il-limitu meta titkejjel dpm baxxa haċfa għall-anqas konċentrazzjoni ta' 17β-estradijoli radjotikkettat ittestjat.

#### *Assaġġ tal-irbit kompetittiv*

44. Konċentrazzjonijiet dejjem akbar ta' 17β-estradijoli mhux tikkettat għandhom jispostaw [<sup>3</sup>H]-17β-estradijoli mir-riċettur b'mod konsistenti b'irbit kompetittiv f'sit wiehed.
45. Il-valur tal-IC<sub>50</sub> għall-estrogeni ta' riferiment (jiġifieri 17β-estradijoli) għandu jkun bejn wiehed u iehor daqs il-konċentrazzjoni molar ta' [<sup>3</sup>H]-17β-estradijoli flimkien ma' K<sub>d</sub> determinat mill-assaġġ tal-irbit tas-saturazzjoni.
46. L-irbit speċifiku totali għandu jkun konsistentement fi hdan il-medda aċċettabbli ta' 40 ± 10 % meta l-konċentrazzjoni mkejla medja tar-radjuattività totali miżjuda f'kull bwejra tkun ta' 0,5 nM fis-sessjonijiet. Hruġ haċif okkażjonali barra minn din il-medda hu aċċettabbli, iżda jekk is-sessjonijiet ikunu konsistentement barra din il-medda jew medda partikolari tkun ferm barra din il-medda, il-konċentrazzjoni tal-proteina għandha tiġi aġġustata.
47. Is-solvent ma għandux ibiddel is-sensittività jew ir-riproduċibbiltà tal-assaġġ. Ir-riżultati tal-kontroll bis-solvent (bwejriet tat-TB) jitqabblu mal-kontroll bil-bafer biex jiġi verifikat li s-solvent użat ma jaffettwax is-sistema tal-assaġġ. Ir-riżultati tat-TB u tal-kontroll bil-Bafer għandhom ikunu komparabbli jekk ma jkun hemm ebda effett tas-solvent fuq l-assaġġ.
48. Il-mhux vinkolant ma għandux jispsota aktar minn 25 % tal-[<sup>3</sup>H]-17β-estradijoli mill-hrERα meta jiġi ttestjat sa 10<sup>-3</sup> M (OTES) jew 10<sup>-4</sup> M (DBP).
49. Il-krierji tal-prestazzjoni ġew żviluppati għall-estrogeni ta' referenza u għal żewġ leganti dgħajfin (eż. noretinodrel, noretindron) bl-użu tad-*data* mill-istudju ta' validazzjoni għall-Assaġġ CERI tal-Irbit tal-hrER (Anness N ta' riferiment 2). L-intervalli ta' kunfidenza ta' 95 % huma pprovduti għal ± SD (n) tas-sessjonijiet tal-kontroll kollha bejn erba' laboratorji li hađu sehem fl-istudju ta' validazzjoni. L-intervalli ta' kunfidenza ta' 95 % ġew ikkalkolati għall-parametri ta' dhul ta' kurva (jiġifieri l-quċċata, il-qiegh, Hillslope u Log IC<sub>50</sub>) għall-estrogeni referenzjarju u għal-leganti dgħajfin, għal-Log<sub>10</sub>RBA tal-leganti



dghajfin relattivi għall-estrogenu referenzjarju. It-Tabella 1 tipprovdi l-meded mistennija għall-parametri ta' dhul ta' kurva li jistgħu jintużaw bħala kriterji tal-prestazzjoni. Fil-prattika, il-medda tal-IC<sub>50</sub> tista' tvarja ftit fuq il-bażi tal-Kd derivat minn esperimenti tal-preparazzjoni tar-riċettur u tal-konċentrazzjoni tal-ligand użati għall-assaġġ.

50. Ma gie żviluppat ebda kriterju tal-prestazzjoni għall-parametri ta' dhul ta' kurva għas-sustanzi kimiċi tat-test minhabba l-firxa vasta ta' sustanzi kimiċi tat-test potenzjali eżistenti u l-varjazzjoni fl-affinitajiet u fl-eżiti potenzjali (eż. Kurva shiħa, kurva parzjali, ebda dhul ta' kurva). Madankollu, għandu jiġi applikat ġudizzju professjonali meta jiġu riezaminati r-riżultati minn kull sessjoni għal kull sustanza kimika tat-test. Medda suffiċjenti ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test għandha tintuża biex tiġi definita biċ-ċar il-quċcata (eż. 90 - 100 % tal-irbit) tal-kurva kompetittiva. Il-varjabbiltà bejn ir-repliki f'kull konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test kif ukoll bejn it-tliet sessjonijiet mhux konkorrenti għandha tkun raġonevoli u xjentifikament difendibbli. Il-kontrolli minn kull sessjoni għal sustanza kimika tat-test għandhom joqorbu lejn il-kejljiet tal-prestazzjoni rrapportati għal dan l-assaġġ CERI u jkunu konsistenti mad-*data* storika tal-kontrolli minn kull laboratorju rispettiv.

## ANALIŻI TAD-DATA

### Assaġġ tal-irbit tas-saturazzjoni

51. Jitkejjel l-irbit totali kif ukoll dak mhux speċifiku. Minn dawn il-valuri, l-irbit speċifiku tal-konċentrazzjonijiet dejjem akbar ta' [<sup>3</sup>H]-17β-estradijoli f'kundizzjonijiet ta' ekwilibriju jiġi kkalkolat bit-tnaqqis tal-mhux speċifiku mit-total. Graff tal-irbit speċifiku kontra l-konċentrazzjoni ta' [<sup>3</sup>H]-17β-estradijoli għandha tilhaq plateau għall-irbit speċifiku massimu li tindika saturazzjoni tal-hrERα bl-[<sup>3</sup>H]-17β-estradijoli. Barra minn hekk, l-analiżi tad-*data* għandha tiddokumenta l-irbit ta' [<sup>3</sup>H]-17β-estradijoli ma' sit ta' rbit wieħed b'affinità għolja. L-irbit mhux speċifiku, totali u speċifiku għandu jintwera fuq kurva tal-irbit tas-saturazzjoni. Analizi ulterjuri ta' din id-*data* għandha tuża analizi ta' rigressjoni mhux lineari (eż. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) b'wiri finali tad-*data* bħala plot Scatchard.
52. L-analiżi tad-*data* għandha tiddetermina l-Bmax u l-Kd mid-*data* dwar l-irbit totali biss, bl-użu tas-suppożizzjoni li l-irbit mhux speċifiku hu lineari, sakemm ma tingħatax ġustifikazzjoni għall-użu ta' metodu differenti. Barra minn hekk, ir-rigressjoni robusta għandha tintuża meta jiġi determinat l-aħjar dhul sakemm ma tingħatax ġustifikazzjoni. Il-metodu magħżul għar-rigressjoni robusta għandu jiġi ddikjarat. Il-korrezzjoni għat-tnaqqis tal-ligand (eż. bl-użu tal-metodu ta' Swillens 1995) dejjem għandha tintuża meta jiġu determinati l-Bmax u l-Kd mid-*data* dwar l-irbit tas-saturazzjoni.

### Assaġġ tal-irbit kompetittiv

53. Il-kurva tal-irbit kompetittiv tigi plottjata bhala irbit speċifiku ta' [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -estradijoli kontra l-konċentrazzjoni (unitajiet tal-log<sub>10</sub>) tal-kompetitur. Il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li tinibixxi 50 % tal-irbit speċifiku massimu ta' [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$  hi l-valur tal-IC<sub>50</sub>.
54. Stimuli tal-valuri tal-log (IC<sub>50</sub>) għall-kontrolli pożittivi (eż. estrogeni referenzjarju u legant dgħajjef) għandhom jiġu determinati bl-użu ta' softwer xieraq ta' dħul ta' kurva nonlineari għad-dħul f'ekwazzjoni ta' Hill b'erba' parametri (eż. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). Il-quċċata, il-qiegh, il-pendil u l-log(IC<sub>50</sub>) ġeneralment għandhom jithallew mhux ristretti meta jiddaħħlu dawn il-kurvi. Ir-rigressjoni robusta għandha tintuża meta jiġi determinat l-aħjar dħul sakemm ma tinghatax ġustifikazzjoni. Ma għandhiex tintuża korrezzjoni għat-tnaqqis tal-ligand. Wara l-analiżi inizjali, kull kurva tal-irbit għandha tigi rieżaminata biex jiġi żgurat dħul xieraq fil-mudell. L-affinità relattiva għall-irbit (RBA) għal-legant dgħajjef għandha tigi kkalkolata bhala perċentwal tal-log (IC<sub>50</sub>) għal-legant dgħajjef relattiv għal-log (IC<sub>50</sub>) għal 17 $\beta$ -estradijoli. Ir-risultati mill-kontrolli pożittivi u mill-kontroll mhux legant għandhom jiġu evalwati bl-użu tal-miżuri tal-prestazzjoni tal-assaġġ fil-paragrafi 44-49 ta' dan l-Appendiċi 3.
55. Id-*data* għas-sustanzi kimiċi tat-test kollha għandha tigi analizzata bl-użu ta' approċċ skont l-istadju biex jiġi żgurat li d-*data* tigi analizzata kif xieraq u li kull kurva tal-irbit kompetittiv tigi klassifikata kif suppost. Hu rakkomandat li kull sessjoni għal sustanza kimika tat-test għall-ewwel issirilha analiżi tad-*data* standardizzata li tkun identika għal dik użata għall-estrogeni referenzjarju u għall-kontrolli tal-irbit dgħajjef (ara l-paragrafu 54 ta' dan l-Appendiċi 3). Ladarba titlesta, għandhom isiru rieżami tekniku tal-parametri ta' dħul tal-kurva kif ukoll rieżami viżwali ta' kemm qed tidhol sew id-*data* fil-kurva tal-irbit kompetittiv ġenerata għal kull sessjoni. Matul dan ir-rieżami tekniku, l-osservazzjonijiet ta' tnaqqis dipendenti fuq il-konċentrazzjoni fil-perċentwal ta' [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -estradijoli marbut b'mod speċifiku, varjabbiltà baxxa fost ir-repliki tekniċi f'kull konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test, u l-konsistenza fil-parametri mdaħħla fost it-tliet sessjonijiet huma indikazzjoni tajba li l-assaġġ u l-analiżijiet tad-*data* saru kif suppost.

### Interpretazzjoni tad-*data*

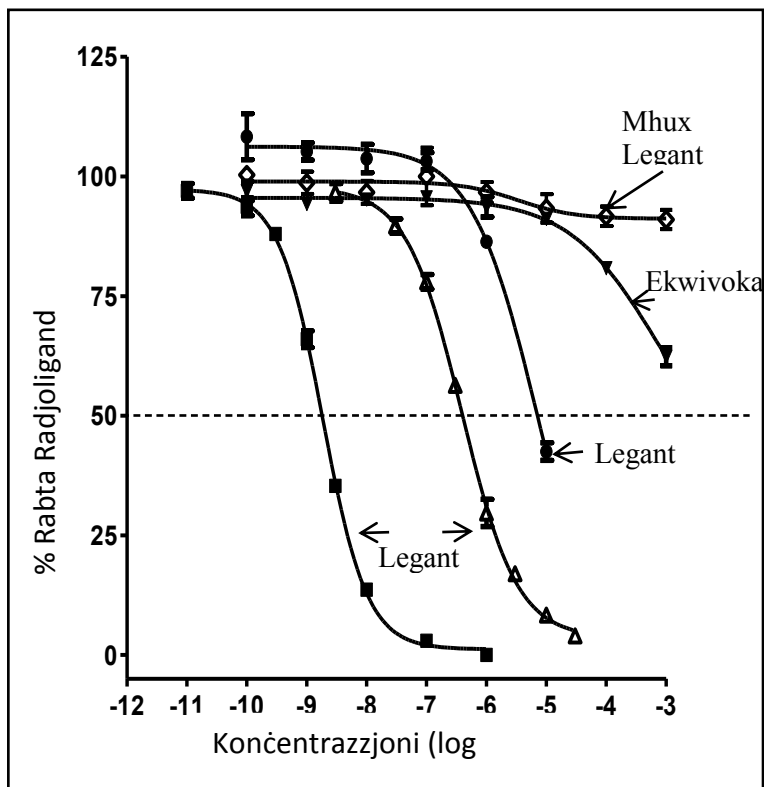
56. Dment li ma jiġux issodisfati l-kriterji ta' aċċettabbiltà, sustanza kimika tat-test titqies li tkun legant għall-hrER $\alpha$  jekk kurva tal-irbit tkun tista' tiddaħħal u l-anqas punt fil-kurva tar-rispons fi hdan il-medda tad-*data* jkun anqas minn 50 % (Figura 1).
57. Dment li ma jiġux issodisfati l-kriterji ta' aċċettabbiltà kollha, sustanza kimika tat-test titqies li mhix legant għall-hrER $\alpha$  jekk:
- Kurva tal-irbit tkun tista' tiddaħħal u l-anqas punt fil-kurva tar-rispons imdaħħla fi hdan il-medda tad-*data* jkun oghla minn 75 %, jew
  - Kurva tal-irbit ma tkunx tista' tiddaħħal u l-anqas irbit perċentwali medju mhux illixxat fost il-gruppi ta' konċentrazzjoni fid-*data* jkun oghla minn 75 %.

58. Is-sustanzi kimiċi tat-test jitqiesu ekwivoċi jekk ma tiġi ssodisfata l-ebda waħda mill-kundizzjonijiet ta' hawn fuq (eż. l-anqas punt fil-kurva tar-rispons imdahhla jkun bejn 76 – 51 %).

**Tabella 7:** Kriterji għall-assenjazzjoni tal-klassifikazzjoni fuq il-bażi tal-kurva tal-irbit kompetittiv għal sustanza kimika tat-test.

| Klassifikazzjoni         | Kriterji                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|--------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Legant <sup>a</sup>      | Kurva tal-irbit tista' tiddahhal.<br><ul style="list-style-type: none"> <li>L-anqas punt fil-kurva tar-rispons fi hdan il-medda tad-<i>data</i> hu anqas minn 50 %.</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                   |
| Mhux Legant <sup>b</sup> | Jekk tista' tiddahhal kurva tal-irbit,<br><ul style="list-style-type: none"> <li>l-anqas punt fil-kurva tar-rispons imdahhla fi hdan il-medda tad-<i>data</i> hu akbar minn 75 %.</li> </ul> Jekk ma tistax tiddahhal kurva tal-irbit,<br><ul style="list-style-type: none"> <li>l-anqas irbit perċentwali medju mhux illixxat fost il-gruppi ta' konċentrazzjoni fid-<i>data</i> hu oghla minn 75 %.</li> </ul> |
| Ekwivoċi <sup>c</sup>    | Kwalunkwe sessjoni li tista' tiġi ttestjata la hi legant u lanqas mhux legant (eż. L-anqas punt fil-kurva mdahhla tar-rispons hu bejn 76 – 51 %).                                                                                                                                                                                                                                                                |

**Figura 1:** Eżempji ta' klassifikazzjoni ta' sustanza kimika tat-test bl-użu ta' kurva tal-irbit kompetittiv.



59. Diversi sessjonijiet imwettqa f' idan laboratorju għal sustanza kimika tat-test jigu kombinati bl-assenjazzjoni ta' valuri numeriċi għal kull sessjoni u bit-teħid tal-medja bejn is-sessjonijiet kif muri fit-Tabella 8. Ir-rizultati għas-sessjonijiet kombinati f' idan kull laboratorju jitqabblu mal-klassifikazzjoni mistennija għal kull sustanza kimika tat-test.

**Tabella 8:** Il-metodu għall-klassifikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test bl-użu ta' diversi sessjonijiet f' idan laboratorju

| Biex jiġi assenjat valur għal kull sessjoni:                              |                               |
|---------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| Klassifikazzjoni                                                          | Valur Numeriku                |
| Legant                                                                    | 2                             |
| Ekwivoċi                                                                  | 1                             |
| Mhux legant                                                               | 0                             |
| Biex tiġi klassifikata medja ta' valur numeriku fuq diversi sessjonijiet: |                               |
| Klassifikazzjoni                                                          | Valur Numeriku                |
| Legant                                                                    | Medja $\geq 1,5$              |
| Ekwivoċi                                                                  | $0,5 \leq \text{Medja} < 1,5$ |
| Mhux legant                                                               | Medja $< 0,5$                 |

## **RAPPORT TAT-TEST**

60. Ara l-paragrafu 24 ta' "KOMPONENTI TAL-ASSAĠĠ TAL-IRBIT TAL-hrER" ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

### Appendiċi 3.1

#### LISTA TA' TERMINI

[<sup>3</sup>H]E2: 17 $\beta$ -Estradjol radjotikkettat bi tritju

DCC: Faħam miksi bid-dekstran

E2: 17 $\beta$ -estradjol mhux tikkettat (inert)

**Bafer tal-assaġġ:** 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, li fih 1 mM EDTA, 1mM EGTA, 1 mM NaVO<sub>3</sub>, 10 % Glicerol, 0,2 mM Lewpeptina, 1 mM Ditjotreitolo u 10 mg/ml Albumina tas-Serum tal-Bovini

**hrER $\alpha$ :** Alfa tar-riċettur tal-estrogeni rikombinanti uman (dominju li jorbot tal-ligand)

**Replika:** Waħda mid-diversi bwejrjet li jkun fihom l-istess kontenut fl-istess konċentrazzjonijiet u li jiġu ttestjati b'mod konkurrenti fi hdan sessjoni waħda. F'dan il-protokoll, kull konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test tiġi ttestjata fi triplikati; jiġifieri, hemm tliet repliki li jiġu assaġġati fl-istess hin f'kull konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test.

**Sessjoni:** Sett shiħ ta' bwejrjet ta' assaġġ ta' pjastra għall-mikrotitraġġ f'sessjoni konkurrenti li jipprova l-informazzjoni neċessarja kollha biex jiġi karatterizzat l-irbit ta' sustanza kimika tat-test mal-hrER $\alpha$  (viz., it-total [<sup>3</sup>H]-17 $\beta$ -estradjol miżjud fil-bwejra tal-assaġġ, l-irbit massimu ta' [<sup>3</sup>H]-17 $\beta$ -estradjol mal-hrER $\alpha$ , l-irbit mhux speċifiku, u l-irbit totali f'diversi konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test). Sessjoni tista' tikkonsisti fi bwejra tal-assaġġ waħda biss (jiġifieri replika) għal kull konċentrazzjoni, iżda peress li dan il-protokoll jeħtieġ assaġġar fi triplikati, sessjoni waħda tikkonsisti fi tliet bwejrjet tal-assaġġ għal kull konċentrazzjoni. Barra minn hekk, dan il-protokoll jeħtieġ tliet sessjonijiet indipendenti (jiġifieri mhux konkurrenti) għal kull sustanza kimika.

### Appendiċi 3.2

#### TIFSILA TAL-BWEJRIET TAL-ASSAĠĠ TAL-IRBIT KOMPETITTIV

| Pjastra | Pożizzjoni | Replika | Tip ta' bwejra | Kodiċi tal-Bwejra | Kodiċi tal-Konċentrazzjoni | Konċentrazzjoni Inizjali tal-Kompetitur (M) | Stokk tal-hrER (µl) | Volum tal-Bafer (µl) | Volum tat-Traċċatur (E2 Jahraq) (µL) | Volum mill-pjastra tad-dilwizzjoni (µL) | Volum Finali (µl) | Konċentrazzjoni Finali tal-Kompetitur (M) |
|---------|------------|---------|----------------|-------------------|----------------------------|---------------------------------------------|---------------------|----------------------|--------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------|-------------------------------------------|
| S       | A1         | 1       | Inbjank        | BK                | BK1                        | —                                           | —                   | —                    | —                                    | —                                       | —                 | —                                         |
| S       | A2         | 2       | Inbjank        | BK                | BK2                        | —                                           | —                   | —                    | —                                    | —                                       | —                 | —                                         |
| S       | A3         | 3       | Inbjank        | BK                | BK3                        | —                                           | —                   | —                    | —                                    | —                                       | —                 | —                                         |
| S       | B1         | 1       | E2 kiesah      | S                 | S1                         | 1,00E-10                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-11                                   |
| S       | B2         | 2       | E2 kiesah      | S                 | S1                         | 1,00E-10                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-11                                   |
| S       | B3         | 3       | E2 kiesah      | S                 | S1                         | 1,00E-10                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-11                                   |
| S       | C1         | 1       | E2 kiesah      | S                 | S2                         | 1,00E-09                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-10                                   |
| S       | C2         | 2       | E2 kiesah      | S                 | S2                         | 1,00E-09                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-10                                   |
| S       | C3         | 3       | E2 kiesah      | S                 | S2                         | 1,00E-09                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-10                                   |
| S       | D1         | 1       | E2 kiesah      | S                 | S3                         | 3,16E-09                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 3,2E-10                                   |
| S       | D2         | 2       | E2 kiesah      | S                 | S3                         | 3,16E-09                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 3,2E-10                                   |
| S       | D3         | 3       | E2 kiesah      | S                 | S3                         | 3,16E-09                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 3,2E-10                                   |
| S       | E1         | 1       | E2 kiesah      | S                 | S4                         | 1,00E-08                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-09                                   |
| S       | E2         | 2       | E2 kiesah      | S                 | S4                         | 1,00E-08                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-09                                   |
| S       | E3         | 3       | E2 kiesah      | S                 | S4                         | 1,00E-08                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-09                                   |
| S       | F1         | 1       | E2 kiesah      | S                 | S5                         | 3,16E-08                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 3,2E-09                                   |
| S       | F2         | 2       | E2 kiesah      | S                 | S5                         | 3,16E-08                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 3,2E-09                                   |
| S       | F3         | 3       | E2 kiesah      | S                 | S5                         | 3,16E-08                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 3,2E-09                                   |
| S       | G1         | 1       | E2 kiesah      | S                 | S6                         | 1,00E-07                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-08                                   |
| S       | G2         | 2       | E2 kiesah      | S                 | S6                         | 1,00E-07                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-08                                   |
| S       | G3         | 3       | E2 kiesah      | S                 | S6                         | 1,00E-07                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-08                                   |
| S       | H1         | 1       | E2 kiesah      | S                 | S7                         | 1,00E-06                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-07                                   |
| S       | H2         | 2       | E2 kiesah      | S                 | S7                         | 1,00E-06                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-07                                   |
| S       | H3         | 3       | E2 kiesah      | S                 | S7                         | 1,00E-06                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-07                                   |
| S       | A4         | 1       | noretinodrel   | NE                | WP1                        | 1,00E-08                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-09                                   |
| S       | A5         | 2       | noretinodrel   | NE                | WP1                        | 1,00E-08                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-09                                   |
| S       | A6         | 3       | noretinodrel   | NE                | WP1                        | 1,00E-08                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-09                                   |
| S       | B4         | 1       | noretinodrel   | NE                | WP2                        | 1,00E-07                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-08                                   |
| S       | B5         | 2       | noretinodrel   | NE                | WP2                        | 1,00E-07                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-08                                   |
| S       | B6         | 3       | noretinodrel   | NE                | WP2                        | 1,00E-07                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-08                                   |
| S       | C4         | 1       | noretinodrel   | NE                | WP3                        | 3,16E-07                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 3,2E-08                                   |
| S       | C5         | 2       | noretinodrel   | NE                | WP3                        | 3,16E-07                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 3,2E-08                                   |
| S       | C6         | 3       | noretinodrel   | NE                | WP3                        | 3,16E-07                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 3,2E-08                                   |
| S       | D4         | 1       | noretinodrel   | NE                | WP4                        | 1,00E-06                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-07                                   |
| S       | D5         | 2       | noretinodrel   | NE                | WP4                        | 1,00E-06                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-07                                   |
| S       | D6         | 3       | noretinodrel   | NE                | WP4                        | 1,00E-06                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-07                                   |
| S       | E4         | 1       | noretinodrel   | NE                | WP5                        | 3,16E-06                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 3,2E-07                                   |
| S       | E5         | 2       | noretinodrel   | NE                | WP5                        | 3,16E-06                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 3,2E-07                                   |
| S       | E6         | 3       | noretinodrel   | NE                | WP5                        | 3,16E-06                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 3,2E-07                                   |
| S       | F4         | 1       | noretinodrel   | NE                | WP6                        | 1,00E-05                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-06                                   |
| S       | F5         | 2       | noretinodrel   | NE                | WP6                        | 1,00E-05                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-06                                   |
| S       | F6         | 3       | noretinodrel   | NE                | WP6                        | 1,00E-05                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-06                                   |
| S       | G4         | 1       | noretinodrel   | NE                | WP7                        | 3,16E-05                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 3,2E-06                                   |
| S       | G5         | 2       | noretinodrel   | NE                | WP7                        | 3,16E-05                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 3,2E-06                                   |

|   |    |   |              |    |     |          |    |    |    |    |     |         |
|---|----|---|--------------|----|-----|----------|----|----|----|----|-----|---------|
| S | G6 | 3 | noretinodrel | NE | WP7 | 3,16E-05 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 3,2E-06 |
|   |    |   |              |    |     |          |    |    |    |    |     |         |



| Tifsila tal-Bwejriet tal-Assaġġ tal-Irbit Kompetittiv |            |         |                          |                   |                            |                                             |                     |                      |                                      |                                         |                   |                                           |
|-------------------------------------------------------|------------|---------|--------------------------|-------------------|----------------------------|---------------------------------------------|---------------------|----------------------|--------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------|-------------------------------------------|
| Pjastra                                               | Pożizzjoni | Replika | Tip ta' bwejra           | Kodiċi tal-Bwejra | Kodiċi tal-Koncentrazzjoni | Koncentrazzjoni Inizjali tal-Kompetitur (M) | Stokk tal-hrER (µl) | Volum tal-Bafer (µl) | Volum tat-Trasfatur (E2 Jahraq) (µL) | Volum mill-pjastra tad-dilwizzjoni (µL) | Volum Finali (µl) | Koncentrazzjoni Finali tal-Kompetitur (M) |
| S                                                     | H4         | 1       | noretinodrel             | NE                | WP8                        | 3,16E-04                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 3,2E-05                                   |
| S                                                     | H5         | 2       | noretinodrel             | NE                | WP8                        | 3,16E-04                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 3,2E-05                                   |
| S                                                     | H6         | 3       | noretinodrel             | NE                | WP8                        | 3,16E-04                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 3,2E-05                                   |
| S                                                     | A7         | 1       | OTES                     | L                 | OTES1                      | 1,00E-09                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-10                                   |
| S                                                     | A8         | 2       | OTES                     | L                 | OTES1                      | 1,00E-09                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-10                                   |
| S                                                     | A9         | 3       | OTES                     | L                 | OTES1                      | 1,00E-09                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-10                                   |
| S                                                     | B7         | 1       | OTES                     | L                 | OTES2                      | 1,00E-08                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-09                                   |
| S                                                     | B8         | 2       | OTES                     | L                 | OTES2                      | 1,00E-08                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-09                                   |
| S                                                     | B9         | 3       | OTES                     | L                 | OTES2                      | 1,00E-08                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-09                                   |
| S                                                     | C7         | 1       | OTES                     | L                 | OTES3                      | 1,00E-07                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-08                                   |
| S                                                     | C8         | 2       | OTES                     | L                 | OTES3                      | 1,00E-07                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-08                                   |
| S                                                     | C9         | 3       | OTES                     | L                 | OTES3                      | 1,00E-07                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-08                                   |
| S                                                     | D7         | 1       | OTES                     | L                 | OTES4                      | 1,00E-06                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-07                                   |
| S                                                     | D8         | 2       | OTES                     | L                 | OTES4                      | 1,00E-06                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-07                                   |
| S                                                     | D9         | 3       | OTES                     | L                 | OTES4                      | 1,00E-06                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-07                                   |
| S                                                     | E7         | 1       | OTES                     | L                 | OTES5                      | 1,00E-05                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-06                                   |
| S                                                     | E8         | 2       | OTES                     | L                 | OTES5                      | 1,00E-05                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-06                                   |
| S                                                     | E9         | 3       | OTES                     | L                 | OTES5                      | 1,00E-05                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-06                                   |
| S                                                     | F7         | 1       | OTES                     | L                 | OTES6                      | 1,00E-04                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-05                                   |
| S                                                     | F8         | 2       | OTES                     | L                 | OTES6                      | 1,00E-04                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-05                                   |
| S                                                     | F9         | 3       | OTES                     | L                 | OTES6                      | 1,00E-04                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-05                                   |
| S                                                     | G7         | 1       | OTES                     | L                 | OTES7                      | 1,00E-03                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-04                                   |
| S                                                     | G8         | 2       | OTES                     | L                 | OTES7                      | 1,00E-03                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-04                                   |
| S                                                     | G9         | 3       | OTES                     | L                 | OTES7                      | 1,00E-03                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-04                                   |
| S                                                     | H7         | 1       | OTES                     | L                 | OTES8DBP7                  | 1,00E-02                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-03                                   |
| S                                                     | H8         | 2       | OTES                     | L                 | OTES88                     | 1,00E-02                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-03                                   |
| S                                                     | H9         | 3       | OTES                     | L                 | OTES8                      | 1,00E-02                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-03                                   |
| S                                                     | A10        | 1       | irbit totali             | TB                | TB1                        | -                                           | 30                  | 60                   | 10                                   | -                                       | 100               | -                                         |
| S                                                     | A11        | 2       | irbit totali             | TB                | TB2                        | -                                           | 30                  | 60                   | 10                                   | -                                       | 100               | -                                         |
| S                                                     | A12        | 3       | irbit totali             | TB                | TB3                        | -                                           | 30                  | 60                   | 10                                   | -                                       | 100               | -                                         |
| S                                                     | B10        | 4       | irbit totali             | TB                | TB4                        | -                                           | 30                  | 60                   | 10                                   | -                                       | 100               | -                                         |
| S                                                     | B11        | 5       | irbit totali             | TB                | TB5                        | -                                           | 30                  | 60                   | 10                                   | -                                       | 100               | -                                         |
| S                                                     | B12        | 6       | irbit totali             | TB                | TB6                        | -                                           | 30                  | 60                   | 10                                   | -                                       | 100               | -                                         |
| S                                                     | C10        | 1       | E2 kiesah (gholi)        | NSB               | S1                         | 1,00E-05                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-06                                   |
| S                                                     | C11        | 2       | E2 kiesah (gholi)        | NSB               | S2                         | 1,00E-05                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-06                                   |
| S                                                     | C12        | 3       | E2 kiesah (gholi)        | NSB               | S3                         | 1,00E-05                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-06                                   |
| S                                                     | D10        | 4       | E2 kiesah (gholi)        | NSB               | S4                         | 1,00E-05                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-06                                   |
| S                                                     | D11        | 5       | E2 kiesah (gholi)        | NSB               | S5                         | 1,00E-05                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-06                                   |
| S                                                     | D12        | 6       | E2 kiesah (gholi)        | NSB               | S6                         | 1,00E-05                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-06                                   |
| S                                                     | E10        | 1       | Kontroll bil-bafer       | BC                | BC1                        | -                                           | -                   | 100                  | -                                    | -                                       | 100               | -                                         |
| S                                                     | E11        | 2       | Kontroll bil-bafer       | BC                | BC2                        | -                                           | -                   | 100                  | -                                    | -                                       | 100               | -                                         |
| S                                                     | E12        | 3       | Kontroll bil-bafer       | BC                | BC3                        | -                                           | -                   | 100                  | -                                    | -                                       | 100               | -                                         |
| S                                                     | F10        | 4       | Kontroll bil-bafer       | BC                | BC4                        | -                                           | -                   | 100                  | -                                    | -                                       | 100               | -                                         |
| S                                                     | F11        | 5       | Kontroll bil-bafer       | BC                | BC5                        | -                                           | -                   | 100                  | -                                    | -                                       | 100               | -                                         |
| S                                                     | F12        | 6       | Kontroll bil-bafer       | BC                | BC6                        | -                                           | -                   | 100                  | -                                    | -                                       | 100               | -                                         |
| S                                                     | G10*       | 1       | Inbjank (ghal dak Jahraq |                   | H1                         | -                                           | 90                  | -                    | 10                                   | -                                       | 100               | -                                         |
| S                                                     | G11*       | 2       | Inbjank (ghal dak Jahraq |                   | H2                         | -                                           | 90                  | -                    | 10                                   | -                                       | 100               | -                                         |
| S                                                     | G12*       | 3       | Inbjank (ghal dak Jahraq |                   | H3                         | -                                           | 90                  | -                    | 10                                   | -                                       | 100               | -                                         |

|   |      |   |                   |        |    |   |    |   |    |   |     |   |
|---|------|---|-------------------|--------|----|---|----|---|----|---|-----|---|
| S | H10* | 4 | Inbjank (għal dak | Jahraq | H4 | - | 90 | - | 10 | - | 100 | - |
| S | H11* | 5 | Inbjank (għal dak | Jahraq | H5 | - | 90 | - | 10 | - | 100 | - |
| S | H12  | 6 | Inbjank (għal dak | Jahraq | H6 | - | 90 | - | 10 | - | 100 | - |

\*: Kun af li l-bwejrjet “jaharqu” jkunu vojta matul l-inkubazzjoni. L-10 µl jiżdiedu biss għall-ghadd tax-xintillazzjoni.

| Tifsila tal-Bwejriet tal-Assaġġ tal-Irbit Kompetittiv |            |         |                |                   |                            |                                             |                     |                      |                                      |                                         |                   |                                           |
|-------------------------------------------------------|------------|---------|----------------|-------------------|----------------------------|---------------------------------------------|---------------------|----------------------|--------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------|-------------------------------------------|
| Pjastra                                               | Pożizzjoni | Replika | Tip ta' bwejra | Kodiċi tal-Bwejra | Kodiċi tal-Konċentrazzjoni | Konċentrazzjoni Inizjali tal-Kompetitur (M) | Stokk tal-hrER (µl) | Volum tal-Bafer (µl) | Volum tat-Traċċatur (E2 Jahraq) (µL) | Volum mill-pjastra tad-dilwizzjoni (µL) | Volum Finali (µl) | Konċentrazzjoni Finali tal-Kompetitur (M) |
| P1                                                    | A1         | 1       | Mhux maghruf 1 | U1                | 1                          | 1,00E-09                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-10                                   |
| P1                                                    | A2         | 2       | Mhux maghruf 1 | U1                | 1                          | 1,00E-09                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-10                                   |
| P1                                                    | A3         | 3       | Mhux maghruf 1 | U1                | 1                          | 1,00E-09                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-10                                   |
| P1                                                    | B1         | 1       | Mhux maghruf 1 | U1                | 2                          | 1,00E-08                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-09                                   |
| P1                                                    | B2         | 2       | Mhux maghruf 1 | U1                | 2                          | 1,00E-08                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-09                                   |
| P1                                                    | B3         | 3       | Mhux maghruf 1 | U1                | 2                          | 1,00E-08                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-09                                   |
| P1                                                    | C1         | 1       | Mhux maghruf 1 | U1                | 3                          | 1,00E-07                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-08                                   |
| P1                                                    | C2         | 2       | Mhux maghruf 1 | U1                | 3                          | 1,00E-07                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-08                                   |
| P1                                                    | C3         | 3       | Mhux maghruf 1 | U1                | 3                          | 1,00E-07                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-08                                   |
| P1                                                    | D1         | 1       | Mhux maghruf 1 | U1                | 4                          | 1,00E-06                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-07                                   |
| P1                                                    | D2         | 2       | Mhux maghruf 1 | U1                | 4                          | 1,00E-06                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-07                                   |
| P1                                                    | D3         | 3       | Mhux maghruf 1 | U1                | 4                          | 1,00E-06                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-07                                   |
| P1                                                    | E1         | 1       | Mhux maghruf 1 | U1                | 5                          | 1,00E-05                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-06                                   |
| P1                                                    | E2         | 2       | Mhux maghruf 1 | U1                | 5                          | 1,00E-05                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-06                                   |
| P1                                                    | E3         | 3       | Mhux maghruf 1 | U1                | 5                          | 1,00E-05                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-06                                   |
| P1                                                    | F1         | 1       | Mhux maghruf 1 | U1                | 6                          | 1,00E-04                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-05                                   |
| P1                                                    | F2         | 2       | Mhux maghruf 1 | U1                | 6                          | 1,00E-04                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-05                                   |
| P1                                                    | F3         | 3       | Mhux maghruf 1 | U1                | 6                          | 1,00E-04                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-05                                   |
| P1                                                    | G1         | 1       | Mhux maghruf 1 | U1                | 7                          | 1,00E-03                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-04                                   |
| P1                                                    | G2         | 2       | Mhux maghruf 1 | U1                | 7                          | 1,00E-03                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-04                                   |
| P1                                                    | G3         | 3       | Mhux maghruf 1 | U1                | 7                          | 1,00E-03                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-04                                   |
| P1                                                    | H1         | 1       | Mhux maghruf 1 | U1                | 8                          | 1,00E-02                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-03                                   |
| P1                                                    | H2         | 2       | Mhux maghruf 1 | U1                | 8                          | 1,00E-02                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-03                                   |
| P1                                                    | H3         | 3       | Mhux maghruf 1 | U1                | 8                          | 1,00E-02                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-03                                   |
| P1                                                    | A4         | 1       | Mhux maghruf 2 | U2                | 1                          | 1,00E-09                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-10                                   |
| P1                                                    | A5         | 2       | Mhux maghruf 2 | U2                | 1                          | 1,00E-09                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-10                                   |
| P1                                                    | A6         | 3       | Mhux maghruf 2 | U2                | 1                          | 1,00E-09                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-10                                   |
| P1                                                    | B4         | 1       | Mhux maghruf 2 | U2                | 2                          | 1,00E-08                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-09                                   |
| P1                                                    | B5         | 2       | Mhux maghruf 2 | U2                | 2                          | 1,00E-08                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-09                                   |
| P1                                                    | B6         | 3       | Mhux maghruf 2 | U2                | 2                          | 1,00E-08                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-09                                   |
| P1                                                    | C4         | 1       | Mhux maghruf 2 | U2                | 3                          | 1,00E-07                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-08                                   |
| P1                                                    | C5         | 2       | Mhux maghruf 2 | U2                | 3                          | 1,00E-07                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-08                                   |
| P1                                                    | C6         | 3       | Mhux maghruf 2 | U2                | 3                          | 1,00E-07                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-08                                   |
| P1                                                    | D4         | 1       | Mhux maghruf 2 | U2                | 4                          | 1,00E-06                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-07                                   |
| P1                                                    | D5         | 2       | Mhux maghruf 2 | U2                | 4                          | 1,00E-06                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-07                                   |
| P1                                                    | D6         | 3       | Mhux maghruf 2 | U2                | 4                          | 1,00E-06                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-07                                   |
| P1                                                    | E4         | 1       | Mhux maghruf 2 | U2                | 5                          | 1,00E-05                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-06                                   |
| P1                                                    | E5         | 2       | Mhux maghruf 2 | U2                | 5                          | 1,00E-05                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-06                                   |
| P1                                                    | E6         | 3       | Mhux maghruf 2 | U2                | 5                          | 1,00E-05                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-06                                   |
| P1                                                    | F4         | 1       | Mhux maghruf 2 | U2                | 6                          | 1,00E-04                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-05                                   |
| P1                                                    | F5         | 2       | Mhux maghruf 2 | U2                | 6                          | 1,00E-04                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-05                                   |
| P1                                                    | F6         | 3       | Mhux maghruf 2 | U2                | 6                          | 1,00E-04                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-05                                   |
| P1                                                    | G4         | 1       | Mhux maghruf 2 | U2                | 7                          | 1,00E-03                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-04                                   |
| P1                                                    | G5         | 2       | Mhux maghruf 2 | U2                | 7                          | 1,00E-03                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-04                                   |
| P1                                                    | G6         | 3       | Mhux maghruf 2 | U2                | 7                          | 1,00E-03                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-04                                   |
| P1                                                    | H4         | 1       | Mhux maghruf 2 | U2                | 8                          | 1,00E-02                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-03                                   |
| P1                                                    | H5         | 2       | Mhux maghruf 2 | U2                | 8                          | 1,00E-02                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-03                                   |
| P1                                                    | H6         | 3       | Mhux maghruf 2 | U2                | 8                          | 1,00E-02                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-03                                   |

| Tifsila tal-Bwejriet tal-Assaġġ tal-Irbit Kompetittiv |            |         |                   |                   |                            |                                             |                     |                      |                                      |                                         |                   |                                           |
|-------------------------------------------------------|------------|---------|-------------------|-------------------|----------------------------|---------------------------------------------|---------------------|----------------------|--------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------|-------------------------------------------|
| Pjastra                                               | Pożizzjoni | Replika | Tip ta' bwejra    | Kodiċi tal-Bwejra | Kodiċi tal-Konċentrazzjoni | Konċentrazzjoni Inizjali tal-Kompetitur (M) | Stokk tal-hrER (µl) | Volum tal-Bafer (µl) | Volum tat-Traċċatur (E2 Jahraq) (µL) | Volum mill-pjastra tad-dilwizzjoni (µL) | Volum Finali (µl) | Konċentrazzjoni Finali tal-Kompetitur (M) |
| P1                                                    | A7         | 1       | Mhux maghruf 3    | U3                | 1                          | 1,00E-09                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-10                                   |
| P1                                                    | A8         | 2       | Mhux maghruf 3    | U3                | 1                          | 1,00E-09                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-10                                   |
| P1                                                    | A9         | 3       | Mhux maghruf 3    | U3                | 1                          | 1,00E-09                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-10                                   |
| P1                                                    | B7         | 1       | Mhux maghruf 3    | U3                | 2                          | 1,00E-08                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-09                                   |
| P1                                                    | B8         | 2       | Mhux maghruf 3    | U3                | 2                          | 1,00E-08                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-09                                   |
| P1                                                    | B9         | 3       | Mhux maghruf 3    | U3                | 2                          | 1,00E-08                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-09                                   |
| P1                                                    | C7         | 1       | Mhux maghruf 3    | U3                | 3                          | 1,00E-07                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-08                                   |
| P1                                                    | C8         | 2       | Mhux maghruf 3    | U3                | 3                          | 1,00E-07                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-08                                   |
| P1                                                    | C9         | 3       | Mhux maghruf 3    | U3                | 3                          | 1,00E-07                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-08                                   |
| P1                                                    | D7         | 1       | Mhux maghruf 3    | U3                | 4                          | 1,00E-06                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-07                                   |
| P1                                                    | D8         | 2       | Mhux maghruf 3    | U3                | 4                          | 1,00E-06                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-07                                   |
| P1                                                    | D9         | 3       | Mhux maghruf 3    | U3                | 4                          | 1,00E-06                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-07                                   |
| P1                                                    | E7         | 1       | Mhux maghruf 3    | U3                | 5                          | 1,00E-05                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-06                                   |
| P1                                                    | E8         | 2       | Mhux maghruf 3    | U3                | 5                          | 1,00E-05                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-06                                   |
| P1                                                    | E9         | 3       | Mhux maghruf 3    | U3                | 5                          | 1,00E-05                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-06                                   |
| P1                                                    | F7         | 1       | Mhux maghruf 3    | U3                | 6                          | 1,00E-04                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-05                                   |
| P1                                                    | F8         | 2       | Mhux maghruf 3    | U3                | 6                          | 1,00E-04                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-05                                   |
| P1                                                    | F9         | 3       | Mhux maghruf 3    | U3                | 6                          | 1,00E-04                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-05                                   |
| P1                                                    | G7         | 1       | Mhux maghruf 3    | U3                | 7                          | 1,00E-03                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-04                                   |
| P1                                                    | G8         | 2       | Mhux maghruf 3    | U3                | 7                          | 1,00E-03                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-04                                   |
| P1                                                    | G9         | 3       | Mhux maghruf 3    | U3                | 7                          | 1,00E-03                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-04                                   |
| P1                                                    | H7         | 1       | Mhux maghruf 3    | U3                | 8                          | 1,00E-02                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-03                                   |
| P1                                                    | H8         | 2       | Mhux maghruf 3    | U3                | 8                          | 1,00E-02                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-03                                   |
| P1                                                    | H9         | 3       | Mhux maghruf 3    | U3                | 8                          | 1,00E-02                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-03                                   |
| P1                                                    | A10        | 1       | E2 tal-Kontroll   | S                 | E2max1                     | 1,00E-06                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,00E-07                                  |
| P1                                                    | A11        | 2       | E2 tal-Kontroll   | S                 | E2max2                     | 1,00E-06                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,00E-07                                  |
| P1                                                    | A12        | 3       | E2 tal-Kontroll   | S                 | E2max3                     | 1,00E-06                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,00E-07                                  |
| P1                                                    | B10        | 1       | E2 tal-Kontroll   | S                 | E2IC501                    | E2IC50x10                                   | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | E2IC50                                    |
| P1                                                    | B11        | 2       | E2 tal-Kontroll   | S                 | E2IC502                    | E2IC50x10                                   | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | E2IC50                                    |
| P1                                                    | B12        | 3       | E2 tal-Kontroll   | S                 | E2IC503                    | E2IC50x10                                   | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | E2IC50                                    |
| P1                                                    | C10        | 1       | NE tal-Kontroll   | S                 | Nemax1                     | 1,00E-3,5                                   | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,00E-4,5                                 |
| P1                                                    | C11        | 2       | NE tal-Kontroll   | S                 | Nemax2                     | 1,00E-3,5                                   | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,00E-4,5                                 |
| P1                                                    | C12        | 3       | NE tal-Kontroll   | S                 | Nemax3                     | 1,00E-3,5                                   | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,00E-4,5                                 |
| P1                                                    | D10        | 1       | NE tal-Kontroll   | S                 | NEIC501                    | NEIC50 x10                                  | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | NEIC50                                    |
| P1                                                    | D11        | 2       | NE tal-Kontroll   | S                 | NEIC502                    | NEIC50 x10                                  | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | NEIC50                                    |
| P1                                                    | D12        | 3       | NE tal-Kontroll   | S                 | NEIC503                    | NEIC50 x10                                  | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | NEIC50                                    |
| P1                                                    | E10        | 1       | E2 kiesah (gholi) | NSB               | S1                         | 1,00E-05                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-06                                   |
| P1                                                    | E11        | 2       | E2 kiesah (gholi) | NSB               | S2                         | 1,00E-05                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-06                                   |
| P1                                                    | E12        | 3       | E2 kiesah (gholi) | NSB               | S3                         | 1,00E-05                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-06                                   |
| P1                                                    | F10        | 4       | E2 kiesah (gholi) | NSB               | S4                         | 1,00E-05                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-06                                   |
| P1                                                    | F11        | 5       | E2 kiesah (gholi) | NSB               | S5                         | 1,00E-05                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-06                                   |
| P1                                                    | F12        | 6       | E2 kiesah (gholi) | NSB               | S6                         | 1,00E-05                                    | 30                  | 50                   | 10                                   | 10                                      | 100               | 1,0E-06                                   |
| P1                                                    | G10        | 1       | irbit totali      | TB                | TB1                        | -                                           | 30                  | 60                   | 10                                   | -                                       | 100               | -                                         |
| P1                                                    | G11        | 2       | irbit totali      | TB                | TB2                        | -                                           | 30                  | 60                   | 10                                   | -                                       | 100               | -                                         |
| P1                                                    | G12        | 3       | irbit totali      | TB                | TB3                        | -                                           | 30                  | 60                   | 10                                   | -                                       | 100               | -                                         |
| P1                                                    | H10        | 4       | irbit totali      | TB                | TB4                        | -                                           | 30                  | 60                   | 10                                   | -                                       | 100               | -                                         |
| P1                                                    | H11        | 5       | irbit totali      | TB                | TB5                        | -                                           | 30                  | 60                   | 10                                   | -                                       | 100               | -                                         |
| P1                                                    | H12        | 6       | irbit totali      | TB                | TB6                        | -                                           | 30                  | 60                   | 10                                   | -                                       | 100               | -                                         |



#### **Appendiċi 4**

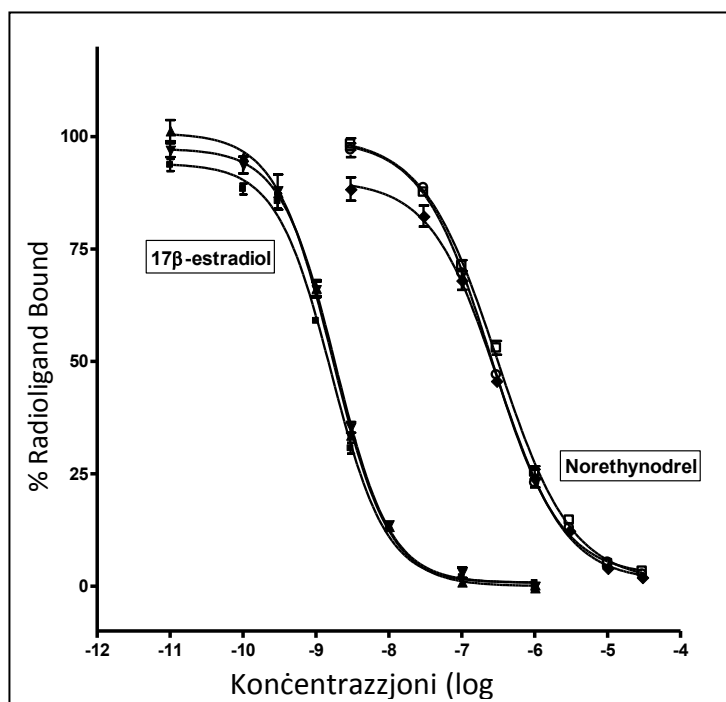
### **KUNSIDERAZZJONIJIET GHALL-ANALIŻI TAD-DATA MILL-ASSAĠĠ TAL-IRBIT KOMPETITTIV TAL-HRER**

1. L-assaġġ tal-irbit kompetittiv tal-hrER $\alpha$  jkejjel l-irbit ta' konċentrazzjoni waħda ta' [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ - estradjol fil-preżenza ta' konċentrazzjonijiet dejjem akbar ta' sustanza kimika tat-test. Il-kurva tal-irbit kompetittiv tiġi plottjata bħala irbit speċifiku ta' [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -estradjol kontra l-konċentrazzjoni (unitajiet tal-log<sub>10</sub>) tal-kompetitur. Il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li tinibixxi 50 % tal-irbit speċifiku massimu ta' [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$  hi l-IC<sub>50</sub>.

#### **Analizi tad-Data għall-Estroġenu Referenzjarju u għal-Legant Dgħajjef (1)**

2. Id-*data* mis-sessjonijiet tal-kontroll huma trasferomati (jiġifieri l-irbit speċifiku percentwali ta' [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -estradjol u l-konċentrazzjoni tal-log tas-sustanza kimika tal-kontroll) għall-analiżi ulterjuri. Stimuli tal-valuri tal-log (IC<sub>50</sub>) għall-kontrolli pożittivi (eż. estroġenu referenzjarju u legant dgħajjef) għandhom jiġu determinati bl-użu ta' softwer xieraq ta' dħul ta' kurva nonlineari għad-dħul f'ekwazzjoni ta' Hill b'erba' parametri (eż. BioSoft; GraphPad Prism) (2). Il-quċċata, il-qiegħ, il-pendil u l-log(IC<sub>50</sub>) tipikament jistgħu jithallew mhux ristretti meta jiddaħħlu dawn il-kurvi. Ir-rigressjoni robusta għandha tintuża meta jiġi determinat l-aħjar dħul sakemm ma tingħatax ġustifikazzjoni. Il-metodu magħżul għar-rigressjoni robusta għandu jiġi ddikjarat. Korrezzjoni għat-tnaqqis tal-ligand ma kinitx meħtieġa għall-assaġġi tal-hrER FW jew CER1, iżda tista' tiġi kkunsidrata jekk tkun meħtieġa. Wara l-analiżi inizjali, kull kurva tal-irbit għandha tiġi rieżaminata biex jiġi żgurat dħul xieraq fil-mudell. L-affinità relattiva għall-irbit (RBA) għal-legant dgħajjef tista' tiġi kkalkolata bħala percentwal tal-log (IC<sub>50</sub>) għal-legant dgħajjef relattiv għal-log (IC<sub>50</sub>) għal 17 $\beta$ -estradjol. Ir-rizultati għall-kontrolli pożittivi u għall-kontroll tal-mhux legant għandhom jiġu evalwati bl-użu tal-kejljiet tal-prestazzjoni tal-assaġġ u tal-kriterji ta' aċċettabbiltà kif deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar (paragrafu 20), fl-Appendiċi 2 (Assaġġ FW, paragrafi 41-51) u fl-Appendiċi 3 (Assaġġ CER1, paragrafi 41-51). Eżempji ta' tliet sessjonijiet għall-estroġenu referenzjarju u għal-legant dgħajjef huma murija fil-Figura 1.

**Figura 1.** Eżempji tal-kurvi tal-irbit kompetittiv għall-estroġenu referenzjarju u għal-legant dgħajjef tal-kontroll.

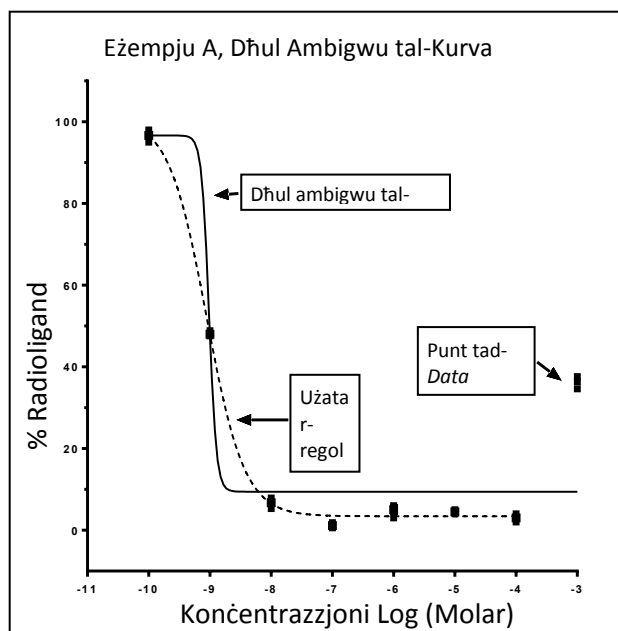


### Analizi tad-*Data* ghas-Sustanzi Kimiċi tat-Test

3. Id-*data* ghas-sustanzi kimiċi tat-test kollha għandha tiġi analizzata bl-użu ta' approċċ skont l-istadju biex jiġi żgurat li d-*data* tiġi analizzata kif xieraq u li kull kurva tal-irbit kompetittiv tiġi klassifikata kif suppost. Kull sessjoni għal sustanza kimika tat-test għall-ewwel għandha ssirilha analizi tad-*data* standardizzata li tkun identika għal dik użata għall-estrogenu referenzjarju u għall-kontrolli tal-irbit dġhajjef. Ladarba titlesta, għandhom isiru rieżami tekniku tal-parametri ta' dħul tal-kurva kif ukoll rieżami viżwali ta' kemm qed tidhol sew id-*data* fil-kurva tal-irbit kompetittiv generata għal kull sessjoni. Matul dan ir-rieżami tekniku, l-osservazzjonijiet ta' tnaqqis dipendenti fuq il-konċentrazzjoni fil-perċentwal ta' [<sup>3</sup>H]-17β-estradiol marbut b'mod speċifiku, varjabbiltà baxxa fost ir-repliki tekniċi f'kull konċentrazzjoni kimika, u l-konsistenza fil-parametri mdahhla fost it-tliet sessjonijiet huma indikazzjoni tajba li l-assaġġ u l-analizijiet tad-*data* saru kif suppost. Għandu jiġi applikat ġudizzju professjonali meta jiġu rieżaminati r-riżultati minn kull sessjoni għal sustanza kimika tat-test, u d-*data* użata biex kull sustanza kimika tat-test tiġi klassifikata bħala legant jew mhux legant għandha tkun xjentifikament difendibbli.
4. Kultant jista' jkun hemm eżempji ta' *data* li tehtieg attenzjoni addizzjonali biex tkun tista' tiġi analizzata u interpretata kif xieraq id-*data* dwar l-irbit tal-hrER. Studji fil-passat kienu urew każijiet li fihom l-analizi u l-interpretazzjoni tad-*data* dwar l-irbit tar-riċettur kompetittiv jistgħu jkunu kumplikati minhabba rpijlar tal-irbit speċifiku perċentwali meta

jigū ttestjati sustanzi kimiċi fl-oghla konċentrazzjonijiet (Figura 2). Din hi problema magħrufa sew li nstabet meta ntużaw protokollu għal numru ta' assaġġi tal-irbit tar-riċettur kompetittiv (3). F'dawn il-każijiet, jiġi osservat rispons dipendenti fuq il-konċentrazzjoni f'konċentrazzjonijiet inferjuri, iżda hekk kif il-konċentrazzjoni tal-approċċi tas-sustanza kimika tat-test toqrob lejn il-limitu tas-solubbiltà, l-ispostament ta'  $[^3\text{H}]17\beta$ -estradijoli ma jkomplix jonqos. F'dawn il-każijiet, id-*data* għall-konċentrazzjonijiet oghla tindika li ntlahaq il-limitu bijoloġiku tal-assaġġ. Pereżempju, dan il-fenomenu hafna drabi jiġi assoċjati mal-insolubbiltà kimika u mal-preċipitazzjoni f'konċentrazzjonijiet għoljin, jew jista' jkun ukoll riflessjoni ta' qbiż tal-kapaċità tal-faħam miksi bid-dekstran biex jinqabad il-ligand radjotikkettat mhux marbut matul il-proċedura ta' separazzjoni fl-oghla konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika. L-inklużjoni ta' dawn il-punti tad-*data* meta tiddaħħal id-*data* dwar l-irbit kompetittiv f'kurva sigmojdi kultant tista' twassal għal klassifikazzjoni ħażina tal-potenzjal ta' rbit tal-ER għal sustanza kimika tat-test (Figura 2). Biex dan jiġi evitat, il-protokoll għall-assaġġi tal-irbit tal-hrER FW u CER1 jinkludi għażla li mill-analiżijiet jiġu esklużi punti tad-*data* fejn il-medja tar-repliki għall-irbit speċifiku percentwali ta'  $[^3\text{H}]17\beta$ -estradijoli tkun 10 % jew aktar oghla minn dik osservata għall-valur medju f'konċentrazzjoni inferjuri (jiġifieri dik li komunement tissejjah ir-regola tal-10 %). Din ir-regola tista' tintuża darba biss għal kurva partikolari, u jrid ikun jifdal *data* għal tal-anqas sitt konċentrazzjonijiet b'tali mod li tkun tista' tiġi klassifikata kif suppost il-kurva.

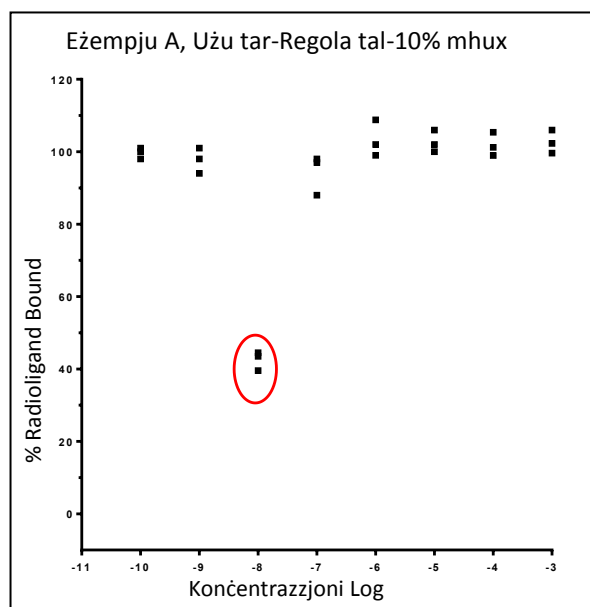
**Figura 2:** Eżempji, Kurvi tal-Irbit Kompetittiv bl-Użu tar-Regola tal-10 % u mingħajr.

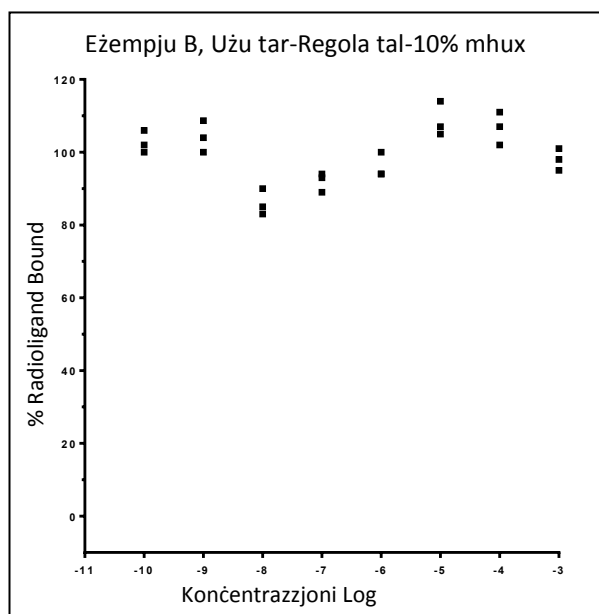




5. L-użu xieraq tar-regola tal-10 % għall-korrezzjoni ta' dawn il-kurvi għandu jigi kkunsidrat bil-galbu u riżervat għal dawk il-każijiet li fihom ikun hemm indikazzjoni b'saħħitha ta' legant tal-hrER. Matul it-twettiq tal-esperimenti għall-istudju ta' validazzjoni tal-Assaġġ tal-Irbit tal-hrER FW, ġie osservat li r-regola tal-10 % kultant kellha konsegwenza mhux intenzjonata u imprevista. Is-sustanzi kimiċi li ma interaġixxux mar-riċettur (jiġifieri mhux leganti veri) spiss urew varjabbiltà madwar l-irbit tar-radjoligandi ta' 100 % li kienet aktar minn 10 % fil-medda ta' konċentrazzjonijiet ittestjati. Jekk l-anqas valur inzerta kien f'konċentrazzjoni baxxa, id-data mill-konċentrazzjonijiet oghla kollha potenzjalment setgħet tithassar mill-analiżi bl-użu tar-regola tal-10 %, għalkemm dawk il-konċentrazzjonijiet jistgħu jkunu siewja fl-istabbiliment tal-fatt li s-sustanza kimika mhix legant. Il-Figura 3 turi eżempji li fihom l-użu tar-regola tal-10 % ma tkunx adattata.

**Figura 3:** Eżempji, Data dwar l-Irbit Kompetittiv Fejn l-Użu tar-Regola tal-10 % Ma Jkunx Adattat.





## Referenzi

- (1) OECD (2015). *Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrER $\alpha$ )*, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.
- (2) Motulsky H. u Christopoulos A. (2003). *The law of mass action, In Fitting Models to Biological Data Using Linear and Non-linear Regression*. GraphPad Software Inc., San Diego, CA, pp 187-191. [Www.graphpad.com/manuals/Prism4/RegressionBook.pdf](http://www.graphpad.com/manuals/Prism4/RegressionBook.pdf)
- (3) Laws SC, Yavanhxay S, Cooper RL, Eldridge JC. (2006). *Nature of the Binding Interaction for 50 Structurally Diverse Chemicals with Rat Estrogen Receptors*. Toxicological Sci. 94(1):46-56.