

Bruksela, 25 lutego 2019 r.  
(OR. en)

6800/19  
ADD 1

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

**PISMO PRZEWODNIE**

---

|                  |                            |
|------------------|----------------------------|
| Od:              | Komisja Europejska         |
| Data otrzymania: | 22 lutego 2019 r.          |
| Do:              | Sekretariat Generalny Rady |

---

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Nr dok. Kom.: | Annex to D060575/02                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Dotyczy:      | ZAŁĄCZNIK DO ROZPORZĄDZENIA KOMISJI (UE) .../... z dnia XXX r. zmieniające, w celu dostosowania do postępu technicznego, załącznik do rozporządzenia (WE) nr 440/2008 ustalającego metody badań zgodnie z rozporządzeniem (WE) nr 1907/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady w sprawie rejestracji, oceny, udzielania zezwoleń i stosowanych ograniczeń w zakresie chemikaliów (REACH) |

---

Delegacje otrzymują w załączeniu dokument Annex to D060575/02.

Zał.: Annex to D060575/02

## Załącznik – Część 1/2

PL

## ZAŁĄCZNIK

W załączniku do rozporządzenia (WE) nr 440/2008 wprowadza się następujące zmiany:

- 1) w części B rozdział B.4 otrzymuje brzmienie:

**„B.4 OSTRE DZIAŁANIE DRAŻNIĄCE/ŻRĄCE NA SKÓRĘ****WPROWADZENIE**

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD nr 404 (2015). Okresowo dokonuje się przeglądu wytycznych OECD dotyczących badania substancji chemicznych, aby odzwierciedlały one najlepszą dostępną wiedzę naukową. W przeglądzie dotyczącej badań wytycznej (TG) OECD nr 404 szczególną uwagę poświęcono ewentualnym ulepszeniom w zakresie dobrostanu zwierząt i oceny wszystkich dostępnych informacji na temat badanej substancji chemicznej w celu uniknięcia niepotrzebnych badań na zwierzętach laboratoryjnych. Zaktualizowana wersja dotyczącej badań wytycznej OECD nr 404 (pierwotnie przyjętej w 1981 r., poprawianej w latach 1992, 2002 i 2015) zawiera odniesienia do wytycznych dotyczących zintegrowanych podejść do badań i oceny (IATA) podrażnienia skóry / działania żrącego na skórę (1) sugerujących podejście modułowe do badań nad podrażnieniem i działaniem żrącym na skórę. W ramach IATA opisano kilka modułów grupujących źródła informacji i narzędzia do analizy danych oraz (i) przedstawiono wytyczne dotyczące sposobu włączania i wykorzystywania istniejących danych, które uzyskano w ramach badań i metodami niebadawczymi, do celów oceny potencjałów substancji chemicznych pod względem działania drażniącego i żrącego na skórę, a także (ii) zaproponowano podejście w sytuacji gdy potrzebne są dalsze badania (1). Ponadto w razie potrzeby, zamiast jednoczesnego zastosowania u zwierzęcia trzech płatków gazy we wstępnym badaniu *in vivo*, w powyższej wytycznej zalecane jest sekwencyjne zastosowanie płatków.
2. Definicje działania drażniącego i żrącego na skórę podano w dodatku do niniejszej metody badawczej.

**ZAŁOŻENIA WSTĘPNE**

3. Z uwagi na dobrze pojęty interes nauki i dobrostan zwierząt nie należy przeprowadzać badań *in vivo*, dopóki wszystkie dostępne dane na temat potencjalnego żrącego/drażniącego działania badanej substancji chemicznej na skórę nie zostaną

ocenione w ramach analizy wagi dowodów tak, jak to przedstawiono w wytycznej dotyczącej zintegrowanych podejść do badań i oceny działania żrącego i drażniącego na skórę, tj. w trzech częściach tej wytycznej i ich odpowiednich modułach (1). W części 1 omówiono pokrótce istniejące dane w siedmiu modułach obejmujących dane dotyczące ludzi, dane *in vivo*, dane *in vitro*, dane dotyczące właściwości fizykochemicznych (np. pH, w szczególności silnej kwasowości lub zasadowości) i metody niebadawcze. W części 2 przeprowadzono analizę wagi dowodów. Jeżeli powyższa analiza wagi dowodów okaże się niejednoznaczna, należy przeprowadzić dodatkowe badania, o których mowa w części 3, zaczynając od metod *in vitro*, przy czym badania *in vivo* stosuje się w ostateczności. Wspomniana analiza powinna zatem przyczynić się do ograniczenia potrzeby prowadzenia badań *in vivo* pod kątem działania żrącego/drażniącego na skórę wywołanego przez badane substancje chemiczne, w odniesieniu do których już istnieje wystarczający, pochodzący z innych badań materiał dowodowy dotyczący tych dwóch odnośnych punktów końcowych.

## **ZASADA BADANIA *IN VIVO***

4. Substancja chemiczna, która ma być zbadana, jest nakładana na skórę zwierzęcia doświadczalnego w pojedynczej dawce; część skóry niepoddana zabiegowi służy jako część kontrolna. Stopień działania żrącego/drażniącego jest określany i oceniany przy pomocy punktacji w określonych odstępach, a następnie dodatkowo opisywany w celu całkowitego oszacowania skutków działania. Czas trwania badania powinien być wystarczający do oceny odwracalności lub nieodwracalności zaobserwowanych skutków.
5. Zwierzęta wykazujące ciągłe objawy silnego stresu lub bólu na jakimkolwiek etapie badania powinny zostać uśmiercone w sposób humanitarny, a badana substancja chemiczna oceniona stosownie do zaobserwowanych skutków. Kryteria podejmowania decyzji o uśmiercaniu zwierząt w stanie agonalnym lub cierpiących silny ból określono w osobnych wytycznych (2).

## **PRZYGOTOWANIA DO BADANIA *IN VIVO***

### **Wybór gatunku zwierząt**

6. Preferowanym gatunkiem zwierzęcia laboratoryjnego jest królik albinos; wykorzystywane są zdrowe młode dorosłe króliki. W przypadku wykorzystania innych gatunków należy podać uzasadnienie.

### **Przygotowanie zwierząt**

7. Na około 24 godziny przed przeprowadzeniem badania należy krótko przyciąć sierść z powierzchni grzbietowej tułowia zwierząt. Należy unikać otarcia skóry; należy wykorzystywać wyłącznie zwierzęta ze zdrową nienaruszoną skórą.

8. Niektóre szczepy królików mają kępy futra, których gęstość jest większa w określonych porach roku. Takie obszary gęstego futra nie powinny być używane jako miejsca badań.

#### **Warunki utrzymywania i karmienia**

9. Zwierzęta należy trzymać oddzielnie. W przypadku królików temperatura w pomieszczeniach dla zwierząt doświadczalnych powinna wynosić 20 °C ( $\pm$  3 °C). Chociaż wilgotność względna powinna wynosić co najmniej 30 % i pożądane jest, żeby nie przekraczała 70 % poza czasem czyszczenia pomieszczenia, celem powinno być utrzymywanie jej na poziomie 50–60 %. Oświetlenie powinno być sztuczne w cyklu 12 godzin z dostępem światła i 12 godzin bez dostępu światła. Do żywienia można stosować konwencjonalne pasze laboratoryjne z nieograniczonym dostępem do wody pitnej.

#### **PROCEDURA BADANIA**

##### **Podawanie badanej substancji chemicznej**

10. Badana substancja chemiczna powinna zostać zaaplikowana na małym obszarze skóry (około 6 cm<sup>2</sup>) i przykryta płatkami gazy przytrzymywanym na miejscu przy pomocy taśmy niedrażniącej. W przypadku gdy bezpośrednie zaaplikowanie badanej substancji chemicznej nie jest niemożliwe (np. w przypadku cieczy lub niektórych past), badana substancja chemiczna powinna zostać najpierw nałożona na gazę, a następnie na skórę. Gaza powinna luźno przylegać do skóry i powinna być przyczepiona do skóry na czas trwania narażenia przy pomocy odpowiedniego opatrunku półokluzyjnego. Jeżeli badana substancja chemiczna została nałożona na płatek gazy, powinna zostać przyczepiona do skóry w sposób zapewniający dobry kontakt i równomierne rozprowadzenie badanej substancji chemicznej na skórze. Należy zapobiec dostępowi zwierzęcia do gazy oraz spożyciu lub inhalacji badanej substancji chemicznej przez zwierzę.
11. Badane substancje chemiczne w stanie ciekłym są na ogół stosowane w stanie nierozcieńczonym. W przypadku badania substancji stałych (które w razie potrzeby można sproszkować) badana substancja chemiczna powinna zostać rozcieńczona przy użyciu minimalnej ilości wody (lub, o ile to konieczne, innego odpowiedniego nośnika), wystarczającej do zapewnienia dobrego kontaktu ze skórą. Jeżeli stosowany jest inny nośnik niż woda, potencjalny wpływ nośnika na podrażnienia skóry przez badaną substancję chemiczną powinien być minimalny lub żaden.
12. O ile to możliwe, na zakończenie okresu narażenia, który na ogół trwa 4 godziny, pozostałości badanej substancji chemicznej powinny zostać usunięte przy użyciu wody lub innego odpowiedniego rozcieńczalnika w sposób pozwalający na uniknięcie zmian w zaistniałej reakcji oraz nienaruszenie naskórka.

##### **Poziom dawki**



13. Na badany obszar skóry aplikowana jest dawka 0,5 ml cieczy lub 0,5 g ciała stałego lub pasty.

**Badanie wstępne (Badanie *in vivo* działania drażniącego/żrącego na skórę przy użyciu jednego zwierzęcia)**

14. Jeżeli na podstawie analizy wagi dowodów lub wcześniejszych badań *in vivo* oceniono, że badana substancja chemiczna może mieć działanie żrące, drażniące lub niesklasyfikowane, nie są wymagane dalsze badania *in vivo*. Jednakże w przypadkach gdzie istnieje potrzeba dostarczenia dodatkowych danych, przeprowadza się badanie *in vivo* przy użyciu jednego zwierzęcia z zastosowaniem procedury opisanej poniżej. Na skórę zwierzęcia nakłada się maksymalnie do trzech płatków gazy z badaną substancją. Pierwszy płatek gazy jest usuwany po trzech minutach. Jeżeli nie zaobserwowano żadnych poważnych reakcji skórnych, drugi płatek gazy jest nakładany w innym miejscu i usuwany po godzinie. Jeżeli obserwacje na tym etapie wskazują na to, że narażenie można wydłużyć w sposób humanitarny do czterech godzin, trzeci płatek gazy jest nakładany i zdejmowany po czterech godzinach, a reakcja klasyfikowana punktowo.
15. Jeżeli działanie żrące zostaje stwierdzone po jednym z trzech sekwencyjnych narażeń, badanie zostaje natychmiast przerywane. W przypadku niestwierdzenia działania żrącego po usunięciu ostatniego płatka gazy, zwierzę jest poddawane obserwacji przez okres 14 dni, o ile wcześniej nie rozwinie się uszkodzenie skóry.
16. W przypadku gdy nie przewiduje się, że badana substancja chemiczna może powodować działanie żrące, lecz może wywoływać podrażnienia, należy zaaplikować jednemu zwierzęciu jeden płatek gazy na czas czterech godzin.

**Badanie potwierdzające (Badanie *in vivo* działania drażniącego na skórę przy wykorzystaniu dodatkowych zwierząt)**

17. W przypadku niestwierdzenia działania żrącego w badaniach wstępnych działanie drażniące lub brak działania należy potwierdzić, wykorzystując maksymalnie dwa dodatkowe zwierzęta i stosując u każdego z nich jedną gazę przez cztery godziny narażenia. W przypadku stwierdzenia działania drażniącego w badaniu wstępnym, badanie potwierdzające może zostać przeprowadzone w sposób sekwencyjny lub poprzez narażenie dwóch dodatkowych zwierząt jednocześnie. W wyjątkowym przypadku nieprzeprowadzania badania wstępnego, można zbadać dwa lub trzy zwierzęta, z których każde zostanie poddane działaniu badanej substancji na jednym płatku gazy, usuniętym następnie po czterech godzinach. Jeżeli w przypadku wykorzystywania dwóch zwierząt, obydwa wykazują te same reakcje, nie wymaga się przeprowadzania dalszych badań. W innym wypadku zbadane zostaje również trzecie zwierzę. Niejednoznaczna reakcja może wymagać oceny z wykorzystaniem dodatkowych zwierząt.

**Okres obserwacji**

18. Długość trwania obserwacji powinna być wystarczająca do pełnej oceny odwracalności zaobserwowanych efektów. Jednakże eksperyment powinien zostać przerwany, skoro tylko zwierzę zacznie wykazywać trwałe objawy silnego bólu lub stresu. W celu określenia odwracalności skutków zwierzę powinno być obserwowane przez okres maksymalnie 14 dni od usunięcia płatków gazy. W przypadku zaobserwowania odwracalności przed upływem 14 dni, eksperyment powinien zostać przerwany.

### **Obserwacja kliniczna i ocena punktowa reakcji skóry**

19. Zwierzęta powinny zostać zbadane pod kątem wystąpienia objawów rumienia i obrzęku oraz reakcji odnotowanych po 60 minutach, a następnie po 24, 48 oraz 72 godzinach od usunięcia płatka gazy. W badaniu wstępnym przeprowadzanym na jednym zwierzęciu miejsce zaaplikowania badanej substancji chemicznej jest również badane natychmiast po usunięciu płatka gazy. Reakcje skórne są oceniane przy pomocy wartości punktowych i zapisywane zgodnie z punktacją podaną w tabeli poniżej. W przypadku uszkodzenia naskórka, którego nie można zidentyfikować jako działania drażniącego ani żrącego po 72 godzinach, w celu określenia odwracalności efektów konieczne może okazać się prowadzenie obserwacji do 14. dnia. Oprócz spostrzeżeń na temat działania drażniącego należy w pełni opisać i zarejestrować wszelkie miejscowe efekty toksyczne, takie jak odłuszczenie skóry oraz wszelkie niepożądane skutki ogólnoustrojowe (np. skutki klinicznych objawów toksyczności i utrata masy ciała). Celem wyjaśnienia niejednoznacznych reakcji można posłużyć się badaniem histopatologicznym.
20. Ocena punktowa reakcji skóry jest z konieczności subiektywna. Celem propagowania harmonizacji punktowej oceny reakcji skóry oraz zapewnienia pomocy laboratoriom badawczym oraz osobom zaangażowanym w prowadzenie oraz interpretację obserwacji, personel prowadzący obserwacje powinien być odpowiednio przeszkolony w zakresie stosowanego systemu oceny (zob. tabela poniżej). Pomocne mogą okazać się ilustrowane instrukcje dotyczące klasyfikacji podrażnień i innych uszkodzeń skóry (3).

### **DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ**

21. Streszczenie wyników badań powinno zostać przedstawione w sprawozdaniu końcowym z badań w formie tabeli, która powinna zawierać wszystkie pozycje wymienione w sekcji 24.

### **Ocena wyników**

22. Wynik badania działania drażniącego na skórę powinien być oceniany stosownie do charakteru oraz natężenia uszkodzeń, oraz z uwzględnieniem ich odwracalności lub jej braku. Poszczególne wyniki nie stanowią normy bezwzględnej działania drażniącego na skórę danego materiału, ponieważ ocenie poddawane są również pozostałe skutki narażenia na badany materiał. Poszczególne wyniki powinny natomiast być traktowane

jako wartości odniesienia, które muszą być oceniane w świetle wszystkich pozostałych spostrzeżeń z badań.

23. W ocenie uszkodzeń skóry pod uwagę powinna być brana odwracalność zmian skóry. Jeżeli reakcje takie jak alopecja (na ograniczonej powierzchni), hiperkeratoza, hiperplazja i łuszczenie są nadal obecne wraz z upływem 14-dniowego okresu obserwacji, badana substancja chemiczna powinna zostać uznana za drażniącą.

### **Sprawozdanie z badania**

24. Sprawozdanie z badania musi zawierać następujące informacje:

#### *Uzasadnienie badań in vivo:*

- analiza wagi dowodów pochodzących z danych z dotychczasowych badań, w tym wyniki strategii badań sekwencyjnych;
- opis odpowiednich danych dostępnych z uprzednio przeprowadzonych badań;
- dane uzyskane w wyniku realizacji każdego etapu strategii badawczej;
- opis przeprowadzonych badań *in vitro*, w tym szczegółowe dane na temat procedur, wyników otrzymanych z zastosowaniem substancji testowych/odniesienia;
- analiza wagi dowodów dla celów przeprowadzenia badania *in vivo*.

#### *Badana substancja chemiczna:*

- substancja jednoskładnikowa: dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa IUPAC lub CAS, numer CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny, czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń, stosownie do przypadku i jeśli jest to praktycznie wykonalne itp.;
- substancja wieloskładnikowa, mieszanina i substancje o nieznanym lub zmiennym składzie, złożone produkty reakcji lub materiały biologiczne (UVCB): opisane w miarę możliwości przez podanie nazwy chemicznej (zob. powyżej), określenie ilości oraz istotnych właściwości fizykochemicznych składników;
- wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne;
- źródło, numer partii (jeżeli dostępny);
- w stosownych przypadkach obróbka badanej substancji chemicznej/substancji kontrolnej przed badaniem (np. ogrzanie, rozdrobnienie);
- stabilność badanej substancji chemicznej, termin przydatności lub data ponownej analizy, jeżeli są znane;
- warunki przechowywania.

*Nośnik:*

- identyfikacja, stężenie (jeżeli dotyczy) użyta objętość;
- uzasadnienie wyboru nośnika.

*Badane zwierzę (zwierzęta):*

- wykorzystany gatunek/szczep, uzasadnienie wykorzystania zwierząt innych niż królik albinos;
- liczba zwierząt każdej płci;
- indywidualna masa ciała na początku i na końcu badania,
- wiek na początku badania;
- źródło pochodzenia zwierząt, warunki utrzymywania, pasza itp.

*Warunki badania:*

- technika przygotowywania miejsc nałożenia płatków gazy;
- szczegółowy opis materiału, z którego wykonane są płatki gazy i sposób ich nakładania;
- szczegóły dotyczące przygotowania, zaaplikowania i usunięcia badanej substancji chemicznej.

*Wyniki:*

- tabele wyników działania drażniącego/żrącego dla każdego zwierzęcia w każdym punkcie czasowym pomiaru;
- opis wszelkich zaobserwowanych uszkodzeń;
- słowny opis charakteru i stopnia zaobserwowanego działania drażniącego lub żrącego oraz wszystkie wyniki badania histopatologicznego;
- opis innych niekorzystnych zmian miejscowych i ogólnoustrojowych (np. odłuszczenia skóry) towarzyszących działaniu drażniącemu lub żrącemu.

*Omówienie wyników*

*Wnioski*

**BIBLIOGRAFIA**

- (1) OECD (2014). *Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion*, [w:] *Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment*, (nr 203), Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.
- (2) OECD (1998) *Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances*, zatwierdzony na 28. wspólnym posiedzeniu komitetu ds. substancji chemicznych i grupy roboczej ds. substancji chemicznych w listopadzie 1998 r.
- (3) OECD (2000). *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, [w:] *Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment* (nr 19), Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

## **TABELA: PUNKTOWA OCENA REAKCJI SKÓRY**

### **Tworzenie rumienia i obrzęku**

Brak rumienia...0

Bardzo lekki rumień (prawie niewidoczny)...1

Dobrze zdefiniowany rumień...2

Rumień umiarkowany do mocnego...3

Mocny rumień (czerwień przypominająca barwę mięsa czerwonego) do form obrzęku wykluczających klasyfikację zmiany jako rumienia... 4

Maksymalna możliwa wartość punktowa: 4

### **Tworzenie się obrzęku**

Brak obrzęku...0

Bardzo słaby obrzęk (prawie niewidoczny)...1

Lekki obrzęk (dobrze wyodrębniony)...2

Umiarkowany obrzęk (wzniesienie na około 1 mm)...3

Mocny obrzęk (wzniesienie ponad 1 mm, sięgający poza obszar narażenia)...4

Maksymalna możliwa wartość punktowa: 4

Celem wyjaśnienia reakcji niejednoznacznych można przeprowadzić badanie histopatologiczne.

## **Dodatek**

### **DEFINICJE**

Substancja chemiczna oznacza substancję lub mieszaninę.

Działanie drażniące na skórę jest wynikiem odwracalnych uszkodzeń skóry wynikających z zastosowania substancji badanej przez okres do czterech godzin.

Działanie żrące na skórę jest wynikiem nieodwracalnego uszkodzenia skóry; tj. widocznej martwicy przebiegającej przez naskórek w głąb skóry, spowodowanej naniesieniem badanej substancji chemicznej na okres nieprzekraczający czterech godzin. Reakcjami na działanie żrące są wrzody, krwotoki, krwawiące strupy oraz – po zakończeniu 14-dniowej obserwacji – odbarwienia wynikłe ze zblednięcia skóry, obszary jednolitej alopecji, a także blizny. Celem oceny wątpliwych uszkodzeń można przeprowadzić badanie histopatologiczne.

Badana substancja chemiczna oznacza każdą substancję lub mieszaninę badaną za pomocą niniejszej metody badawczej”;

2) w części B rozdział B.17 otrzymuje brzmienie:

## **„B.17 TESTY MUTACJI GENOWYCH NA KOMÓRKACH SSAKÓW *IN VITRO* Z WYKORZYSTANIEM GENÓW HPRT I XPRT**

### **WPROWADZENIE**

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD nr 476 (2016). Metody badawcze są poddawane okresowemu przeglądowi w związku z postępem naukowym, zmieniającymi się potrzebami regulacyjnymi oraz troską o dobrostan zwierząt. Niniejsza zaktualizowana wersja metody badawczej B.17 odzwierciedla prawie trzydzieści lat doświadczenia w stosowaniu metody badawczej, a także stanowi efekt opracowania oddzielnej nowej metody przeznaczonej do testów mutacji genowych na komórkach ssaków *in vitro* z wykorzystaniem genu kinazy tymidynowej. Metoda badawcza B.17 stanowi część serii metod dotyczących toksykologii genetycznej. OECD opracowała dokument, który zawiera zwięzłe informacje na temat badań w zakresie toksykologii genetycznej oraz przegląd najnowszych zmian, jakie wprowadzono do wytycznych OECD dotyczących badań w zakresie toksykologii genetycznej (1).
2. Celem testu mutacji genowych na komórkach ssaków *in vitro* jest wykrycie mutacji genowych wywołanych przez substancje chemiczne. Linie komórkowe stosowane w tych badaniach mierzą mutacje pierwotne w genach reporterowych, w szczególności w endogennym genie fosforybozylotransferazy hipoksantynowo-guaninowej (Hprt w komórkach gryzoni, HPRT w komórkach ludzkich; w niniejszej metodzie badawczej zbiorczo zwane genem Hprt i badaniem HPRT) i transgenu fosforybozylotransferazy hipoksantynowo-guaninowej (GPT) (zwanego badaniem XPRT). Badania mutacji HPRT oraz XPRT wykrywają różne widma zdarzeń genetycznych. Poza zdarzeniami mutacji wykrywanymi przy pomocy badania HPRT (np. mutacjami punktowymi, zmianami fazy odczytu, niewielkimi delecjami i insercjami) lokalizacja w autosomie transgenu GPT może pozwolić na wykrycie mutacji powodowanych dużymi delecjami i możliwe, że również rekombinacji mitotycznej niewykrytej w badaniu HPRT z powodu umiejscowienia genu Hprt na chromosomie X (2)(3)(4)(5)(6)(7). Metoda badania XPRT jest obecnie stosowana do celów regulacyjnych w mniejszym zakresie niż badanie HPRT.
3. Zastosowane definicje znajdują się w dodatku 1.

### **ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA**

4. Badania przeprowadzane *in vitro* wymagają zazwyczaj wykorzystania egzogenego źródła aktywacji metabolicznej. Egzogeny układ metabolizujący nie jest w stanie całkowicie naśladować warunków *in vivo*.



5. Należy zachować ostrożność, aby uniknąć wystąpienia warunków, które mogłyby prowadzić do zniekształconych wyników dodatnich (tj. do potencjalnej interakcji z układem badawczym) niespowodowanych bezpośrednią interakcją między badanymi substancjami chemicznymi a materiałem genetycznym komórki; do takich warunków zalicza się zmiany pH lub osmolalności (8)(9)(10), interakcje z elementami podłoża (11)(12) bądź zbyt wysokie poziomy cytotoxyczości (13). Cytotoxyczość przekraczającą zalecane najwyższe poziomy cytotoxyczości ustanowione w pkt 19 uznaje się za zbyt wysoką w przypadku badania HPRT.
6. Przed zastosowaniem przedmiotowej metody badawczej z użyciem mieszaniny w celu zgromadzenia danych na potrzeby założonego celu regulacyjnego należy zastanowić się, czy zastosowanie tej metody może doprowadzić do uzyskania wyników odpowiednich z punktu widzenia tego celu, a jeżeli tak, to dlaczego. Przeprowadzenie takiej analizy nie jest konieczne, jeżeli istnieje wymóg regulacyjny dotyczący badania danej mieszaniny.

## **ZASADA BADANIA**

7. Zmutowane komórki charakteryzujące się niedoborem aktywności enzymów HPRT w badaniu HPRT lub niedoborem aktywności enzymów XPRT w badaniu XPRT są odporne na działanie cytostatyczne 6-tioguaniny (TG) będącej analogiem puryny. Komórki, w przypadku których odnotowuje się prawidłowy poziom enzymów HPRT (w ramach badania HPRT) lub enzymów GPT (w ramach badania XPRT), są wrażliwe na TG, która powoduje wstrzymanie komórkowej przemiany materii oraz zatrzymuje dalsze dzielenie się komórek. W ten sposób zmutowane komórki są w stanie rozmnażać się w obecności TG, natomiast normalne komórki, które zawierają enzymy HPRT (w przypadku badania HPRT) lub GPT (w przypadku badania XPRT), nie mogą.
8. Komórki w zawieszynie lub w jednowarstwowych hodowlach są poddawane działaniu badanej substancji chemicznej, zarówno z udziałem jak i bez udziału egzogennej aktywacji metabolicznej (zob. pkt 14), przez odpowiedni okres (3–6 godzin), a następnie hodowane wtórnie w celu oznaczenia cytotoxyczości oraz dopuszczenia do ekspresji fenotypowej przed wybraniem mutanta (14)(15)(16)(17). Cytotoxyczość jest oznaczana na podstawie względnego wskaźnika przeżyć, tj. skuteczności klonowania mierzonej natychmiast po zakończeniu poddawania działaniu substancji i skorygowanej o wszelkie komórki utracone w trakcie działania substancji badanej w stosunku do kontroli ujemnej (pkt 18 dodatku 2). Kultury poddane działaniu substancji są utrzymywane na podłożu przez okres odpowiedni dla każdego wybranego rodzaju komórki, aby umożliwić zbliżoną do optymalnej ekspresję fenotypową wywołanych mutacji (zazwyczaj co najmniej 7–9 dni). Po uzyskaniu ekspresji fenotypowej oznacza się częstość występowania mutacji, dokonując posiewu określonej liczby komórek na podłożu zawierającym czynnik selektywny w celu wykrycia kolonii zmutowanych komórek oraz na podłożu pozbawionym takiego czynnika selektywnego, aby oznaczyć skuteczność klonowania

(żywołność). Kolonie liczy się po upływie odpowiedniego okresu inkubacji. Częstość występowania mutacji oblicza się na podstawie liczby kolonii zmutowanych komórek skorygowanej o wartość wskaźnika skuteczności klonowania w momencie wyboru zmutowanych komórek.

## OPIS METODY

### Czynności przygotowawcze

#### *Komórki*

9. Rodzaje komórek wykorzystywane w badaniach HPRT i XPRT powinny charakteryzować się wykazaną wrażliwością na oddziaływanie mutagenów, wysoką skutecznością klonowania, stabilnym kariotypem oraz stabilną spontaniczną częstością występowania mutacji. Wśród rodzajów komórek powszechnie wykorzystywanych w badaniach HPRT należy wymienić linie komórkowe CHO, CHL i V79 chomika chińskiego, mysie komórki chłoniaków L5178Y oraz ludzkie komórki limfoblastyczne TK6 (18)(19). W badaniu XPRT wykorzystuje się komórki AS52 pochodzące z linii CHO i zawierające transgen GPT, z których usunięto gen HPRT (20)(21); komórki AS52 nie mogą zostać poddane badaniu HPRT, ponieważ usunięty został gen HPRT. Korzystanie z innych linii komórkowych powinno zostać uzasadnione i zatwierdzone.
10. Linie komórkowe powinny być rutynowo sprawdzane pod kątem stabilności zmiennej liczby chromosomów oraz braku zanieczyszczenia mykoplazmą (22)(23), a komórki nie powinny być wykorzystywane, jeżeli są zanieczyszczone lub doszło do zmiany zmiennej liczby chromosomów. Należy ustalić normalny czas trwania cyklu komórkowego wykorzystywanego w laboratorium badawczym, który powinien być zgodny z opublikowanymi właściwościami komórek. Należy również sprawdzić spontaniczną częstość występowania mutacji w banku komórek macierzystych – w przypadku stwierdzenia, że wskaźnik częstości występowania mutacji w danej kulturze jest niedopuszczalny, taka kultura nie powinna być wykorzystywana.
11. Przed wykorzystaniem kultur do celów tego badania konieczne może okazać się ich oczyszczenie z powstałych wcześniej zmutowanych komórek, np. poprzez hodowanie komórek na podłożu HAT w przypadku badania HPRT oraz na podłożu MPA w przypadku badania XPRT (5)(24) (zob. dodatek 1). Oczyszczone komórki mogą zostać poddane krioprezerwacji, a następnie rozmrożone w celu ich wykorzystania w charakterze kultur roboczych. Nowo rozmrożona kultura robocza może zostać wykorzystana do celów badania po osiągnięciu standardowych czasów podwojenia. Przy przeprowadzaniu badania XPRT rutynowa kultura komórek AS52 powinna być utrzymywana w warunkach gwarantujących zachowanie transgenu GPT (20).

### Podłoża i warunki hodowli kultur

12. W celu utrzymania kultur należy zastosować odpowiednie podłoże oraz warunki inkubacji (naczynia do hodowli komórkowych, wilgotne środowisko o zawartości CO<sub>2</sub> wynoszącej 5 %, oraz temperatura inkubacji 37 °C). Kultury komórkowe powinny być zawsze utrzymywane w warunkach zapewniających fazę logarytmicznego wzrostu. W tym kontekście szczególne znaczenie ma dobór podłoża i warunków hodowli kultur w taki sposób, aby zapewnić optymalny wzrost komórek w okresie ekspresji oraz optymalną skuteczność klonowania zarówno w przypadku komórek zmutowanych, jak i komórek niezmutowanych.

### **Przygotowanie kultur**

13. Linie komórkowe są rozmnażane z kultur wyjściowych i wysiewane na podłoże z taką gęstością, by komórki w zawiesinach lub jednowarstwowych hodowlach mogły nadal rosnąć wykładniczo przez okres poddawania działaniu substancji i okres ekspresji (np. należy unikać konfluencji w przypadku komórek rosnących w jednowarstwowych hodowlach).

### **Aktywacja metaboliczna**

14. Egzogenne układy metabolizujące powinny być stosowane w przypadku wykorzystania komórek o nieodpowiedniej endogennej wydolności metabolicznej. Najpowszechniej stosowanym układem, który jest domyślnie zalecany, jeżeli w danym przypadku nie występują czynniki uzasadniające zastosowanie innego układu, jest frakcja postmitochondrialna suplementowanego kofaktora (S9) przygotowywana z wątrób gryzoni (najczęściej szczurów) poddawanych działaniu substancji indukujących enzymy takich jak Aroclor 1254 (25)(26)(27)(28) lub połączenie fenobarbitalu i β-naftoflawonu (29)(30)(31)(32). Stosowanie tego ostatniego połączenia substancji nie narusza postanowień Konwencji sztokholmskiej w sprawie trwałych zanieczyszczeń organicznych (33), przy czym połączenie to okazało się równie skuteczne jak Aroclor 1254 w indukowaniu oksydaz wieloczynnościowych (29)(31). Frakcja S9 jest zazwyczaj wykorzystywana w stężeniach mieszczących się w przedziale 1–2 % (objętościowo), ale stężenie to może zostać zwiększone do 10 % (objętościowo) w końcowym podłożu badawczym. Klasa badanych substancji może wywierać wpływ na rodzaj i stężenie stosowanego egzogenego układu metabolizującego lub czynnika pobudzającego metabolizm (34)(35)(36).

### **Przygotowanie badanej substancji chemicznej**

15. Badane substancje chemiczne w stanie stałym należy rozpuścić w odpowiednich rozpuszczalnikach oraz – w stosownych przypadkach – rozcieńczyć przed poddaniem komórek ich działaniu (zob. pkt 16). Badane substancje chemiczne w stanie ciekłym można dodać do układu badawczego bezpośrednio lub rozcieńczyć je przed poddaniem układu badawczego ich działaniu. Badane substancje chemiczne w stanie gazowym lub lotnym należy badać, wprowadzając stosowne modyfikacje w standardowych protokołach,

np. poddając układ działania substancji w szczelnie zamkniętych naczyniach do hodowli komórkowych (37)(38). Preparaty badanej substancji chemicznej należy przygotowywać tuż przed poddaniem komórek jej działaniu, chyba że dane dotyczące stabilności wskazują, że dopuszczalne jest składowanie substancji.

## **WARUNKI BADANIA**

### **Rozpuszczalniki**

16. Rozpuszczalnik należy wybrać tak, aby zoptymalizować rozpuszczalność badanych substancji chemicznych, unikając niepożądanego wpływu na przebieg badania, np. zmiany wzrostu komórek, wpływu na integralność badanej substancji chemicznej, reakcji z naczyniami do hodowli komórkowych czy zakłócenia układu metabolizującego. Zaleca się, aby w miarę możliwości w pierwszej kolejności rozważyć możliwość zastosowania wodnego rozpuszczalnika (lub podłoża). Sprawdzone rozpuszczalnikami są na przykład woda i siarkowodorek dimetylu. Zasadniczo zawartość rozpuszczalników organicznych nie powinna przekraczać 1 % (obj.) a zawartość rozpuszczalników wodnych (soli fizjologicznej lub wody) w końcowym podłożu użytym do badania nie powinna przekroczyć 10 % (obj.). Jeżeli używane są niesprawdzone rozpuszczalniki (np. etanol czy aceton), ich użycie powinno być uzasadnione danymi, które potwierdzają ich zgodność z badanymi substancjami chemicznymi oraz z układem badawczym, a także brak właściwości świadczących o toksyczności genetycznej w zastosowanym stężeniu. W przypadku braku takich danych potwierdzających, należy uwzględnić dodatkowe kontrole niepoddane działaniu substancji (zob. dodatek 1), aby wykazać, że wybrany rozpuszczalnik nie wywołuje szkodliwych ani mutagennych skutków.

### **Pomiar cytotoksyczności i wybór stężeń ekspozycyjnych**

17. Przy ustalaniu najwyższego stężenia badanej substancji chemicznej należy unikać stężeń, które mogą doprowadzić do zniekształconych wyników dodatnich, np. stężeń wywołujących nadmierną cytotoksyczność (zob. pkt 20), wytrącania substancji w podłożu (zob. pkt 21) lub znacznej zmiany w pH lub osmolalności (zob. pkt 5). Jeżeli badana substancja chemiczna wywołuje znaczną zmianę pH podłoża w momencie jej dodania, poziom pH można skorygować, buforując końcowe podłoże użyte do badania, aby uniknąć zniekształconych wyników dodatnich i utrzymać odpowiednie warunki hodowli kultur.
18. Wyboru stężenia dokonuje się na podstawie poziomu cytotoksyczności oraz innych parametrów (zob. pkt 20–22). Choć dokonanie oceny cytotoksyczności na etapie badania wstępnego może przyczynić się do precyzyjniejszego określenia stężeń, które mają zostać zastosowane w ramach głównego doświadczenia, wykonanie takiego badania wstępnego nie jest wymagane. Nawet w przypadku dokonania wstępnej oceny cytotoksyczności, w ramach głównego doświadczenia należy wykonać ponownie pomiar cytotoksyczności w odniesieniu do każdej kultury. Ocenę cytotoksyczności należy przeprowadzić w oparciu

o względny wskaźnik przeżyć, tj. wskaźnik skuteczności klonowania komórek posianych natychmiast po poddaniu działaniu substancji skorygowany o wszelkie komórki utracone w trakcie działania substancji na podstawie liczby komórek w stosunku do skorygowanego wskaźnika skuteczności klonowania w kontrolach ujemnych (którym przypisano wskaźnik przeżycia wynoszący 100 %) (odpowiedni wzór zawarto w dodatku 2).

19. Należy ocenić co najmniej cztery badane stężenia (poza kontrolami z rozpuszczalnikiem i kontrolami dodatnimi), które spełniają kryteria dopuszczalności (odpowiednia cytotoksyczność, liczba komórek itp.). Choć zaleca się korzystanie ze zduplikowanych kultur, w odniesieniu do każdego badanego stężenia dopuszcza się możliwość stosowania kontrprób albo pojedynczych kultur poddawanych działaniu substancji. Wyniki uzyskane na podstawie niezależnych zduplikowanych kultur przy danym stężeniu należy zgłaszać odrębnie, ale dopuszcza się możliwość ich łączenia na potrzeby analizy danych (17). W przypadku badanych substancji chemicznych wykazujących niewielką cytotoksyczność lub niewykazujących cytotoksyczności na ogół odpowiednie będzie zastosowanie 2–3-krotnych przedziałów stężenia. W przypadku wystąpienia cytotoksyczności wybrane badane stężenia powinny obejmować zakres rozpoczynający się od stężenia, które wykazuje cytotoksyczność, oraz uwzględniający stężenia, w których wystąpiła umiarkowana i niewielka cytotoksyczność lub nie wystąpiła cytotoksyczność. W przypadku wielu badanych substancji chemicznych można zaobserwować strome krzywe ilustrujące zależność stężenie-odpowiedź, dlatego też aby uwzględnić cały zakres cytotoksyczności lub szczegółowo zbadać zależność stężenie-odpowiedź, konieczne może okazać się zastosowanie więcej niż czterech stężeń o bardziej zbliżonych wartościach – dotyczy to zwłaszcza przypadków, w których zachodzi konieczność powtórzenia doświadczenia (zob. pkt 43). Stosowanie więcej niż 4 stężeń może mieć szczególnie istotne znaczenie w przypadku korzystania z pojedynczych kultur.
20. Jeżeli maksymalne stężenie określono na podstawie cytotoksyczności, należy dążyć do tego, by poziom takiego maksymalnego stężenia doprowadził do uzyskania względnego wskaźnika przeżyć na poziomie od 20 do 10 %. Należy przy tym zachować ostrożność przy interpretowaniu wyników dodatnich uzyskiwanych wyłącznie przy względnym wskaźniku przeżyć na poziomie 10 % lub niższym (pkt 43).
21. W przypadku słabo rozpuszczalnych badanych substancji chemicznych, które nie wykazują cytotoksyczności w stężeniach niższych od najniższego stężenia nierozpuszczalnego, najwyższy poziom stężenia wykorzystanego w badaniu powinien wywołać zmętnienie lub doprowadzić do wytrącenia się osadu widocznego gołym okiem lub przez mikroskop odwrócony pod koniec poddawania działaniu badanej substancji. Nawet jeżeli cytotoksyczność wystąpi powyżej najniższego stężenia nierozpuszczalnego, zaleca się przeprowadzenie badania przy zastosowaniu wyłącznie jednego stężenia wywołującego zmętnienie lub skutkującego wytrącaniem się widocznego osadu, ponieważ osad może prowadzić do uzyskania zniekształconych wyników. W przypadku stężenia

powodującego powstanie osadu należy zadbać, aby pojawienie się osadu nie zakłóciło przebiegu badania. Pomocne może okazać się oznaczenie rozpuszczalności w podłożu przed przeprowadzeniem doświadczenia.

22. Jeżeli nie zaobserwowano żadnego osadu ani ograniczenia cytotoksyczności, najwyższe badane stężenie powinno odpowiadać 10 mM, 2 mg/ml lub 2 µl/ml, w zależności od tego, która z tych wartości jest najniższa (39)(40). Jeżeli badana substancja chemiczna nie ma określonego składu, np. substancje o nieznanym lub zmiennym składzie, złożone produkty reakcji lub materiały biologiczne (tj. substancje chemiczne o nieznanym lub zmiennym składzie (UVCB)) (41), wyciągi pochodzące ze środowiska itp., może być konieczne podwyższenie najwyższego stężenia (np. do 5 mg/ml) w przypadku braku dostatecznej cytotoksyczności, aby zwiększyć stężenie każdego ze składników. Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, że wymagania te mogą być inne w przypadku produktów leczniczych przeznaczonych dla ludzi (42).

### Kontrole

23. Dla każdego warunku doświadczalnego należy włączyć jednoczesne kontrole ujemne (zob. pkt 16) obejmujące sam rozpuszczalnik w podłożu użytym do badania, w odniesieniu do których podjęto takie same czynności jak w odniesieniu do kultur poddanych działaniu substancji.
24. Jednoczesne kontrole dodatnie są niezbędne do wykazania zdolności danego laboratorium do zidentyfikowania mutagenów w warunkach określonych w zastosowanym protokole badania oraz, w stosownych przypadkach, skuteczności egzogenego układu metabolizującego. W tabeli 1 poniżej przedstawiono przykłady kontroli dodatnich. W uzasadnionych przypadkach dopuszcza się możliwość stosowania alternatywnych substancji służących do kontroli dodatniej. Ponieważ badania na komórkach ssaków *in vitro* pod kątem toksyczności genetycznej są w dostatecznym stopniu znormalizowane, badania, w których komórki poddaje się działaniu substancji z udziałem i bez udziału egzogennej aktywacji metabolicznej, można przeprowadzić wyłącznie przy wykorzystaniu kontroli dodatniej wymagającej aktywacji metabolicznej. W takim przypadku wspomniana pojedyncza reakcja kontroli dodatniej potwierdzi zarówno aktywność układu metabolizującego, jak i reaktywność układu badawczego. Każdą kontrolę dodatnią należy zastosować z co najmniej jednym stężeniem, w odniesieniu do którego oczekuje się uzyskania odtwarzalnych oraz wykrywalnych wzrostów powyżej tła, w celu wykazania czułości układu badawczego, przy czym reakcja nie powinna być zakłócona cytotoksycznością wykraczającą poza limity określone w niniejszej metodzie badawczej (zob. pkt 20).

**Tabela 1:** Substancje odniesienia, z których zaleca się korzystać przy przeprowadzaniu oceny biegłości laboratorium i przy dokonywaniu wyboru kontroli dodatnich.

| Warunek aktywacji metabolicznej             | Locus       | Substancja i nr CAS                                                                                                           |
|---------------------------------------------|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Brak egzogennej aktywacji metabolicznej     | <i>HPRT</i> | Metanosulfonat etylu [nr CAS 62-50-0]<br>Nitrozomocznik etylu [nr CAS 759-73-9]<br>1-tlenek-4-nitrochinoliny [nr CAS 56-57-5] |
|                                             | <i>XPRT</i> | Streptonigryna [nr CAS 3930-19-6]<br>Mitomycyna C [nr CAS 50-07-7]                                                            |
| Obecność egzogennej aktywacji metabolicznej | <i>HPRT</i> | 3-metylocholantrén [nr CAS 56-49-5]<br>7,12-antracen dimetylobenzenu [nr CAS 57-97-6]<br>Benzo[a]piren [nr CAS 50-32-8]       |
|                                             | <i>XPRT</i> | Benzo[a]piren [nr CAS 50-32-8]                                                                                                |

## PROCEDURA

### Poddanie działaniu badanej substancji chemicznej

25. Rozmnażające się komórki są poddawane działaniu badanej substancji chemicznej z udziałem i bez udziału układu metabolizującego. Narażenie na działanie badanej substancji powinno trwać dostatecznie długo (z reguły przyjmuje się, że odpowiedni okres narażenia na działanie substancji wynosi od 3 do 6 godzin).
26. Minimalną liczbę komórek wykorzystywanych w odniesieniu do każdej kultury (kontrolnej i poddawanej działaniu substancji) na poszczególnych etapach badania należy ustalić na podstawie wskaźnika spontanicznej częstości występowania mutacji. Ogólnie zaleca się poddawanie działaniu substancji i pasażowanie takiej liczby komórek, która będzie wystarczająca, aby utrzymać poziom 10 spontanicznie powstałych zmutowanych komórek w każdej kulturze na wszystkich etapach badania (17). Częstość spontanicznej mutacji waha się zazwyczaj w przedziale od 5 do 20 x 10<sup>-6</sup>. W przypadku gdy częstość występowania spontanicznej mutacji wynosi 5 x 10<sup>-6</sup>, utrzymanie wystarczającej liczby spontanicznie zmutowanych komórek (przynajmniej 10) również w kulturach poddanych działaniu substancji w stężeniach powodujących cytotoksyczność na poziomie 90 % (względny wskaźnik przeżyć wynoszący 10 %) wiązałoby się z koniecznością poddania działaniu substancji co najmniej 20 x 10<sup>6</sup> komórek. Ponadto w okresie ekspresji należy wyhodować wystarczającą liczbę komórek (co najmniej 2 mln), a następnie posiać te komórki w celu dokonania wyboru zmutowanych komórek (17).

### Czas ekspresji fenotypowej i pomiar częstości występowania mutacji

27. Po zakończeniu okresu poddawania działaniu substancji komórki hoduje się, aby umożliwić ekspresję fenotypu mutantów. Na ogół okres wynoszący co najmniej 7–9 dni wystarczy do zapewnienia niemal optymalnej ekspresji fenotypowej nowo wywołanych mutacji HPRT i XPRT (43)(44). W tym okresie z komórek regularnie wydzielają się kultury

poходne, aby podtrzymać ich wzrost wykładniczy. Po zakończeniu okresu ekspresji fenotypowej komórki ponownie posiewa się na podłożu z udziałem lub bez udziału czynnika selektywnego (6-tioguaniny), aby odpowiednio ustalić liczbę mutantów i określić skuteczność klonowania w momencie dokonywania wyboru. Takiego posiewu można dokonać przy wykorzystaniu płytek do jednowarstwowej hodowli kultur lub mikropłytek do komórek w zawieszynie. Na potrzeby wyboru mutantów komórki powinny zostać posiane z gęstością zapewniającą optymalny poziom pozyskiwania mutantów (tj. aby nie doszło do sprzężenia metabolicznego) (17). Posiane komórki inkubuje się przez odpowiedni czas, aby zapewnić optymalne tempo wzrostu kolonii (np. 7–12 dni), po czym liczy się kolonie. Częstość występowania mutacji oblicza się na podstawie liczby kolonii zmutowanych komórek skorygowanej o wartość wskaźnika skuteczności klonowania w momencie wyboru zmutowanych komórek (stosowne wzory przedstawiono w dodatku 2).

### **Biegłość laboratorium**

28. Aby ustalić, czy dane laboratorium ma dostateczne doświadczenie w zakresie przedmiotowego badania przed zastosowaniem go w rutynowych badaniach, powinno ono przeprowadzić szereg doświadczeń z wykorzystaniem referencyjnych substancji chemicznych służących do kontroli dodatniej, działających za pomocą różnych mechanizmów (co najmniej jedna substancja aktywna z udziałem aktywacji metabolicznej i jedna substancja aktywna bez udziału aktywacji metabolicznej, wybrane spośród substancji wymienionych w tabeli 1) oraz różnych kontroli ujemnych (różnych rozpuszczalników/nośników). Reakcje otrzymane w wyniku takiej kontroli dodatniej i ujemnej powinny odpowiadać reakcjom opisanym w literaturze. Nie dotyczy to laboratoriów, które mają odpowiednie doświadczenie, tj. laboratoriów prowadzących bazę danych historycznych, o której mowa w pkt 30–33.
29. Aby wykazać biegłość w zakresie wykrywania mutagennych substancji chemicznych, oznaczania skuteczności układu metabolizującego i wykazywania adekwatności warunków wzrostu komórek poddawanych działaniu substancji, ekspresji fenotypowej i wyboru mutantów oraz procedur oceny punktowej, należy zbadać szereg substancji chemicznych z udziałem i bez udziału aktywacji metabolicznej (zob. tabela 1 pkt 25). Należy dobrać zakres stężeń wybranych substancji tak, aby uzyskać powtarzalne i powiązane ze stężeniem wzrosty powyżej tła w celu wykazania czułości i zakresu oznaczania układu badawczego.

### **Dane historyczne dotyczące kontroli**

30. Laboratorium powinno ustalić:

- zakres i rozkład historycznych wyników kontroli dodatniej,
- zakres i rozkład historycznych wyników kontroli ujemnej (bez poddania działaniu substancji chemicznej, z rozpuszczalnikiem).



31. Przy pierwszym gromadzeniu danych dotyczących rozkładu historycznych wyników kontroli ujemnych wyniki jednoczesnych kontroli ujemnych powinny być zgodne z opublikowanymi danymi dotyczącymi kontroli (22). W miarę dodawania kolejnych danych doświadczalnych do rozkładu kontroli najlepiej byłoby, gdyby jednoczesne kontrole ujemne mieściły się w granicach kontrolnych wyznaczających przedział 95 % tego rozkładu (17)(45)(46).
32. Prowadzona przez dane laboratorium baza danych historycznych dotyczących kontroli ujemnych powinna początkowo zawierać dane z co najmniej 10 doświadczeń, a najlepiej z co najmniej 20 doświadczeń przeprowadzonych w porównywalnych warunkach doświadczalnych. Laboratoria powinny stosować metody kontroli jakości, takie jak karty kontrolne (np. karty C lub karty X-średnie (47)) w celu określania stopnia zmienności gromadzonych przez nie danych dotyczących kontroli dodatniej i ujemnej oraz w celu wykazania, że stosowana przez nie metodologia jest „pod kontrolą” (46). Dalsze zalecenia dotyczące sposobu gromadzenia i wykorzystywania danych historycznych (tj. kryteria włączania danych do zbioru danych historycznych i wykluczania danych z tego zbioru oraz kryteria dopuszczalności dla danego doświadczenia) można znaleźć w literaturze (45).
33. Dane dotyczące kontroli ujemnej powinny obejmować częstość występowania mutacji w pojedynczej kulturze lub, najlepiej, w zduplikowanych kulturach, jak opisano w pkt 23. Najlepiej byłoby, gdyby jednoczesne kontrole ujemne mieściły się w granicach kontrolnych wyznaczających przedział 95 % rozkładu danych zawartych w prowadzonej przez laboratorium bazie danych historycznych dotyczących kontroli ujemnych) (17)(45)(46). Jeżeli dane dotyczące jednoczesnych kontroli ujemnych nie mieszczą się w granicach kontrolnych wyznaczających przedział 95 %, włączenie ich do rozkładu kontroli historycznej może być dopuszczalne, pod warunkiem że dane te nie stanowią skrajnych obserwacji nietypowych oraz że istnieją dowody świadczące o tym, iż dany układ badawczy znajduje się „pod kontrolą” (zob. powyżej), a także dowody wykluczające błąd techniczny czy ludzki.
34. Wszelkie zmiany w protokole doświadczalnym należy rozpatrywać pod kątem ich spójności z dotychczas prowadzonymi przez laboratorium bazami danych historycznych dotyczących kontroli. Wszelkie poważne niespójności powinny skutkować utworzeniem nowej bazy danych historycznych dotyczących kontroli.

## **DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ**

### **Przedstawienie wyników**

35. Przedstawienie wyników powinno obejmować wszystkie dane niezbędne do obliczenia poziomu cytotoksyczności (wyrażonej jako względny wskaźnik przeżyć). Wspomniane dane, które dotyczą zarówno kultur poddanych działaniu substancji, jak i kultur kontrolnych, powinny uwzględniać liczbę komórek pod koniec poddawania działaniu

substancji, liczbę komórek posianych bezpośrednio po zakończeniu poddawania działaniu substancji oraz liczbę kolonii (lub liczbę dołków bez kolonii w przypadku metody mikropłytkowej). Względny wskaźnik przeżyć dla każdej kultury powinien zostać wyrażony jako odsetek w stosunku do równoczesnej kontroli z rozpuszczalnikiem (zob. dodatek 1, aby zapoznać się ze stosownymi definicjami).

36. Przedstawienie wyników powinno również obejmować wszystkie dane niezbędne do obliczenia częstości występowania mutacji. Dane dotyczące zarówno kultur poddanych działaniu substancji, jak i kultur kontrolnych, powinny obejmować: 1) liczbę komórek posianych z udziałem lub bez udziału czynnika selektywnego (w momencie posiewu komórek w celu wybrania komórek zmutowanych) oraz 2) liczbę kolonii (lub liczbę dołków bez kolonii w przypadku metody mikropłytkowej) na płytkach z czynnikiem selektywnym lub bez tego czynnika. Częstość występowania mutacji oblicza się na podstawie liczby kolonii zmutowanych komórek (na płytkach z czynnikiem selektywnym) skorygowanej o wartość wskaźnika skuteczności klonowania w momencie wyboru zmutowanych komórek (z płytek bez czynnika selektywnego). Częstość występowania mutacji powinna być wyrażona jako liczba zmutowanych komórek na milion komórek żywych (zob. dodatek 1, aby zapoznać się ze stosownymi definicjami).

37. Należy dostarczyć dane dotyczące poszczególnych kultur. Dodatkowo wszystkie dane należy przedstawić w postaci tabeli.

### **Kryteria dopuszczalności**

38. Dopuszczalność testu ocenia się na podstawie następujących kryteriów:

- uznaje się, że dopuszczalne jest włączenie danych dotyczących równoczesnych kontroli ujemnych do prowadzonej przez laboratorium bazy danych historycznych dotyczących kontroli ujemnych, jak opisano w pkt 33;
- równoczesne kontrole dodatnie (zob. pkt 24) powinny wywoływać reakcje zgodne z reakcjami odnotowanymi w bazie danych historycznych dotyczących kontroli dodatniej i wykazywać statystycznie istotny wzrost w porównaniu z równoczesną kontrolą ujemną;
- zbadano dwa warunki doświadczalne (z udziałem i bez udziału aktywacji metabolicznej) do momentu uzyskania w jednym z nich wyników dodatnich (zob. pkt 25);
- można poddać analizie wystarczającą liczbę komórek i stężeń (pkt 25, 26 i 19);
- kryteria wyboru najwyższego stężenia są spójne z kryteriami opisanymi w pkt 20, 21 i 22.

### **Ocena i interpretacja wyników**

39. O ile wszystkie kryteria dopuszczalności są spełnione, uznaje się, że badana substancja chemiczna daje wynik jednoznacznie dodatni, jeżeli w dowolnych ze zbadanych warunków doświadczalnych:

- co najmniej jedno z badanych stężeń wykazuje statystycznie istotny wzrost w porównaniu z równoczesną kontrolą ujemną,
- ocena przeprowadzona z zastosowaniem odpowiedniego testu tendencji pokazuje, że wzrost jest powiązany ze stężeniem,
- którykolwiek z wyników znajduje się poza rozkładem danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej (np. poza granicą kontrolną wyznaczającą przedział 95 % na podstawie rozkładu Poissona; zob. pkt 33).

W przypadku gdy wszystkie wspomniane kryteria zostały spełnione, uznaje się, że badana substancja chemiczna jest w stanie wywołać mutacje genowe w hodowanych komórkach ssaków w danym układzie badawczym. Zalecenia dotyczące najodpowiedniejszych metod statystycznych można znaleźć w literaturze (46)(48).

40. O ile wszystkie kryteria dopuszczalności zostały spełnione, uznaje się, że badana substancja chemiczna daje wynik jednoznacznie ujemny, jeżeli we wszystkich zbadanych warunkach doświadczalnych:

- żadne z badanych stężeń nie wykazuje statystycznie istotnego wzrostu w porównaniu z równoczesną kontrolą ujemną,
- ocena przeprowadzona z zastosowaniem odpowiedniego testu tendencji pokazuje, że wzrost nie jest powiązany ze stężeniem,
- wszystkie wyniki mieszczą się w rozkładzie danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej (np. w granicach kontrolnych wyznaczających przedział 95 % na podstawie rozkładu Poissona; zob. pkt 33).

Badaną substancję chemiczną uznaje się następnie za niezdolną do wywołania mutacji genowych w hodowanych komórkach ssaków w danym układzie badawczym.

41. Weryfikacja jednoznacznie dodatniej lub ujemnej reakcji nie jest wymagana.

42. Jeżeli reakcja nie jest ani jednoznacznie ujemna, ani jednoznacznie dodatnia, jak opisano powyżej, oraz aby ułatwić ustalenie biologicznego znaczenia wyniku, dane powinny zostać ocenione w oparciu o opinię eksperta lub dalsze badania. Przydatne może być powtórne przeprowadzenie doświadczenia, potencjalnie z zastosowaniem zmienionych warunków doświadczalnych (np. odstępów czasu między stężeniami, innych warunków aktywacji metabolicznej (tj. stężenie S9 lub pochodzenie S9)).

43. W rzadkich przypadkach nawet po przeprowadzeniu dalszych badań uzyskany zbiór danych uniemożliwi uznanie wyników za dodatnie lub ujemne. W takiej sytuacji należy uznać, że reakcja badanej substancji chemicznej jest niejednoznaczna (tj. może zostać zinterpretowana zarówno jako dodatnia, jak i jako ujemna).

**Sprawozdanie z badania**

44. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

*Badana substancja chemiczna:*

- źródło, numer partii, termin przydatności, jeżeli jest dostępny;
- stabilność badanej substancji chemicznej, jeżeli jest znana;
- rozpuszczalność i stabilność badanej substancji chemicznej w rozpuszczalniku, jeżeli są znane;
- pomiar pH, osmolalności i osadu w podłożu, do którego dodano badaną substancję chemiczną, stosownie do przypadku.

*Substancja jednoskładnikowa:*

- wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne;
- dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa IUPAC lub CAS, numer CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny, czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń, w stosownych przypadkach i jeśli jest to praktycznie wykonalne, itp.

*Substancja wieloskładnikowa, UVCB i mieszaniny:*

- opisane w miarę możliwości przez podanie nazwy chemicznej (zob. powyżej), określenie ilości oraz istotnych właściwości fizykochemicznych składników.

*Rozpuszczalnik:*

- uzasadnienie wyboru rozpuszczalnika;
- zawartość procentowa rozpuszczalnika w końcowym podłożu.

*Komórki:*

W przypadku głównych kultur laboratoryjnych:

- rodzaj i źródło komórek oraz linie komórkowe;
- liczba pasaży – o ile informacje na ten temat są dostępne – i dane historyczne dostępne w laboratorium;
- cechy kariotypu lub zmienna liczba chromosomów;
- metody utrzymywania kultur komórkowych;
- brak mykoplazmy;
- czasy podwojenia komórek.

*Warunki badania:*

- uzasadnienie wyboru stężeń oraz liczby kultur, z uwzględnieniem np. danych dotyczących cytotoksyczności oraz granic rozpuszczalności;
- skład podłoża, stężenie CO<sub>2</sub>, poziom wilgotności;
- stężenie badanej substancji chemicznej wyrażone jako stężenie końcowe w podłożu (np. µg lub mg/ml lub mM podłoża);
- stężenie (lub objętość) rozpuszczalnika i badanej substancji chemicznej dodanych do podłoża;
- temperatura inkubacji;
- okres inkubacji;
- czas poddawania działaniu substancji chemicznej;
- zagęszczenie komórek w trakcie poddawania działaniu substancji;
- typ oraz skład układu metabolizującego (źródło frakcji S9, metoda przygotowania preparatu frakcji S9, stężenie lub objętość preparatu frakcji S9 i frakcji S9 w końcowym podłożu, kontrole jakości frakcji S9);
- substancje służące do kontroli dodatniej i ujemnej, stężenia końcowe w poszczególnych warunkach poddawania działaniu substancji chemicznej;
- długość okresu ekspresji (w tym liczba posianych komórek i podkultur oraz – w stosownych przypadkach – schematy żywienia);
- nazwa czynnika selektywnego i jego stężenie;
- kryteria dopuszczalności badań;
- metody wykorzystywane do wyliczenia liczby żywotnych i zmutowanych komórek;
- metody wykorzystywane do pomiaru cytotoksyczności;
- wszelkie informacje uzupełniające istotne w kontekście cytotoksyczności i stosowanej metody;
- czas trwania okresów inkubacji po posiewie;
- kryteria uznawania wyników badań za dodatnie, ujemne lub niejednoznaczne;
- metody stosowane w celu ustalenia poziomu pH, osmolalności i strącania.

*Wyniki:*

- liczba komórek poddanych działaniu substancji chemicznej i liczba komórek w hodowli pochodnej z każdej kultury;
- wyniki pomiaru cytotoksyczności oraz ewentualne inne obserwacje;

- oznaki strącania i czas oznaczenia;
- liczba komórek posianych na podłożu selektywnym i nieselektywnym;
- liczba kolonii na podłożu nieselektywnym i liczba odpornych kolonii na podłożu selektywnym oraz powiązane częstości występowania mutacji;
- w stosownych przypadkach zależność stężenie-odpowiedź;
- dane dotyczące jednoczesnych kontroli ujemnych (z rozpuszczalnikiem) i dodatnich (stężenia i rozpuszczalniki);
- dane historyczne dotyczące kontroli ujemnych (z rozpuszczalnikiem) i dodatnich wraz z zakresami, średnimi i odchyleniami standardowymi oraz przedziałem ufności (np. 95 %), przy uwzględnieniu również ilości danych;
- analizy statystyczne (dla poszczególnych kultur oraz, w stosownych przypadkach, połączonych kontrprób) oraz p-wartości, jeżeli występują.

*Omówienie wyników.*

*Wniosek*

## BIBLIOGRAFIA

- (1) OECD (2016). *Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015*. [W:] Publikacje na temat środowiska, seria dotycząca badań i oceny nr 234. Paryż: OECD.
- (2) Moore M.M., DeMarini D.M., DeSerres F.J. i Tindall, K.R. (red.) (1987). *Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis*. Cold Spring Harbor Laboratory, Nowy Jork.
- (3) E. H. Y. Chu i H. V. Malling (1968). *Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells In Vitro*. „Proc. Natl. Acad. Sci., USA”. nr 61, s. 1306–1312.
- (4) Moore M.M., Harrington-Brock K., Doerr C.L. i Dearfield K.L. (1989). *Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci*. „Mutagen.” Res.” nr 4, s. 394–403.
- (5) Aaron C.S. i Stankowski Jr. L.F. (1989). *Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates*. „Mutation Res.” nr 223, s. 121–128.
- (6) Aaron C.S., Bolcsfoldi G., Glatt H.R., Moore M., Nishi Y., Stankowski L., Theiss J. i Thompson E. (1994). *Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures*. „Mutation Res.” nr 312, s. 235–239.
- (7) Li A.P., Gupta R.S., Heflich R.H. i 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.” nr 196, s. 17–36.
- (8) Scott D., Galloway S.M., Marshall R.R., Ishidate M., Brusick D., Ashby J. i Myhr B.C. (1991). *Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A Report from ICPEMC Task Group 9*. „Mutation Res.” nr 257, s. 147–204.
- (9) Morita T., Nagaki T., Fukuda I. i Okumura K. (1992). *Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells*. „Mutation Res.” nr 268, s. 297–305.
- (10) Brusick D. (1986). *Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion concentrations*. „Environ. Mutagen.” nr 8, s. 789–886.

- (11) Nesslany F., Simar-Meintieres S., Watzinger M., Talahari I. i Marzin D. (2008). *Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid*. „Environ. Mol. Mutation Res.” nr 49, s. 439–452.
- (12) Long L.H., Kirkland D., Whitwell J. i 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.” nr 634, s. 177–183.
- (13) Kirkland D., Aardema M., Henderson L. i 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.” nr 584, s. 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. i Yang L.L. (1987). *A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay*. „Mutation Res.” nr 189, s. 135–141.
- (15) Liber H.L., Yandell D.W. i 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.” nr 216, s. 9–17.
- (16) L. F. Jr. Stanowski, K. R. Tindall i A. W. Hsie (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.” nr 160, s. 133–147.
- (17) Arlett C.F., Smith D.M., Clarke G.M., Green M.H.L., Cole J., McGregor D.B. i Asquith J.C. (1989). *Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation, [W:] Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, D. J. Kirkland (red.), Cambridge University Press, s. 66–101.
- (18) Hsie A.W., Casciano D.A., Couch D.B., Krahn D.F., O'Neill J.P. i 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.” nr 86, s. 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.” nr 85, s. 165–175.
- (20) Tindall K.R., Stankowski Jr., L.F., Machanoff R. i Hsie A.W. (1984). *Detection of Deletion Mutations in pSV2gpt-Transformed Cells*. „Mol. Cell. Biol.” nr 4, s. 1411–1415.



- (21) Hsie A. W., Recio L., Katz D. S., Lee C. Q., Wagner M. i Schenley R. L. (1986). *Evidence for Reactive Oxygen Species Inducing Mutations in Mammalian Cells*. „Proc Natl Acad Sci.” nr 83(24), s. 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*. (Tekst w przygotowaniu).
- (23) Coecke S., Balls M., Bowe G., Davis J., Gstraunthaler G., Hartung T., Hay R., Merten O.W., Price A., Schechtman L., Stacey G. i Stokes W. (2005). *Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice*. „ATLA” nr 33, s. 261–287.
- (24) Rosen M.P., San R.H.C. i Stich H.F. (1980). *Mutagenic Activity of Ascorbate in Mammalian Cell Cultures*. „Can. Lett.” nr 8, s. 299–305.
- (25) Natarajan A.T., Bates A.D., Van Buul P.P.W., Meijers M. i 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.” nr 37, s. 83-90.
- (26) Abbondandolo A., Bonatti S., Corti G., Fiorio R., Loprieno N. i Mazzaccaro A. (1977). *Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine*. „Mutation Res.” nr 46, s. 365–373.
- (27) Ames B.N., McCann J. i Yamasaki E. (1975). *Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test*. „Mutation Res.” nr 31, s. 347–364.
- (28) Maron D.M. i Ames B.N. (1983). *Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test*. „Mutation Res.” nr 113, s. 173–215.
- (29) Elliott B.M., Combes R.D., Elcombe C.R., Gatehouse D.G., Gibson G.G., Mackay J.M. i Wolf R.C. (1992). *Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in In Vitro Genotoxicity Assays*. „Mutagen.” nr 7, s. 175–177.
- (30) Matsushima T., Sawamura M., Hara K. i Sugimura T. (1976). *A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems*, [W:] *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres F.J., Fouts J.R., Bend J.R. i Philpot R.M. (red.). Elsevier, North-Holland, s. 85–88.

- (31) Ong T.-m., Mukhtar M., Wolf C.R. i 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.” nr 4, s. 55–65.
- (32) Johnson T.E., Umbenhauer D.R. i 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.” nr 28, s. 51–59.
- (33) UNEP (2001). Konwencja sztokholmska w sprawie trwałych zanieczyszczeń organicznych, Program Narodów Zjednoczonych ds. Ochrony Środowiska (UNEP). Dostępne na stronie internetowej: [<http://www.pops.int.html>].
- (34) Tan E.-L. i 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.” nr 84, s. 147–156.
- (35) J. P. O'Neill, R. Machanoff, J. R. San Sebastian i A. W. Hsie (1982). *Cytotoxicity and Mutagenicity of Dimethylnitrosamine in Cammalian Cells (CHO/HGPRT system): Enhancement by Calcium Phosphate*. „Environ. Mol. Mutation.” nr 4, s. 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.”, nr 4, s. 7–18.
- (37) Krahm D.F., Barsky F.C. i McCooey K.T. (1982). *CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids*. [W:] Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (red.), *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, Nowy Jork, Plenum, s. 91–103.
- (38) Zamora P.O., Benson J.M., Li A.P. i Brooks A.L. (1983). *for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay*. „Environ. Mutagenesis”, nr 5, s. 795–801.
- (39) OECD (2014). *Document Supporting the WNT Decision to Implement Revised Criteria for the Selection of the Top Concentration in the In Vitro Mammalian Cell Assays on Genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487)*. Dostępny na żądanie od Organizacji Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.
- (40) Brookmire L., Chen J.J. i Levy D.D. (2013). *Evaluation of the Highest Concentrations Used in the in vitro Chromosome Aberrations Assay*. „Environ. Mol. Mutation.”, nr 54, s. 36–43.
- (41) EPA, Urząd ds. Bezpieczeństwa Substancji Chemicznych i Zapobiegania Zanieczyszczeniom. (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*. Dostępne na stronie internetowej: [<https://federalregister.gov/a/2012-13774>].
- (43) O'Neill J.P. i 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. i Au W.W. (1995). *Induction of Deletion Mutations by Methoxyacetaldehyde in Chinese Hamster Ovary (CHO)-AS52 cells*. „Mutation Research” nr 1335(2), s. 121–128.
- (45) Hayashi M., Dearfield K., Kasper P., Lovell D., Martus H.J., i Thybaud V. (2011). *Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data*, [w:] „Mutation Research” nr 723, s. 87–90.
- (46) OECD (2014). *Statistical Analysis Supporting the Revision of the Genotoxicity Test Guidelines* [w:] Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (nr 199), Paryż: Organisation for Economic Cooperation and Development.
- (47) Richardson C., Williams D.A., Allen J.A., Amphlett G., Chanter D.O., i Phillips B. (1989). *Analysis of Data from In Vitro Cytogenetic Assays*. [W:] *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*. D.J. Kirkland (red.) Cambridge: Cambridge University Press, s. 141–154.
- (48) Fleiss J. L., Levin B., i Paik M. C. (2003). *Statistical Methods for Rates and Proportions*, wydanie trzecie, Nowy Jork: John Wiley & Sons.

## Dodatek 1

### DEFINICJE

Mutageny powodujące substytucję: substancje chemiczne, które powodują podstawienie par zasad w DNA.

Substancja chemiczna: substancja lub mieszanina.

Skuteczność klonowania: odsetek komórek posiewanych z niską gęstością, będących w stanie przekształcić się w zdatną do zliczenia kolonię.

Stężenia: odnoszą się do stężeń końcowych badanej substancji chemicznej w podłożu.

Cytotoksyczność: w odniesieniu do testów objętych niniejszą metodą badawczą cytotoksyczność określa się jako obniżenie względnego wskaźnika przeżyć komórek poddanych działaniu substancji w porównaniu z kontrolą ujemną (zob. odpowiedni pkt).

Mutacja pierwotna: mutacja genu z rodzaju macierzystego do mutanta, który powoduje zmianę lub stratę aktywności enzymatycznej funkcji zakodowanego białka.

Mutageny typu zmiany fazy odczytu: substancje chemiczne, które powodują dodanie lub delecję pojedynczej pary zasad lub wielu par zasad w cząstce DNA.

Genotoksyczny: termin ogólny, obejmujący wszystkie rodzaje uszkodzeń DNA lub chromosomu, w tym pęknięcia, przegrupowania adduktów, mutacje, aberracje chromosomowe i aneuploidię. Nie wszystkie rodzaje skutków genotoksycznych powodują mutacje lub stałe uszkodzenia chromosomu.

Podłoże HAT: podłoże wykorzystywane do czyszczenia mutantów fosforybozylotransferazy hipoksantynowo-guaninowej, zawierające hipoksantynę, aminopterynę oraz tymidynę.

Rekombinacja mitotyczna: zachodząca podczas mitozy rekombinacja między chromatydami homologicznymi, której możliwe skutki to indukowanie pęknięć łańcucha DNA lub utrata heterozygotyczności.

Podłoże MPA: podłoże wykorzystywane do czyszczenia mutantów fosforybozylotransferazy hipoksantynowo-guaninowej zawierające ksantynę, adeninę, tymidynę, aminopterynę oraz kwas mykofenolowy.

Mutagenny: powoduje dziedziczne zmiany w sekwencji lub sekwencjach par zasad DNA w genach lub w strukturze chromosomów (aberracje chromosomowe).

Częstość występowania mutacji (MF): liczba zaobserwowanych kolonii zmutowanych komórek podzielona przez liczbę komórek posianych w podłożu selektywnym, skorygowana podczas wyboru względem skuteczności klonowania (lub żywotności).

Czas ekspresji fenotypowej: czas po poddaniu działaniu substancji chemicznej, w trakcie którego zmiana genetyczna utrwalana jest w genomie, a wszelkie istniejące wcześniej produkty genu zostają oddzielone w takim stopniu, że zmianie ulega cecha fenotypowa.

Względny wskaźnik przeżyć (RS): względny wskaźnik przeżyć wykorzystuje się do mierzenia cytotoksyczności związanej z działaniem substancji chemicznej. Względny wskaźnik przeżyć to wskaźnik skuteczności klonowania komórek posianych natychmiast po poddaniu działaniu substancji chemicznej, skorygowany o wszelkie komórki utracone w trakcie działania substancji w stosunku do wskaźnika skuteczności klonowania w kontrolach ujemnych (którym przypisano wskaźnik przeżycia wynoszący 100 %).

Frakcje S9 uzyskane z wątroby: supernatant z homogenatu wątroby po odwirowaniu przy 9 000 g, tj. surowy ekstrakt z wątroby.

Preparat frakcji S9: preparat złożony z frakcji S9 uzyskanej z wątroby i kofaktorów niezbędnych do aktywności metabolicznej enzymów.

Kontrola z rozpuszczalnikiem: ogólny termin opisujący kultury kontrolne otrzymujące wyłącznie rozpuszczalnik stosowany do rozpuszczenia badanej substancji chemicznej.

Badana substancja chemiczna: dowolna substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

Kontrola niepoddawana działaniu substancji: hodowle, które nie są poddawane działaniu żadnej substancji (tj. ani badanej substancji chemicznej, ani rozpuszczalnika), lecz które są poddawane zabiegom równoległym i w taki sam sposób jak hodowle otrzymujące badaną substancję chemiczną.

UVCB: substancje o nieznanym lub zmiennym składzie, złożone produkty reakcji lub materiały biologiczne.

**Dodatek 2****WZORY DO CELÓW OCENY CYTOKSYCZNOŚCI ORAZ CZĘSTOŚCI WYSTĘPOWANIA MUTACJI**

Ocenę cytotoksyczności przeprowadza się w oparciu o względny wskaźnik przeżyć, tj. wskaźnik skuteczności klonowania komórek posianych natychmiast po poddaniu działaniu substancji, skorygowany o wszelkie komórki utracone w trakcie działania substancji w stosunku do skorygowanej skuteczności klonowania w kontrolach ujemnych (którym przypisano wskaźnik przeżycia wynoszący 100 %) (zob. poniżej wzór dotyczący względnego wskaźnika przeżyć).

Skorygowaną skuteczność klonowania (SK) kultury poddanej działaniu badanej substancji chemicznej oblicza się w następujący sposób:

$$\text{Skorygowana SK} = \frac{\text{Liczba komórek pod koniec okresu narażenia}}{\text{Liczba komórek na początku okresu narażenia}}$$

Względny wskaźnik przeżyć kultury poddanej działaniu badanej substancji chemicznej oblicza się w następujący sposób:

$$\text{RS} = \frac{\text{Skorygowana SK w kulturze poddanej działaniu}}{\text{Skorygowana SK w kontroli z rozpuszczalnikiem}} \times 100$$

Częstość występowania mutacji jest to skuteczność klonowania kolonii zmutowanych komórek w podłożu selektywnym podzielona przez skuteczność klonowania w podłożu nieselektywnym, mierzona podczas dokonywania wyboru w odniesieniu do tej samej kultury.

$$\text{Częstość wyst. mutacji} = \frac{\text{SK kolonii zmutowanych w podłożu selektywnym}}{\text{SK w podłożu nieselektywnym}}$$

Gdy stosuje się płytki w odniesieniu do skuteczności klonowania:

Skuteczność klonowania = liczba kolonii / liczba posianych komórek

Gdy stosuje się mikropłytki w odniesieniu do skuteczności klonowania:

Liczba kolonii na dołek w mikropłytkach jest zgodna z rozkładem Poissona.

Skuteczność klonowania =  $-\text{LnP}(0)$  / liczba posianych komórek na dołek

Gdzie  $-\text{LnP}(0)$  jest to prawdopodobna liczba pustych dołków pośród dołków posianych,

określana według następującego wzoru:

$$\text{LnP}(0) = -\text{Ln} (\text{liczba pustych dołków} / \text{liczba posianych dołków})'';$$

3) w części B rozdział B.22 otrzymuje brzmienie:

## **„B.22 BADANIE DOMINUJĄCEGO GENU LETALNEGO GRYZONIA**

### **WPROWADZENIE**

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w wytycznej dotyczącej badań OECD (TG) 478 (2016). Metody badawcze są okresowo poddawane przeglądowi w związku z postępem naukowym, zmieniającymi się potrzebami regulacyjnymi oraz troską o dobrostan zwierząt. Niniejsza zmodyfikowana wersja metody badawczej jest efektem ponad trzydziestoletniego doświadczenia w przeprowadzaniu tego badania i odzwierciedla potencjał integracji lub łączenia tego badania z innymi badaniami dotyczącymi toksyczności, takimi jak badania rozwojowe, badania toksyczności reprodukcyjnej lub genotoksyczności; jednak z powodu tych ograniczeń oraz wykorzystania dużej liczby zwierząt nie zaleca się stosować tego testu jako podstawowej metody, a raczej traktować jako metodę dodatkową, którą można stosować jedynie w przypadku gdy w odniesieniu do wymogów regulacyjnych nie istnieje metoda alternatywna. Połączenie badań toksyczności może uchronić dużą liczbę zwierząt przed wykorzystaniem ich w takich badaniach. OECD opracowała dokument, który zawiera zwięzłe informacje na temat badań w zakresie toksykologii genetycznej oraz przegląd najnowszych zmian, jakie wprowadzono do wytycznych OECD dotyczących badań w zakresie toksykologii genetycznej (1).
2. Celem badania dominującej mutacji letalnej jest ustalenie, czy substancje chemiczne wytwarzają w komórkach germinalnych mutacje wynikające z aberracji chromosomowych. Ponadto badanie dominującego genu letalnego ma istotne znaczenie dla oceny genotoksyczności, ponieważ czynniki związane z metabolizmem *in vivo*, farmakokinetyką oraz procesami naprawy DNA – choć mogą różnić się w zależności od gatunku – są aktywne i wywierają wpływ na reakcję. Indukcja dominującej mutacji letalnej po narażeniu na działanie badanej substancji chemicznej wskazuje, że substancja chemiczna wpłynęła na tkankę rozrodczą zwierzęcia laboratoryjnego.
3. Mutacje dominującego genu letalnego powodują śmierć embrionu lub stratę płodu. Indukcja dominującej mutacji letalnej po narażeniu na działanie badanej substancji chemicznej wskazuje, że substancja chemiczna wpływa na komórki germinalne zwierzęcia laboratoryjnego.
4. Test dominującej mutacji letalnej jest użytecznym testem, który umożliwia potwierdzenie wyników dodatnich badań wykorzystujących somatyczne punkty końcowe *in vivo* oraz jest istotnym punktem końcowym pozwalającym przewidzieć zagrożenie wobec ludzi i ryzyko chorób genetycznych przekazywanych w linii germinalnej. Test ten jest jednak pracochłonny i wymaga wykorzystania dużej liczby zwierząt; w rezultacie jego



przeprowadzenie jest bardzo kosztowne i czasochłonne. Z uwagi na fakt, że spontaniczna częstotliwość dominujących mutacji letalnych jest dość wysoka, czułość testu pod kątem wykrywania niewielkich wzrostów częstotliwości mutacji jest zasadniczo ograniczona.

5. Definicje kluczowych terminów zamieszczono w dodatku 1.

## **ZAŁOŻENIA WSTĘPNE**

6. Badanie najczęściej przeprowadza się na myszach (2)(3)(4), jednak jeżeli jest to naukowo uzasadnione – w niektórych przypadkach dopuszcza się wykorzystanie innych gatunków, takich jak szczury (5)(6)(7)(8). Dominujące mutacje letalne są zazwyczaj skutkiem rażących aberracji chromosomowych (aberracji strukturalnych i liczbowych) (9)(10)(11), jednak niewykluczone są także mutacje genowe. Dominująca mutacja letalna to mutacja, która zachodzi *per se* w komórce germinalnej lub utrwała się po zapłodnieniu we wczesnym stadium embrionalnym; nie powoduje ona jednak dysfunkcji gamety, ale jest śmiertelna dla zapłodnionego jaja lub rozwijającego się embrionu.
7. Poszczególne samce wykorzystywane są do krycia dziewiczych samic sekwencyjnie w odpowiednich odstępach czasu. Liczba kryć następujących po zakończeniu badania jest zależna od ostatecznego celu badania dotyczącego dominującej mutacji letalnej (pkt 23) oraz powinna zapewnić możliwość przeprowadzenia oceny dojrzewania męskich komórek germinalnych pod kątem dominujących mutacji letalnych (12).
8. Jeżeli istnieją dowody świadczące o tym, że badana substancja chemiczna lub jej metabolit lub metabolity nie dotrą do jądra, nie należy przeprowadzać tego badania.

## **ZASADA BADANIA**

9. Zasadniczo samce poddaje się działaniu badanej substancji chemicznej z zastosowaniem odpowiedniej drogi narażenia i kryje nimi dziewicze samice, których nie poddano takiemu działaniu. Wykorzystując kolejne następujące po sobie okresy krycia można badać różne rodzaje komórek germinalnych. Po okresie krycia i upływie odpowiedniego czasu samice poddaje się eutanazji i bada ich macice, aby ustalić liczbę implantów oraz żywych i martwych embrionów. Letalność dominującą badanej substancji chemicznej określa się, porównując liczbę żywych zagnieżdżonych zarodków na samicę w grupie badanej do liczby żywych zagnieżdżonych zarodków na samicę w grupie kontrolnej z nośnikiem/rozpuszczalnikiem. Wzrost liczby martwych zagnieżdżonych zarodków na samicę w grupie badanej powyżej liczby martwych zagnieżdżonych zarodków na samicę w grupie kontrolnej odzwierciedla straty poimplantacyjne wywołane przez badaną substancję chemiczną. Straty poimplantacyjne oblicza się, określając stosunek martwych zagnieżdżonych zarodków do całkowitej liczby zagnieżdżonych zarodków w grupie badanej i porównując stosunek martwych zagnieżdżonych zarodków do ich całkowitej

liczby w grupie kontrolnej. Straty przedimplantacyjne można oszacować, porównując liczby ciałek żółtych po odjęciu całkowitej liczby zagnieżdżonych zarodków lub całkowitej liczby zagnieżdżonych zarodków na samicę w grupie badanej i grupach kontrolnych.

## WERYFIKACJA BIEGŁOŚCI LABORATORIUM

10. Kompetencje w zakresie przedmiotowego testu ustala się, wykazując zdolność do odtwarzania częstotliwości dominujących mutacji letalnych z opublikowanych danych (np. (13)(14)(15)(16)(17)(18)) z zastosowaniem substancji służących do kontroli dodatniej (w tym reakcji słabych), takich jak te wymienione w tabeli 1, oraz do grup kontrolnych nośnika, i uzyskując częstotliwości kontroli ujemnej posiadające akceptowalny pod względem spójności zakres danych (zob. powyższe odniesienia), lub z wykorzystaniem historycznego rozkładu kontroli laboratorium, gdy taki rozkład jest dostępny.

## OPIS METODY

### Czynności przygotowawcze

#### *Wybór gatunku zwierząt*

11. Badania należy prowadzić na zdrowych, dojrzałych płciowo laboratoryjnych szczepach zwierząt powszechnie wykorzystywanych w badaniach laboratoryjnych. Badania przeprowadza się zazwyczaj na myszach, choć właściwe może być również wykorzystywanie szczurów. Dopuszcza się również możliwość wykorzystania wszelkich innych odpowiednich gatunków ssaków, o ile zostanie to w sprawozdaniu uzasadnione naukowo.

#### *Warunki utrzymywania i karmienia zwierząt*

12. W przypadku gryzoni temperatura w pomieszczeniu dla zwierząt powinna wynosić 22 °C ( $\pm 3$  °C). Chociaż wilgotność względna powinna wynosić co najmniej 40 % i pożądane jest, by nie przekraczała 70 % poza okresami czyszczenia pomieszczenia, najlepiej byłoby, gdyby utrzymywała się na poziomie 50–60 %. Oświetlenie powinno być sztuczne z zachowaniem cyklu 12 godzin bez dostępu światła, które poprzedza 12 godzin z dostępem światła. Do żywienia można stosować konwencjonalne pasze laboratoryjne z nieograniczonym dostępem do wody pitnej. Wybór paszy może zależeć od potrzeby zapewnienia odpowiedniej domieszki badanej substancji chemicznej, jeżeli jest ona podawana tą drogą. Przed poddaniem działaniu substancji lub przed kryciem gryzonie należy trzymać w małych grupach (nie więcej niż pięć sztuk) składających się ze zwierząt tej samej płci, jeżeli nie przewiduje się lub nie obserwuje agresywnego zachowania, a najlepiej trzymać je w klatkach z pełną podłogą oraz zapewnić im odpowiednie urozmaicenie warunków bytowania. Jeżeli ma to naukowe uzasadnienie, zwierzęta mogą być trzymane oddzielnie.

*Przygotowanie zwierząt*

13. Zdrowe i dojrzałe płciowo dorosłe samce i samice należy przydzielić losowo do grup kontrolnych i grup poddawanych działaniu badanej substancji. Zwierzęta znakuje się indywidualnie przy użyciu humanitarnej, mało inwazyjnej metody (np. poprzez obrączkowanie, kolczykowanie, wszczepianie mikroukładów i identyfikację biometryczną, a nie przycinanie uszu i palców) i aklimatyzuje do warunków laboratoryjnych przez co najmniej pięć dni. Klatki należy rozmieścić w taki sposób, aby zminimalizować potencjalny wpływ ich układu. Należy unikać zanieczyszczenia krzyżowego kontrolą dodatnią i badaną substancją chemiczną. W momencie rozpoczęcia badania różnice w masie ciała zwierząt powinny być minimalne i nie powinny przekraczać  $\pm 20\%$  średniej masy dla każdej płci.

*Przygotowanie dawek*

14. Badane substancje chemiczne w stanie stałym należy rozpuszczać lub przygotowywać w postaci zawiesiny w odpowiednich rozpuszczalnikach lub nośnikach lub dodawać do paszy lub do wody do picia przed podaniem dawki zwierzętom. Badane substancje chemiczne w stanie ciekłym mogą być dawkowane bezpośrednio lub można je rozcieńczać przed dawkowaniem. W przypadku narażenia w drodze inhalacji badane substancje chemiczne można podawać w postaci gazu, pary lub stałych/ciekłych aerozoli, w zależności od ich właściwości fizykochemicznych. Należy stosować świeże preparaty badanej substancji chemicznej, chyba że z danych dotyczących stabilności wynika, iż przechowywanie tych preparatów jest dopuszczalne i że w danych tych określono warunki prawidłowego przechowywania takich preparatów.

**Warunki badania***Rozpuszczalnik/nośnik*

15. Rozpuszczalnik/nośnik w stosowanych objętościach dawek nie powinien wywoływać efektów toksycznych oraz nie powinno istnieć ryzyko, że wejdzie on w reakcję chemiczną z badaną substancją chemiczną. Jeśli stosowane są inne niż dobrze znane rozpuszczalniki/nośniki, ich włączenie do doświadczenia powinno być poparte danymi referencyjnymi wskazującymi na ich zgodność. Zaleca się, aby, o ile to możliwe, w pierwszej kolejności rozważone zostało wykorzystanie wodnych rozpuszczalników/nośników. Wśród przykładów powszechnie wykorzystywanych zgodnych rozpuszczalników/nośników można wymienić wodę, sól fizjologiczną, roztwór metylocelulozy, roztwór soli sodowej karboksymetylocelulozy, oliwę z oliwek i olej kukurydziany.

*Kontrola dodatnie*

16. Zawsze należy prowadzić równoległą grupę zwierząt na potrzeby kontroli dodatniej, chyba że laboratorium wykazało biegłość w przeprowadzaniu badania oraz w niedawnej przeszłości regularnie przeprowadzało takie badania (np. w ciągu ostatnich 5 lat). Nie ma

jednak konieczności postępowania ze zwierzętami przeznaczonymi na potrzeby kontroli dodatniej w ten sam sposób jak ze zwierzętami otrzymującymi badaną substancję chemiczną, czy konieczności pobierania próbek we wszystkich odstępach czasu między okresami krycia. Substancjami stosowanymi do celów kontroli dodatniej powinny być substancje znane z wytwarzania dominującej mutacji letalnej w warunkach prowadzenia badania. Z wyjątkiem poddawania działaniu substancji badanej, ze zwierzętami w grupach kontrolnych należy obchodzić się w identyczny sposób jak ze zwierzętami w grupach poddanych działaniu substancji.

17. Dawki substancji stosowane do celów kontroli dodatniej należy dobrać w taki sposób, aby wywoływały słabe lub umiarkowane efekty, pozwalające na krytyczną ocenę efektywności i czułości badania, jednak wywołujące w sposób systematyczny efekty dodatnie dominującej mutacji letalnej. W tabeli 1 przedstawiono przykładowe substancje chemiczne stosowane do celów kontroli dodatniej oraz ich właściwe dawkowanie.

**Tabela 1:** Przykładowe substancje chemiczne służące do kontroli dodatniej.

| <b>Substancja [Nr CAS]<br/>(numer referencyjny)</b> | <b>Zakres dawki<br/>efektywnej<br/>(gatunek gryzonia)</b> | <b>Czas podawania<br/>(wyrażony<br/>w dniach)</b> |
|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| Trietylenomelamina [51-18-3] (15)                   | 0,25 (myszy)                                              | 1                                                 |
| Cyklofosfamid [50-18-0] (19)                        | 50–150 (myszy)                                            | 5                                                 |
| Cyklofosfamid [50-18-0] (5)                         | 25–100 (szczury)                                          | 1                                                 |
| Metanosulfonian etylu [62-50-0] (13)                | 100–300 (myszy)                                           | 5                                                 |
| Akrylamid monomeryczny [79-06-1] (17)               | 50 (myszy)                                                | 5                                                 |
| Chlorambucyl [305-03-3] (14)                        | 25 (myszy)                                                | 1                                                 |

#### *Kontrole ujemne*

18. W każdym okresie pobierania próbek należy uwzględnić zwierzęta przeznaczone do celów kontroli ujemnej, poddane działaniu samego rozpuszczalnika lub nośnika, a poza tym badane w ten sam sposób, jak grupy poddawane działaniu substancji (20). Jeżeli nie istnieją historyczne lub opublikowane dane wykazujące, że wybrany rozpuszczalnik/nośnik nie wywołuje żadnych dominujących mutacji letalnych ani innych szkodliwych skutków, zwierzęta w grupie kontrolnej powinny zostać również uwzględnione w każdym okresie pobierania próbek, aby ustalić dopuszczalność grupy kontrolnej nośnika.

## PROCEDURA

### Liczba zwierząt

19. Zaleca się krycie jednej dziewiczej samicy w sposób sekwencyjny w odpowiednio ustalonych z góry odstępach czasu (np. w tygodniowych odstępach czasu, pkt 21 i 23) przez pojedyncze samce. Liczbę samców w grupach należy ustalić z góry tak, aby zapewnić wystarczającą (w połączeniu z liczbą pokrytych samic w każdym okresie krycia) moc testów statystycznych niezbędną do wykrycia co najmniej dwukrotnego zwiększenia częstotliwości dominującej mutacji letalnej (pkt 44).
20. Należy również określić z góry liczbę samic w danym okresie krycia na podstawie obliczeń mocy testów statystycznych, aby zapewnić możliwość wykrycia co najmniej podwojenia częstości występowania dominującej mutacji letalnej (tj. liczba ciężarnych samic powinna być wystarczająca, aby uzyskać łącznie co najmniej 400 zagnieżdżonych zarodków) (20)(21)(22)(23), przy czym oczekuje się co najmniej jednego martwego zagnieżdżonego zarodka na jednostkę poddawaną analizie (tj. na grupę wykorzystywaną do krycia przy danej dawce) (24).

### Okres podawania i okresy krycia

21. Liczbę okresów krycia po poddaniu działaniu substancji ustala się na podstawie harmonogramu podawania substancji chemicznej, przy czym powinna ona zagwarantować, aby wszystkie etapy dojrzewania męskich komórek germinalnych zostały ocenione pod kątem indukcji dominującej mutacji letalnej (12)(25). W przypadku pojedynczego poddania działaniu substancji obejmującego podanie do pięciu dawek substancji w odstępach tygodniowych od ostatniego poddania działaniu substancji powinno odbyć się 8 kryć (w przypadku myszy) lub 10 kryć (w przypadku szczurów). W przypadku podania wielu dawek liczba okresów krycia może zostać zmniejszona proporcjonalnie do wydłużenia okresu podawania z zachowaniem celu polegającego na przeprowadzeniu oceny wszystkich etapów spermatogenezy (np. po 28-dniowym okresie narażenia ocena wszystkich etapów spermatogenezy u myszy wymaga zaledwie 4 kryć w tygodniu). Wszystkie harmonogramy podawania substancji chemicznej i harmonogramy krycia powinny być naukowo uzasadnione.
22. Samice powinny przebywać z samcami przez co najmniej jeden pełny cykl estrogenowy (np. jeden tydzień obejmuje jeden pełny cykl estrogenowy zarówno u myszy, jak i u szczurów). Samice, które nie zostały pokryte w tym jednotygodniowym okresie, mogą zostać wykorzystane w kolejnym okresie krycia. Ewentualnie samice mogą przebywać z samcami do momentu pokrycia, co ustala się poprzez sprawdzenie obecności plemników w pochwie lub obecności czopa pochwowego.
23. Okres narażenia i harmonogram krycia ustala się w zależności od nadrzędnego celu badania dominującej mutacji letalnej. Jeżeli celem jest ustalenie, czy dana substancja

chemiczna sama w sobie wywołuje dominującą mutację letalną, uznawaną metodą byłoby poddanie całego cyklu spermatogenezy działaniu substancji (np. 7 tygodni u myszy, 5–7 przypadków poddania działaniu substancji w tygodniu) i przeprowadzenie jednorazowego krycia na zakończenie cyklu. Jeżeli jednak celem jest zidentyfikowanie wrażliwego rodzaju komórek germinalnych w kontekście indukcji dominującej mutacji letalnej, wówczas lepiej jest przeprowadzić jeden cykl narażenia lub poddawać działaniu substancji przez okres 5 dni, po którym zaleca się tygodniowy okres krycia.

### Poziomy dawek

24. W przypadku przeprowadzania wstępnego badania ustalającego zakres dawkowania ze względu na brak dostępnych odpowiednich danych umożliwiających dobranie dawki, badanie takie należy wykonać w tym samym laboratorium z wykorzystaniem tego samego gatunku, szczepu, płci i schematu podawania substancji chemicznej, jakie mają być stosowane w badaniu głównym (26). Celem badania powinno być określenie maksymalnej tolerowanej dawki (MTD) zdefiniowanej jako najwyższa dawka tolerowana bez wywoływania objawów toksyczności ograniczającej badanie w stosunku do czasu trwania badania (na przykład dawka wywołująca nietypowe zachowanie lub reakcje, niewielki spadek masy ciała lub cytotoksyczność układu krwiotwórczego), ale niepowodująca śmierci lub objawów bólu, cierpienia lub stresu, które wiązałyby się z koniecznością uśmiercenia zwierzęcia w humanitarny sposób (27)).
25. Maksymalna tolerowana dawka nie może również wywierać niekorzystnego wpływu na skuteczność krycia (21).
26. W przypadku badanych substancji chemicznych charakteryzujących się szczególną aktywnością biologiczną przy niskich dawkach nietoksycznych (takich jak hormony i mitogeny) oraz substancji chemicznych wykazujących intensywne parametry toksykokinetyczne dopuszcza się możliwość zastosowania odstępstwa od kryteriów ustalania dawek – każdą taką substancję należy oceniać indywidualnie.
27. Aby uzyskać informacje na temat zależności dawka-odpowiedź, w kompletnym badaniu należy uwzględnić grupę kontrolną ujemną oraz co najmniej trzy poziomy dawek, przy czym każda kolejna dawka jest większa od poprzedniej na ogół dwukrotnie, ale nie więcej niż czterokrotnie. Jeżeli wyniki badania ustalającego zakres dawkowania lub istniejące dane będą wskazywały, że badana substancja chemiczna nie wywołuje toksyczności, najwyższa dawka w przypadku podania jednorazowego powinna wynosić 2 000 mg/kg masy ciała. Jeżeli jednak badana substancja chemiczna będzie miała działanie toksyczne, maksymalną tolerowaną dawkę należy ustalić na poziomie odpowiadającym najwyższej podanej dawce, przy czym najlepiej byłoby, gdyby zastosowane poziomy dawek obejmowały zakres od dawki maksymalnej do dawki o niskiej toksyczności lub niewywołującej żadnej toksyczności. Jeżeli chodzi o nietoksyczne substancje chemiczne, dawka graniczna w przypadku okresu podawania trwającego 14 dni lub dłuższego wynosi

1 000 mg/kg masy ciała dziennie, a w przypadku okresu podawania trwającego krócej niż 14 dni – 2 000 mg/kg masy ciała dziennie.

### **Podawanie dawek**

28. Planując test, należy wziąć pod uwagę przewidywaną drogę narażenia ludzi. W związku z tym można wybrać jako uzasadnione takie drogi narażenia, jak podanie substancji z paszą, z wodą do picia, podskórne, dożylnie, przez wdychanie, ustne (przez sondę) lub przez implantację. W każdym razie drogę narażenia należy dobrać w taki sposób, aby zapewnić odpowiednie narażenie tkanek docelowych. Zasadniczo nie zaleca się dokonywania wstrzyknięć dootrzewnowych, ponieważ nie jest to typowa droga narażenia ludzi – taką drogę należy stosować wyłącznie w przypadku wystąpienia konkretnego uzasadnienia naukowego. Jeżeli badaną substancję chemiczną dodaje się do paszy lub wody do picia, w szczególności w przypadku pojedynczej dawki substancji, należy upewnić się, że okres między spożyciem paszy i wody a kryciem jest wystarczający, aby zapewnić możliwość wykrycia skutków podania substancji (pkt 31). Maksymalna objętość płynu, jaką można podać przez sondę lub wstrzyknąć jednorazowo, zależy od wielkości zwierzęcia doświadczalnego. Objętość ta nie powinna co do zasady przekraczać 1 ml/100 g masy ciała oprócz roztworów wodnych, w przypadku których można zastosować maksymalnie 2 ml/100 g masy ciała. Zastosowanie objętości wyższych niż podane (jeżeli są dopuszczone przepisami dotyczącymi dobrostanu zwierząt) powinno być uzasadnione. Zmienność objętości badanej substancji należy zminimalizować, dostosowując stężenie, aby zapewnić stałą objętość w stosunku do masy ciała przy wszystkich poziomach dawek.

### **Obserwacje**

29. Ogólne obserwacje kliniczne zwierząt doświadczalnych wraz z rejestrowaniem objawów klinicznych powinny odbywać się co najmniej raz dziennie, najlepiej każdego dnia o tej samej porze i z uwzględnieniem szczytowego okresu przewidywanych skutków po dawkowaniu. Co najmniej dwa razy dziennie w trakcie okresu dawkowania wszystkie zwierzęta powinny być obserwowane pod kątem zachorowalności i upadkowości. Wszystkie zwierzęta powinny być ważone na początku badania i co najmniej raz w tygodniu w trakcie badań dawki powtórzonej, a także w momencie ich uśmiercenia. Pomiary ilości spożytego pokarmu powinny być dokonywane co najmniej co tydzień. Jeżeli badana substancja chemiczna jest podawana w wodzie do picia, należy mierzyć spożycie wody przy każdej zmianie wody i co najmniej raz w tygodniu. Zwierzęta, u których stwierdzono oznaki podwyższonej toksyczności nieprowadzące do śmierci, należy uśmiercić przed zakończeniem okresu badania (27).

### **Pobieranie i przetwarzanie tkanek**

30. Samice uśmierca się w drugiej połowie okresu ciąży, tj. w 13. dniu ciąży w przypadku myszy i w 14.–15. dniu ciąży w przypadku szczurów. Macice bada się pod kątem cech

świadczących o dominującej mutacji letalnej, aby ustalić liczbę zagnieżdżonych zarodków, żywych i martwych embrionów oraz ciałek żółtych.

31. Rogi macicy i jajniki odsłania się w celu policzenia ciałek żółtych; płody są następnie usuwane, zliczane i ważone. Należy pamiętać o zbadaniu macic pod kątem resorbowanych jaj płodowych przesłoniętych żywymi płodami oraz o wyliczeniu wszystkich przypadków resorpcji. Należy odnotować upadkowość płodów. Odnotowuje się również liczbę skutecznie zapłodnionych samic oraz łączną liczbę implantacji, strat przedimplantacyjnych i upadkowości po implantacji (uwzględniając przypadki resorpcji na wczesnym i późnym etapie). Ponadto widoczne płody mogą zostać utrwalone w utrwalaczu Bouina na co najmniej 2 tygodnie; następnie bada się je pod kątem poważnych zewnętrznych wad rozwojowych (28), aby uzyskać dodatkowe informacje na temat wpływu badanego czynnika na rozrodczość i rozwój.

## DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

### Opracowanie wyników

32. Dane należy przedstawić w formie tabeli, wskazując liczbę samców, które pokryły samice, liczbę ciężarnych samic, oraz liczbę samic niebędących w ciąży. Wyniki krycia, w tym dane identyfikacyjne każdego samca i samicy, należy odnotować indywidualnie. W odniesieniu do każdej samicy należy wskazać okres krycia, poziom dawek, jakie podano samcom poddawanych działaniu substancji, oraz liczbę żywych i martwych zagnieżdżonych zarodków.
33. Straty poimplantacyjne oblicza się, ustalając stosunek martwych zagnieżdżonych zarodków do całkowitej liczby zagnieżdżonych zarodków w grupie poddawanej działaniu substancji i zestawiając ten stosunek ze stosunkiem martwych zagnieżdżonych zarodków do łącznej liczby zagnieżdżonych zarodków w danej grupie kontrolnej z nośnikiem/rozpuszczalnikiem.
34. Straty przedimplantacyjne oblicza się jako różnicę między liczbą ciałek żółtych a liczbą zagnieżdżonych zarodków lub jako spadek średniej liczby zagnieżdżonych zarodków na daną samicę w porównaniu z kryciami kontrolnymi. Jeżeli oszacowano straty przedimplantacyjne, należy zgłosić ten fakt.
35. Wartość wskaźnika dominującej mutacji letalnej szacuje się w następujący sposób: (upadki po implantacji / łączna liczba implantacji na samicę) x 100.
36. Należy zgłosić dane dotyczące toksyczności i objawów klinicznych (zgodnie z pkt 29).

### Kryteria dopuszczalności

37. Dopuszczalność badania ocenia się na podstawie następujących kryteriów:



- równoczesna kontrola ujemna jest zgodna z opublikowanymi normami dotyczącymi danych historycznych w zakresie kontroli ujemnych, a także – w stosownych przypadkach – z danymi historycznymi w zakresie kontroli zgromadzonymi przez dane laboratorium (zob. pkt 10 i 18);
- równoczesne kontrole dodatnie powinny wywoływać reakcje zgodne z reakcjami odnotowanymi w opublikowanych normach dotyczących historycznych prób kontrolnych dodatnich lub reakcje zgodne z reakcjami odnotowanymi w prowadzonej przez laboratorium bazie danych historycznych dotyczących kontroli dodatniej, jeżeli taka baza jest dostępna, i doprowadzić do statystycznie istotnego wzrostu w porównaniu z kontrolą ujemną (zob. pkt 17 i 18);
- poddano analizie wystarczającą liczbę zagnieżdżonych zarodków i dawek (pkt 20);
- kryteria wyboru najwyższej dawki są spójne z kryteriami opisanymi w pkt 24 i 27.

### **Ocena i interpretacja wyników**

38. Aby uzyskać wystarczające dane do analizy zależności dawka-odpowiedź, należy przeanalizować co najmniej trzy poddane działaniu substancji grupy dawkowania.
39. O ile wszystkie kryteria dopuszczalności są spełnione, uznaje się, że badana substancja chemiczna daje wynik jednoznacznie dodatni, jeżeli:
- co najmniej jedna badana dawka wykazuje statystycznie istotny wzrost w porównaniu z równoczesną kontrolą ujemną,
  - ocena przeprowadzona z zastosowaniem odpowiedniego testu pokazuje, że wzrost jest powiązany z dawką w co najmniej jednym z warunków doświadczalnych (np. tygodniowy odstęp między okresami krycia), oraz
  - którykolwiek wynik znajduje się poza dopuszczalnym zakresem danych dotyczących kontroli ujemnej lub poza rozkładem danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej zgromadzonych przez dane laboratorium (np. poza granicami kontrolnymi wyznaczającymi przedział 95 % na podstawie rozkładu Poissona), jeżeli takie dane są dostępne.

Od tego momentu badaną substancję chemiczną uznaje się za zdolną do wywołania dominujących mutacji letalnych w komórkach germinalnych zwierząt doświadczalnych. W pkt 44 opisano zalecenia dotyczące najodpowiedniejszych metod statystycznych; informacje na temat innych zalecanych podejść statystycznych można znaleźć również w literaturze (20)(21)(22)(24)(29). Jednostką doświadczalną w zastosowanych badaniach statystycznych powinno być zwierzę.

40. O ile wszystkie kryteria dopuszczalności są spełnione, uznaje się, że badana substancja chemiczna daje wynik jednoznacznie ujemny, jeżeli:

- żadna dawka testowa nie wykazuje statystycznie istotnego wzrostu w porównaniu z równoczesną kontrolą ujemną,
- w ramach żadnego warunku doświadczalnego nie dochodzi do wzrostu powiązanego z dawką, oraz
- wszystkie wyniki mieszczą się w dopuszczalnym zakresie danych dotyczących kontroli ujemnych lub danych historycznych dotyczących kontroli ujemnych gromadzonych przez dane laboratorium (np. w granicach kontrolnych wyznaczających przedział 95 % na podstawie rozkładu Poissona), jeżeli takie dane są dostępne.

Od tego momentu badaną substancję chemiczną uznaje się za niezdolną do wywołania dominujących mutacji letalnych w komórkach germinalnych zwierząt doświadczalnych.

41. Weryfikacja jednoznacznie dodatniej lub jednoznacznie ujemnej reakcji nie jest wymagana.
42. Jeżeli reakcja nie jest ani jednoznacznie ujemna, ani jednoznacznie dodatnia oraz aby ułatwić ustalenie biologicznego znaczenia wyniku (np. niewielki lub graniczny wzrost), dane powinny zostać ocenione w oparciu o opinię eksperta lub wyniki dalszych badań przy wykorzystaniu istniejących danych doświadczalnych, takich jak dane wskazujące, czy wynik dodatni wykracza poza zakres danych dotyczących kontroli ujemnej lub poza zakres danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej gromadzonych przez dane laboratorium (30).
43. W rzadkich przypadkach, nawet po przeprowadzeniu dalszych badań, uzyskany zbiór danych uniemożliwi uznanie wyników za dodatnie lub ujemne i w takiej sytuacji wynik zostanie uznany za niejednoznaczny.
44. W badaniach statystycznych należy przyjąć, że jednostką doświadczalną jest zwierzę płci męskiej. Choć dane o liczbie (np. liczba zagnieżdżonych zarodków na samice) mogą być rozłożone zgodnie z rozkładem Poissona lub odpowiednie dane dotyczące proporcji (np. odsetek martwych zagnieżdżonych zarodków) mogą być rozłożone zgodnie z rozkładem dwumianowym, takie dane są niejednokrotnie nadmiernie rozproszone (31). Dlatego też w ramach analizy statystycznej należy w pierwszej kolejności przeprowadzić badanie służące ustaleniu, czy w danym przypadku dochodzi do nadmiernego lub zbyt małego rozproszenia, takie jak test wariancji dwumianowej Cochra (32) lub test Tarone'a  $C(\alpha)$  w przypadku nadmiernego rozproszenia dwumianowego (31)(33). Jeżeli nie zostanie stwierdzone odstępstwo od rozproszenia dwumianowego, tendencje w zakresie proporcji przy poszczególnych poziomach dawek można zbadać, przeprowadzając test tendencji Cochra-Armitage'a (34), przy czym przeprowadzane parami porównania z grupą kontrolną mogą zostać zbadane w ramach testu dokładnego Fishera (35). Podobnie w przypadku niestwierdzenia odstępstwa od rozproszenia dwumianowego tendencje w zakresie danych liczbowych można zbadać za pomocą regresji Poissona (36), przy czym

przeprowadzane sparowane porównania z grupą kontrolną mogą zostać zbadane w kontekście modelu Poissona przy wykorzystaniu sparowanych kontrastów (36). W przypadku stwierdzenia znacznego nadmiernego lub zbyt małego rozproszenia zaleca się skorzystanie z metod nieparametrycznych (23)(31). Metody te obejmują bezparametrowe badanie statystyczne, takie jak test Jonckheere'a-Terpstry dla tendencji (37) i testy Manna-Whitneya (38) dla sparowanych porównań z grupą kontrolną z nośnikiem/rozpuszczalnikiem, a także testów permutacyjnych, testów, w ramach których dochodzi do ponownego wyboru próby, testów bootstrapowych dla tendencji oraz przeprowadzanych parami porównań z grupą kontrolną (31)(39).

45. Dodatni wynik testu dominującej mutacji letalnej dostarcza dowodów potwierdzających genotoksyczność badanej substancji chemicznej w odniesieniu do komórek germinalnych samca poddanego działaniu substancji chemicznej, należącego do gatunku doświadczalnego.
46. Ustalenie, czy odnotowane wartości mieszczą się w zakresie danych historycznych dotyczących kontroli, czy też wykraczają poza ten zakres, może okazać się pomocne w kontekście oceny biologicznego znaczenia reakcji (40).

### **Sprawozdanie z badania**

47. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

#### *Streszczenie.*

##### *Badana substancja chemiczna:*

- źródło, numer partii, termin przydatności, jeżeli jest dostępny,
- stabilność badanej substancji chemicznej, jeżeli jest znana,
- rozpuszczalność i stabilność badanej substancji chemicznej w rozpuszczalniku, jeżeli są znane,
- pomiar pH, osmolalności i osadu w podłożu, do którego dodano badaną substancję chemiczną, stosownie do przypadku.

##### *Substancja jednoskładnikowa:*

- wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne,
- dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa IUPAC lub CAS, numer CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny, czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń, stosownie do przypadku i jeśli jest to praktycznie wykonalne, itp.

##### *Substancja wieloskładnikowa, UVCB i mieszaniny:*

- opisane w miarę możliwości przez podanie nazwy chemicznej (zob. powyżej), określenie ilości oraz istotnych właściwości fizykochemicznych składników.

*Przygotowanie badanej substancji chemicznej:*

- uzasadnienie wyboru nośnika,
- rozpuszczalność oraz stabilność badanej substancji chemicznej w rozpuszczalniku/nośniku, jeżeli są znane,
- przygotowanie postaci użytkowych przeznaczonych do spożycia w paszy i z wodą do picia lub w formie wziewnej,
- oznaczenie analityczne postaci użytkowych (np. stabilność, jednorodność, stężenia nominalne), jeżeli jest przeprowadzane.

*Zwierzęta doświadczalne:*

- gatunek/szczep wykorzystywane w badaniu wraz z uzasadnieniem jego wyboru,
- liczba, wiek i płeć zwierząt,
- źródło pochodzenia, warunki utrzymywania, pasza itp.,
- metoda niepowtarzalnej identyfikacji zwierząt,
- w przypadku badań krótkoterminowych: masa ciała poszczególnych samców na początku i na końcu badania; w przypadku badań trwających dłużej niż jeden tydzień: masa ciała poszczególnych zwierząt w trakcie badania oraz informacje o spożyciu pokarmu. W odniesieniu do każdej grupy należy uwzględnić informacje o zakresie masy ciała oraz o średniej i odchyleniu standardowym.

*Warunki badania:*

- dane dotyczące kontroli dodatnich i ujemnych (z rozpuszczalnikiem/nośnikiem),
- dane uzyskane w ramach badania ustalającego zakres dawkowania,
- uzasadnienie wyboru poziomu dawkowania,
- szczegółowe informacje dotyczące przygotowania badanej substancji chemicznej,
- szczegółowe informacje dotyczące podawania badanej substancji chemicznej,
- uzasadnienie drogi podawania,
- metody pomiaru toksyczności u zwierząt, w tym dostępne analizy histopatologiczne lub hematologiczne oraz częstotliwość przeprowadzania obserwacji zwierząt i pomiaru masy ciała,
- metody sprawdzania, czy badana substancja chemiczna dotarła do tkanki docelowej lub do krwioobiegu w przypadku otrzymania wyników ujemnych,

- dawka faktyczna (mg/kg masy ciała na dobę) obliczona w oparciu o stężenie badanej substancji chemicznej w paszy/wodzie do picia (ppm) i spożycie, w stosownych przypadkach,
- szczegółowe informacje dotyczące jakości pokarmu i wody,
- szczegółowe informacje dotyczące urozmaicenia warunków bytowania w klatce,
- szczegółowy opis harmonogramów podawania substancji chemicznej i pobierania próbek oraz ich uzasadnienie,
- metoda analgezji,
- metoda uśmiercenia,
- procedury izolowania i konserwacji tkanek,
- źródło i numery partii wszystkich zestawów i odczynników (w stosownych przypadkach),
- metody oznaczania liczby dominujących mutacji letalnych,
- harmonogram krycia,
- metody stosowane w celu ustalenia, czy nastąpiło krycie,
- czas uśmiercenia,
- kryteria oceny punktowej skutków dominującej mutacji letalnej, z uwzględnieniem ciałek żółtych, implantacji, resorpcji i strat przedimplantacyjnych, żywych zagnieżdżonych zarodków, martwych zagnieżdżonych zarodków.

*Wyniki:*

- stan zwierząt przed badaniem i podczas całego okresu badania, w tym oznaki toksyczności,
- masa ciała samca w okresie poddawania działaniu substancji i w okresie krycia,
- liczba pokrytych samic,
- w stosownych przypadkach zależność dawka-odpowiedź,
- dane dotyczące równoczesnych i historycznych kontroli ujemnych z uwzględnieniem zakresów, średnich i odchyleń standardowych,
- dane dotyczące równoczesnych kontroli dodatnich,
- dane zestawione w formie tabeli lub dane dotyczące poszczególnych matek, w tym: liczba ciałek żółtych u danej matki; liczba implantacji u danej matki; liczba resorpcji i strat przedimplantacyjnych u danej matki; liczba żywych zagnieżdżonych zarodków u danej matki; liczba martwych zagnieżdżonych zarodków u danej matki; masy płodów,
- powyższe dane zestawione dla poszczególnych okresów krycia i dawek z uwzględnieniem częstości występowania dominujących mutacji letalnych,

- zastosowane analizy i metody statystyczne.

*Omówienie wyników.*

*Wniosek.*

## BIBLIOGRAFIA

- (1) OECD (2016). *Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015*. [W:] Publikacje na temat środowiska, seria dotycząca badań i oceny nr 234. Paryż: OECD.
- (2) Bateman, A.J. (1977). *The Dominant Lethal Assay in the Male Mouse*, [w:] B. J. Kilbey *et al.* (red.) *Handbook of Mutagenicity Test Procedures* s. 235–334, Elsevier, Amsterdam.
- (3) Ehling U.H., Ehling, U.H., Machemer, L., Buselmaier, E., Dycka, D., Froberg, H., Kratochvilova, J., Lang, R., Lorke, D., Muller, D., Pheh, J., Rohrborn, G., Roll, R., Schulze-Schencking, M. i Wiemann, H. (1978). *Standard Protocol for the Dominant Lethal Test on Male Mice*. Dokument sporządzony przez grupę roboczą utworzoną w ramach powołanej *ad hoc* komisji ds. genetyki chemicznej zajmującej się dominującymi mutacjami letalnymi, „Toxicol.” nr 39, s. 173–185.
- (4) Shelby M.D. (1996). *Selecting Chemicals and Assays for Assessing Mammalian Germ Cell Mutagenicity*. „Mutation Res.” nr 352, s. 159–167.
- (5) Knudsen I., Knudsen, I., Hansen, E.V., Meyer, O.A. i 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 Research” nr 48, s. 267–270.
- (6) Anderson D., Hughes, J.A., Edwards, A.J. i Brinkworth, M.H. (1998). *A Comparison of Male-Mediated Effects in Rats and Mice Exposed to 1,3-Butadiene*. „Mutation Research” nr 397, s. 74–77.
- (7) Shively C.A., C.A., White, D.M., Blauch, J.L. i Tarka, S.M. Jr. (1984). *Dominant Lethal Testing of Theobromine in Rats*. „Toxicology Lett.” nr 20, s. 325–329.
- (8) Rao K.S., Cobel-Geard, S.R., Young, J.T., Hanley, T.R. Jr., Hayes, W.C., John, J.A. i Miller, R.R. (1983). *Ethyl Glycol Monomethyl Ether II. Reproductive and dominant Lethal Studies in Rats*. „Fundamental and Applied Toxicology” nr 3, s. 80–85.
- (9) Brewen J.G., Payne, H.S., Jones, K.P., i 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 Research” nr 33, s. 239–249.
- (10) Marchetti F., Bishop, J.B., Cosentino, L., Moore II, D. i Wyrobek, A.J. (2004). *Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations in Mouse Zygotes Determine their Embryonic Fate*. „Biology of Reproduction” nr 70, s. 616–624.

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



- (22) Generoso W.M. i Piegorsch W.W. (1993). *Dominant Lethal Tests in Male and Female Mice*. „Methods in Toxicology”, część 3A, s. 124–141.
- (23) Haseman J.K. i Soares E.R. (1976). *The Distribution of Fetal Death in Control Mice and its Implications on Statistical Tests for Dominant Lethal Effects*. „Mutation Research” nr 41, s. 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. „Mutagenesis” nr 1, s. 353–360.
- (25) Anderson D., Anderson, D., Hodge, M.C.E., Palmer, S. i Purchase, I.F.H. (1981). *Comparison of Dominant Lethal and Heritable Translocation Methodologies*. „Mutation Research” nr 85, s. 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. i Richold, M. (1992). *Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in In Vivo Mutagenicity Assays*. „Mutagenesis” nr 7 s. 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*, [w:] *Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment* (nr 19), Paryż: Organisation for Economic Cooperation and Development.
- (28) Barrow M.V., Taylor W.J i Morphol J. (1969). *A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Fetuses*, nr. 127, s. 291–306.
- (29) Kirkland D.J., (red.)(1989). *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*. Cambridge University Press.
- (30) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper P., Lovell D., Martus H.-J. i Thybaud V. (2011). *Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data*. „Mutation Research” nr 723, s. 87–90.
- (31) Lockhart A.C., Piegorsch W.W. i Bishop J.B. (1992). *Assessing Over Dispersion and Dose-Response in the Male Dominant Lethal Assay*. „Mutation Research” nr 272, s. 35–58.
- (32) Cochran W.G. (1954). *Some Methods for Strengthening the Common  $\chi^2$  Tests*. „Biometrics” nr 10, 417–451.
- (33) Tarone R.E. (1979). *Testing the Goodness of Fit of the Binomial Distribution*. „Biometrika” nr 66, 585–590.

- (34) Margolin B.H. (1988). *Test for Trend in Proportions*. [W:] Kotz S. and Johnson N. L. (red.) *Encyclopedia of Statistical Sciences*. t. 9, s. 334–336. John Wiley and Sons, Nowy Jork.
- (35) D.R. Cox, *Analysis of Binary Data*. Chapman and Hall, Londyn (1970).
- (36) Neter J.M., Kutner, H.C., Nachtsheim, J. i Wasserman, W. (1996). *Applied Linear Statistical Models*. wydanie czwarte, rozdziały 14 i 17, McGraw-Hill, Boston.
- (37) Jonckheere R. (1954). *A Distribution-Free K-Sample Test Against Ordered Alternatives*. „Biometrika” nr 41, s. 133–145.
- (38) Conover W.J. (1971). *Practical Nonparametric Statistics*. John Wiley and Sons, Nowy Jork.
- (39) Efron, B. (1982). *The Jackknife, the Bootstrap and Other Resampling Plans*. Society for Industrial and Applied Mathematics, Filadelfia.
- (40) Fleiss J. (1973). *Statistical Methods for Rates and Proportions*. John Wiley and Sons, Nowy Jork.

## **Dodatek 1**

### **DEFINICJE**

Substancja chemiczna: substancja lub mieszanina.

Ciało żółte (ciałka żółte): hormonalna struktura wydzielnicza utworzona na jajniku w obszarze pęcherzyka, który uwolnił jajo. Liczba ciałek żółtych w jajnikach odpowiada liczbie jaj, u których nastąpił proces owulacji.

Dominująca mutacja letalna: mutacja, która zachodzi w komórce germinalnej lub utrwała się po zapłodnieniu, powodując śmierć embrionu lub stratę płodu.

Współczynnik płodności: liczba pokrytych ciężarnych samic w stosunku do liczby pokrytych samic.

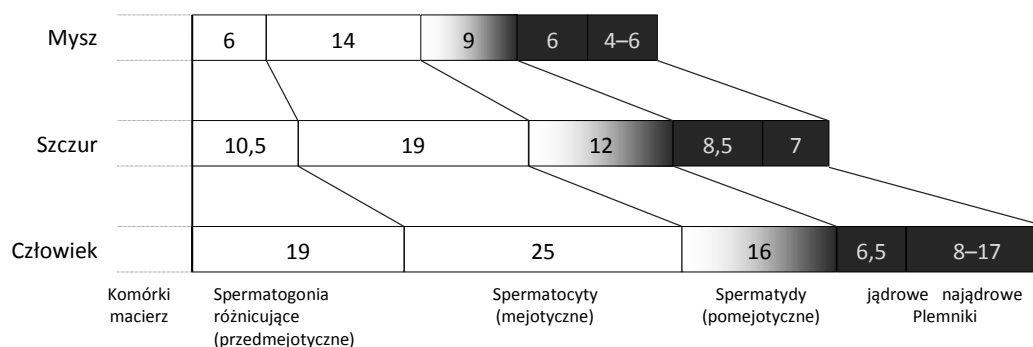
Okres krycia: czas między zakończeniem fazy narażenia a kryciem przez samców poddanych działaniu substancji. Kontrolowanie tego okresu pozwala na ocenę wpływu efektów chemicznych na różne rodzaje komórek germinalnych. W przypadku krycia myszy w 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7. i 8. tygodniu po zakończeniu narażenia mierzy się skutki, jakie zaszły w plemnikach, skondensowanych spermatydach, okrągłych spermatydach, spermatocytach na etapie pachytenu, wczesnych spermatocytach, zróżnicowanych spermatogoniach, spermatogoniach różnicujących oraz w spermatogoniach macierzystych.

Strata przedimplantacyjna: różnica między liczbą zagnieżdżonych zarodków a liczbą ciałek żółtych. Można ocenić przez porównanie całkowitej ilości zagnieżdżonych zarodków u danej samicy w grupie poddanej działaniu substancji i grupach kontrolnych.

Strata poimplantacyjna: odsetek martwych zagnieżdżonych zarodków w grupie poddanej działaniu substancji porównany ze stosunkiem liczby martwych zagnieżdżonych zarodków do ich całkowitej liczby w grupie kontrolnej.

Badana substancja chemiczna: dowolna substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

UVCB: substancje o nieznanym lub zmiennym składzie, złożone produkty reakcji lub materiały biologiczne.

**Dodatek 2****HARMONOGRAM SPERMATOGENEZY U SSAKÓW**

**Rys. 1.** Porównanie czasu trwania (w dniach) rozwoju męskiej komórki germinalnej u myszy i człowieka. Naprawa DNA nie następuje w okresach wskazanych przez zacielenie.

Powyższy schemat przedstawia przebieg spermatogenezy u myszy, szczurów i człowieka (źródło: „Alder” 1996). Do spermatogoniów niezróżnicowanych zalicza się: spermatogonia *A single* (As); spermatogonia *A paired* (Ap); oraz spermatogonia *A aligned* (Aal) (źródło: Hess and de Franca, 2008). Spermatogonia *A single* uznaje się za rzeczywiste komórki macierzyste; w związku z tym, aby móc przeprowadzić ocenę wpływu na komórki macierzyste, między ostatnim wstrzyknięciem badanej substancji chemicznej a kryciem musi upłynąć co najmniej 49 dni (w przypadku myszy).

**Źródła**

Adler, ID (1996). *Comparison of the duration of spermatogenesis between rodents and humans*. „Mutation Research” nr 352, s. 169–172.

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

4) w części B rozdział B.23 otrzymuje brzmienie:

## **„B.23 BADANIE ABERRACJI CHROMOSOMOWEJ SPERMATOGONIÓW U SSAKÓW**

### **WPROWADZENIE**

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD nr 483 (2016). Metody badawcze są okresowo poddawane przeglądowi w związku z postępem naukowym, zmieniającymi się potrzebami regulacyjnymi oraz troską o dobrostan zwierząt. Niniejsza zmodyfikowana wersja metody badawczej odzwierciedla wieloletnie doświadczenie w przeprowadzaniu tego badania oraz potencjał integracji lub łączenia tego badania z innymi badaniami dotyczącymi toksyczności lub genotoksyczności. Łączenie badań toksyczności stwarza możliwość ograniczenia liczby zwierząt wykorzystywanych w badaniach toksyczności. Niniejsza metoda badawcza stanowi część cyklu metod badawczych dotyczących toksykologii genetycznej. OECD opracowała dokument, który zawiera zwięzłe informacje na temat badań w zakresie toksykologii genetycznej oraz przegląd najnowszych zmian, jakie wprowadzono do wytycznych OECD dotyczących badań w zakresie toksykologii genetycznej (1).
2. Celem badania aberracji chromosomowej spermatogoniów u ssaków *in vivo* jest zidentyfikowanie substancji chemicznych, które powodują strukturalne aberracje chromosomowe w spermatogoniach ssaków (2)(3)(4). Ponadto niniejsze badanie jest istotne dla oceny genotoksyczności, ponieważ czynniki związane z metabolizmem, farmakokinetyką oraz procesami naprawy DNA *in vivo* – choć mogą różnić się w zależności od gatunku – są aktywne i wywierają wpływ na reakcję. Niniejsza metoda badawcza nie służy do pomiaru aberracji liczbowych; testu tego nie stosuje się rutynowo w tym celu.
3. Za pomocą niniejszego badania mierzy się strukturalne aberracje chromosomowe (zarówno w typie chromosomowym, jak i chromatydowym) w dzieleniu komórek germinalnych i w związku z tym oczekuje się, że pozwoli ono prognozować wprowadzanie dziedzicznych mutacji w komórkach germinalnych.
4. Definicje kluczowych terminów podano w dodatku.

### **ZAŁOŻENIA WSTĘPNE**

5. Chociaż niniejsze badanie przeprowadza się zazwyczaj na gryzoniach, w niektórych przypadkach dopuszcza się również możliwość wykorzystania innych gatunków, jeżeli zostanie to naukowo uzasadnione. Standardowe preparaty cytogenetyczne jąder gryzoni umożliwiają wygenerowanie metafaz mitotycznych (spermatogoniów) oraz mejozycznych (spermatocytów). Metafazy mitotyczne oraz mejozyczne można zidentyfikować, opierając się na morfologii chromosomów (4). Niniejsze badanie cytogenetyczne *in vivo* umożliwia wykrywanie

strukturalnych aberracji chromosomowych podczas podziału mitotycznego spermatogonii. Inne komórki docelowe nie są przedmiotem niniejszej metody badawczej.

6. Aby wykryć aberracje typu chromatydowego w spermatogoniach przed przekształceniem tych aberracji w aberracje typu chromosomowego w kolejnych podziałach komórek, należy zbadać pierwszy podział komórki mitotycznej następujący po poddaniu działaniu substancji. Dodatkowe informacje ze spermatocytów poddanych działaniu substancji można uzyskać w drodze analizy chromosomu mejozytycznego pod kątem strukturalnych aberracji chromosomowych w diakinezie metafazy I i metafazie II.
7. W jądrze występuje pewna liczba generacji spermatogoniów (5) i te różne rodzaje komórek germinalnych mogą charakteryzować się pewnym zakresem wrażliwości na działanie substancji chemicznej. Zatem wykryte aberracje przedstawiają zagregowaną reakcję poddanych działaniu substancji populacji spermatogoniów. Spermatogonia B stanowią większość komórek mitotycznych w preparatach z jądrem, a ich cykl komórkowy wynosi około 26 godzin (3).
8. Jeżeli istnieją dowody świadczące o tym, że badana substancja chemiczna lub jej metabolit lub metabolity nie dotrą do jądra, nie należy przeprowadzać tego badania.

## **ZASADA METODY BADAWCZEJ**

9. Zasadniczo zwierzęta poddaje się działaniu badanej substancji chemicznej z zastosowaniem odpowiedniej drogi narażenia i uśmierca się je po upływie odpowiedniego czasu od podania substancji chemicznej. Przed uśmierceniem zwierzętom podaje się substancję chemiczną zawierającą środek zatrzymujący metafazę (np. kolchicynę lub Colcemid®). Następnie z komórek germinalnych sporządza się preparaty chromosomowe i je barwi, po czym analizuje się komórki metafazy pod kątem aberracji chromosomowych.

## **WERYFIKACJA BIEGŁOŚCI LABORATORIUM**

10. Kompetencje w zakresie przedmiotowego testu ustala się, wykazując zdolność do odtwarzania częstotliwości oczekiwanych wyników strukturalnej aberracji chromosomowej w spermatogoniach z substancjami służącymi do kontroli dodatniej (łącznie z reakcjami słabymi), takimi jak te wymienione w tabeli 1, oraz uzyskując częstotliwości kontroli ujemnej spójne z zakresem danych dotyczących kontroli dopuszczalnym w dostępnej literaturze (np. (2)(3)(6)(7)(8)(9)(10)) lub z historycznym rozkładem kontroli laboratorium, jeżeli jest dostępny.

## **OPIS METODY**

### **Czynności przygotowawcze**

*Wybór gatunku zwierząt*

11. Badania należy prowadzić na zdrowych młodych dorosłych zwierzętach należących do szczepów powszechnie wykorzystywanych w badaniach laboratoryjnych. Zazwyczaj wykorzystuje się samce myszy; jeżeli zostanie to naukowo uzasadnione, dopuszcza się jednak możliwość wykorzystania innych odpowiednich gatunków ssaków, dopuszcza się także przeprowadzenie niniejszego badania w połączeniu z inną metodą badawczą. W sprawozdaniu należy przedstawić naukowe uzasadnienie wykorzystania gatunków innych niż gryzonie.

#### *Warunki utrzymywania i karmienia zwierząt*

12. W przypadku gryzoni temperatura w pomieszczeniu dla zwierząt powinna wynosić 22 °C ( $\pm 3$  °C). Chociaż wilgotność względna powinna wynosić co najmniej 40 % i pożądane jest, by nie przekraczała 70 % poza okresami czyszczenia pomieszczenia, najlepiej byłoby, gdyby utrzymywała się na poziomie 50–60 %. Oświetlenie powinno być sztuczne w cyklu 12 godzin z dostępem światła i 12 godzin bez dostępu światła. Do żywienia można stosować konwencjonalne pasze laboratoryjne z nieograniczonym dostępem do wody pitnej. Wybór paszy może zależeć od potrzeby zapewnienia odpowiedniej domieszki badanej substancji chemicznej, jeżeli jest ona podawana tą drogą. Gryzonie należy trzymać w małych grupach (nie więcej niż pięć zwierząt w klatce), jeżeli nie przewiduje się ich agresywnego zachowania, najlepiej w klatkach z pełną podłogą, oraz zapewnić im odpowiednie urozmaicenie warunków bytowania. Jeżeli ma to naukowe uzasadnienie, zwierzęta mogą być trzymane oddzielnie.

#### *Przygotowanie zwierząt*

13. Zazwyczaj wykorzystuje się zdrowe młode dorosłe samce (w wieku 8–12 tygodni na początku badania) i losowo przydziela do grup kontrolnych i grup poddawanych działaniu substancji. Zwierzęta znakuje się indywidualnie przy użyciu humanitarnej, mało inwazyjnej metody (np. poprzez obrączkowanie, kolczykowanie, wszczepianie mikroukładów i identyfikację biometryczną, a nie przycinanie uszu lub palców) i aklimatyzuje do warunków laboratoryjnych przez co najmniej pięć dni. Klatki należy rozmieścić w taki sposób, aby zminimalizować potencjalny wpływ ich układu. Należy unikać zanieczyszczenia krzyżowego kontrolą dodatnią i badaną substancją chemiczną. W momencie rozpoczęcia badania różnice w masie ciała poszczególnych zwierząt powinny być minimalne i nie powinny przekraczać  $\pm 20$  %.

#### *Przygotowanie dawek*

14. Badane substancje chemiczne w stanie stałym należy rozpuszczać lub przygotowywać w postaci zawiesiny w odpowiednich rozpuszczalnikach lub nośnikach lub dodawać do paszy lub do wody do picia przed podaniem dawki zwierzętom. Badane substancje chemiczne w stanie ciekłym mogą być dawkowane bezpośrednio lub można je rozcieńczać przed dawkowaniem. W przypadku narażenia w drodze inhalacji badane substancje chemiczne można podawać w postaci gazu, pary lub stałych/ciekłych aerozoli, w zależności od ich właściwości fizykochemicznych. Należy stosować świeże preparaty badanej substancji chemicznej, chyba że z danych dotyczących stabilności wynika, iż przechowywanie tych preparatów jest dopuszczalne i że w danych tych określono warunki prawidłowego przechowywania takich preparatów.

### Warunki badania – rozpuszczalnik/nośnik

15. Rozpuszczalnik/nośnik nie powinien wywoływać efektów toksycznych przy stosowanych poziomach dawek oraz nie powinien być w stanie wchodzić w reakcję chemiczną z badanymi substancjami chemicznymi. Jeśli stosowane są inne niż dobrze znane rozpuszczalniki/nośniki, ich włączenie do doświadczenia powinno być poparte danymi referencyjnymi wskazującymi na ich zgodność. Zaleca się, o ile to możliwe, aby w pierwszej kolejności rozważone zostało wykorzystanie wodnych rozpuszczalników/nośników. Wśród przykładów powszechnie wykorzystywanych zgodnych rozpuszczalników/nośników można wymienić wodę, sól fizjologiczną, roztwór metylocelulozy, roztwór soli sodowej karboksymetylocelulozy, oliwę z oliwek i olej kukurydziany. Jeżeli nie istnieją historyczne lub opublikowane dane wykazujące, że wybrany nietypowy rozpuszczalnik/nośnik nie wywołuje żadnych strukturalnych aberracji chromosomowych ani innych szkodliwych skutków, należy wykonać badanie wstępne w celu ustalenia dopuszczalności stosowania kontroli z rozpuszczalnikiem/nośnikiem.

### Kontrole dodatnie

16. Zawsze należy prowadzić równoległą grupę zwierząt na potrzeby kontroli dodatniej, chyba że laboratorium wykazało biegłość w przeprowadzaniu badania oraz w niedawnej przeszłości regularnie przeprowadzało takie badania (np. w ciągu ostatnich 5 lat). W przypadku nieuwzględnienia równoczesnej kontroli dodatniej, do każdego doświadczenia należy włączyć kontrolę na potrzeby oceny ilościowej (utrwalone i niebarwione preparaty). Tego rodzaju kontrole można uzyskać, włączając do oceny ilościowej wyników badania odpowiednie próbki referencyjne, które pozyskano w trakcie odrębnego doświadczenia przeprowadzanego okresowo (np. co 6–18 miesięcy) z wykorzystaniem kontroli dodatniej, i które są przechowywane w laboratorium przeprowadzającym test; na przykład w trakcie badania biegłości i – w stosownych przypadkach – w regularnych odstępach czasu w późniejszym okresie.
17. Substancje służące do kontroli dodatniej powinny w przewidywalny sposób generować zauważalny wzrost częstości występowania komórek ze strukturalnymi aberracjami chromosomowymi w porównaniu z częstością występowania samorzutnego. Dawki stosowane do celów kontroli dodatniej należy dobierać w taki sposób, aby efekty były jasne, lecz aby osoba zliczająca nie była w stanie natychmiast zidentyfikować zakodowanych próbek. W tabeli 1 przedstawiono przykładowe substancje służące do kontroli dodatniej.

**Tabela 1:** Przykładowe substancje chemiczne służące do kontroli dodatniej.

| Substancje referencyjne    | [nr CAS]                            | (numer |
|----------------------------|-------------------------------------|--------|
| Cyklofosfamid (monohydrat) | [nr CAS 50-18-0 (nr CAS 6055-19-2)] | (9)    |
| Cykloheksyloamina          | [nr CAS 108-91-8]                   | (7)    |
| Mitomycyna C               | [nr CAS 50-07-7]                    | (6)    |



|                                           |
|-------------------------------------------|
| Akrylamid monomeryczny [CAS 79-06-1] (10) |
| Trietylenomelamina [CAS 51-18-3] (8)      |

### *Kontrole ujemne*

18. W każdym okresie pobierania próbek należy uwzględnić zwierzęta przeznaczone do celów kontroli ujemnej, poddane działaniu samego rozpuszczalnika lub nośnika, a poza tym badane w ten sam sposób, jak grupy poddawane działaniu substancji. Jeżeli nie istnieją historyczne lub opublikowane dane wykazujące, że wybrany rozpuszczalnik/nośnik nie wywołuje żadnych aberracji chromosomowych lub innych szkodliwych skutków, zwierzęta w grupie kontrolnej powinny zostać również uwzględnione w każdym okresie pobierania próbek w celu ustalenia dopuszczalności grupy kontrolnej nośnika.

## **PROCEDURA**

### **Liczba zwierząt**

19. Na początku badania należy ustalić liczebność grup w celu zapewnienia w każdej grupie co najmniej 5 samców. Uważa się, że ta liczba zwierząt w grupie jest wystarczająca, aby zapewnić odpowiednią moc testów statystycznych (tj. ogólnie umożliwiającą wykrycie co najmniej podwojenia częstości występowania aberracji chromosomowych, kiedy poziom kontroli ujemnej wynosi co najmniej 1,0 %, a prawdopodobieństwo poziomu istotności wynoszącego 0,05 jest równe 80 %) (3)(11). Zgodnie z maksymalnymi typowymi wymaganiami w zakresie liczby zwierząt – w przypadku badania, w ramach którego dwukrotnie pobiera się próbki, z trzema grupami dawkowania i równolegle prowadzoną kontrolą ujemną oraz dodatnią (każda grupa złożona z pięciu zwierząt), wymagane byłoby użycie 45 zwierząt.

### **Harmonogram podawania substancji chemicznej**

20. Badane substancje chemiczne zazwyczaj podaje się jednorazowo (tj. jako pojedynczą dawkę); można również zastosować inne schematy dawkowania, pod warunkiem że są one naukowo uzasadnione.
21. W grupie otrzymującej najwyższą dawkę wykorzystywane są dwa okresy pobierania próbek po poddaniu działaniu substancji badanej. Ponieważ czas wymagany na wchłonięcie i metabolizm badanych substancji chemicznych oraz jego oddziaływanie na kinetykę cyklu komórkowego mogą wywierać wpływ na optymalny czas na wykrycie aberracji chromosomowej, wykorzystuje się wcześniejszy i późniejszy okres pobierania próbek – po upływie 24 godzin oraz po upływie 48 godzin po poddaniu działaniu substancji badanej. W przypadku dawek innych niż najwyższa należy wykorzystać wczesny okres pobierania próbek – po 24 godzinach (czas równy czasowi trwania cyklu komórkowego spermatogoniów B lub krótszy i tym samym optymalizujący prawdopodobieństwo oceny pierwszych metafaz po poddaniu działaniu

substancji), chyba że znany jest inny, bardziej odpowiedni i uzasadniony okres pobierania próbek.

22. Można stosować inne okresy pobierania próbek. Na przykład w przypadku substancji chemicznych, które mogą wywierać skutki niezależne od fazy S, odpowiednie mogą być wcześniejsze okresy pobierania próbek (tj. krótsze niż 24 godziny).
23. Można wykorzystać schemat powtórzonej dawki substancji chemicznej, np. w połączeniu z badaniem w innym punkcie końcowym, w którym stosuje się okres podawania wynoszący 28 dni (np. metoda badawcza B.58); aby uwzględnić różne okresy pobierania próbek, będą jednak wymagane dodatkowe grupy zwierząt. W związku z powyższym odpowiedniość takiego schematu należy uzasadnić naukowo w poszczególnych przypadkach.
24. Przed uśmierceniem zwierzętom wstrzykuje się dootrzewnowo odpowiednią dawkę substancji chemicznej zatrzymującej metafazę (np. Colcemid® lub kolchicina). Następnie pobiera się próbkę ze zwierząt w odpowiednim odstępie czasu. W przypadku myszy i szczurów ten odstęp czasu wynosi około 3–5 godzin.

### Poziomy dawek

25. W przypadku przeprowadzenia wstępnego badania ustalającego zakres dawkowania ze względu na brak dostępnych odpowiednich danych umożliwiających dobranie dawki, badanie takie należy wykonać w tym samym laboratorium z wykorzystaniem tego samego gatunku, szczepu i schematu podawania substancji chemicznej, jakie mają być stosowane w badaniu głównym według zaleceń dotyczących prowadzenia badań ustalających zakres dawkowania (12). Celem badania powinno być określenie maksymalnej tolerowanej dawki (MTD) zdefiniowanej jako dawka powodująca niewielkie efekty toksyczne w stosunku do czasu trwania badania (na przykład nietypowe zachowanie lub reakcje, niewielki spadek masy ciała lub cytotoksyczność układu krwiotwórczego), ale niepowodująca śmierci lub objawów bólu, cierpienia albo stresu, które wiązałyby się z koniecznością uśmiercenia zwierząt (13).
26. Najwyższa dawka może być również określona jako dawka wywołująca niektóre objawy toksyczności w spermatogoniach (np. zmniejszenie wskaźnika podziału mitotycznego spermatogonii w odniesieniu do pierwszej oraz drugiej metafazy podziału mejotycznego). Redukcja ta nie powinna przekroczyć 50 %.
27. W przypadku badanych substancji chemicznych charakteryzujących się szczególną aktywnością biologiczną przy niskich dawkach nietoksycznych (takich jak hormony i mitogeny) oraz substancji chemicznych wykazujących intensywne parametry toksykokinetyczne dopuszcza się możliwość zastosowania odstępstwa od kryteriów ustalania dawek – każdą taką substancję należy oceniać indywidualnie.
28. Aby uzyskać informacje na temat zależności dawka-odpowiedź, w kompletnym badaniu należy uwzględnić grupę kontrolną ujemną (pkt 18) oraz co najmniej trzy poziomy dawek, przy czym

każda kolejna dawka jest większa od poprzedniej na ogół dwukrotnie, ale nie więcej niż czterokrotnie. Jeżeli wyniki badania ustalającego zakres dawkowania lub istniejące dane będą wskazywały, że badana substancja chemiczna nie wywołuje toksyczności, najwyższa dawka w przypadku podania jednorazowego powinna wynosić 2 000 mg/kg masy ciała. Jeżeli jednak badana substancja chemiczna będzie miała działanie toksyczne, maksymalną tolerowaną dawkę należy ustalić na poziomie odpowiadającym najwyższej podanej dawce, przy czym najlepiej byłoby, gdyby zastosowane poziomy dawek obejmowały zakres od dawki maksymalnej do dawki o niskiej toksyczności lub niewywołującej żadnej toksyczności. W przypadku zaobserwowania toksyczności w tkance docelowej (tj. w jądrze) przy wszystkich badanych poziomach dawek zaleca się dalsze badania z wykorzystaniem dawek nietoksycznych. W przypadku badań przeprowadzanych w celu uzyskania bardziej szczegółowych ilościowych informacji na temat zależności dawka-odpowiedź konieczne może okazać się utworzenie dodatkowych grup dawkowania. Wspomniane wartości graniczne mogą różnić się w przypadku niektórych rodzajów badanych substancji chemicznych (np. produktów leczniczych przeznaczonych dla ludzi), które podlegają szczególnym wymogom. Jeżeli badana substancja chemiczna wywołuje toksyczność, należy wybrać dawkę graniczną i dwie niższe dawki (jak opisano powyżej). Dawka graniczna w przypadku okresu podawania trwającego 14 dni lub dłuższego wynosi 1 000 mg/kg masy ciała dziennie, a w przypadku okresu podawania trwającego krócej niż 14 dni – 2 000 mg/kg masy ciała dziennie.

### **Podawanie dawek**

29. Planując test, należy wziąć pod uwagę przewidywaną drogę narażenia ludzi. W związku z tym można wybrać jako uzasadnione takie drogi narażenia, jak podanie substancji z paszą, z wodą do picia, miejscowe, podskórne, dożylne, ustne (przez sondę), przez wdychanie lub przez implantację. Drogę narażenia należy w każdym razie dobrać w taki sposób, aby zapewnić odpowiednie narażenie tkanki docelowej. Zasadniczo nie zaleca się dokonywania wstrzyknięć dootrzewnowych, o ile nie jest to naukowo uzasadnione, ponieważ nie jest to zazwyczaj droga narażenia ludzi pod względem fizjologicznym. Jeżeli badaną substancję chemiczną dodaje się do paszy lub wody do picia, w szczególności w przypadku pojedynczej dawki substancji, należy upewnić się, że okres między spożyciem paszy i wody a pobraniem próbki jest wystarczający, aby zapewnić możliwość wykrycia skutków podania substancji (zob. pkt 33). Maksymalna objętość płynu, jaką można podać przez sondę lub wstrzyknąć jednorazowo, zależy od wielkości zwierzęcia doświadczalnego. Objętość ta nie powinna co do zasady przekraczać 1 ml/100 g masy ciała, oprócz roztworów wodnych, w przypadku których można zastosować maksymalnie 2 ml/100 g masy ciała. Zastosowanie objętości wyższych niż podane (jeżeli są dopuszczone przepisami dotyczącymi dobrostanu zwierząt) powinno być uzasadnione. Zmienność objętości badanej substancji należy zminimalizować, dostosowując stężenie, aby zapewnić stałą objętość w stosunku do masy ciała przy wszystkich poziomach dawek.

### **Obserwacje**

30. Ogólne obserwacje kliniczne zwierząt doświadczalnych wraz z rejestrowaniem objawów klinicznych powinny odbywać się co najmniej raz dziennie, najlepiej każdego dnia o tej samej porze i z uwzględnieniem szczytowego okresu przewidywanych skutków po dawkowaniu. Co najmniej dwa razy dziennie wszystkie zwierzęta powinny być obserwowane pod kątem zachorowalności i upadkowości. Wszystkie zwierzęta powinny być ważone na początku badania, co najmniej raz w tygodniu w trakcie badań z dawką powtórzoną oraz po uśmierceniu. W przypadku badań trwających co najmniej tydzień co najmniej raz w tygodniu należy dokonywać pomiaru ilości spożytego pokarmu. Jeżeli badana substancja chemiczna jest podawana w wodzie do picia, należy mierzyć spożycie wody przy każdej zmianie wody i co najmniej raz w tygodniu. Zwierzęta, u których stwierdzono oznaki podwyższonej toksyczności nieprowadzące do śmierci, należy uśmiercić przed zakończeniem okresu badania (13).

### **Przygotowanie chromosomów**

31. Natychmiast po uśmierceniu pozyskuje się zawiesiny komórek germinalnych z jednego jądra lub z obu jąder, poddaje działaniu roztworu hipotonicznego i utrzuwa zgodnie z ustalonymi protokołami (np. (2)(14)(15)). Komórki umieszcza się następnie na szkiełkach mikroskopowych i barwi (16)(17). Wszystkie szkiełka mikroskopowe należy zakodować, aby osoba zliczająca nie mogła ich zidentyfikować.

### **Analiza**

32. W przypadku każdego zwierzęcia należy ocenić co najmniej 200 prawidłowo rozmieszczonych metafaz (3)(11). Jeżeli historyczna częstość kontroli ujemnych jest  $< 1\%$ , w przypadku każdego zwierzęcia należy ocenić ponad 200 komórek, aby zwiększyć moc testów statystycznych (3). Należy zastosować metody barwienia, które umożliwiają identyfikację centromeru.
33. Aberracje typu chromosomowego i chromatydowego należy odnotowywać oddzielnie i klasyfikować według podtypów (pęknięcia, wymiany). Przy ustalaniu, czy substancja chemiczna powoduje znaczący wzrost występowania komórek z aberracjami chromosomowymi, należy odnotować przerwy bez ich uwzględniania. Procedury stosowane w laboratorium powinny zapewniać przeprowadzanie analizy aberracji chromosomowych przez odpowiednio przeszkolonych pracowników dokonujących oceny punktowej. Z uwagi na fakt, iż w wyniku przygotowywania preparatów często dochodzi do złamań w części komórek w metafazie, co prowadzi do utraty chromosomów, komórki poddawane ocenie punktowej powinny zawierać liczbę centromerów wynoszącą co najmniej  $2n \pm 2$ , gdzie  $n$  stanowi haploidalną liczbę chromosomów dla danego gatunku.
34. Mimo że celem badania jest wykrycie strukturalnych aberracji chromosomowych, należy pamiętać o konieczności odnotowywania częstości występowania komórek poliploidalnych i komórek z endoreduplikowanymi chromosomami, jeżeli zaobserwowano wystąpienie tych zjawisk (zob. pkt 44).

## DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

### Opracowanie wyników

35. Dane dotyczące poszczególnych zwierząt należy przedstawić w postaci tabeli. W przypadku każdego zwierzęcia należy ocenić liczbę komórek ze strukturalnymi aberracjami chromosomowymi oraz liczbę aberracji chromosomowych na komórkę. Aberracje typu chromosomowego i chromatydowego sklasyfikowane według podtypów (pęknięcia, wymiany) należy wyszczególnić oddzielnie, podając ich liczbę i częstość występowania w grupach doświadczalnych i kontrolnych. Przerwy odnotowuje się osobno. Częstość występowania przerw zgłasza się, lecz zazwyczaj nie uwzględnia się ich w analizie ogólnej częstości występowania strukturalnych aberracji chromosomowych. Odsetek poliploidalności oraz komórek z endoreduplikowanymi chromosomami zgłasza się, jeżeli zostaną one zaobserwowane.

36. Należy zgłosić dane dotyczące toksyczności i objawów klinicznych (zgodnie z pkt 30).

### Kryteria dopuszczalności

37. Dopuszczalność badania ocenia się na podstawie następujących kryteriów:

- równoczesna kontrola ujemna jest zgodna opublikowanymi normami dotyczącymi danych historycznych dotyczących kontroli ujemnych, co do których oczkuje się, że odsetek komórek z aberracjami chromosomowymi będzie  $> 0\%$  i  $\leq 1,5\%$ , a także – w stosownych przypadkach – zgodnie z danymi historycznymi dotyczącymi kontroli zgromadzonymi przez dane laboratorium (zob. pkt 10 i 18);
- równoczesne kontrole dodatnie powinny wywoływać reakcje zgodne z reakcjami odnotowanymi w opublikowanych normach dotyczących historycznych prób kontrolnych dodatnich lub reakcje zgodne z reakcjami odnotowanymi w prowadzonej przez laboratorium bazie danych historycznych dotyczących kontroli dodatniej, jeżeli taka baza jest dostępna, i doprowadzić do statystycznie istotnego wzrostu w porównaniu z kontrolą ujemną (zob. pkt 17, 18);
- poddano analizie wystarczające liczby komórek i dawek (zob. pkt 28 i 32);
- kryteria wyboru najwyższej dawki są spójne z kryteriami opisanymi w pkt 25 i 26.

38. Jeżeli obserwuje się zarówno mitozę, jak i mejozę, powinien zostać oznaczony wskaźnik podziału mitotycznego spermatogonii w odniesieniu do pierwszej i drugiej metafazy podziału meiotycznego, jako miara cytotoksyczności dla wszystkich zwierząt poddanych działaniu substancji oraz poddanych kontroli ujemnej w całkowitej próbie 100 dzielących się komórek na zwierzę. Jeżeli obserwuje się jedynie mitozę, indeks mitotyczny powinien zostać oznaczony w co najmniej 1 000 komórek w odniesieniu do każdego zwierzęcia.

### Ocena i interpretacja wyników

39. Aby uzyskać wystarczające dane do analizy zależności dawka-odpowiedź, należy przeanalizować co najmniej trzy poddane działaniu substancji grupy dawkowania.

40. O ile wszystkie kryteria dopuszczalności są spełnione, uznaje się, że badana substancja chemiczna daje wynik jednoznacznie dodatni, jeżeli:

- co najmniej jedna badana dawka wykazuje statystycznie istotny wzrost w porównaniu z równoczesną kontrolą ujemną,
- wzrost jest powiązany z dawką w co najmniej jednym okresie pobierania próbek; oraz
- którykolwiek wynik znajduje się poza dopuszczalnym zakresem danych dotyczących kontroli ujemnej lub poza rozkładem danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej gromadzonych przez dane laboratorium (np. poza granicami kontrolnymi wyznaczającymi przedział 95 % na podstawie rozkładu Poissona), jeżeli takie dane są dostępne.

Od tego momentu badaną substancję chemiczną uznaje się za zdolną do wywołania aberracji chromosomowych w spermatogoniach zwierząt doświadczalnych. Zalecenia dotyczące najodpowiedniejszych metod statystycznych można również znaleźć w literaturze (11)(18). Jednostką doświadczalną w zastosowanych badaniach statystycznych powinno być zwierzę.

41. O ile wszystkie kryteria dopuszczalności są spełnione, uznaje się, że badana substancja chemiczna daje wynik jednoznacznie ujemny, jeżeli:

- żadna dawka testowa nie wykazuje statystycznie istotnego wzrostu w porównaniu z równoczesną kontrolą ujemną,
- w ramach żadnego warunku doświadczalnego nie dochodzi do wzrostu powiązanego z dawką, oraz
- wszystkie wyniki mieszczą się w dopuszczalnym zakresie danych dotyczących kontroli ujemnych lub danych historycznych dotyczących kontroli ujemnych gromadzonych przez dane laboratorium (np. w granicach kontrolnych wyznaczających przedział 95 % na podstawie rozkładu Poissona), jeżeli takie dane są dostępne.

Od tego momentu badaną substancję chemiczną uznaje się za niezdolną do wywołania aberracji chromosomowych w spermatogoniach zwierząt doświadczalnych. Zalecenia dotyczące najodpowiedniejszych metod statystycznych można również znaleźć w literaturze (11)(18). Wynik ujemny nie wyklucza możliwości, że dana substancja chemiczna może wywoływać aberracje chromosomowe lub mutacje genowe w późniejszych fazach rozwojowych, których nie zbadano.

42. Weryfikacja wyraźnie dodatniej lub ujemnej reakcji nie jest wymagana.

43. Jeżeli reakcja nie jest ani jednoznacznie ujemna, ani jednoznacznie dodatnia oraz aby ułatwić ustalenie biologicznego znaczenia wyniku (np. niewielki lub graniczny wzrost), dane powinny zostać ocenione w oparciu o opinię eksperta lub wyniki dalszych badań przy wykorzystaniu

istniejących danych doświadczalnych, takich jak dane wskazujące, czy wynik dodatni wykracza poza zakres danych dotyczących kontroli ujemnej lub poza zakres danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej gromadzonych przez dane laboratorium (19).

44. W rzadkich przypadkach, nawet po przeprowadzeniu dalszych badań, uzyskany zbiór danych uniemożliwi uznanie wyników za dodatnie lub ujemne i w takiej sytuacji wynik zostanie uznany za niejednoznaczny.
45. Wzrost liczby komórek poliploidalnych może świadczyć o tym, że badana substancja chemiczna może potencjalnie hamować procesy mitotyczne oraz powodować aberracje liczby chromosomów (20). Wzrost liczby komórek z endoreduplikowanymi chromosomami może świadczyć o tym, że badana substancja chemiczna może potencjalnie hamować przebieg cyklu komórkowego (21)(22), który jest innym mechanizmem wywoływania ilościowych zmian chromosomowych niż hamowanie procesów mitotycznych (zob. pkt 2). W związku z tym częstość występowania komórek poliploidalnych i komórek z endoreduplikowanymi chromosomami należy odnotować oddzielnie.

### **Sprawozdanie z badania**

46. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

#### *Streszczenie.*

##### *Badana substancja chemiczna:*

- źródło, numer partii, termin przydatności, jeżeli jest dostępny,
- stabilność badanej substancji chemicznej, jeżeli jest znana,
- rozpuszczalność i stabilność badanej substancji chemicznej w rozpuszczalniku, jeżeli są znane,
- pomiar pH, osmolalności i osadu w podłożu, do którego dodano badaną substancję chemiczną, stosownie do przypadku.

##### *Substancja jednoskładnikowa:*

- wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne,
- dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa IUPAC lub CAS, numer CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny, czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń, stosownie do przypadku i jeśli jest to praktycznie wykonalne, itp.

##### *Substancja wieloskładnikowa, UVCB i mieszaniny:*

- opisane w miarę możliwości przez podanie nazwy chemicznej (zob. powyżej), określenie ilości oraz istotnych właściwości fizykochemicznych składników.

##### *Przygotowanie badanej substancji chemicznej:*

- uzasadnienie wyboru nośnika,

- rozpuszczalność i stabilność badanej substancji chemicznej w rozpuszczalniku/nośniku,
- przygotowanie postaci użytkowych przeznaczonych do spożycia w paszy i z wodą do picia lub w formie wziewnej,
- oznaczenia analityczne postaci użytkowych (np. stabilność, jednorodność, stężenia nominalne),
- jeżeli je wykonano.

*Zwierzęta doświadczalne:*

- gatunek/szczep wykorzystywane w badaniu wraz z uzasadnieniem jego zastosowania,
- liczba oraz wiek zwierząt,
- źródło pochodzenia, warunki utrzymywania, pasza itp.,
- metoda niepowtarzalnej identyfikacji zwierząt,
- w przypadku badań krótkoterminowych: masa ciała poszczególnych zwierząt na początku i na końcu badania; w przypadku badań trwających dłużej niż jeden tydzień: masa ciała poszczególnych zwierząt w trakcie badania oraz informacje o spożyciu pokarmu. W odniesieniu do każdej grupy należy uwzględnić informacje o zakresie masy ciała oraz o średniej i odchyleniu standardowym.

*Warunki badania:*

- dane dotyczące kontroli dodatnich i ujemnych (z rozpuszczalnikiem/nośnikiem),
- dane dotyczące studium określającego zakres badania, jeżeli zostało przeprowadzone,
- uzasadnienie wyboru poziomu dawkowania,
- uzasadnienie drogi podawania,
- szczegółowe informacje dotyczące przygotowania badanej substancji chemicznej,
- szczegółowe informacje dotyczące podawania badanej substancji chemicznej,
- uzasadnienie czasu uśmiercenia,
- metody pomiaru toksyczności u zwierząt, w tym dostępne analizy histopatologiczne lub hematologiczne oraz częstotliwość przeprowadzania obserwacji zwierząt i pomiaru masy ciała,
- metody sprawdzania, czy badana substancja chemiczna dotarła do tkanki docelowej lub do krwiobiegu w przypadku otrzymania wyników ujemnych,
- dawka faktyczna (mg/kg masy ciała na dobę) obliczona w oparciu o stężenie badanej substancji chemicznej w paszy/wodzie do picia (ppm) i spożycie, w stosownych przypadkach,
- szczegółowe informacje dotyczące jakości pokarmu i wody,
- szczegółowy opis harmonogramów podawania substancji chemicznej i pobierania próbek oraz ich uzasadnienie,



- metoda uśmiercenia,
- metoda analgezji (jeżeli jest stosowana),
- procedury izolowania tkanek,
- nazwa substancji chemicznej zatrzymującej metafazę, jej stężenie oraz czas poddania działaniu substancji,
- metody przygotowywania preparatów,
- kryteria oceny aberracji,
- liczba poddanych analizie komórek przypadających na zwierzę,
- kryteria uznawania badań za pozytywne, ujemne lub niejednoznaczne.

#### *Wyniki:*

- stan zwierząt przed badaniem i podczas całego okresu badania, w tym oznaki toksyczności,
- masa ciała i organów po uśmierceniu (jeżeli zastosowano wielokrotne poddanie działaniu substancji chemicznej, pomiar masy ciała przeprowadza się w trakcie danego schematu dawkowania),
- oznaki toksyczności,
- indeks mitotyczny,
- wskaźnik podziału mitotycznego spermatogonii w odniesieniu do pierwszej i drugiej metafazy podziału mejotycznego lub inne dowody świadczące o narażeniu na tkankę docelową,
- rodzaj i liczba aberracji podawane osobno dla każdego zwierzęcia,
- łączna liczba aberracji na grupę wraz ze średnimi i odchyleniami standardowymi,
- liczba komórek z aberracjami na grupę wraz ze średnimi i odchyleniami standardowymi,
- w stosownych przypadkach zależność dawka-odpowiedź,
- zastosowane analizy i metody statystyczne,
- dane dotyczące równoczesnych kontroli ujemnych,
- dane historyczne dotyczące kontroli ujemnej wraz z zakresami, średnimi, odchyleniami standardowymi i przedziałem ufności o wartości 95 % (w stosownych przypadkach) lub opublikowane dane historyczne dotyczące kontroli ujemnej wykorzystywane do akceptacji wyników badania,
- dane dotyczące równoczesnych kontroli dodatnich,
- zmiany ploidalności, jeżeli zostały zaobserwowane, w tym informacje na temat częstości występowania poliploidalności lub komórek endoreduplikowanych.

#### *Omówienie wyników*

*Wniosek*

## BIBLIOGRAFIA

- (1) OECD (2016). *Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015*. [W:] Publikacje na temat środowiska, Seria dotycząca badań i oceny, nr 234, OECD, Paryż.
- (2) Adler, I.-D. (1984). *Cytogenetic Tests in Mammals*, [W:] *Mutagenicity Testing: a Practical Approach*, red. S. Venitt i J.M. Parry, IRL Press, Oxford, Washington DC, s. 275–306.
- (3) Adler I.-D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. i Tanaka N. (1994). *International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests*. „Mutation Research” nr 312, s. 313–318.
- (4) Russo, A. (2000). *In Vivo Cytogenetics: Mammalian Germ Cells*. „Mutation Research” nr 455, s. 167–189.
- (5) Hess, R.A. i de Franca L.R. (2008). *Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium* [W:] *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*, (red.) Cheng C.Y, Landes Biosciences and Springer Science+Business Media, s. 1–15.
- (6) Adler, I.-D. (1974). Comparative Cytogenetic Study after Treatment of Mouse Spermatogonia with Mitomycin C. „Mutation Research” nr 23(3): s. 368–379.  
Adler, I.D. (1986). *Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications*, [W:] *Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis*, (red.) Ramel C., Lambert B. i Magnusson J., Liss, New York, s. 477–484.
- (7) Cattanaach, B.M., i Pollard C.E. (1971). *Mutagenicity Tests with Cyclohexylamine in the Mouse*. „Mutation Research”, nr 12, 472–474.
- (8) Cattanaach, B.M. i Williams, C.E. (1971). *A search for Chromosome Aberrations Induced in Mouse Spermatogonia by Chemical Mutagens*. „Mutation Research”, nr 13, 371–375.
- (9) Rathenburg, R. (1975). *Cytogenetic Effects of Cyclophosphamide on Mouse Spermatogonia*. „Humangenetik”, nr 29, 135–140.
- (10) Shiraishi, Y. (1978). *Chromosome Aberrations Induced by Monomeric Acrylamide in Bone Marrow and Germ Cells of Mice*. „Mutation Research”, nr 57(3), s. 313–324.
- (11) Adler I.-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. i Hayashi, M. (1998). *Recommendations for Statistical Designs of In Vivo Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis*. „Mutation Research” nr 417 s. 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. i Richold, M. (1992). *Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in In Vivo Mutagenicity Assays*. „Mutagenesis”, nr 7, s. 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”, nr 19, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paryż.
- (14) Yamamoto, K. i Kikuchi, Y. (1978). *A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes*. „Mutation Research”, nr 52, 207–209.
- (15) Hsu, T.C., Elder, F. i Pathak, S. (1979). *Method for Improving the Yield of Spermatogonial and Meiotic Metaphases in Mammalian Testicular Preparations*. „Environ. Mutagen.”, nr 1, s. 291–294.
- (16) Evans, E.P., Breckon, G., i Ford, C.E. (1964). *An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes*. „Cytogenetics and Cell Genetics” nr 3, 289–294.
- (17) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. i Henderson, L. (1990). *In Vivo Cytogenetics Assays*, [w:] (red.) D.J. Kirkland, *Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised*. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, s. 115–141.
- (18) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. i Savage, J.R.K. (1989). „Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays”, [w:] (red.) D.J. Kirkland, *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, s. 184–232.
- (19) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H.-J. i Thybaud, V. (2011). *Compilation and use of genetic toxicity historical control Data*. „Mutation Research” nr 723, s. 87–90.
- (20) Warr T.J., Parry E.M. i 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 Research” nr 287, s. 29–46.
- (21) Huang, Y., Change, C. i Trosko, J.E. (1983). *Aphidicolin-Induced Endoreduplication in Chinese Hamster Cells*. „Cancer Res.” nr 43, s. 1362–1364.

- (22) Locke-Huhle, C. (1983). *Endoreduplication in Chinese Hamster Cells during Alpha-Radiation Induced G2 Arrest*. „Mutation Research” nr 119, s. 403–413.

## Dodatek

### DEFINICJE

Aneuploidia: wszelkie odchylenia od zwykłej diploidalnej (lub haploidalnej) liczby chromosomów w pojedynczym chromosomie lub w większej ich liczbie, ale nie w całym zestawie lub w całych zestawach chromosomów (poliploidalność).

Centromer: region(y) chromosomu, w którym(-ch) mikrotubule wrzeciona podziałowego są asocjowane w trakcie podziału komórki, co umożliwia przemieszczenie się chromosomów potomnych do biegunów komórek potomnych.

Substancja chemiczna: substancja lub mieszanina.

Różnorodność chromosomów: różnorodność kształtów chromosomów (np. metacentryczne, akrocentryczne itd.) i ich rozmiarów.

Aberracja typu chromatydowego: strukturalne uszkodzenie chromosomu wyrażone jako złamanie pojedynczych chromatyd lub złamanie i ponowne połączenie się chromatyd.

Aberracja typu chromosomowego: strukturalne uszkodzenie chromosomu wyrażone jako złamanie chromatyd lub złamanie i ponowne połączenie się obu chromatyd w tym samym miejscu.

Klastogen: każda substancja chemiczna, która powoduje strukturalne aberracje chromosomowe w populacjach komórek lub organizmów.

Przerwa: achromatyczne uszkodzenie mniejsze niż szerokość jednej chromatyd prowadzące do minimalnego wypaczenia chromatyd.

Genotoksyczny: ogólny termin obejmujący wszelkiego rodzaju uszkodzenia DNA lub chromosomu, w tym pęknięcia, delecje, addukty, modyfikacje i sprzężenia nukleotydów, rearanżacje, mutacje, aberracje chromosomowe oraz aneuploidie. Nie wszystkie rodzaje skutków genotoksycznych powodują mutacje lub stałe uszkodzenia chromosomu.

Indeks mitotyczny: stosunek komórek w metafazie do całkowitej liczby komórek zaobserwowanych w populacji komórek; wskazanie stopnia proliferacji tej populacji.

Mitoza: podział jądra komórkowego zazwyczaj podzielony na profazę, prometafazę, metafazę, anafazę i telofazę.

Mutagenny: powoduje dziedziczne zmiany w sekwencji lub sekwencjach par zasad DNA w genach lub w strukturze chromosomów (aberracje chromosomowe).

Aberracja liczbowa: zmiana liczby chromosomów względem standardowej liczby chromosomów typowej dla wykorzystywanych zwierząt.

Poliploidalność: wielokrotność haploidalnej liczby chromosomów ( $n$ ) inna niż liczba diploidalna (tj.  $3n$ ,  $4n$  itd.).

Strukturalna aberracja chromosomowa: zmiana w strukturze chromosomu wykrywalna przez badanie mikroskopowe etapu metafazy w cyklu podziału komórki, zaobserwowana jako delecje, fragmenty i wymiany.

Badana substancja chemiczna: dowolna substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

UVCB: substancje chemiczne o nieznanym lub zmiennym składzie, złożone produkty reakcji i materiały biologiczne.";

5) w części B rozdział B.40 otrzymuje brzmienie:

## **„B.40 BADANIE DZIAŁANIA ŻRĄCEGO NA SKÓRĘ METODĄ *IN VITRO*: TEST PRZEZSKÓRNEJ OPORNOŚCI ELEKTRYCZNEJ**

### **WPROWADZENIE**

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD (TG) nr 430 (2015). Działanie żrące na skórę oznacza powstawanie nieodwracalnych uszkodzeń skóry, które przejawiają się jako widoczna martwica naskórka i skóry, w wyniku naniesienia na skórę substancji badanej [zgodnie z definicją Globalnie Zharmonizowanego Systemu Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów (GHS) Organizacji Narodów Zjednoczonych (ONZ) (1) i z rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin (CLP)<sup>1</sup>]. Niniejsza zaktualizowana metoda badawcza B.40 obejmuje procedurę *in vitro* umożliwiającą identyfikację substancji i mieszanin mających działanie żrące i niemających takiego działania zgodnie z GHS ONZ (1) oraz rozporządzeniem CLP.
2. Ocena działania żrącego na skórę wiązała się zwykle z wykorzystaniem zwierząt laboratoryjnych (metoda badawcza B.4 równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD (TG) nr 404 pierwotnie przyjętej w 1981 r. i zmienionej w latach 1992, 2002 i 2015) (2). Poza obecną metodą badawczą B.40 zweryfikowano i przyjęto inne metody badawcze *in vitro* służące badaniu potencjalnego działania żrącego na skórę substancji chemicznych jako metodę badawczą B.40bis (równoważną metodzie opisanej w wytycznej dotyczącej badań OECD (TG) 431) (3) oraz B.65 (równoważną metodzie opisanej w wytycznej dotyczącej badań OECD (TG) 435) (4), dzięki którym, jeżeli jest to wymagane, można również zidentyfikować podkategorie żrących substancji chemicznych. Jako metodę badawczą B.46 (równoważną metodzie opisanej w wytycznej dotyczącej badań OECD (TG) 439) (5) przyjęto szereg zweryfikowanych metod badawczych *in vitro* w celu wykorzystywania ich do badania podrażnienia skóry. W wytycznych OECD dotyczących zintegrowanych podejść do badań i oceny (IATA) działania żrącego na skórę i podrażnienia skóry opisano kilka modułów grupujących różne źródła informacji i narzędzia do analizy oraz (i) przedstawiono wytyczne dotyczące sposobu włączania i wykorzystywania istniejących danych, które uzyskano w ramach badań i metodami niebadawczymi, do celów oceny potencjałów substancji chemicznych pod

---

<sup>1</sup> Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniające i uchylające dyrektywy 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1907/2006, Dz.U. L 353 z 31.12.2008, s. 1.



względem działania drażniącego i żrącego na skórę, a także (ii) zaproponowano podejście w sytuacji gdy potrzebne są dalsze badania (6).

3. Niniejsza metoda badawcza odnosi się do punktu końcowego, jakim jest działanie żrące na skórę ludzką. Metoda ta opiera się na teście pomiaru przezskórnej oporności elektrycznej z użyciem skóry szczura, w którym wykorzystuje się krążki skóry, aby określić substancje żrące według ich zdolności do powodowania utraty normalnej integralności warstwy rogowej i funkcji ochronnej naskórka. Odpowiadającą wytyczną dotyczącą badań OECD przyjęto pierwotnie w 2004 r. i zaktualizowano w 2015 r., aby odnieść się do wytycznych IATA.
4. Aby ocenić badania działania żrącego na skórę *in vitro* do celów regulacyjnych, przeprowadzono badania poprzedzające walidację (7), po których przeprowadzono badanie walidacyjne testu pomiaru przezskórnej oporności elektrycznej z użyciem skóry szczura do pomiaru działania żrącego (8)(9)(10)(11). Wyniki tych badań doprowadziły do opracowania zalecenia, że metodą badawczą testu przezskórnej oporności elektrycznej (oznaczoną jako zwalidowana metoda referencyjna – VRM) można wykorzystywać do celów regulacyjnych oceny działania żrącego na skórę *in vivo* (12)(13)(14).
5. Zanim będzie można wykorzystać do celów regulacyjnych zaproponowaną podobną lub zmienioną metodą badawczą testu przezskórnej oporności elektrycznej *in vitro* inną niż VRM powinny zostać określone jej wiarygodność, istotność (dokładność) oraz ograniczenia dotyczące jej proponowanego wykorzystania, aby zapewnić jej podobieństwo do VRM zgodnie z wymogami standardów wykonywania badań (15). Wzajemne uznawanie danych OECD będzie zagwarantowane wyłącznie po poddaniu przeglądowi każdej nowej lub zaktualizowanej metody badawczej zgodnej ze standardem wykonywania badań i włączeniu jej do odpowiednich wytycznych OECD dotyczących badań.

## DEFINICJE

6. Stosowane definicje znajdują się w dodatku.

## ZAŁOŻENIA WSTĘPNE

7. Na podstawie badania walidacyjnego (10) i innych opublikowanych badań (16) (17) stwierdzono, że dzięki metodzie badawczej testu przezskórnej oporności elektrycznej z użyciem skóry szczura możliwe jest rozróżnienie znanych substancji mających działanie żrące na skórę i substancji niemających takiego działania przy ogólnej wrażliwości na poziomie 94 % (51/54) i swoistości na poziomie 71 % (48/68) w przypadku bazy danych obejmującej 122 substancje.
8. Niniejsza metoda badawcza dotyczy działania żrącego na skórę *in vitro*. Umożliwia ona określenie badanych substancji chemicznych mających działanie żrące i niemających takiego działania zgodnie z GHS ONZ/rozporządzeniem CLP. Ograniczenie niniejszej metody

badawczej, jak pokazano na podstawie badań walidacyjnych (8)(9)(10)(11), polega na tym, że metoda ta nie umożliwia podziału żrących substancji i mieszanin na podkategorie zgodnie z GHS ONZ/rozporządzeniem CLP. To, jak będzie stosowana niniejsza metoda badawcza zostanie określone w obowiązujących ramach regulacyjnych. Chociaż niniejsza metoda badawcza nie pozwala uzyskać odpowiednich informacji na temat podrażnienia skóry, należy zauważyć, że metoda badawcza B.46 dotyczy w szczególności badania *in vitro* (5) skutku dla zdrowia jakim jest podrażnienie skóry. Aby dokonać pełnej oceny miejscowego działania na skórę po pojedynczym narażeniu przez skórę, należy zapoznać się z wytycznymi OECD dotyczącymi IATA (6).

9. W ramach walidacji leżącej u podstaw niniejszej metody badawczej zbadano szeroką gamę produktów chemicznych, z których większość stanowiły substancje chemiczne, a w empirycznej bazie danych z badania walidacyjnego znalazło się 60 substancji obejmujących szeroki zakres klas chemicznych (8)(9). Z dostępnych ogólnych danych wynika, że metoda badawcza ma zastosowanie do wielu klas chemicznych i stanów skupienia, w tym do płynów, substancji półstałych, stałych i wosków. Ponieważ jednak dla konkretnych stanów skupienia elementy badane z odpowiednimi danymi porównawczymi nie są łatwo dostępne, należy zauważyć, że podczas zatwierdzania dokonano oceny stosunkowo niewielkiej liczby wosków i substancji stałych o działaniu żrącym. Ciecze mogą być wodne lub niewodne; substancje stałe mogą być rozpuszczalne lub nierozpuszczalne w wodzie. W przypadkach, w których można przedstawić dowody na brak możliwości zastosowania omawianej metody badawczej do konkretnej kategorii substancji, metody tej nie należy stosować w odniesieniu do tej konkretnej kategorii substancji. Ponadto przyjmuje się, że niniejsza metoda badawcza ma zastosowanie nie tylko do substancji, ale także do mieszanin. Jednak ze względu na fakt, iż mieszaniny obejmują szeroki zakres kategorii oraz składów, oraz że obecnie dostępna jest niewielka ilość informacji na temat badania mieszanin, w przypadkach, w których można przedstawić dowody na brak możliwości zastosowania omawianej metody badawczej w odniesieniu do danej kategorii mieszanin (np. kierując się strategią zaproponowaną przez Eskesa i in., 2012) (18), metody tej nie należy stosować w odniesieniu do tej konkretnej kategorii mieszanin. Przed zastosowaniem przedmiotowej metody badawczej z użyciem mieszaniny w celu zgromadzenia danych na potrzeby założonego celu regulacyjnego należy zastanowić się, czy zastosowanie tej metody może doprowadzić do uzyskania wyników odpowiednich z punktu widzenia tego celu, a jeżeli tak, to dlaczego. Przeprowadzenie takiej analizy nie jest konieczne, jeżeli ustanowiono wymóg regulacyjny dotyczący badania danej mieszaniny. Gazów i aerozoli nie oceniano jeszcze w badaniach walidacyjnych (8)(9). Chociaż nie można wykluczyć, że da się je badać z wykorzystaniem metody badawczej jaką jest test przezskórnej oporności elektrycznej, niniejsza metoda badawcza nie pozwala na badanie gazów i aerozoli.

## ZASADA BADANIA

10. Badaną substancję chemiczną nakłada się na okres do 24 godzin na powierzchnię naskórka krążków skóry w dwuczęściowym układzie badawczym, w którym krążki skóry pełnią funkcję przegrody między dwoma częściami. Krążki skóry pobiera się od szczurów uśmiercanych w humanitarny sposób w wieku 28–30 dni. Substancje chemiczne mające działanie żrące identyfikuje się na podstawie ich zdolności do powodowania utraty integralności warstwy rogowej naskórka i do zaburzania funkcji ochronnej, co mierzy się spadkiem TER poniżej poziomu progowego (16) (zob. pkt 32). W przypadku testu przezskórnej oporności elektrycznej z użyciem skóry szczurów przyjęto wartość graniczną 5 k $\Omega$ ; wartość tę ustalono na podstawie obszernych danych dla szerokiego zakresu substancji, w przypadku których znaczna większość wartości była albo wyraźnie wyższa (często > 10 k $\Omega$ ) albo znacznie niższa (często < 3 k $\Omega$ ) od tej wartości (16). Ogólnie badane substancje chemiczne, które w przypadku zwierząt nie mają działania żrącego, tylko drażniące lub nie mają działania drażniącego, nie powodują spadku przezskórnej oporności elektrycznej poniżej tej wartości granicznej. Co więcej, zastosowanie innych preparatów skóry lub innego sprzętu może zmienić wartość graniczną, powodując konieczność dalszej walidacji.
11. Etap wiązania barwnika jest włączony do procedury testowej mającej potwierdzić dodatnie wyniki testu przezskórnej oporności elektrycznej, w tym wartości około 5 k $\Omega$ . Etap wiązania barwnika pozwala na stwierdzenie, czy wzrost przepuszczalności jonów jest spowodowany fizycznym zniszczeniem warstwy rogowej naskórka. Wykazano, że metoda polegająca na teście przezskórnej oporności elektrycznej z wykorzystaniem skóry szczurów świadczy o działaniu żrącym *in vivo*, badanym u królików metodą badawczą B.4 (2).

## WYKAZANIE BIEGŁOŚCI

12. Przed przystąpieniem do rutynowego stosowania metody badawczej, jaką jest test przezskórnej oporności elektrycznej z użyciem skóry szczura, która to metoda jest zgodna z niniejszą metodą badawczą, laboratoria powinny wykazać swoją biegłość techniczną, prawidłowo ustalając klasyfikację 12 substancji chemicznych zalecanych w tabeli 1. W sytuacji gdy substancja znajdująca się w wykazie jest niedostępna lub w uzasadnionych przypadkach można zastosować inną substancję, dla której dostępne są odpowiednie dane porównawcze z badań *in vivo* i *in vitro* (np. z wykazu referencyjnych substancji chemicznych (16)), pod warunkiem zastosowania tych samych kryteriów wyboru, które opisano w tabeli 1.

**Tabela 1:** Wykaz substancji służących do wykazania biegłości<sup>1</sup>

| Substancja                      | Numer CAS | Klasa chemiczna <sup>2</sup> | Kategoria wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP na podstawie wyników badań <i>in vivo</i> <sup>3</sup> | Kategoria VRM na podstawie wyników badań <i>in vitro</i> | Stan skupienia | pH <sup>4</sup> |
|---------------------------------|-----------|------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|----------------|-----------------|
| Substancje żrące <i>in vivo</i> |           |                              |                                                                                                  |                                                          |                |                 |

| Substancja                                            | Numer CAS  | Klasa chemiczna <sup>2</sup> | Kategoria wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP na podstawie wyników badań <i>in vivo</i> <sup>3</sup> | Kategoria VRM na podstawie wyników badań <i>in vitro</i> | Stan skupienia | pH <sup>4</sup> |
|-------------------------------------------------------|------------|------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|----------------|-----------------|
| N,N-Dimetylo-dipropylenotriamina                      | 10563-29-8 | zasada organiczna            | 1A                                                                                               | 6 x C                                                    | L              | 8,3             |
| 1,2-Diaminopropan                                     | 78-90-0    | zasada organiczna            | 1A                                                                                               | 6 x C                                                    | L              | 8,3             |
| Kwas siarkowy (10 %)                                  | 7664-93-9  | kwas nieorganiczny           | (1A)/1B/1C                                                                                       | 5 x C<br>1 x NC                                          | L              | 1,2             |
| Wodorotlenek potasu (10 % r.w.)                       | 1310-58-3  | zasada nieorganiczna         | (1A)/1B/1C                                                                                       | 6 x C                                                    | L              | 13,2            |
| Kwas oktanowy (kaprylowy)                             | 124-07-2   | kwas organiczny              | 1B/1C                                                                                            | 4 x C<br>2 x NC                                          | L              | 3,6             |
| Di-tert-butylofenol                                   | 88-18-6    | fenol                        | 1B/1C                                                                                            | 4 x C<br>2 x NC                                          | L              | 3,9             |
| <b>Substancje nie działające żrąco <i>in vivo</i></b> |            |                              |                                                                                                  |                                                          |                |                 |
| Kwas izostearynowy                                    | 2724-58-5  | kwas organiczny              | NC                                                                                               | 6 x NC                                                   | L              | 3,6             |
| 4-amino-1,2,4-triazol                                 | 584-13-4   | zasada organiczna            | NC                                                                                               | 6 x NC                                                   | S              | 5,5             |
| Bromek fenetylu                                       | 103-63-9   | elektrofil                   | NC                                                                                               | 6 x NC                                                   | L              | 3,6             |
| 4-(metylio)-benzaldehyd                               | 3446-89-7  | elektrofil                   | NC                                                                                               | 6 x NC                                                   | L              | 6,8             |
| 1,9-dekadien                                          | 1647-16-1  | obojętna organiczna          | NC                                                                                               | 6 x NC                                                   | L              | 3,9             |
| tetrachloroetylen                                     | 127-18-4   | obojętna organiczna          | NC                                                                                               | 6 x NC                                                   | L              | 4,5             |

Skróty: r.w. = roztwór wodny Numer CAS = numer w rejestrze organizacji Chemical Abstracts Service VRM = zwalidowana metoda referencyjna; ND = nie określono.

<sup>1</sup>Substancje służące do wykazania biegłości, podzielone w pierwszej kolejności na substancje działające i nie działające żrąco, następnie według podkategorii działania żrącego i klasy chemicznej, wybrano spośród substancji wykorzystanych w badaniu walidacyjnym ECVAM metody badawczej jaką jest test przezskórnej oporności elektrycznej z użyciem skóry szczura (8)(9). O ile nie wskazano inaczej, substancje przebadano na wysokim poziomie czystości uzyskanym po nabyciu ich z handlowego źródła (8). Wybór obejmuje w możliwym zakresie substancje, które: (i) są reprezentatywne dla zakresu reakcji żrących (np. substancje nie działające żrąco; od słabo do silnie żrących substancji), które za pomocą metody VRM można zmierzyć lub przewidzieć (ii) są reprezentatywne dla klas chemicznych wykorzystywanych w badaniu walidacyjnym; (iii) odzwierciedlają cechy związane z efektywnością metody VRM; (iv) mają dobrze określoną strukturę chemiczną; (v) dają ostateczne wyniki w referencyjnej metodzie badawczej *in vivo*; (vi) są dostępne na rynku; oraz (vii) nie są związane z wygórowanymi kosztami utylizacji.

<sup>2</sup>Klasa chemiczna przypisana przez Barratta et al. (8).

<sup>3</sup>Odpowiadające grupy opakowaniowe ONZ to I, II oraz III odpowiednio dla kategorii 1A, 1B oraz 1C Globalnie Zharmonizowanego Systemu Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów/rozporządzenia CLP.

<sup>4</sup>Źródłem wartości pH jest Fentem et al. (9) oraz Barratt et al. (8).

## PROCEDURA

13. Dostępne są standardowe procedury operacyjne z wykorzystaniem skóry szczura w odniesieniu do metody badawczej jaką jest test przezskórnej oporności elektrycznej na działanie żrące na skórę (19). Metody badawcze polegające na teście przezskórnej oporności elektrycznej z wykorzystaniem skóry szczura powinny spełniać następujące warunki:

### Zwierzęta

14. Należy wykorzystać szczury, ponieważ wcześniej wykazano wrażliwość ich skóry na substancje stosowane w niniejszej metodzie badawczej (12) oraz jest to jedyny formalnie zatwierdzony rodzaj skóry (8)(9). Wiek (w momencie pobierania skóry) i szczep szczurów mają zasadnicze znaczenie, bowiem od tego zależy, czy mieszki włosowe są w stanie uśpienia poprzedzającym fazę wzrostu włosa u dorosłych osobników.
15. Owłosienie z grzbietu i boku ciała młodych, około 22-dniowych samców lub samic szczurów (pochodzących od szczepu Wistar lub podobnych) zostaje starannie usunięte małą maszynką do strzyżenia. Następnie zwierzęta są dokładnie przemywane i wycierane, natomiast miejsca, z których usuwano owłosienie, są pokrywane roztworem antybiotyku (zawierającym na przykład streptomycynę, penicylinę, chloramfenikol i amfoterycynę w stężeniach zapewniających zahamowanie rozwoju bakterii). Zwierzęta są przemywane antybiotykiem powtórnie trzeciego lub czwartego dnia po pierwszym przemyciu i są poddawane eksperymentowi w ciągu 3 dni od drugiego przemycia, kiedy warstwa rogowa naskórka ulegnie regeneracji po usunięciu owłosienia.

### Przygotowanie krążków skóry

16. Zwierzęta są humanitarnie uśmiercane, gdy osiągną 28–30 dzień życia; ten wiek ma kluczowe znaczenie. Z grzbietu i boków ciała każdego zwierzęcia pobierana jest skóra, z której następnie starannie usuwa się nadmiar tłuszczu podskórnego. Pobierane są krążki skóry, każdy o średnicy około 20 mm. Przed użyciem krążków skóra może być przechowywana, jeśli wykazano, że dane dla kontroli dodatniej i ujemnej są równoważne z danymi uzyskanymi przy użyciu świeżej skóry.
17. Każdy krążek skóry jest umieszczany nad jednym z końców rurki PTFE (politetrafluoroetylenowej), przy czym należy dopilnować, aby powierzchnia naskórka przylegała do rurki. Na koniec rurki wciskany jest gumowy pierścień, który utrzymuje skórę w odpowiednim położeniu, a nadmiar tkanki jest odcinany. Połączenie między rurką PTFE a gumowym pierścieniem jest następnie starannie uszczelniane wazeliną. Rurka jest następnie mocowana zaciskiem sprężynowym wewnątrz komory receptorowej zawierającej roztwór  $MgSO_4$  (154 mM) (rysunek 1). Krążek skóry powinien być całkowicie zanurzony w roztworze  $MgSO_4$ . Ze skóry jednego szczura można otrzymać aż 10–15 krążków. Wymiary rurki i pierścienia pokazano na rysunku 2.

18. Przed rozpoczęciem badania, w ramach procedury kontroli jakości, przezskórną oporność elektryczną na dwóch krążkach skóry mierzy się w odniesieniu do skóry każdego ze zwierząt. Aby reszta krążków mogła zostać wykorzystana w metodzie badawczej, wartości oporu elektrycznego dla obu krążków powinny być wyższe niż 10 k $\Omega$ . Jeśli wartość oporu jest mniejsza niż 10 k $\Omega$ , resztę krążków tej skóry należy wyrzucić.

### **Podawanie badanej i kontrolnej substancji chemicznej**

19. Aby zapewnić odpowiednie działanie modelu, w każdej analizie (doświadczeniu) należy równocześnie stosować kontrole dodatnie i ujemne. W każdej analizie (doświadczeniu) należy wykorzystać krążki skóry pozyskane z pojedynczego zwierzęcia. Jako badanych substancji chemicznych kontroli dodatniej i ujemnej zaleca się używać odpowiednio 10M kwasu solnego i wody destylowanej.
20. Badane substancje chemiczne w stanie ciekłym nanosi się równomiernie na powierzchnię naskórka wewnątrz rurki (150  $\mu$ l). Aby podczas badania materiałów stałych mieć pewność, że pokryta jest cała powierzchnia, na krążek nakłada się równomiernie odpowiednią ilość materiału stałego. Do substancji stałej dodaje się wodę dejonizowaną (150  $\mu$ l) i delikatnie potrząsa się rurką. W celu zapewnienia maksymalnego kontaktu substancji stałych ze skórą może być konieczne podgrzanie ich do 300 °C w celu stopienia lub zmiękczenia badanej substancji chemicznej, lub jej zmielenie, by otrzymać granulację lub proszek.
21. W każdej serii badawczej (każdym doświadczeniu) wykorzystuje się trzy krążki skóry w odniesieniu do każdej serii badawczej i kontrolnej substancji chemicznej. Badane substancje chemiczne nakłada się na 24 godziny w temperaturze 20–23 °C. Usuwa się je, zmywając strumieniem wody wodociągowej o temperaturze pokojowej do momentu, gdy nie będzie można usunąć żadnego dalszego materiału.

### **Pomiary przezskórnej oporności elektrycznej**

22. Impedancję skóry mierzy się jako przezskórną oporność elektryczną za pomocą mostka Wheatstone'a zasilanego prądem przemiennym o niskim napięciu (18). Ogólne dane techniczne mostka: napięcie robocze 1–3 V, prąd przemienny 50–1000 Hz sinusoidalny lub prostokątny i zakres pomiaru co najmniej 0,1–30 k $\Omega$ . Mostek Wheatstone'a w badaniach walidacyjnych mierzy indukcyjność, opór bierny pojemnościowy i opór do wartości odpowiednio 2000 H, 2000  $\mu$ F oraz 2 M $\Omega$ , przy częstotliwości odpowiednio 100 Hz lub 1 kHz w połączeniach szeregowych lub równoległych. Do celów oceny testu działania żrącego TER dokonuje się pomiarów oporności przy częstotliwości 100 Hz i przy zastosowaniu połączeń szeregowych. Przed pomiarem oporu elektrycznego zmniejsza się napięcie skóry, dodając dostateczną ilość 70 % etanolu, aby pokryła naskórek. Po kilku sekundach usuwa się etanol z rurki, a następnie nawadnia się tkankę przez dodanie 3 ml roztworu MgSO<sub>4</sub> (154 mM). W celu zmierzenia oporu krążka skóry w k $\Omega$ , po obu jego stronach są umieszczane elektrody mostka (rysunek 1). Na rysunku 2 pokazano wymiary elektrod i długość obnażonej części elektrod poniżej zacisku

szczękowego. W czasie pomiaru oporu zacisk przymocowany do wewnętrznej elektrody opiera się na górnym końcu rurki PTFE, aby w roztworze  $\text{MgSO}_4$  zanurzony był ciągły odcinek elektrody. Elektroda zewnętrzna umieszczona jest wewnątrz komory receptorowej na jej dnie. Należy utrzymywać stałą odległość między zaciskiem sprężynowym a dnem rurki PTFE (rysunek 2), ponieważ odległość ma wpływ na otrzymywane wartości oporu. W związku z tym odległość między wewnętrzną elektrodą a krążkiem skóry powinna być stała i minimalna (1–2 mm).

23. Jeśli zmierzona wartość oporu jest większa niż 20 k $\Omega$ , może to być spowodowane pozostałościami badanej substancji chemicznej pokrywającej naskórkową powierzchnię krążka skóry. Można próbować usunąć tę warstwę, zatykając na przykład rurkę palcem w rękawiczce i potrząsając nią przez około 10 sekund; usuwa się roztwór  $\text{MgSO}_4$  i powtarza pomiar oporu ze świeżą porcją  $\text{MgSO}_4$ .
24. Na otrzymane wartości testu przezskórnej oporności elektrycznej mogą mieć wpływ charakterystyka i wymiary aparatu testowego oraz zastosowana procedura eksperymentalna. Na podstawie danych uzyskanych przy użyciu określonej aparatury i procedury, przedstawionych w opisie tej metody badawczej, ustalono próg działania żrącego na skórę na poziomie 5 k $\Omega$ . Jeśli warunki testu zostaną zmienione lub jeśli stosuje się inną aparaturę, zastosowanie mogą znajdować inne progi i wartości kontrolne. Tak więc konieczne jest dokonanie kalibracji metodyki i wartości progów oporu przez zbadanie szeregu substancji służących do wykazania biegłości wybranych spośród substancji chemicznych użytych w badaniu walidacyjnym (8)(9) lub spośród substancji chemicznych podobnych do badanych substancji. W tabeli 1 znajduje się zestaw odpowiednich substancji służących do wykazania biegłości.

### **Metody wiązania barwników**

25. Narażenie na niektóre materiały niedziałające żrąco na skórę może prowadzić do zmniejszenia oporu poniżej wartości granicznej 5 k $\Omega$ , umożliwiając przechodzenie jonów przez warstwę rogową naskórka i w ten sposób redukując opór elektryczny (9). Na przykład obojętne związki organiczne oraz substancje powierzchniowo czynne (w tym detergenty, emulgatory i inne surfaktanty) mogą usuwać ze skóry tłuszcz, powodując, że bariera skórna staje się bardziej przepuszczalna dla jonów. Tak więc, jeśli wartości TER wytworzone przez takie substancje chemiczne są niższe niż lub zbliżone do 5 k $\Omega$  przy braku wizualnie dostrzegalnego uszkodzenia krążków skóry, należy dla tkanek kontrolnych i badanych przeprowadzić test przenikania barwnika, aby stwierdzić, czy uzyskane wartości TER są wynikiem zwiększonej przepuszczalności skóry czy jej uszkodzenia (7)(9). W tym drugim przypadku, jeśli uszkodzona jest warstwa rogowa naskórka, barwnik sulforodamina B szybko przenika w głąb skóry i zabarwia leżącą głębiej tkankę. Ten szczególny barwnik nie wchodzi w reakcję z wieloma różnymi substancjami chemicznymi i nie ma na niego wpływu procedura ekstrakcji opisana poniżej.

### **Stosowanie barwnika sulforodaminy B i jego usuwanie**

26. Po dokonaniu oceny testu przezskórnej oporności elektrycznej siarczan magnezu jest usuwany z rurki i skóra jest poddawana dokładnym oględzinom, aby sprawdzić, czy są na niej widoczne uszkodzenia. Jeżeli nie ma oczywistych dużych uszkodzeń (np. perforacji), na naskórkową powierzchnię każdego krążka skóry nakłada się na dwie godziny 150  $\mu$ l 10 proc. (masa/obj.) roztworu barwnika sulforodaminy B w wodzie destylowanej (Acid Red 52; C.I. 45100; nr CAS 3520-42-1). Krążki skóry są następnie przemywane wodą wodociągową o temperaturze nie wyższej od pokojowej przez około 10 sekund, aby usunąć wszelki zbędny/niezwiazany barwnik. Każdy krążek skóry jest starannie usuwany z rurki PTFE i umieszczany w fiolce (np. w szklanej fiole scyntylacyjnej o pojemności 20 ml) zawierającej wodę dejonizowaną (8 ml). Fiolki są delikatnie wstrząsane przez 5 minut, aby usunąć cały nadmiar niezwiązane barwnika. Procedurę płukania powtarza się, po czym krążki skóry wyjmują się i umieszcza w fiolkach zawierających 5 ml 30 % (masa/obj.) roztworu sodowego siarczanu dodecyłu (SDS) w wodzie destylowanej i inkubuje przez noc w 60 °C.
27. Po inkubacji krążki należy wyjąć i wyrzucić, a pozostały roztwór odwirować przez 8 minut w 21 °C (względna siła odśrodkowa  $\sim 175 \times g$ ). Próbkę o objętości 1 ml supernatantu jest rozpuszczana w stosunku 1 do 5 (obj./obj.) [tj. 1 ml + 4 ml] z 30 % (masa/obj) SDS w wodzie destylowanej. Gęstość optyczną (OD) mierzy się przy 565 nm.

#### Obliczanie zawartości barwnika

28. Zawartość barwnika sulforodaminy B na krążek obliczana jest na podstawie wartości OD (9) (współczynnik molowy ekstynkcji sulforodaminy B przy 565 nm =  $8,7 \times 10^4$ ; masa cząsteczkowa = 580). Zawartość barwnika jest określana dla wszystkich krążków skóry przy zastosowaniu odpowiedniej krzywej kalibracyjnej, a następnie dla wszystkich kontrprób liczona jest średnia.

#### Kryteria dopuszczalności

29. Średnie wyniki TER są uznawane, jeśli w testującym laboratorium wartości otrzymane w równoczesnych próbach kontroli dodatniej i ujemnej mieszczą się w zakresie dopuszczalnym dla metody. Dopuszczalne zakresy oporu dla metodyki i aparatury opisanych powyżej podano w poniższej tabeli:

| Kontrola | Substancja                  | Zakres oporu ( $k\Omega$ ) |
|----------|-----------------------------|----------------------------|
| Dodatnia | Kwas chlorowodorowy<br>10 M | 0,5 – 1,0                  |
| Ujemna   | Woda destylowana            | 10 – 25                    |

30. Średnie wyniki wiązania barwnika są akceptowane, pod warunkiem że wartości otrzymane w równoczesnych testach kontrolnych mieszczą się w przedziałach akceptowanych dla metody. Sugerowane dopuszczalne zakresy zawartości barwnika substancji kontrolnych dla metodyki i aparatury opisanych powyżej zamieszczono w poniższej tabeli:



| Kontrola | Substancja                  | Zakres zawartości barwnika<br>( $\mu\text{g}/\text{krążek}$ ) |
|----------|-----------------------------|---------------------------------------------------------------|
| Dodatnia | Kwas chlorowodorowy<br>10 M | 40 – 100                                                      |
| Ujemna   | Woda destylowana            | 15 – 35                                                       |

### Interpretacja wyników

31. Wartość graniczną testu przezskórnej oporności elektrycznej, odróżniającą żrące substancje chemiczne od substancji chemicznych niemających działania żrącego, ustanowiono podczas optymalizacji metody badawczej, testowano w fazie prewalidacyjnej oraz zatwierdzono w formalnym badaniu walidacyjnym.
32. Poniżej przedstawiono związany z systemem klasyfikacji Globalnego Zharmonizowanego Systemu Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów / rozporządzenia CLP model prognozowania z wykorzystaniem skóry szczura w odniesieniu do metody badawczej, jaką jest test przezskórnej oporności elektrycznej na działanie żrące na skórę (9)(19):

Uznaje się, że badana substancja chemiczna nie działa żrąco na skórę:

- i) jeśli średnia wartość uzyskana w teście przezskórnej oporności elektrycznej dla badanej substancji chemicznej jest większa ( $>$ ) niż 5 k $\Omega$ ; lub
- ii) jeśli średnia wartość uzyskana w teście przezskórnej oporności elektrycznej dla badanej substancji chemicznej jest mniejsza bądź równa ( $\leq$ ) 5 k $\Omega$ ; oraz
- krążki skóry nie wykazują oczywistych uszkodzeń (np. perforacji); oraz
- średnia zawartość barwnika krążka jest niższa ( $<$ ) niż średnia zawartość barwnika krążka otrzymanej jednocześnie kontroli dodatniej 10M HCl (zob. pkt 30 w odniesieniu do wartości kontroli dodatnich).

Uznaje się, że badana substancja chemiczna działa żrąco na skórę:

- i) jeśli średnia wartość uzyskana w teście przezskórnej oporności elektrycznej dla badanej substancji chemicznej jest mniejsza bądź równa ( $\leq$ ) 5 k $\Omega$  oraz krążki skóry posiadają oczywiste uszkodzenia (np. są perforowane); lub
  - ii) jeśli średnia wartość uzyskana w teście przezskórnej oporności elektrycznej dla badanej substancji chemicznej jest mniejsza bądź równa ( $\leq$ ) 5 k $\Omega$ ; oraz
  - krążki skóry nie wykazują oczywistych uszkodzeń (np. perforacji); ale
  - średnia zawartość barwnika krążka jest większa bądź równa ( $\geq$ ) średniej zawartości barwnika krążka otrzymanej jednocześnie kontroli dodatniej 10M HCl (zob. pkt 30 w odniesieniu do wartości kontroli dodatnich).
33. Jeśli klasyfikacja jest jednoznaczna, seria badawcza (doświadczenie), w skład której wchodzi co najmniej trzy kontrpróby, powinna wystarczyć dla badanej substancji chemicznej. W przypadku wyników granicznych, np. niezgodności powtarzalnych pomiarów lub średniej TER równej  $5 \pm 0,5$  k $\Omega$ , należy jednak rozważyć przeprowadzenie drugiej niezależnej serii

badawczej (doświadczenia), jak również trzeciej w przypadku niezgodności między wynikami dwóch pierwszych serii badawczych (doświadczeń).

## DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

### Dane

34. Wartości oporu ( $k\Omega$ ) oraz, w stosownych przypadkach, wartości zawartości barwnika ( $\mu\text{g}/\text{krążek}$ ) w odniesieniu do badanej substancji chemicznej oraz kontroli dodatnich i ujemnych należy zgłaszać w postaci tabeli, która będzie zawierać dane dotyczące każdego krążka kontrpróby w każdej serii badawczej (każdym doświadczeniu) oraz średnie wartości  $\pm\text{SD}$ . Należy zgłaszać wszystkie powtarzane doświadczenia. Zaobserwowane uszkodzenia krążków skóry należy zgłaszać w odniesieniu do każdej badanej substancji chemicznej.

### Sprawozdanie z badania

35. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

#### *Badana substancja chemiczna oraz substancje kontrolne:*

- substancja jednoskładnikowa: dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa IUPAC lub CAS, numer CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny, czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń, stosownie do przypadku i jeśli jest to praktycznie wykonalne itp.,
- substancja wieloskładnikowa, UVCB i mieszanina: opisane w miarę możliwości przez podanie nazwy chemicznej (zob. powyżej), określenie ilości oraz istotnych właściwości fizykochemicznych składników,
- wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne,
- źródło, numer partii (jeżeli dostępny),
- w stosownych przypadkach obróbka badanej substancji chemicznej/substancji kontrolnej przed badaniem (np. ogrzanie, rozdrobnienie),
- stabilność badanej substancji chemicznej, termin przydatności lub data ponownej analizy, jeżeli są znane,
- warunki przechowywania.

#### *Zwierzęta doświadczone:*

- szczep i płeć,
- wiek zwierząt w momencie pobierania skóry,
- źródło, warunki utrzymywania, pasza itp.,
- szczegóły dotyczące przygotowania skóry.

#### *Warunki badania:*

- krzywe wzorcowe dla aparatury testowej,

- krzywe wzorcowe dla parametrów testu wiązania barwnika, wykorzystanego filtra środkowoprzepustowego stosowanego do pomiaru wartości OD oraz, w stosownych przypadkach, zakres liniowości OD urządzenia wykorzystywanego do przeprowadzania pomiaru (np spektrofotometr),
- szczegółowe informacje na temat procedury badawczej stosowanej do pomiarów przekórnej oporności elektrycznej,
- szczegółowe informacje na temat procedury badawczej stosowanej do oceny wiązania barwnika, w stosownych przypadkach,
- zastosowane dawki badanej substancji chemicznej, czas trwania okresu lub okresów narażenia oraz temperatura lub temperatury narażenia,
- szczegółowe informacje na temat stosowanej procedury mycia po okresie narażenia,
- Liczba wykorzystywanych kontrprób krążków skóry na każdą badaną substancję chemiczną oraz kontrolę (kontrola dodatnia i ujemna),
- opis wszelkich modyfikacji procedur testowych,
- odniesienie do danych historycznych modelu. Powinno to między innymi obejmować:
  - i) dopuszczalność wartości przekórnej oporności elektrycznej kontroli dodatniej oraz ujemnej (w  $k\Omega$ ) w odniesieniu do zakresów oporu kontroli dodatniej oraz ujemnej;
  - ii) dopuszczalność wartości zawartości barwnika kontroli dodatniej oraz ujemnej (w  $\mu g/\text{krążek}$ ) w odniesieniu do zakresów oporu kontroli dodatniej oraz ujemnej;
  - iii) dopuszczalność wyników badania w odniesieniu do historycznej zmienności między kontrpróbami krążków skóry.
- opis zastosowanych kryteriów podejmowania decyzji/modelu prognozowania.

#### *Wyniki:*

- Tabele zawierające dane z badań TER i testu wiązania barwnika (w stosownych przypadkach) dla poszczególnych badanych substancji chemicznych oraz kontroli, dla każdej serii badawczej (każdego doświadczenia) oraz każdej kontrpróby krążka skóry (poszczególne zwierzęta i poszczególne próbki skóry), średnie, wartości SD oraz CV,
- opis wszelkich zaobserwowanych skutków,
- ustalona na tej podstawie klasyfikacja w odniesieniu do modelu prognozowania lub zastosowanych kryteriów podejmowania decyzji.

#### *Omówienie wyników*

#### *Wnioski*

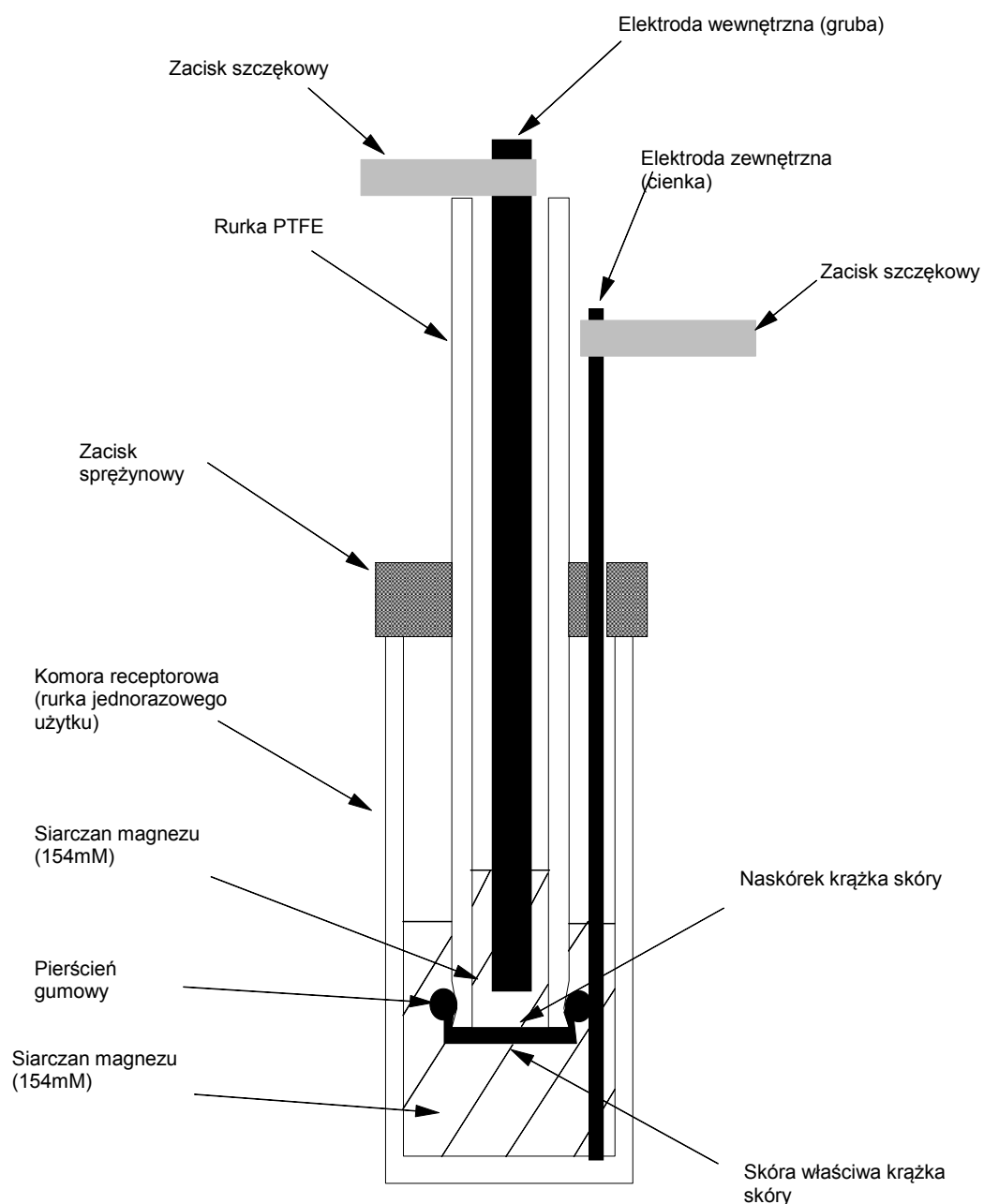
## BIBLIOGRAFIA

- (1) Organizacja Narodów Zjednoczonych (ONZ), Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów (GHS), wydanie drugie zmienione, ONZ Nowy Jork i Genewa 2013. Dostępne na stronie internetowej: [[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) Rozdział B.4 niniejszego załącznika, *Ostre działanie drażniące na skórę*.
- (3) Rozdział B.40bis niniejszego załącznika, *Model skóry in vitro*.
- (4) Rozdział B.65 niniejszego załącznika, *Metoda badawcza bariery membranowej in vitro*.
- (5) Rozdział B.46 niniejszego załącznika, *Badanie podrażnień skóry in vitro: Metoda badania z użyciem zrekonstruowanego ludzkiego naskórka*.
- (6) OECD (2014). *Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion*, [w:] *Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment* (nr 203), Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.
- (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., i Balls M. (1995). *A Prevalidation Study on In Vitro Skin Corrosivity Testing. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 6*. „ALTA” nr 23, s. 219–255.
- (8) Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., i Worth A.P. (1998). *The ECVAM International Validation Study on In Vitro Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals*. „Toxicology In Vitro” nr 12, s. 471–482.
- (9) Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Holzhtter H.-G. i 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” nr 12, s. 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., i Zucco F. (1995). *Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops*. „ALTA” nr 23, s. 129–147.
- (11) ICCVAM (Międzyagencyjny Komitet Koordynacyjny ds. Uznawania Metod Alternatywnych) (1997). *Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological*

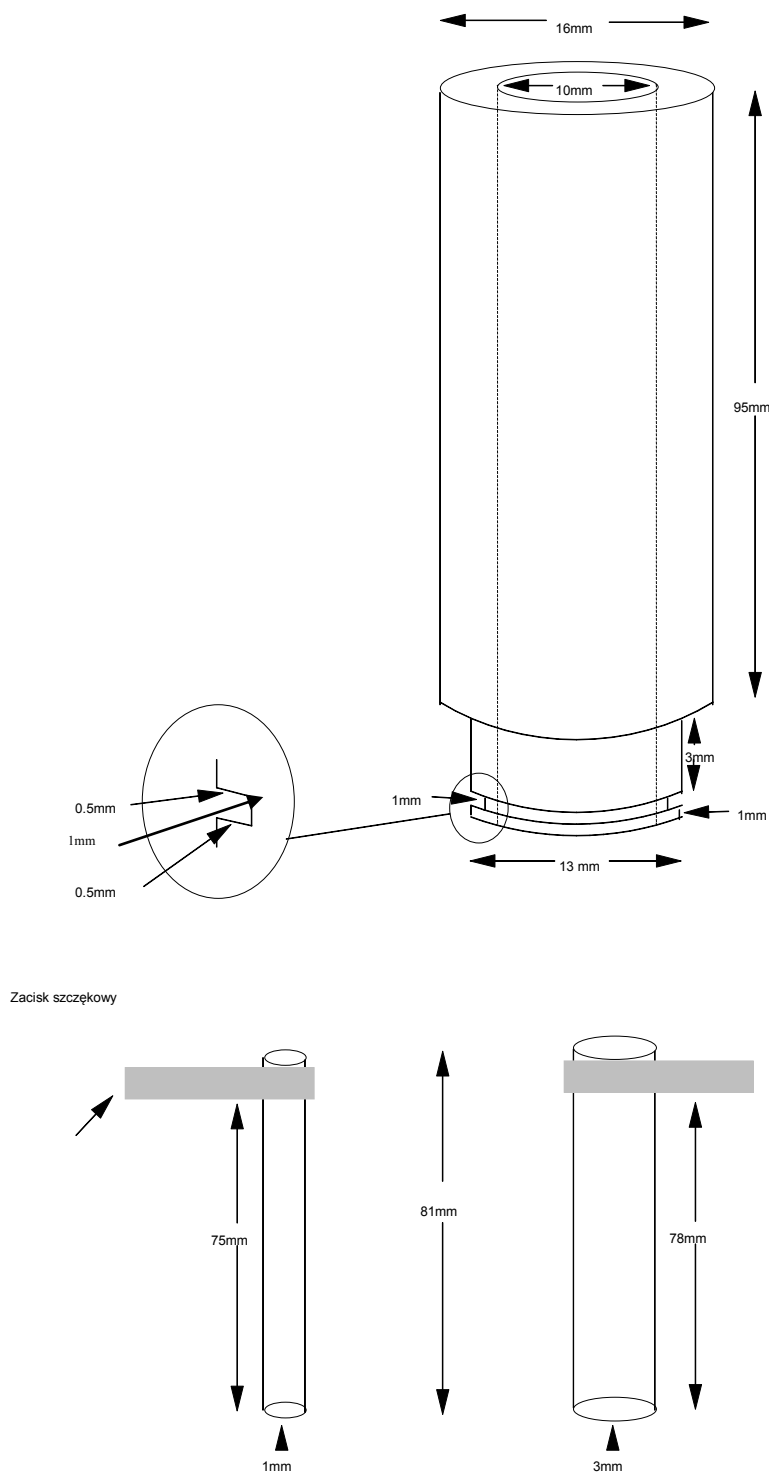
- Test Methods*. Publikacja NIH nr 97-3981, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, Karolina Północna, Stany Zjednoczone.
- (12) EC-ECVAM (1998). *Statement on the Scientific Validity of the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test (an In Vitro Test for Skin Corrosivity)*. ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3 kwietnia 1998.
- (13) ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA nr 26, 275–280.
- (14) ICCVAM (Międzyagencyjny Komitet Koordynacyjny ds. Uznawania Metod Alternatywnych) (2002), *ICCVAM Evaluation of EpiDerm<sup>TM</sup> (EPI-200), EPISKIN<sup>TM</sup> (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: In Vitro Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals*. „NIH Publication” nr 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, Karolina Północna, 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*. [w:] *Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment* (nr 218), Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.
- (16) Oliver G.J.A., Pemberton M.A. i Rhodes C. (1986). *An In Vitro Skin Corrosivity Test -Modifications and Validation*. „Food and Chemical Toxicology” nr 24, s. 507–512.
- (17) Botham P.A., Hall T.J., Dennett R., McCall J.C., Basketter D.A., Whittle E., Cheeseman M., Esdaile D.J., i Gardner J. (1992). *The Skin Corrosivity Test In Vitro: Results of an Interlaboratory Trial*. „Toxicology in Vitro” nr 6, s. 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. i Depallens O. (2012). *Regulatory Assessment of In Vitro Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations*. „Regulatory Toxicology and Pharmacology” nr 62, s. 393–403.
- (19) TER SOP (grudzień 2008), Protokół 115 INVITTOX, *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*. [w:] *Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment* (nr 34), Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

**RYSUNEK 1: APARATURA DO WYKONYWANIA TESTU PRZEZSKÓRNEJ OPORNOŚCI ELEKTRYCZNEJ SKÓRY SZCZURA**



## RYSUNEK 2: WYMIARY RUREK POLITETRAFLUOROETYLENOWEJ (PTFE) I RECEPTOROWEJ ORAZ STOSOWANE ELEKTRODY



**Najważniejsze elementy urządzenia przedstawionego powyżej:**

- wewnętrzną średnicą rurki PTFE,



- długość elektrod w stosunku do rurek PTFE i receptorowej dobrana tak, aby elektrody nie dotykały do krążka skóry oraz by standardowy odcinek elektrody stykał się z roztworem  $\text{MgSO}_4$ ,
- ilość roztworu  $\text{MgSO}_4$  w rurce receptorowej powinna zapewniać wysokość słupa cieczy względem poziomu w rurce PTFE, jak pokazano na rysunku 1,
- krążek skóry powinien być wystarczająco mocno przymocowany do rurki PTFE, aby opór elektryczny był rzeczywistą miarą właściwości skóry.

## Dodatek

### DEFINICJE

**Dokładność:** stopień zgodności wyników zastosowanej metody badawczej z przyjętymi wartościami odniesienia. Jest to miara efektywności metody badawczej i jeden z aspektów jej istotności. Pojęcia tego często używa się zamiennie z pojęciem »zgodność« na określenie odsetka prawidłowych wyników uzyskiwanych przy użyciu metody badawczej (20).

**C:** żrący.

**Substancja chemiczna:** substancja lub mieszanina.

**Zgodność:** miara efektywności metody badawczej w odniesieniu do metod badawczych, które dają wyniki katagoryczne; jest jednym z aspektów istotności. To określenie jest czasami stosowane wymiennie z określeniem „dokładność”; definiuje się jako odsetek wszystkich badanych substancji chemicznych, które są prawidłowo sklasyfikowane jako dodatnie lub ujemne. Zgodność jest w dużym stopniu uzależniona od przewagi dodatnich wyników w rodzajach badanej substancji chemicznej (20).

**GHS (Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów (ONZ)):** system obejmujący klasyfikację substancji chemicznych (substancji i mieszanin) według znormalizowanych rodzajów i poziomów zagrożeń fizycznych, zdrowotnych i środowiskowych oraz odpowiednie elementy komunikacyjne, takie jak: piktogramy, hasła ostrzegawcze, zwroty wskazujące rodzaj zagrożenia, zwroty wskazujące środki ostrożności i karty charakterystyki, mające informować na temat szkodliwego działania tych substancji chemicznych w celu zapewnienia ochrony ludzi (w tym pracowników, robotników, przewoźników, konsumentów i ratowników) oraz środowiska (1).

**IATA:** zintegrowane podejście do badań i oceny.

**Mieszanina:** mieszanina lub roztwór składający się z co najmniej dwóch substancji.

**Substancja jednoskładnikowa:** substancja zdefiniowana za pomocą jej składu ilościowego, w której jeden główny składnik występuje w stężeniu co najmniej 80 % (w/w).

**Substancja wieloskładnikowa:** substancja zdefiniowana za pomocą jej składu ilościowego, w której więcej niż jeden główny składnik występuje w stężeniu  $\geq 10$  % (w/w) i  $< 80$  % (w/w). Substancja wieloskładnikowa powstaje w wyniku procesu wytwarzania. Różnica między mieszaniną a substancją wieloskładnikową polega na tym, że mieszaninę uzyskuje się w wyniku zmieszania co najmniej dwóch substancji, między którymi nie zachodzi reakcja chemiczna. Substancja wieloskładnikowa powstaje w wyniku reakcji chemicznej.

**NC:** substancja niemająca działania żrącego.

**OD:** gęstość optyczna.

**PC:** kontrola dodatnia; kontrpróba zawierająca wszystkie składniki układu badawczego, poddana działaniu substancji chemicznej, o której wiadomo, że wywołuje reakcję dodatnią. Aby zapewnić

możliwość oceny zmienności reakcji w kontroli dodatniej w czasie, siła reakcji w postaci silnego działania drażniącego nie może być zbyt duża.

**Standardy wykonywania badań:** normy oparte na zwalidowanej metodzie badania, zapewniające podstawę do oceny porównywalności proponowanej metody badawczej, która jest podobna do metody referencyjnej pod względem mechanistycznym i funkcjonalnym. Uwzględnia się: (i) zasadnicze elementy metody badawczej; (ii) podstawowy wykaz chemicznych substancji odniesienia wybranych spośród substancji chemicznych wykorzystywanych w celu wykazania dopuszczalnej efektywności zwalidowanej metody badania; oraz (iii) podobny poziom dokładności i wiarygodności, na podstawie wyników uzyskanych dla zwalidowanej metody badawczej, który proponowana metoda badawcza powinna osiągnąć przy ocenie z wykorzystaniem podstawowego wykazu chemicznych substancji odniesienia.

**Istotność:** opis powiązania badania z oczekiwanym skutkiem oraz czy jest ono istotne i użyteczne dla konkretnego celu. Jest to zakres, w jakim metoda badawcza prawidłowo mierzy lub przewiduje biologiczny oczekiwany skutek. Istotność obejmuje uwzględnienie dokładności (zgodności) metody badawczej (20).

**Wiarygodność:** miary zakresu, w jakim metoda badawcza może być przeprowadzana w sposób odtwarzalny w jednym laboratorium i pomiędzy laboratoriami na przestrzeni czasu w przypadku jej przeprowadzania przy użyciu tego samego protokołu. Ocenia się ją, obliczając odtwarzalność wewnątrz- i międzylaboratoryjną (20).

**Czułość:** odsetek wszystkich substancji chemicznych dających wynik dodatni / aktywnych substancji chemicznych prawidłowo sklasyfikowanych za pomocą danej metody badawczej. Jest to miara dokładności metody badawczej, która daje wyniki definitywne i stanowi istotny parametr w ocenie istotności metody badawczej (20).

**Działanie żrące na skórę *in vivo*:** powstanie nieodwracalnego uszkodzenia skóry; tj. widocznej martwicy przebiegającej przez naskórek w głąb skóry, spowodowanej naniesieniem badanej substancji chemicznej na okres nieprzekraczający czterech godzin. Reakcjami na działanie żrące są wrzody, krwotoki, krwawiące strupy oraz – po zakończeniu 14-dniowej obserwacji – odbarwienia wynikłe ze zblednięcia skóry, obszary jednolitej alopecji, a także blizny. Celem oceny wątpliwych uszkodzeń można przeprowadzić badanie histopatologiczne.

**Swoistość:** odsetek wszystkich substancji chemicznych dających wynik ujemny / nieaktywnych substancji chemicznych prawidłowo sklasyfikowanych za pomocą danej metody badawczej. Jest to miara dokładności metody badawczej, która daje wyniki definitywne i stanowi istotny parametr w ocenie istotności metody badawczej (20).

**Substancja:** pierwiastek chemiczny i jego związki w stanie naturalnym lub uzyskane w wyniku dowolnego procesu produkcyjnego, w tym wszelkie dodatki konieczne do zachowania trwałości produktu i wszelkie zanieczyszczenia powstałe w wyniku zastosowanego procesu, z wyłączeniem wszelkich rozpuszczalników, które można oddzielić bez wpływu na stabilność substancji i bez zmiany jej składu.

**Seria (badawcza):** pojedyncza substancja chemiczna badana jednocześnie na co najmniej trzech

kontrpróbach krążków skóry.

**Badana substancja chemiczna:** dowolna substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

**Test przezskórnej oporności elektrycznej (TER):** miara elektrycznej impedancji skóry jako wartość oporu w kiloomach. Jest to prosta i pewna metoda oceny funkcji ochronnej skóry polegająca na rejestrowaniu przechodzenia przez skórę jonów za pomocą mostka Wheatstone'a.

**UVCB:** substancje o nieznanym lub zmiennym składzie, złożone produkty reakcji lub materiały biologiczne.";

6) w części B rozdział B.40bis otrzymuje brzmienie:

**„B.40bis BADANIE DZIAŁANIA ŻRĄCEGO NA SKÓRĘ *IN VITRO*: METODA BADAWCZA Z UŻYCIEM ZREKONSTRUOWANEGO LUDZKIEGO NASKÓRKA**

**WPROWADZENIE**

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD (TG) nr 431 (2016). Działanie żrące na skórę oznacza powstawanie nieodwracalnych uszkodzeń skóry, które przejawiają się jako widoczna martwica naskórka i skóry, w wyniku naniesienia na skórę substancji badanej [zgodnie z definicją Globalnie Zharmonizowanego Systemu Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów (GHS) Organizacji Narodów Zjednoczonych (ONZ) (1) i z rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin (CLP)<sup>1</sup>]. Niniejsza zaktualizowana metoda badawcza B.40bis obejmuje procedurę *in vitro* umożliwiającą identyfikację substancji i mieszanin mających działanie żrące i niemających takiego działania zgodnie z GHS ONZ oraz rozporządzeniem CLP. Umożliwia ona również częściowy podział substancji działających żrąco na podkategorie.
2. Ocena potencjalnego działania żrącego na skórę substancji chemicznych wiązała się zwykle z wykorzystaniem zwierząt laboratoryjnych (metoda badawcza B.4 równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD (TG) nr 404, pierwotnie przyjętej w 1981 r. i zmienionej w latach 1992, 2002 i 2015) (2). Poza niniejszą metodą badawczą B.40bis zweryfikowano i przyjęto dwie inne metody badawcze *in vitro* służące badaniu potencjalnego działania żrącego substancji chemicznych jako metodę badawczą B.40 (równoważną metodzie opisanej w wytycznej dotyczącej badań OECD (TG) 430) (3) oraz B.65 (równoważną metodzie opisanej w wytycznej dotyczącej badań OECD (TG) 435) (4). Ponadto w celu badania potencjalnego działania drażniącego na skórę przyjęto metodę badawczą B.46 *in vitro* (równoważną metodzie opisanej w wytycznej dotyczącej badań OECD (TG) 439) (5). W wytycznych OECD dotyczących zintegrowanych podejść do badań i oceny (IATA) działania żrącego na skórę i podrażnienia skóry opisano kilka modułów grupujących źródła informacji i narzędzia do analizy oraz (i) przedstawiono wytyczne dotyczące sposobu włączania i wykorzystywania istniejących danych, które uzyskano w ramach badań i metodami niebadawczymi, do celów oceny potencjałów substancji chemicznych pod względem działania

---

<sup>1</sup> Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniające i uchylające dyrektywy 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1907/2006, Dz.U. L 353 z 31.12.2008, s. 1.

drażniącego i żrącego na skórę, a także (ii) zaproponowano podejście w sytuacji, gdy potrzebne są dalsze badania (6).

3. Niniejsza metoda badawcza odnosi się do punktu końcowego, jakim jest działanie żrące na skórę ludzką. Wykorzystuje się w niej zrekonstruowany ludzki naskórek (RhE) (otrzymany z niezmiennych keratynocytów naskórka pochodzenia ludzkiego), który dokładnie imituje historyczne, morfologiczne, biochemiczne i fizjologiczne właściwości górnych warstw ludzkiej skóry, tj. naskórka. Odpowiadającą wytyczną dotyczącą badań OECD przyjęto pierwotnie w 2004 r. i zaktualizowano w 2013 r., aby zawrzeć w niej dodatkowe metody badawcze z wykorzystaniem modeli zrekonstruowanego ludzkiego naskórka oraz możliwość wykorzystania tych metod w celu uzasadnienia podziału substancji chemicznych mających działanie żrące na kategorie; w 2015 r. zaktualizowano wytyczną, by odnieść się do wytycznych IATA oraz wprowadzić wykorzystanie alternatywnej procedury pomiaru żywotności.
4. W niniejszej metodzie badawczej zawarto cztery zatwierdzone i dostępne na rynku modele RhE. W odniesieniu do dwóch z tych dostępnych na rynku modeli – model standardowy EpiSkin™ (SM) oraz badanie działania żrącego na skórę EpiDerm™ (SCT) (EPI-200) (nazywane w dalszej części tekstu zwalidowanymi metodami referencyjnymi – VRM) – przeprowadzono (11)(12) badania prewalidacyjne (7) po których nastąpiło badanie walidacyjne w celu oceny działania żrącego na skórę (8)(9)(10). W wyniku tych badań opracowano zalecenie, że dwie wspomniane VRM można stosować do celów regulacyjnych, by odróżnić żrące substancje (C) od substancji niemających działania żrącego (NC), oraz że model EpiSkin™ można ponadto stosować, by uzasadnić podział substancji żrących na podkategorie (13)(14)(15). W wyniku zastosowania dwóch pozostałych dostępnych na rynku modeli badania działania żrącego na skórę *in vitro* z wykorzystaniem RhE uzyskano podobne wyniki do VRM EpiDerm™ zgodnie z walidacją opartą na standardach wykonywania badań (16)(17)(18). Są to metody SkinEthic™ RHE<sup>1</sup> oraz epiCS® (wcześniej znane pod nazwą EST-1000), które również można stosować do celów regulacyjnych, by odróżnić substancje żrące od tych, które nie mają działania żrącego (19)(20). Dzięki badaniom powalidacyjnym wykonanym przez producentów modelu RhE w latach 2012–2014 z udoskonalonym protokołem korygującym interferencje nieswoistej redukcji MTT przez badaną substancję chemiczną poprawiono efektywność zarówno jeżeli chodzi o rozróżnianie, czy substancja jest żrąca, czy nie, jak i jeżeli chodzi o uzasadnienie podziału substancji żrących na podkategorie (21)(22). Dalsze analizy

---

<sup>1</sup> Skrót RhE (ang. *Reconstructed human Epidermis*, zrekonstruowany ludzki naskórek) stosuje się w przypadku wszystkich modeli opartych na technologii RhE. Skrót RhE stosowany w połączeniu z modelem SkinEthic™ oznacza to samo, jednak gdy jest on częścią nazwy konkretnej metody badawczej na rynku, cały skrót pisze się drukowanymi literami.

statystyczne powalidacyjnych danych wygenerowanych dzięki EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE i EpiCS® wykonano w celu określenia alternatywnych modeli predykcyjnych, dzięki którym poprawiono zdolność predykcyjną podziału na podkategorie (23).

5. Zanim będzie można wykorzystać do celów regulacyjnych zaproponowaną podobną lub zmienioną metodę badawczą *in vitro* działania żrącego na skórę z wykorzystaniem RhE inną niż VRM należy określić jej wiarygodność, istotność (dokładność) oraz ograniczenia dotyczące jej proponowanego wykorzystania, aby zapewnić jej podobieństwo do VRM zgodnie z wymogami standardów wykonywania badań (24) określonymi zgodnie z zasadami przedstawionymi w wytycznej dotyczącej badań OECD nr 34 (25). Wzajemne uznawanie danych będzie zagwarantowane dopiero po dokonaniu przeglądu i włączeniu do odpowiadającej wytycznej dotyczącej badań jakiejkolwiek zaproponowanej nowej lub zaktualizowanej metody badawczej zgodnej ze standardem wykonywania badań. Modele badań objęte wytyczną dotyczącą badań można wykorzystywać, by spełnić wymagania państw dotyczące wyników badań metody badawczej działania żrącego na skórę *in vitro*, korzystając jednocześnie z wzajemnego uznawania danych.

## DEFINICJE

6. Zastosowane definicje znajdują się w dodatku 1.

## ZAŁOŻENIA WSTĘPNE

7. Niniejsza metoda badawcza umożliwia identyfikację substancji i mieszanin mających działanie żrące i niemających takiego działania zgodnie z GHS ONZ oraz rozporządzeniem CLP. Niniejsza metoda badawcza umożliwia podział na podkategorie substancji i mieszanin mających działanie żrące; kategorie te to fakultatywna podkategoria 1A zgodnie z GHS ONZ (1) oraz połączenie podkategorii 1B i 1C (21)(22)(23). Ograniczenie niniejszej metody badawczej polega na tym, że nie pozwala ona na rozróżnienie między podkategorią 1B (działanie żrące na skórę) a podkategorią 1C zgodnie z GHS ONZ i rozporządzeniem CLP ze względu na ograniczony zestaw dobrze znanych substancji chemicznych mających działanie żrące na skórę *in vivo* należących do podkategorii 1C. Podział na podkategorie jest możliwy dzięki modelom badań EpiSkin™, EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE i epiCS® (tj. 1A a 1B oraz 1C a substancje niemające działania żrącego na skórę).
8. W ramach walidacji wspierającej modele badań objęte niniejszą metodą badawczą przebadano szeroki zakres substancji chemicznych reprezentujących głównie poszczególne substancje, kiedy są one wykorzystywane do określania, które substancje mają działanie żrące, a które nie; w empirycznej bazie danych z badania walidacyjnego znalazło się 60 substancji chemicznych obejmujących szeroki zakres klas chemicznych (8)(9)(10). Badanie mające na celu wykazanie wrażliwości testu podziału na podkategorie, jego swoistości, dokładności i odtwarzalności w warunkach laboratoryjnych wykonali twórcy metody badawczej, a przegląd wyników

wykonała OECD (21)(22)(23). Z dostępnych ogólnych danych wynika, że metoda badawcza ma zastosowanie do wielu klas chemicznych i stanów skupienia, w tym do płynów, substancji półstałych, stałych i wosków. Ciecze mogą być wodne lub niewodne; substancje stałe mogą być rozpuszczalne lub nierozpuszczalne w wodzie. W miarę możliwości substancje stałe należy przed zastosowaniem zmielić na drobnoziarnisty proszek; nie jest wymagana żadna wcześniejsza obróbka próbki. W przypadkach, w których można przedstawić dowody na brak możliwości zastosowania modeli badań objętych omawianą metodą badawczą do konkretnej kategorii badanych substancji chemicznych, modeli tych nie należy stosować w odniesieniu do tej konkretnej kategorii badanych substancji chemicznych. Ponadto przyjmuje się, że niniejsza metoda badawcza ma zastosowanie nie tylko do substancji, ale także do mieszanin. Jednak ze względu na fakt, iż mieszaniny obejmują szeroki zakres kategorii oraz składów, oraz że obecnie dostępna jest niewielka ilość informacji na temat badania mieszanin, w przypadkach, w których można przedstawić dowody na brak możliwości zastosowania omawianej metody badawczej w odniesieniu do konkretnej kategorii mieszanin (np. kierując się strategią zaproponowaną w (26)), metody tej nie należy stosować w odniesieniu do tej konkretnej kategorii mieszanin. Przed zastosowaniem przedmiotowej metody badawczej z użyciem mieszaniny w celu zgromadzenia danych na potrzeby założonego celu regulacyjnego należy zastanowić się, czy zastosowanie tej metody może doprowadzić do uzyskania wyników odpowiednich z punktu widzenia tego celu, a jeżeli tak, to dlaczego. Przeprowadzenie takiej analizy nie jest konieczne, jeżeli ustanowiono wymóg regulacyjny dotyczący badania danej mieszaniny. Gazów i aerozoli nie oceniano jeszcze w badaniach walidacyjnych (8)(9)(10). Chociaż nie można wykluczyć, że da się je badać z wykorzystaniem technologii RhE, niniejsza metoda badawcza nie pozwala na badanie gazów i aerozoli.

9. Badane substancje chemiczne pochłaniające światło w takim samym zakresie, jak formazan MTT oraz badane substancje chemiczne, które są w stanie bezpośrednio obniżyć zawartość barwnika przyżyciowego MTT (do formazanu MTT), mogą zakłócać pomiary żywotności tkanki i wymagać zastosowania przystosowanych kontroli w celu korekty. Rodzaj przystosowanych kontroli, który może być wymagany, będzie się różnił w zależności od rodzaju interferencji wywołanych przez badaną substancję chemiczną oraz procedurę zastosowaną w celu pomiaru formazanu MTT (zob. pkt 25–31).
10. Chociaż niniejsza metoda badawcza nie dostarcza wystarczających informacji na temat podrażnienia skóry, należy zauważyć, że metoda badawcza B.46 dotyczy konkretnie badania *in vitro*, powodującego skutki dla zdrowia w postaci podrażnienia skóry, i opiera się na tym samym układzie badawczym RhE, choć z wykorzystaniem innego protokołu (5). Aby dokonać pełnej oceny miejscowego działania na skórę po pojedynczym narażeniu przez skórę, należy zapoznać się z wytycznymi OECD dotyczącymi zintegrowanych podejść do badań i oceny (6). Podejście IATA obejmuje przeprowadzanie badań *in vitro* w kierunku działania żrącego na skórę (takich jak opisano w niniejszej metodzie badawczej) i podrażnienia skóry przed rozważeniem badań na żywych zwierzętach. Uznaje się, że zastosowanie ludzkiej skóry podlega krajowym i międzynarodowym zastrzeżeniom i warunkom etycznym.



## ZASADA BADANIA

11. Badana substancja chemiczna jest наносzona miejscowo na trójwymiarowy model RhE składający się z niezmienionych keratynocytów naskórka pochodzących od człowieka, które poddano hodowli w celu uzyskania wielowarstwowego, wysoce zróżnicowanego modelu ludzkiego naskórka. Model ten składa się z zorganizowanych warstw: podstawnej, koleczystej i ziarnistej oraz z wielopoziomowej warstwy rogowej naskórka zawierającej struktury blaszkowate utworzone z lipidów wypychanych do przestrzeni międzykomórkowej, analogiczne do struktur stwierdzanych *in vivo*.
12. Metoda badawcza RhE opiera się na założeniu, że substancje chemiczne są w stanie przeniknąć przez warstwę rogową naskórka na drodze dyfuzji lub w wyniku jej niszczenia i są cytotoksyczne dla leżących głębiej warstw komórek. Żywotność komórek jest mierzona metodą enzymatycznej konwersji barwnika przyżyciowego MTT [bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylo-tetrazoliowy, błękit tiazolilowy; numer CAS 298-93-1], w niebieską sól formazanu, którą oznacza się ilościowo po ekstrakcji z tkanek (27). Substancje żrące identyfikuje się na podstawie ich zdolności do zmniejszenia żywotności komórek poniżej określonych wartości progowych (zob. pkt 35 i 36). Okazało się, że oparta na RhE metoda badania działania żrącego na skórę pozwala na prognozowanie skutków takiego działania na skórę *in vivo*, ocenianych u królików zgodnie z metodą badawczą B.4 (2).

## WYKAZANIE BIEGŁOŚCI

13. Przed przystąpieniem do rutynowego stosowania dowolnego z czterech zweryfikowanych modeli badań RhE zgodnych z niniejszą metodą badawczą laboratorium powinny wykazać swoją biegłość techniczną, prawidłowo klasyfikując 12 substancji służących do wykazania biegłości wykazanych w tabeli 1. W przypadku wykorzystania metody do utworzenia niższych jednostek klasyfikacji, należy również wykazać prawidłowy podział na podkategorie. W sytuacji gdy substancja znajdująca się w wykazie jest niedostępna lub w uzasadnionych przypadkach można zastosować inną substancję, dla której dostępne są odpowiednie dane porównawcze z badań *in vivo* i *in vitro* (np. z wykazu referencyjnych substancji chemicznych (24)), pod warunkiem zastosowania tych samych kryteriów wyboru, które opisano w tabeli 1.

**Tabela 1:** Wykaz substancji służących do wykazania biegłości<sup>1</sup>

| Substancja                                               | Numer CAS  | Klasa chemiczna <sup>2</sup> | Kategoria wg GHS ONZ/rozporządzenia CLP na podstawie wyników badań <i>in vivo</i> <sup>3</sup> | Kategoria VRM VRM na podstawie wyników badań <i>in vitro</i> <sup>4</sup> | Reduktor MTT <sup>5</sup> | Stan Fizyczny |
|----------------------------------------------------------|------------|------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|---------------------------|---------------|
| <b>Podkategoria 1A substancji żrących <i>in vivo</i></b> |            |                              |                                                                                                |                                                                           |                           |               |
| Kwas bromooctowy                                         | 79-08-3    | Kwas organiczny              | 1A                                                                                             | (3) 1A                                                                    | --                        | S             |
| Trójfluorek boru – dwuwodny                              | 13319-75-0 | Kwas nieorganiczny           | 1A                                                                                             | (3) 1A                                                                    | --                        | L             |
| Fenol                                                    | 108-95-2   | Fenol                        | 1A                                                                                             | (3) 1A                                                                    | --                        | S             |

|                                                                          |           |                    |         |             |    |       |
|--------------------------------------------------------------------------|-----------|--------------------|---------|-------------|----|-------|
| Chlorek dichloroacetylu                                                  | 79-36-7   | Elektrofil         | 1A      | (3) 1A      | -- | L     |
| <b>Kombinacja podkategorii 1B i 1C substancji żrących <i>in vivo</i></b> |           |                    |         |             |    |       |
| Kwas glioksalowy – jednowodny                                            | 563-96-2  | Kwas organiczny    | 1B i 1C | (3) 1B i 1C | -- | S     |
| Kwas mlekowy                                                             | 598-82-3  | Kwas organiczny    | 1B i 1C | (3) 1B i 1C | -- | L     |
| Etanoloamina                                                             | 141-43-5  | Zasada organiczna  | 1B      | (3) 1B i 1C | T  | Lepka |
| Kwas chlorowodorowy                                                      | 7647-01-0 | Kwas nieorganiczny | 1B i 1C | (3) 1B i 1C | -- | L     |
| <b>Substancje nie działające żrąco <i>in vivo</i></b>                    |           |                    |         |             |    |       |
| Bromek fenetylu                                                          | 103-63-9  | Elektrofil         | NC      | (3) NC      | T  | L     |
| 4-amino-1,2,4-triazol                                                    | 584-13-4  | Zasada organiczna  | NC      | (3) NC      | -- | S     |
| 4-(metylotio)-benzaldehyd                                                | 3446-89-7 | Elektrofil         | NC      | (3) NC      | T  | L     |
| Kwas laurynowy                                                           | 143-07-7  | Kwas organiczny    | NC      | (3) NC      | -- | S     |

Skróty: Numer CAS = numer w rejestrze Chemical Abstracts Service; VRM = zwalidowana metoda referencyjna; NC = nieżrące

<sup>1</sup>Substancje służące do wykazania biegłości, podzielone w pierwszej kolejności na substancje mające i niemające działania żrącego, a następnie według podkategorii działania żrącego i klasy chemicznej, wybrano spośród substancji wykorzystanych w badaniach walidacyjnych ECVAM modeli badań EpiSkin™ i EpiDerm™ (8)(9)(10) oraz spośród badań powalidacyjnych na podstawie danych uzyskanych od producentów EpiSkin™ (22), EpiDerm™, SkinEthic™ i epiCS® (23). O ile nie wskazano inaczej, substancje przebadano na wysokim poziomie czystości uzyskanym po nabyciu ich z handlowego źródła (8)(10). Wybór obejmuje – w miarę możliwości – substancje, które: (i) są reprezentatywne dla zakresu reakcji żrących (np. substancje nie działające żrąco; od słabo do silnie żrących substancji), które można zmierzyć lub przewidzieć za pomocą VRM; (ii) są reprezentatywne dla klas chemicznych wykorzystywanych w badaniach walidacyjnych; (iii) mają dobrze określoną strukturę chemiczną; (iv) dają odtwarzalne wyniki przy użyciu VRM; (v) dają ostateczne wyniki w referencyjnej metodzie badawczej *in vivo*; (vi) są dostępne na rynku; oraz (vii) nie są związane z wygórowanymi kosztami utylizacji.

<sup>2</sup>Klasa chemiczna przypisana przez Barratta i in. (8).

<sup>3</sup>Odpowiadające grupy opakowaniowe ONZ dla kategorii 1A, 1B i 1C Globalnie Zharmonizowanego Systemu Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów/rozporządzenia CLP to odpowiednio I, II i III.

<sup>4</sup>Prognozy *in vitro* uzyskane za pomocą VRM podane w tabeli otrzymano, stosując modele badań (VRM) EpiSkin™ i EpiDerm™ podczas powalidacyjnego badania przeprowadzonego przez producentów tej metody badawczej.

<sup>5</sup>Przy obliczaniu wartości żywotności otrzymanych w badaniach walidacyjnych w kierunku działania żrącego na skórę ECVAM nie uwzględniono bezpośredniej redukcji MTT (w badaniach walidacyjnych nie wykonano kontroli tkanek martwych). Powalidacyjne dane wygenerowane przez producentów metody badawczej zaprezentowane w tej tabeli otrzymano jednak, wykorzystując dostosowane kontrole (23).

14. W ramach wykazywania efektywności zaleca się, aby użytkownik sprawdził właściwości bariery cechujące tkanki po ich otrzymaniu zgodnie ze wskazaniem producenta modelu RhE. Jest to szczególnie istotne, jeżeli tkanki są wysyłane na duże odległości lub wysyłka trwa długo. Gdy metoda badawcza została z powodzeniem wprowadzona oraz wykazano jej efektywność, weryfikacja taka nie będzie konieczna w ramach rutynowej procedury. W przypadku rutynowego zastosowania metody zaleca się jednak, aby w dalszym ciągu oceniać właściwości bariery w regularnych odstępach czasu.

## PROCEDURA

15. Poniższe stanowi ogólny opis składowych i procedur modeli badań RhE służących ocenie działania żrącego na skórę objętej niniejszą metodą badawczą. Modele RhE, które potwierdzono naukowo jako zdadne do wykorzystania w niniejszej metodzie badawczej, tj. modele EpiSkin™ (SM), EpiDerm™ (EPI-200), SkinEthic™ RHE i epiCS® (16)(17)(19)(28)(29)(30)(31)(32)(33), można uzyskać ze źródeł komercyjnych. Standardowe procedury operacyjne dla tych czterech modeli RhE są dostępne (34)(35)(36)(37), a ich główne składowe metody badawczej streszczono w dodatku 2. Zaleca się, aby przy wdrażaniu i stosowaniu jednego z tych modeli w laboratorium zapoznać się z odpowiednią standardową procedurą operacyjną. Badanie przy pomocy czterech modeli badań RhE opisanych w niniejszej metodzie badawczej powinno spełniać następujące warunki:

## ELEMENTY METODY BADAWCZEJ RHE

### Warunki ogólne

16. W celu odtworzenia nabłonka należy użyć niezmiennych keratynocytów pochodzących od człowieka. Pod zachowującą funkcje życiowe warstwą rogową naskórka powinno znajdować się kilka warstw żywych komórek nabłonka (warstwa podstawna, warstwa kolczysta, warstwa ziarnista). Warstwa rogowa naskórka powinna być wielopoziomowa i powinna zawierać lipidy niezbędne do utworzenia czynnościowej bariery na tyle wytrzymałej, aby uniemożliwiała szybkie przenikanie cytotoksycznych wzorcowych substancji chemicznych, np. soli sodowej siarczuanu dodecyłu (SDS) lub markera Triton X-100. Funkcję bariery należy wykazać i można ocenić albo poprzez ustalenie stężenia, w którym wzorcowa substancja chemiczna zmniejsza żywotność tkanek o 50 % ( $IC_{50}$ ) po ustalonym czasie narażenia na działanie, albo poprzez ustalenie czasu narażenia na działanie potrzebnego do zmniejszenia żywotności komórek o 50 % ( $ET_{50}$ ) po zastosowaniu wzorcowej substancji chemicznej w określonym, stałym stężeniu (zob. pkt 18). Właściwości izolacyjne modelu RhE powinny zapobiegać przechodzeniu materiału przez warstwę rogową naskórka do żywej tkanki, gdyż w innym razie modelowanie narażenia skóry mogłoby być niewłaściwe. Model RhE nie powinien być skażony bakteriami, wirusami, mykoplazmą ani grzybami.

### Warunki funkcjonalne

#### *Żywotność*

17. Testem stosowanym do określenia ilościowego żywotności tkanki jest próba MTT (27). Komórki żywotne wytworu tkankowego RhE redukują barwnik przyżyciowy MTT do wytrąconego niebieskiego formazanu MTT, który jest później ekstrahowany z komórki przy użyciu izopropanolu (lub podobnego rozpuszczalnika). OD samego rozpuszczalnika do ekstrakcji powinna być wystarczająco niska, tj.  $OD < 0,1$ . Ekstrahowany formazan MTT można określić ilościowo, stosując pomiar absorbancji wzorca (OD) albo procedurę spektrofotometrii HPLC/UPLC (38). Użytkownicy modelu RhE powinni zapewnić zgodność każdej partii

zastosowanego modelu RhE z określonymi kryteriami kontroli ujemnej. Zakres dopuszczalności (górną i dolną granicą) kontroli ujemnej wartości OD powinien zostać określony przez producentów/dostawców modelu RhE. Zakresy dopuszczalności kontroli ujemnej wartości OD dla czterech zweryfikowanych modeli badań RhE uwzględnionych w niniejszej metodzie badawczej podano w tabeli 2. Użytkownik spektrofotometrii HPLC/UPLC powinien stosować kontrolę ujemną zakresów OD określonych w tabeli 2 jako warunku dopuszczenia kontroli ujemnej. Należy udokumentować, że tkanki poddane zabiegowi w ramach kontroli ujemnej są stabilne w hodowli (umożliwiają podobne pomiary OD) przez cały okres narażenia.

**Tabela 2:** Zakresy dopuszczalności dla kontroli ujemnej wartości OD do kontroli jakości partii

|                               | <b>Dolna granica dopuszczalności</b> | <b>Górna granica dopuszczalności</b> |
|-------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| <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                                |

#### *Funkcja bariery*

18. Warstwa rogowa naskórka i wchodzące w jej skład lipidy powinny być na tyle odporne, aby nie było możliwe szybkie przenikanie przez nie niektórych cytotoksycznych wzorcowych substancji chemicznych (np. SDS lub markera Triton X-100) według oceny na podstawie IC<sub>50</sub> lub ET<sub>50</sub> (tabela 3). Producent/dostawca modelu RhE powinien w momencie dostarczenia tkanek użytkownikowi końcowemu wykazać funkcję bariery każdej partii zastosowanego modelu RhE (zob. pkt 21).

#### *Morfologia*

19. Badanie histologiczne modelu RhE należy przeprowadzić z wykazaniem istnienia wielowarstwowej struktury przypominającej ludzki naskórek zawierający warstwę podstawną, warstwę kolczystą, warstwę ziarnistą i warstwę rogową, oraz wykazać profil lipidowy podobny do profilu lipidowego ludzkiego naskórka. Producent/dostawca modelu RhE powinien w momencie dostarczenia tkanek użytkownikowi końcowemu przedłożyć badania histologiczne każdej partii modelu RhE wykorzystanego do wykazania odpowiedniej morfologii tkanek (zob. pkt 21).

#### *Odtwarzalność*

20. Użytkownicy metody badawczej powinni wykazać odtwarzalność metody badawczej w czasie z dodatnimi i ujemnymi kontrolami. Ponadto metodę badawczą należy stosować wyłącznie w przypadku, gdy producent/dostawca modelu RhE dostarczy dane potwierdzające odtwarzalność w czasie z zastosowaniem żrących i nieżrących substancji chemicznych, np.

ujętych w wykazie substancji służących do wykazania biegłości (tabela 1). W przypadku wykorzystania metody badawczej do utworzenia niższych jednostek klasyfikacji, należy również wykazać odtwarzalność w odniesieniu do podkategorii.

#### *Kontrola jakości (QC)*

21. Model RhE należy stosować jedynie w przypadku, gdy producent bądź dostawca wykaże, że każda partia wykorzystywanego modelu RhE spełnia określone kryteria zwolnienia do produkcji, spośród których te dotyczące żywotności (pkt 17), funkcji bariery (pkt 18) i morfologii (pkt 19) są najbardziej istotne. Dane te są przekazywane użytkownikom metody badawczej, tak aby mogli oni uwzględnić tę informację w sprawozdaniu z badania. Jedynie wyniki otrzymane z partii tkanek zatwierdzonych przez kontrolę jakości mogą być dopuszczone do wiarygodnej prognozy klasyfikacji substancji żrących. Zakres dopuszczalności (górna i dolna granica)  $IC_{50}$  lub  $ET_{50}$  określa producent/dostawca modelu RhE. Zakresy dopuszczalności czterech zweryfikowanych modeli badań podano w tabeli 3.

**Tabela 3:** Kryteria zwolnienia serii na podstawie kontroli jakości

|                                                                         | <b>Dolna granica dopuszczalności</b> | <b>Górna granica dopuszczalności</b> |
|-------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| <b>EpiSkin™ (SM)</b><br>(poddawanie działaniu SDS przez 18 godzin) (33) | $IC_{50} = 1,0$ mg/ml                | $IC_{50} = 3,0$ mg/ml                |
| <b>EpiDerm™ SCT (EPI-200)</b><br>(1 % Triton X-100) (34)                | $ET_{50} = 4,0$ godziny              | $ET_{50} = 8,7$ godziny              |
| <b>SkinEthic™ RHE</b><br>(1 % Triton X-100) (35)                        | $ET_{50} = 4,0$ godziny              | $ET_{50} = 10,0$ godzin              |
| <b>epiCS®</b><br>(1 % Triton X-100) (36)                                | $ET_{50} = 2,0$ godziny              | $ET_{50} = 7,0$ godzin               |

#### **Podawanie badanej i kontrolnej substancji chemicznej**

22. Należy użyć co najmniej dwóch kontrprób tkanki dla każdej badanej substancji chemicznej i prób kontrolnych w każdym okresie narażenia. W przypadku płynnych i stałych substancji należy nałożyć na skórę dostateczną ilość substancji badanej, tak aby równomiernie pokrywała powierzchnię naskórka, unikając jednak nakładania dawki nieskończonej, tj. należy użyć co najmniej  $70 \mu\text{L}/\text{cm}^2$  lub  $30 \text{ mg}/\text{cm}^2$ . W zależności od modelu przed nałożeniem stałych substancji chemicznych należy zwilżyć powierzchnię naskórka wodą dejonizowaną lub destylowaną w celu poprawy kontaktu między badaną substancją chemiczną i powierzchnią naskórka (34)(35)(36)(37). W miarę możliwości substancje stałe powinny być badane w postaci drobnoziarnistego proszku. Sposób podania powinien być odpowiedni dla badanej substancji chemicznej (zob. np. pozycje z literatury (34–37)). Pod koniec okresu narażenia substancję

badaną należy ostrożnie zmyć z naskórka roztworem buforowym lub 0,9 % NaCl. Zależnie od tego, która z trzech zatwierdzonych metod z wykorzystaniem RhE jest stosowana, wykorzystuje się dwa lub trzy okresy narażenia na badaną substancję chemiczną (w przypadku wszystkich czterech zweryfikowanych modeli RhE: 3 minuty i 1 godzina; w przypadku EpiSkin<sup>TM</sup> dodatkowe 4 godziny czasu narażenia). Zależnie od wykorzystanego modelu badania RhE i ocenianego okresu narażenia temperatura inkubacji podczas narażenia może się wahać od temperatury pokojowej do 37 °C.

23. W każdej serii badawczej należy zastosować jednoczesną kontrolę ujemną i kontrolę dodatnią (PC), aby wykazać, że żywotność (przy NC), funkcja bariery i ostateczna czułość tkankowa (przy PC) mieszczą się w dopuszczalnym zakresie zdefiniowanym na podstawie danych historycznych. W zależności od zastosowanego modelu RhE jako substancji do kontroli pozytywnej zaleca się użycie kwasu octowego lodowatego lub 8N KOH. Należy zauważyć, że 8N KOH stanowi bezpośredni reduktor MTT, który może wymagać dostosowania kontroli zgodnie z opisem z pkt 25 i 26. Zalecanymi substancjami w kontroli ujemnej są 0,9 % NaCl lub woda.

#### **Pomiary żywotności komórek**

24. Test ilościowy MTT należy wykorzystywać do pomiarów żywotności komórek w ramach niniejszej metody badawczej (27). Próbkę tkanki umieszcza się w roztworze MTT o właściwym stężeniu (np. 0,3–1 mg/ml) na 3 godziny. Wytrącony niebieski produkt formazanowy ekstrahuje się następnie z tkanki przy użyciu rozpuszczalnika (np. izopropanolu, kwaśnego izopropanolu) i mierzy się stężenie formazanu poprzez oznaczenie OD przy długości fali 570 nm, wykorzystując filtr w paśmie maksimum  $\pm 30$  nm lub z zastosowaniem procedury spektrofotometrii HPLC/UPLC (zob. pkt 30 i 31) (38).
25. Badane substancje chemiczne mogą zakłócać test MTT na skutek bezpośredniej redukcji MTT do niebieskiego formazanu albo na skutek zakłócenia barw, jeżeli badana substancja chemiczna jest chłonna, w sposób naturalny lub w wyniku procedur poddania działaniu badanej substancji w tym samym zakresie formazanu pod względem gęstości optycznej ( $570 \pm 30$  nm, głównie niebieskich i fioletowych substancji chemicznych). Należy użyć dodatkowych kontroli w celu wykrycia i uwzględnienia potencjalnej interferencji tych badanych substancji chemicznych, takiej jak kontrola nieswoistej redukcji MTT (NSMTT) i kontrola o barwie nieswoistej (NSC) (zob. pkt 26–30). Jest to istotne zwłaszcza w przypadku niecałkowitego usunięcia określonej substancji badanej z tkanki przez przemywanie lub gdy substancja ta przeniknie przez naskórek, przez co pozostaje obecna w tkankach podczas przeprowadzania badania żywotności MTT. Szczegółowy opis korekty bezpośredniej redukcji MTT i zakłóceń przez barwniki jest dostępny w standardowych procedurach operacyjnych dotyczących modeli badań (34)(35)(36)(37).
26. W celu identyfikacji bezpośrednich reduktorów MTT każdą badaną substancję chemiczną należy dodać do świeżo przygotowanej pożywki MTT (34)(35)(36)(37). Jeżeli mieszanina

MTT zawierająca badaną substancję chemiczną zmieni barwę na niebieską/fioletową, zakłada się, że badana substancja chemiczna bezpośrednio redukuje MTT i należy przeprowadzić pogłębioną kontrolę funkcjonalną niezdolnego do życia naskórka, stosując niezależnie pomiar absorbancji wzorca (OD) lub procedurę spektrofotometrii HPLC/UPLC. Do tej dodatkowej kontroli funkcjonalnej używa się martwych tkanek, które wykazują jedynie resztkową aktywność metaboliczną, ale wchłaniają badaną substancję chemiczną w podobnym stopniu co tkanki żywotne. Każda substancja chemiczna redukująca MTT наносzona jest na co najmniej dwie kontrpróby martwych tkanek na czas narażenia, które przechodzą pełne badanie działania żrącego na skórę. Następnie oblicza się rzeczywistą żywotność jako odsetek żywotności tkanek uzyskany w wyniku narażenia żywych tkanek na działanie reduktora MTT pomniejszony o odsetek nieswoistej redukcji MTT uzyskany w wyniku narażenia martwych tkanek na działanie tego samego reduktora MTT, obliczony relatywnie względem kontroli ujemnej prowadzonej jednocześnie z korygowanym badaniem (%NSMTT).

27. W celu identyfikacji potencjalnego zakłócenia przez barwne badane substancje chemiczne lub przez badane substancje chemiczne, które zabarwiają się w kontakcie z wodą lub izopropanolem, i podjęcia decyzji co do potrzeby dodatkowych kontroli, należy przeprowadzić analizę widmową badanej substancji chemicznej w wodzie (środowisko podczas narażenia) lub izopropanolu (roztwór ekstrakcyjny). Jeżeli w wodzie lub izopropanolu badana substancja chemiczna chłonie światło w zakresie  $570 \pm 30$  nm, należy przeprowadzić pogłębione kontrole z barwnikiem lub, alternatywnie, procedurę spektrofotometrii HPLC/UPLC, w przypadku której te kontrole nie są wymagane (zob. pkt 30 i 31). Podczas dokonywania pomiaru absorbancji wzorca każda zakłócająca, barwiona badana substancja chemiczna nakładana jest na każdy okres narażenia na co najmniej dwie kontrpróby żywych tkanek, które podlegają pełnemu badaniu w kierunku działania żrącego na skórę, ale są inkubowane z pożywką zamiast roztworu MTT podczas etapu inkubacji z MTT w celu uzyskania kontroli o barwie nieswoistej (NSC<sub>living</sub>). Ze względu na naturalną różnorodność biologiczną żywych tkanek kontrolę NSC<sub>living</sub> należy przeprowadzać równocześnie na każdy czas narażenia na każdą barwioną badaną substancję chemiczną (w każdej serii badawczej). Następnie oblicza się rzeczywistą żywotność jako odsetek żywotności uzyskany w wyniku narażenia żywych tkanek na działanie zakłócającej badanej substancji chemicznej i inkubowanych z roztworem MTT pomniejszony o odsetek tkanek nieswoistej barwy uzyskanych w wyniku narażenia żywych tkanek na działanie zakłócającej badanej substancji chemicznej i inkubowanych z pożywką bez udziału MTT, w badaniu przeprowadzonym jednocześnie z korygowanym badaniem (%NSC<sub>living</sub>).
28. Badane substancje chemiczne, które zidentyfikowano jako powodujące zarówno bezpośrednią redukcję MTT (zob. pkt 26), jak i zakłócenia barwy (zob. pkt 27), będą również wymagały trzeciego zestawu kontroli, oprócz kontroli NSMTT i NSC<sub>living</sub> opisanych w poprzednich punktach, podczas wykonywania standardowego pomiaru absorbancji (OD). Dzieje się tak zazwyczaj w przypadku badanych substancji chemicznych o ciemnym zabarwieniu, która interferują z testem MTT (np. niebieski, fioletowy, czarny), ponieważ, jak opisano w pkt 26, ich swoista barwa utrudnia ocenę zdolności do bezpośredniego zmniejszenia MTT. Te badane

substancje chemiczne mogą wiązać się zarówno z tkankami martwymi, jak i żywymi, a zatem kontrola NSMTT może nie tylko korygować bezpośrednią redukcję MTT przez badaną substancję chemiczną, ale również zakłócenia barwy wynikające z wiązania się badanej substancji chemicznej z martwymi tkankami. Może to prowadzić do podwójnej korekty zakłóceń koloru, ponieważ kontrola NSC<sub>living</sub> już koryguje zakłócenia barwy wynikające z połączenia badanej substancji chemicznej z żywymi tkankami. Aby uniknąć podwójnej korekty możliwej w przypadku zakłócenia barwy, należy przeprowadzić trzecią kontrolę nieswoistego zabarwienia w martwych tkankach. W tej dodatkowej kontroli badana substancja chemiczna nanoszona jest co najmniej na dwie kontrpróby martwych tkanek na każdy czas narażenia, które podlegają pełnemu badaniu, ale są inkubowane z pożywką zamiast z roztworem MTT w trakcie etapu inkubacji z MTT. Pojedyncza kontrola NSC<sub>killed</sub> jest wystarczająca dla każdej badanej substancji chemicznej, niezależnie od liczby przeprowadzonych niezależnych badań/analiz, lecz powinna być przeprowadzana jednocześnie z kontrolą NSMTT, i o ile to możliwe, z wykorzystaniem tej samej partii tkanki. Następnie oblicza się rzeczywistą żywotność jako odsetek żywotności tkanek uzyskany w wyniku narażenia żywych tkanek na działanie badanej substancji chemicznej pomniejszony o %NSMTT i %NSC<sub>living</sub>, powiększony o odsetek barwy nieswoistej uzyskanej w wyniku narażenia martwych tkanek na zakłócającą badaną substancję chemiczną i inkubowanych w podłożu bez MTT, obliczony relatywnie względem kontroli ujemnej przeprowadzonej jednocześnie z korygowanym badaniem (%NSC<sub>killed</sub>).

29. Należy zauważyć, że nieswoista redukcja MTT i nieswoiste zakłócenia barwy mogą powodować większe odczyty ekstraktu tkankowego powyżej zakresu liniowości spektrofotometru. Na tej podstawie każde laboratorium przed rozpoczęciem badania badanych substancji chemicznych do celów regulacyjnych powinno określić liniowość zakresu spektrofotometru przy użyciu formazanu MTT (CAS # 57360-69-7) pochodzącego ze źródła komercyjnego. W szczególności pomiar absorbancji wzorca (OD) przy użyciu spektrofotometru jest właściwy do oceny bezpośrednich reduktorów MTT i substancji chemicznych zakłócających barwę, gdy OD ekstraktów tkankowych uzyskanych za pomocą badanej substancji chemicznej bez korekty na bezpośrednią redukcję MTT lub zakłócenie barwy mieszczą się w liniowym zakresie spektrofotometru lub gdy nieskorygowana procentowa żywotność uzyskana za pomocą badanej substancji chemicznej zdefiniowana została już jako działająca żrąco na skórę (zob. pkt 35 i 36). Niemniej jednak, wyniki dla badanych substancji chemicznych produkujących %NSMTT lub %NSC<sub>living</sub> > 50 % kontroli ujemnej powinny być przyjmowane z ostrożnością.
30. W przypadku barwnych badanych substancji chemicznych, które nie są zgodne z pomiarem absorbancji wzorca (OD) ze względu na zbyt silną interferencję z testem MTT, można zastosować alternatywną procedurę spektrofotometrii HPLC/UPLC- spektrofotometrii do pomiaru formazanu MTT (zob. pkt 31) (37). System spektrofotometrii HPLC/UPLC pozwala na rozdzielenie formazanu MTT od badanej substancji chemicznej przed jej oznaczeniem ilościowym (38). Z tego powodu kontrole NSC<sub>living</sub> lub NSC<sub>killed</sub> nie są nigdy wymagane, gdy



wykorzystuje się spektrofotometrię HPLC/UPLC, niezależnie od badanej substancji chemicznej. Kontrole NSMTT powinny być jednak stosowane, jeżeli istnieje podejrzenie, że badana substancja chemiczna bezpośrednio obniża MTT lub ma barwę, która utrudnia ocenę zdolności do bezpośredniego zmniejszenia MTT (jak opisano w pkt 26). W przypadku stosowania spektrofotometrii HPLC/UPLC do pomiaru formazanu MTT procent żywotności tkanek oblicza się jako procent MTT powierzchni pików formazanu uzyskanej z żywych tkanek poddanych działaniu badanej substancji chemicznej w stosunku do pików formazanu MTT uzyskanego przy równoczesnej kontroli ujemnej. W przypadku badanych substancji chemicznych zdolnych do bezpośredniego obniżenia MTT rzeczywistą żywotność tkanek oblicza się jako odsetek żywotności tkanek uzyskanych w wyniku narażenia żywych tkanek na działanie badanej substancji chemicznej minus %NSMTT. Na koniec należy zauważyć, że bezpośrednie reduktory MTT, które mogą również zakłócać barwę, są zatrzymywane w tkankach po obróbce i obniżają MTT tak znacznie, że prowadzą do OD (przy użyciu pomiaru wzorca OD) lub obszarów pików (przy użyciu spektrofotometrii UPLC/HPLC) badanych ekstraktów tkankowych wykraczających poza zakres liniowości spektrofotometru, których nie można ocenić, chociaż oczekuje się, że będą występować tylko w bardzo rzadkich sytuacjach.

31. Spektrofotometria HPLC/UPLC może być również stosowana ze wszystkimi rodzajami badanych substancji chemicznych (barwne, niekolorowe, reduktory MTT i reduktory MTT) do pomiaru formazanu MTT (38). Z powodu zróżnicowania systemów spektrofotometrii HPLC/UPLC, należy wykazać kwalifikację systemu spektrofotometrii HPLC/UPLC przed jego zastosowaniem, aby określić ilościowo formazan MTT z ekstraktów tkankowych poprzez spełnienie kryteriów dopuszczalności zestawu standardowych parametrów kwalifikacyjnych w oparciu na kryteriach opisanych w wytycznych Agencji Żywności i Leków Stanów Zjednoczonych dotyczących przemysłu walidacji metodą bioanalityczną (38) (39). Te kluczowe parametry i kryteria ich dopuszczalności przedstawiono w dodatku 4. Po spełnieniu kryteriów dopuszczalności określonych w dodatku 4, system spektrofotometrii HPLC/UPLC uznaje się za kwalifikowany i gotowy do pomiaru formazanu MTT w warunkach doświadczalnych opisanych w niniejszej metodzie badawczej.

### **Kryteria dopuszczalności**

32. Dla każdej metody badawczej wykorzystującej ważne modele RhE, tkanki poddane działaniu kontroli ujemnej powinny wykazywać OD odzwierciedlające jakość tkanek, jak opisano w tabeli 2, i nie powinny mieć wartości poniżej historycznie ustalonych granic. Tkanki poddane działaniu PC, tj. kwasu octowego lodowatego lub 8N KOH, powinny odzwierciedlać zdolność tkanek do reagowania na żrące substancje chemiczne w warunkach modelu badania (zob. dodatek 2). Zmienność pomiędzy kontrpróbami tkanek badanych substancji chemicznych lub kontrolnych powinna mieścić się w akceptowalnych granicach dla każdego ważnego wzoru RhE (zob. dodatek 2) (np. różnica żywotności pomiędzy dwoma kontrpróbami tkanek nie powinna przekraczać 30 %). Jeżeli kontrola ujemna lub PC wchodzące w skład serii badawczej mieszczą się w przyjętych zakresach, serię tę uznaje się za niekwalifikowaną i należy ją

powtórzyć. Jeżeli zmienność badanych substancji chemicznych wychodzi poza określony przedział, należy powtórzyć badanie.

### Interpretacja wyników i model prognozowania

33. Wartości OD otrzymane dla każdej badanej substancji chemicznej mogą być wykorzystane do obliczenia procentowej żywotności w stosunku do kontroli ujemnej, dla której przyjmuje się 100 %. W przypadku spektrofotometrii HPLC/UPLC do pomiaru formazanu MTT, procent żywotności tkanek oblicza się jako procent MTT powierzchni piku formazanu uzyskanej z żywych tkanek poddanych działaniu badanej substancji chemicznej w stosunku do piku formazanu MTT uzyskanego przy jednoczesnej kontroli ujemnej. Wartości granicy odcięcia procentowego żywotności komórek rozróżniające żrącą badaną substancję chemiczną od substancji niemającej działania żrącego (lub rozróżniające różne podkategorie żrące) określono poniżej w pkt 35 i 36 dla każdego z modeli badań objętych niniejszą metodą badawczą i powinny być stosowane do interpretacji wyników.
34. Pojedyncza seria badawcza, w skład której wchodzi co najmniej dwie kontrpróby tkanek, powinna wystarczyć dla badanej substancji chemicznej, jeśli otrzymana klasyfikacja jest jednoznaczna. W przypadku wyników granicznych, np. niezgodności powtarzalnych pomiarów można jednak rozważyć przeprowadzenie drugiej serii badawczej, jak również trzeciej w przypadku niezgodności między wynikami dwóch pierwszych serii.
35. W tabeli 4 przedstawiono związany z systemem klasyfikacji Globalnego Zharmonizowanego Systemu Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów / rozporządzenia CLP model prognozowania dotyczący modelu badania działania żrącego na skórę EpiSkin™ (9)(34)(22).

**Tabela 4:** Model prognozowania EpiSkin™

| <b>Żywotność mierzona po punktach czasowych narażenia (t = 3, 60 oraz 240 minut)</b>                                                                                           | <b>Rozważana prognoza</b>                                                      |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| < 35 % po 3 minutach narażenia                                                                                                                                                 | <b>Substancja żrąca:</b><br>• Dodatkowa podkategoria 1A*                       |
| ≥ 35 % po 3 minutach narażenia <b>ORAZ</b><br>< 35 % po 60 minutach narażenia<br><b>LUB</b><br>≥ 35 % po 60 minutach narażenia <b>ORAZ</b><br>< 35 % po 240 minutach narażenia | <b>Substancja żrąca:</b><br>• Połączenie dodatkowych podkategorii 1B- oraz -1C |
| ≥ 35 % po 240 minutach narażenia                                                                                                                                               | <b>Substancja nieżrąca</b>                                                     |

\*) Zgodnie z danymi wygenerowanymi w celu oceny przydatności modeli testowych RhE do wspierania podkategorii wykazano, że około 22 % wyników badania modelu EpiSkin™ podkategorii 1A może faktycznie stanowić podkategorię 1B lub podkategorię 1C substancji/mieszanin (tj. nad klasyfikacjami) (zob. dodatek 3).

36. W tabeli 5 przedstawiono modele prognozowania dla EpiDerm™ SCT (10)(23)(35), SkinEthic™ RHE (17)(18)(23)(36) i epiCS® (16)(23)(37) modele badania działania żrącego na skórę, powiązane z systemem klasyfikacji GHS ONZ/rozporządzeniem CLP:

**Tabela 5:** EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ zrekonstruowany ludzki naskórek oraz epiCS®

| <b>Żywotność mierzona po punktach czasowych narażenia (t = 3, oraz 60 minut)</b>                       | <b>Rozważana prognoza</b>                   |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| <b>ETAP 1 w przypadku EpiDerm™ SCT – zrekonstruowany ludzki naskórek SkinEthic™ oraz epiCS®</b>        |                                             |
| < 50 % po 3 minutach narażenia                                                                         | <b>Substancja żrąca:</b>                    |
| ≥ 50 % po 3 minutach narażenia <b>ORAZ</b><br>< 15 % po 60 minutach narażenia                          | <b>Substancja żrąca:</b>                    |
| ≥ 50 % po 3 minutach narażenia <b>ORAZ</b><br>≥ 15 % po 60 minutach narażenia                          | <b>Substancja nieżrąca</b>                  |
| <b>ETAP 2 w przypadku EpiDerm™ SCT – substancje/mieszaniny zidentyfikowane jako żrące w etapie 1</b>   |                                             |
| < 25 % po 3 minutach narażenia                                                                         | Dodatkowa podkategoria 1A*                  |
| ≥ 25 % po 3 minutach narażenia                                                                         | Połączenie dodatkowych podkategorii 1B i 1C |
| <b>ETAP 2 w przypadku SkinEthic™ RHE – substancje/mieszaniny zidentyfikowane jako żrące w etapie 1</b> |                                             |
| < 18 % po 3 minutach narażenia                                                                         | Dodatkowa podkategoria 1A*                  |
| ≥ 18 % po 3 minutach narażenia                                                                         | Połączenie dodatkowych podkategorii 1B i 1C |
| <b>ETAP 2 w przypadku epiCS® – substancje/mieszaniny zidentyfikowane jako żrące w etapie 1</b>         |                                             |
| < 15 % po 3 minutach narażenia                                                                         | Dodatkowa podkategoria 1A*                  |
| ≥ 15 % po 3 minutach narażenia                                                                         | Połączenie dodatkowych podkategorii 1B i 1C |

## DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

### Dane

37. W przypadku każdego badania należy przedstawić w formie tabelarycznej, z uwzględnieniem w stosownych przypadkach danych z powtórzonych eksperymentów, dane z poszczególnych kontrprób tkanek (np. dane dotyczące wartości OD i obliczonej procentowej żywotności komórek dla każdej substancji badanej, łącznie z klasyfikacją). Ponadto w odniesieniu do każdego badania należy zgłosić średnie i zakresy żywotności oraz CV pomiędzy kontrpróbami tkanki. W odniesieniu do każdej badanej substancji chemicznej należy zgłosić zaobserwowane

interakcje bezpośrednich reduktorów MTT lub barwnych substancji chemicznych z odczynnikiem MTT.

### **Sprawozdanie z badania**

38. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

#### *Badane i kontrolne substancje chemiczne:*

- Substancja jednoskładnikowa: dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa IUPAC lub CAS, numer CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny, czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń, stosownie do przypadku i jeśli jest to praktycznie wykonalne itp.,
- substancja wieloskładnikowa, UVCB i mieszanina: opisana w miarę możliwości przez podanie nazwy chemicznej (zob. powyżej), określenie ilości oraz istotnych właściwości fizykochemicznych składników,
- wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie i wszelkie dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne,
- źródło, numer partii (jeżeli dostępny),
- w stosownych przypadkach obróbka badanej substancji chemicznej/substancji kontrolnej przed badaniem (np. ogrzanie, rozdrobnienie),
- stabilność badanej substancji chemicznej, termin przydatności lub data ponownej analizy, jeżeli są znane,
- warunki przechowywania.

#### *Zastosowany model i protokół RhE oraz jego uzasadnienie (w stosownych przypadkach)*

##### *Warunki badania:*

- zastosowany model RhE (w tym numer partii),
- Informacje na temat wzorcowania urządzenia pomiarowego (np. *spektrofotometru*), długość fali i filtr środkowoprzepustowy (w stosownych przypadkach) stosowany do określenia ilościowego formazanu MTT oraz zakres liniowości urządzenia pomiarowego,
- opis metody wykorzystanej do oceny ilościowej formazanu MTT,
- opis dopuszczalności systemu spektrofotometrycznego HPLC/UPLC, w stosownych przypadkach,
- pełne informacje podstawowe na temat stosowanego modelu RhE, z uwzględnieniem jego efektywności. Powinno to między innymi obejmować:
  - i) żywotność;
  - ii) funkcję ochronną;

- iii) morfologię;
- iv) odtwarzalność i zdolność predykcyjną;
- v) kontrole jakości (QC) modelu;

- odniesienie do danych historycznych modelu. Powinno to między innymi obejmować:
- dopuszczalność danych QC z odwołaniem do danych dotyczących serii historycznych,
- wykazanie biegłości w stosowaniu metody badawczej przed rutynowym użyciem w drodze badania substancji służących do wykazania biegłości.

*Procedura badawcza:*

- szczegóły wykorzystanej procedury badania (w tym procedury mycia sprzętu stosowane po okresie narażenia),
- dawki wykorzystanych badanych substancji chemicznych i kontrolnych substancji chemicznych,
- czas trwania okresu lub okresów narażenia oraz temperatura lub temperatury narażenia,
- wskazanie prób kontroli używanych w odniesieniu do bezpośrednich reduktorów MTT lub badanych substancji chemicznych, które w wyniku reakcji przechodzą w barwny produkt, w stosownych przypadkach,
- liczba kontrprób tkanek wykorzystanych do badanej substancji chemicznej i kontroli (PC, kontrola ujemna, NSMTT, NSC<sub>living</sub> i NSC<sub>killed</sub>, jeśli dotyczy), na czas narażenia,
- opis zastosowanych kryteriów podejmowania decyzji/modelu prognozowania na podstawie wykorzystanego modelu RhE,
- opis wszelkich modyfikacji w procedurze badawczej (w tym w procedurach mycia).

*Kryteria dopuszczalności badania i serii badawczej:*

- średnie wartości oraz zakresy dopuszczalności dodatniej i ujemnej kontroli na podstawie danych historycznych,
- dopuszczalna zmienność wśród kontrprób tkanek w przypadku dodatniej i ujemnej kontroli,
- dopuszczalna zmienność wśród kontrprób tkanek w przypadku badanej substancji chemicznej.

*Wyniki:*

- tabelaryczne zestawienie danych dla poszczególnych badanych substancji chemicznych i kontroli, dla każdego okresu narażenia, każdej serii badawczej i każdego pomiaru kontrpróby, w tym powierzchni piku OD lub formazanu MTT, procentu żywotności tkanek, średniego procentu żywotności tkanek, różnic między kontrpróbami, SD lub CV, jeżeli dotyczy,
- w stosownych przypadkach wyniki kontroli używanych w odniesieniu do bezpośrednich reduktorów MTT lub badanych substancji chemicznych, które w wyniku reakcji przechodzą

w barwny produkt, w tym OD lub MTT powierzchni pików formazanu, % NSMTT, % NSC<sub>living</sub>, %NSC<sub>killed</sub>, różnic pomiędzy kontrpróbami tkanki, SD lub CV (w stosownych przypadkach) oraz ostateczny prawidłowy odsetek żywotności tkanki,

- wyniki uzyskane z zastosowaniem badanych substancji chemicznych i kontrolnych substancji chemicznych w odniesieniu do określonych kryteriów dopuszczalności badania i serii badawczej,
- opis innych zaobserwowanych skutków,
- ustalona na tej podstawie klasyfikacja w odniesieniu do modelu prognozowania lub zastosowanych kryteriów podejmowania decyzji.

*Omówienie wyników*

*Wnioski*

## BIBLIOGRAFIA

- (1) Organizacja Narodów Zjednoczonych (ONZ) (2013), Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów (GHS), wydanie piąte zmienione; Nowy Jork i Genewa: Dostępne na stronie internetowej:  
[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) Rozdział B.4 niniejszego załącznika, Ostre działanie drażniące na skórę.
- (3) Rozdział B.40 niniejszego załącznika, *Badanie działania żrącego na skórę in vitro*:
- (4) Rozdział B.65 niniejszego załącznika, *Metoda badawcza bariery membranowej in vitro*.
- (5) Rozdział B.46 niniejszego załącznika, *Badanie podrażnień skóry in vitro: Metoda badania z użyciem zrekonstruowanego ludzkiego naskórka*.
- (6) OECD (2014). *Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion*. [W:] Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 203. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju, 2014.
- (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., i Balls M. (1995). *A Prevalidation Study on In Vitro Skin Corrosivity Testing. The report and Recommendations of ECVAM Workshop 6*. „ALTA” nr 23, s. 219–255.
- (8) Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P. i Worth A.P. (1998). *The ECVAM International Validation Study on In Vitro Tests for Skin Corrosivity*. 1. Selection and distribution of the test chemicals. „Toxicology In Vitro” nr 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. i 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” nr 12: 483–524.
- (10) Liebsch M., Traue D., Barrabas C., Spielmann H., Uphill, P., Wilkins S., Wiemann C., Kaufmann T., Remmele M. i 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. i Zucco F. (1995). *Practical Aspects of the*

*Validation of Toxicity Test Procedures*. The report and Recommendations of ECVAM Workshops, „ALTA” nr 23, s. 129–147.

- (12) ICCVAM (Międzyagencyjny Komitet Koordynacyjny ds. Uznawania Metod Alternatywnych) (1997), *Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods*. Publikacja NIH nr 97-3981, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, Karolina Północna, Stany Zjednoczone.
- (13) ICCVAM (Międzyagencyjny Komitet Koordynacyjny ds. Uznawania Metod Alternatywnych) (2002), ICCVAM Evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals*. „NIH Publication” nr 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, Karolina Północna, Stany Zjednoczone.
- (14) EC-ECVAM (1998). *Statement on the Scientific Validity of the EpiSkin™ Test (an In Vitro Test for Skin Corrosivity)*. ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3 kwietnia 1998.
- (15) EC-ECVAM (2000). *Statement on the Application of the SkinEthic™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing*, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC14), 21 marca 2000.
- (16) Hoffmann J., Heisler E., Karpinski S., Losse J., Thomas D., Siefken W., Ahr H.J., Vohr H.W. i Fuchs H.W. (2005). *Epidermal-Skin-Test 1000 (EST-1000)-A New Reconstructed Epidermis for In Vitro Skin Corrosivity Testing*. „Toxicology In Vitro” nr 19, s. 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., i 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*. „Toxicology In Vitro” nr 20, s. 547–559.
- (18) Tornier C., Roquet M. i Fraissinette A.B. (2010). *Adaptation of the Validated SkinEthic™ Reconstructed Human Epidermis (RHE) Skin Corrosion Test Method to 0.5 cm² Tissue Sample*. „Toxicol. nr 24, s. 1379–1385.
- (19) EC-ECVAM (2006). *Statement on the Application of the SkinEthic™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing*, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC25), 17 listopada 2006.
- (20) EC-ECVAM (2009). *ESAC Statement on the Scientific Validity of an In-Vitro Test Method for Skin Corrosivity Testing: the EST-1000*, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30), 12 czerwca 2009.



- (21) OECD (2013). *Summary Document on the Statistical Performance of Methods in OECD Test Guideline 431 for Sub-categorisation*. [W:] *Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment* (nr 190). Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.
- (22) Alépée N., Grandidier M.H., i 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. nr 28, s. 131–145.
- (23) Desprez B., Barroso J., Griesinger C., Kandárová H., Alépée N., i Fuchs, H. (2015). *Two Novel Prediction Models Improve Predictions of Skin Corrosive Sub-categories by Test Methods of OECD Test Guideline No 431*. „Toxicol. nr 29, s. 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*. [W:] *Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment* (nr 219). Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.
- (25) OECD (2005). *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*. . [W:] *Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment* (nr 34). Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.
- (26) Eskes C. *et al.* (2012). *Regulatory Assessment of In Vitro Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations*. „Regulatory Toxicology and Pharmacology” nr 62, s. 393–403.
- (27) Mosmann T. (1983). *Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays*. „Journal of Immunological Methods” nr 65, s. 55–63.
- (28) Tinois E., *et al.* (1994). *The Episkin Model: Successful Reconstruction of Human Epidermis In Vitro*. . [W:] „*In Vitro Skin Toxicology*” A. Rougier, Goldberg A.M i Maibach H.I. (red.), s. 133–140.
- (29) Cannon C. L., Neal P.J., Southee J.A., Kubilus J. i Klausner M. (1994), *New Epidermal Model for Dermal Irritancy Testing*. „*Toxicology In Vitro*” nr 8, s. 889–891.
- (30) Ponec M., Boelsma E., Weerheim A., Mulder A., Bouwstra J i Mommaas M. (2000). *Lipid and ultrastructural characterization of reconstructed skin models*. „*International Journal of Pharmaceutics*” nr 203, s. 211–225.
- (31) Tinois E., Tillier, J., Gaucherand, M., Dumas, H., Tardy, M. i 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.*  
„Experimental Cell Research” nr 193, s. 310–319.

- (32) Parenteau N.L., Bilbo P, Nolte CJ, Mason VS i Rosenberg M. (1992). *The Organotypic Culture of Human Skin Keratinocytes and Fibroblasts to Achieve Form and Function.* „Cytotechnology” nr 9, s. 163–171.
- (33) Wilkins L.M., Watson SR, Prosky SJ, Meunier SF i Parenteau N.L. (1994). *Development of a Bilayered Living Skin Construct for Clinical Applications.* „Biotechnology and Bioengineering” nr 43/8, s. 747–756.
- (34) EpiSkin™ SOP (grudzień 2011). *INVITTOX Protocol (nr 118), EpiSkin™ Skin Corrosivity Test.*
- (35) EpiDerm™ SOP (luty 2012). *Version MK-24-007-0024 Protocol for: In Vitro EpiDerm™ Skin Corrosion Test (EPI-200-SCT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm.*
- (36) SkinEthic™ RHE SOP (styczeń 2012). *INVITTOX Protocol SkinEthic™ Skin Corrosivity Test.*
- (37) EpiCS® SOP (styczeń 2012). *Version 4.1 In Vitro Skin Corrosion: Human Skin Model Test Epidermal Skin Test 1000 (epiCS®) CellSystems.*
- (38) Alépée N., Barroso J., De Smedt A., De Wever B., Hibatallah J., Klaric M., Mewes K.R., Millet M., Pfannenbecker U., Tailhardat M., Templier M. i 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. nr 29, s. 741–761.
- (39) US FDA (2001). *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation.* U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, maj 2001. Dostępne na stronie internetowej: [\[http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf\]](http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf).

## Dodatek 1

### DEFINICJE

**Dokładność:** stopień zgodności wyników zastosowanej metody badawczej z przyjętymi wartościami odniesienia. Jest to miara efektywności metody badawczej i jeden z aspektów jej istotności. Pojęcia tego często używa się zamiennie z pojęciem »zgodność« na określenie odsetka prawidłowych wyników uzyskiwanych przy użyciu metody badawczej (25).

**Żywotność komórek:** parametr określający całkowitą aktywność populacji komórek, np. zdolność dehydrogenaz w mitochondriach komórek do obniżenia zawartości barwnika przyżyciowego MTT, (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylo-tetrazoliowy) który, w zależności od pomiaru końcowego i zastosowanego schematu badania odpowiada całkowitej liczbie lub żywotności komórek.

**Substancja chemiczna:** substancja lub mieszanina.

**Zgodność:** jest to miara efektywności metody badawczej w odniesieniu do metod badawczych, które dają wyniki kategoryczne i jest ona jednym z aspektów istotności. To określenie jest czasami stosowane wymiennie z określeniem „dokładność”; definiuje się jako odsetek wszystkich badanych substancji chemicznych, które są prawidłowo sklasyfikowane jako dodatnie lub ujemne. Zgodność jest w dużym stopniu uzależniona od przewagi dodatnich wyników w rodzajach badanej substancji chemicznej (25).

**ET<sub>50</sub>:** może być oszacowane przez ustalenie czasu narażenia na działanie potrzebnego do zmniejszenia żywotności komórek o 50 % po zastosowaniu wzorcowej substancji chemicznej w określonym, stałym stężeniu, zob. również IC<sub>50</sub>.

**GHS (Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów):** system, w ramach którego proponuje się klasyfikację substancji chemicznych (substancji i mieszanin) według znormalizowanych rodzajów i poziomów zagrożeń fizycznych, zdrowotnych i środowiskowych oraz omawia się odpowiednie elementy komunikacyjne, takie jak: piktogramy, hasła ostrzegawcze, zwroty wskazujące rodzaj zagrożenia, zwroty wskazujące środki ostrożności i karty charakterystyki substancji i produktów niebezpiecznych, aby przekazać informacje na temat ich szkodliwego działania w celu zapewnienia ochrony ludzi (w tym pracowników, robotników, przewoźników, konsumentów i ratowników) i środowiska (1).

**HPLC:** wysokosprawna chromatografia cieczowa.

**IATA:** zintegrowane podejście do badań i oceny.

**IC<sub>50</sub>:** może być oszacowane w drodze ustalenia stężenia, w którym wzorcowa substancja chemiczna powoduje zmniejszenie żywotności tkanek o 50 % (IC<sub>50</sub>) po stałym czasie narażenia na działanie, zob. również ET<sub>50</sub>.

**Dawka nieskończona:** ilość substancji badanej nakładana na skórę, przekraczająca ilość konieczną do całkowitego, jednolitego pokrycia jej powierzchni. **Mieszanina:** mieszanina lub roztwór, które składają się z co najmniej dwóch substancji niewchodzących ze sobą w reakcję.

**Substancja jednoskładnikowa:** substancja zdefiniowana za pomocą jej składu ilościowego, w której jeden główny składnik występuje w stężeniu co najmniej 80 % (w/w).

**MTT:** bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylo-tetrazoliowy MTT.

**Substancja wieloskładnikowa:** substancja zdefiniowana za pomocą jej składu ilościowego, w której więcej niż jeden główny składnik występuje w stężeniu  $> 10\%$  (w/w) i  $< 80\%$  (w/w). Substancja wieloskładnikowa powstaje w wyniku procesu wytwarzania. Różnica między mieszaniną a substancją wieloskładnikową polega na tym, że mieszaninę uzyskuje się w wyniku zmieszania co najmniej dwóch substancji, między którymi nie zachodzi reakcja chemiczna. Substancja wieloskładnikowa powstaje w wyniku reakcji chemicznej.

**NC:** substancja niemająca działania żrącego.

**Kontrola NSC<sub>killed</sub>:** kontrola o barwie nieswoistej martwych tkanek.

**Kontrola NSC<sub>living</sub>:** kontrola o barwie nieswoistej żywych tkanek.

**NSMTT:** nieswoista redukcja MTT.

**OD:** gęstość optyczna (ang. Optical Density).

**PC:** kontrola dodatnia – kontrpróba zawierająca wszystkie składniki układu badawczego, poddana działaniu substancji chemicznej, o której wiadomo, że wywołuje reakcję dodatnią. Aby zapewnić możliwość oceny zmienności reakcji w kontroli dodatniej w czasie, siła reakcji w postaci silnego działania drażniącego nie może być zbyt duża.

**Standardy wykonywania badań:** normy oparte na zwalidowanej metodzie badania, zapewniające podstawę do oceny porównywalności proponowanej metody badawczej, która jest podobna do metody referencyjnej pod względem mechanistycznym i funkcjonalnym. Uwzględnia się: (i) zasadnicze elementy metody badawczej; (ii) podstawowy wykaz chemicznych substancji odniesienia wybranych spośród substancji chemicznych wykorzystywanych w celu wykazania dopuszczalnej efektywności zwalidowanej metody badania; oraz (iii) podobny poziom dokładności i wiarygodności, na podstawie wyników uzyskanych dla zwalidowanej metody badawczej, który proponowana metoda badania powinna osiągnąć przy ocenie z wykorzystaniem podstawowego wykazu chemicznych substancji odniesienia (25).

**Istotność:** opis powiązania badania z oczekiwanym skutkiem oraz czy jest ono istotne i użyteczne dla konkretnego celu. Jest to zakres, w jakim metoda badawcza prawidłowo mierzy lub przewiduje biologiczny oczekiwany skutek. Istotność obejmuje uwzględnienie dokładności (zgodności) metody badawczej (25).

**Wiarygodność:** miary zakresu, w jakim metoda badawcza może być przeprowadzana w sposób odtwarzalny w jednym laboratorium i pomiędzy laboratoriami na przestrzeni czasu w przypadku jej przeprowadzania przy użyciu tego samego protokołu. Ocenia się ją, obliczając odtwarzalność wewnątrz- i międzylaboratoryjną (25).

**Seria badawcza:** seria badawcza obejmuje przynajmniej jedną badaną substancję chemiczną, która badana jest równocześnie z kontrolą ujemną i kontrolą dodatnią.

**Czułość:** odsetek wszystkich substancji chemicznych dających wynik dodatni / aktywnych substancji chemicznych prawidłowo sklasyfikowanych za pomocą danej metody badawczej. Jest to miara dokładności metody badawczej, która daje wyniki definitywne i stanowi istotny parametr w ocenie istotności metody badawczej (25).

**Działanie żrące na skórę *in vivo*:** powstanie nieodwracalnego uszkodzenia skóry; tj. widocznej martwicy przebiegającej przez naskórek w głąb skóry, spowodowanej naniesieniem badanej substancji chemicznej na okres nieprzekraczający czterech godzin. Reakcjami na działanie żrące są wrzody, krwotoki, krwawiące strupy oraz – po zakończeniu 14-dniowej obserwacji – odbarwienia wynikłe ze zblednięcia skóry, obszary jednolitej alopecji, a także blizny. Celem oceny wątpliwych uszkodzeń można przeprowadzić badanie histopatologiczne.

**Swoistość:** odsetek wszystkich substancji chemicznych dających wynik ujemny / nieaktywnych substancji chemicznych prawidłowo sklasyfikowanych za pomocą danej metody badawczej. Jest to miara dokładności metody badawczej, która daje wyniki definitywne i stanowi istotny parametr w ocenie istotności metody badawczej (25).

**Substancja:** pierwiastek chemiczny i jego związki w stanie naturalnym lub uzyskane w wyniku dowolnego procesu produkcyjnego, w tym wszelkie dodatki konieczne do zachowania trwałości produktu i wszelkie zanieczyszczenia powstałe w wyniku zastosowanego procesu, z wyłączeniem wszelkich rozpuszczalników, które można oddzielić bez wpływu na stabilność substancji i bez zmiany jej składu. **Badana substancja chemiczna:** dowolna substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

**UPLC:** ultrawysokosprawna chromatografia cieczowa.

**UVCB:** substancje o nieznanym lub zmiennym składzie, złożone produkty reakcji lub materiały biologiczne.

## Dodatek 2

### GLÓWNE SKŁADOWE MODELI BADANIA RHE ZATWIERDZONE DO BADAŃ DOTYCZĄCYCH DZIAŁANIA ŻRĄCEGO NA SKÓRĘ

| Składowe modelu badania | EpiSkin™                         | EpiDerm™ SCT          | SkinEthic™ RHE                   | epiCS®                           |
|-------------------------|----------------------------------|-----------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Powierzchnia modelu     | 0,38 cm <sup>2</sup>             | 0,63 cm <sup>2</sup>  | 0,5 cm <sup>2</sup>              | 0,6 cm <sup>2</sup>              |
| Liczba kontrprób tkanki | Co najmniej 2 na okres narażenia | 2–3 na czas narażenia | Co najmniej 2 na okres narażenia | Co najmniej 2 na okres narażenia |

| Składowe modelu badania | EpiSkin™                                                                                                                                                                                                                                                                               | EpiDerm™ SCT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | SkinEthic™ RHE                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | epiCS®                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|-------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Dawkowanie i stosowanie | <p><u>Ciecze i substancje lepkie:</u> 50 µl ±3 µl (131,6 µl/cm<sup>2</sup>)</p> <p><u>Substancje stałe:</u> 20 ±2 mg (52,6 mg/cm<sup>2</sup>) + 100 µl ±5µl roztworu NaCl (9 g/l)</p> <p><u>Substancje woskowate/kleiste:</u> 50 ±2 mg (131,6 mg/cm<sup>2</sup>) z siatką nylonową</p> | <p><u>Ciecze:</u> 50 µl (79,4 µl/cm<sup>2</sup>) z siatką nylonową lub bez</p> <p><i>Kompatybilność badanej substancji chemicznej z siatką nylonową przed rozpoczęciem badania</i></p> <p><u>Substancje półstałe:</u> 50 µl (79,4 µl/cm<sup>2</sup>)</p> <p><u>Substancje stałe:</u> 25 µl H<sub>2</sub>O (lub więcej w razie potrzeby) + 25 mg (39,7 mg/cm<sup>2</sup>)</p> <p><u>Substancje woskowate:</u> płaski, podobny do krążka, kawałek o średnicy ok. 8 mm umieszczony na wierzchu tkanki zwilżonej 15 µl H<sub>2</sub>O.</p> | <p><u>Ciecze i substancje lepkie:</u> 40 µl ±3 µl (80 µl/cm<sup>2</sup>) z siatką nylonową</p> <p><i>Kompatybilność badanej substancji chemicznej z siatką nylonową przed rozpoczęciem badania</i></p> <p><u>Substancje stałe:</u> 20 µl ±2µl H<sub>2</sub>O + 20 ±3 mg (40 mg/cm<sup>2</sup>)</p> <p><u>Substancje woskowate/kleiste:</u> 20 ±3 mg (40 mg/cm<sup>2</sup>) z siatką nylonową</p> | <p><u>Ciecze:</u> 50 µl (83,3 µl/cm<sup>2</sup>) z siatką nylonową</p> <p><i>Kompatybilność badanej substancji chemicznej z siatką nylonową przed rozpoczęciem badania</i></p> <p><u>Substancje półstałe:</u> 50 µl (83,3 µl/cm<sup>2</sup>)</p> <p><u>Substancje stałe:</u> 25 mg (41,7 mg/cm<sup>2</sup>) + 25 µl H<sub>2</sub>O (lub więcej w razie potrzeby)</p> <p><u>Substancja woskowata:</u> płaski, podobny do ciastka, kawałek o średnicy ok. 8 mm umieszczony na wierzchu tkanki zwilżonej 15 µl H<sub>2</sub>O.</p> |

| Składowe modelu badania                                 | EpiSkin™                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | EpiDerm™ SCT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | SkinEthic™ RHE                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | epiCS®                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|---------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Wstępna kontrola przed bezpośrednią redukcją MTT</b> | <p>50 µl (ciecz) lub 20 mg (substancja stała)<br/>+ 2 ml MTT</p> <p>roztwór 0,3 mg/ml przez 180 ±5 min</p> <p>w temperaturze 37 °C, w atmosferze zawierającej 5 % CO<sub>2</sub> i w warunkach względnej wilgotności wynoszącej 95 %</p> <p>→ jeżeli roztwór zmienia barwę na niebieską lub fioletową, należy wykonać dostosowane kontrole martwych tkanek uśmierczanych wodą</p> | <p>50 µl (ciecz) lub 25 mg (substancja stała)<br/>+ 1 ml MTT</p> <p>1 mg/ml przez 60 min</p> <p>w temperaturze 37 °C, w atmosferze zawierającej 5 % CO<sub>2</sub> i w warunkach względnej wilgotności wynoszącej 95 %</p> <p>→ jeżeli roztwór zmienia barwę na niebieską lub fioletową, należy wykonać dostosowane kontrole uśmierczane przez zamrożenie</p> | <p>40 µl (ciecz) lub 20 mg (substancja stała)<br/>+ 1 ml MTT</p> <p>roztwór 1 mg/ml przez 180 ±15 min w temperaturze 37 °C, w atmosferze zawierającej 5 % CO<sub>2</sub> 95 % RH</p> <p>→ jeżeli roztwór zmienia barwę na niebieską lub fioletową, należy wykonać dostosowane kontrole uśmierczane przez zamrożenie</p> | <p>50 µl (ciecz) lub 25 mg (substancja stała)<br/>+ 1 ml MTT</p> <p>1 mg/ml przez 60 min</p> <p>w temperaturze 37 °C, w atmosferze zawierającej 5 % CO<sub>2</sub> i w warunkach względnej wilgotności wynoszącej 95 %</p> <p>→ jeżeli roztwór zmienia barwę na niebieską lub fioletową, należy wykonać dostosowane kontrole uśmierczane przez zamrożenie</p> |
| <b>Wstępna kontrola zakłócenia barw</b>                 | <p>10 µl (cieczy) lub 10 mg (substancji stałej) + 90 µl H<sub>2</sub>O mieszane przez 15 min w temperaturze pokojowej</p> <p>→ jeżeli roztwór zabarwił się, należy wykonać żywe dostosowane kontrole</p>                                                                                                                                                                          | <p>50 µl (cieczy) lub 25 mg (substancji stałej) + 300 µl H<sub>2</sub>O</p> <p>przez 60 min w temperaturze 37 °C, w atmosferze zawierającej 5 % CO<sub>2</sub> i w warunkach względnej wilgotności wynoszącej 95 %</p> <p>→ jeżeli roztwór zabarwił się, należy wykonać żywe dostosowane kontrole</p>                                                         | <p>40 µl (ciecz) lub 20 mg (substancja stała) + 300 µl H<sub>2</sub>O mieszane przez 60 min w temperaturze pokojowej</p> <p>→ jeżeli badana substancja chemiczna uległa zabarwieniu, należy wykonać żywe dostosowane kontrole</p>                                                                                       | <p>50 µl (cieczy) lub 25 mg (substancji stałej) + 300 µl H<sub>2</sub>O</p> <p>przez 60 min w temperaturze 37 °C, w atmosferze zawierającej 5 % CO<sub>2</sub> i w warunkach względnej wilgotności wynoszącej 95 %</p> <p>→ jeżeli roztwór zabarwił się, należy wykonać żywe dostosowane kontrole</p>                                                         |



| <b>Składowe modelu badania</b>      | <b>EpiSkin™</b>                                                                                                  | <b>EpiDerm™ SCT</b>                                                                                                                                                   | <b>SkinEthic™ RHE</b>                                                                                                                                                 | <b>epiCS®</b>                                                                                                                                                         |
|-------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Czas i temperatura narażenia</b> | 3 min, 60 min (±5 min)<br>oraz 240 min (±10 min)<br>W wentylowanej szafce<br>Temperatura pokojowa (RT, 18–28 °C) | 3 min w temperaturze pokojowej oraz 60 min<br>w temperaturze 37 °C, w atmosferze zawierającej 5 % CO <sub>2</sub> i w warunkach względnej wilgotności wynoszącej 95 % | 3 min w temperaturze pokojowej oraz 60 min<br>w temperaturze 37 °C, w atmosferze zawierającej 5 % CO <sub>2</sub> i w warunkach względnej wilgotności wynoszącej 95 % | 3 min w temperaturze pokojowej oraz 60 min<br>w temperaturze 37 °C, w atmosferze zawierającej 5 % CO <sub>2</sub> i w warunkach względnej wilgotności wynoszącej 95 % |
| <b>Płukanie</b>                     | 25 ml 1x PBS (2 ml/wrzucenie)                                                                                    | 20 razy stałym, łagodnym strumieniem, wykorzystując 1x PBS                                                                                                            | 20 razy stałym, łagodnym strumieniem, wykorzystując 1x PBS                                                                                                            | 20 razy stałym, łagodnym strumieniem, wykorzystując 1x PBS                                                                                                            |
| <b>Kontrola ujemna</b>              | 50 µl roztworu NaCl (9 g/l)<br>Badana dla każdego okresu narażenia                                               | 50 µl H <sub>2</sub> O<br>Badana dla każdego okresu narażenia                                                                                                         | 40 µl H <sub>2</sub> O<br>Badana dla każdego okresu narażenia                                                                                                         | 50 µl H <sub>2</sub> O<br>Badana dla każdego okresu narażenia                                                                                                         |
| <b>Kontrola dodatnia</b>            | 50 µl kwasu octowego lodowatego<br>Badana tylko przez 4 godziny                                                  | 50 µl 8N KOH<br>Badana dla każdego okresu narażenia                                                                                                                   | 40 µl 8N KOH<br>Badana tylko przez 1 godzinę                                                                                                                          | 50 µl 8N KOH<br>Badana dla każdego okresu narażenia                                                                                                                   |
| <b>Roztwór MTT</b>                  | 2 ml 0,3 mg/ml                                                                                                   | 300 µl 1 mg/ml                                                                                                                                                        | 300 µl 1 mg/ml                                                                                                                                                        | 300 µl 1 mg/ml                                                                                                                                                        |

| Składowe modelu badania                      | EpiSkin™                                                                                                                                  | EpiDerm™ SCT                                                                                                                    | SkinEthic™ RHE                                                                                                                            | epiCS®                                                                                                                          |
|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Inkubacja MTT narażenia</b>               | 180 min (±15 min) w temperaturze 37 °C, w atmosferze zawierającej 5 % CO <sub>2</sub> i w warunkach względnej wilgotności wynoszącej 95 % | 180 min w temperaturze 37 °C, w atmosferze zawierającej 5 % CO <sub>2</sub> i w warunkach względnej wilgotności wynoszącej 95 % | 180 min (±15 min) w temperaturze 37 °C, w atmosferze zawierającej 5 % CO <sub>2</sub> i w warunkach względnej wilgotności wynoszącej 95 % | 180 min w temperaturze 37 °C, w atmosferze zawierającej 5 % CO <sub>2</sub> i w warunkach względnej wilgotności wynoszącej 95 % |
| <b>Ekstrahent</b>                            | 500 µl zakwaszonego izopropanolu (0,04 N HCl w izopropanolu) (całkowicie zanurzona izolowana tkanka)                                      | 2 ml izopropanolu (ekstrakcja z dolnej i górnej części wkładki)                                                                 | 1,5 ml izopropanolu (ekstrakcja z dolnej i górnej części wkładki)                                                                         | 2 ml izopropanolu (ekstrakcja z dolnej i górnej części wkładki)                                                                 |
| <b>Czas trwania i temperatura ekstrakcji</b> | Przez noc w temperaturze pokojowej, chronić przed światłem                                                                                | Bez wstrząsania w temperaturze pokojowej przez noc lub ze wstrząsaniem w temperaturze pokojowej przez 120 min (~120 obr./min)   | Bez wstrząsania w temperaturze pokojowej przez noc lub ze wstrząsaniem w temperaturze pokojowej przez 120 min (~120 obr./min)             | Bez wstrząsania w temperaturze pokojowej przez noc lub ze wstrząsaniem w temperaturze pokojowej przez 120 min (~120 obr./min)   |
| <b>Odczyt OD</b>                             | 570 nm (545–595 nm)<br>bez filtra referencyjnego                                                                                          | 570 nm (lub 540 nm)<br>bez filtra referencyjnego                                                                                | 570 nm (540–600 nm)<br>bez filtra referencyjnego                                                                                          | 540–570 nm<br>bez filtra referencyjnego                                                                                         |
| <b>Kontrola jakości tkanki</b>               | Poddawanie działaniu SDS przez 18 godzin<br>1,0 mg/ml ≤ IC <sub>50</sub> ≤ 3,0 mg/ml                                                      | Poddawanie działaniu 1 % Tritonu X-100<br>4,08 godz. ≤ ET <sub>50</sub> ≤ 8,7 godz.                                             | Poddawanie działaniu 1 % Tritonu X-100<br>4,0 godz. ≤ ET <sub>50</sub> ≤ 10,0 godz.                                                       | Poddawanie działaniu 1 % Tritonu X-100<br>2,0 godz. ≤ ET <sub>50</sub> ≤ 7,0 godz.                                              |

| Składowe modelu badania  | EpiSkin™                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | EpiDerm™ SCT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | SkinEthic™ RHE                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | epiCS®                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|--------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Kryteria dopuszczalności | <p>1. Średnia wartość OD kontrprób tkanek poddanych działaniu kontroli ujemnej (NaCl) dla każdego okresu narażenia powinna być <math>\geq 0,6</math> i <math>\leq 1,5</math></p> <p>2. Średnia żywotność kontrprób tkanek poddawanych narażeniu przez 4 godziny z kontrolą dodatnią (kwas octowy lodowaty) wyrażona jako odsetek kontroli dodatnich powinna być <math>\leq 20\%</math></p> <p>3. W zakresie żywotności 20–100 % oraz dla wartości OD <math>\geq 0,3</math> różnica między dwiema kontrpróbami tkanek nie powinna przekraczać 30 %</p> | <p>1. Średnia wartość OD kontrprób tkanek poddanych działaniu kontroli ujemnej (H<sub>2</sub>O) dla każdego okresu narażenia powinna wynosić <math>\geq 0,8</math> i <math>\leq 2,8</math></p> <p>2. Średnia żywotność kontrprób tkanek poddawanych narażeniu przez 1 godzinę za pomocą kontroli dodatniej (8N KOH) wyrażona jako odsetek kontroli dodatnich powinna wynosić <math>&lt; 15\%</math></p> <p>3. W zakresie żywotności 20–100 % współczynnik zmienności między kontrpróbami tkanek powinien wynosić <math>\leq 30\%</math></p> | <p>1. Średnia wartość OD kontrprób tkanek poddanych działaniu kontroli ujemnej (H<sub>2</sub>O) dla każdego okresu narażenia powinna wynosić <math>\geq 0,8</math> i <math>\leq 3,0</math></p> <p>2. Średnia żywotność kontrprób tkanek poddawanych narażeniu przez 1 godzinę (a w stosownych przypadkach przez 4 godziny) za pomocą kontroli dodatniej (8N KOH) wyrażona jako odsetek kontroli dodatnich powinna wynosić <math>&lt; 15\%</math></p> <p>3. W zakresie żywotności 20–100 % oraz dla wartości OD <math>\geq 0,3</math>, różnica między dwiema kontrpróbami tkanek nie powinna przekraczać 30 %</p> | <p>1. Średnia wartość OD kontrprób tkanek poddanych działaniu kontroli ujemnej (H<sub>2</sub>O) dla każdego okresu narażenia powinna wynosić <math>\geq 0,8</math> i <math>\leq 2,8</math></p> <p>2. Średnia żywotność kontrprób tkanek poddawanych narażeniu przez 1 godzinę za pomocą kontroli dodatniej (8N KOH) wyrażona jako odsetek kontroli dodatnich powinna wynosić <math>&lt; 20\%</math></p> <p>3. W zakresie żywotności 20–100 % oraz dla wartości OD <math>\geq 0,3</math>, różnica między dwiema kontrpróbami tkanek nie powinna przekraczać 30 %</p> |

### Dodatek 3

#### **EFEKTYWNOŚĆ MODELI BADAŃ POD WZGLĘDEM SUBKATEGORYZACJI**

Poniższa tabela przedstawia efektywność czterech modeli badań, którą obliczono na podstawie zestawu 80 substancji chemicznych badanych przez czterech producentów badań. Sekretariat OECD dokonał obliczeń, a podgrupa ekspertów przeprowadziła ich przegląd oraz je zatwierdziła (21) (23).

Modele badań EpiSkin™, EpiDerm™, SkinEthic™ oraz epiCS® można dzielić na subkategorie (np. 1A a 1B oraz 1C a kontrola ujemna).

Efektywność, wskaźniki nadmiernej klasyfikacji, wskaźniki niedostatecznej klasyfikacji oraz dokładność (zdolność predykcyjną) czterech modeli badań badano na podstawie zestawu 80 substancji chemicznych; wszystkie substancje badano w 2 lub 3 seriach badawczych dla każdego modelu badania:

| <b>STATYSTYKI DOTYCZĄCE PROGNOZ UZYSKANYCH W ODNIESIENIU DO CAŁEGO ZESTAWU SUBSTANCJI CHEMICZNYCH</b><br>(n = 80 substancji chemicznych badanych w 2 niezależnych seriach badawczych w odniesieniu do epiCS® lub na 3 niezależnych seriach badawczych w odniesieniu do EpiDerm™ SCT, EpiSkin™ oraz SkinEthic™ RHE, np. odpowiednio 159* lub 240 klasyfikacji)<br><small>*ze względu na brak dostępności jedna substancja chemiczna jednokrotnie zbadano w epiCS® (23)</small> |               |               |               |               |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | EpiSkin™      | EpiDerm™      | SkinEthic™    | epiCS®        |
| <b>Zmiana klasyfikacji na wyższą:</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |               |               |               |               |
| klasyfikacja 1A zmieniona na 1B i 1C                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 21,50 %       | 29,0 %        | 31,2 %        | 32,8 %        |
| klasyfikacja 1B i 1C przeklasyfikowane na                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 20,7 %        | 23,4 %        | 27,0 %        | 28,4 %        |
| klasyfikacja 1A zmieniona na kontrolę ujemną                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 0,00 %        | 2,7 %         | 0,0 %         | 0,00 %        |
| przeklasyfikowana korekta                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 20,7 %        | 26,1 %        | 27,0 %        | 28,4 %        |
| <b>Ogólny wskaźnik zmian klasyfikacji (we</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | <b>17,9 %</b> | <b>23,3 %</b> | <b>24,5 %</b> | <b>25,8 %</b> |
| <b>Zmiana klasyfikacji na niższą:</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |               |               |               |               |
| klasyfikacja 1B i 1C zmieniona na 1A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 16,7 %        | 16,7 %        | 16,7 %        | 12,5 %        |
| klasyfikacja kontroli ujemnej zmieniona na 1A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 0,00 %        | 0,00 %        | 0,00 %        | 0,00 %        |
| klasyfikacja kontroli ujemnej zmieniona na 1B                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 2,2 %         | 0,00 %        | 7,5 %         | 6,6 %         |
| <b>Ogólny wskaźnik zmian klasyfikacji na niższą</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | <b>3,3 %</b>  | <b>2,5 %</b>  | <b>5,4 %</b>  | <b>4,4 %</b>  |
| <b>Klasyfikacje poprawne:</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |               |               |               |               |
| Poprawna klasyfikacja 1A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 83,3 %        | 83,3 %        | 83,3 %        | 87,5 %        |

|                                        |               |               |             |               |
|----------------------------------------|---------------|---------------|-------------|---------------|
| Poprawna klasyfikacja 1B i 1C          | 76,3 %        | 71,0 %        | 61,3 %      | 60,7 %        |
| Poprawna klasyfikacja kontroli ujemnej | 79,3 %        | 73,9 %        | 73,0 %      | 71,62 %       |
| <b>Ogólna dokładność</b>               | <b>78,8 %</b> | <b>74,2 %</b> | <b>70 %</b> | <b>69,8 %</b> |

NC: Substancja niezrąca

#### **Dodatek 4**

Kluczowe parametry i kryteria dopuszczalności systemu spektrofotometrycznego HPLC/UPLC do pomiaru formazanu MTT pobranego z tkanki RhE.

| <b>Parametr</b>                                                                      | <b>Protokół wyprowadzony z Wytycznej FDA (37) (38)</b>                                                                                                                                                                                                                               | <b>Kryteria dopuszczalności</b>                                                                                                                                          |
|--------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Selektywność                                                                         | Analiza izopropanolu, ślepej próby z żywymi tkankami (izopropanolu pobranego z żyjących tkanek RhE niepoddanych działaniu jakichkolwiek substancji), ślepej próby z martwymi tkankami (izopropanolu pobranego z martwych tkanek RhE niepoddanych działaniu jakichkolwiek substancji) | $\text{Obszar}_{\text{interferencja}} \leq 20 \%$<br>$\text{Obszar}_{\text{LLOQ}}^1$                                                                                     |
| Precyzja                                                                             | Kontrole jakości (tj. formazan MTT w stężeniu 1,6 µg/ml, 16 µg/ml oraz 160 µg/ml) w izopropanolu (n = 5)                                                                                                                                                                             | $\text{CV} \leq 15 \%$ lub $\leq 20 \%$ w odniesieniu do LLOQ                                                                                                            |
| Dokładność                                                                           | Kontrole jakości w izopropanolu (n = 5)                                                                                                                                                                                                                                              | $\% \text{ Dev} \leq 15 \%$ lub $\leq 20 \%$ w odniesieniu do LLOQ                                                                                                       |
| Efekt matrycy                                                                        | Kontrole jakości na żywej ślepej próbce (n = 5)                                                                                                                                                                                                                                      | $85 \% \leq \text{efekt macierzysty} \leq 115 \%$                                                                                                                        |
| Środek przeniesiony                                                                  | Analiza izopropanolu według normy ULOQ <sup>2</sup>                                                                                                                                                                                                                                  | $\text{Obszar}_{\text{interferencja}} \leq 20 \%$<br>$\text{Obszar}_{\text{LLOQ}}$                                                                                       |
| Odtwarzalność (śróddzienna)                                                          | 3 niezależne krzywe wzorcowe (na podstawie 6 kolejnych roztworów 1/3 formazanu MTT w izopropanolu, poczynając od ULOQ, np. 200 µg/ml);<br>Kontrole jakości w izopropanolu (n = 5)                                                                                                    | Krzywe kalibracyjne: $\% \text{ Dev} \leq 15 \%$ lub $\leq 20 \%$ w odniesieniu do LLOQ<br><br>Kontrole jakości: $\% \text{ Dev} \leq 15 \%$ oraz $\text{CV} \leq 15 \%$ |
| Odtwarzalność (między kolejnymi dniami)                                              | Dzień 1: 1 krzywa wzorcowa oraz kontrole jakości w izopropanolu (n = 3)                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                          |
|                                                                                      | Dzień 2: 1 krzywa wzorcowa oraz kontrole jakości w izopropanolu (n = 3)                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                          |
|                                                                                      | Dzień 3: 1 krzywa wzorcowa oraz kontrole jakości w izopropanolu (n = 3)                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                          |
| Krótkookresowa stabilność formazanu MTT w ekstrakcie tkankowym RhE                   | Kontrole jakości na żywej ślepej próbce (n = 3) analizowane w dniu przygotowania oraz po 24 godzinach składowania w temperaturze pokojowej                                                                                                                                           | $\% \text{ Dev} \leq 15 \%$                                                                                                                                              |
| W razie potrzeby – długookresowa stabilność formazanu MTT w ekstrakcie tkankowym RhE | Kontrole jakości w żywej ślepej próbce (n = 3) analizowane w dniu przygotowania oraz po kilku dniach przechowywania w określonej temperaturze (np. 4 °C, -20 °C, -80 °C)                                                                                                             | $\% \text{ Dev} \leq 15 \%$                                                                                                                                              |

1LLOQ: Dolna granica oznaczalności określona tak, by obejmowała 1-2 % żywotności tkanek, tj. 0,8 µg/ml.

2ULOQ: Górna granica oznaczalności określona tak, by była co najmniej dwukrotnie wyższa niż najwyższe oczekiwane stężenie formazanu MTT w ekstraktach izopropanolu z kontroli ujemnych 200 µg/ml.,,;

7) w części B rozdział B.46 otrzymuje brzmienie:

## **„B.46 BADANIE DZIAŁANIA DRAŻNIĄCEGO NA SKÓRĘ *IN VITRO*: METODA BADANIA Z UŻYCIEM ZREKONSTRUOWANEGO LUDZKIEGO NASKÓRKA**

### **WPROWADZENIE**

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD (TG) nr 439 (2015). Działanie drażniące na skórę oznacza powodowanie odwracalnego uszkodzenia skóry w wyniku nałożenia na skórę badanej substancji chemicznej na okres do 4 godzin [zgodnie z definicją Globalnie Zharmonizowanego Systemu Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów (GHS) Organizacji Narodów Zjednoczonych (ONZ)] (1) i z unijnym rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin (rozporządzenie CLP)<sup>1</sup>. Niniejsza metoda badawcza obejmuje procedurę *in vitro*, która może być wykorzystywana do identyfikacji zagrożeń w przypadku drażniących chemikaliów (substancji i mieszanin) zgodnie z GHS ONZ i rozporządzeniem CLP kategorii 2 (2). W regionach, które nie przyjęły fakultatywnej kategorii 3 GHS ONZ (lekko drażniące), niniejsza metoda badawcza może być wykorzystywana również w celu zidentyfikowania chemikaliów niezakwalifikowanych do żadnej kategorii. Dlatego w zależności od ram regulacyjnych oraz wykorzystywanego systemu klasyfikacji, niniejszą metodę badawczą można wykorzystać do ustalenia drażliwości na skórę substancji chemicznych na podstawie samodzielnego badania zastępczego dla badania działania drażniącego na skórę metodą *in vivo* lub na podstawie częściowego zastąpienia badania w strategii badań (3).
2. Ocena podrażnień skóry wiązała się zwykle z wykorzystaniem zwierząt laboratoryjnych [metoda badawcza B.4 równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD (TG) nr 404 pierwotnie przyjętej w 1981 r. i zmienionej w latach 1992, 2002 i 2015] (4). Jeżeli chodzi o badanie niszczenia skóry, przyjęto trzy zweryfikowane metody badawcze *in vitro*, tj. metodę badawczą OECD B.40 (równoważną metodzie badawczej OECD nr 430), metodę badawczą B.40bis (równoważną metodzie badawczej nr 431) oraz metodę badawczą B.65 (równoważną metodzie badawczej OECD nr 435) (5)(6)(7). W wytycznych OECD dotyczących zintegrowanego podejścia do badań i oceny (IATA)

---

<sup>1</sup> Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniające i uchylające dyrektywy 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1907/2006, Dz.U. L 353 z 31.12.2008, s. 1.

w odniesieniu do działania żrącego i drażniącego na skórę opisano szereg modułów, które grupują źródła informacji i narzędzia analizy oraz zapewniono wytyczne dotyczące tego, (i) w jaki sposób zintegrować i wykorzystać istniejące dane dotyczące badań i inne dane do oceny potencjalnego działania żrącego i drażniącego na skórę substancji chemicznych oraz (ii) zaproponowano podejście, w przypadku gdy potrzebne są dalsze badania (3).

3. Niniejsza metoda badawcza odnosi się do działania drażniącego na skórę ludzką. Jej podstawę stanowi układ badawczy *in vitro* zrekonstruowanego ludzkiego naskórka (RhE), który dokładnie imituje biochemiczne i fizjologiczne właściwości górnych warstw ludzkiej skóry, tj. naskórka. Układ badawczy RhE jako źródło komórek do rekonstrukcji modelu naskórka z reprezentatywną histologią i cytoarchitekturą wykorzystuje nieprzetworzone keratynocyty pochodzenia ludzkiego. Zgodnie z zasadami wytycznej OECD nr 34 (8)(9), standardy wykonywania badań dostępne są po to, aby ułatwić walidację oraz ocenę podobnych i zmienionych metod badawczych opartych o RhE. Odpowiadającą wytyczną dotyczącą badań przyjęto pierwotnie w 2010 r., zaktualizowano w 2013 r., aby zawrzeć w niej dodatkowe modele RhE i w 2015 r., by odnieść się do wytycznych IATA oraz wprowadzić wykorzystanie alternatywnej procedury pomiaru żywotności.
4. Wstępną walidację, optymalizację oraz badania walidacyjne ukończono w odniesieniu do czterech dostępnych na rynku modeli badania *in vitro* (10)(11)(12)(13)(14)(15)(16)(17)(18)(19)(20)(21)(22)(23)(24)(25)(26)(27)(28) opartych na układzie badawczym RhE (o czułości 80 %, specyficzności 70 % oraz dokładności 75 %). Te cztery modele badania zawarto w niniejszej wytycznej dotyczącej badań i wykazano w dodatku 2, który zawiera także informacje dotyczące rodzaju badania walidacyjnego wykorzystanego do zatwierdzania odpowiednich metod badawczych. Zwalidowaną metodę referencyjną, jak zauważono w dodatku 2, wykorzystano do rozwoju obecnej metody badawczej oraz standardów wykonywania badań (8).
5. Wzajemne uznawanie danych OECD będzie możliwe wyłącznie w przypadku modeli badania zweryfikowanych zgodnie ze standardami wykonywania badań (8), pod warunkiem że OECD dokonał ich przeglądu oraz je zatwierdził. Modele badań objęte niniejszą metodą badawczą oraz odpowiadającą wytyczną OECD dotyczącą badań można wykorzystywać bez wyjątku, by spełnić wymagania państw dotyczące wyników badań metod badawczych *in vitro* w odniesieniu do podrażnień skóry, korzystając jednocześnie z wzajemnego uznawania danych.
6. Definicje pojęć użytych w tym dokumencie znajdują się w dodatku 1.

## **ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA**

7. Ograniczeniem niniejszej metody badawczej, jak wykazano w pełnym prospektywnym badaniu walidacyjnym oceniającym i charakteryzującym metody badawcze RhE (16), jest



to, że nie umożliwia ono klasyfikacji substancji chemicznych do opcjonalnej kategorii 3 GHS ONZ (lekko drażniące) (1). Obowiązujące ramy regulacyjne określają zatem sposób, w jaki w państwach członkowskich będzie się stosować niniejszą metodę badawczą określaną. W przypadku UE kategorii 3 nie uwzględniono w CLP. Aby dokonać pełnej oceny miejscowego działania na skórę po pojedynczym narażeniu przez skórę, należy zapoznać się z wytycznymi OECD dotyczącymi zintegrowanych podejść do badań i oceny (3). Uznaje się, że zastosowanie ludzkiej skóry podlega krajowym i międzynarodowym zastrzeżeniom i warunkom etycznym.

8. Niniejsza metoda badawcza odnosi się do działania drażniącego na skórę ludzką. Pomimo że niniejsza metoda badawcza nie zapewnia wystarczających informacji na temat działania żrącego na skórę, należy zauważyć, że metoda badawcza B.40bis (która jest równoważna wytycznej OECD dotyczącej badań nr 431) dotycząca działania żrącego na skórę opiera się również na tym samym układzie badawczym z RhE, choć z wykorzystaniem innego protokołu (6). Niniejsza metoda badawcza opiera się na modelach RhE wykorzystujących ludzkie keratynocyty, które w związku z tym w badaniach *in vitro* pełnią rolę docelowego narządu u docelowego gatunku. Ponadto bezpośrednio obejmuje ona pierwszy etap kaskady zapalnej/mechanizmu działania (uszkodzenia komórki i tkanki dające w wyniku miejscowy uraz), które występuje podczas podrażnienia skóry *in vivo*. W ramach walidacji leżącej u podstaw niniejszej metody badawczej zbadano szeroką gamę chemikaliów, a baza danych badań walidacyjnych wyniosła ogółem 58 chemikaliów (16) (18) (23). Metoda badawcza ma zastosowanie do ciał stałych, półstałych, cieczy, emulsji i wosków. Ciecze mogą być wodne lub niewodne; substancje stałe mogą być rozpuszczalne lub nierozpuszczalne w wodzie. W miarę możliwości substancje stałe należy przed zastosowaniem zmielić na drobnoziarnisty proszek; żadna inna wstępna obróbka próbki nie jest wymagana. Gazów i aerozoli nie oceniano jeszcze w badaniach walidacyjnych (29). Chociaż nie można wykluczyć, że da się je badać z wykorzystaniem technologii RhE, niniejsza metoda badawcza nie pozwala na badanie gazów i aerozoli.
9. Przed zastosowaniem przedmiotowej metody badawczej z użyciem mieszaniny w celu zgromadzenia danych na potrzeby założonego celu regulacyjnego należy zastanowić się, czy zastosowanie tej metody może doprowadzić do uzyskania wyników odpowiednich z punktu widzenia tego celu, a jeżeli tak, to dlaczego. Przeprowadzenie takiej analizy nie jest konieczne, jeżeli ustanowiono wymóg regulacyjny dotyczący badania danej mieszaniny. Ze względu jednak na fakt, że mieszaniny obejmują szeroki zakres kategorii i składów oraz że obecnie dostępna jest niewielka ilość informacji na temat badania mieszanin, w przypadkach, w których można przedstawić dowody na brak możliwości zastosowania omawianej metody badawczej w odniesieniu do konkretnej kategorii mieszanin (np. kierując się strategią zaproponowaną przez Eskesa i in., 2012) (30)), metody tej nie należy stosować w odniesieniu do tej konkretnej kategorii mieszanin. Należy postępować z podobną ostrożnością w przypadku, gdy poszczególne klasy

substancji chemicznych lub właściwości fizykochemiczne okazują się być nieodpowiednie dla niniejszej metody badawczej.

10. Badane substancje chemiczne pochłaniające światło w takim samym zakresie, jak formazan MTT, oraz badane substancje chemiczne, które są w stanie bezpośrednio obniżyć zawartość barwnika przyżyciowego MTT (do formazanu MTT), mogą zakłócać pomiary żywotności komórek i w celu korekty wymagać zastosowania przystosowanych kontroli (zob. pkt 28–34).
11. Pojedyncza seria badawcza, w skład której wchodzi trzy kontrpróby tkanek, powinna wystarczyć dla badanej substancji chemicznej, jeśli klasyfikacja jest jednoznaczna. W przypadku wyników granicznych, np. niezgodności powtarzalnych pomiarów lub średniej procentowej żywotności równej  $50 \pm 5\%$ , należy jednak rozważyć przeprowadzenie drugiej serii badawczej, jak również trzeciej w przypadku niezgodności między wynikami dwóch pierwszych serii.

## ZASADA BADANIA

12. Badana substancja chemiczna jest наносzona miejscowo na trójwymiarowy model RhE składający się z niezmienionych keratynocytów naskórka pochodzących od człowieka, które poddano hodowli w celu uzyskania wielowarstwowego, wysoce zróżnicowanego modelu ludzkiego naskórka. Model ten składa się ze zorganizowanych warstw: podstawowej, kolczystej i ziarnistej oraz z wielopoziomowej warstwy rogowej zawierającej struktury blaszkowate utworzone z lipidów wypychanych do przestrzeni międzykomórkowej, analogiczne do struktur stwierdzanych *in vivo*.
13. Sprowokowane chemicznie działanie drażniące na skórę, objawiające się głównie poprzez rumień i obrzęk, jest wynikiem kaskady wydarzeń zaczynającej się od penetracji warstwy rogowej naskórka przez substancję chemiczną, która może doprowadzić do uszkodzenia leżących głębiej warstw keratynocytów. Uszkodzone komórki mogą uwalniać mediatory zapalne lub wywołać kaskadę zapalną, która oddziałuje także na komórki skóry właściwej, zwłaszcza na komórki zrębu i śródbłónka naczyń krwionośnych. To wskutek rozszerzenia i wzrostu przepuszczalności komórek śródbłónka można zaobserwować rumień i obrzęk (29). Metody badawcze oparte na RhE w nieobecności jakiegokolwiek unaczynienia w układzie badawczym *in vitro* mierzą zdarzenia inicjujące mające miejsce w kaskadzie, np. uszkodzenie komórki/tkanki (16)(17), i jako odczyt wykorzystują żywotność komórek.
14. Żywotność komórek w modelach RhE mierzy się metodą enzymatycznej konwersji barwnika przyżyciowego MTT [bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylo-tetrazoliowy, błękit tiazolilowy; numer CAS 298-93-1], w niebieską sól formazanu, którą oznacza się ilościowo po ekstrakcji z tkanek (31). Substancje drażniące identyfikuje się na podstawie ich zdolności do zmniejszenia żywotności komórek poniżej

określonych wartości progowych (tj.  $\leq 50\%$  dla substancji drażniących kategorii 2 Globalnie Zharmonizowanego Systemu Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów / rozporządzenia CLP). W zależności od ram regulacyjnych oraz zastosowania metody badawczej, badane substancje chemiczne, które prowadzą do zachowania żywotności komórek powyżej określonego poziomu progowego, można uznać za niedrażniące (tj.  $> 50\%$  – brak kategorii).

## WYKAZANIE BIEGŁOŚCI

15. Przed przystąpieniem do rutynowego stosowania dowolnego z czterech zweryfikowanych modeli badań zgodnych z niniejszą metodą badawczą (dodatek 2), laboratoria powinny wykazać swoją biegłość techniczną, wykorzystując dziesięć substancji służących do wykazania biegłości wykazanych w tabeli 1. Na przykład w przypadku, gdy wykazana substancja nie jest dostępna, można użyć innej substancji, w odniesieniu do której dostępne są odpowiednie dane porównawcze z badań *in vivo* i *in vitro* (np. z wykazu referencyjnych substancji chemicznych (8)), pod warunkiem zastosowania tych samych kryteriów wyboru, które opisano w tabeli 1. Należy uzasadnić wykorzystanie alternatywnej substancji służącej do wykazania efektywności.
16. W ramach wykazywania efektywności zaleca się, aby użytkownicy sprawdzili właściwości bariery cechujące tkanki po ich otrzymaniu, zgodnie ze wskazaniem producenta modelu RhE. Jest to szczególnie istotne, jeżeli tkanki są wysyłane na duże odległości lub wysyłka trwa długo. Gdy metoda badawcza została z powodzeniem wprowadzona oraz nabyto i wykazano jej efektywność, weryfikacja taka nie będzie konieczna w ramach rutynowej procedury. W przypadku rutynowego zastosowania metody zaleca się jednak, aby w dalszym ciągu oceniać właściwości bariery w regularnych odstępach czasu.

**Tabela 1:** Substancje służące do wykazania biegłości<sup>1</sup>

| Substancja                                                   | NR CAS    | Wynik <i>in vivo</i> <sup>2</sup> | Stan skupienia | Kategoria wg GHS ONZ                                |
|--------------------------------------------------------------|-----------|-----------------------------------|----------------|-----------------------------------------------------|
| <b>SUBSTANCJE NIESKLASYFIKOWANE (brak kategorii GHS ONZ)</b> |           |                                   |                |                                                     |
| kwas 1-naftylooctowy                                         | 86-87-3   | 0                                 | Stały          | Brak kategorii                                      |
| izopropanol                                                  | 67-63-0   | 0,3                               | Ciecz          | Brak kategorii                                      |
| stearynian metylu                                            | 112-61-8  | 1                                 | Stały          | Brak kategorii                                      |
| maślan heptylu                                               | 5870-93-9 | 1,7                               | Ciecz          | Brak kategorii<br>(Opcjonalnie kat. 3) <sup>3</sup> |
| salicylan heksylu                                            | 6259-76-3 | 2                                 | Ciecz          | Brak kategorii<br>(Opcjonalnie kat. 3) <sup>3</sup> |
| <b>SUBSTANCJE SKLASYFIKOWANE (kategoria 2 wg GHS ONZ)</b>    |           |                                   |                |                                                     |
| aldehyd cyklamenu                                            | 103-95-7  | 2,3                               | Ciecz          | Kategoria 2                                         |
| 1-bromoheksan                                                | 111-25-1  | 2,7                               | Ciecz          | Kategoria 2                                         |
| Wodorotlenek potasu (5 %)                                    | 1310-58-3 | 3                                 | Ciecz          | Kategoria 2                                         |

|                                |           |     |       |             |
|--------------------------------|-----------|-----|-------|-------------|
| roztwór wodny)                 |           |     |       |             |
| 1-metylo-3-fenilo-1-piperazyna | 5271-27-2 | 3,3 | Stały | Kategoria 2 |
| heptanal                       | 111-71-7  | 3,4 | Ciecz | Kategoria 2 |

1 Substancje służące do wykazania biegłości stanowią podzbiór substancji wykorzystanych w badaniu walidacyjnym, a ich wybór opiera się na następujących kryteriach; (i) substancje chemiczne są dostępne na rynku; (ii) są reprezentatywne dla pełnego zakresu skali podrażnienia wg Draize'a (od niedrażniących po silnie drażniące); (iii) mają określoną budowę chemiczną; (iv) są reprezentatywne dla funkcjonalności chemicznej wykorzystywanej w procesie walidacji (v) dostarczyły one odtwarzalne wyniki *in vitro* w wielu badaniach oraz laboratoriach; (vi) przewidziano je w sposób prawidłowy metodą *in vitro*, oraz (vii) nie wykazują wysoce toksycznych właściwości (np. nie są rakotwórcze ani toksyczne dla układu rozrodczego) i nie wiążą się z nadmiernymi kosztami usuwania pozostałości.

2 Ocena *in vivo* zgodnie z metodą badawczą B.4 (4).

3 Zgodnie z niniejszą metodą badania opcjonalna kategoria 3 GHS ONZ (lekko drażniące) (1) jest uznawana za brak kategorii.

## PROCEDURA

17. Poniższe stanowi opis składowych i procedur metody badawczej RhE służących ocenie podrażnień skóry (aby zapoznać się z parametrami powiązanymi z każdym modelem badania, zob. również dodatek 3). Dostępne są standardowe procedury operacyjne dla czterech modeli zgodnych z niniejszą metodą badawczą (32)(33)(34)(35).

## ELEMENTY METODY BADAWCZEJ RHE

### Warunki ogólne

18. W celu odtworzenia nabłonka należy użyć niezmiennych keratynocytów pochodzących od człowieka. Pod zachowującą funkcje życiowe warstwą rogową naskórka powinno znajdować się kilka warstw żywych komórek nabłonka (warstwa podstawna, warstwa kolczysta, warstwa ziarnista). Warstwa rogowa naskórka powinna być wielopoziomowa i powinna zawierać lipidy niezbędne do utworzenia czynnościowej bariery na tyle wytrzymałej, aby uniemożliwiała szybkie przenikanie cytotoksycznych wzorcowych substancji chemicznych, np. soli sodowej siarczanu dodecyłu (SDS) lub markera Triton X-100. Funkcję bariery należy wykazać i można ocenić albo poprzez ustalenie stężenia, w którym wzorcowa substancja chemiczna zmniejsza żywotność tkanek o 50 % (IC<sub>50</sub>) po ustalonym czasie narażenia na działanie, albo poprzez ustalenie czasu narażenia na działanie potrzebnego do zmniejszenia żywotności komórek o 50 % (ET<sub>50</sub>) po zastosowaniu wzorcowej substancji chemicznej w określonym, stałym stężeniu. Właściwości izolacyjne modelu RhE powinny zapobiegać przechodzeniu materiału przez warstwę rogową naskórka do żywej tkanki, gdyż w innym razie modelowanie narażenia skóry mogłoby być niewłaściwe. Model RhE nie powinien być skażony bakteriami, wirusami, mykoplazmą ani grzybami.

## Warunki funkcjonalne

### *Żywotność*

19. Testem stosowanym do określenia ilościowego żywotności tkanki jest próba MTT (31). Komórki żywotne wytworu tkankowego RhE mogą zredukować barwnik przyżyciowy MTT do wytrąconego niebieskiego formazanu MTT, który jest później ekstrahowany z komórki przy użyciu izopropanolu (lub podobnego rozpuszczalnika). Gęstość optyczna (OD) samego rozpuszczalnika do ekstrakcji powinna być wystarczająco niska, tj.  $OD < 0,1$ . Ekstrahowany formazan MTT można określić ilościowo, stosując pomiar absorbancji wzorca (OD) albo procedurę spektrofotometrii HPLC/UPLC (36). Użytkownicy modelu RhE powinni zapewnić zgodność każdej partii zastosowanego modelu RhE z określonymi kryteriami kontroli ujemnej. Zakres dopuszczalności (górna i dolna granica) kontroli ujemnej wartości gęstości optycznej (w warunkach metody badania działania drażniącego na skórę) jest określony przez producentów/dostawców modelu RhE. Zakresy dopuszczalności dla czterech zatwierdzonych metod zawartych w niniejszej metodzie badawczej podano w tabeli 2. Użytkownik spektrofotometrii HPLC/UPLC powinien stosować kontrolę ujemną zakresów OD określonych w tabeli 2 jako warunku dopuszczenia kontroli ujemnej. Należy udokumentować stabilność w hodowli (uzyskiwanie podobnych wyników pomiarów żywotności) tkanki poddanej działaniu kontroli ujemnej w badanym okresie narażenia.

**Tabela 2:** Zakresy dopuszczalności dla kontroli ujemnej wartości OD modeli badania zawartych w niniejszej metodzie badawczej

|                                | <b>Dolna granica dopuszczalności</b> | <b>Górna granica dopuszczalności</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> | $\geq 0,7$                           | $\leq 2,5$                           |

### *Funkcja bariery*

20. Warstwa rogowa naskórka i wchodzące w jej skład lipidy powinny być na tyle odporne, aby nie było możliwe szybkie przenikanie przez nie cytotoksycznych wzorcowych substancji chemicznych, np. SDS lub markera Triton X-100, według oceny na podstawie  $IC_{50}$  lub  $ET_{50}$  (tabela 3).

### *Morfologia*

21. Badanie histologiczne modelu RhE należy przeprowadzić z wykazaniem istnienia struktury przypominającej ludzki naskórek (w tym wielopoziomowej warstwy rogowej).

### *Odtwarzalność*

22. Wyniki dodatniej kontroli oraz ujemnych w ramach metody badawczej powinny wykazywać odtwarzalność w czasie.

#### Kontrola jakości (QC)

23. Model RhE należy stosować jedynie w przypadku, gdy producent lub dostawca wykaże, że każda partia wykorzystywanego modelu RhE spełnia określone kryteria zwolnienia do produkcji, spośród których najbardziej istotne są te dotyczące *żywołności* (pkt 19), *funkcji bariery* (pkt 20) i *morfologii* (pkt 21). Dane te powinny być przekazane użytkownikom metody badawczej, tak aby mogli oni uwzględnić tę informację w sprawozdaniu z badania. Zakres dopuszczalności (górną i dolną granicę)  $IC_{50}$  lub  $ET_{50}$  powinien określać producent/dostawca modelu RhE. Do wiarygodnego przewidywania klasy podrażnienia można przyjąć wyłącznie wyniki uzyskane z użyciem zakwalifikowanych tkanek. Zakresy dopuszczalności czterech zweryfikowanych modeli badań zawartych w tej wytycznej dotyczącej badań podano w tabeli 3.

**Tabela 3:** Kryteria zwolnienia serii na podstawie kontroli jakości modeli badania zawartych w niniejszej metodzie badawczej.

|                                                                                   | <b>Dolna granica dopuszczalności</b> | <b>Górną granicę dopuszczalności</b> |
|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| <b>EpiSkin™ (SM)</b><br>(poddawanie działaniu SDS przez 18 godzin) (32)           | $IC_{50} = 1,0$ mg/ml                | $IC_{50} = 3,0$ mg/ml                |
| <b>EpiDerm™ SIT (EPI-200)</b><br>(1 % Triton X-100) (33)                          | $ET_{50} = 4,0$ godziny              | $ET_{50} = 8,7$ godziny              |
| <b>SkinEthic™ RHE</b><br>(1 % Triton X-100) (34)                                  | $ET_{50} = 4,0$ godziny              | $ET_{50} = 10,0$ godziny             |
| <b>LabCyte EPI-MODEL24 SIT</b><br>(poddawanie działaniu SDS przez 18 godzin) (35) | $IC_{50} = 1,4$ mg/ml                | $IC_{50} = 4,0$ mg/ml                |

#### Podawanie badanej i kontrolnej substancji chemicznej

24. Należy użyć co najmniej trzy kontrpróby dla każdej substancji badanej i kontrolnej w każdej serii badawczej. W przypadku płynnych i stałych substancji należy nanieść na skórę dostateczną ilość badanej substancji chemicznej, tak aby równomiernie pokrywała powierzchnię naskórka, unikając jednak nakładania dawki nieskończonej, tj. w zakresie od  $26\text{--}83 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  lub  $\text{mg}/\text{cm}^2$  (zob. dodatek 3). W przypadku stałych substancji chemicznych, przed ich naniesieniem należy zwilżyć powierzchnię naskórka wodą dejonizowaną lub destylowaną w celu polepszenia kontaktu między badaną substancją chemiczną i powierzchnią naskórka. W miarę możliwości substancje stałe powinny być badane w postaci drobnoziarnistego proszku. W niektórych przypadkach przy rozsiewaniu można wspomóc się siatką nylonową (zob. dodatek 3). Pod koniec okresu narażenia substancję badaną należy ostrożnie zmyć z powierzchni skóry roztworem buforowym lub 0,9 % NaCl. W zależności od stosowanego modelu badania RhE, okres narażenia waha

się w zakresie od 15 do 60 minut, a temperatura inkubacji w zakresie od 20 do 37 °C. Te okresy narażenia na działanie i temperatury są dobrane odpowiednio dla każdej z metod badawczych RhE i dla każdego modelu badania reprezentują różne swoiste właściwości (np. funkcję ochronną) (zob. dodatek 3).

25. W każdej serii badawczej należy wykorzystać równoczesną kontrolę ujemną i kontrolę dodatnią (PC), aby wykazać, że żywotność (przy NC), funkcja ochronna i ostateczna czułość tkankowa (przy PC) mieszczą się w dopuszczalnym zakresie zdefiniowanym na podstawie danych historycznych. Proponowana PC to 5 % roztworu wodnego SDS. Zalecanymi substancjami stanowiącymi NC są woda albo sól fizjologiczna buforowana fosforanami (PBS).

### **Pomiary żywotności komórek**

26. W związku z procedurą badawczą najważniejsze jest to, aby pomiar żywotności nie był wykonywany natychmiast po narażeniu na badaną substancję chemiczną, ale po dostatecznie długim okresie inkubacji tkanki przemytej po tej ekspozycji w świeżym podłożu. Ten okres pozwala zarówno na ustąpienie słabych działań cytotoksycznych, jak i na pojawienie się wyraźnych działań cytotoksycznych. Podczas optymalizacji dwóch modeli badania opartych na RhE, leżących u podstaw niniejszej metody badawczej (11)(12)(13)(14)(15), za optymalny okres inkubacji po poddaniu działaniu substancji chemicznej uznano 42 godziny.
27. Test MTT jest uznaną metodą ilościową, którą należy wykorzystywać do pomiarów żywotności komórek w ramach niniejszej metody badawczej. Można ją stosować do badań z użyciem trójwymiarowego wytworu tkankowego. Próbkę tkanki umieszcza się w roztworze MTT o właściwym stężeniu (np. 0,3–1 mg/ml) na 3 godziny. Komórki żywotne przekształcają MTT w niebieski formazan. Wytrącony niebieski produkt formazanowy ekstrahuje się następnie z tkanki przy użyciu rozpuszczalnika (np. izopropanolu, kwaśnego izopropanolu) i mierzy się stężenie formazanu poprzez oznaczenie OD przy długości fali 570 nm, wykorzystując filtr w paśmie maksimum  $\pm 30$  nm lub poprzez wykorzystanie procedury spektrofotometrii HPLC/UPLC (zob. pkt 34) (36).
28. Właściwości optyczne badanej substancji chemicznej lub jej oddziaływanie chemiczne na MTT (np. substancje chemiczne mogą zapobiegać lub odwracać proces wytwarzania barwy, jak również powodować jego powstawanie) powodować interferencję w teście, prowadząc do błędnego oszacowania żywotności. Może tak się zdarzyć w przypadku niecałkowitego usunięcia określonej substancji badanej z tkanki przez przemywanie lub gdy substancja ta przeniknie przez naskórek. Jeśli substancja badana oddziałuje bezpośrednio na MTT (np. reduktor MTT), jest naturalnie barwna lub staje się barwna w trakcie oddziaływania na tkankę, należy zastosować dodatkowe kontrole w celu

wykrycia i skorygowania wpływu substancji badanej na technikę pomiaru żywotności (zob. pkt 29 i 33). Szczegółowy opis korekty bezpośredniej redukcji MTT i zakłóceń przez barwniki jest dostępny w standardowych procedurach operacyjnych dotyczących trzech zatwierdzonych modeli zawartych w niniejszej metodzie badawczej (32)(33)(34)(35).

29. W celu identyfikacji bezpośrednich reduktorów MTT, każdą badaną substancję chemiczną należy dodać do świeżo przygotowanego roztworu MTT. Jeżeli mieszanina MTT zawierająca badaną substancję chemiczną zmieni barwę na niebieską/fioletową, zakłada się, że badana substancja chemiczna bezpośrednio redukuje MTT i należy przeprowadzić pogłębioną kontrolę funkcjonalną nieżywotnych tkanek RhE, stosując niezależnie pomiar absorbancji wzorca (OD) lub procedurę spektrofotometrii HPLC/UPLC. Do tej dodatkowej kontroli funkcjonalnej używa się martwych tkanek, które wykazują jedynie resztkową aktywność metaboliczną, ale wchłaniają badaną substancję chemiczną w podobny sposób jak tkanki żywotne. Każda substancja chemiczna redukująca MTT nanoszona jest na co najmniej dwie kontrpróby martwych tkanek, które przechodzą przez pełną procedurę badawczą, by wygenerować nieswoistą redukcję MTT (NSMTT) (32)(33)(34)(35). Pojedyncza kontrola NSMTT jest wystarczająca w odniesieniu do każdej badanej substancji chemicznej, niezależnie od liczby przeprowadzonych niezależnych badań/serii badawczych. Następnie oblicza się rzeczywistą żywotność jako odsetek żywotności tkanek uzyskany w wyniku narażenia żywych tkanek na działanie reduktora MTT pomniejszony o odsetek nieswoistej redukcji MTT uzyskany w wyniku narażenia martwych tkanek na działanie tego samego reduktora MTT, obliczony relatywnie względem kontroli ujemnej prowadzonej jednocześnie z korygowanym badaniem (%NSMTT).
30. W celu identyfikacji potencjalnego zakłócenia przez barwne badane substancje chemiczne lub przez badane substancje chemiczne, które zabarwiają się w kontakcie z wodą lub izopropanolem, i podjęcia decyzji co do potrzeby dodatkowych kontroli, należy przeprowadzić analizę widmową badanej substancji chemicznej w wodzie (środowisko podczas narażenia) lub izopropanolu (roztwór ekstrakcyjny). Jeżeli w wodzie lub izopropanolu badana substancja chemiczna pochłania światło w zakresie  $570 \pm 30$  nm, należy przeprowadzić pogłębione kontrole z barwnikiem lub, alternatywnie, zastosować procedurę spektrofotometrii HPLC/UPLC, w przypadku której te kontrole nie są wymagane (zob. pkt 33 i 34). Podczas pomiaru absorbancji wzorca każda zakłócająca, barwiona badana substancja chemiczna nanoszona jest na co najmniej dwie kontrpróby żywych tkanek, które w celu uzyskania kontroli o barwie nieswoistej (NSC<sub>living</sub>) podlegają pełnej procedurze badawczej, ale podczas etapu inkubacji z MTT są inkubowane z pożywką zamiast z roztworem MTT. Kontrolę NSC<sub>living</sub> należy przeprowadzać równolegle z badaniem barwionej substancji chemicznej, a w przypadku wielokrotnego badania, niezależną kontrolę NSC<sub>living</sub> należy przeprowadzić podczas każdego wykonanego badania (w każdej serii badawczej) z powodu naturalnej różnorodności biologicznej żywych tkanek. Następnie oblicza się rzeczywistą żywotność jako odsetek żywotności



uzyskany w wyniku narażenia żywych tkanek na działanie zakłócającej, badanej substancji chemicznej i inkubowanych z roztworem MTT pomniejszony o odsetek tkanek nieswoistej barwie uzyskanych w wyniku narażenia żywych tkanek na działanie zakłócającej badanej substancji chemicznej i inkubowanych z pożywką bez udziału MTT, w badaniu prowadzonym jednocześnie z korygowanym badaniem (%NSC<sub>living</sub>).

31. Badane substancje chemiczne, które zidentyfikowano jako powodujące zarówno bezpośrednią redukcję MTT (zob. pkt 29), jak i zakłócenia barwy (zob. pkt 30), będą podczas wykonywania standardowego pomiaru absorbancji (OD) wymagały również trzeciego zestawu kontroli, oprócz kontroli NSMTT i NSC<sub>living</sub> opisanych w poprzednich punktach. Dzieje się tak zazwyczaj w przypadku badanych substancji chemicznych o ciemnym zabarwieniu zakłócających badanie MTT (np. niebieskich, fioletowych, czarnych), ponieważ, jak opisano w pkt 29, ich swoista barwa utrudnia ocenę zdolności do bezpośredniego zmniejszenia MTT. Te badane substancje chemiczne mogą wiązać się zarówno z tkankami martwymi, jak i żywymi, a zatem kontrola NSMTT może nie tylko korygować bezpośrednią redukcję MTT przez badaną substancję chemiczną, ale również zakłócenia barwy wynikające z wiązania się badanej substancji chemicznej z martwymi tkankami. Może to prowadzić do podwójnej korekty zakłóceń koloru, ponieważ kontrola NSC<sub>living</sub> już koryguje zakłócenia barwy wynikające z połączenia badanej substancji chemicznej z żywymi tkankami. Aby uniknąć podwójnej korekty możliwej w przypadku zakłócenia barwy, należy przeprowadzić trzecią kontrolę nieswoistego zabarwienia martwych tkanek (NSC<sub>killed</sub>). W trakcie tej dodatkowej kontroli badana substancja chemiczna nakładana jest na co najmniej dwie kontrpróby martwych kontrprób tkanek na czas narażenia, które podlegają pełnemu badaniu, ale są inkubowane z pożywką zamiast z roztworem MTT w trakcie etapu inkubacji z MTT. Pojedyncza kontrola NSC<sub>killed</sub> jest wystarczająca dla każdej badanej substancji chemicznej, niezależnie od liczby przeprowadzonych niezależnych badań/analiz, lecz powinna być przeprowadzana jednocześnie z kontrolą NSMTT, i o ile to możliwe, z wykorzystaniem tej samej partii tkanki. Następnie oblicza się rzeczywistą żywotność jako odsetek żywotności tkanek uzyskany w wyniku narażenia żywych tkanek na działanie badanej substancji chemicznej pomniejszony o %NSMTT i %NSC<sub>living</sub>, powiększony o odsetek barwy nieswoistej uzyskanej w wyniku narażenia martwych tkanek na zakłócającą badaną substancję chemiczną i inkubowanych w podłożu bez MTT, obliczony relatywnie względem kontroli ujemnej przeprowadzonej jednocześnie z korygowanym badaniem (%NSC<sub>killed</sub>).
32. Należy zauważyć, że nieswoista redukcja MTT i nieswoiste zakłócenia barwy mogą powodować większe odczyty ekstraktu tkankowego powyżej zakresu liniowości spektrofotometru. Na tej podstawie każde laboratorium przed rozpoczęciem badania badanych substancji chemicznych do celów regulacyjnych powinno określić liniowość zakresu spektrofotometru przy użyciu formazanu MTT (CAS # 57360-69-7) pochodzącego ze źródła komercyjnego. Pomiar absorbancji wzorca (OD) z wykorzystaniem

spektrofotometru jest odpowiedni do oceny bezpośrednich reduktorów MTT oraz zakłócających barwę badanych substancji chemicznych, gdy OD ekstraktów tkankowych uzyskanych za pomocą badanej substancji chemicznej bez korekty na bezpośrednią redukcję MTT lub interferencję koloru mieszczą się w liniowym zakresie spektrofotometru lub gdy nieskorygowana procentowa żywotność uzyskana za pomocą badanej substancji chemicznej wynosi już  $\leq 50\%$ . Niemniej jednak wyniki badanych substancji chemicznych wytwarzających  $\%NSMTT$  lub  $\%NSC_{\text{living}} \geq 50\%$  kontroli ujemnej powinny być przyjmowane z ostrożnością, ponieważ jest to granica odcięcia stosowana do odróżnienia substancji chemicznych sklasyfikowanych od niesklasyfikowanych (zob. pkt 36).

33. W przypadku barwionych badanych substancji chemicznych, które nie są zgodne z pomiarem absorbancji wzorca (OD) ze względu na zbyt silną interferencję z testem MTT, można zastosować alternatywną procedurę spektrofotometrii HPLC/UPLC do pomiaru formazanu MTT (zob. pkt 34) (36). System spektrofotometrii HPLC/UPLC pozwala na rozdzielenie formazanu MTT od badanej substancji chemicznej przed jej oznaczeniem ilościowym (36). Z tego powodu kontrole  $NSC_{\text{living}}$  lub  $NSC_{\text{killed}}$  nie są nigdy wymagane, gdy wykorzystuje się spektrofotometrię HPLC/UPLC, niezależnie od badanej substancji chemicznej. Kontrole  $NSMTT$  powinny być jednak stosowane, jeżeli istnieje podejrzenie, że badana substancja chemiczna bezpośrednio redukuje MTT lub zabarwia się, który utrudnia ocenę zdolności do bezpośredniego zmniejszenia MTT (jak opisano w pkt 29). W przypadku stosowania spektrofotometrii HPLC/UPLC do pomiaru formazanu MTT procent żywotności tkanek oblicza się jako procent MTT powierzchni pików formazanu uzyskanej z żywych tkanek poddanych działaniu badanej substancji chemicznej w stosunku do pików formazanu MTT uzyskanego przy równoczesnej kontroli ujemnej. W przypadku badanych substancji chemicznych zdolnych do bezpośredniego obniżenia MTT rzeczywistą żywotność tkanek oblicza się jako odsetek żywotności tkanek uzyskanych w wyniku narażenia żywych tkanek na działanie badanej substancji chemicznej minus  $\%NSMTT$ . Na koniec należy zauważyć, że bezpośrednie reduktory MTT, mogące również zakłócać barwę, które są zatrzymywane w tkankach po obróbce i zmniejszają MTT tak mocno, że prowadzą do OD (przy użyciu standardowego pomiaru OD) lub obszarów pików (wykorzystując spektrofotometrię UPLC/HPLC) badanych ekstraktów tkankowych, które wykraczają poza zakres liniowości spektrofotometru, nie można ocenić, chociaż oczekuje się, że będą występować tylko w bardzo rzadkich sytuacjach.
34. Spektrofotometria HPLC/UPLC może być również stosowana ze wszystkimi rodzajami badanych substancji chemicznych (barwnych, bezbarwnych, reduktorów MTT i substancji nieredukujących MTT) do pomiaru formazanu MTT (36). Z powodu zróżnicowania systemów spektrofotometrii HPLC/UPLC, należy wykazać kwalifikację systemu spektrofotometrii HPLC/UPLC przed jego zastosowaniem, aby określić ilościowo formazan MTT z ekstraktów tkankowych poprzez spełnienie kryteriów dopuszczalności

zestawu standardowych parametrów kwalifikacyjnych w oparciu na kryteriach opisanych w wytycznych Agencji Żywności i Leków Stanów Zjednoczonych dotyczących przemysłu walidacji metodą bioanalityczną (36)(37). Te kluczowe parametry i kryteria ich dopuszczalności przedstawiono w dodatku 4. Po spełnieniu kryteriów dopuszczalności określonych w dodatku 4, system spektrofotometrii HPLC/UPLC uznaje się za kwalifikowany i gotowy do pomiaru formazanu MTT w warunkach doświadczalnych opisanych w niniejszej metodzie badawczej.

### **Kryteria dopuszczalności**

35. Dla każdej metody badawczej z zastosowaniem zwalidowanych serii RhE (zob. pkt 23) tkanki poddane działaniu kontroli ujemnej powinny wykazywać OD odpowiednią do jakości tkanek poddanych wszystkim etapom wysyłki i odbioru oraz wszystkim procesom protokołu badania. Wartości OD kontroli nie powinny być niższe niż dolne granice zdefiniowane na podstawie danych historycznych. Podobnie tkanki poddane działaniu PC, tj. 5 % uwodnionego SDS, powinny odzwierciedlać zdolność do reagowania na drażniącą substancję chemiczną w warunkach metody badawczej (zob. dodatek 3 oraz dalsze informacje na temat standardowych procedur operacyjnych czterech modeli badań zawartych w niniejszej wytycznej dotyczącej badań (32)(33)(34)(35)). Powiązane i właściwe miary zmienności między kontrpróbami tkanek, tj. odchylenia standardowe (SD) powinny mieścić się w granicach akceptowalnych ustalonych dla stosowanego modelu badania (zob. dodatek 3).

### **Interpretacja wyników i model prognozowania**

36. Wartości OD uzyskane dla każdej badanej substancji chemicznej można wykorzystać do obliczenia procentowej żywotności znormalizowanej w odniesieniu do kontroli ujemnej, której żywotność ustala się na 100 %. W przypadku spektrofotometrii HPLC/UPLC do pomiaru formazanu MTT, procent żywotności tkanek oblicza się jako procent MTT powierzchni piku formazanu uzyskanej z żywych tkanek poddanych działaniu badanej substancji chemicznej w stosunku do piku formazanu MTT uzyskanego przy jednoczesnej kontroli ujemnej. Należy wyraźnie zdefiniować i udokumentować wartość odcięcia procentowej żywotności komórek, odróżniając drażniące substancje badane od niesklasyfikowanych substancji badanych, oraz procedury statystyczne stosowane do oceny wyników i identyfikacji substancji drażniących; należy również udowodnić, że są one właściwe (aby uzyskać więcej informacji zob. standardowe procedury operacyjne modeli badania). Wartości odcięcia do predykcji działania drażniącego są podane poniżej:

- Badaną substancję chemiczną określa się jako „wymagającą klasyfikacji i oznakowania w związku z ONZ GHS/CLP (kategorią 2 lub 1)”, jeżeli średni odsetek żywotności tkanek po narażeniu i inkubacji po poddaniu działaniu substancji jest mniejszy bądź równy ( $\leq$ ) 50 %. Ponieważ modeli badań RhE objętych niniejszą metodą badawczą nie można rozdzielać między kategoriami ONZ GHS/CLP 1 i 2, do podjęcia decyzji w sprawie

ostatecznej kwalifikacji wymagane będą dalsze informacje dotyczące działania żrącego na skórę [zob. również wytyczne OECD w sprawie IATA (3)]. W przypadku gdy badana substancja chemiczna zostanie uznana za nieżrącą (np. na podstawie metody badawczej 40, B.40bis lub B.65) oraz po narażeniu i okresie inkubacji po poddaniu działaniu substancji chemicznej wykazuje żywotność tkanek mniejszą niż 50 % lub równą ( $\leq$ ) zgodnie z GHS ONZ / kategorią 2 wg rozporządzenia CLP badaną substancję chemiczną uznaje się za drażniącą dla skóry.

- W zależności od ram regulacyjnych obowiązujących w państwach członkowskich, zgodnie z GHS ONZ / rozporządzeniem CLP, brak kategorii badaną substancję chemiczną można uznać za niedrażniącą dla skóry jeśli żywotność tkanek po narażeniu i okresie inkubacji po poddaniu działaniu substancji chemicznej wynosi ponad ( $>$ ) 50 %.

## **DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ**

### **Dane**

37. Dla każdej serii badawczej należy przedstawić w formie tabelarycznej, z uwzględnieniem w stosownych przypadkach danych z powtórzeń eksperymentu, dane z poszczególnych kontrprób tkanek (np. dane dotyczące wartości OD i obliczonej procentowej żywotności komórek dla każdej substancji badanej, łącznie z klasyfikacją). Ponadto należy zgłosić średnie  $\pm$  odchylenie standardowe dla każdej serii badawczej. W odniesieniu do każdej substancji badanej należy zgłosić zaobserwowane interakcje z odczynnikiem MTT i z barwnymi substancjami badanymi.

### **Sprawozdanie z badania**

38. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

#### *Badane i kontrolne substancje chemiczne:*

- Substancja jednoskładnikowa: dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa IUPAC lub CAS, numer CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny, czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń, stosownie do przypadku i jeśli jest to praktycznie wykonalne itp.,
- substancja wieloskładnikowa, UVCB i mieszanina: opisana w miarę możliwości przez podanie nazwy chemicznej (zob. powyżej), określenie ilości oraz istotnych właściwości fizykochemicznych składników,
- wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie i wszelkie dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne,
- źródło, numer partii (jeżeli dostępny),
- postępowanie z badanymi/kontrolnymi substancjami chemicznymi przed rozpoczęciem badań, w stosownych przypadkach (np. podgrzewanie, mielenie),

- stabilność badanej substancji chemicznej, termin przydatności lub data ponownej analizy, jeżeli są znane,
- warunki przechowywania.

Zastosowany model i protokół RhE (oraz uzasadnienie wyboru w stosownych przypadkach)

*Warunki badania:*

- zastosowany model RhE (w tym numer partii),
- informacje na temat wzorcowania urządzenia pomiarowego (np. spektrofotometru), długość fali i filtr środkowoprzepustowy (w stosownych przypadkach) stosowany do określenia ilościowego formazanu MTT oraz zakres liniowości urządzenia pomiarowego; opis metody wykorzystanej do oceny ilościowej formazanu MTT,
- opis dopuszczalności systemu spektrofotometrycznego HPLC/UPLC, w stosownych przypadkach; pełne informacje podstawowe na temat stosowanego modelu RhE, z uwzględnieniem jego efektywności. Powinno to między innymi obejmować:
  - i) żywotność;
  - ii) funkcję bariery;
  - iii) morfologię;
  - iv) odtwarzalność i predykcję;
  - v) kontrole jakości (QC) modelu,
- odniesienie do danych historycznych modelu. Powinno to między innymi obejmować dopuszczalność danych QC z odwołaniem do danych dotyczących serii historycznych,
- wykazanie biegłości w stosowaniu metody badawczej przed rutynowym użyciem w drodze badania substancji służących do wykazania biegłości.

*Procedura badawcza:*

- szczegóły wykorzystanej procedury badania (w tym procedury mycia sprzętu stosowane po okresie narażenia), dawki wykorzystanych badanych substancji chemicznych i zastosowane próby kontroli,
- czas trwania i temperatura okresu inkubacji w trakcie narażenia i po jego zakończeniu,
- wskazanie prób kontroli używanych w odniesieniu do bezpośrednich reduktorów MTT lub badanych substancji chemicznych, które w wyniku reakcji przechodzą w barwny produkt, w stosownych przypadkach,
- liczba kontrprób tkanek wykorzystanych na badaną substancję chemiczną i próbę kontroli (PC, kontrola ujemna oraz NSMTT, NSC<sub>living</sub> i NSC<sub>killed</sub>, w stosownych przypadkach),

- opis zastosowanych kryteriów podejmowania decyzji/modelu prognozowania na podstawie wykorzystanego modelu RhE,
- Opis wszelkich modyfikacji w procedurze badawczej (w tym procedurach mycia).

*Kryteria dopuszczalności badania i serii badawczej:*

- średnie wartości oraz zakresy dopuszczalności dodatniej i ujemnej kontroli na podstawie danych historycznych; dopuszczalna zmienność wśród kontrprób tkanek w przypadku dodatniej i ujemnej kontroli,
- dopuszczalna zmienność wśród kontrprób tkanek w przypadku badanej substancji chemicznej.

*Wyniki:*

- tabelaryczne zestawienie danych dotyczących pojedynczych badanych substancji chemicznych dla każdej serii badawczej i każdego powtarzalnego pomiaru, w tym OD lub MTT powierzchni piku formazanu, odsetka żywotności tkanek, średniego odsetka żywotności tkanek i SD,
- w stosownych przypadkach wyniki kontroli używanych w odniesieniu do bezpośrednich reduktorów MTT lub badanych substancji chemicznych, które w wyniku reakcji przechodzą w barwny produkt, w tym OD lub MTT powierzchni piku formazanu, % NSMTT, % NSC<sub>living</sub>, %NSC<sub>killed</sub>, SD, ostateczny właściwy odsetek żywotności tkanek,
- wyniki uzyskane z zastosowaniem badanych substancji chemicznych i kontroli w odniesieniu do określonych kryteriów dopuszczalności badania i serii badawczej,
- opis innych zaobserwowanych skutków,
- ustalona na tej podstawie klasyfikacja w odniesieniu do modelu prognozowania lub zastosowanych kryteriów podejmowania decyzji.

*Omówienie wyników*

*Wnioski*

## BIBLIOGRAFIA

- (1) Organizacja Narodów Zjednoczonych (ONZ), Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów (GHS), wydanie drugie zmienione, ONZ Nowy Jork i Genewa 2013. Dostępne na stronie internetowej:  
[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). *Statement on the Performance under UN GHS of three In Vitro assays for skin irritation testing and the adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM skin irritation Performance Standards*, ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 9 kwietnia 2009. Dostępne na stronie internetowej: [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*, [W:] Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr 203). Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.
- (4) Rozdział B.4 niniejszego załącznika, Ostre działanie drażniące na skórę.
- (5) Rozdział B.40 niniejszego załącznika, *Badanie działania żrącego na skórę in vitro: Test przezskórnej oporności elektrycznej (TER)*.
- (6) Rozdział B.40bis niniejszego załącznika, *Badanie działania żrącego na skórę in vitro: Metoda badawcza z użyciem zrekonstruowanego ludzkiego naskórka*.
- (7) Rozdział B.65 niniejszego załącznika, *Metoda badawcza bariery membranowej 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*. [W:] Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 220. Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.
- (9) OECD (2005). *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*. [W:] Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 34. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.
- (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. i Botham, P. (2001). *A*

*Prevalidation Study on In Vitro Tests for Acute Skin Irritation, Results and Evaluation by the Management Team*, „Toxicol. in Vitro” nr 15, s. 57–93.

- (11) Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C. i 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” nr 16, s. 765–770.
- (12) Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. i Spielmann, H. (2004). *Optimisation of the EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on In Vitro Skin Irritation Tests*, „ALTEX” nr 21, s. 107–114.
- (13) Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. i 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” nr 33, s. 351–367.
- (14) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. i 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” nr 33, s. 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. i 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” nr 30, s. 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. i 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” nr 35, s. 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. i Zuang, V. (2007). *The ECVAM International Validation Study on In Vitro Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals*, „ATLA” nr 35, s. 603–619.
- (19) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonnaud, E. i 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” nr 14, s. 351–358.

- (20) EURL-ECVAM (2007). *Statement on the Validity of In Vitro Tests for Skin Irritation*, ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27 kwietnia 2007. Dostępne na stronie internetowej: [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*. Uwaga: Są to pierwotne PS wykorzystane w celu walidacji dwóch metod badawczych. Nie należy już stosować tych PS, ponieważ obecnie dostępna jest zaktualizowana wersja (8).
- (22) EURL-ECVAM (2008). *Statement on the Scientific Validity of In Vitro Tests for Skin Irritation Testing*, ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC29), 5 listopada 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*. [W:] Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 137, Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.
- (24) Katoh, M., Hamajima, F., Ogasawara, T. i 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*, „Toxicol Sci” nr 34, s. 327–334.
- (25) Katoh, M. i Hata K. (2011). *Refinement of LabCyte EPI-MODEL24 Skin Irritation Test Method for Adaptation to the Requirements of OECD Test Guideline 439*, „AATEX” nr 16, s. 111–122.
- (26) OECD (2011). *Validation Report for the Skin Irritation Test Method Using LabCyte EPI-MODEL24*, [W:] Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr 159). Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.
- (27) OECD (2011). *Peer Review Report of Validation of the Skin Irritation Test Using LabCyte EPI-MODEL24*, [W:] Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr 155). Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

- (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. i Omori, T. (2012). *Validation Study of the In Vitro Skin Irritation Test with the LabCyte EPI-MODEL24*, „Altern Lab Anim” nr 40, s. 33–50.
- (29) Welss, T., Basketter, D.A. i Schröder, K.R. (2004). *In Vitro Skin Irritation: Fact and Future. State of the Art Review of Mechanisms and Models*, „Toxicol. In Vitro” nr 18, s. 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.”nr 62, s. 393–403.
- (31) Mosmann, T. (1983). *Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays*, „J. Immunol. Methods” nr 65, s. 55–63.
- (32) EpiSkin™ (luty 2009). *SOP, Version 1.8ECVAM 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™ (zmienione, marzec 2009), *SOP, Version 7.0, Protocol for: In Vitro EpiDerm™ Skin Irritation Test (EPI-200-SIT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm (EPI-200)*.
- (34) SkinEthic™ RHE SOP (luty 2009) *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 (czerwiec 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., i 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*. Tekst w przygotowaniu.
- (37) US FDA (2001). *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, maj 2001. Dostępne na stronie internetowej: [<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>].

- (38) Harvell, J.D., Lamminstausta, K. i Maibach, H.I. (1995). *Irritant Contact Dermatitis*, [w]: „Practical Contact Dermatitis”, s. 7–18 (red. J.D. Guin). Mc Graw-Hill, Nowy Jork.
- (39) EURL-ECVAM (2009). *Performance Standards for In Vitro Skin Irritation Test Methods Based on Reconstructed Human Epidermis (RhE)*. Uwaga: Jest to obecna wersja PS ECVAM, zaktualizowana w 2009 r. w celu wdrożenia GHS ONZ. Nie należy już stosować tych PS, ponieważ obecnie dostępna jest zaktualizowana wersja (8) odnosząca się do obecnej wytycznej dotyczącej badań.
- (40) EURL-ECVAM (2009). *ESAC Statement on the Performance Standards (PS) for In Vitro Skin Irritation Testing Using Reconstructed Human Epidermis*, ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 8 lipca 2009.
- (41) Komisja Europejska (2001). Dyrektywa Komisji 2001/59/WE z dnia 6 sierpnia 2001 r. dostosowująca do postępu technicznego po raz dwudziesty ósmy dyrektywę Rady 67/548/EWG w sprawie zbliżenia przepisów ustawowych, wykonawczych i administracyjnych, dotyczących klasyfikacji, pakowania i etykietowania substancji niebezpiecznych, Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej L 225, s. 1.

## **Dodatek 1**

### **DEFINICJE**

**Dokładność:** stopień zgodności wyników zastosowanej metody badawczej z przyjętymi wartościami odniesienia. Jest to miara efektywności metody badawczej i jeden z aspektów jej istotności. Pojęcia tego często używa się zamiennie z pojęciem »zgodność« na określenie odsetka prawidłowych wyników uzyskiwanych przy użyciu metody badawczej (9).

**Żywotność komórek:** parametr określający całkowitą aktywność populacji komórek, np. zdolność dehydrogenaz w mitochondriach komórek do obniżenia zawartości barwnika przyżyciowego MTT, (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylo-tetrazoliowy) który, w zależności od pomiaru końcowego i zastosowanego schematu badania odpowiada całkowitej liczbie lub żywotności komórek.

**Substancja chemiczna:** oznacza substancję lub mieszaninę.

**Zgodność:** jest to miara efektywności w odniesieniu do modeli badania, które dają wyniki kategoryczne i jest jednym z aspektów istotności. To określenie jest czasami stosowane wymiennie z określeniem „dokładność”; definiuje się jako odsetek wszystkich badanych substancji chemicznych, które są prawidłowo sklasyfikowane jako dodatnie lub ujemne. Zgodność jest w dużym stopniu uzależniona od przewagi dodatnich wyników w rodzajach badanej substancji chemicznej (9).

**ET<sub>50</sub>:** może być oszacowane przez ustalenie czasu narażenia na działanie potrzebnego do zmniejszenia żywotności komórek o 50 % po zastosowaniu wzorcowej substancji chemicznej w określonym, stałym stężeniu, zob. również IC<sub>50</sub>.

**GHS (Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów Organizacji Narodów Zjednoczonych (ONZ)):** system obejmujący klasyfikację substancji chemicznych (substancji i mieszanin) według znormalizowanych rodzajów i poziomów zagrożeń fizycznych, zdrowotnych i środowiskowych oraz odpowiednie elementy komunikacyjne, takie jak: piktogramy, hasła ostrzegawcze, zwroty wskazujące rodzaj zagrożenia, zwroty wskazujące środki ostrożności i karty charakterystyki, mające informować na temat szkodliwego działania tych substancji chemicznych w celu zapewnienia ochrony ludzi (w tym pracowników, robotników, przewoźników, konsumentów i ratowników) oraz środowiska (1).

**HPLC:** wysokosprawna chromatografia cieczowa.

**IATA:** zintegrowane podejście do badań i oceny

**IC<sub>50</sub>:** może być oszacowane w drodze ustalenia stężenia, w którym wzorcowa substancja chemiczna powoduje zmniejszenie żywotności tkanek o 50 % (IC<sub>50</sub>) po stałym czasie narażenia na działanie, zob. również ET<sub>50</sub>.

**Dawka nieskończona:** ilość substancji badanej nakładana na skórę, przekraczająca ilość

konieczną do całkowitego, jednolitego pokrycia jej powierzchni.

**Mieszanina:** mieszanina lub roztwór, które składają się z co najmniej dwóch substancji.

**Substancja jednoskładnikowa:** substancja zdefiniowana za pomocą jej składu ilościowego, w której jeden główny składnik występuje w stężeniu co najmniej 80 % (w/w).

**MTT:** bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylo-tetrazoliowy MTT.

**Substancja wieloskładnikowa:** substancja zdefiniowana za pomocą jej składu ilościowego, w której więcej niż jeden główny składnik występuje w stężeniu  $\geq 10\%$  (w/w) i  $< 80\%$  (w/w). Substancja wieloskładnikowa powstaje w wyniku procesu wytwarzania. Różnica między mieszaniną a substancją wieloskładnikową polega na tym, że mieszaninę uzyskuje się w wyniku zmieszania co najmniej dwóch substancji, między którymi nie zachodzi reakcja chemiczna. Substancja wieloskładnikowa powstaje w wyniku reakcji chemicznej.

**NSC<sub>killed</sub>:** barwa nieswoista martwych tkanek.

**NSC:** barwa nieswoista żywych tkanek.

**NSMTT:** nieswoista redukcja MTT.

**Standardy wykonywania badań:** normy oparte na zwalidowanej metodzie badania, zapewniające podstawę do oceny porównywalności proponowanej metody badawczej, która jest podobna do metody referencyjnej pod względem mechanistycznym i funkcjonalnym. Uwzględnia się: (i) zasadnicze elementy metody badawczej; (ii) podstawowy wykaz chemicznych substancji odniesienia wybranych spośród substancji chemicznych wykorzystywanych w celu wykazania dopuszczalnej efektywności zwalidowanej metody badania; oraz (iii) podobny poziom dokładności i wiarygodności, na podstawie wyników uzyskanych dla zwalidowanej metody badania, który proponowana metoda badania powinna osiągnąć przy ocenie z wykorzystaniem podstawowego wykazu chemicznych substancji odniesienia (9).

**PC:** Kontrola dodatnia – kontrpróba zawierająca wszystkie składniki układu badawczego, poddana działaniu substancji chemicznej, o której wiadomo, że wywołuje reakcję dodatnią. Aby zapewnić możliwość oceny zmienności reakcji w kontroli dodatniej w czasie, siła reakcji w postaci silnego działania drażniącego nie może być zbyt duża.

**Istotność:** opis powiązania badania z oczekiwanym skutkiem oraz czy jest ono znaczące i użyteczne z punktu widzenia określonego celu. Jest to zakres, w jakim badanie prawidłowo mierzy lub przewiduje biologiczny oczekiwany skutek. Istotność obejmuje uwzględnienie dokładności (zgodności) metody badania (9).

**Wiarygodność:** miary zakresu, w jakim metoda badawcza może być przeprowadzana w sposób odtwarzalny w jednym laboratorium i pomiędzy laboratoriami na przestrzeni czasu w przypadku jej przeprowadzania przy użyciu tego samego protokołu. Ocenia się ją poprzez obliczenie odtwarzalności wewnątrz- i międzylaboratoryjnej (9).

**Badanie zastępcze:** badanie, które ma na celu zastąpienie badania stosowanego rutynowo i zaakceptowanego do identyfikacji zagrożeń i/lub oceny ryzyka i w odniesieniu do którego ustalono, że zapewnia równoważną lub lepszą ochronę zdrowia ludzi lub zwierząt lub środowiska, odpowiednio, w porównaniu z zaakceptowanym badaniem, we wszystkich możliwych warunkach badania i w odniesieniu do wszystkich możliwych chemikaliów (9).

**Seria badawcza:** seria badawcza obejmuje przynajmniej jedną badaną substancję chemiczną, która badana jest równocześnie z kontrolą ujemną i kontrolą dodatnią.

**Czułość:** odsetek wszystkich dodatnich/aktywnych substancji chemicznych prawidłowo sklasyfikowanych w badaniu. Jest to miara dokładności metody badania, która daje wyniki katagoryczne, stanowiąca parametr istotny dla oceny istotności metody badania (9).

**Badanie *in vivo* działania drażniącego na skórę:** powodowanie odwracalnego uszkodzenia skóry w wyniku nałożenia na skórę badanej substancji chemicznej na okres do 4 godzin. Działanie drażniące na skórę jest powstającą miejscowo reakcją badanej tkanki skóry i pojawia się wkrótce po stymulacji (38). Jest ono spowodowane miejscową reakcją zapalną związaną z wrodzoną (nieswoistą) odpowiedzią układu odpornościowego tkanki skóry. Jego główną cechą jest odwracalny proces obejmujący reakcje zapalne oraz większość charakterystycznych objawów klinicznych podrażnienia (rumień, obrzęk, świąd i ból) związanych z procesem zapalnym.

**Swoistość:** odsetek wszystkich negatywnych/nieczynnych badanych chemikaliów prawidłowo sklasyfikowanych w badaniu. Jest to miara dokładności metody badania, która daje wyniki katagoryczne, stanowiąca parametr istotny dla oceny istotności metody badania (9).

**Substancja:** pierwiastek chemiczny i jego związki w stanie naturalnym lub uzyskane w wyniku dowolnego procesu produkcyjnego, w tym wszelkie dodatki konieczne do zachowania trwałości produktu i wszelkie zanieczyszczenia powstałe w wyniku zastosowanego procesu, z wyłączeniem wszelkich rozpuszczalników, które można oddzielić bez wpływu na stabilność substancji i bez zmiany jej składu.

**Badana substancja chemiczna:** dowolna substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

**UPLC:** Ultrawysokosprawna chromatografia cieczowa.

**UVCB:** substancje o nieznanym lub zmiennym składzie, złożone produkty reakcji lub materiały biologiczne.

## Dodatek 2

### MODELE BADANIA UWZGLĘDNIONE W NINIEJSZEJ METODZIE BADAWCZEJ

| N<br>r | Nazwa<br>modelu<br>badania    | Rodzaj badania<br>walidacyjnego                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Źródła                                                                             |
|--------|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| 1      | <b>EpiSkin™</b>               | Pełne prospektywne badanie walidacyjne (2003–2007). Elementy tego modelu zostały wykorzystane do określenia istotnych elementów metody badania pierwotnej i zaktualizowanej ECVAM PS (39)(40)(21)*. Ponadto dane metody odnoszące się do identyfikacji substancji niesklasyfikowanych i sklasyfikowanych stanowiły główną podstawę do określenia swoistości i czułości pierwotnych PS*. | (2)(10)(11)(14)(15)(16)(17)(18)(19)(20)(21)(23)(32)(39)(40)                        |
| 2      | <b>EpiDerm™ SIT (EPI-200)</b> | EpiDerm™ ( <i>pierwotna</i> ): Początkowo model badania przeszedł pełną prospektywną walidację wraz z numerem 1. z lat 2003–2007. Elementy tego modelu zostały wykorzystane do określenia istotnych elementów metod badania pierwotnej i zaktualizowanej ECVAM PS (39)(40)(21)*.<br><b>EpiDerm™ SIT</b>                                                                                 | (2)(10)(12)(13)(15)(16)(17)(18)(20)(21)(23)(33)(39)(40)<br><br>(2)(21)(22)(23)(33) |

|   |                                             |                                                                                                                                                                                                                |                                                                                  |
|---|---------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
|   |                                             | <b>(EPI-200):</b><br>Modyfikacja<br>pierwotnego<br>EpiDerm™ została<br>zweryfikowana<br>przy użyciu<br>pierwotnej<br>ECVAM PS (21)<br>w 2008 r.*                                                               |                                                                                  |
| 3 | <b>SkinEthic™ RHE</b>                       | Badanie<br>walidacyjne na<br>podstawie<br>pierwotnych<br>standardów<br>wykonywania<br>badań ECVAM<br>(21) w 2008 r.*                                                                                           | (2)(21)(22)(23)(31)                                                              |
| 4 | <b>LabCyte<br/>EPI-<br/>MODEL24<br/>SIT</b> | Badanie<br>walidacyjne (2011–<br>2012) na podstawie<br>standardów<br>wykonywania<br>badań (PS)<br>wytycznej<br>dotyczącej badań<br>OECD nr 439 (8)<br>opartych na<br>zaktualizowanej<br>ECVAM PS*<br>(39)(40). | (24)(25)(26)(27)(28)(35)(39) (40) oraz PS tej wytycznej<br>dotyczącej badań (8)* |

\*) Pierwotne standardy wykonywania badań ECVAM (PS) (21) zostały opracowane w 2007 r. po zakończeniu prospektywnego badania walidacyjnego (16), w ramach którego oceniono efektywność modeli badania nr 1 i 2 w odniesieniu do systemu klasyfikacji opisanego w poprawce 28 do dyrektywy UE w sprawie substancji niebezpiecznych (41). W 2008 r. wprowadzono GHS ONZ (1) i unijnego rozporządzenia CLP, skutecznie przesuwając wartość graniczną dla odróżnienia substancji niesklasyfikowanych od substancji sklasyfikowanych z oceny *in vivo* 2,0 do 2,3. Aby dostosować się do tego zmienionego wymogu regulacyjnego, w 2009 r. zaktualizowano wartości dokładności i wykaz chemicznych substancji odniesienia ECVAM PS (2)(39)(40). Podobnie jak pierwotne PS, również uaktualnione PS były w dużej mierze oparte na danych z modeli nr 1 i 2 (16), ale dodatkowo wykorzystywały dane dotyczące chemicznych substancji odniesienia z modelu nr 3. W 2010 r. zaktualizowane ECVAM PS zostały wykorzystane do określenia PS związanych z tą wytyczną dotyczącą badań (8). Dla celów niniejszej metody badawczej EpiSkin™ jest uważany za zwalidowaną metodę referencyjną, ponieważ został wykorzystany do opracowania wszystkich kryteriów PS. Szczegółowe informacje na temat badań walidacyjnych, zestawienie wygenerowanych danych, jak również tło dla niezbędnych dostosowań PS w wyniku wdrożenia GHS ONZ / rozporządzenia CLP można znaleźć w wyjaśniającym dokumencie bazowym ECVAM/BfR do odpowiedniej wytycznej dotyczącej badań OECD nr 439 (23).

SIT: Badanie działania drażniącego na skórę

RHE: Zrekonstruowany ludzki naskórek



### Dodatek 3

#### **PARAMETRY PROTOKOŁU SPECYFICZNE DLA KAŻDEGO Z MODELI BADANIA UWZGLĘDNIONYCH W NINIEJSZEJ METODZIE BADAWCZEJ**

Modele RhE wykazują bardzo podobne protokoły i wszystkie wykorzystują okres po inkubacji o długości 42 godzin (32)(33)(34)(35). Zmiany dotyczą głównie trzech parametrów związanych z różnymi funkcjami ochronnymi modeli badania i wymienionych tutaj: A) czas i objętość inkubacji wstępnej, B) podawanie badanych substancji chemicznych i C) objętość po inkubacji.

|                                                     | <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) Inkubacja wstępna</b>                         |                                  |                                                     |                                   |                                    |
| Czas inkubacji                                      | 18–24 godzin                     | 18–24 godzin                                        | < 2 godzin                        | 15–30 godzin                       |
| Objętość pożywki                                    | 2 ml                             | 0,9 ml                                              | 0,3 lub 1 ml                      | 0,5 ml                             |
| <b>B) Podanie badanej substancji chemicznej</b>     |                                  |                                                     |                                   |                                    |
| Dla cieczy                                          | 10 µl (26 µl/cm²)                | 30 µl (47 µl/cm²)                                   | 16 µl (32 µl/cm²)                 | 25 µl (83 µl/cm²)                  |
| Dla substancji stałych                              | 10 mg (26 mg/cm²)<br>+ DW (5 µl) | 25 mg (39 mg/cm²)<br>+ DPBS (25 µl)                 | 16 mg (32 mg/cm²)<br>+ DW (10 µl) | 25 mg (83 mg/cm²)<br>+ DW (25 µl)  |
| Zastosowanie siatki nylonowej                       | Nie stosuje się                  | W razie potrzeby                                    | Stosuje się                       | Nie stosuje się                    |
| Całkowity czas podawania                            | 15 minut                         | 60 minut                                            | 42 minuty                         | 15 minut                           |
| Temperatura podawania                               | RT                               | a) w RT przez 25 minut<br>b) w 37 °C przez 35 minut | RT                                | RT                                 |
| <b>C) Objętość po inkubacji</b>                     |                                  |                                                     |                                   |                                    |
| Objętość pożywki                                    | 2 ml                             | 0,9 ml x2                                           | 2 ml                              | 1 ml                               |
| <b>D) Maksymalna dopuszczalna zmienność</b>         |                                  |                                                     |                                   |                                    |
| Odchylenie standardowe pomiędzy kontrpróbami tkanek | SD18                             | SD18                                                | SD18                              | SD18                               |

RT: temperatura pokojowa

DW: woda destylowana

DPBS: roztwór chlorku sodu buforowany fosforanami Dulbecco

#### **Dodatek 4**

### **KLUCZOWE PARAMETRY I KRYTERIA DOPUSZCZALNOŚCI SYSTEMU SPEKTROFOTOMETRYCZNEGO HPLC/UPLC DO POMIARU FORMAZANU MTT POBRANEGO Z TKANEK RHE**

| Parametr                                                                             | Protokół wyprowadzony z Wytycznej FDA (36)(37)                                                                                                                                                                                                                                       | Kryteria dopuszczalności                                                                                                                                                                       |
|--------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Selektywność                                                                         | Analiza izopropanolu, ślepej próby z żywymi tkankami (izopropanolu pobranego z żyjących tkanek RhE niepoddanych działaniu jakichkolwiek substancji), ślepej próby z martwymi tkankami (izopropanolu pobranego z martwych tkanek RhE niepoddanych działaniu jakichkolwiek substancji) | $\text{Obszar}_{\text{interferencja}} \leq 20 \% \text{ Obszar}_{\text{LLOQ}}^1$                                                                                                               |
| Precyzja                                                                             | Kontrole jakości (np. formazan MTT przy 1,6 µg/ml, 16 µg/ml oraz 160 µg/ml) w izopropanolu (n = 5)                                                                                                                                                                                   | $\text{CV} \leq 15 \% \text{ lub } \leq 20 \% \text{ w odniesieniu do LLOQ}$                                                                                                                   |
| Dokładność                                                                           | Kontrole jakości w izopropanolu (n = 5)                                                                                                                                                                                                                                              | $\% \text{ Dev} \leq 15 \% \text{ lub } \leq 20 \% \text{ w odniesieniu do LLOQ}$                                                                                                              |
| Efekt matrycy                                                                        | Kontrole jakości na żywej ślepej próbce (n = 5)                                                                                                                                                                                                                                      | $85 \% \leq \text{efekt macierzysty} \% \leq 115 \%$                                                                                                                                           |
| Środek przeniesiony                                                                  | Analiza izopropanolu według normy ULOQ <sup>2</sup>                                                                                                                                                                                                                                  | $\text{Obszar}_{\text{interferencja}} \leq 20 \% \text{ Obszar}_{\text{LLOQ}}$                                                                                                                 |
| Odtwarzalność (śróddzienna)                                                          | 3 niezależne krzywe wzorcowe (na podstawie 6 kolejnych roztworów 1/3 formazanu MTT w izopropanolu, poczynając od ULOQ, np. 200 µg/ml); Kontrole jakości w izopropanolu (n = 5)                                                                                                       | Krzywe kalibracyjne: $\% \text{ Dev} \leq 15 \% \text{ lub } \leq 20 \% \text{ w odniesieniu do LLOQ}$<br><br>Kontrole jakości: $\% \text{ Dev} \leq 15 \% \text{ oraz } \text{CV} \leq 15 \%$ |
| Odtwarzalność (między kolejnymi dniami)                                              | Dzień 1: 1 krzywa wzorcowa oraz kontrole jakości w izopropanolu (n = 3)<br>Dzień 2: 1 krzywa wzorcowa oraz kontrole jakości w izopropanolu (n = 3)<br>Dzień 3: 1 krzywa wzorcowa oraz kontrole jakości w izopropanolu (n = 3)                                                        |                                                                                                                                                                                                |
| Krótkookresowa stabilność formazanu MTT w ekstrakcie tkankowym RhE                   | Kontrole jakości na żywej ślepej próbce (n = 3) analizowane w dniu przygotowania oraz po 24 godzinach składowania w temperaturze pokojowej                                                                                                                                           | $\% \text{ Dev} \leq 15 \%$                                                                                                                                                                    |
| W razie potrzeby – długookresowa stabilność formazanu MTT w ekstrakcie tkankowym RhE | Kontrole jakości w żywej ślepej próbce (n = 3) analizowane w dniu przygotowania oraz po kilku dniach przechowywania w określonej temperaturze (np. 4 °C, -20 °C, -80 °C)                                                                                                             | $\% \text{ Dev} \leq 15 \%$                                                                                                                                                                    |

<sup>1</sup>LLOQ: Dolna granica oznaczalności określona tak, by obejmowała 1-2 % żywotności tkanek, tj. 0,8 µg/ml.

<sup>2</sup>ULOQ: Górna granica oznaczalności określona tak, by była co najmniej dwukrotnie wyższa niż najwyższe oczekiwane stężenie formazanu MTT w ekstraktach izopropanolu z kontroli ujemnych 200 µg/ml.,,;

8) W części B dodaje się rozdziały w brzmieniu:

## **„B.63 BADANIE KLASYFIKACYJNE TOKSYCZNOŚCI REPRODUKCYJNEJ I ROZWOJOWEJ**

### **WPROWADZENIE**

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna wytycznej OECD dotyczącej badań (TG) nr 421 (2016). Okresowo dokonuje się przeglądu wytycznych OECD dotyczących badania substancji chemicznych pod kątem postępu naukowego. Pierwotna wytyczna dotycząca badań klasyfikacyjnych 421 została przyjęta w 1995 r. na podstawie protokołu „Wstępne badanie klasyfikacyjne toksyczności reprodukcyjnej (*Preliminary Reproduction Toxicity Screening Test*)” omówionego na dwóch posiedzeniach ekspertów: w Londynie w 1990 r. (1) i w Tokio w 1992 r. (2).
2. Niniejsza metoda badawcza została zaktualizowana o właściwe punkty końcowe badania substancji zaburzającej funkcjonowanie układu hormonalnego w ramach działań następczych do działania o wysokim priorytecie podjętego przez OECD w 1998 r., mającego na celu zmianę istniejących wytycznych i opracowanie nowych wytycznych dotyczących badań klasyfikacyjnych i badania potencjalnych substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego (3). Na przykład wytyczną dotyczącą badań nr OECD 407 (28-dniowe badanie toksyczności doustnej wywołanej powtarzanym dawkowaniem u gryzoni, rozdział B.7 niniejszego załącznika) wzbogacono w 2008 r. o parametry odpowiednie do wykrywania aktywności endokrynologicznej badanych substancji chemicznych. Celem aktualizacji wytycznej dotyczącej badań nr 421 było uwzględnienie niektórych właściwych punktów końcowych substancji zaburzającej funkcjonowanie układu hormonalnego w badaniach klasyfikacyjnych TG, gdzie okresy narażenia obejmują niektóre wrażliwe okresy w rozwoju (okresy przed lub wcześniej po urodzeniu).
3. Wybrane dodatkowe właściwe punkty końcowe badania substancji zaburzającej funkcjonowanie układu hormonalnego, stanowiące również część wytycznej dotyczącej badań 443 (Rozszerzone badanie toksyczności reprodukcyjnej w jednym pokoleniu, rozdział B.56 niniejszego załącznika), zostały włączone do wytycznej TG 421 na podstawie studium wykonalności dotyczącego kwestii naukowych i technicznych związanych z ich włączeniem, jak również możliwych dostosowań projektu badań potrzebnych do ich włączenia (4).
4. Niniejsza metoda badawcza ma na celu wygenerowanie ograniczonej ilości informacji dotyczących wpływu badanej substancji chemicznej na efektywność reprodukcyjną samców i samic, taką jak funkcja gonad, zachowanie kopulacyjne, zapłodnienie, rozwój

jaja płodowego i poród. Nie jest ona metodą alternatywną dla istniejących metod badań B.31, B.34, B.35 lub B.56, ani ich nie zastępuje.

## **ZAŁOŻENIA WSTĘPNE**

5. Niniejsza metoda badania klasyfikacyjnego może być stosowana w celu dostarczenia wstępnych informacji na temat możliwego wpływu na reprodukcję lub rozwój, albo na wczesnym etapie oceny właściwości toksykologicznych substancji chemicznych lub na przedmiotowe substancje chemiczne. Może być również stosowana jako część zestawu wstępnych badań klasyfikacyjnych dla istniejących substancji chemicznych, w przypadku których dostępne są niewiele informacji toksykologicznych lub nie ma ich wcale, jako badanie ustalające zakres dawek dla bardziej ekstensywnych badań nad rozrodczością/rozwojem, lub w przypadku gdy jest to uznane za istotne w inny sposób. Przy prowadzeniu badania należy przestrzegać zasad i ustaleń określonych w dokumencie zawierającym wytyczne OECD nr 19 „Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluations” (5) (Wytyczne dotyczące uznawania, oceny i wykorzystywania objawów klinicznych jako punktów humanitarnego zakończenia w odniesieniu do zwierząt doświadczalnych wykorzystywanych w ocenach bezpieczeństwa).
6. Niniejsza metoda badawcza nie zapewnia pełnych informacji na temat wszystkich aspektów reprodukcji i rozwoju. W szczególności oferuje jedynie ograniczone środki wykrywania poporodowych przejawów narażenia prenatalnego lub skutków, które mogą być wywołane podczas narażenia postnatalnego. Ze względu (między innymi) na stosunkowo małą liczbę zwierząt w grupach dawkowania, selektywność punktów końcowych oraz krótki czas trwania badania, metoda ta nie dostarczy dowodów na definitywne stwierdzenie braku skutków. Ponadto wobec braku danych z innych badań toksyczności reprodukcyjnej/rozwojowej, wyniki dodatnie są przydatne do wstępnej oceny zagrożeń i przyczyniają się do podejmowania decyzji dotyczących konieczności i terminów dodatkowych badań.
7. Wyniki uzyskane za pomocą parametrów związanych z układem hormonalnym należy rozpatrywać w kontekście dokumentu „OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals” („Ramy koncepcyjne OECD dotyczące testowania i oceny substancji chemicznych zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego”) (6). W niniejszych ramach koncepcyjnych rozszerzona wytyczna dotycząca badań OECD nr 421 zawarta jest na poziomie 4 jako test *in vivo* dostarczający danych na temat niekorzystnego wpływu na właściwe punkty końcowe w badaniu wpływu na układ hormonalny. Sygnał endokrynnny może jednak nie być uważany za wystarczający dowód na to, że badana substancja chemiczna jest substancją zaburzającą funkcjonowanie układu hormonalnego.

8. Niniejsza metoda badawcza zakłada doustną drogę podawania badanej substancji chemicznej. W przypadku stosowania innych dróg narażenia, może być konieczne dokonanie modyfikacji.
9. Przed zastosowaniem przedmiotowej metody badawczej z użyciem mieszaniny w celu zgromadzenia danych na potrzeby założonego celu regulacyjnego należy zastanowić się, czy zastosowanie tej metody może doprowadzić do uzyskania wyników odpowiednich z punktu widzenia tego celu, a jeżeli tak, to dlaczego. Przeprowadzenie takiej analizy nie jest konieczne, jeżeli ustanowiono wymóg regulacyjny dotyczący badania danej mieszaniny.
10. Stosowane definicje znajdują się w dodatku 1.

## **ZASADA BADANIA**

11. Badana substancja chemiczna podawana jest w stopniowanych dawkach kilku grupom samców i samic. Samce powinny otrzymywać dawki substancji przez co najmniej cztery tygodnie do dnia przed planowanym uśmierceniem włącznie (obejmuje to co najmniej dwa tygodnie przed kryciem, w okresie krycia i około dwóch tygodni po kryciu). Ze względu na ograniczone dawkowanie przed kryciem u samców, płodność może nie być szczególnie czułym wskaźnikiem toksyczności w odniesieniu do jąder. W związku z tym niezbędne jest szczegółowe badanie histologiczne jąder. Uważa się, że połączenie dwutygodniowego okresu dawkowania w okresie przed kojarzeniem i późniejszych obserwacji krycia/płodności z ogólnym okresem dawkowania wynoszącym co najmniej cztery tygodnie, po którym następuje szczegółowa histopatologia gonad samców, jest wystarczające do wykrycia większości wpływu na płodność i spermatogenezę samców.
12. Samice powinny otrzymywać dawki przez cały czas trwania badania. Obejmuje to dwa tygodnie przed kryciem (w celu objęcia co najmniej dwóch pełnych cykli estrogenowych), zmienny czas do zapłodnienia, czas trwania ciąży i co najmniej trzynaście dni po porodzie, do dnia planowanego uśmiercenia włącznie.
13. Czas trwania badania, po aklimatyzacji i ocenie cyklu estrogenowego przed dawkowaniem, zależy od efektywności samic i wynosi około 63 dni, [co najmniej 14 dni okresu przed kojarzeniem, (do) 14 dni krycia, 22 dni ciąży, 13 dni laktacji].
14. Podczas okresu dawkowania każdego dnia zwierzęta są dokładnie obserwowane w celu wykrycia oznak toksyczności. Zwierzęta, które zginą lub zostaną uśmiercone w okresie badania, są poddawane autopsji, a zwierzęta, które przeżyją, są po zakończeniu badania uśmiercane i poddawane autopsji.

## **OPIS METODY**

## **Wybór gatunku zwierząt**

15. Niniejsza metoda badawcza jest przeznaczona do stosowania z wykorzystaniem szczurów. W przypadku gdy parametry określone w niniejszej metodzie badawczej badane są z wykorzystaniem innego gatunku gryzoni, należy podać uzasadnienie. Szczur był jedynym gatunkiem wykorzystywanym w międzynarodowym programie walidacyjnym dotyczącym substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego w wytycznej dotyczącej badań OECD nr 407 (odpowiadającej rozdziałowi B.7 niniejszego załącznika). Nie należy stosować szczepów o niskiej płodności lub powszechnie znanej wysokiej częstości występowania wad rozwojowych. Należy wykorzystać zdrowe zwierzęta dziewicze, które nie były wcześniej poddawane procedurom badawczym. Badane zwierzęta należy scharakteryzować z uwzględnieniem ich gatunku, szczepu, płci, masy i wieku. W momencie rozpoczęcia badania różnice w masie ciała wykorzystywanych zwierząt powinny być minimalne i nie powinny przekraczać 20 % średniej masy ciała u każdej z płci. W przypadku gdy badanie przeprowadza się jako badanie wstępne w stosunku do badania długoterminowego lub pełnopokoleniowego, zaleca się, aby w obu badaniach wykorzystywać zwierzęta tego samego szczepu i źródła.

## **Warunki utrzymywania i karmienia**

16. Wszystkie procedury powinny być zgodne z lokalnymi normami utrzymywania zwierząt laboratoryjnych. Temperatura w pomieszczeniu, w którym przetrzymuje się zwierzęta doświadczalne, powinna wynosić 22 °C ( $\pm 3^\circ$ ). Wilgotność względna, poza okresem sprzątania pomieszczenia, powinna wynosić co najmniej 30 % i raczej poniżej 70 %, należy starać się ją utrzymać na poziomie 50–60 %. Oświetlenie powinno być sztuczne w cyklu 12 godzin z dostępem światła i 12 godzin bez dostępu światła. Do żywienia można stosować konwencjonalne pasze laboratoryjne z nieograniczonym dostępem do wody pitnej. Na wybór paszy może mieć wpływ potrzeba zapewnienia odpowiedniej domieszki badanej substancji chemicznej w przypadku podawania jej w ramach opisywanej metody.
17. Zwierzęta należy przetrzymywać razem, w małych grupach składających się z osobników tej samej płci; można je przetrzymywać pojedynczo, jeżeli ma to naukowe uzasadnienie. W przypadku przetrzymywania w grupach, w jednej klatce należy umieszczać nie więcej niż pięć zwierząt. Procedury krycia powinny być przeprowadzane w klatkach nadających się do tego celu. Ciężarne samice powinny być przetrzymywane w osobnych klatkach i mieć zapewnione materiały do budowy gniazda. Samice w okresie ciąży będą przebywać w indywidualnych klatkach ze swoim potomstwem.
18. Paszę należy regularnie analizować pod kątem obecności zanieczyszczeń. Próbkę paszy należy zachować do momentu ukończenia sprawozdania.

## **Przygotowanie zwierząt**

19. Zdrowe młode dorosłe osobniki zwierząt są losowo przydzielane do grup kontrolnych oraz grup poddawanych działaniu substancji. Klatki należy rozmieścić w taki sposób, aby zminimalizować potencjalny wpływ ich układu. Zwierzęta są identyfikowane jednoznacznie i przetrzymywane w klatkach przez co najmniej pięć dni przed rozpoczęciem badania, żeby umożliwić aklimatyzację do warunków laboratoryjnych.

### **Przygotowanie dawek**

20. Zaleca się, aby badana substancja chemiczna była podawana doustnie, chyba że za bardziej odpowiednią uzna się inną drogę podawania. W przypadku wybrania doustnej drogi podawania, badaną substancję chemiczną zazwyczaj podaje się za pomocą sondy; można jednak również zastosować metodę alternatywną polegającą na podaniu badanych substancji chemicznych w paszy lub w wodzie do picia.
21. W razie potrzeby badaną substancję chemiczną rozpuszcza się lub przygotowuje jako zawiesinę w odpowiednim nośniku. Zaleca się, w miarę możliwości, najpierw rozważyć zastosowanie roztworu wodnego/zawiesiny, następnie roztworu/emulsji w oleju (np. z zastosowaniem oleju kukurydzianego), a potem możliwego roztworu w innych nośnikach. W przypadku nośników innych niż woda właściwości toksyczne tego nośnika powinny być znane. Należy określić stabilność i jednorodność badanej substancji chemicznej w nośniku.

## **PROCEDURA**

### **Liczba i płeć zwierząt**

22. Zaleca się, aby w każdej grupie na początku znajdowało się co najmniej 10 samców i 12–13 samic. Ocena samic będzie prowadzona przed narażeniem pod kątem cykliczności estrogenowej, a do badania nie zostaną włączone zwierzęta, które nie wykażą typowych 4–5 dniowych cykli; w związku z tym zaleca się zastosowanie dodatkowych samic w celu uzyskania 10 samic w każdej grupie. Poza przypadkiem, w którym występują wyraźne efekty toksyczne, oczekuje się, że zapewni to co najmniej 8 ciężarnych samic na grupę, co zazwyczaj stanowi najniższą dopuszczalną liczbę ciężarnych samic na grupę. Celem jest wyprodukowanie odpowiedniej liczby ciąż i potomstwa w celu zapewnienia znaczącej oceny wpływu badanej substancji chemicznej na płodność, ciążę, zachowanie macierzyńskie i zwierząt ssących oraz wzrost i rozwój potomstwa F<sub>1</sub> w okresie od chwili poczęcia do 13 dnia po porodzie.

### **Dawkowanie**

23. Zasadniczo należy wykorzystać co najmniej trzy grupy badane i jedną grupę kontrolną. Poziomy dawek mogą opierać się na informacjach z badań dotyczących ostrej toksyczności lub na wynikach badań wielokrotnej dawki. Z wyjątkiem podawania badanej substancji chemicznej zwierzęta w grupie kontrolnej należy traktować w identyczny sposób jak



zwierzęta w grupie badanej. Jeżeli przy podawaniu badanej substancji chemicznej jest stosowany nośnik, grupa kontrolna powinna otrzymać największą użytą objętość nośnika.

24. Poziomy dawki powinny być wybierane, biorąc pod uwagę jakiegokolwiek istniejące dostępne dane o toksyczności i dane toksykokinetyczne. Należy także wziąć pod uwagę, że mogą istnieć różnice w czułości między zwierzętami w ciąży a tymi niebędącymi w ciąży. Należy wybrać taki najwyższy poziom dawkowania, który powoduje oznaki toksyczności, ale nie powoduje śmierci lub silnego cierpienia. Następnie należy dobierać poziomy dawkowania w sekwencji malejącej w taki sposób, aby ukazać wszystkie reakcje powiązane z dawkowaniem i brak obserwowanych szkodliwych zmian przy najmniejszym poziomie dawkowania (NOAEL). Często do ustalenia malejących poziomów dawkowania optymalne jest zastosowanie poziomów dawkowania różniących się od dwu- do czterokrotnie, a zamiast stosować bardzo odległe (np. różniące się więcej niż 10-krotnie) poziomy dawkowania, często lepiej jest dodać czwartą grupę badaną.
25. Jeśli obserwowana jest ogólna toksyczność (np. spadek masy ciała, wpływ na wątrobę, serce, płuca lub nerki itp.) bądź inne zmiany, które nie muszą być efektami toksycznymi (np. zmniejszone pobieranie pokarmu, powiększenie wątroby), należy zachować ostrożność interpretując obserwowane skutki w punktach końcowych wpływu na układ hormonalny.

### **Badanie graniczne**

26. Jeżeli badanie z podawaniem doustnym przy jednym poziomie dawki równym co najmniej 1000 mg/kg masy ciała/dzień lub, w przypadku podawania w paszy lub w wodzie do picia, równoważny procent w paszy lub wodzie do picia, stosując procedury opisane dla tego badania, nie wywołuje widocznych objawów zatrucia i jeżeli nie należałoby spodziewać się toksyczności na podstawie danych, dotyczących substancji strukturalnie pokrewnych, wtedy pełne badanie przy użyciu szeregu poziomów dawki może nie być konieczne. Ten test graniczny stosuje się z wyjątkiem przypadków, w których ekspozycja ludzi wskazuje na konieczność użycia wyższego poziomu dawki doustnej. W odniesieniu do innych dróg podawania, na przykład wziewnej lub stosowania na skórę, fizyczne własności chemiczne badanych substancji chemicznych mogą często wyznaczać najwyższe możliwe do osiągnięcia stężenie.

### **Podawanie dawek**

27. Zwierzętom podaje się badaną substancję chemiczną codziennie, przez siedem dni w tygodniu. Gdy badana substancja chemiczna jest podawana przez sondę, należy ją podawać zwierzętom w pojedynczej dawce przy użyciu sondy żołądkowej lub odpowiedniej kaniuli intubacyjnej. Maksymalna objętość płynu, jaką można podać jednorazowo, zależy od wielkości badanego zwierzęcia. Objętość ta nie powinna przekraczać 1 ml/100 g masy ciała, oprócz roztworów wodnych, w przypadku których

można użyć 2 ml/100 g masy ciała. Poza drażniącymi lub żrącymi badanymi substancjami chemicznymi, które zwykle dają zaostrzone objawy przy wyższych stężeniach, zmienność objętości w badaniu powinna być zminimalizowana przez dostosowanie stężenia, aby zapewnić stałą objętość przy wszystkich poziomach dawki.

28. W przypadku substancji chemicznych podawanych z paszą lub wodą do picia należy dopilnować, aby ilości podawanej badanej substancji chemicznej nie zakłócały zwykłego odżywiania lub gospodarki wodnej organizmu. Przy podawaniu badanej substancji chemicznej wraz z pokarmem można zastosować stałe stężenie w pokarmie (ppm) lub też stały poziom dawki w zależności do masy ciała zwierzęcia; należy podać zastosowany wariant. W przypadku badanej substancji chemicznej podawanej przez sondę, dawka powinna być podawana każdego dnia o podobnej porze i w razie konieczności modyfikowana co najmniej raz na tydzień, aby utrzymać stały poziom dawki w zależności od masy ciała zwierzęcia.

### **Harmonogram doświadczalny**

29. Podawanie dawek substancji obu płciom powinno rozpocząć się co najmniej dwa tygodnie przed kryciem, po zaaklimatyzowaniu się osobników przez co najmniej pięć dni i poddaniu samic badaniu przesiewowemu pod kątem normalnych cykli estrogenowych (w dwa tygodnie przed okresem poddawania działaniu substancji). Badanie powinno być zaprogramowane w taki sposób, żeby ocena cyklu estrogenowego rozpoczynała się zaraz po osiągnięciu przez zwierzęta pełnej dojrzałości płciowej. Pod tym względem mogą występować nieznaczne różnice u różnych szczepów szczurów wykorzystywanych w różnych laboratoriach, np. szczury szczepu Sprague Dawley osiągają dojrzałość płciową po 10 tygodniach życia, a szczepu Wistar – po około 12 tygodniach. Matki posiadające potomstwo należy uśmiercić 13. dnia po porodzie lub wkrótce po tym dniu. Dzień narodzin (tj. dzień zakończenia porodu) określa się jako dzień 0 po porodzie. Samice, u których nie zaobserwowano oznak kopulacji, uśmierca się po 24–26 dniach od ostatniego dnia okresu krycia. Dawkowanie należy kontynuować u obu płci przez okres krycia. Dawkowanie u samców należy nadal stosować po okresie krycia co najmniej do zakończenia minimalnego łącznego okresu dawkowania wynoszącego 28 dni. Następnie samce są uśmiercane lub ewentualnie zatrzymywane i kontynuuje się dawkowanie w celu ewentualnego drugiego krycia, jeśli uzna się to za stosowne.
30. Codziennie dawkowanie u rodzicielskich samic powinno dalej trwać przez cały okres ciąży, co najmniej do 13. dnia po porodzie włącznie, lub do dnia poprzedzającego uśmiercenie. W przypadku badań, w których badaną substancję chemiczną podaje się drogą wziewną lub skórną, dawkowanie powinno trwać co najmniej do 19. dnia ciąży włącznie i powinno być ono wznowione najszybciej jak to możliwe – nie później niż w czwartym dniu po urodzeniu.
31. Diagram przedstawiający harmonogram doświadczenia znajduje się w dodatku 2.

## **Procedura krycia**

32. Podczas tego badania należy zazwyczaj wykorzystywać krycia 1:1 (jeden samiec na jedną samicę). W przypadku wystąpienia sporadycznych zgonów samców mogą pojawić się wyjątki. Samicę należy umieścić razem z tym samym samcem na okres trwający do momentu odnotowania kopulacji lub dwa tygodnie. Każdego dnia rano samice należy poddać badaniu na obecność plemników lub czopa pochwowego. Dzień 0 ciąży określa się jako dzień, w którym potwierdzono wystąpienie krycia (wykrycie czopa pochwowego lub plemników). Jeśli kojarzenie w parze nie uda się, można rozważyć krycie samic samcami o dowiedzionej płodności.

## **Liczebność miotu**

33. Czwartego dnia po porodzie można skorygować liczebność każdego miotu, eliminując dodatkowe, losowo wybrane młode w miocie, by otrzymać, na ile to możliwe, cztery lub pięć samic i cztery lub pięć samców na miot, w zależności od typowej liczebności miotów w szczepie wykorzystanych szczurów. Próbkę krwi należy pobrać od dwóch młodych nieprzydzielonych do żadnej kohorty, zebrać i wykorzystać do określenia poziomów surowicy T4. Wybiórcza eliminacja młodych, np. na podstawie masy ciała lub odległości anogenitalnej jest nieodpowiednia. Ilekroć liczba młodych samców lub samic uniemożliwia uzyskanie czterech lub pięciu osobników każdej płci na miot, dopuszczalne jest częściowe dostosowanie (na przykład sześć samców i cztery samice). Żadne młode nie zostanie wyeliminowane, gdy liczebność miotu spadnie poniżej celu eliminacji (8 lub 10 młodych/miot). Jeżeli dostępne jest tylko jedno młode powyżej celu eliminacji, tylko jedno młode zostanie wyeliminowane i wykorzystane do pobrania krwi do ewentualnej oceny surowicy T4.
34. Jeżeli liczebność miotu nie została skorygowana, dwa młode na miot uśmierca się 4. dnia po urodzeniu, a próbki krwi pobiera się do pomiaru stężeń hormonów tarczycy w surowicy. Jeżeli to możliwe, dwa młode na miot powinny stanowić młode samice, aby zachować młode samce na potrzeby oceny zatrzymywania płynu w brodawkach sutkowych, oprócz przypadku, w którym eliminacja tych młodych powoduje, że nie pozostaną żadne samice do oceny końcowej przy uśmiercaniu. Żadne młode nie zostanie wyeliminowane, gdy rozmiar miotu spadnie poniżej 8 lub 10 młodych/miot (w zależności od typowego rozmiaru miotu w szczepie wykorzystanych szczurów). Jeżeli dostępne jest tylko jedno młode powyżej typowej liczebności miotu, tylko jedno młode zostanie wyeliminowane i wykorzystane do pobrania krwi do ewentualnej oceny surowicy T4.

## **Obserwacje w trakcie życia**

### *Obserwacje kliniczne*

35. W trakcie okresu badania ogólne obserwacje kliniczne należy przeprowadzać co najmniej raz dziennie, a w przypadku zaobserwowania oznak toksyczności należy zwiększyć ich

częstotliwość. Najlepiej prowadzić je każdego dnia o tej samej porze, biorąc pod uwagę szczytowy okres przewidywanych objawów po dawkowaniu. Należy odnotować zmiany w zachowaniu mające związek z badaniami, objawy trudnego lub długotrwałego porodu oraz wszelkie objawy toksyczności, włączając śmiertelność. Zapisy te powinny zawierać czas pojawienia się, stopień ciężkości i czas trwania objawów toksyczności.

#### *Masa ciała i spożycie pokarmu/wody*

36. Samce i samice należy zważyć w pierwszym dniu dawkowania, a następnie co najmniej raz tygodniowo oraz w momencie zakończenia dawkowania. Samice w okresie ciąży należy ważyć w dniach 0, 7, 14 i 20 oraz w ciągu 24 godzin od porodu (w dniu 0 lub 1 po porodzie), a także co najmniej 4 i 13 dni po porodzie. Obserwacje te należy umieścić w sprawozdaniu oddzielnie w odniesieniu do każdego dorosłego zwierzęcia.
37. Przed kryciem, w okresie ciąży oraz laktacji spożycie pokarmu należy mierzyć co najmniej raz w tygodniu. W okresie krycia pomiar spożycia pokarmu nie jest obowiązkowy. Gdy badana substancja chemiczna podawana jest za pośrednictwem wody do picia, w trakcie tych okresów należy także mierzyć spożycie wody.

#### *Cykle estrogenowe*

38. Monitorowanie cykli estrogenowych powinno odbywać się przed rozpoczęciem poddawania działaniu substancji, aby do badania wybrać samice o regularnej cykliczności (zob. pkt 22). Należy także codziennie, od rozpoczęcia poddawania działaniu substancji do potwierdzenia krycia, monitorować rozmazy śluzówki pochwy. Jeżeli istnieje obawa związana z wystąpieniem dotkliwych skutków stresu mogących zmienić cykle estrogenowe wraz z rozpoczęciem dawkowania, laboratoria mogą przez dwa tygodnie narażać zwierzęta doświadczalne, a następnie przez co najmniej dwa tygodnie codziennie pobierać rozmazy śluzówki pochwy by monitorować cykl estrogenowy w trakcie okresu poprzedzającego krycie, ciągle monitorując go w okresie krycia, aż do momentu jego zaistnienia. Przy pozyskiwaniu komórek pochwy / szyjki macicy należy zachować ostrożność, aby nie dopuścić do zaburzeń błony śluzowej, które mogłyby wywoływać ciężką rzekomą (7)(8).

#### *Parametry potomstwa*

39. Począwszy od dnia 0 ciąży należy odnotowywać i liczyć czas jej trwania. Każdy miot należy zbadać tak szybko po urodzeniu jak to możliwe, w celu ustalenia liczby i płci młodych, płodów urodzonych martwo, płodów urodzonych żywo, słabowitych młodych w miocie (młodych o znacznie mniejszych rozmiarach niż odpowiadające młode kontrolne) oraz obecności poważnych nieprawidłowości.
40. Należy policzyć i ustalić płeć żywych młodych, a następnie zważyć mioty w ciągu 24 godzin od porodu (w dniu 0 lub 1. dniu po porodzie) oraz co najmniej 4. i 13. dnia po

porodzie. W dodatku do obserwacji opisanych w pkt 35 należy odnotować wszelkie nieprawidłowe zachowania potomstwa.

41. Odległość anogenitalną każdego młodego należy mierzyć w tym samym dniu po urodzeniu – między 0. a 4. dniem po urodzeniu. W dniu pomiaru odległości anogenitalnej należy dokonać pomiaru masy ciała młodego, a odległość anogenitalną należy znormalizować w odniesieniu do pomiaru wielkości młodego, najlepiej jako pierwiastek kwadratowy masy ciała (9). Liczbę brodawek sutkowych / otoczek brodawek u młodych samców należy mierzyć, według zaleceń zawartych w wytycznej OECD nr 151, w 12. lub 13. dnia po urodzeniu (10).

### **Biochemia kliniczna**

42. Próbkę krwi z określonego miejsca pobiera się według następującego planu:

- od co najmniej dwóch młodych na miot 4. dnia po urodzeniu jeżeli liczba młodych na to pozwala (zob. pkt 33–34),
- od wszystkich matek oraz co najmniej dwóch młodych z każdego miotu przy zakończeniu badania 13. dnia oraz
- od wszystkich dorosłych samców w dniu zakończenia badań.

Wszystkie próbki krwi przechowuje się w odpowiednich warunkach. Próbkę krwi pobrane od 13. dniowych młodych oraz dorosłych samców ocenia się pod kątem poziomów surowicy hormonów tarczycy (T4). Jeżeli uzna się za stosowne, przeprowadzana jest dalsza ocena T4 w próbkach krwi od matek oraz 4. dniowych młodych. Można opcjonalnie przeprowadzić pomiar innych hormonów. Krew młodych z każdego miotu można połączyć do celów analizy hormonów tarczycy. Hormony tarczycy (T4 i TSH) zaleca się mierzyć jako „całkowite”.

43. Na zmienność i wartości bezwzględne stężeń przy oznaczaniu hormonów mogą mieć wpływ następujące czynniki:

- czas uśmiercenia zwierzęcia w związku z dobową zmiennością stężeń hormonów;
- metoda uśmiercenia zastosowana w celu uniknięcia zbędnego stresu dla zwierząt, mogącego wpłynąć na stężenia hormonów;
- zestawy do oznaczania hormonów, których krzywe standardowe mogą się różnić.

44. Próbkę osocza przeznaczoną konkretnie do oznaczenia poziomu hormonów należy pobierać w porównywalnej porze dnia. Wartości liczbowe uzyskane w toku analizy stężeń hormonów różnią się w zależności od zastosowanego dostępnego w handlu zestawu testowego.

### **Patologia**

### *Pełne rozpoznanie histopatologiczne*

45. W momencie uśmiercenia lub śmierci w okresie trwania badania dorosłe zwierzęta należy zbadać makroskopowo pod kątem nieprawidłowości lub zmian patologicznych. Szczególną uwagę należy zwrócić na organy układu rozrodczego. Należy odnotować liczbę miejsc zagnieżdżenia. Rozmazy śluzówki pochwy należy zbadać z rana w dniu autopsji, aby określić stadium cyklu estrogenowego oraz umożliwić korelację z histopatologią jajników.
46. Jądra i najądrza, a także gruczoł krokowy i kanaliki nasienne z całymi gruczołami koagulującymi wszystkich dorosłych samców należy, w stosownym przypadku, wyczyścić z wszelkich przylegających tkanek, a ich mokrą masę, a ich mokrą masę należy pobrać jak najszybciej po dysekcji, aby zapobiec jej wyschnięciu. Ponadto opcjonalne masy narządów mogą w przypadku samców obejmować zespół mięśni dźwigacza odbytu i mięśni opuszkowo-jamistych, gruczoły Cowpera i żołądź, a w przypadku samic parę jajników (mokra masa) i macicę (wraz z szyjką); jeżeli są uwzględnione, masy te należy określić jak najszybciej po dysekcji.
47. Martwe młode i młode zabite 13. dnia po porodzie lub wkrótce potem należy co najmniej przebadать zewnętrznie z zachowaniem ostrożności pod kątem poważnych nieprawidłowości. Szczególną uwagę należy zwrócić na zewnętrzne narządy rozrodcze, które należy zbadać pod kątem zmian rozwojowych. W 13. dniu należy zachować tarczycę jednego samca i jednej młodej samicy na miot.
48. Należy zachować jajniki, jądra, płciowe narządy dodatkowe (macicę wraz z szyjką, najądrza, gruczoł krokowy, kanaliki nasienne i gruczoły koagulujące), tarczycę i wszystkie narządy wykazujące makroskopowe zmiany patologiczne wszystkich dorosłych zwierząt. Do rutynowych badań jąder i najądrzy nie zaleca się utrwalania w formalinie. Akceptowalną metodą w przypadku tych tkanek jest wykorzystanie utrwalacza Bouina lub zmodyfikowanego utrwalacza Davidsona (11). Błonę białawą trzeba delikatnie i płytko przekłuć igłą na obu biegunach narządu w celu umożliwienia szybkiego wnikięcia płynu utrwalającego.

### *Histopatologia*

49. Należy wykonać szczegółowe badanie histologiczne jajników, jąder i najądrzy (ze szczególnym naciskiem na stadia spermatogenezy i histopatologię śródmiąższowej struktury komórek jąder) zwierząt znajdujących się w grupie otrzymującej najwyższą dawkę oraz zwierząt znajdujących się w grupie kontrolnej. Można w razie potrzeby zbadać pozostałe zachowane organy, w tym tarczycę pochodzące od młodych i dorosłych zwierząt. Masę tarczycy można określić po utrwaleniu. Należy zachować dużą ostrożność przy okrawaniu i wykonywać je dopiero po utrwaleniu, w celu uniknięcia uszkodzenia tkanek. Mogłoby ono zakłócić analizę histopatologiczną. Badania powinny być rozciągnięte na inne grupy badane, gdy w grupie otrzymującej najwyższe dawki obserwuje

się zmiany. W wytycznych dotyczących histopatologii (11) podano dodatkowe informacje dotyczące wycinania, utrwalania, dzielenia i histopatologii tkanek układu hormonalnego.

## **DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ**

### **Dane**

50. Należy podać dane każdego zwierzęcia. Ponadto wszystkie dane należy podsumować w formie tabeli wykazującej, w odniesieniu do każdej grupy badanej i każdego pokolenia, liczbę zwierząt na początku badania, liczbę zwierząt, które znaleziono martwe podczas badania lub zwierząt uśmierconych ze względów humanitarnych, czas śmierci lub humanitarnego uśmiercenia, liczbę zwierząt płodnych, liczbę ciężarnych samic, liczbę zwierząt wykazujących zaobserwowane oznaki toksyczności, z podaniem czasu ich pojawienia się, w tym czasu trwania, ciężkości wszelkich skutków toksyczności, rodzajów zmian histopatologicznych oraz wszelkich odnośnych danych miotów. W dodatku 3 przedstawiono podsumowanie w formie tabeli, które okazało się być bardzo przydatne przy ocenianiu efektu reprodukcyjnego/rozwojowego.
51. Ze względu na ograniczone wymiary badania, analizy statystyczne w postaci testów na „istotność” mają ograniczoną wartość dla wielu punktów końcowych, zwłaszcza reprodukcyjnych punktów końcowych. Jeżeli wykorzystywane są analizy statystyczne, wybrana metoda powinna być odpowiednia dla rozkładu badanej zmiennej i powinna być wybrana przed rozpoczęciem badania. Analiza statystyczna odległości anogenitalnej i zatrzymywania płynu w brodawkach powinna być oparta na danych dotyczących poszczególnych młodych z uwzględnieniem wpływu na miot. W stosownych przypadkach za jednostkę analityczną uznaje się miot. Analiza statystyczna masy ciała młodych powinna być oparta na danych dotyczących poszczególnych młodych z uwzględnieniem liczebności miotu. Ze względu na małą wielkość grupy, wykorzystanie historycznych danych dotyczących kontroli (np. dotyczących wielkości miotu), w przypadku gdy są one dostępne, może być również przydatne jako pomoc w interpretacji badania.

### **Ocena wyników**

52. Wyniki tego badania toksyczności powinny być oceniane w kategoriach zaobserwowanych skutków, wyników autopsji i badań mikroskopowych. Ocena obejmuje zależność pomiędzy dawką badanej substancji chemicznej a obecnością lub brakiem, częstością i ciężkością nieprawidłowości, w tym poważnych zmian patologicznych, wskazanymi organami docelowymi, bezpłodnością, nieprawidłowościami klinicznymi, zmienionymi funkcjami rozrodczymi i funkcjonowaniem miotów, zmianami masy ciała, wpływem na śmiertelność i wszelkimi innymi skutkami toksycznymi.
53. Ze względu na krótki okres poddania działaniu substancji w odniesieniu do samców, przy ocenie wpływu na rozrodczość u samców należy uwzględnić histopatologię jąder

i najądrzy oraz dane dotyczące płodności. Wykorzystanie historycznych danych dotyczących kontroli odnoszących się do reprodukcji/rozwoju (np. dotyczących wielkości miotu, odległości anogenitalnej, zatrzymywania płynu w brodawkach, poziomu T4 w surowicy), w przypadku gdy są one dostępne, może być również przydatne jako pomoc w interpretacji badania.

54. Proponuje się, aby do celów kontroli jakości zbierać historyczne dane kontrolne i obliczać współczynniki zmienności dla danych liczbowych, szczególnie w odniesieniu do parametrów związanych z wykrywaniem substancji zakłócających funkcjonowanie układu hormonalnego. Dane te można wykorzystać do celów porównawczych przy ocenie bieżących badań.

### **Sprawozdanie z badania**

55. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

#### *Badana substancja chemiczna:*

- źródło, numer partii, termin przydatności, jeżeli są znane,
- stabilność badanej substancji chemicznej, jeżeli jest znana;

#### *substancja jednoskładnikowa:*

- wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne,
- dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa IUPAC lub CAS, numer CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny, czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń, stosownie do przypadku i jeśli jest to praktycznie wykonalne, itp.;

#### *substancja wieloskładnikowa, UVCB i mieszaniny:*

- opisane w miarę możliwości przez podanie nazwy chemicznej (zob. powyżej), określenie ilości oraz istotnych właściwości fizykochemicznych składników.

#### *Nośnik (w stosownych przypadkach):*

- uzasadnienie wyboru nośnika, jeśli jest inny niż woda.

#### *Zwierzęta doświadczalne:*

- wykorzystany gatunek/szczep,
- liczba, wiek i płeć zwierząt,
- źródło pochodzenia, warunki utrzymywania, pasza itp.,
- masa ciała poszczególnych zwierząt na początku badania,



- uzasadnienie wyboru gatunku, jeśli jest inny niż szczur.

*Warunki badania:*

- uzasadnienie wyboru poziomu dawkowania,
- szczegóły dotyczące postaci użytkowej badanej substancji chemicznej/przygotowania pokarmu, osiągnięte stężenie, stabilność i jednorodność preparatu,
- szczegółowe informacje dotyczące podawania badanej substancji chemicznej,
- wskaźnik konwersji stężenia badanej substancji chemicznej w pokarmie / wodzie pitnej (ppm) do dawki rzeczywistej (mg/kg masy ciała/dzień), jeśli ma to zastosowanie,
- szczegółowe informacje dotyczące jakości pokarmu i wody,
- szczegółowy opis procedury randomizacji stosowanej do doboru młodych do eliminacji w przypadku, gdy się jej dokonuje.

*Wyniki:*

- masa ciała / zmiany masy ciała,
- spożycie pokarmu, spożycie wody (jeżeli dane są dostępne),
- dane dotyczące efektu toksycznego ze względu na płć i dawkę, włączając płodność, ciążę i wszelkie inne objawy toksyczności,
- długość trwania ciąży,
- skutki toksyczne lub inne wywierane na reprodukcję, potomstwo, wzrost pourodzeniowy itp.,
- rodzaj, nasilenie i czas trwania obserwowanych objawów klinicznych (tak odwracalnych, jak i nieodwracalnych),
- liczba dorosłych samic, u których występuje normalny lub nienormalny cykl estrogenowy i czas trwania cyklu,
- liczba młodych urodzonych żywo i strat poimplantacyjnych,
- dane dotyczące masy ciała młodego,
- odległość anogenitalna u wszystkich młodych (oraz masa ciała na dzień pomiaru odległości anogenitalnej),
- zatrzymywanie płynu w brodawkach u młodych płci męskiej,
- poziom hormonów tarczycy, młode w 13. dniu zucia i dorosłe samce (oraz matki i młode w 4. dniu życia, jeśli dokonano pomiaru),
- liczba młodych z wyraźnie widocznymi nieprawidłowościami, ocena wzrokowa zewnętrznych narządów płciowych, liczba słabowitych młodych w miocie,

- czas zgonu podczas badania lub informacja o tym, czy zwierzęta przetrwały do czasu zakończenia badania,
- liczba zagnieżdżeń, liczebność miotu i masa poszczególnych młodych w miocie w momencie rejestracji,
- masa ciała w chwili uśmiercenia oraz masa narządów u zwierząt rodzicielskich,
- wyniki autopsji,
- szczegółowy opis wyników badania histopatologicznego,
- dane dotyczące absorpcji (jeżeli są dostępne),
- w stosownych przypadkach statystyczne opracowanie wyników.

*Omówienie wyników.*

*Wnioski*

### **Interpretacja wyników**

56. Badanie dostarczy ocen toksyczności reprodukcyjnej/rozwojowej związanej z zastosowaniem powtarzanego dawkowania (zob. pkt 5 i 6). Może ono stanowić wskazówkę co do potrzeby prowadzenia dalszych badań i stanowić wskazówkę przy projektowaniu kolejnych badań. Przy interpretowaniu wyników dotyczących rozrodczości i rozwoju pomocny może być dokument zawierający wytyczne OECD nr 43 (12). Wytyczne OECD nr 106 w sprawie oceny histologicznej badań endokrynologicznych i reprodukcyjnych u gryzoni („OECD Guidance Document No 106 on Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents”) (11) zawierają informacje na temat przygotowania i oceny narządów (endokrynologicznych) i rozmazów śluzówki pochwy, które mogą być pomocne w odniesieniu do tej wytycznej dotyczącej badań.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) OECD (1990). *Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee*. Dokument dostępny na wniosek w Organizacji Współpracy Gospodarczej i Rozwoju w Paryżu.
- (2) OECD (1992). *Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods*, Tokio, 27–29 października 1992. Dokument dostępny na wniosek w Organizacji Współpracy Gospodarczej i Rozwoju w Paryżu.
- (3) OECD (1998). *Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force*, 10–11 marca 1998 r. Dokument dostępny na wniosek w Organizacji Współpracy Gospodarczej i Rozwoju w Paryżu.
- (4) OECD (2015). *Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints*. [W:] Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr 217). Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.
- (5) OECD (2000). *Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations*. [w:] seria dotycząca badań i oceny nr 19. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.
- (6) OECD (2011). *Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption*. [w:] Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 150. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.
- (7) Goldman, J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M. i Cooper R.L. (2007). *The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies*. „Birth Defects Research” część B nr 80 (2), s. 84–97.
- (8) Sadleir R.M.F.S (1979). *Cycles and Seasons*, w: C.R. Auston i R.V. Short, (red.), *Reproduction in Mammals, I. Germ Cells and Fertilization*. Cambridge, Nowy Jork.
- (9) Gallavan R.H. Jr, Holson J.F., Stump D.G., Knapp J.F. i Reynolds V.L.(1999). *Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights*. „Reproductive Toxicology” nr 13, s. 383–390.
- (10) OECD (2013). *Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study*, [W:] Environment,

Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr 151).  
Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

- (11) OECD (2009). *Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents*. [w:] Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 106. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.
- (12) OECD (2008). *Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment*. [W:] Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr 43). Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

## **Dodatek 1**

### **DEFINICJE (ZOB. RÓWNIEŻ WYTYCZNA OECD NR 150 (6))**

Działanie androgenowe jest to zdolność substancji chemicznej do działania przypominającego działanie naturalnego hormonu androgenowego (np. testosteronu) w organizmach ssaków.

Działanie antyandrogenowe jest to zdolność substancji chemicznej do hamowania działania naturalnego hormonu androgenowego (np. testosteronu) w organizmach ssaków.

Działanie antyestrogenowe jest to zdolność substancji chemicznej do hamowania działania naturalnego hormonu estrogenowego (np. 17 $\beta$ -estradiolu) w organizmach ssaków.

Działanie antytyroidowe jest to zdolność substancji chemicznej do hamowania działania naturalnego hormonu tarczycy (np. T<sub>3</sub>) w organizmach ssaków.

Substancja chemiczna oznacza substancję lub mieszaninę.

Toksyczność rozwojowa: objawy toksyczności reprodukcyjnej, reprezentujące zaburzenia przedporodowe, okołoporodowe, poporodowe, strukturalne lub czynnościowe u potomstwa.

Dawkowanie jest terminem ogólnym obejmującym dawkę, częstotliwość i czas trwania dawkowania.

Dawka jest to ilość podawanej badanej substancji chemicznej. Dawkę wyraża się jako masę badanej substancji chemicznej na jednostkę masy ciała zwierzęcia doświadczalnego na dzień (np. mg/kg masy ciała/dzień) lub jako stałe stężenie w diecie.

Wyrażna toksyczność jest to określenie ogólne opisujące wyraźne oznaki toksyczności występujące po podaniu badanej substancji chemicznej. Powinny one być wystarczające do oceny ryzyka i mieć taki charakter, że można oczekiwać, iż zwiększenie podawanej dawki spowoduje pojawienie się silnych oznak toksyczności i prawdopodobną śmiertelność.

Upośledzenie płodności oznacza zaburzenie funkcji reprodukcyjnych lub zdolności reprodukcyjnych samców lub samic.

Toksyczność matczyna: niekorzystny skutek dla ciężarnych samic, występujący swoiście (skutek bezpośredni) lub nieswoiście (skutek pośredni).

NOAEL jest to skrót oznaczający poziom dawkowania, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian. Jest to najwyższy poziom dawkowania, przy którym nie obserwuje się szkodliwych efektów związanych z podawaniem substancji na skutek jej podawania.

Działanie estrogenowe jest to zdolność substancji chemicznej do działania przypominającego działanie naturalnego hormonu estrogenowego (np. 17 $\beta$ -estradiolu) w organizmach ssaków.

Toksyczność reprodukcyjna oznacza szkodliwy wpływ na potomstwo lub upośledzenie funkcji lub zdolności reprodukcyjnych u samców i samic.

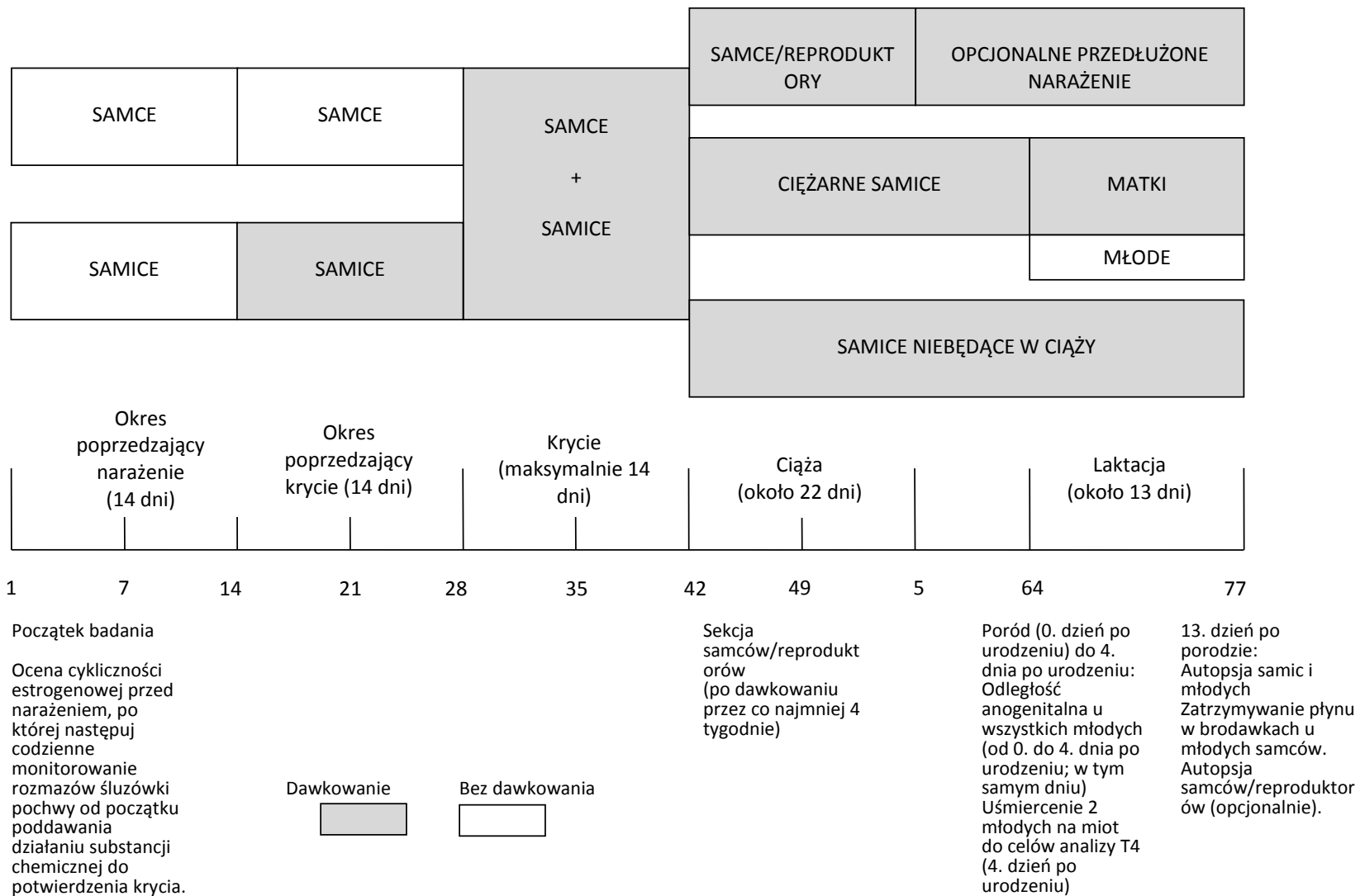
Badana substancja chemiczna oznacza każdą substancję lub mieszaninę badaną za pomocą niniejszej metody badawczej.

Działanie tyroidowe jest to zdolność substancji chemicznej do działania przypominającego działanie naturalnego hormonu tarczycy (np.  $T_3$ ) w organizmach ssaków.

Walidacja jest to proces naukowy mający na celu scharakteryzowanie wymogów operacyjnych i ograniczeń metody badawczej i wykazanie jej wiarygodności oraz odpowiedniości do danego celu.

## **Dodatek 2**

**Schemat eksperymentalnego planu wskazujący maksymalny czas trwania badania, oparty na pełnym 14-dniowym okresie krycia**





### Dodatek 3

## TABELARYCZNE SPRAWOZDANIE PODSUMOWUJĄCE WPLYW NA REPRODUKCJĘ/ROZWÓJ

| OBSERWACJE                                                                                  | WARTOŚCI            |         |         |         |         |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|---------|---------|---------|---------|
| Dawkowanie (jednostki)                                                                      | 0<br>(kontrola<br>) | ..<br>. | ..<br>. | ..<br>. | ..<br>. |
| Zapoczątkowane pary (N)                                                                     |                     |         |         |         |         |
| Cykl estrogenowy (co najmniej średnia długość i częstość występowania nieregularnych cykli) |                     |         |         |         |         |
| Samice wykazujące oznaki kopulacji (N)                                                      |                     |         |         |         |         |
| Samice zachodzące w ciążę (N)                                                               |                     |         |         |         |         |
| Dni poczęcia 1–5 (N)                                                                        |                     |         |         |         |         |
| Dni poczęcia 6–. . <sup>(1)</sup> (N)                                                       |                     |         |         |         |         |
| Ciąża ≤ 21 dni (N)                                                                          |                     |         |         |         |         |
| Ciąża = 22 dni (N)                                                                          |                     |         |         |         |         |
| Ciąża ≥ 23 dni (N)                                                                          |                     |         |         |         |         |
| Matki z urodzonymi żywymi młodymi (N)                                                       |                     |         |         |         |         |
| Matki z żywymi młodymi w 4. dniu po porodzie (N)                                            |                     |         |         |         |         |
| Implanty/matka (średnia)                                                                    |                     |         |         |         |         |
| Żywe młode/matkę przy porodzie (średnia)                                                    |                     |         |         |         |         |
| Żywe młode/matka w 4 dniu (średnia)                                                         |                     |         |         |         |         |
| Proporcja płci (samiec/samica) przy porodzie (średnia)                                      |                     |         |         |         |         |
| Proporcja płci (samiec/samica) w 4 dniu (średnia)                                           |                     |         |         |         |         |
| Masa miotu przy porodzie (średnia)                                                          |                     |         |         |         |         |

---

<sup>(1)</sup> ostatni dzień okresu krycia

|                                                                                                                                                          |  |  |  |  |  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|--|--|--|--|
| Masa miotu w 4 dniu (średnia)                                                                                                                            |  |  |  |  |  |
| Masa ciała młodego przy porodzie (średnia)                                                                                                               |  |  |  |  |  |
| Masa ciała młodego przy pomiarze odległości anogenitalnej (średnia dla samców, średnia dla samic)                                                        |  |  |  |  |  |
| Odległość anogenitalna młodego w tym samym dniu po urodzeniu, urodzenie – 4. dzień (średnia dla samców, średnia dla samic, zaznaczyć dzień po urodzeniu) |  |  |  |  |  |
| Masa ciała młodego w 4 dniu (średnia)                                                                                                                    |  |  |  |  |  |
| Zatrzymywanie płynu w brodawkach u młodych płci męskiej w 13 dniu (średnia)                                                                              |  |  |  |  |  |
| Masa ciała młodego w 13 dniu (średnia)                                                                                                                   |  |  |  |  |  |
| <b>MŁODE Z ZABURZENIAMI</b>                                                                                                                              |  |  |  |  |  |
| Matki z 0                                                                                                                                                |  |  |  |  |  |
| Matki z 1                                                                                                                                                |  |  |  |  |  |
| Matki z $\geq 2$                                                                                                                                         |  |  |  |  |  |
| <b>UTRATA POTOMSTWA</b>                                                                                                                                  |  |  |  |  |  |
| <b>Przedurodzeniowe/postimplantacyjne (implantacje minus żywe urodzenia)</b>                                                                             |  |  |  |  |  |
| Samice z 0                                                                                                                                               |  |  |  |  |  |
| Samice z 1                                                                                                                                               |  |  |  |  |  |
| Samice z 2                                                                                                                                               |  |  |  |  |  |
| Samice z $\geq 3$                                                                                                                                        |  |  |  |  |  |
| <b>Pourodzeniowe (żywe urodzenia minus żywe 13. dnia po urodzeniu)</b>                                                                                   |  |  |  |  |  |
| Samice z 0                                                                                                                                               |  |  |  |  |  |
| Samice z 1                                                                                                                                               |  |  |  |  |  |
| Samice z 2                                                                                                                                               |  |  |  |  |  |
| Samice z $\geq 3$                                                                                                                                        |  |  |  |  |  |

## **B.64 POŁĄCZONE BADANIE Z UŻYCIEM DAWKI POWTARZANEJ I BADANIE KLASYFIKACYJNE TOKSYCZNOŚCI REPRODUKCYJNEJ/ROZWOJOWEJ**

### **WPROWADZENIE**

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej dotyczącej badań OECD nr 422 (2016). Okresowo dokonuje się przeglądu wytycznych OECD dotyczących badania substancji chemicznych pod kątem postępu naukowego. Pierwotna wytyczna dotycząca badań klasyfikacyjnych nr 422 została przyjęta w 1996 r. na podstawie protokołu „Połączone badanie z użyciem dawki powtarzanej i badanie klasyfikacyjne reprodukcyjne/rozwojowe (Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Screening Test)” omówionego na dwóch posiedzeniach ekspertów: w Londynie w 1990 r. (1) i w Tokio w 1992 r. (2).
2. Niniejsza metoda badawcza łączy część dotyczącą badań klasyfikacyjnych toksyczności reprodukcyjnej/rozwojowej, która opiera się na doświadczeniu zdobytym w państwach członkowskich w związku ze stosowaniem pierwotnej metody w odniesieniu do istniejących substancji chemicznych produkowanych w dużych objętościach oraz w badaniach eksploracyjnych z substancjami służącymi do kontroli dodatkowej (3) (4), oraz część dotyczącą badania toksyczności z użyciem dawki powtarzanej, zgodnie z wytyczną dotyczącą badań OECD nr 407 (28-dniowe badanie toksyczności doustnej wywołanej powtarzanym dawkowaniem u gryzoni, odpowiadająca rozdziałowi B.7 niniejszego załącznika).
3. Niniejsza metoda badawcza została zaktualizowana o właściwe punkty końcowe dotyczące substancji zaburzającej funkcjonowanie układu hormonalnego w ramach działań następczych do działania o wysokim priorytecie podjętego przez OECD w 1998 r., mającego na celu zmianę istniejących wytycznych i opracowanie nowych wytycznych dotyczących badań klasyfikacyjnych i badania potencjalnych substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego (5). W tym kontekście wytyczną dotyczącą badań nr 407 (opowiadającą rozdziałowi B.7 niniejszego załącznika) wzbogacono w 2008 r. o parametry odpowiednie do wykrywania aktywności endokrynologicznej badanych substancji chemicznych. Celem aktualizacji wytycznej dotyczącej badań nr 422 było uwzględnienie niektórych właściwych punktów końcowych substancji zaburzającej funkcjonowanie układu hormonalnego w badaniach klasyfikacyjnych TG, gdzie okresy narażenia obejmują niektóre wrażliwe okresy w rozwoju (okresy przed lub wcześniej po urodzeniu).
4. Wybrane dodatkowe właściwe punkty końcowe dotyczące substancji zaburzającej funkcjonowanie układu hormonalnego, stanowiące również część wytycznej dotyczącej badań nr 443 (Rozszerzone badanie toksyczności reprodukcyjnej w jednym pokoleniu, odpowiadająca rozdziałowi B.56 niniejszego załącznika), zostały włączone do wytycznej

dotyczącej badań nr 422 na podstawie studium wykonalności dotyczącego kwestii naukowych i technicznych związanych z ich włączeniem, jak również możliwych dostosowań projektu badań potrzebnych do ich włączenia (6).

5. Niniejsza metoda badawcza ma na celu wygenerowanie ograniczonej ilości informacji dotyczących wpływu badanej substancji chemicznej na efektywność reprodukcyjną samców i samic, taką jak funkcja gonad, zachowanie kopulacyjne, zapłodnienie, rozwój jaja płodowego i poród. Nie jest ona metodą alternatywną dla istniejących metod badań B.31, B.34, B.35 lub B.56, ani ich nie zastępuje.

## **ZAŁOŻENIA WSTĘPNE**

6. Przy szacowaniu i ocenie właściwości toksycznych badanej substancji chemicznej oznaczenie toksyczności doustnej przy zastosowaniu powtarzanego dawkowania można prowadzić po uzyskaniu początkowej informacji o toksyczności na podstawie badań toksyczności ostrej. Badanie to dostarcza informacji na temat możliwych zagrożeń dla zdrowia, które mogą wynikać z powtarzającego się narażenia przez stosunkowo ograniczony czas. Metoda obejmuje podstawowe badanie toksyczności wywołanej powtarzanym dawkowaniem, które można przeprowadzić w przypadku substancji chemicznych, dla których nie ma obowiązku wykonania badania 90-dniowego (np. wtedy, gdy wielkość produkcji nie przekracza pewnych limitów) lub jako badanie wstępne do badania długoterminowego. Przy prowadzeniu badania należy przestrzegać zasad i ustaleń określonych w dokumencie zawierającym wytyczne OECD nr 19 „Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluations” (7) (Wytyczne dotyczące uznawania, oceny i wykorzystywania objawów klinicznych jako punktów humanitarnego zakończenia w odniesieniu do zwierząt doświadczalnych wykorzystywanych w ocenach bezpieczeństwa).
7. Ponadto obejmuje ono badanie klasyfikacyjne toksyczności reprodukcyjnej/rozwojowej, a zatem może być również wykorzystywane w celu dostarczenia wstępnych informacji na temat możliwych skutków dla sprawności reprodukcyjnej samców i samic, takich jak funkcja gonad, zachowanie kopulacyjne, zapłodnienie, rozwój jaja płodowego i poród, albo na wczesnym etapie oceny właściwości toksykologicznych badanych substancji chemicznych lub na przedmiotowe badane substancje chemiczne. Niniejsza metoda badawcza nie zapewnia pełnych informacji na temat wszystkich aspektów reprodukcji i rozwoju. W szczególności oferuje jedynie ograniczone środki wykrywania poporodowych przejawów narażenia prenatalnego lub skutków, które mogą być wywołane podczas narażenia postnatalnego. Ze względu (między innymi) na selektywność punktów końcowych oraz krótki czas trwania badania, metoda ta nie dostarczy dowodów na definitywne stwierdzenie braku skutków reprodukcyjnych/rozwojowych. Ponadto wobec braku danych z innych badań toksyczności reprodukcyjnej/rozwojowej, wyniki dodatnie są

przydatne do wstępnej oceny zagrożeń i przyczyniają się do podejmowania decyzji dotyczących konieczności i terminów dodatkowych badań.

8. Wyniki uzyskane za pomocą parametrów związanych z układem hormonalnym należy rozpatrywać w kontekście dokumentu „OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals” („Ramy koncepcyjne OECD dotyczące testowania i oceny substancji chemicznych zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego”) (8). W niniejszych ramach koncepcyjnych rozszerzona wytyczna dotyczącej badań OECD nr 422 zawarta jest na poziomie 4 jako test *in vivo* dostarczający danych na temat niekorzystnego wpływu na właściwe punkty końcowe dotyczące układu hormonalnego. Sygnał endokrynnny może jednak nie być uważany za wystarczający dowód na to, że badana substancja chemiczna jest substancją zaburzającą funkcjonowanie układu hormonalnego.
9. Metoda badawcza kładzie również nacisk na objawy neurologiczne jako określony punkt końcowy, i podkreślana jest konieczność uważnych obserwacji klinicznych zwierząt, w celu otrzymania możliwie największej ilości informacji. Metoda ta powinna identyfikować chemikalia o potencjale neurotoksycznym, które mogą również dawać podstawy do dalszego dogłębnego badania tego aspektu. Ponadto metoda ta może również w podstawowym zakresie może wskazywać na skutki dla układu immunologicznego.
10. Wobec braku danych z innych badań toksyczności ogólnoustrojowej, toksyczności reprodukcyjnej/rozwojowej, neurotoksyczności lub immunotoksyczności, wyniki dodatnie są przydatne do wstępnej oceny zagrożeń i przyczyniają się do podejmowania decyzji dotyczących konieczności i terminów dodatkowych badań. Badanie może być szczególnie użyteczne jako część Screening Information Data Set (SIDS) OECD do oceny istniejących substancji chemicznych, w odniesieniu do których istnieje niewiele lub nie ma dostępnych informacji toksykologicznych i może służyć jako metoda alternatywna dla przeprowadzenia dwóch oddzielnych badań, odpowiednio toksyczności z użyciem dawki powtarzanej (wytyczna dotycząca badań OECD nr 407, odpowiadająca rozdziałowi B.7 niniejszego załącznika) i toksyczności reprodukcyjnej/rozwojowej (wytyczna dotycząca badań OECD nr 421, odpowiadająca rozdziałowi B.63 niniejszego załącznika). Może być również stosowana jako badanie ustalające zakres dawek dla bardziej ekstensywnych badań nad rozrodczością/rozwojem, lub w przypadku gdy jest to uznane za istotne w inny sposób.
11. Zakłada się zasadniczo, że istnieją różnice w czułości między zwierzętami ciężarnymi a tymi niebędącymi w ciąży. W związku z tym określenie w ramach tego badania łączonego poziomów dawek, które wystarczają do oceny zarówno ogólnej toksyczności ogólnoustrojowej i specyficznej toksyczności reprodukcyjnej i rozwojowej, może być bardziej skomplikowane niż w przypadku przeprowadzenia indywidualnych badań odrębnie. Interpretacja wyników badania w odniesieniu do ogólnej toksyczności

ogólnoustrojowej może być ponadto trudniejsze niż przeprowadzanie odrębnego badania dawki powtórzonej, w szczególności kiedy parametry dotyczące surowicy i histopatologii nie są poddane ocenie w tym samym punkcie czasu badania. Ze względu na te złożoności techniczne przeprowadzenie tego łączonego badania klasyfikacyjnego wymaga znacznego doświadczenia w badaniu toksyczności. Z drugiej strony badanie łączne może, poza wykorzystaniem mniejszej liczby osób, stanowić lepszy sposób odróżnienia bezpośrednich skutków dotyczących reprodukcji i rozwoju od tych, które są drugorzędne względem innych skutków (ogólnoustrojowych).

12. Okres dawkowania jest dłuższy w tym badaniu niż w standardowym 28-dniowym badaniu dawki powtórzonej. Wykorzystuje się w nim jednak mniej zwierząt obojga płci w poszczególnych grupach w porównaniu z sytuacją, w której przeprowadza się standardowe 28-dniowe badanie dawki powtórzonej poza badaniem klasyfikacyjnym toksyczności reprodukcyjnej i rozwojowej.
13. Niniejsza metoda badawcza zakłada doustną drogę podawania badanej substancji chemicznej. W przypadku stosowania innych dróg narażenia, może być konieczne dokonanie modyfikacji.
14. Przed zastosowaniem przedmiotowej metody badawczej z użyciem mieszaniny w celu zgromadzenia danych na potrzeby założonego celu regulacyjnego należy zastanowić się, czy zastosowanie tej metody może doprowadzić do uzyskania wyników odpowiednich z punktu widzenia tego celu, a jeżeli tak, to dlaczego. Przeprowadzenie takiej analizy nie jest konieczne, jeżeli ustanowiono wymóg regulacyjny dotyczący badania danej mieszaniny.
15. Stosowane definicje znajdują się w dodatku 1.

## **ZASADA BADANIA**

16. Badana substancja chemiczna podawana jest w stopniowanych dawkach kilku grupom samców i samic. Samce powinny otrzymywać dawki przez co najmniej cztery tygodnie do dnia przed planowanym uśmierceniem włącznie (obejmuje to co najmniej dwa tygodnie przed kryciem, w okresie krycia i około dwóch tygodni po kryciu). Ze względu na ograniczone dawkowanie przed kryciem u samców, płodność nie może być szczególnie czułym wskaźnikiem toksyczności w odniesieniu do jąder. W związku z tym niezbędne jest szczegółowe badanie histologiczne jąder. Uważa się, że połączenie dwutygodniowego okresu dawkowania w okresie przed kojarzeniem i późniejszych obserwacji krycia/płodności z ogólnym okresem dawkowania wynoszącym co najmniej cztery tygodnie, po którym następuje szczegółowa histopatologia gonad samców, jest wystarczające do wykrycia większości wpływu na płodność i spermatogenezę samców.

17. Samice powinny otrzymywać dawki przez cały czas trwania badania. Obejmuje to dwa tygodnie przed kryciem (w celu objęcia co najmniej dwóch pełnych cykli estrogenowych), zmienny czas do zapłodnienia, czas trwania ciąży i co najmniej trzynastie dni po porodzie, do dnia planowanego uśmiercenia włącznie.
18. Czas trwania badania, po aklimatyzacji i ocenie cyklu estrogenowego przed dawkowaniem, zależy od efektywności samic i wynosi około 63 dni, [co najmniej 14 dni okresu przed kojarzeniem, (do) 14 dni krycia, 22 dni ciąży, 13 dni laktacji].
19. Podczas okresu dawkowania każdego dnia zwierzęta są dokładnie obserwowane w celu wykrycia oznak toksyczności. Zwierzęta, które zginą lub zostaną uśmiercone w okresie badania, są poddawane autopsji, a zwierzęta, które przeżyją, są po zakończeniu badania uśmiercane i poddawane autopsji.

## **OPIS METODY**

### **Wybór gatunku zwierząt**

20. Niniejsza metoda badawcza jest przeznaczona do stosowania z wykorzystaniem szczurów. W przypadku gdy parametry określone w TG 422 badane są z wykorzystaniem innego gatunku gryzoni, należy podać uzasadnienie. Szczur był jedynym gatunkiem wykorzystywanym w międzynarodowym programie walidacyjnym dotyczącym substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego w oparciu o TG 407. Nie należy stosować szczepów o niskiej płodności lub powszechnie znanej wysokiej częstości występowania wad rozwojowych. Należy wykorzystać zdrowe zwierzęta dziewicze, które nie były wcześniej poddawane procedurom badawczym. Badane zwierzęta należy scharakteryzować z uwzględnieniem ich gatunku, szczepu, płci, masy i wieku. W momencie rozpoczęcia badania różnice w masie ciała wykorzystywanych zwierząt powinny być minimalne i nie powinny przekraczać  $\pm 20\%$  średniej masy ciała u każdej z płci. W przypadku gdy badanie przeprowadza się jako badanie wstępne w stosunku do badania długoterminowego lub pełnopakoleniowego, zaleca się, aby w obu badaniach wykorzystywać zwierzęta tego samego szczepu i źródła.

### **Warunki utrzymywania i karmienia**

21. Wszystkie procedury powinny być zgodne z lokalnymi normami utrzymywania zwierząt laboratoryjnych. Temperatura w pomieszczeniu, w którym przetrzymuje się zwierzęta doświadczalne, powinna wynosić  $22^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 3^{\circ}$ ). Wilgotność względna, poza okresem sprzątania pomieszczenia, powinna wynosić co najmniej 30 % i najlepiej byłoby, gdyby utrzymywała się na poziomie 70 %. Oświetlenie powinno być sztuczne w cyklu 12 godzin z dostępem światła i 12 godzin bez dostępu światła. Do żywienia można stosować konwencjonalne pasze laboratoryjne z nieograniczonym dostępem do wody pitnej. Na

wybór paszy może mieć wpływ potrzeba zapewnienia odpowiedniej domieszki badanej substancji chemicznej w przypadku podawania jej w ramach opisywanej metody.

22. Zwierzęta należy przetrzymywać razem, w małych grupach składających się z osobników tej samej płci; można je przetrzymywać pojedynczo, jeżeli ma to naukowe uzasadnienie. W przypadku przetrzymywania w grupach, w jednej klatce należy umieszczać nie więcej niż pięć zwierząt. Procedury krycia powinny być przeprowadzane w klatkach nadających się do tego celu. Ciężarne samice powinny być przetrzymywane w osobnych klatkach i mieć zapewnione materiały do budowy gniazda. Samice w okresie ciąży będą przebywać w indywidualnych klatkach ze swoim potomstwem.
23. Paszę należy regularnie analizować pod kątem obecności zanieczyszczeń. Próbkę paszy należy zachować do momentu ukończenia sprawozdania.

### **Przygotowanie zwierząt**

24. Zdrowe młode dorosłe osobniki zwierząt wybiera się losowo i przypisuje do grup poddawanych działaniu substancji i do klatek. Klatki należy rozmieścić w taki sposób, aby zminimalizować potencjalny wpływ ich układu. Zwierzęta są identyfikowane jednoznacznie i przetrzymywane w klatkach przez co najmniej pięć dni przed rozpoczęciem badania, żeby umożliwić aklimatyzację do warunków laboratoryjnych.

### **Przygotowanie dawek**

25. Zaleca się, aby badana substancja chemiczna była podawana doustnie, chyba że za bardziej odpowiednią uzna się inną drogę podawania. W przypadku wybrania doustnej drogi podawania, badaną substancję chemiczną zazwyczaj podaje się za pomocą sondy; można jednak również zastosować metodę alternatywną polegającą na podaniu badanych substancji chemicznych w paszy lub w wodzie do picia.
26. W razie potrzeby badaną substancję chemiczną rozpuszcza się lub przygotowuje jako zawiesinę w odpowiednim nośniku. Zaleca się, w miarę możliwości, najpierw rozważyć zastosowanie roztworu wodnego/zawiesiny, następnie roztworu/zawiesiny w oleju (np. z zastosowaniem oleju kukurydzianego), a potem możliwego roztworu w innych nośnikach. W przypadku zastosowania nośników niewodnych właściwości toksyczne danego nośnika powinny być znane. Należy określić stabilność i jednorodność badanej substancji chemicznej w nośniku.

## **PROCEDURA**

### **Liczba i płeć zwierząt**

27. Zaleca się, aby w każdej grupie na początku znajdowało się co najmniej 10 samców i 12–13 samic. Ocena samic będzie prowadzona przed narażeniem pod kątem cykliczności estrogenowej, a do badania nie zostaną włączone zwierzęta, które nie wykażą typowych 4–



5 dniowych cykli; w związku z tym zaleca się zastosowanie dodatkowych samic w celu uzyskania 10 samic w każdej grupie. Poza przypadkiem, w którym występują wyraźne efekty toksyczne, oczekuje się, że zapewni to co najmniej 8 ciężarnych samic na grupę, co zazwyczaj stanowi najniższą dopuszczalną liczbę ciężarnych samic na grupę. Celem jest wyprodukowanie odpowiedniej liczby ciąż i potomstwa w celu zapewnienia znaczącej oceny wpływu badanej substancji chemicznej na płodność, ciążę, zachowanie macierzyńskie i zwierząt ssących oraz wzrost i rozwój potomstwa F<sub>1</sub> w okresie od chwili poczęcia do 13 dnia po porodzie. Jeśli planuje się uśmiercanie w trakcie badania, liczbę należy zwiększyć o liczbę zwierząt przeznaczonych do uśmiercenia przed zakończeniem badań. Należy rozważyć włączenie dodatkowej satelitarnej grupy pięciu zwierząt obojga płci do grupy kontrolnej i grupy otrzymującej najwyższe dawki w celu obserwacji odwracalności, trwałości lub opóźnionego występowania skutków toksycznych przez co najmniej 14 dni po zakończeniu podawania substancji. Zwierzęta wchodzące w skład grup satelitarnych nie będą kryte, a zatem nie zostaną wykorzystane w ocenie toksyczności reprodukcyjnej/rozwojowej.

## **Dawkowanie**

28. Zasadniczo należy wykorzystać co najmniej trzy grupy badane i jedną grupę kontrolną. Jeżeli nie ma dostępu do odpowiednich danych dotyczących ogólnej toksyczności, można wykonać badanie ustalające zakres (z wykorzystaniem zwierząt tego samego szczepu, pochodzących z tego samego źródła) w celu określenia dawek, które mają być zastosowane. Z wyjątkiem podawania badanej substancji chemicznej zwierzęta w grupie kontrolnej należy traktować w identyczny sposób jak zwierzęta w grupie badanej. Jeżeli przy podawaniu badanej substancji chemicznej jest stosowany nośnik, grupa kontrolna powinna otrzymać największą użytą objętość nośnika.
29. Poziomy dawki powinny być wybierane, biorąc pod uwagę jakiegokolwiek istniejące dostępne dane o toksyczności i dane toksykokinetyczne. Należy także wziąć pod uwagę, że mogą istnieć różnice w czułości między zwierzętami w ciąży a tymi niebędącymi w ciąży. Należy wybrać taki najwyższy poziom dawkowania, który powoduje oznaki toksyczności, ale nie zgon lub widoczne cierpienie. Następnie należy dobierać poziomy dawkowania w sekwencji malejącej w taki sposób, aby ukazać wszystkie reakcje powiązane z dawkowaniem i brak niekorzystnych zmian przy najmniejszym poziomie dawkowania. Często optymalne jest zastosowanie poziomów dawkowania różniących się od dwu- do czterokrotnie, a zamiast stosować bardzo odległe (np. różniące się więcej niż 10-krotnie) poziomy dawkowania, często lepiej jest dodać czwartą grupę badaną.
30. Jeśli obserwowana jest ogólna toksyczność (np. spadek masy ciała, wpływ na wątrobę, serce, płuca lub nerki itp.) bądź inne zmiany, które nie muszą być efektami toksycznymi (np. zmniejszone pobieranie pokarmu, powiększenie wątroby), należy zachować

ostrożność interpretując obserwowane skutki w punktach końcowych wpływu na układ hormonalny.

### **Badanie graniczne**

31. Jeżeli badanie z podawaniem doustnym przy jednym poziomie dawki równym co najmniej 1000 mg/kg masy ciała/dzień lub, w przypadku podawania w pożywieniu, równoważnej procentowej zawartości w pożywieniu lub wodzie pitnej (na podstawie ustalonej masy ciała), z zastosowaniem procedur opisanych dla tego badania, nie wywołuje widocznych efektów toksycznych i jeżeli nie należałoby spodziewać się toksyczności na podstawie danych dotyczących substancji strukturalnie pokrewnych, wówczas pełne badanie przy użyciu kilku poziomów dawki może nie być konieczne. Można zastosować badanie graniczne z wyjątkiem sytuacji, gdy narażenie ludzi wskazuje potrzebę zastosowania wyższego poziomu dawki. W odniesieniu do innych dróg podawania, na przykład wziewnej lub stosowania na skórę, fizyczne własności chemiczne badanych substancji chemicznych mogą często decydować o najwyższym możliwym do osiągnięcia narażeniu.

### **Podawanie dawek**

32. Zwierzętom podaje się badaną substancję chemiczną codziennie, przez siedem dni w tygodniu. Gdy badana substancja chemiczna jest podawana przez sondę, należy ją podawać zwierzętom w pojedynczej dawce przy użyciu sondy żołądkowej lub odpowiedniej kaniuli intubacyjnej. Maksymalna objętość płynu, jaką można podać jednorazowo, zależy od wielkości badanego zwierzęcia. Objętość ta nie powinna przekraczać 1 ml/100 g masy ciała, oprócz roztworów wodnych, w przypadku których można użyć 2 ml/100 g masy ciała. Poza drażniącymi lub żrącymi badanymi substancjami chemicznymi, które zwykle dają zaobserwowane objawy przy wyższych stężeniach, zmienność objętości w badaniu powinna być zminimalizowana przez dostosowanie stężenia, aby zapewnić stałą objętość przy wszystkich poziomach dawki.
33. W przypadku substancji chemicznych podawanych w paszy lub w wodzie do picia należy dopilnować, aby ilości podawanej badanej substancji chemicznej nie zakłócały zwykłego odżywiania lub gospodarki wodnej organizmu. Przy podawaniu badanej substancji chemicznej wraz z pokarmem można zastosować stałe stężenie w pokarmie (ppm) lub też stały poziom dawki w zależności od masy ciała zwierzęcia; należy podać zastosowany wariant. W przypadku badanej substancji chemicznej podawanej przez sondę, dawka powinna być podawana każdego dnia o podobnej porze i w razie konieczności modyfikowana co najmniej raz na tydzień, aby utrzymać stały poziom dawki w zależności od masy ciała zwierzęcia. W przypadku wykorzystania badania łączonego jako badania wstępnego przed badaniem długoterminowym lub pełnym badaniem toksyczności reprodukcyjnej, należy w obu badaniach stosować podobną dietę.

### **Harmonogram doświadczalny**

34. Podawanie dawek osobnikom obu płci należy rozpocząć co najmniej dwa tygodnie przed kryciem, co najmniej pięć dni po aklimatyzacji i po poddaniu samic badaniu przesiewowemu pod kątem normalnych cykli estrogenowych (przez dwa tygodnie przed okresem poddawania działaniu substancji). Badanie powinno być zaprogramowane w taki sposób, żeby ocena cyklu estrogenowego rozpoczynała się zaraz po osiągnięciu przez zwierzęta pełnej dojrzałości płciowej. Pod tym względem mogą występować nieznaczne różnice u różnych szczepów szczurów wykorzystywanych w różnych laboratoriach, np. szczury szczepu Sprague Dawley osiągają dojrzałość płciową po 10 tygodniach życia, a szczepu Wistar – po około 12 tygodniach. Matki posiadające potomstwo należy uśmiercić 13. dnia po porodzie lub wkrótce po tym dniu. Aby umożliwić wstrzymanie podawania zwierzętom pokarmu matkom przed pobraniem krwi (jeżeli preferuje się taki wariant), matki i ich potomstwo nie muszą być uśmiercone tego samego dnia. Dzień narodzin (tj. dzień zakończenia porodu) określa się jako dzień 0 po porodzie. Samice, u których nie zaobserwowano oznak kopulacji, uśmierca się po 24–26 dniach od ostatniego dnia okresu krycia. Dawkowanie należy kontynuować u obu płci przez okres krycia. Dawkowanie u samców należy nadal stosować po okresie krycia co najmniej do zakończenia minimalnego łącznego okresu dawkowania wynoszącego 28 dni. Następnie samce są uśmiercane lub ewentualnie zatrzymywane i kontynuuje się dawkowanie w celu ewentualnego drugiego krycia, jeśli uzna się to za stosowne.
35. Codziennie dawkowanie u rodzicielskich samic powinno dalej trwać przez cały okres ciąży, co najmniej do 13. dnia po porodzie włącznie, lub do dnia poprzedzającego uśmiercenie. W przypadku badań, w których badaną substancję chemiczną podaje się drogą wziewną lub skórną, dawkowanie powinno trwać co najmniej do 19. dnia ciąży włącznie i powinno zostać wznowione najszybciej jak to możliwe, nie później niż w czwartym dniu po urodzeniu.
36. Jeżeli uwzględniono zwierzęta z grupy satelitarnej przeznaczone do obserwacji uzupełniających, nie wykorzystuje się ich do krycia. Należy je trzymać przez co najmniej 14 kolejnych dni po pierwszym planowanym uśmierceniu matek bez podawania substancji w celu wykrycia opóźnionego pojawienia się, utrzymywania lub ustąpienia efektów toksyczności.
37. Diagram przedstawiający harmonogram doświadczenia znajduje się w dodatku 2.

### **Cykle estrogenowe**

38. Monitorowanie cykli estrogenowych powinno odbywać się przed rozpoczęciem poddawania działaniu substancji, aby do badania wybrać samice o regularnej cykliczności (zob. pkt 27). Należy także codziennie, od rozpoczęcia poddawania działaniu substancji do potwierdzenia krycia, monitorować rozmazy śluzówki pochwy. Jeżeli istnieje obawa o wystąpienie dotkliwych skutków stresu mogących zmienić cykle estrogenowe wraz z rozpoczęciem dawkowania, laboratoria mogą przez dwa tygodnie narażać zwierzęta

doświadczalne, a następnie przez co najmniej dwa tygodnie codziennie pobierać rozmazy śluzówki pochwy, by monitorować cykl estrogenowy w okresie poprzedzającym krycie i ciągle monitorować go w okresie krycia, aż do momentu zaistnienia oznak krycia. Przy pozyskiwaniu komórek pochwy/szyjki macicy należy zachować ostrożność, aby nie dopuścić do uszkodzenia błony śluzowej, które mogłoby wywoływać ciężą rzekomą (8)(9).

### **Procedura krycia**

39. Podczas tego badania należy zazwyczaj wykorzystywać krycia 1:1 (jeden samiec na jedną samicę). W przypadku wystąpienia sporadycznych zgonów samców mogą pojawić się wyjątki. Samicę należy umieścić razem z tym samym samcem na okres trwający do momentu odnotowania kopulacji lub dwa tygodnie. Każdego dnia rano samice należy poddać badaniu na obecność plemników lub czopa pochwowego. Dzień 0 ciąży określa się jako dzień, w którym potwierdzono wystąpienie krycia (wykrycie czopa pochwowego lub plemników). Jeśli kojarzenie w danej parze nie uda się, można rozważyć krycie samic samcami o dowiedzionej płodności.

### **Liczebność miotu**

40. Czwartego dnia po porodzie można skorygować liczebność każdego miotu, eliminując dodatkowe, losowo wybrane młode w miocie, by otrzymać, na ile to możliwe, cztery lub pięć samic i cztery lub pięć samców na miot, w zależności od typowej liczebności miotów w szczepie wykorzystanych szczurów. Próbkę krwi należy pobrać od dwóch młodych nieprzydzielonych do żadnej kohorty, zebrać je i wykorzystać do określenia poziomów surowicy T4. Selektywna eliminacja młodych, np. oparta na masie ciała lub odległości anogenitalnej, jest nieodpowiednia. Ilekroć liczba młodych samców lub samic uniemożliwia uzyskanie czterech lub pięciu osobników każdej płci na miot, dopuszczalne jest częściowe dostosowanie (na przykład sześć samców i cztery samice). Żadne młode nie zostanie wyeliminowane, gdy liczebność miotu spadnie poniżej celu eliminacji (8 lub 10 młodych/miot). Jeżeli dostępne jest tylko jedno młode powyżej celu eliminacji, tylko jedno młode zostanie wyeliminowane i wykorzystane do pobrania krwi do ewentualnej oceny surowicy T4.
41. Jeżeli liczebność miotu nie została skorygowana, dwa młode na miot uśmierca się 4. dnia po urodzeniu, a próbki krwi pobiera się do pomiaru stężeń hormonów tarczycy w surowicy. Jeżeli to możliwe, dwa młode na miot powinny stanowić młode samice, aby zachować młode samce na potrzeby ocen zatrzymywania płynu w brodawkach sutkowych, oprócz przypadku, w którym eliminacja tych młodych powoduje, że nie pozostaną żadne samice do oceny końcowej przy uśmiercaniu. Żadne młode nie zostanie wyeliminowane, gdy rozmiar miotu spadnie poniżej 8 lub 10 młodych/miot (w zależności od typowego rozmiaru miotu w szczepie wykorzystanych szczurów). Jeżeli dostępne jest tylko jedno młode powyżej typowej liczebności miotu, tylko jedno młode zostanie wyeliminowane i wykorzystane do pobrania krwi do ewentualnej oceny surowicy T4.

## Obserwacje

42. Ogólne obserwacje kliniczne powinny być przeprowadzane co najmniej raz dziennie, najlepiej każdego dnia o tej samej porze, biorąc pod uwagę szczytowy okres przewidywanych objawów po dawkowaniu. Należy rejestrować stan zdrowia zwierząt. Co najmniej dwa razy dziennie wszystkie zwierzęta poddaje się obserwacjom pod kątem zachorowalności i śmiertelności.
43. Dla wszystkich rodzicielskich zwierząt należy przeprowadzać szczegółowe obserwacje kliniczne: jeden raz przed pierwszym narażeniem (w celu umożliwienia porównania badanych zwierząt), a następnie co najmniej raz w tygodniu. Obserwacji należy dokonywać poza klatką zwierzęcia, najlepiej w warunkach standardowych i każdego dnia o tej samej porze. Obserwacje należy starannie odnotowywać najlepiej za pomocą systemów punktacji wyraźnie określonych przez laboratorium badawcze. Należy dołożyć starań w celu dopilnowania, aby odchylenia w warunkach badania były minimalne, preferowane jest prowadzenie obserwacji przez osoby, które nie wiedzą, jaka substancja jest podawana. Odnotowane objawy powinny obejmować między innymi zmiany w skórze, sierści, oczach, błonach śluzowych, wystąpienie wydzielin i wydaliny oraz aktywność autonomicznej części układu nerwowego (np. łzawienie, piloreksja, rozmiar źrenicy, zmieniony rytm oddychania). Należy odnotować także zmiany w sposobie chodzenia, postawie i reakcji na dotyk, jak również obecność ruchów klonicznych lub tonicznych, zachowań stereotypowych (np. nadmierne czyszczenie się, powtarzające się krążenie w kółko), trudny lub długotrwały poród oraz dziwne zachowania (np. samookaleczanie się, chodzenie do tyłu) (10).
44. Raz w ciągu badania należy przeprowadzić ocenę reaktywności na bodźce różnego typu (np. słuchowe, wzrokowe i czucia głębokiego) (8)(9)(11), ocenę siły uchwytu (12) oraz ocenę aktywności motorycznej (13) na pięciu samcach i pięciu samicach losowo wybranych z każdej z grup. Dalsze szczegółowe informacje na temat procedur, jakie można zastosować, podano w odpowiednich odniesieniach. Można jednak także zastosować również procedury inne niż te podane w odniesieniach. W przypadku samców danych obserwacji funkcjonalnych należy dokonać pod koniec ich okresu dawkowania, krótko przed planowanym uśmierceniem ale przed pobieraniem próbek krwi do analizy pod kątem hematologii lub chemii klinicznej (zob. pkt 53–56, w tym przypis 1). W trakcie tych badań funkcjonalnych samice powinny być w fizjologicznie podobnym stanie i najlepiej badać je raz w trakcie ostatniego tygodnia laktacji (np. LD 6–13), na krótko przed planowanym uśmierceniem. W miarę możliwości należy zminimalizować czas, w którym matki i młode przebywają osobno.
45. Obserwacje funkcjonalne przeprowadzane tylko raz odnośnie do końca badań mogą być pominięte, gdy badanie prowadzone jest jako badanie wstępne do późniejszego badania podchronicznego (90-dniowego) lub badania długofalowego. W takim przypadku obserwacje funkcjonalne należy zamieścić w tym badaniu uzupełniającym. Z drugiej

strony, dostępność danych dotyczących obserwacji czynnościowych z tego badania z powtarzanym dawkowaniem może zwiększyć możliwości doboru poziomów dawkowania do celów późniejszego badania toksyczności podprzewlekłej lub badania długofalowego.

46. Wyjątkowo można pominąć obserwacje czynnościowe również w odniesieniu do grup, które oprócz tego przejawiają oznaki toksyczności nasilone na tyle, że mogłyby znacznie zakłócić wykonanie badania funkcjonalnego.
47. Począwszy od dnia 0 ciąży należy odnotowywać i liczyć czas jej trwania. Każdy miot należy zbadać tak szybko po urodzeniu jak to możliwe, w celu ustalenia liczby i płci młodych, płodów urodzonych martwo, płodów urodzonych żywo, słabowitych młodych w miocie (młodych o znacznie mniejszych rozmiarach niż odpowiadające młode kontrolne) oraz obecności poważnych nieprawidłowości.
48. Należy zliczyć i ustalić płeć żywych młodych, a mioty należy zważyć w ciągu 24 godzin od porodu (w dniu 0 lub 1. dnia po porodzie) oraz co najmniej 4. i 13. dnia po porodzie. W dodatku do obserwacji dotyczących zwierząt rodzicielskich (zob. pkt 43 i 44), należy odnotować wszelkie nieprawidłowe zachowania potomstwa.
49. Odległość anogenitalną każdego młodego należy mierzyć w tym samym dniu po urodzeniu – między 0. a 4. dniem po urodzeniu. W dniu pomiaru odległości anogenitalnej należy dokonać pomiaru masy ciała młodego, a odległość anogenitalną należy znormalizować w odniesieniu do pomiaru wielkości młodego, najlepiej jako pierwiastek kwadratowy masy ciała (14). Liczbę brodawek sutkowych / otoczek brodawek u młodych samców należy mierzyć, według zaleceń zawartych w wytycznej OECD nr 151, 12. lub 13. dnia po urodzeniu (15).

### **Masa ciała i spożycie pokarmu/wody**

50. Samce i samice należy zważyć w pierwszym dniu dawkowania, a następnie co najmniej raz tygodniowo oraz w momencie zakończenia dawkowania. Samice w okresie ciąży należy ważyć w dniach 0, 7, 14 i 20 oraz w ciągu 24 godzin od porodu (w dniu 0 lub 1. dniu po porodzie), a także co najmniej 4. i 13. dnia po porodzie. Obserwacje te należy umieścić w sprawozdaniu oddzielnie w odniesieniu do każdego dorosłego zwierzęcia.
51. Przed kryciem, w okresie ciąży oraz laktacji spożycie pokarmu należy mierzyć co najmniej raz w tygodniu. W okresie krycia pomiar spożycia pokarmu nie jest obowiązkowy. W tych okresach należy także mierzyć spożycie wody, jeżeli badana substancja chemiczna podawana jest za pośrednictwem tego nośnika.

### **Hematologia**

52. W okresie badania na pięciu samcach i pięciu samicach losowo wybranych z każdej z grup należy jednorazowo przeprowadzić następujące analizy hematologiczne: hematokryt,

stężenia hemoglobiny, liczba erytrocytów, liczba retikulocytów, całkowita i różnicowa liczba leukocytów, liczba płytek krwi i pomiar czasu krzepnięcia krwi. Jeśli badana substancja chemiczna lub jej potencjalne metabolity mają właściwości utleniające lub podejrzewa się, że mogą mieć takie właściwości, należy również przeprowadzić inne oznaczenia, w tym stężenia methemoglobiny i ciałek Heintza.

53. Próbkę krwi należy pobierać z wyznaczonego miejsca. Podczas pobierania próbek samice powinny być w fizjologicznie podobnym stanie. Aby uniknąć utrudnień praktycznych związanych ze zmiennością na początku ciąży, pobrania próbek krwi samic można dokonać na końcu okresu poprzedzającego krycie, ponieważ jest to metoda alternatywna do pobierania próbek tuż przed, lub w ramach procedury eutanazji zwierząt. Najlepiej, by próbki krwi samców pobierać tuż przed eutanazją zwierząt lub jako element tej procedury. Ewentualnie pobieranie próbek krwi od samców można także przeprowadzić pod koniec okresu poprzedzającego krycie, w przypadku gdy ten punkt czasowy był preferowany u samic.

54. Próbkę krwi należy przechowywać we właściwych warunkach.

### **Biochemia kliniczna**

55. Oznaczenia biochemii klinicznej w celu zbadania głównych efektów toksycznych w tkankach, a w szczególności wpływu na nerki i wątrobę, powinny być wykonywane na próbkach krwi pobranych od wybranych pięciu samców i pięciu samic z każdej grupy. Zalecane jest wstrzymanie podawania pożywienia zwierzętom przez noc poprzedzającą pobranie krwi <sup>1</sup>. Badania osocza i surowicy powinny obejmować sód, potas, glukozę, cholesterol całkowity, mocznik, kreatyninę, białko całkowite i albuminę, co najmniej dwa enzymy wskazujące na skutki komórkowe w wątrobie (takie jak aminotransferaza alaninowa, aminotransferaza asparaginowa i dehydrogenaza sorbitolu) oraz kwasy żółciowe. W pewnych okolicznościach przydatnych informacji mogą dostarczyć pomiary dodatkowych enzymów (pochodzenia wątrobowego lub innego) oraz bilirubiny.

---

<sup>1</sup> W odniesieniu do niektórych pomiarów dotyczących surowicy i osocza, w szczególności dla glukozy, zaleca się wstrzymanie podawania pokarmu przez noc. Zalecenie to wynika głównie z faktu, że zwiększona zmienność, którą nieuchronnie powoduje nieprzerwanie podawania pokarmu, często maskuje bardziej subtelne skutki, co utrudnia interpretację wyników. Z drugiej jednak strony, niekarmienie przez noc może zakłócać ogólny metabolizm zwierząt (w ciąży), zaburzać laktację i zachowanie podczas karmienia i, w szczególności w badaniach żywieniowych, może zakłócać dzienne narażenie na działanie badanej substancji chemicznej. Jeżeli przyjęto wstrzymanie podawania pożywienia przez całą noc, biochemiczne oznaczenia kliniczne należy wykonać po przeprowadzeniu obserwacji czynnościowych w 4. tygodniu badania samców. Matki należy przetrzymać przez dodatkowy dzień po usunięciu młodych 13. dnia po urodzeniu). Matki nie powinny otrzymywać pokarmu w nocy z 13 na 14. dzień laktacji i należy wykorzystać krew z dnia uśmiercenia do celów ustalenia parametrów chemii klinicznej.

56. Próbkę krwi z określonego miejsca pobiera się według następującego planu:

- od co najmniej dwóch młodych na miot 4. dnia po urodzeniu, jeżeli liczba młodych na to pozwala (zob. pkt 40–41);
- od wszystkich matek oraz co najmniej dwóch młodych z każdego miotu przy zakończeniu badania 13. dnia; oraz
- od wszystkich dorosłych samców w dniu zakończenia badania.

Wszystkie próbki krwi przechowuje się w odpowiednich warunkach. Próbkę krwi pobraną od 13-dniowych młodych oraz dorosłych samców ocenia się pod kątem poziomów surowicy hormonów tarczycy (T4). Jeżeli uzna się za stosowne, przeprowadzana jest dalsza ocena T4 w próbkach krwi od matek oraz 4-dniowych młodych. Jeżeli uzna się to za stosowne, można przeprowadzić opcjonalny pomiar innych hormonów. Krew młodych z każdego miotu można połączyć do celów analizy hormonów tarczycy. Hormony tarczycy (T4 i TSH) zaleca się mierzyć jako „całkowite”.

57. Fakultatywnie u pięciu przypadkowo wybranych samców w każdej grupie można przeprowadzić następujące oznaczenia analityczne w moczu w ciągu ostatniego tygodnia badań; przejrzystość, objętość, osmolalność lub ciężar właściwy, pH, białka, glukoza i komórki krwi.

58. Dodatkowo należy rozważyć zastosowanie do badań surowicy znaczników ogólnego uszkodzenia tkanek. Inne oznaczenia, które powinny być przeprowadzone, jeżeli znane właściwości badanej substancji chemicznej mogą lub podejrzewa się, że mogą wpływać na pokrewne profile metaboliczne, obejmują wapń, fosforan, triglicerydy i glukozę po poście, hormony specyficzne, metahemoglobinę i cholinoesterazę. Kwestie te należy identyfikować indywidualnie dla każdego przypadku.

59. Na zmienność i wartości bezwzględne stężeń przy oznaczaniu hormonów mogą mieć wpływ następujące czynniki:

- czas uśmiercenia zwierzęcia w związku z dobową zmiennością stężeń hormonów;
- metoda uśmiercenia zastosowana w celu uniknięcia zbędnego stresu dla zwierząt, mogącego wpłynąć na stężenia hormonów;
- zestawy do oznaczania hormonów, których krzywe standardowe mogą się różnić.

60. Próbkę osocza przeznaczoną konkretnie do oznaczenia poziomu hormonów należy pobierać w porównywalnej porze dnia. Wartości liczbowe uzyskane w toku analizy stężeń hormonów różnią się w zależności od zastosowanego dostępnego w handlu zestawu testowego.

61. Jeżeli historyczne dane odniesienia są niewystarczające, należy rozważyć oznaczenie zmiennych hematologicznych i biochemii klinicznej przed rozpoczęciem podawania dawek



lub, lepiej, w grupie zwierząt niebędących zwierzętami doświadczalnymi. W przypadku samic dane muszą dotyczyć zwierząt w okresie laktacji.

## **PATOLOGIA**

### **Pełne rozpoznanie histopatologiczne**

62. Wszystkie dorosłe zwierzęta w badaniu powinny podlegać szczegółowemu pełnemu rozpoznaniu histopatologicznemu, które obejmuje staranne badanie zewnętrznej powierzchni ciała, wszystkich otworów ciała, jamy czaszkowej, klatki piersiowej i jamy brzusznej oraz ich zawartości. Szczególną uwagę należy zwrócić na organy układu rozrodczego. Należy odnotować liczbę miejsc zagnieżdżenia. Rozmazy śluzówki pochwy należy zbadać w dniu autopsji, aby określić stadium cyklu estrogenowego oraz umożliwić korelację z histopatologią organów rozrodczych samicy.
63. Jądra i najądrza, a także gruczoł krokowy i kanaliki nasienne z całymi gruczołami koagulującymi wszystkich dorosłych samców należy, w stosownym przypadku, wyczyścić z wszelkich przylegających tkanek, a ich mokrą masę należy pobrać jak najszybciej po dysekcji, aby zapobiec jej wyschnięciu. Ponadto opcjonalne masy narządów mogą w przypadku samców obejmować zespół mięśni dźwigacza odbytu i mięśni opuszkowo-jamistych, gruczoły Cowpera i żołądź, a w przypadku samic parę jajników (mokra masa) i macicę (wraz z szyjką); jeżeli są uwzględnione, masy te należy określić jak najszybciej po dysekcji. Należy zachować jajniki, jądra, najądrza, płciowe narządy dodatkowe i jakiegokolwiek narządy wykazujące makroskopowe zmiany patologiczne wszystkich dorosłych zwierząt.
64. Gruczoły tarczowe wszystkich dorosłych samców i samic oraz jednego młodego, 13-dniowego samca i samicy powinny być zakonserwowane w najwłaściwszym środku utrwalającym dla zamierzonych kolejnych badań histopatologicznych. Masę tarczycy można określić po utrwaleniu. Należy zachować dużą ostrożność przy okrawaniu i wykonywać je dopiero po utrwaleniu, w celu uniknięcia uszkodzenia tkanek. Mogłoby ono zakłócić analizę histopatologiczną. Próbkę krwi należy pobierać z wyznaczonego miejsca tuż przed eutanazją zwierząt lub jako element jej procedury i przechowywać w odpowiednich warunkach (zob. pkt 56).
65. Ponadto wątroby, nerki, nadnercza, grasice, śledziony, mózgi i serca co najmniej pięciu dorosłych, losowo wybranych z każdej grupy samców i samic (poza tymi, które znaleziono w agonii lub poddano eutanazji przed zakończeniem badania) należy wyczyścić z wszelkich przylegających tkanek, a ich mokrą masę, aby uniknąć wyschnięcia, należy pobrać możliwie najszybciej po dysekcji. Następujące tkanki powinny być zakonserwowane w najwłaściwszym środku utrwalającym dla obu typów tkanek i zamierzonych kolejnych badań histopatologicznych: wszystkie poważne zmiany patologiczne, mózg (reprezentatywne obszary, w tym kresomózgowie, mózdzek i most),

rdzeń kręgowy, oko, żołądek, jelito cienkie i grube (w tym kępki Peyera), wątrobę, nerki, nadnercza, śledzionę, serce, grasicę, tchawicę i płuca (zakonserwowane przez napełnienie środkiem utrwalającym i następnie zanurzenie), gonady (jądra i jajniki), płciowe narządy dodatkowe (macicę i szyjkę macicy, najądrza, prostatę, pęcherzyki nasienne wraz z gruczołami koagulującymi), pochwę, pęcherz moczowy, węzły chłonne (poza najbliższym węzłem chłonnym należy pobrać inny węzeł w zależności od doświadczenia laboratorium (16)), nerw obwodowy (kulszowy lub piszczelowy), najlepiej w bliskiej odległości od mięśnia, mięsień szkieletowy i kość szkieletową wraz ze szpikiem kostnym (wycinek lub ewentualnie świeżo pobrany szpik kostny). Zaleca się utrwalenie jąder poprzez zanurzenie w utrwalaczu Bouina lub zmodyfikowanym utrwalaczu Davidsona (16)(17)(18); nie zaleca się utrwalania tych tkanek w formalinie. Błonę białawą trzeba delikatnie i płytko przekłuć igłą na obu biegunach narządu w celu umożliwienia szybkiego wnikięcia płynu utrwalającego. Wyniki badań klinicznych i inne ustalenia mogą wskazać na konieczność zbadania dodatkowych tkanek. Organy uznane za prawdopodobne organy docelowe, w oparciu o znane właściwości substancji badanej, także należy zachować.

66. Ważnych wskazówek co do efektów związanych z układem hormonalnym mogą dostarczyć badania następujących tkanek: gonad (jajników i jąder), płciowych narządów dodatkowych (macicy wraz z szyjką, najądrzy, pęcherzyków nasiennych z gruczołami koagulacyjnymi, części grzbietowo-bocznej i brzusznej prostaty), pochwy, przysadki mózgowej, męskich gruczołów mlekowych i gruczołu nadnerczowego. Zmiany w męskich gruczołach mlekowych nie są zbyt dobrze udokumentowane, ale parametr ten może być bardzo czuły na substancje o działaniu estrogenowym. Obserwacja organów/tkanek niewykazanych w pkt 65 jest opcjonalna.
67. Martwe młode i młode zabite 13. dnia po porodzie lub wkrótce potem należy co najmniej przebadać zewnętrznie z zachowaniem ostrożności pod kątem poważnych nieprawidłowości. Szczególną uwagę należy zwrócić na zewnętrzne narządy rozrodcze, które należy zbadać pod kątem zmian rozwojowych.

## **Histopatologia**

68. Należy wykonać szczegółową histopatologię zachowanych organów i tkanek zwierząt wytypowanych w grupach kontrolnych i grupach otrzymujących wysoką dawkę (ze szczególnym naciskiem na stadia spermatogenezy w gonadach samców i histopatologię śródmiąższowej struktury komórek jąder). Gruczoły tarczowe pochodzące od młodych i pozostałych dorosłych zwierząt w razie potrzeby mogą być badane. Badania te powinny być rozciągnięte na inne grupy badane, jeśli w grupie otrzymującej najwyższe dawki obserwuje się zmiany związane z działaniem substancji. W wytycznych dotyczących histopatologii (10) podano dodatkowe informacje dotyczące wycinania, utrwalania, dzielenia i histopatologii tkanek układu hormonalnego.

69. Należy przebadąć wszystkie uszkodzenia. Aby ułatwić objaśnienie poziomów dawkowania, przy których nie obserwuje się szkodliwych zmian, należy zbadać organy docelowe w innych grupach otrzymujących dawkę, a w szczególności w grupach, które te poziomy rzekomo wykazują.
70. Jeśli wykorzystuje się grupę satelitarną, należy przeprowadzić badanie histopatologiczne tych tkanek i organów, w których – w grupach otrzymujących substancję badaną – stwierdzono skutki podania substancji.

## **DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ**

### **Dane**

71. Należy podać dane każdego zwierzęcia. Ponadto wszystkie dane należy podsumować w formie tabeli wykazującej, w odniesieniu do każdej grupy badanej i każdego pokolenia, liczbę zwierząt na początku badania, liczbę zwierząt, które znaleziono martwe podczas badania lub zwierząt uśmierconych ze względów humanitarnych, czas śmierci lub uśmiercenia, liczbę zwierząt płodnych, liczbę ciężarnych samic, liczbę zwierząt wykazujących zaobserwowane oznaki toksyczności, z podaniem czasu ich pojawienia się, w tym czasu trwania, ciężkości wszelkich skutków toksyczności, rodzajów zmian histopatologicznych oraz wszelkich odnośnych danych miotów. W dodatku 3 przedstawiono podsumowanie w formie tabeli, które okazało się być bardzo przydatne przy ocenianiu efektów reprodukcyjnych/rozwojowych.
72. O ile to możliwe, wyniki liczbowe należy poddawać ocenie za pomocą właściwych i ogólnie przyjętych metod statystycznych. Przy porównywaniu skutków dla różnych dawek należy unikać stosowania wielokrotnego porównywania testem t-Studenta. Metody statystyczne należy wybrać podczas planowania badania. Analiza statystyczna odległości anogenitalnej i zatrzymywania płynu w brodawkach powinna być oparta na danych dotyczących poszczególnych młodych z uwzględnieniem wpływu na miot. W stosownych przypadkach za jednostkę analityczną uznaje się miot. Analiza statystyczna masy ciała młodych powinna być oparta na danych dotyczących poszczególnych młodych z uwzględnieniem liczebności miotu. Ze względu na ograniczone wymiary badania, analizy statystyczne w postaci testów na „istotność” mają ograniczoną wartość dla wielu punktów końcowych, zwłaszcza reprodukcyjnych punktów końcowych. Niewłaściwe są niektóre z najszerszej stosowanych metod, zwłaszcza badania parametryczne dotyczące średnich. Jeżeli wykorzystywane są analizy statystyczne, wybrana metoda powinna być odpowiednia dla rozkładu badanej zmiennej i powinna być wybrana przed rozpoczęciem badania.

### **Ocena wyników**

73. Wyniki tego badania toksyczności powinny być oceniane w kategoriach zaobserwowanych skutków, wyników autopsji i badań mikroskopowych. Ocena obejmuje zależność pomiędzy dawką badanej substancji chemicznej a obecnością lub brakiem, częstością i ciężkością nieprawidłowości, w tym poważnych zmian patologicznych, wskazanymi organami docelowymi, bezpłodnością, nieprawidłowościami klinicznymi, zmienionymi funkcjami rozrodczymi i funkcjonowaniem miotów, zmianami masy ciała, wpływem na śmiertelność i wszelkimi innymi skutkami toksycznymi.
74. Ze względu na krótki okres poddania działaniu substancji w odniesieniu do samców, przy ocenie wpływu na rozrodczość u samców należy uwzględnić histopatologię jąder i najądrzy oraz dane dotyczące płodności. Wykorzystanie historycznych danych dotyczących kontroli odnoszących się do reprodukcji/rozwoju (np. dotyczących wielkości miotu, odległości anogenitalnej, zatrzymywania płynu w brodawkach, poziomu T4 w surowicy), w przypadku gdy są one dostępne, może być również przydatne jako pomoc w interpretacji badania.
75. Proponuje się, aby do celów kontroli jakości zbierać historyczne dane kontrolne i obliczać współczynniki zmienności dla danych liczbowych, szczególnie w odniesieniu do parametrów związanych z wykrywaniem substancji zakłócających funkcjonowanie układu hormonalnego. Dane te można wykorzystać do celów porównawczych przy ocenie bieżących badań.

### **Sprawozdanie z badania**

76. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

#### *Badana substancja chemiczna:*

- źródło, numer partii, termin przydatności, jeżeli są znane,
- stabilność badanej substancji chemicznej, jeżeli jest znana.

#### *substancja jednoskładnikowa:*

- wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne,
- dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa IUPAC lub CAS, numer CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny, czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń, stosownie do przypadku i jeśli jest to praktycznie wykonalne, itp.

#### *Substancja wieloskładnikowa, UVCB i mieszaniny:*

- opisane w miarę możliwości przez podanie nazwy chemicznej (zob. powyżej), określenie ilości oraz istotnych właściwości fizykochemicznych składników.

*Nośnik (w stosownych przypadkach):*

- uzasadnienie wyboru nośnika, jeśli jest inny niż woda.

*Zwierzęta doświadczalne:*

- wykorzystany gatunek/szczep,
- liczba, wiek i płeć zwierząt,
- źródło pochodzenia, warunki utrzymywania, pasza itp.,
- masa ciała poszczególnych zwierząt na początku badania,
- uzasadnienie wyboru gatunku, jeśli jest inny niż szczur.

*Warunki badania:*

- uzasadnienie wyboru poziomu dawkowania,
- szczegóły dotyczące przygotowania formy użytkowej badanej substancji chemicznej / przygotowania paszy, uzyskanego stężenia, trwałości i jednorodności preparatu,
- szczegółowe informacje dotyczące podawania badanej substancji chemicznej,
- wskaźnik konwersji stężenia badanej substancji chemicznej w pokarmie / wodzie pitnej (ppm) do dawki rzeczywistej (mg/kg masy ciała/dzień), jeśli ma to zastosowanie,
- szczegółowe informacje dotyczące jakości pokarmu i wody,
- szczegółowy opis procedury randomizacji stosowanej do doboru młodych do eliminacji w przypadku, gdy się jej dokonuje.

*Wyniki:*

- masa ciała / zmiany masy ciała,
- dane dotyczące spożycia pokarmu oraz wody, w stosownych przypadkach,
- dane dotyczące efektu toksycznego ze względu na płeć i dawkę, włączając płodność, ciążę i wszelkie inne objawy toksyczności,
- długość trwania ciąży,
- wpływ toksyczności lub innych skutków na reprodukcję, potomstwo i rozwój poporodowy itp.,
- rodzaj, nasilenie i czas trwania obserwowanych objawów klinicznych (tak odwracalnych, jak i nieodwracalnych),
- oceny aktywności sensorycznej, siły uchwytu i aktywności motorycznej,
- badania hematologiczne wraz z odpowiednimi wartościami odniesienia,
- badania biochemii klinicznej wraz z odpowiednimi wartościami odniesienia,

- liczba dorosłych samic, u których występuje normalny lub nienormalny cykl estrogenowy i czas trwania cyklu,
- liczba młodych urodzonych żywo i strat poimplantacyjnych,
- liczba młodych z wyraźnie widocznymi nieprawidłowościami; ocena wzrokowa zewnętrznych narządów płciowych, liczba słabowitych młodych w miocie,
- czas zgonu podczas badania lub informacja o tym, czy zwierzęta przetrwały do czasu zakończenia badania,
- liczba zagnieżdżeń, liczebność miotu i masa poszczególnych młodych w miocie w momencie rejestracji,
- dane dotyczące masy ciała młodego,
- odległość anogenitalna u wszystkich młodych (oraz masa ciała na dzień pomiaru odległości anogenitalnej),
- zatrzymywanie płynu w brodawkach u młodych płci męskiej,
- poziom hormonów tarczycy, młode w 13. dniu życia i dorosłe samce (oraz matki i młode w 4. dniu życia, jeśli dokonano pomiaru),
- masa ciała w chwili uśmiercenia oraz masa narządów u zwierząt rodzicielskich,
- wyniki autopsji,
- szczegółowy opis wyników badania histopatologicznego,
- dane dotyczące absorpcji (jeżeli są dostępne),
- w stosownych przypadkach statystyczne opracowanie wyników.

*Omówienie wyników.*

*Wnioski*

### **Interpretacja wyników**

77. Badanie dostarczy ocen toksyczności reprodukcyjnej/rozwojowej związanej z zastosowaniem powtarzanego dawkowania. W szczególności, ponieważ szczególną uwagę przywiązuje się do punktów końcowych toksyczności ogólnej i toksyczności reprodukcyjnej/rozwojowej, wyniki badania pozwolą na odróżnienie skutków reprodukcyjnych/rozwojowych występujących przy braku ogólnej toksyczności od występujących jedynie na poziomach, które są toksyczne również dla zwierząt rodzicielskich (zob. pkt 7–11). Może ono stanowić wskazówkę co do potrzeby prowadzenia dalszych badań i może dostarczyć wytycznych przy opracowywaniu kolejnych badań. Przy interpretowaniu wyników dotyczących rozrodczości i rozwoju pomocny może być dokument zawierający wytyczne OECD nr 43 (19). Wytyczne OECD nr 106 w sprawie oceny histologicznej badań endokrynologicznych i reprodukcyjnych

u gryzoni (OECD Guidance Document 106 on Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents) (16) zawierają informacje na temat przygotowania i oceny narządów (endokrynologicznych) i rozmazów śluzówki pochwy, które mogą być pomocne w niniejszej metodzie badawczej.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Dokument dostępny na wniosek w Organizacji Współpracy Gospodarczej i Rozwoju w Paryżu.
- (2) OECD (1992). *Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods*, Tokio, 27–29 października 1992 . Dokument dostępny na wniosek w Organizacji Współpracy Gospodarczej i Rozwoju w Paryżu.
- (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. i 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.” nr 19, s. 141–149.
- (4) Tanaka S., Kawashima K., Naito K., Usami M., Nakadate M., Imaida K., Takahashi M., Hayashi Y., Kurokawa Y. i Tobe M. (1992). *Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test (OECD): Familiarization Using Cyclophosphamide*. „Fundamental and Applied Toxicol.” nr 18, s. 89–95.
- (5) OECD (1998). *Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force*, Dokument dostępny na wniosek w Organizacji Współpracy Gospodarczej i Rozwoju w Paryżu, 10–11 marca 1998.
- (6) OECD (2015). *Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints*. [W:] Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr 217). Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.
- (7) OECD (2000). *Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations*, [W:] Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 19. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.
- (8) Goldman J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M. i Cooper R.L. (2007). *The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies*, „Birth Defects Research” część B, nr 80 (2), 84–97.



- (9) Sadleir R.M.F.S. (1979). *Cycles and Seasons*, w: C.R. Auston i R.V. Short, (red.), *Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization*. Cambridge, Nowy Jork.
- (10) IPCS (1986). *Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals*, [W:] Environmental Health Criteria Document nr 60.
- (11) Moser V.C., McDaniel K.M. i Phillips P.M. (1991). *Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz*, „Toxicol. Applied Pharmacol.” nr 108, s. 267–283.
- (12) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C. i Riley M.T. (1979). *A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice*, „Neurobehav. Toxicol.” nr 1, s. 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.” nr 13, s. 599–609.
- (14) Gallavan R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp i V.L. Reynolds. (1999). *Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights*, „Reproductive Toxicology” nr 13, s. 383–390.
- (15) OECD (2013). *Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study*, [W:] Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 151. Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.
- (16) OECD (2009) *Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents*, [W:] Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 106. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.
- (17) Hess RA i Moore BJ. (1993). *Histological Methods for the Evaluation of the Testis* [W:] „Methods in Reproductive Toxicology”, R.E. Chapin i J.J. Heindel (red.), Academic Press: San Diego, Kalifornia, s. 52–85.
- (18) J.R. Latendresse, A.R. Warbritton, H. Jonassen, D.M. Creasy (2002). *Fixation of Testes and Eyes Using a Modified Davidson's Fluid: Comparison with Bouin's Fluid and Conventional Davidson's fluid*, „Toxicol. Pathol.” nr 30, s. 524–533.
- (19) OECD (2008). *Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment*. [W:] Environment, Health and Safety Publications,

Series on Testing and Assessment (nr 43). Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

- (20) OECD (2011), *Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption* nr 150, Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

## **Dodatek 1**

### **DEFINICJE (ZOB. RÓWNIEŻ WYTYCZNA OECD NR 150 (20))**

Działanie androgenowe jest to zdolność substancji chemicznej do działania przypominającego działanie naturalnego hormonu androgenowego (np. testosteronu) w organizmach ssaków.

Działanie antyandrogenowe jest to zdolność substancji chemicznej do hamowania działania naturalnego hormonu androgenowego (np. testosteronu) w organizmach ssaków.

Działanie antyestrogenowe jest to zdolność substancji chemicznej do hamowania działania naturalnego hormonu estrogenowego (np. 17 $\beta$ -estradiolu) w organizmach ssaków.

Działanie antytyroidowe jest to zdolność substancji chemicznej do hamowania działania naturalnego hormonu tarczycy (np. T<sub>3</sub>) w organizmach ssaków.

Substancja chemiczna oznacza substancję lub mieszaninę.

Toksyczność rozwojowa: objawy toksyczności reprodukcyjnej, reprezentującej zaburzenia przedporodowe, okołoporodowe, porodowe, strukturalne lub czynnościowe u potomstwa.

Dawka jest to ilość podawanej badanej substancji chemicznej. Dawkę wyraża się jako masę badanej substancji chemicznej na jednostkę masy ciała zwierzęcia doświadczalnego na dzień (np. mg/kg masy ciała/dzień) lub jako stałe stężenie w diecie.

Dawkowanie jest terminem ogólnym obejmującym dawkę, częstotliwość i czas trwania dawkowania.

Wyrażna toksyczność jest to określenie ogólne opisujące wyraźne oznaki toksyczności występujące po podaniu badanej substancji chemicznej. Powinny one być wystarczające do oceny ryzyka i mieć taki charakter, że można oczekiwać, iż zwiększenie podawanej dawki spowoduje pojawienie się silnych oznak toksyczności i prawdopodobną śmiertelność.

Upośledzenie płodności oznacza zaburzenie funkcji reprodukcyjnych lub zdolności reprodukcyjnych samców lub samic.

Toksyczność matczyna: niekorzystny skutek dla ciężarnych samic, występujący swoiście (skutek bezpośredni) lub nieswoiście (skutek pośredni) i związany ze stanem ciężarnym.

NOAEL jest to skrót oznaczający poziom dawkowania, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian. Jest to najwyższy poziom dawkowania, przy którym nie obserwuje się szkodliwych efektów związanych z podawaniem substancji na skutek jej podawania.

Działanie estrogenowe jest to zdolność substancji chemicznej do działania przypominającego działanie naturalnego hormonu estrogenowego (np. 17 $\beta$ -estradiolu) w organizmach ssaków.

Toksyczność reprodukcyjna oznacza szkodliwy wpływ na potomstwo lub upośledzenie funkcji lub zdolności reprodukcyjnych u samców i samic.

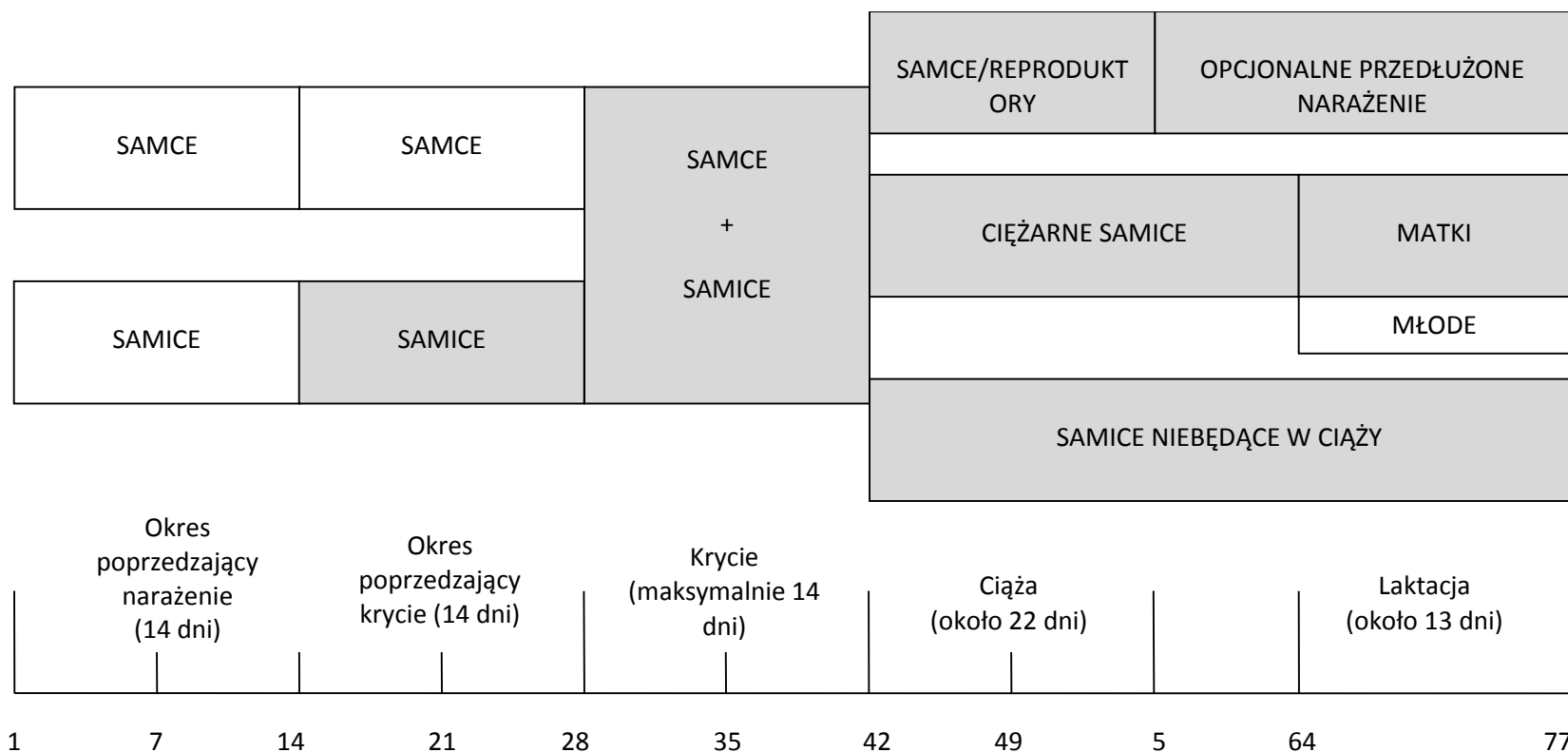
Badana substancja chemiczna oznacza każdą substancję lub mieszaninę badaną za pomocą niniejszej metody badawczej.

Działanie tyroidowe jest to zdolność substancji chemicznej do działania przypominającego działanie naturalnego hormonu tarczycy (np.  $T_3$ ) w organizmach ssaków.

Walidacja jest to proces naukowy mający na celu scharakteryzowanie wymogów operacyjnych i ograniczeń metody badawczej i wykazanie jej wiarygodności oraz odpowiedniości do danego celu.

## **Dodatek 2**

**SCHEMAT HARMONOGRAMU DOŚWIADCZALNEGO WSKAZUJĄCY MAKSYMALNY CZAS TRWANIA BADANIA, OPARTY NA PEŁNYM 14-DNIOWYM OKRESIE KRYCIA**



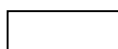
Początek badania

Ocena cykliczności estrogenowej przed narażeniem, po której następuj codzienne monitorowanie rozmazów śluzówki pochwy od początku poddawania działaniu substancji chemicznej do potwierdzenia krycia.

Dawkowanie



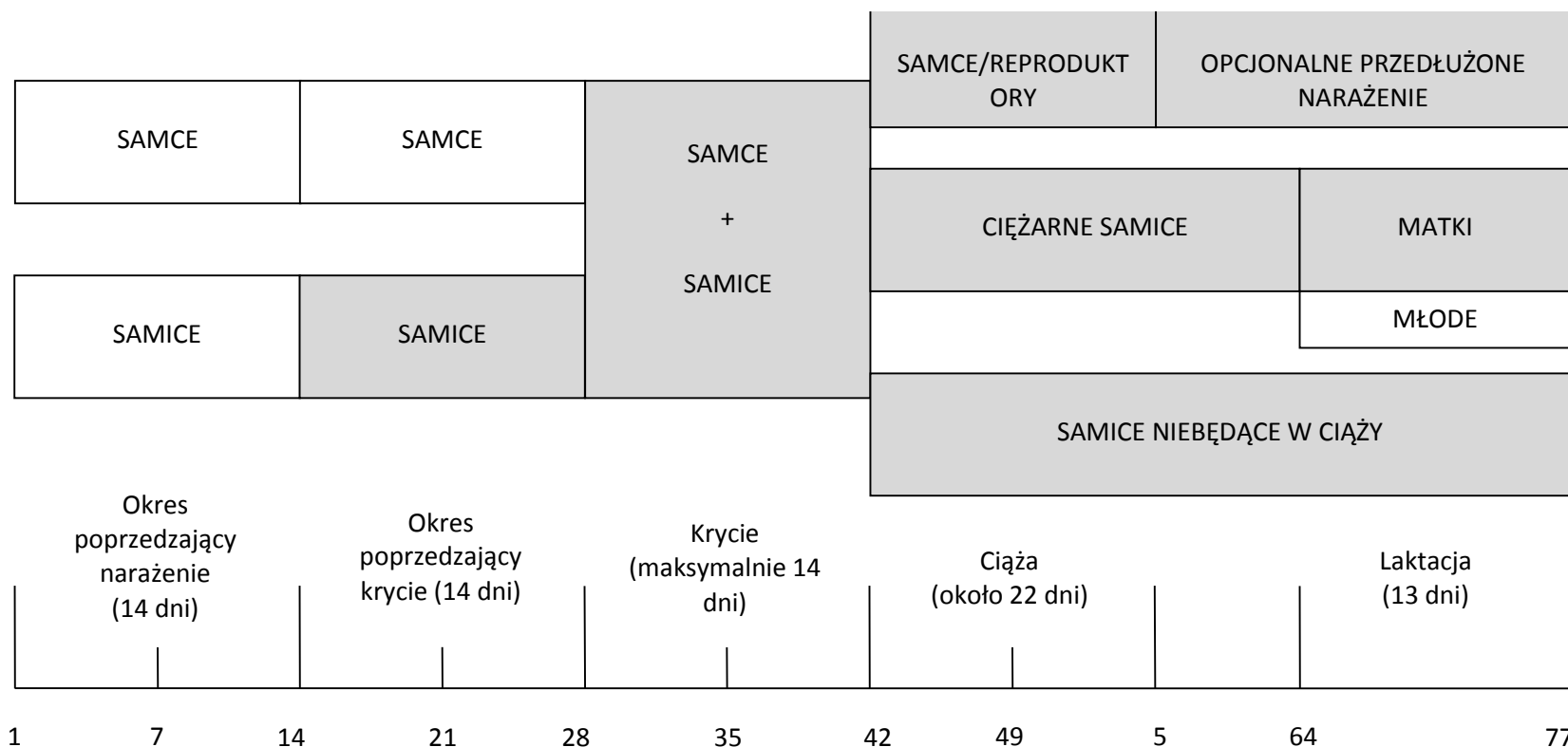
Bez dawkowania



Sekcja samców/reproduktorów (po dawkowaniu przez co najmniej 4 tygodnie)

Poród (0. dzień po urodzeniu) do 4. dnia po urodzeniu: Odległość anogenitalna u wszystkich młodych (od 0. do 4. dnia po urodzeniu; w tym samym dniu) Uśmiercenie 2 młodych na miot do celów analizy T4 (4. dzień po urodzeniu)

13. dzień po porodzie Autopsja samic i młodych Zatrzymywanie płynu w brodawkach u młodych samców. Autopsja samców/reproduktorów (opcjonalnie).



Początek badania

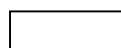
Ocena cykliczności estrogenowej przed narażeniem, po której następuj codzienne monitorowanie rozmazów śluzówki pochwy od początku poddawania działaniu substancji chemicznej do potwierdzenia krycia.

Dawkowanie



Hematologia / chemia kliniczna u samców i samic (opcjonalnie)

Bez dawkowania



Autopsja samców/reproduktorów  
Obserwacje funkcjonalne u samców (opcjonalnie)  
Hematologia / chemia kliniczna u samców, po uśmierceniu (po dawkowaniu przez co najmniej 4 tygodnie)

Poród (0. dzień po urodzeniu) do 4. dnia po urodzeniu:  
Odległość anogenitalna u wszystkich młodych (od 0. do 4. dnia po urodzeniu; w tym samym dniu)  
Uśmiercenie 2 młodych na miot do celów analizy T4 (4. dzień po urodzeniu)

13. dzień po porodzie  
Autopsja samic i młodych  
Autopsja samców/reproduktorów (opcjonalnie). Obserwacje funkcjonalne u samców (opcjonalnie) i samic  
Hematologia / chemia kliniczna u samców i samic (opcjonalnie)  
Zatrzymywanie płynu w brodawkach u młodych samców.

### Dodatek 3

## TABELARYCZNE SPRAWOZDANIE PODSUMOWUJĄCE WPŁYW NA REPRODUKCJĘ/ROZWÓJ

| OBSERWACJE                                                                                                                                               | WARTOŚCI     |     |     |     |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|-----|-----|-----|-----|
| Dawkowanie (jednostki)                                                                                                                                   | 0 (kontrola) | ... | ... | ... | ... |
| Zapoczątkowane pary (N)                                                                                                                                  |              |     |     |     |     |
| Cykl estrogenowy (co najmniej średnia długość i częstość występowania nieregularnych cykli)                                                              |              |     |     |     |     |
| Samice wykazujące oznaki kopulacji (N)                                                                                                                   |              |     |     |     |     |
| Samice zachodzące w ciążę (N)                                                                                                                            |              |     |     |     |     |
| Dni poczęcia 1–5 (N)                                                                                                                                     |              |     |     |     |     |
| Dni poczęcia 6–. <sup>(1)</sup> (N)                                                                                                                      |              |     |     |     |     |
| Ciąża ≤ 21 dni (N)                                                                                                                                       |              |     |     |     |     |
| Ciąża = 22 dni (N)                                                                                                                                       |              |     |     |     |     |
| Ciąża ≥ 23 dni (N)                                                                                                                                       |              |     |     |     |     |
| Matki z urodzonymi żywymi młodymi (N)                                                                                                                    |              |     |     |     |     |
| Matki z żywymi młodymi w 4. dniu po porodzie (N)                                                                                                         |              |     |     |     |     |
| Implanty/matka (średnia)                                                                                                                                 |              |     |     |     |     |
| Żywe młode/matka przy porodzie (średnia)                                                                                                                 |              |     |     |     |     |
| Żywe młode/matka w 4. dniu (średnia)                                                                                                                     |              |     |     |     |     |
| Proporcja płci (samiec/samica) przy porodzie (średnia)                                                                                                   |              |     |     |     |     |
| Proporcja płci (samiec/samica) w 4 dniu (średnia)                                                                                                        |              |     |     |     |     |
| Masa miotu przy porodzie (średnia)                                                                                                                       |              |     |     |     |     |
| Masa miotu w 4 dniu (średnia)                                                                                                                            |              |     |     |     |     |
| Masa ciała młodego przy porodzie (średnia)                                                                                                               |              |     |     |     |     |
| Masa ciała młodego przy pomiarze odległości anogenitalnej (średnia dla samców, średnia dla samic)                                                        |              |     |     |     |     |
| Odległość anogenitalna młodego w tym samym dniu po urodzeniu, urodzenie – 4. dzień (średnia dla samców, średnia dla samic, zaznaczyć dzień po urodzeniu) |              |     |     |     |     |
| Masa ciała młodego w 4. dniu (średnia)                                                                                                                   |              |     |     |     |     |
| Masa ciała młodego w 13. dniu (średnia)                                                                                                                  |              |     |     |     |     |
| Zatrzymywanie płynu w brodawkach u młodych płci męskiej                                                                                                  |              |     |     |     |     |

<sup>(1)</sup> ostatni dzień okresu krycia



|                                                                       |  |  |  |  |  |
|-----------------------------------------------------------------------|--|--|--|--|--|
| w 13 dniu (średnia)                                                   |  |  |  |  |  |
| <b>MŁODE Z ZABURZENIAMI</b>                                           |  |  |  |  |  |
| Matki z 0                                                             |  |  |  |  |  |
| Matki z 1                                                             |  |  |  |  |  |
| Matki z $\geq 2$                                                      |  |  |  |  |  |
| <b>UTRATA POTOMSTWA</b>                                               |  |  |  |  |  |
| <b>Przed urodzeniem (implantacje minus żywe urodzenia)</b>            |  |  |  |  |  |
| Samice z 0                                                            |  |  |  |  |  |
| Samice z 1                                                            |  |  |  |  |  |
| Samice z 2                                                            |  |  |  |  |  |
| Samice z $\geq 3$                                                     |  |  |  |  |  |
| <b>Po urodzeniu (żywe urodzenia minus żywe 13. dnia po urodzeniu)</b> |  |  |  |  |  |
| Samice z 0                                                            |  |  |  |  |  |
| Samice z 1                                                            |  |  |  |  |  |
| Samice z 2                                                            |  |  |  |  |  |
| Samice z $\geq 3$                                                     |  |  |  |  |  |

## **B.65 METODA BADAWCZA BARIERY MEMBRANOWEJ *IN VITRO* W PRZYPADKU DZIAŁANIA ŻRĄCEGO NA SKÓRĘ**

### **WPROWADZENIE**

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD nr 435 (2015). Działanie żrące na skórę oznacza powstawanie nieodwracalnych uszkodzeń skóry, które przejawiają się jako widoczna martwica naskórka i skóry właściwej, w wyniku kontaktu z badaną substancją chemiczną zgodnie z definicją Globalnie Zharmonizowanego Systemu Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów (GHS) Organizacji Narodów Zjednoczonych (ONZ) (1) i z rozporządzeniem Unii Europejskiej (UE) nr 1272/2008 w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin (CLP)<sup>1</sup>. Niniejsza metoda badawcza, równoważna zaktualizowanej metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD nr 435 zapewnia metodę badawczą bariery membranowej *in vitro*, którą można zastosować, aby zidentyfikować żrące substancje chemiczne. W ramach metody badawczej wykorzystuje się sztuczną membranę zaprojektowaną, aby reagowała na żrące substancje chemiczne w sposób podobny do skóry zwierząt *in situ*.
2. Tradycyjnie ocenę działania żrącego na skórę przeprowadzano, nakładając badaną substancję chemiczną na skórę żywych zwierząt i oceniając stopień uszkodzenia tanki po upływie ustalonego okresu (2). Oprócz obecnie stosowanej metody, jako metody alternatywne dla standardowej procedury *in vivo* dotyczącej skóry królików (rozdział B.4 niniejszego załącznika, równoważnej metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD nr 404) stosowanej do identyfikowania żrących substancji chemicznych (2) przyjęto szereg innych metod badawczych *in vitro* (3)(4). W ramach zintegrowanej strategii GHS ONZ dotyczącej badania i analizowania w zakresie oceny i klasyfikacji działania żrącego na skórę oraz wytycznych OECD w sprawie zintegrowanego podejścia do badań i oceny (IATA) podrażnienia skóry / działania żrącego na skórę zaleca się stosowanie zweryfikowanych i zaakceptowanych metod badawczych *in vitro* w ramach modułu 3 i 4 (1)(5). W ramach IATA opisano szereg modułów grupujących źródła informacji i narzędzia służące do analizy oraz (i) zapewniono wytyczne dotyczące sposobu integracji i wykorzystania istniejących danych pochodzących z badań i metod

---

<sup>1</sup> Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniające i uchylające dyrektywy 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1907/2006, Dz.U. L 353 z 31.12.2008, s. 1.

niebadawczych do oceny potencjałów substancji chemicznych do podrażnienia i działania żrącego na skórę, a także (ii) zaproponowano podejście, w przypadku gdy potrzebne są dalsze badania, w tym jeśli stwierdzono wyniki ujemne (5). W ramach tego podejścia modułowego można wykorzystać wyniki dodatnie z metod badawczych *in vitro*, aby zaklasyfikować substancję chemiczną jako żrącą bez konieczności przeprowadzania badań na zwierzętach, tym samym ograniczając i doskonaląc wykorzystanie zwierząt oraz zapobiegając bólowi i stresowi, który mógłby wystąpić, jeśli wykorzystywano by zwierzęta w tym celu.

3. Zakończono badania walidacyjne dotyczące modelu bariery membranowej *in vitro* dostępne na rynku jako Corrositex® (6)(7)(8), wykazując ogólną dokładność w przewidywaniu działania żrącego na skórę wynoszącą 79 % (128/163), wrażliwości – 85 % (76/89) i specyficzności – 70 % (52/74) w odniesieniu do bazy danych składającej się ze 163 substancji i mieszanin (7). Na podstawie jej potwierdzonej zasadności tę zwalidowaną metodę referencyjną (VRM) zalecono w celu zastosowania jako część zintegrowanej strategii badań dotyczącej oceniania potencjału substancji chemicznych w zakresie zagrożenia działaniem żrącym na skórę (5)(7). Zanim będzie można wykorzystać do celów regulacyjnych model bariery membranowej *in vitro* w przypadku działania żrącego na skórę, należy określić jej wiarygodność, przydatność (dokładność) oraz ograniczenia dotyczące jej proponowanego wykorzystania, aby zapewnić jej podobieństwo do VRM (9) zgodnie z wcześniej określonymi standardami wykonywania badań (PS) (10). Wzajemne uznawanie danych OECD będzie zagwarantowane wyłącznie po poddaniu przeglądowi każdej nowej lub zaktualizowanej metody zgodnej ze standardem wykonywania badań i włączeniu jej do równoważnych wytycznych OECD dotyczących badań. Obecnie wytyczne OECD dotyczące badań nr 435 obejmują wyłącznie jedną metodę *in vitro* i niniejszą metodę badawczą, dostępny na rynku model Corrositex®.
4. Inne metody badawcze dotyczące badania działania żrącego na skórę opierają się na wykorzystaniu zregenerowanej ludzkiej skóry (wytyczne OECD dotyczące badań nr 431) (3) oraz wyizolowanej skóry szczura (wytyczne OECD dotyczące badań nr 430) (4). Te wytyczne dotyczące badań przewidują również podzielenie żrących substancji chemicznych na trzy podkategorie GHS ONZ w odniesieniu do działania żrącego oraz trzy grupy opakowaniowe ONZ w celu transportu w związku z zagrożeniem działaniem żrącym. Te wytyczne dotyczące badań przyjęto pierwotnie w 2006 r. i zaktualizowano w 2015 r., aby odnieść się do wytycznych IATA i zaktualizować wykaz substancji służących do wykazania biegłości.

## DEFINICJE

5. Stosowane definicje znajdują się w dodatku.

## ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA

6. Badanie opisane w niniejszej metodzie badawczej umożliwia zidentyfikowanie żrących badanych substancji chemicznych oraz pozwala na podzielenie żrących badanych substancji chemicznych na podkategorie zgodnie z GHS ONZ / rozporządzeniem CLP (tabela 1). Ponadto taką metodę badawczą można wykorzystać, aby podjąć decyzje dotyczące działania żrącego i braku działania żrącego szczególnych klas substancji chemicznych, np. kwasów organicznych i nieorganicznych, pochodnych kwasów<sup>1</sup> oraz podstaw określonych celów badania transportu (7)(11)(12). Niniejsza metoda badawcza opisuje ogólną procedurę podobną do zwalidowanej referencyjnej metody badawczej (7). Chociaż niniejsza metoda badawcza nie dostarcza wystarczających informacji na temat podrażnienia skóry, należy zauważyć, że metoda badawcza B.46 (równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD nr 439) dotyczy konkretnie badania *in vitro*, powodującego skutki dla zdrowia w postaci podrażnienia skóry (13). Aby dokonać pełnej oceny miejscowego działania na skórę po pojedynczym narażeniu przez skórę, należy zapoznać się z wytycznymi OECD dotyczącymi zintegrowanych podejść do badań i oceny (5).

**Tabela 1:** Kategoria i podkategorie działania żrącego na skórę GHS ONZ (1)

| Kategoria działania żrącego (kategoria 1)<br>(dla organów niestosujących podkategorii) | Podkategorie potencjalnego działania żrącego <sup>2</sup><br>(dla organów stosujących podkategorie, w tym rozporządzenie CLP) | Działanie żrące w przypadku $\geq 1$ z 3 zwierząt |                  |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|------------------|
|                                                                                        |                                                                                                                               | Narażanie                                         | Uwagi            |
| Żrące                                                                                  | Działanie żrące podkategorii 1A                                                                                               | $\leq 3$ minuty                                   | $\leq 1$ godzina |
|                                                                                        | Działanie żrące podkategorii 1B                                                                                               | $> 3$ minuty / $\leq 1$ godzina                   | $\leq 14$ dni    |
|                                                                                        | Działanie żrące podkategorii 1C                                                                                               | $> 1$ godzina / $\leq 4$ godziny                  | $\leq 14$ dni    |

7. Ograniczenie zwalidowanej metody referencyjnej (7) polega na możliwości niezakwalifikowania do badania wielu nieżrących substancji chemicznych i niektórych żrących substancji chemicznych na podstawie wyników wstępnego badania zgodności

<sup>1</sup> „Pochodna kwasu” to niespecyficzna nazwa klasy szeroko zdefiniowana jako kwas wytworzony bezpośrednio z substancji chemicznej albo poprzez modyfikację, albo częściową substytucję. Do tej klasy należą bezwodniki, kwasy halogenowe, sole i inne rodzaje substancji chemicznych.

<sup>2</sup> Jeżeli chodzi o UE, w rozporządzeniu CLP wprowadzono trzy podkategorie działania żrącego na skórę – 1A, 1B i 1C.

(zob. pkt 13). Uwodnione substancje chemiczne o pH mieszającym się w zakresie 4,5–8,5 często nie kwalifikują się do objęcia badaniem; jednak podczas badań na zwierzętach okazało się, że 85 % zbadanych substancji chemicznych o pH mieszającym się w tym zakresie nie ma właściwości żrących (7). Metodę badawczą bariery membranowej *in vitro* można stosować w celu zbadania substancji stałych (rozpuszczalnych lub nierozpuszczalnych w wodzie), cieczy (wodnych lub niewodnych) i emulsji. Badanych substancji chemicznych niepowodujących wykrywalnej zmiany w badaniu zgodności (tj. zmiana barwy w systemie wykrywania substancji chemicznych zwalidowanej referencyjnej metody badawczej) nie można poddać badaniu metodą bariery membranowej, ale należy je badać przy użyciu innych metod badawczych.

## **ZASADA BADANIA**

8. Układ badawczy składa się z dwóch elementów: syntetycznej makrocząsteczkowej bariery biologicznej i systemu wykrywania substancji chemicznych; niniejsza metoda badawcza pozwala wykrywać za pośrednictwem systemu wykrywania substancji chemicznych uszkodzenie bariery membranowej spowodowane przez badane żrące substancje chemiczne w następstwie zastosowania badanej substancji chemicznej na powierzchni syntetycznej makrocząsteczkowej bariery membranowej (7), przypuszczalnie na podstawie takiego samego mechanizmu lub takich samych mechanizmów działania żrącego na żywą skórę.
9. Penetrację bariery membranowej (lub jej przebicie) można zmierzyć wykorzystując w tym celu szereg procedur lub systemów wykrywania substancji chemicznych, w tym zmiany barwy barwnika we wskaźniku pH lub innej właściwości roztworu wskaźnika umieszczonego pod barierą.
10. Należy stwierdzić, czy bariera membranowa jest ważna, tj. właściwa i wiarygodna pod względem zamierzonego zastosowania. Działanie to obejmuje zapewnienie, by poszczególne preparaty były spójne pod względem właściwości bariery, np. zdolności do zachowania bariery w przypadku nieżrących substancji chemicznych, zdolności do kategoryzacji właściwości żrących substancji chemicznych w poszczególnych podkategoriach działania żrącego GHS ONZ (1). Przypisana klasyfikacja opiera się na czasie potrzebnym, aby substancja chemiczna przeniknęła przez barierę membranową do roztworu wskaźnika.

## **WYKAZANIE BIEGŁOŚCI**

11. Przed przystąpieniem do rutynowego stosowania metody badawczej bariery membranowej *in vitro* zgodnej z niniejszą metodą badawczą laboratorium powinny wykazać swoją biegłość techniczną, prawidłowo klasyfikując 12 substancji służących do wykazania biegłości, które przedstawiono w tabeli 2. W przypadku gdy wykazana substancja nie jest dostępna lub gdy

jest to uzasadnione, można użyć innej substancji, w odniesieniu do której dostępne są odpowiednie dane porównawcze z badań *in vivo* i *in vitro* (np. z wykazu referencyjnych substancji chemicznych (10)), pod warunkiem zastosowania tych samych kryteriów wyboru, które opisano w tabeli 1.

**Tabela 2:** Substancje służące do wykazania biegłości<sup>1</sup>

| Substancja <sup>2</sup>     | Numer CAS  | Klasa chemiczna                   | Podkategoria <i>in vivo</i> GHS ONZ <sup>3</sup> | Podkategoria <i>in vitro</i> GHS ONZ <sup>3</sup> |
|-----------------------------|------------|-----------------------------------|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| Trójfluorek boru – dwuwodny | 13319-75-0 | Kwasy nieorganiczne               | 1A                                               | 1A                                                |
| Kwas azotowy                | 7697-37-2  | Kwasy nieorganiczne               | 1A                                               | 1A                                                |
| Pentachlorek fosforu        | 10026-13-8 | Prekursory kwasów nieorganicznych | 1A                                               | 1A                                                |
| Chlorek walerylu            | 638-29-9   | Chlorki kwasowe                   | 1B                                               | 1B                                                |
| Wodorotlenek sodu           | 1310-73-2  | Zasady nieorganiczne              | 1B                                               | 1B                                                |
| 1-(2-Aminoetylo)piperazyna  | 140-31-8   | Aminy alifatyczne                 | 1B                                               | 1B                                                |
| Chlorek benzenosulfonylu    | 98-09-9    | Chlorki kwasowe                   | 1C                                               | 1C                                                |
| N,N-Dimetylobenzyloamina    | 103-83-3   | Anilina                           | 1C                                               | 1C                                                |
| Tetraetylenopentamina       | 112-57-2   | Aminy alifatyczne                 | 1C                                               | 1C                                                |
| Eugenol                     | 97-53-0    | Fenole                            | NC                                               | NC                                                |
| Akrylan nonylu              | 2664-55-3  | Akrylany/metakrylany              | NC                                               | NC                                                |
| Wodorowęglan sodu           | 144-55-8   | Sole nieorganiczne                | NC                                               | NC                                                |

<sup>1</sup>Dwanaście wymienionych powyżej substancji zawiera trzy substancje z każdej z trzech podkategorii substancji żrących GHS ONZ i trzy substancje nieżrące; substancje te są łatwo dostępne za pośrednictwem dostawców komercyjnych, a podkategorię GHS ONZ oparto na wynikach wysokiej jakości badań *in vivo*. Substancje te znajdują się w wykazie 40 substancji odniesienia, które wchodziły w skład minimalnego wykazu substancji chemicznych wybranych w celu określenia dokładności i wiarygodności metod badawczych podobnych do zwalidowanej referencyjnej metody badawczej pod względem strukturalnym i funkcjonalnym, a wybrano je spośród 163 chemicznych substancji odniesienia, które wykorzystywano pierwotnie do zatwierdzania referencyjnej metody badawczej (Corrositex®) (7) (10) (14). Celem tego procesu wyboru było uwzględnienie w największym możliwym stopniu substancji chemicznych, które: były reprezentatywne dla zakresu reakcji żrących (np. substancje nie działające żrąco; substancje żrące należące do grup opakowaniowych ONZ I, II i III), które można zmierzyć lub przewidzieć przy użyciu zwalidowanej referencyjnej metody badawczej; były reprezentatywne dla klas chemicznych wykorzystywanych podczas procesu walidacji; miały dobrze określoną strukturę chemiczną; dawały odtwarzalne wyniki podczas stosowania zwalidowanej referencyjnej metody badawczej; dawały ostateczne wyniki w referencyjnym badaniu *in vivo*; były dostępne na rynku; oraz nie były związane z wygórowanymi kosztami utylizacji (14).

<sup>2</sup>Substancje zbadane w postaci czystej lub o czystości  $\geq 90\%$

<sup>3</sup>Odpowiadające grupy opakowaniowe ONZ to I, II oraz III odpowiednio dla podkategorii 1A, 1B i 1C GHS ONZ.

NC: Substancja nieżrąca.

## PROCEDURA

12. W poniższych punktach opisano elementy i procedury metody badawczej sztucznej bariery membranowej służące ocenie działania żrącego (7)(15), oparte na obecnej zwalidowanej metodzie referencyjnej, tj. dostępnym na rynku badaniu Corrositex<sup>®</sup>. Bariere membranową oraz wskaźnik zgodności i roztwory wykorzystywane do kategoryzacji można stworzyć, przygotować lub nabyć, tak jak w przypadku zwalidowanej metody referencyjnej Corrositex<sup>®</sup>. Dostępny jest protokół próbnej metody badawczej dotyczący zwalidowanej referencyjnej metody badawczej (7). Badanie należy przeprowadzać w temperaturze otoczenia (17–25 °C), a elementy powinny spełniać następujące warunki.

### Badanie zgodności badanej substancji chemicznej

13. Przez przystąpieniem do badania bariery membranowej przeprowadza się badanie zgodności w celu określenia, czy system wykrywania substancji chemicznych wykrywa badaną substancję chemiczną. Jeżeli system wykrywania substancji chemicznych nie wykrywa badanej substancji chemicznej, metoda badawcza bariery membranowej nie jest odpowiednia, aby ocenić potencjalne działanie żrące tej szczególnej badanej substancji chemicznej i należy zastosować inną metodę badawczą. System wykrywania substancji chemicznych i warunki narażenia na działanie substancji powinny odzwierciedlać narażenie podczas następującego badania bariery membranowej.

### Badanie kategorii skali czasu badanej substancji chemicznej

14. W przypadkach stosownych dla metody badawczej badaną substancję chemiczną zakwalifikowaną na podstawie badania zgodności należy poddać badaniu kategorii skali czasu, tj. badaniu klasyfikacyjnemu pozwalającemu rozróżnić kwasy słabe i mocne lub zasady. Na przykład w zwalidowanej referencyjnej metodzie badawczej badanie kategoryzacji skali czasu wykorzystuje się, aby wskazać, którą z dwóch skal czasu należy wykorzystać w zależności od wykrycia znacznej rezerwy kwasowej lub alkalicznej. Dwie różne skale czasu wytrzymałości należy stosować w celu określenia działania żrącego i podkategorii działania żrącego na skórę GHS ONZ, w zależności od rezerwy kwasowej lub alkalicznej badanej substancji chemicznej.

## ELEMENTY METODY BADAWCZEJ BARIERY MEMBRANOWEJ

### Bariera membranowa

15. Bariera membranowa składa się z dwóch elementów: białkowego makrocząsteczkowego wodnistego żelu i przepuszczalnej, podtrzymującej membrany. Białkowy żel nie powinien przepuszczać cieczy i substancji stałych, ale może ulec zniszczeniu i stać się

przepuszczalny. W pełni zbudowaną barierę membranową należy przechowywać w określonych wcześniej warunkach, które zapobiegają pogorszeniu się jakości żelu, tj. jego wyschnięciu, wzrostowi mikroorganizmów, przesunięciu, krakingowi, które miałyby niekorzystny wpływ na jego działanie. Należy określić dopuszczalny okres przechowywania i nie używać preparatów bariery membranowej po upływie tego okresu.

16. Przepuszczalna podtrzymująca membrana zapewnia mechaniczne podparcie dla białkowego żelu w trakcie procesu formowania żelu i narażenia na badaną substancję chemiczną. Podtrzymująca membrana powinna zapobiegać opadaniu lub przesuwaniu się żelu oraz powinna łatwo przepuszczać wszystkie badane substancje chemiczne.
17. Białkowy żel, składający się z białka, np. keratyny, kolagenu lub mieszanin białek, tworzący macierz żelową, odgrywa rolę celu badanej substancji chemicznej. Materiał białkowy umieszcza się na powierzchni podtrzymującej membrany i umożliwia się wytworzenie z niego żelu przed umieszczeniem bariery membranowej nad roztworem wskaźnika. Żel białkowy powinien mieć taką samą objętość i gęstość na całej powierzchni oraz nie powinny występować w nim pęcherzyki powietrza lub wady, które mogłyby wpłynąć na jego integralność funkcjonalną.

### **System wykrywania substancji chemicznych**

18. Roztwór wskaźnika będący takim samym roztworem, jaki wykorzystano do badania zgodności, powinien reagować na obecność badanej substancji chemicznej. Jako barwnik we wskaźniku pH lub mieszaninę barwników należy stosować np. czerwień krezolową i oranż metylowy, które zmieniają swoje zabarwienie w reakcji na obecność badanej substancji chemicznej. System pomiarowy może być wizualny lub elektroniczny.
19. Systemy wykrywania, które opracowano w celu wykrywania przechodzenia badanej substancji chemicznej przez barierę membranową, należy oceniać pod względem ich istotności i wiarygodności w celu wykazania zakresu substancji chemicznych, które można wykryć, i ilościowych granic wykrywalności.

## **WYKONANIE BADANIA**

### **Zestaw elementów metody badawczej**

20. Bariera membranowa umieszczona jest we fiolce (lub w rurce) zawierającej roztwór wskaźnika, w taki sposób, by cała powierzchnia podtrzymującej membrany miała kontakt z roztworem wskaźnika oraz by nie powstawały pęcherzyki powietrza. Należy dopilnować, by bariera zachowała integralność.

### **Podawanie badanej substancji chemicznej**



21. Stosowną ilość badanej substancji chemicznej, np. 500 µl cieczy lub 500 mg drobno sproszkowanej substancji stałej (7) nakłada się ostrożnie na górną powierzchnię bariery membranowej i równo po niej rozprowadza. Dla każdej badanej substancji chemicznej i jej odpowiednich kontroli przygotowuje się odpowiednią liczbę kontrprób, np. cztery (7) (zob. pkt 23–25). Odnotowuje się czas stosowania badanej substancji chemicznej na barierę membranową. Aby zapewnić właściwe odnotowanie krótkich okresów działania żrącego, okresy stosowania badanej substancji chemicznej we fiolkach z kontrpróbą bada się z przesunięciem.

### **Pomiar przenikania przez barierę membranową**

22. Należy odpowiednio monitorować każdą fiolkę oraz odnotować czas pierwszej zmiany roztworu wskaźnika, tj. przeniknięcia przez barierę, a także określać upływ czasu między zastosowaniem i przeniknięciem bariery membranowej.

### **Kontrole**

23. Podczas badań, które obejmują stosowanie nośnika lub rozpuszczalnika wraz z badaną substancją chemiczną, nośnik lub rozpuszczalnik powinien być zgodny z układem bariery membrany, tj. nie powinien zmieniać integralności układu bariery membranowej i nie powinien wpływać na działanie żrące badanej substancji chemicznej. W stosownych przypadkach grupę kontrolną rozpuszczalnika (lub nośnika) należy zbadać jednocześnie z badaną substancją chemiczną, aby wykazać zgodność rozpuszczalnika z układem bariery membranowej.
24. Kontrolę dodatnią (żrącą) o średnim działaniu żrącym, np.  $110 \pm 15$  mg wodorotlenek sodu (podkategoria działania żrącego GHS ONZ 1B) (7), należy badać jednocześnie z badaną substancją chemiczną, aby ocenić, czy sposób działania układu badawczego jest akceptowalny. Druga kontrola dodatnia, która należy do takiej samej klasy chemicznej, jak badana substancja chemiczna, może być przydatna, aby ocenić względne potencjały działania żrącego żrącej badanej substancji chemicznej. Należy wybierać kontrole dodatnie o średnim działaniu żrącym (np. należące do podkategorii 1B GHS ONZ), aby wykryć zmiany w czasie przenikania, które mogą być niedopuszczalnie dłuższe lub krótsze niż ustanowiona wartość odniesienia, wskazując tym samym, że układ badawczy nie funkcjonuje prawidłowo. Do tego celu substancje chemiczne o wysokim działaniu żrącym (podkategoria 1A GHS ONZ) lub nieżrące substancje chemiczne mają ograniczoną użyteczność. Żrąca substancja chemiczna należąca do podkategorii 1B GHS ONZ umożliwiłaby wykrywanie zbyt szybkiego lub zbyt wolnego czasu wytrzymałości. Substancję chemiczną żrącą w niewielkim stopniu (podkategoria 1C GHS ONZ) można wykorzystać jako kontrolę dodatnią w celu zmierzenia zdolności metody badawczej do ciągłego rozróżniania substancji chemicznych żrących w niewielkim stopniu od nieżrących substancji chemicznych. Niezależnie od zastosowanego podejścia należy opracować dopuszczalny zakres reakcji w kontroli dodatniej na podstawie wcześniejszego zakresu

czasu wytrzymałości dla zastosowanych kontroli dodatnich, takich jak średnia  $\pm 2-3$  odchyłeń standardowych. Podczas każdego badania należy określić dokładny czas wytrzymałości w odniesieniu do kontroli dodatniej, aby możliwe było wykrycie odchyłeń od dopuszczalnego zakresu.

25. Kontrolę ujemną (nieżrącą), np. 10 % kwas cytrynowy, 6 % kwas propanowy (7), również należy zbadać jednocześnie z badaną substancją chemiczną, jako kolejny środek kontroli jakości w celu wykazania integralności funkcjonalnej bariery membranowej.

### **Kryteria dopuszczalności badania**

26. Zgodnie z ustanowionymi parametrami czasu dla każdej z podkategorii działań żrących GHS ONZ, czas (w minutach), jaki upłynął od zastosowania badanej substancji chemicznej na barierę membranową a przeniknięciem bariery, wykorzystuje się w celu przewidzenia działania żrącego badanej substancji chemicznej. Aby badanie można było uznać za dopuszczalne, równoczesna kontrola dodatnia powinna wykazywać oczekiwany czas reakcji przenikania (np. czas wytrzymałości 8–16 minut w przypadku wykorzystania wodorotlenku sodu jako kontroli dodatniej), równoczesna kontrola ujemna nie powinna mieć działania żrącego, a w stosownych przypadkach równoczesna kontrola z rozpuszczalnikiem nie powinna być żrąca, ani nie powinna wpływać na potencjał działania żrącego badanej substancji chemicznej. Przed przystąpieniem do rutynowego stosowania metody zgodnej z niniejszą metodą badawczą, laboratoria powinny wykazać swoją biegłość techniczną przy użyciu 12 substancji zalecanych w tabeli 2. W przypadku nowych metod zwanych „me-too”, opracowanych zgodnie z niniejszą metodą badawczą, które są podobne do zwalidowanej metody referencyjnej pod względem strukturalnym i funkcjonalnym (14), należy zastosować wcześniej określone standardy wykonywania badań, aby wykazać wiarygodność i dokładność nowej metody przed zastosowaniem jej podczas badań regulacyjnych (10).

### **Interpretacja wyników i klasyfikacja badanych substancji chemicznych pod względem działania żrącego**

27. Czas (w minutach), jaki upłynął od zastosowania badanej substancji chemicznej na barierę membranową a przeniknięciem bariery, wykorzystuje się, aby zaklasyfikować badaną substancję chemiczną do podkategorii działania żrącego GHS ONZ (1) oraz, w stosownych przypadkach, do grupy opakowaniowej ONZ (16). Wartości czasu odcięcia dla każdej z trzech podkategorii działania żrącego ustala się dla każdej proponowanej metody badawczej. Ostateczne decyzje dotyczące czasu odcięcia powinny uwzględniać potrzebę ograniczenia zaniżania klasyfikacji zagrożenia związanego z działaniem żrącym (tj. wyników fałszywie ujemnych). Zgodnie z obecną wytyczną dotyczącą badań należy wykorzystać czas odcięcia Corrositex® opisany w tabeli 3, ponieważ model ten stanowi obecnie jedyną metodą badawczą zgodną z wytyczną dotyczącą badań (7).

**Tabela 3:** Model prognozowania Corrositex®

| Średni czas wytrzymałości (min.)                                                                                       |                                                                                                                        | Proгноza GHS ONZ <sup>3</sup>                      |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| Badane substancje chemiczne kategorii 1 <sup>1</sup><br>(określone na podstawie badania kategoryzacji w ramach metody) | Badane substancje chemiczne kategorii 2 <sup>2</sup><br>(określone na podstawie badania kategoryzacji w ramach metody) |                                                    |
| 0–3 min.                                                                                                               | 0–3 min.                                                                                                               | <b>Dodatkowa podkategoria działania żrącego 1A</b> |
| > 3–60 min.                                                                                                            | > 3–30 min.                                                                                                            | <b>Dodatkowa podkategoria działania żrącego 1B</b> |
| > 60–240 min.                                                                                                          | > 30–60 min.                                                                                                           | <b>Dodatkowa podkategoria działania żrącego 1C</b> |
| > 240 min.                                                                                                             | > 60 min.                                                                                                              | <b>Substancja niezrąca</b>                         |

<sup>1</sup> Badane substancje chemiczne o wysokiej rezerwie kwasowo/zasadowej (6)

<sup>2</sup> Badane substancje chemiczne o niskiej rezerwie kwasowo/zasadowej (6)

<sup>3</sup> Podkategorie 1A, 1B i 1C GHS ONZ odpowiadają odpowiednio grupom opakowaniowym ONZ I, II i III

## DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

### Dane

28. Czas (w minutach), jaki upłynął od zastosowania substancji do przeniknięcia bariery w odniesieniu do badanej substancji chemicznej i kontroli dodatnich, należy zgłosić w postaci tabeli jako poszczególne dane dla powtórzeń, a także średnie  $\pm$  odchylenie standardowe dla każdej próby.

### Sprawozdanie z badania

29. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

*Badana substancja chemiczna oraz substancje kontrolne:*

- substancja jednoskładnikowa: dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa IUPAC lub CAS, numer CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny, czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń, stosownie do przypadku i jeśli jest to praktycznie wykonalne itp.,

- substancja wieloskładnikowa, UVCB i mieszanina: opisana w miarę możliwości przez podanie nazwy chemicznej (zob. powyżej), określenie ilości oraz istotnych właściwości fizykochemicznych składników,
- wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne,
- źródło, numer partii (jeżeli dostępny),
- w stosownych przypadkach obróbka badanej substancji chemicznej/substancji kontrolnej przed badaniem (np. ogrzanie, rozdrobnienie),
- stabilność badanej substancji chemicznej, termin przydatności lub data ponownej analizy, jeżeli są znane,
- warunki przechowywania.

*Nośnik:*

- identyfikacja, stężenie (jeżeli dotyczy) użyta objętość,
- uzasadnienie wyboru nośnika.

*Wykorzystany model bariery membranowej in vitro i protokół, w tym wykazana dokładność i wiarygodność*

*Warunki badania:*

- opis wykorzystanej aparatury i zastosowanych procedur przygotowania,
- pochodzenie i skład wykorzystanej bariery membranowej *in vitro*,
- skład i właściwości roztworu wskaźnika,
- metoda wykrywania,
- ilości badanej substancji chemicznej i substancji kontrolnych,
- liczba kontrprób,
- opis i uzasadnienie badania kategoryzacji skali czasu,
- metoda zastosowania,
- okresy obserwacji,
- opis stosowanych kryteriów oceny i klasyfikacji,
- wykazanie efektywności w wykonywaniu metody badawczej przed rutynowym użyciem poprzez badanie substancji chemicznych przeznaczonych do oceny biegłości.

*Wyniki:*

- tabelaryczne zestawienie poszczególnych danych surowych dotyczących poszczególnych badań i próbek kontrolnych dla każdej kontrpróby,
- opis innych zaobserwowanych skutków,
- ustalona na tej podstawie klasyfikacja w odniesieniu do modelu prognozowania lub zastosowanych kryteriów podejmowania decyzji.

*Omówienie wyników*

*Wnioski*

## BIBLIOGRAFIA

- (1) Organizacja Narodów Zjednoczonych (ONZ), Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów (GHS), wydanie pierwsze zmienione, Nowy Jork i Genewa: publikacje Organizacji Narodów Zjednoczonych, 2013. Dostępne na stronie internetowej: [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) Rozdział B.4 niniejszego załącznika, Ostre działanie drażniące na skórę.
- (3) Rozdział B.40bis niniejszego załącznika, *Badanie działania żrącego na skórę metodą In Vitro: metoda badawcza z użyciem zrekonstruowanego ludzkiego naskórka*.
- (4) Rozdział B.40 niniejszego załącznika, *Badanie działania żrącego na skórę metodą In Vitro: Test przezskórnej oporności elektrycznej (TER)*.
- (5) OECD (2015). *Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion*. [W:] Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 203, Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.
- (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. i 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” nr 12, s. 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*. [W:] Publikacja NIH nr 99-4495, NIEHS.
- (8) Gordon V.C., Harvell J.D. i Maibach H.I. (1994). *Dermal Corrosion, the Corrositex® System: A DOT Accepted Method to Predict Corrosivity Potential of Test Materials*. [W:] *In vitro Skin Toxicology: Irritation, Phototoxicity, Sensitization. Alternative Methods in Toxicology 10*, s. 37–45.
- (9) OECD (2005). *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*. [W:] Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 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*. Organizacja Współpracy Gospodarczej

i Rozwoju. Dostępne na stronie internetowej:  
<http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/PerfStand-TG430-June14.pdf>.

- (11) ECVAM (2001). *Statement on the Application of the CORROSITEX® Assay for Skin Corrosivity Testing. 15th Meeting of ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC), Ispra, Italy*, „ATLA” nr 29, s. 96–97.
- (12) U.S. DOT (2002). *Exemption DOT-E-10904 (Fifth Revision)*, (20 września 2002 r.). Waszyngton: U.S. DOT.
- (13) Rozdział B.46 niniejszego załącznika, *Badanie podrażnień skóry in vitro: Metoda badania z użyciem zrekonstruowanego ludzkiego naskórka*. ICCVAM (2004). *ICCVAM Recommended Performance Standards for In Vitro Test Methods for Skin Corrosion*. [W:] Publikacja NIH nr 04-4510, NIEHS. Dostępne na stronie internetowej:  
[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*. Dostępne na stronie internetowej:  
<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/1120.pdf>.
- (15) Organizacja Narodów Zjednoczonych (ONZ), *UN Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Model Regulations, 18th Revised Edition (Part, Chapter 2.8)*, ONZ, 2013. Dostępne na stronie internetowej:  
[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)

## Dodatek

### DEFINICJE

**Dokładność:** stopień zgodności wyników zastosowanej metody badawczej z przyjętymi wartościami odniesienia. Jest to miara efektywności metody badawczej i jeden z aspektów jej istotności. Pojęcia tego często używa się zamiennie z pojęciem »zgodność« na określenie odsetka prawidłowych wyników uzyskiwanych przy użyciu metody badawczej (9).

**Substancja chemiczna:** substancja lub mieszanina.

**System wykrywania substancji chemicznych:** wizualny lub elektroniczny system pomiarowy zawierający roztwór wskaźnika, który reaguje na obecność badanej substancji chemicznej, np. przez zmianę barwy barwnika we wskaźniku pH lub mieszanin barwników, które zmieniają swoje zabarwienie w reakcji na obecność badanej substancji chemicznej, lub przez inny rodzaj reakcji chemicznych lub elektromechanicznych.

**Zgodność:** jest to miara efektywności metody badawczej w odniesieniu do metod badawczych, które dają wyniki kategoryczne i jest ona jednym z aspektów istotności. To określenie jest czasami stosowane wymiennie z określeniem „dokładność”; definiuje się jako odsetek wszystkich badanych substancji chemicznych, które są prawidłowo sklasyfikowane jako pozytywne lub negatywne. Zgodność jest w dużym stopniu uzależniona od przewagi dodatnich wyników w rodzajach badanej substancji chemicznej (9).

**GHS (Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów):** system obejmujący klasyfikację substancji chemicznych (substancji i mieszanin) według znormalizowanych rodzajów i poziomów zagrożeń fizycznych, zdrowotnych i środowiskowych oraz odpowiednie elementy komunikacyjne, takie jak: piktogramy, hasła ostrzegawcze, zwroty wskazujące rodzaj zagrożenia, zwroty wskazujące środki ostrożności i karty charakterystyki, mające informować na temat szkodliwego działania tych substancji chemicznych w celu zapewnienia ochrony ludzi (w tym pracowników, robotników, przewoźników, konsumentów i ratowników) oraz środowiska (1).

**IATA:** zintegrowane podejście do badań i oceny.

**Mieszanina:** mieszanina lub roztwór składający się z co najmniej dwóch substancji.

**Substancja jednoskładnikowa:** substancja zdefiniowana za pomocą jej składu ilościowego, w której jeden główny składnik występuje w stężeniu co najmniej 80 % (w/w).

**Substancja wieloskładnikowa:** substancja zdefiniowana za pomocą jej składu ilościowego, w której więcej niż jeden główny składnik występuje w stężeniu  $\geq 10\%$  (w/w) i  $< 80\%$  (w/w). Substancja wieloskładnikowa powstaje w wyniku procesu wytwarzania. Różnica między mieszaniną a substancją wieloskładnikową polega na tym, że mieszaninę uzyskuje się w wyniku zmieszania co najmniej dwóch substancji, między którymi nie zachodzi reakcja chemiczna. Substancja wieloskładnikowa powstaje w wyniku reakcji chemicznej.



NC: substancja niemająca działania żrącego.

**Standardy wykonywania badań (PS):** normy oparte na zwalidowanej metodzie badania, zapewniające podstawę do oceny porównywalności proponowanej metody badawczej, która jest podobna do metody referencyjnej pod względem mechanistycznym i funkcjonalnym. Uwzględnia się (i) istotne elementy metody badania; (ii) podstawowy wykaz chemicznych substancji odniesienia wybranych spośród substancji chemicznych wykorzystywanych w celu wykazania dopuszczalnej efektywności zwalidowanej metody badania; oraz (iii) podobny poziom dokładności i wiarygodności, na podstawie wyników uzyskanych dla zwalidowanej metody badawczej, który proponowana metoda badania powinna osiągnąć przy ocenie z wykorzystaniem podstawowego wykazu chemicznych substancji odniesienia (9).

**Istotność:** opis powiązania badania z oczekiwanym skutkiem oraz czy jest ono znaczące i użyteczne dla konkretnego celu. Jest to zakres, w jakim metoda badawcza prawidłowo mierzy lub przewiduje biologiczny oczekiwany skutek. Istotność obejmuje uwzględnienie dokładności (zgodności) metody badania (9).

**Wiarygodność:** miernik zakresu, w jakim metoda badania może zostać wykonana w sposób odtwarzalny w jednym laboratorium i pomiędzy laboratoriami w dłuższym okresie czasu, w przypadku jej wykonywania przy użyciu tego samego protokołu. Ocenia się ją poprzez obliczenie odtwarzalności wewnątrz- i międzylaboratoryjnej (9).

**Czułość:** odsetek wszystkich substancji chemicznych dających wynik dodatni / aktywnych substancji chemicznych prawidłowo sklasyfikowanych za pomocą danej metody badawczej. Jest to miara dokładności metody badania, która daje wyniki katagoryczne, stanowiąca parametr istotny dla oceny istotności metody badania (9).

**Działanie żrące na skórę *in vivo*:** powstanie nieodwracalnego uszkodzenia skóry; tj. widocznej martwicy przebiegającej przez naskórek w głąb skóry, spowodowanej naniesieniem badanej substancji chemicznej na okres nieprzekraczający czterech godzin. Reakcjami na działanie żrące są wrzody, krwotoki, krwawiące strupy oraz – po zakończeniu 14-dniowej obserwacji – odbarwienia wynikłe ze zblednięcia skóry, obszary jednolitej alopecji, a także blizny. Celem oceny wątpliwych uszkodzeń można przeprowadzić badanie histopatologiczne.

**Swoistość:** odsetek wszystkich substancji chemicznych dających wynik ujemny / nieaktywnych substancji chemicznych prawidłowo sklasyfikowanych za pomocą danej metody badawczej. Jest to miara dokładności metody badania, która daje wyniki katagoryczne, stanowiąca parametr istotny dla oceny istotności metody badania (9).

**Substancja:** pierwiastek chemiczny i jego związki w stanie naturalnym lub uzyskane w wyniku dowolnego procesu produkcyjnego, w tym wszelkie dodatki konieczne do zachowania trwałości produktu i wszelkie zanieczyszczenia powstałe w wyniku zastosowanego procesu, z wyłączeniem wszelkich rozpuszczalników, które można oddzielić bez wpływu na stabilność substancji i bez zmiany jej składu.

**Badana substancja chemiczna:** dowolna substancja lub mieszanina badana za pomocą

niniejszej metody badawczej.

**UVCB:** substancje o nieznanym lub zmiennym składzie, złożone produkty reakcji lub materiały biologiczne.

## **B.66 STABILNIE TRANSFEKOWANA TRANSAKTYWACJA W BADANIACH *IN VITRO* DO WYKRYWANIA AGONISTÓW I ANTAGONISTÓW RECEPTORA ESTROGENOWEGO**

### **WPROWADZENIE OGÓLNE**

#### **Wytyczna OECD dotycząca badań w oparciu o wyniki**

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna wytycznej OECD dotyczącej badań (TG) nr 455 (2016). TG 455 jest wytyczną dotyczącą badań w oparciu o wyniki, która opisuje metodykę stabilnie transfekowanej transaktywacji w testach *in vitro* do wykrywania agonistów i antagonistów receptora estrogenowego (badania aktywacji transkrypcji receptora estrogenowego – ER TA). Obejmuje ona szereg metod badań podobnych pod względem mechanistycznym i funkcjonalnym mających na celu określenie agonistów lub antagonistów receptora estrogenowego (tj. ER $\alpha$ , lub ER $\beta$ ), które powinny ułatwiać opracowanie nowych – podobnych lub zmienionych – metod badawczych zgodnie z zasadami walidacji określonymi w wytycznych OECD *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment* (1). W pełni zwalidowane referencyjne metody badań (dodatek 2 i dodatek 3), które stanowią podstawę tej wytycznej dotyczącej badań w oparciu o wyniki, to:
  - test stabilnie transfekowanej transaktywacji (STTA) (2) wykorzystaniem linii komórkowej (h) ER $\alpha$ -HeLa-9903 oraz
  - test VM7Luc ER TA (3) przy użyciu linii komórkowej VM7Luc4E2<sup>1</sup>, która wyraża przede wszystkim hER $\alpha$  z niewielkim udziałem hER $\beta$ (4)(5).

W celu opracowania i walidacji podobnych testów dotyczących tego samego punktu końcowego zagrożenia dostępne są standardy wykonywania badań (6) (7), które należy stosować. Umożliwiają one terminową zmianę wytycznej dotyczącej badań w oparciu o wyniki nr 455, aby do zaktualizowanej wytycznej dotyczącej badań w oparciu o wyniki można było dodać nowe podobne testy; podobne testy zostaną

---

<sup>1</sup> Do czerwca 2016 r. linia ta była oznaczona jako linia komórkowa BG1Luc. Jako pierwszy komórki BG-1 opisał Geisinger *et al.* (1998) (35), po czym ich charakterystykę opracowali badacze z Narodowego Instytutu Nauk o Zdrowiu Środowiskowym (36). Stosunkowo niedawno odkryto, że istnieją dwie różne odmiany komórek BG-1 stosowanych przez badaczy – BG-1 Fr i BG-1 NIEHS. Wnikliwa analiza, w tym badanie DNA tych dwóch odmiennych linii komórkowych BG-1 przeprowadzone przez Li *et al.* (2014) (37) wykazała, że BG-1 Fr była niepowtarzalna i że linia BG-1 NIEHS, tj. pierwotna linia komórkowa stosowana do opracowania badania, nie była linią komórkową ludzkiego raka jajnika, lecz odmianą linii komórkowej ludzkiego raka piersi MCF7. Linia komórkowa stosowana w badaniu znana pod nazwą BG1Luc4E2 (38) będzie obecnie nosiła nazwę VM7Luc4E2 („V” = odmiana; „M7” = komórki MCF7). Analogiczny test będzie obecnie określany jako „badanie aktywacji transkrypcji receptora estrogenowego VM7Luc” („test VM7Luc ER TA”). Chociaż powoduje to zmianę pochodzenia linii komórkowej, na której opiera się test, to nie ma wpływu ani na opublikowane badania walidacyjne, ani na użyteczność i stosowanie tego testu do celów rozpoznawania estrogenowych/antyestrogenowych substancji chemicznych.

jednak dodane dopiero po przeglądzie przeprowadzonym przez OECD i po uzgodnieniu przez tę organizację, że standardy wykonywania badań zostały spełnione. Testy ujęte w wytycznej dotyczącej badań nr 455 można stosować w sposób nieograniczony w celu spełnienia wymogów państw członkowskich OECD w zakresie wyników badań dotyczących transaktywacji receptora estrogenowego przy jednoczesnym korzystaniu z wzajemnego uznawania danych OECD.

### **Kontekst i zasady dotyczące testów zawartych w niniejszej metodzie badawczej**

2. W 1998 r. OECD podjęła działania o wysokim priorytecie, mające na celu zmianę istniejących wytycznych i opracowanie nowych wytycznych dotyczących badań na potrzeby badań klasyfikacyjnych i badań substancji potencjalnie zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego. W 2012 r. zmieniono ramy koncepcyjne OECD dotyczące badania i oceny substancji potencjalnie zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego. Oryginalne i zmienione ramy koncepcyjne uwzględniono jako załączniki do wytycznych OECD *Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption* (8). Ramy koncepcyjne składają się z pięciu poziomów, a każdy z nich odpowiada innemu poziomowi złożoności biologicznej. Transaktywacja receptora estrogenowego opisana w niniejszej metodzie badawczej należy do poziomu 2, który obejmuje „testy *in vitro* dostarczające danych na temat wybranych mechanizmów/ścieżek układu hormonalnego”. Niniejsza metoda badawcza dotyczy testów transaktywacji *in vitro* stworzonych, aby określić agonistów i antagonistów receptora estrogenowego.
3. Interakcja estrogenów z receptorami estrogenowymi może wpłynąć na transkrypcję genów regulowanych przez estrogen, co może prowadzić do indukcji lub inhibicji procesów komórkowych, w tym tych koniecznych do proliferacji komórek, prawidłowego rozwoju płodu i funkcji reprodukcyjnej (9)(10)(11). Zakłócenie prawidłowego układu estrogenowego może potencjalnie wywołać niekorzystny wpływ na prawidłowy rozwój (ontogenezę), zdrowie reprodukcyjne i integralność układu rozrodczego.
4. Badania aktywacji transkrypcji *in vitro* opierają się na bezpośredniej lub pośredniej interakcji między substancjami zawierającymi szczególnie receptor, który reguluje transkrypcję produktu genu reporterowego. Takie testy wykorzystywano w dużym stopniu w celu oceny ekspresji genów regulowanej przez szczególne receptory jądrowe, takie jak receptory estrogenowe (12)(13)(14)(15)(16). Proponowano je w celu wykrywania transaktywacji estrogenu regulowanej przez receptor estrogenowy (17)(18)(19). Istnieją co najmniej dwa główne podtypy jądrowych receptorów estrogenowych,  $\alpha$  i  $\beta$ , które są zakodowane przez odrębne geny. Odpowiednie białka mają różne biologiczne funkcje, a także różny rozkład w tkankach i powinowactwo wiązania ligandów (20)(21)(22)(23)(24)(25)(26). Jądrowy ER $\alpha$  pośredniczy w klasycznej reakcji estrogennej (27)(28)(29)(30) i z związku z tym większość opracowywanych obecnie modeli mających na celu zmierzenie aktywacji lub inhibicji ER dotyczy ER $\alpha$ . Badania wykonuje się w celu

określenia substancji chemicznych, które aktywują (lub hamują) receptor estrogenowy w następstwie wiązania ligandów, po którym kompleks receptor-ligand wiąże się z określonymi elementami reakcji DNA oraz transaktywuje gen reporterowy, powodując zwiększoną ekspresję komórkową białka markerowego. Podczas testów można wykorzystać różne reakcje genów reporterowych. W układach opartych na lucyferazie enzym lucyferaza przekształca substrat lucyferyny w produkt bioluminescencyjny, który można zmierzyć ilościowo przy użyciu luminometru. Inne przykłady częstych genów reporterowych obejmują białko fluorescencji i gen *LacZ*, który koduje  $\beta$ -galaktozydazę, enzym przetwarzający bezbarwny substrat X-gal (5-bromo-4-chloro-indolilo-galaktopiranozyd) w niebieski produkt, który można określić ilościowo przy użyciu spektrofotometru. Te geny reporterowe można ocenić w szybki i niedrogi sposób, wykorzystując dostępne na rynku zestawy badawcze.

5. Badania walidacyjne dotyczące badań aktywacji transkrypcji STTA i VM7Luc wykazały istotność i wiarygodność tych metod w odniesieniu do ich przeznaczenia (3)(4)(5)(30). Standardy wykonywania badań dotyczące testów ER TA opartych na luminescencji przy użyciu linii komórkowych raka piersi zawarto w dokumencie ICCVAM *Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL<sup>®</sup> ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An In Vitro Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals* (3). Te standardy wykonywania badań zmieniono, aby miały zastosowanie zarówno do badań aktywacji transkrypcji STTA jak i VM7Luc (2).
6. Definicje i skróty stosowane w niniejszej metodzie badawczej opisano w dodatku 1.

#### **Zakres badań aktywacji transkrypcji i związane z nimi ograniczenia**

7. Testy te proponuje się do celów badań przesiewowych i ustalania substancji priorytetowych, ale mogą one dostarczać również informacji mechanistycznych, które można wykorzystać w ramach podejścia opartego na wadze dowodów. Testy te dotyczą transaktywacji wywołanej przez substancję chemiczną wiążącą się z receptorami estrogenowymi w układzie *in vitro*. W związku z tym wyników nie należy ekstrapolować bezpośrednio do złożonej sygnalizacji i regulacji nieuszkodzonego układu hormonalnego *in vivo*.
8. Transaktywację, w której pośredniczą ER, uznaje się za jeden z kluczowych mechanizmów zaburzania funkcjonowania układu hormonalnego, chociaż istnieją także inne mechanizmy, które mogą wywołać zaburzenia funkcjonowania układu hormonalnego, między innymi (i) interakcje z innymi receptorami i układami enzymatycznymi w układzie hormonalnym, (ii) synteza hormonów, (iii) aktywacja metaboliczna lub dezaktywacja hormonów, (iv) dystrybucja hormonów do tkanek docelowych i (v) usunięcie hormonów z ciała. Żaden z testów wchodzących w skład niniejszej metody badawczej nie dotyczy tych sposobów działania.

9. Niniejsza metoda badawcza dotyczy zdolności substancji chemicznych do aktywowania (tj. działania jako agoniści), a także do hamowania (tj. działania jako antagoniści) transkrypcji zależnej od ER. Niektóre substancje chemiczne, które w zależności od rodzaju komórek wykazują zarówno działanie agonistyczne, jak i antagonistyczne, określa się jako selektywne modulatory receptora estrogenowego (SERM). Substancje chemiczne, które w tych testach dają wynik ujemny, można ocenić za pomocą testu wiązania ER przed stwierdzeniem, że dana substancja chemiczna nie wiąże się z receptorem. Ponadto testy mogą zapewnić informacje wyłącznie dotyczące działania pierwotnej molekuly, biorąc pod uwagę ograniczone zdolności metaboliczne układów komórek *in vitro*. Biorąc pod uwagę, że podczas walidacji wykorzystano jedynie pojedyncze substancje, nie zbadano zastosowania do mieszanin stosowanych w badaniu. Teoretycznie metoda badawcza może jednak mieć zastosowanie do badania zarówno substancji wieloskładnikowych, substancji o nieznanym lub zmiennym składzie, złożonych produktów reakcji lub materiały biologicznych, jak i mieszanin. Przed zastosowaniem przedmiotowej metody badawczej w odniesieniu do substancji wieloskładnikowej, UVCB lub mieszaniny w celu zgromadzenia danych na potrzeby założonego celu regulacyjnego należy zastanowić się, czy zastosowanie niniejszej metody może doprowadzić do uzyskania wyników odpowiednich z punktu widzenia tego celu, a jeżeli tak – dlaczego. Przeprowadzenie takiej analizy nie jest konieczne, jeżeli ustanowiono wymóg regulacyjny dotyczący badania danej mieszaniny.
10. Do celów informacyjnych w tabeli 1 przedstawiono wyniki testu agonisty 34 substancji, które zbadano za pomocą obu w pełni zwalidowanych referencyjnych metod badań opisanych w niniejszej metodzie badawczej. 26 z tych substancji sklasyfikowano jako jednoznacznych agonistów ER a 8 jako ujemne na podstawie opublikowanych sprawozdań, w tym testów *in vitro* wiązania i transaktywacji lub testu wzrostu macicy (2)(3)(18)(31)(32)(33)(34). W tabeli 2 przedstawiono wyniki testu antagonistycznego 15 substancji, które zbadano za pomocą obu w pełni zwalidowanych referencyjnych metod badań opisanych w niniejszej metodzie badawczej. Cztery z tych substancji sklasyfikowano jako jednoznacznych/przypuszczalnych antagonistów ER a 10 jako ujemne na podstawie opublikowanych sprawozdań, w tym testów *in vitro* wiązania i transaktywacji ER (2)(3)(18)(31). Jeżeli chodzi o dane podsumowane w tabeli 1 i tabeli 2, wyniki obu referencyjnych metod badawczych dotyczące klasyfikacji wszystkich substancji, poza jedną (mifepryston), w odniesieniu do testu antagonisty były stuprocentowo zgodne, a wszystkie substancje sklasyfikowano prawidłowo jako agonistów/antagonistów ER lub jako substancje ujemne. Dodatkowe informacje dotyczące tej grupy substancji chemicznych, a także dodatkowe substancje chemiczne zbadane za pomocą testów STTA i VM7Luc ER TA podczas badań walidacyjnych zawarto w dodatku 2 (tabela 1, 2 i 3) do standardów wykonywania badań ER TA (6)(7).

**Tabela 1:** Przegląd wyników testów STTA i VM7Luc ER TA dotyczących substancji zbadanych za pomocą obu testów agonistycznych, które sklasyfikowano jako agonistów ER dodatnich (DOD.) lub ujemnych (UJEM.)

|    | Substancja                         | Numer CAS  | Test STTA <sup>1</sup> |                              |                                           | Test VM7Luc ER TA <sup>2</sup> |                                             | Źródło danych do celów klasyfikacji <sup>4</sup> |             |               |
|----|------------------------------------|------------|------------------------|------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------------|--------------------------------------------------|-------------|---------------|
|    |                                    |            | Działanie ER TA        | wartość PC <sub>10</sub> (M) | wartość PC <sub>50</sub> <sup>b</sup> (M) | Działanie ER TA                | Wartość EC <sub>50</sub> <sup>b,3</sup> (M) | Inne testy ER TA <sup>c</sup>                    | Wiązanie ER | Wzrost macicy |
| 1  | 17β-estradiol <sup>a</sup>         | 50-28-2    | DOD.                   | < 1,00 × 10 <sup>-11</sup>   | < 1,00 × 10 <sup>-11</sup>                | DOD.                           | 5,63 × 10 <sup>-12</sup>                    | DOD. (227/227)                                   | DOD.        | DOD.          |
| 2  | 17α-estradiol <sup>a</sup>         | 57-91-0    | DOD.                   | 7,24 × 10 <sup>-11</sup>     | 6,44 × 10 <sup>-10</sup>                  | DOD.                           | 1,40 × 10 <sup>-9</sup>                     | DOD. (11/11)                                     | DOD.        | DOD.          |
| 3  | Etynyloestradiol 17-α <sup>a</sup> | 57-63-6    | DOD.                   | < 1,00 × 10 <sup>-11</sup>   | < 1,00 × 10 <sup>-11</sup>                | DOD.                           | 7,31 × 10 <sup>-12</sup>                    | DOD. (22/22)                                     | DOD.        | DOD.          |
| 4  | 17β-trenbolon                      | 10161-33-8 | DOD.                   | 1,78 × 10 <sup>-8</sup>      | 2,73 × 10 <sup>-7</sup>                   | DOD.                           | 4,20 × 10 <sup>-8</sup>                     | DOD. (2/2)                                       | NB          | NB            |
| 5  | 19-nortestosterone <sup>a</sup>    | 434-22-0   | DOD.                   | 9,64 × 10 <sup>-9</sup>      | 2,71 × 10 <sup>-7</sup>                   | DOD.                           | 1,80 × 10 <sup>-6</sup>                     | DOD. (4/4)                                       | DOD.        | DOD.          |
| 6  | 4-kumylfenol <sup>a</sup>          | 599-64-4   | DOD.                   | 1,49 × 10 <sup>-7</sup>      | 1,60 × 10 <sup>-6</sup>                   | DOD.                           | 3,20 × 10 <sup>-7</sup>                     | DOD. (5/5)                                       | DOD.        | NB            |
| 7  | 4-tert-Oktylofenol                 | 140-66-9   | DOD.                   | 1,85 × 10 <sup>-9</sup>      | 7,37 × 10 <sup>-8</sup>                   | DOD.                           | 3,19 × 10 <sup>-8</sup>                     | DOD. (21/24)                                     | DOD.        | DOD.          |
| 8  | Apigenin <sup>a</sup>              | 520-36-5   | DOD.                   | 1,31 × 10 <sup>-7</sup>      | 5,71 × 10 <sup>-7</sup>                   | DOD.                           | 1,60 × 10 <sup>-6</sup>                     | DOD. (26/26)                                     | DOD.        | NB            |
| 9  | Atrazyna <sup>a</sup>              | 1912-24-9  | UJEM.                  | -                            | -                                         | UJEM.                          | -                                           | UJEM. (30/30)                                    | UJEM.       | NB            |
| 10 | Bisfenol A <sup>a</sup>            | 80-05-7    | DOD.                   | 2,02 × 10 <sup>-8</sup>      | 2,94 × 10 <sup>-7</sup>                   | DOD.                           | 5,33 × 10 <sup>-7</sup>                     | DOD. (65/65)                                     | DOD.        | DOD.          |
| 11 | Bisfenol B <sup>a</sup>            | 77-40-7    | DOD.                   | 2,36 × 10 <sup>-8</sup>      | 2,11 × 10 <sup>-7</sup>                   | DOD.                           | 1,95 × 10 <sup>-7</sup>                     | DOD. (6/6)                                       | DOD.        | DOD.          |
| 12 | Ftalan benzylu butylu <sup>a</sup> | 85-68-7    | DOD.                   | 1,14 × 10 <sup>-6</sup>      | 4,11 × 10 <sup>-6</sup>                   | DOD.                           | 1,98 × 10 <sup>-6</sup>                     | DOD. (12/14)                                     | DOD.        | UJEM.         |
| 13 | Kortykosteron <sup>a</sup>         | 50-22-6    | UJEM.                  | -                            | -                                         | UJEM.                          | -                                           | UJEM. (6/6)                                      | UJEM.       | NB            |
| 14 | Kumestrol <sup>a</sup>             | 479-13-0   | DOD.                   | 1,23 × 10 <sup>-9</sup>      | 2,00 × 10 <sup>-8</sup>                   | DOD.                           | 1,32 × 10 <sup>-7</sup>                     | DOD. (30/30)                                     | DOD.        | NB            |
| 15 | Daidzeina <sup>a</sup>             | 486-66-8   | DOD.                   | 1,76 × 10 <sup>-8</sup>      | 1,51 × 10 <sup>-7</sup>                   | DOD.                           | 7,95 × 10 <sup>-7</sup>                     | DOD. (39/39)                                     | DOD.        | DOD.          |
| 16 | Dietylostylbestrol <sup>a</sup>    | 56-53-1    | DOD.                   | < 1,00 × 10 <sup>-11</sup>   | 2,04 × 10 <sup>-11</sup>                  | DOD.                           | 3,34 × 10 <sup>-11</sup>                    | DOD. (42/42)                                     | DOD.        | NB            |
| 17 | Ftalan di-n-butylu                 | 84-74-2    | DOD.                   | 4,09 × 10 <sup>-6</sup>      |                                           | DOD.                           | 4,09 × 10 <sup>-6</sup>                     | DOD. (6/11)                                      | DOD.        | UJEM.         |
| 18 | Etyloparaben                       | 120-47-8   | DOD.                   | 5,00 × 10 <sup>-6</sup>      | (PC <sub>50</sub> nie ustalono)           | DOD.                           | 2,48 × 10 <sup>-5</sup>                     | DOD.                                             |             | NB            |
| 19 | Estron <sup>a</sup>                | 53-16-7    | DOD.                   | 3,02 × 10 <sup>-11</sup>     | 5,88 × 10 <sup>-10</sup>                  | DOD.                           | 2,34 × 10 <sup>-10</sup>                    | DOD. (26/28)                                     | DOD.        | DOD.          |
| 20 | Genisteina <sup>a</sup>            | 446-72-0   | DOD.                   | 2,24 × 10 <sup>-9</sup>      | 2,45 × 10 <sup>-8</sup>                   | DOD.                           | 2,71 × 10 <sup>-7</sup>                     | DOD. (100/102)                                   | DOD.        | DOD.          |
| 21 | Haloperydol                        | 52-86-8    | UJEM.                  | -                            | -                                         | UJEM.                          | -                                           | UJEM. (2/2)                                      | UJEM.       | NB            |
| 22 | Kemferol <sup>a</sup>              | 520-18-3   | DOD.                   | 1,36 × 10 <sup>-7</sup>      | 1,21 × 10 <sup>-6</sup>                   | DOD.                           | 3,99 × 10 <sup>-6</sup>                     | DOD. (23/23)                                     | DOD.        | NB            |
| 23 | Kepone <sup>a</sup>                | 143-50-0   | DOD.                   | 7,11 × 10 <sup>-7</sup>      | 7,68 × 10 <sup>-6</sup>                   | DOD.                           | 4,91 × 10 <sup>-7</sup>                     | DOD. (14/18)                                     | DOD.        | NB            |
| 24 | Ketokonazol                        | 65277-42-1 | UJEM.                  | -                            | -                                         | UJEM.                          | -                                           | UJEM. (2/2)                                      | UJEM.       | NB            |

|    |                                        |          |       |                          |                                              |       |                        |              |       |      |
|----|----------------------------------------|----------|-------|--------------------------|----------------------------------------------|-------|------------------------|--------------|-------|------|
| 25 | Linuron <sup>a</sup>                   | 330-55-2 | UJEM. | -                        | -                                            | UJEM. | -                      | UJEM. (8/8)  | UJEM. | NB   |
| 26 | mezoheksesrol <sup>a</sup>             | 84-16-2  | DOD.  | $< 1,00 \times 10^{-11}$ | $2,75 \times 10^{-11}$                       | DOD.  | $1,65 \times 10^{-11}$ | DOD. (4/4)   | DOD.  | NB   |
| 27 | Metylotestosteron <sup>a</sup>         | 58-18-4  | DOD.  | $1,73 \times 10^{-7}$    | $4,11 \times 10^{-6}$                        | DOD.  | $2,68 \times 10^{-6}$  | DOD. (5/6)   | DOD.  | NB   |
| 28 | Moryna                                 | 480-16-0 | DOD.  | $5,43 \times 10^{-7}$    | $4,16 \times 10^{-6}$                        | DOD.  | $2,37 \times 10^{-6}$  | DOD. (2/2)   | DOD.  | NB   |
| 29 | Noretynodrel <sup>a</sup>              | 68-23-5  | DOD.  | $1,11 \times 10^{-11}$   | $1,50 \times 10^{-9}$                        | DOD.  | $9,39 \times 10^{-10}$ | DOD. (5/5)   | DOD.  | NB   |
| 30 | <i>p,p'</i> -Metoksychlor <sup>a</sup> | 72-43-5  | DOD.  | $1,23 \times 10^{-6}$    | (PC <sub>50</sub> nie ustalono) <sup>b</sup> | DOD.  | $1,92 \times 10^{-6}$  | DOD. (24/27) | DOD.  | DOD. |
| 31 | Fenobarbital <sup>a</sup>              | 57-30-7  | UJEM. | -                        | -                                            | UJEM. | -                      | UJEM. (2/2)  | UJEM. | NB   |
| 32 | Rezerpina                              | 50-55-5  | UJEM. | -                        | -                                            | UJEM. | -                      | UJEM. (4/4)  | UJEM. | NB   |
| 33 | Spironolakton <sup>a</sup>             | 52-01-7  | UJEM. | -                        | -                                            | UJEM. | -                      | UJEM. (4/4)  | UJEM. | NB   |
| 34 | Testosteron                            | 58-22-0  | DOD.  | $2,82 \times 10^{-8}$    | $9,78 \times 10^{-6}$                        | DOD.  | $1,75 \times 10^{-5}$  | DOD. (5/10)  | DOD.  | NB   |

Skróty: Numer CAS = numer w rejestrze Chemical Abstracts Service; M = molowy; EC<sub>50</sub> = połowa maksymalnego stężenia efektywnego badanej substancji; UJEM. = ujemny; DOD. = dodatni; NB = nie badano; PC<sub>10</sub> (and PC<sub>50</sub>) = stężenie badanej substancji, przy którym reakcja stanowi 10 % (lub 50 % w przypadku PC<sub>50</sub>) reakcji kontroli dodatniej (E2, 1nM) na każdej płytce.

<sup>a</sup> Wspólne substancje badane w ramach testów STTA i VM7Luc ER TA, które zostały określone jako agoniści ER lub ujemne i wykorzystane do oceny dokładności w badaniu walidacyjnym VM7Luc ER TA (sprawozdanie oceniające ICCVAM dotyczące VM7Luc ER TA, tabela 4-1 (3)).

<sup>b</sup> Maksymalne stężenie badane bez ograniczeń wynikających z cytotoksyczności lub nierozpuszczalności wynosiło  $1 \times 10^{-5}$  M (test STTA) i  $1 \times 10^{-3}$  M (test VM7Luc ER TA).

<sup>c</sup> Liczba w nawiasie oznacza wyniki badania sklasyfikowane jako dodatnie (DOD) lub ujemne (UJEM.) we wszystkich badaniach referencyjnych.

<sup>1</sup> Wartości zgłoszone w projekcie sprawozdania *Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line* (2).

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

<sup>3</sup> Średnie wartości EC<sub>50</sub> zostały obliczone na podstawie wartości zgłoszonych przez laboratoria badania walidacyjnego VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM i Hiyoshi) (3).

<sup>4</sup> Klasyfikacja jako agonista ER lub jako substancja ujemna została oparta na informacjach zawartych w dokumentach ICCVAM Background Review Documents (BRD) w odniesieniu do metod badań ER Binding i TA (31) oraz informacjach uzyskanych z publikacji wydanych i poddanych przeglądowi po zakończeniu ICCVAM BRD (2)(3)(18)(31)(33)(34).

Uwagi: Nie we wszystkich testach przeprowadzanych w ramach niniejszej metody badawczej mierzy się te same wartości. W niektórych przypadkach obliczenie EC<sub>50</sub> nie jest możliwe, ponieważ nie dochodzi do wygenerowania pełnej krzywej dawka-odpowiedź. Chociaż w teście STTA wartość PC<sub>10</sub> jest kluczowym pomiarem, mogą istnieć również dalsze przykłady, w których wartość PC<sub>x</sub> dostarczy przydatnych informacji.



**Tabela 2:** Porównanie wyników testów STTA i VM7Luc ER TA dotyczących substancji zbadanych za pomocą obu testów antagonisty, które sklasyfikowano jako antagonistów ER dodatnich (DOD.) lub ujemnych (UJEM.)

|    | Substancja <sup>a</sup>   | Numer CAS  | Test STTA ER <sup>1</sup> |                                           | Test VM7Luc ER TA <sup>2</sup> |                                             | Potencjalne wyniki ER STTA <sup>4</sup> | Uzgodniona klasyfikacja ICCVAM <sup>5</sup> | Klasa chemiczna MeSH <sup>6</sup>   | Klasa produktowa <sup>7</sup>                                         |
|----|---------------------------|------------|---------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
|    |                           |            | Działanie ER TA           | wartość IC <sub>50</sub> <sup>b</sup> (M) | Działanie ER TA                | wartość IC <sub>50</sub> <sup>b,3</sup> (M) |                                         |                                             |                                     |                                                                       |
| 1  | 4-hydroksy-tamoksyfen     | 68047-06-3 | DOD.                      | $3,97 \times 10^{-9}$                     | DOD.                           | $2,08 \times 10^{-7}$                       | umiarkowany DOD.                        | DOD.                                        | Węglowodór (cykliczny)              | Produkt leczniczy                                                     |
| 2  | Dibenzo[a,h]antracen      | 53-70-3    | DOD.                      | IC <sub>50</sub> nie występuje            | DOD.                           | IC <sub>50</sub> nie występuje              | DOD.                                    | ZD                                          | Związek policykliczny               | Laboratoryjna substancja chemiczna, produkt naturalny                 |
| 3  | Mifepryston               | 84371-65-3 | DOD.                      | $5,61 \times 10^{-6}$                     | UJEM.                          | -                                           | umiarkowany DOD                         | UJEM.                                       | Steryd                              | Produkt leczniczy                                                     |
| 4  | Chlorowodorek raloksyfenu | 82640-04-8 | DOD.                      | $7,86 \times 10^{-10}$                    | DOD.                           | $1,19 \times 10^{-9}$                       | umiarkowany DOD.                        | DOD.                                        | Węglowodór (cykliczny)              | Produkt leczniczy                                                     |
| 5  | Tamoksyfen                | 10540-29-1 | DOD.                      | $4,91 \times 10^{-7}$                     | DOD.                           | $8,17 \times 10^{-7}$                       | DOD.                                    | DOD.                                        | Węglowodór (cykliczny)              | Produkt leczniczy                                                     |
| 6  | 17β-estradiol             | 50-28-2    | UJEM.                     | -                                         | UJEM.                          | -                                           | ZU                                      | ZU                                          | Steryd                              | Produkt leczniczy, środek weterynaryjny                               |
| 7  | Apigenin                  | 520-36-5   | UJEM.                     | -                                         | UJEM.                          | -                                           | UJEM.                                   | UJEM.                                       | Związek heterocykliczny             | Barwnik, produkt naturalny, półprodukt farmaceutyczny                 |
| 8  | Atrazyna                  | 1912-24-9  | UJEM.                     | -                                         | UJEM.                          | -                                           | UJEM.                                   | ZU                                          | Związek heterocykliczny             | Herbicyd                                                              |
| 9  | Ftalan di-n-butyłu        | 84-74-2    | UJEM.                     | -                                         | UJEM.                          | -                                           | UJEM.                                   | UJEM.                                       | Ester, Kwas ftalowy                 | Składnik kosmetyczny, przemysłowa substancja chemiczna, plastifikator |
| 10 | Fenarymol                 | 60168-88-9 | UJEM.                     | -                                         | UJEM.                          | -                                           | nie badano                              | ZU                                          | Związek heterocykliczny, pirymidyna | Środek grzybobójczy                                                   |
| 11 | Flawon                    | 525-82-6   | UJEM.                     | -                                         | UJEM.                          | -                                           | ZU                                      | ZU                                          | Flawonoid, związek heterocykliczny  | Produkt naturalny, produkt leczniczy                                  |
| 12 | Flutamid                  | 13311-84-7 | UJEM.                     | -                                         | UJEM.                          | -                                           | UJEM.                                   | ZU                                          | Amidy                               | Produkt leczniczy, środek weterynaryjny                               |
| 13 | Genisteina                | 446-72-0   | UJEM.                     | -                                         | UJEM.                          | -                                           | ZU                                      | UJEM.                                       | Flawonoid, związek heterocykliczny  | Produkt naturalny, produkt leczniczy                                  |
| 14 | p-n-nonylofenol           | 104-40-5   | UJEM.                     | -                                         | UJEM.                          | -                                           | nie badano                              | UJEM.                                       | Fenol                               | Półprodukt                                                            |

|    |             |          |       |   |       |   |    |       |                           |                   |
|----|-------------|----------|-------|---|-------|---|----|-------|---------------------------|-------------------|
| 15 | Resweratrol | 501-36-0 | UJEM. | - | UJEM. | - | ZU | UJEM. | Węglowodór<br>(cykliczny) | Produkt naturalny |
|----|-------------|----------|-------|---|-------|---|----|-------|---------------------------|-------------------|

Skróty: Numer CAS = numer w rejestrze Chemical Abstracts Service; M = molowy; IC<sub>50</sub> = połowa maksymalnego stężenia hamującego badanej substancji; UJEM. = ujemny; ZU = zakładany ujemny; DOD. = dodatni; ZD = zakładany dodatni.

<sup>a</sup> Wspólne substancje badane w ramach testów STTA i VM7Luc ER TA, które zostały określone jako antagoniści ER lub ujemne ER i wykorzystane do oceny dokładności w badaniu walidacyjnym VM7Luc ER TA (2)(3).

<sup>b</sup> Maksymalne stężenie badane bez ograniczeń wynikających z cytotoksyczności lub nierozpuszczalności wynosiło 1 x 10<sup>-3</sup> M (test STTA) i 1 x 10<sup>-5</sup> M (test VM7Luc ER TA).

<sup>1</sup> The Validation Report of the Stably transfected Transcriptional Activation Assay to Detect ER mediated activity, część B (2)

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

<sup>3</sup> Średnie wartości IC<sub>50</sub> zostały obliczone na podstawie wartości zgłoszonych przez laboratoria badania walidacyjnego VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM i Hiyoshi) (3).

<sup>4</sup> Działanie STTA ER założone na podstawie zgłoszonych wyników tych testów znanych dzięki danym historycznym CERi dotyczącym testu wiązania ER, testowi wzrostu macicy i zestawionym informacjom z ogólnie dostępnych publikacji (2)

<sup>5</sup> Klasyfikacja jako antagonist ER lub jako ujemny ER została oparta na informacjach zawartych w dokumentach ICCVAM Background Review Documents (BRD) w odniesieniu do testów ER Binding i TA (31) oraz informacjach uzyskanych z publikacji wydanych i poddanych przeglądowi po zakończeniu ICCVAM BRD (2)(3)(18)(31).

<sup>6</sup> Substancje przypisano do co najmniej jednej klasy chemicznej przy użyciu Medical Subject Headings (MeSH) amerykańskiej National Library of Medicine – międzynarodowo uznanego znormalizowanego systemu klasyfikacji (dostępnego na stronie <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

<sup>7</sup> Substancje przypisano do co najmniej jednej klasy produktowej przy użyciu bazy danych substancji niebezpiecznych amerykańskiej National Library of Medicine (dostępnej na stronie <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).

## **ELEMENTY TESTU ER TA**

### **Istotne elementy testu**

11. Niniejsza metoda badawcza ma zastosowanie do testów, podczas których wykorzystuje się stabilnie transfekowany lub endogenny receptor estrogenowy alfa oraz stabilnie transfekowany konstrukt genu reporterowego podlegający kontroli co najmniej jednego elementu reakcji na estrogen; mogą jednak występować inne receptory, takie jak ER $\beta$ . Są to istotne elementy testu.

### **Kontrole**

12. Należy opisać podstawę proponowanych równoległych wzorców referencyjnych dla każdego testu agonisty i antagonisty. Jednoczesne kontrole (ujemne, z rozpuszczalnikiem i dodatnie) w stosownych przypadkach służą jako wskazówka, że test działa w warunkach badania, a także stanowią podstawę porównań między doświadczeniami; kontrole te wchodziły zwykle w skład kryteriów dopuszczalności danego doświadczenia (1).

### **Standardowe procedury kontroli jakości**

13. Standardowe procedury kontroli jakości należy przeprowadzać jak opisano dla każdego testu w celu zapewnienia, by każda linia komórkowa utrzymywała stabilność przez wiele pasażów, by pozostawała niezanieczyszczona mykoplazmą (tj. niezanieczyszczona skażeniem bakteryjnym) oraz by zachowała zdolność do zapewnienia oczekiwanych reakcji, w których pośredniczy ER, na przestrzeni czasu. Należy przeprowadzić dalszą kontrolę linii komórkowych, aby sprawdzić ich właściwą tożsamość, a także inne zanieczyszczenia (np. grzyby, drożdże i wirusy).

### **Wykazanie biegłości laboratorium**

14. Przed przeprowadzeniem badania nieznanych substancji chemicznych przy użyciu któregośkolwiek z testów przeprowadzanych w ramach niniejszej metody badawczej każde laboratorium powinno wykazać biegłość w stosowaniu testu. Aby wykazać biegłość, każde laboratorium powinno zbadać 14 substancji służących do wykazania biegłości wymienionych w tabeli 3 w odniesieniu do testu agonisty i 10 substancji służących do wykazania biegłości wymienionych w tabeli 4 w odniesieniu do testu antagonisty. To badanie biegłości potwierdzi również reaktywność układu badawczego. Wykaz substancji służących do wykazania biegłości stanowi podzbiór substancji odniesienia przedstawionych w standardach wykonywania badań dotyczących testów ER TA (6). Substancje te są dostępne na rynku, należą do klas substancji chemicznych łączących się często z aktywnością agonistów lub antagonistów ER, wykazują odpowiedni zakres siły działania oczekiwanej w przypadku agonistów/antagonistów ER (tj. wysoki lub słaby) oraz obejmują substancje ujemne. Badanie substancji służących do wykazania biegłości należy powtórzyć co najmniej dwukrotnie, w innych dniach. Biegłość wykazuje się w drodze poprawnej klasyfikacji (dodatnia/ujemna)

każdej substancji służącej do wykazania biegłości. Podczas nauki przeprowadzania testów każdy technik powinien powtórzyć badanie biegłości. W zależności od rodzaju komórki, niektóre z tych substancji służących do wykazania biegłości mogą zachowywać się jak SERM i wykazywać działanie zarówno agonistyczne, jak i antagonistyczne. Substancje służące do wykazania biegłości są jednak sklasyfikowane w tabelach 3 i 4 według ich znanego i dominującego działania, które należy wykorzystać w celu oceny biegłości.

15. Aby wykazać efektywność oraz do celów kontroli jakości każde laboratorium powinno stworzyć bazy danych historycznych dotyczących działania agonistycznego i antagonistycznego wraz z wzorcami referencyjnymi (np.  $17\beta$ -estradiol i tamoksyfen), substancjami chemicznymi służącymi do kontroli dodatniej i ujemnej i danymi dotyczącymi kontroli z rozpuszczalnikiem (np. DMSO). Na początek bazę danych należy wygenerować z co najmniej 10 niezależnych prób dotyczących agonistów (np.  $17\beta$ -estradiol) i 10 niezależnych serii badawczych antagonistów (np. tamoksyfen). Wyniki przyszłych analiz tych wzorców referencyjnych i kontroli z rozpuszczalnikiem należy dodawać do bazy danych, aby ją powiększyć, co pozwoli z czasem zapewnić spójność i efektywność testu biologicznego przeprowadzanego przez laboratorium.

**Tabela 3: Wykaz (14) substancje służące do wykazania biegłości w odniesieniu do testu agonisty<sup>8</sup>**

| Nr <sup>7</sup> | Substancja                  | Numer CAS  | Przewidywana reakcja <sup>1</sup> | Test STTA                                    |                                              |                            | Test VM7Luc ER TA                                |                                                                              | Klasa chemiczna MeSH <sup>5</sup>      | Klasa produktowa <sup>6</sup>                   |
|-----------------|-----------------------------|------------|-----------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------|--------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|-------------------------------------------------|
|                 |                             |            |                                   | wartość PC <sub>10</sub><br>(M) <sup>2</sup> | wartość PC <sub>50</sub><br>(M) <sup>2</sup> | Zakres badanych stężeń (M) | Wartość EC <sub>50</sub> VM7Luc (M) <sup>3</sup> | Najwyższe stężenie na potrzeby ustalenia zakresu dawkowania (M) <sup>4</sup> |                                        |                                                 |
| 14              | Dietylostylbestrol          | 56-53-1    | DOD.                              | $< 1,00 \times 10^{-11}$                     | $2,04 \times 10^{-11}$                       | $10^{-14} - 10^{-8}$       | $3,34 \times 10^{-11}$                           | $3,73 \times 10^{-4}$                                                        | Węglowodór (cykliczny)                 | Produkt leczniczy, środek weterynaryjny         |
| 12              | 17 $\alpha$ -estradiol      | 57-91-0    | DOD.                              | $4,27 \times 10^{-11}$                       | $6,44 \times 10^{-10}$                       | $10^{-11} - 10^{-5}$       | $1,40 \times 10^{-9}$                            | $3,67 \times 10^{-3}$                                                        | Steryd                                 | Produkt leczniczy, środek weterynaryjny         |
| 15              | mezoheksesrol               | 84-16-2    | DOD.                              | $< 1,00 \times 10^{-11}$                     | $2,75 \times 10^{-11}$                       | $10^{-11} - 10^{-5}$       | $1,65 \times 10^{-11}$                           | $3,70 \times 10^{-3}$                                                        | Węglowodór (cykliczny), fenol          | Produkt leczniczy, środek weterynaryjny         |
| 11              | 4- <i>tert</i> -oktylofenol | 140-66-9   | DOD.                              | $1,85 \times 10^{-9}$                        | $7,37 \times 10^{-8}$                        | $10^{-11} - 10^{-5}$       | $3,19 \times 10^{-8}$                            | $4,85 \times 10^{-3}$                                                        | Fenol                                  | Półprodukt                                      |
| 9               | Genisteina                  | 446-72-0   | DOD.                              | $2,24 \times 10^{-9}$                        | $2,45 \times 10^{-8}$                        | $10^{-11} - 10^{-5}$       | $2,71 \times 10^{-7}$                            | $3,70 \times 10^{-4}$                                                        | Flawonoid, związek heterocykliczny     | Produkt naturalny, produkt leczniczy            |
| 6               | Bisfenol A                  | 80-05-7    | DOD.                              | $2,02 \times 10^{-8}$                        | $2,94 \times 10^{-7}$                        | $10^{-11} - 10^{-5}$       | $5,33 \times 10^{-7}$                            | $4,38 \times 10^{-3}$                                                        | Fenol                                  | Półprodukt                                      |
| 2               | Kemferol                    | 520-18-3   | DOD.                              | $1,36 \times 10^{-7}$                        | $1,21 \times 10^{-6}$                        | $10^{-11} - 10^{-5}$       | $3,99 \times 10^{-6}$                            | $3,49 \times 10^{-3}$                                                        | Flawonoid, związek heterocykliczny     | Produkt naturalny                               |
| 3               | Ftalan benzylu butylu       | 85-68-7    | DOD.                              | $1,14 \times 10^{-6}$                        | $4,11 \times 10^{-6}$                        | $10^{-11} - 10^{-5}$       | $1,98 \times 10^{-6}$                            | $3,20 \times 10^{-4}$                                                        | Kwas karboksylowy, ester, kwas ftalowy | Plastyfikator, przemysłowa substancja chemiczna |
| 4               | <i>p,p'</i> -Metoksychlor   | 72-43-5    | DOD.                              | $1,23 \times 10^{-6}$                        | -                                            | $10^{-11} - 10^{-5}$       | $1,92 \times 10^{-6}$                            | $2,89 \times 10^{-3}$                                                        | Węglowodór (halogenowany)              | Pestycyd, środek weterynaryjny                  |
| 1               | Etyloparaben                | 120-47-8   | DOD.                              | $5,00 \times 10^{-6}$                        | -                                            | $10^{-11} - 10^{-5}$       | $2,48 \times 10^{-5}$                            | $6,02 \times 10^{-3}$                                                        | Kwas karboksylowy, fenol               | Produkt leczniczy, konserwant                   |
| 17              | Atrazyna                    | 1912-24-9  | UJEM.                             | -                                            | -                                            | $10^{-10} - 10^{-4}$       | -                                                | $4,64 \times 10^{-4}$                                                        | Związek heterocykliczny                | Herbicyd                                        |
| 20              | Spironolakton               | 52-01-7    | UJEM.                             | -                                            | -                                            | $10^{-11} - 10^{-5}$       | -                                                | $2,40 \times 10^{-3}$                                                        | Lakton, Steryd                         | Produkt leczniczy                               |
| 21              | Ketokonazol                 | 65277-42-1 | UJEM.                             | -                                            | -                                            | $10^{-11} - 10^{-5}$       | -                                                | $9,41 \times 10^{-5}$                                                        | Związek heterocykliczny                | Produkt leczniczy                               |
| 22              | Rezerpina                   | 50-55-5    | UJEM.                             | -                                            | -                                            | $10^{-11} - 10^{-5}$       | -                                                | $1,64 \times 10^{-3}$                                                        | Związek heterocykliczny,               | Produkt leczniczy,                              |

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |                      |
|--|--|--|--|--|--|--|--|--|-------|----------------------|
|  |  |  |  |  |  |  |  |  | indol | środek weterynaryjny |
|--|--|--|--|--|--|--|--|--|-------|----------------------|

Skróty: Numer CAS = numer w rejestrze Chemical Abstracts Service; EC<sub>50</sub> = połowa maksymalnego stężenia efektywnego badanej substancji; UJEM. = ujemny; DOD. = dodatni; PC<sub>10</sub> (and PC<sub>50</sub>) = stężenie badanej substancji, przy którym reakcja stanowi 10 % (lub 50 % w przypadku PC<sub>50</sub>) reakcji kontroli dodatniej (E2, 1nM) na każdej płytce.

<sup>1</sup> Klasyfikacja jako dodatnie lub ujemne działanie agonistyczne ER została oparta na dokumentach ICCVAM Background Review Documents (BRD) w odniesieniu do testów ER Binding i TA (31) oraz na danych empirycznych i innych informacjach uzyskanych z badań porównawczych wydanych i poddanych przeglądowi po zakończeniu ICCVAM BRD (2)(3)(18)(31)(32)(33)(34).

<sup>2</sup> Wartości zgłoszone w projekcie sprawozdania *Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line* (30).

<sup>3</sup> Średnie wartości EC<sub>50</sub> zostały obliczone na podstawie wartości zgłoszonych przez laboratoria badania walidacyjnego VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM i Hiyoshi) (3).

<sup>4</sup> Zgłoszone stężenia były najwyższymi zbadanymi stężeniami (badanie ustalające zakres) podczas walidacji testu VM7Luc ER TA. Jeżeli stężenia różniły się między laboratoriami, zgłaszane jest najwyższe stężenie. Zob. tabela 4–10 w sprawozdaniu oceniającym metodę badawczą ICCVAM; The LUMI-Cell®ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals (3).

<sup>5</sup> Substancje przypisano do co najmniej jednej klasy chemicznej przy użyciu Medical Subject Headings (MeSH) amerykańskiej National Library of Medicine, międzynarodowo uznanego znormalizowanego systemu klasyfikacji (dostępnego na stronie <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

<sup>6</sup> Substancje przypisano do co najmniej jednej klasy produktowej przy użyciu bazy danych substancji niebezpiecznych amerykańskiej National Library of Medicine (dostępnej na stronie <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).

<sup>7</sup> Z tabeli 1 (wykaz chemicznych substancji odniesienia (22) do celów oceny dokładności agonisty ER) zawartej w standardach wykonywania badań (6)

<sup>8</sup> Jeżeli substancja służąca do wykazania biegłości nie jest już dostępna na rynku, można wykorzystać substancję o takiej samej kwalifikacji i porównywalnej sile działania, sposobie działania i klasie chemicznej.

**Tabela 4:** Wykaz (10) substancji służących do wykazania biegłości w odniesieniu do testu antagonisty

|   | Substancja <sup>a</sup>   | Numer CAS  | Test STTA ER <sup>1</sup> |                        |                            | Test VM7Luc ER TA <sup>2</sup> |                                   |                                                                              | Potencjalne wyniki ER STTA <sup>1</sup> | ICCVAM <sup>5</sup><br>ICCVAM <sup>5</sup> | Klasa chemiczna MeSH <sup>6</sup>  | Klasa produktowa <sup>7</sup>                                         |
|---|---------------------------|------------|---------------------------|------------------------|----------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
|   |                           |            | Działanie ER TA           | IC <sub>50</sub> (M)   | Zakres badanych stężeń (M) | Działanie ER TA                | IC <sub>50</sub> <sup>3</sup> (M) | Najwyższe stężenie na potrzeby ustalenia zakresu dawkowania (M) <sup>4</sup> |                                         |                                            |                                    |                                                                       |
| 1 | 4-hydroksy-tamoksyfen     | 68047-06-3 | DOD.                      | $3,97 \times 10^{-9}$  | $10^{-12} - 10^{-7}$       | DOD.                           | $2,08 \times 10^{-7}$             | $2,58 \times 10^{-4}$                                                        | umiarkowany DOD.                        | DOD.                                       | Węglowodór (cykliczny)             | Produkt leczniczy                                                     |
| 2 | Chlorowodorek raloksyfenu | 82640-04-8 | DOD.                      | $7,86 \times 10^{-10}$ | $10^{-12} - 10^{-7}$       | DOD.                           | $1,19 \times 10^{-9}$             | $1,96 \times 10^{-4}$                                                        | umiarkowany DOD.                        | DOD.                                       | Węglowodór (cykliczny)             | Produkt leczniczy                                                     |
| 3 | Tamoksyfen                | 10540-29-1 | DOD.                      | $4,91 \times 10^{-7}$  | $10^{-10} - 10^{-5}$       | DOD.                           | $8,17 \times 10^{-7}$             | $2,69 \times 10^{-4}$                                                        | DOD.                                    | DOD.                                       | Węglowodór (cykliczny)             | Produkt leczniczy                                                     |
| 4 | 17β-estradiol             | 50-28-2    | UJEM.                     | -                      | $10^{-9} - 10^{-4}$        | UJEM.                          | -                                 | $3,67 \times 10^{-3}$                                                        | będą ujemne*                            | ZU                                         | Steryd                             | Produkt leczniczy, środek weterynaryjny                               |
| 5 | Apigenin                  | 520-36-5   | UJEM.                     | -                      | $10^{-9} - 10^{-4}$        | UJEM.                          | -                                 | $3,70 \times 10^{-4}$                                                        | UJEM.                                   | UJEM.                                      | Związek heterocykliczny            | Barwnik, produkt naturalny, półprodukt farmaceutyczny                 |
| 6 | Ftalan di-n-butylu        | 84-74-2    | UJEM.                     | -                      | $10^{-8} - 10^{-3}$        | UJEM.                          | -                                 | $3,59 \times 10^{-3}$                                                        | UJEM.                                   | UJEM.                                      | Ester, Kwas ftalowy                | Składnik kosmetyczny, przemysłowa substancja chemiczna, plastifikator |
| 7 | Flawon                    | 525-82-6   | UJEM.                     | -                      | $10^{-8} - 10^{-3}$        | UJEM.                          | -                                 | $4,50 \times 10^{-4}$                                                        | będą ujemne*                            | ZU                                         | Flawonoid, związek heterocykliczny | Produkt naturalny, produkt leczniczy                                  |
| 8 | Genisteina                | 446-72-0   | UJEM.                     | -                      | $10^{-9} - 10^{-4}$        | UJEM.                          | -                                 | $3,70 \times 10^{-4}$                                                        | będą ujemne*                            | UJEM.                                      | Flawonoid, związek heterocykliczny | Produkt naturalny, produkt leczniczy                                  |
| 9 | p-n-nonylofenol           | 104-40-5   | UJEM.                     | -                      | $10^{-9} - 10^{-4}$        | UJEM.                          | -                                 | $4,54 \times 10^{-4}$                                                        | nie badano                              | UJEM.                                      | Fenol                              | Półprodukt                                                            |

|    |             |          |       |   |                     |       |   |                       |              |       |                           |                   |
|----|-------------|----------|-------|---|---------------------|-------|---|-----------------------|--------------|-------|---------------------------|-------------------|
| 10 | Resweratrol | 501-36-0 | UJEM. | - | $10^{-8} - 10^{-3}$ | UJEM. | - | $4,38 \times 10^{-4}$ | będą ujemne* | UJEM. | Węglowodór<br>(cykliczny) | Produkt naturalny |
|----|-------------|----------|-------|---|---------------------|-------|---|-----------------------|--------------|-------|---------------------------|-------------------|

Skróty: Numer CAS = numer w rejestrze Chemical Abstracts Service; M = molowy; IC<sub>50</sub> = połowa maksymalnego stężenia hamującego badanej substancji; UJEM. = ujemny; ZU = zakładany ujemny; DOD. = dodatni.

\* sklasyfikowano jako ujemne zgodnie z przeglądem bibliografii (2).

<sup>a</sup> Wspólne substancje badane w ramach testów STTA i VM7Luc ER TA, które zostały oznaczone jako antagoniści ER lub ujemne ER i wykorzystane do oceny dokładności w badaniu walidacyjnym VM7Luc ER TA (2)(3).

<sup>1</sup> The Validation Report of the Stably transfected Transcriptional Activation Assay to Detect ER mediated activity, część B (2)

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

<sup>3</sup> Średnie wartości IC<sub>50</sub> zostały obliczone na podstawie wartości zgłoszonych przez laboratoria badania walidacyjnego VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM i Hiyoshi) (3).

<sup>4</sup> Zgłoszone stężenia były najwyższymi zbadanymi stężeniami (badanie ustalające zakres) podczas walidacji testu VM7Luc ER TA. Jeżeli stężenia różniły się między laboratoriami, zgłaszane jest najwyższe stężenie. Zob. tabele 4–11 w ICCVAM Test Method Evaluation Report; The LUMI-Cell®ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals (3).

<sup>5</sup> Klasyfikacja jako antagonist ER lub jako ujemny została oparta na informacjach zawartych w dokumentach ICCVAM Background Review Documents (BRD) w odniesieniu do metod badań ER Binding i TA (31) oraz informacjach uzyskanych z publikacji wydanych i poddanych przeglądowi po zakończeniu ICCVAM BRD (2)(3)(18)(31).

<sup>6</sup> Substancje przypisano do co najmniej jednej klasy chemicznej przy użyciu Medical Subject Headings (MeSH) amerykańskiej National Library of Medicine – międzynarodowo uznanego znormalizowanego systemu klasyfikacji (dostępnego na stronie <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

<sup>7</sup> Substancje przypisano do co najmniej jednej klasy produktowej przy użyciu bazy danych substancji niebezpiecznych amerykańskiej National Library of Medicine (dostępnej na stronie <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).



### Kryteria dopuszczalności serii badawczej

16. Akceptacji lub odrzucenia serii badawczej dokonuje się na podstawie oceny wyników uzyskanych w odniesieniu do wzorców referencyjnych i kontroli stosowanych w przypadku każdego doświadczenia. Wartości  $PC_{50}$  ( $EC_{50}$ ) lub  $IC_{50}$  w odniesieniu do wzorców referencyjnych powinny spełniać kryteria dopuszczalności przewidziane dla wybranego testu (dla STTA zob. dodatek 2, dla VM7Luc ER TA zob. dodatek 3), a wszystkie kontrole dodatnie/ujemne powinny być prawidłowo sklasyfikowane w odniesieniu do każdego zaakceptowanego doświadczenia. Zdolność do spójnego przeprowadzania testu należy wykazać poprzez opracowanie i utrzymywanie bazy danych historycznych w odniesieniu do wzorców referencyjnych i kontroli (zob. pkt 15). Odchylenia standardowe (SD) lub współczynniki zmienności (CV) dla środków parametrów dopasowania krzywej wzorców referencyjnych z wielu doświadczeń mogą być stosowane jako miara odtwarzalności laboratoryjnej. Ponadto powinny być spełnione następujące zasady dotyczące kryteriów dopuszczalności:
- Dane powinny być wystarczające do ilościowej oceny aktywacji receptora estrogenowego (dla testu agonisty) lub jego supresji (dla testu antagonisty) (tj. skuteczności i siły działania).
  - Średnia aktywność reporterowa w odniesieniu do referencyjnego stężenia estrogenów odniesienia powinna być co najmniej równa minimum podanemu w testach dotyczących kontroli z nośnikiem (z rozpuszczalnikiem) w celu zapewnienia odpowiedniej czułości. W odniesieniu do testów STTA i VM7Luc ER TA jest to czterokrotność średniej grupy kontrolnej nośnika na każdej płycie.
  - Badane stężenia powinny pozostać w zakresie rozpuszczalności badanych substancji chemicznych i nie powinny wykazywać cytotoksyczności.

### Analiza danych

17. Zdefiniowana procedura interpretacji danych w odniesieniu do każdego testu powinna być stosowana do klasyfikacji odpowiedzi dodatniej i ujemnej.
18. Spełnienie kryteriów dopuszczalności (pkt 16) wskazuje, że test funkcjonuje prawidłowo, ale nie gwarantuje, że którakolwiek konkretna seria badawcza dostarczy dokładnych danych. Powtarzanie się wyników pierwszej serii badawczej stanowi najlepszą wskazówkę, że dostarczono dokładnych danych. Jeżeli dwie serie badawcze dają odtwarzalne wyniki (np. obie serie badawcze wskazują, że badana substancja chemiczna jest dodatnia), wykonanie trzeciej serii nie jest konieczne.
19. Jeżeli dwie serie badawcze nie dają odtwarzalnych wyników (np. badana substancja chemiczna jest dodatnia w jednej serii, a ujemna w drugiej) lub jeżeli wymagana jest większa pewność co do wyniku tego testu, należy przeprowadzić co najmniej trzy niezależne serie

badawcze. W tym przypadku klasyfikacji dokonuje się na podstawie dwóch zgodnych wyników z trzech.

### **Ogólne kryteria interpretacji danych**

20. Obecnie nie istnieje powszechnie uzgodniona metoda interpretacji danych pochodzących z ER TA. Zarówno jakościowe (np. dodatnie/ujemne) jak i ilościowe (np. EC<sub>50</sub>, PC<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub>) oceny aktywności z udziałem receptora estrogenowego powinny jednak być oparte na danych empirycznych i rzetelnej ocenie naukowej. W przypadku, gdy jest to możliwe, wyniki dodatnie powinny charakteryzować się zarówno wielkością skutku w porównaniu z kontrolą z nośnikiem (z rozpuszczalnikiem) lub estrogenu odniesienia, jak i stężeniem, przy którym występuje skutek (np. EC<sub>50</sub>, PC<sub>50</sub>, RPC<sub>Max</sub>, IC<sub>50</sub> itd.).

### **Sprawozdanie z badania**

21. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

#### *Test:*

- zastosowany test,
- kontrola/wzorzec referencyjny/badana substancja chemiczna,
- źródło, numer partii, termin przydatności, jeżeli są znane,
- stabilność badanej substancji chemicznej, jeżeli jest znana,
- rozpuszczalność i stabilność badanej substancji chemicznej w rozpuszczalniku, jeżeli są znane,
- pomiar pH, osmolalności i osadu w podłożu, do którego dodano badaną substancję chemiczną, stosownie do przypadku.

#### *Substancja jednoskładnikowa:*

- wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne,
- dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa IUPAC lub CAS, numer CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny, czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń, stosownie do przypadku i jeśli jest to praktycznie wykonalne, itp.

#### *Substancja wieloskładnikowa, UVCB i mieszaniny:*

- opisane w miarę możliwości przez podanie nazwy chemicznej (zob. powyżej), określenie ilości oraz istotnych właściwości fizykochemicznych składników.

#### *Rozpuszczalnik/nośnik:*

- charakterystyka (charakter, dostawca i partia),
- uzasadnienie wyboru rozpuszczalnika/nośnika,
- rozpuszczalność i stabilność badanej substancji chemicznej w rozpuszczalniku/nośniku, jeżeli są znane.

#### *Komórki:*

- rodzaj i źródło komórek:
  - Czy receptor estrogenowy jest endogenicznie wyrażony? Jeśli nie, to który receptor (które receptory) poddano transfekcji?
  - Zastosowany (zastosowane) konstrukt reporterowy (konstrukty reporterowe) (w tym gatunki źródłowe);
  - Metoda transfekcji;
  - Metoda wyboru w odniesieniu do utrzymania stabilnej transfekcji (w stosownych przypadkach);
  - Czy metoda transfekcji jest odpowiednia dla linii stabilnych?
- liczba pasażów komórek (od rozmrożenia),
- liczba pasażów komórek w momencie rozmrożenia,
- metody utrzymywania kultur komórkowych.

#### *Warunki badania:*

- granice rozpuszczalności,
- opis zastosowanych metod oceny żywotności,
- skład podłoża; stężenie CO<sub>2</sub>,
- stężenia badanej substancji chemicznej,
- objętość dodanego nośnika i badanej substancji chemicznej,
- temperatura i wilgotność inkubacji,
- czas poddawania działaniu substancji chemicznej,
- zagęszczenie komórek na początku i w trakcie poddania działaniu substancji,
- kontrole dodatnie i ujemne wzorce referencyjne,
- odczynniki reporterowe (nazwa produktu, dostawca i partia),
- kryteria uznania serii badawczej za dodatnią, ujemną lub niejednoznaczną.

#### *Kontrola dopuszczalności:*

- krotności indukcji w odniesieniu do każdej płytki testowej oraz czy spełniają one minimum wymagane w ramach tego testu na podstawie historycznych kontroli,
- rzeczywiste wartości w odniesieniu do kryteriów dopuszczalności, np.  $\log_{10}EC_{50}$ ,  $\log_{10}PC_{50}$ ,  $\log IC_{50}$  oraz krzywa Hilla w odniesieniu do równoczesnych kontroli dodatnich/wzorców referencyjnych.

#### *Wyniki:*

- dane surowe i znormalizowane,
- maksymalny poziom krotności indukcji,
- dane dotyczące cytotoksyczności,
- jeżeli istnieje, najniższe stężenie efektywne (LEC),
- W stosownych przypadkach wartości  $RPC_{Max}$ ,  $PC_{Max}$ ,  $PC_{50}$ ,  $IC_{50}$  lub  $EC_{50}$ ,
- w stosownych przypadkach zależność stężenie-odpowiedź,
- analizy statystyczne, jeśli takie istnieją, wraz z miarą błędu i wiarygodności (np. SEM, SD, CV lub 95 % CI) oraz opisem sposobu uzyskania tych wartości.

#### *Omówienie wyników*

#### *Wniosek*

## BIBLIOGRAFIA

- (1) OECD (2005). *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*. [w:] Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 34. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.
- (2) OECD (2015). *Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity*. [W:] Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 225. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.
- (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.” nr 58(23), s. 5367–5373.
- (5) Rogers J.M. i 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” nr 13(1), s. 67–82.
- (6) OECD (2012). *Performance Standards For Stably Transfected Transactivation In Vitro Assay to Detect Estrogen Receptor Agonists (for TG 455)*. [w:] Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 173. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.
- (7) OECD (2015). *Performance Standards For Stably Transfected Transactivation In Vitro Assay to Detect Estrogen Receptor Antagonists*. [w:] Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 174. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.
- (8) OECD (2012). *Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption*. [w:] Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 150. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.
- (9) Cavailles V. (2002). *Estrogens and Receptors: an Evolving Concept*. „Climacteric” nr 5, suplement 2, s. 20–26.

- (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” nr 16(4): s. 1073–1089.
- (11) Younes M. i Honma N. (2011). *Estrogen Receptor Beta*. „Arch. Pathol. Lab. Med.”, 135(1): s. 63–66.
- (12) Jefferson W.N., *et al.* (2002). *Assessing Estrogenic Activity of Phytochemicals Using Transcriptional Activation and Immature Mouse Uterotrophic Responses*. „Journal of Chromatography B” nr 777(1–2), s. 179–189.
- (13) Sonneveld E. *et al.* (2006). *Comparison of In Vitro and In Vivo Screening Models for Androgenic and Estrogenic Activities*. „Toxicol. Sci.” nr 89(1), s. 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” nr 126(2), s. 91–98.
- (15) R.D. Combes, (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” nr 28(1), s. 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.” nr 71(10), s. 1459–1469.
- (17) Gray L.E. Jr. (1998). *Tiered Screening and Testing Strategy for Xenoestrogens and Antiandrogens*. „Toxicol. Lett.” nr 102–103, s. 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” nr 163(3), s. 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” nr 243(1), s. 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” nr 82(12), s. 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” nr 299(2), s. 204–211.
- (24) Barkhem T. *et al.* (1998). *Differential Response of Estrogen Receptor Alpha and Estrogen Receptor Beta to Partial Estrogen Agonists/Antagonists*. „Mol. Pharmacolog.” nr 54(1), s. 105–112.
- (25) Deroo B.J. i Buensuceso A.V. (2010). *Minireview: Estrogen Receptor- $\beta$ : Mechanistic Insights from Recent Studies*. „Molecular Endocrinology” nr 24(9), s. 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” nr 230(8), s. 558–568.
- (27) Anderson J.N. Clark J.H. i Peck E.J.Jr. (1972). *The Relationship Between Nuclear Receptor- Estrogen Binding and Uterotrophic Responses*. „Biochemical and Biophysical Research Communications” nr 48(6), s. 1460–1468.
- (28) Toft D. (1972). *The Interaction of Uterine Estrogen Receptors with DNA*. „Journal of Steroid Biochemistry” nr 3(3), s. 515–522.
- (29) Gorski J. *et al.* (1968). *Hormone Receptors: Studies on the Interaction of Estrogen with the Uterus*. „Recent Progress in Hormone Research” nr 24, s. 45–80.
- (30) E.V. Jensen *et al.* (1967). *Estrogen-Receptor Interactions in Target Tissues*. „Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale” nr 56(3), s. 547–569.
- (31) ICCVAM (2002). *Background Review Document: Estrogen Receptor Transcriptional Activation (TA) Assay*. dodatek D, *Substances Tested in the ER TA Assay*. NIH Publication Report (Nr 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.” nr 109, s. 785–794.
- (33) Kanno J. *et al.* (2003). *The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two Dose-Response Studies*. „Environ. Health Persp.” nr 111, s. 1530–1549.

- (34) J. Kanno *et al.* (2003), *The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two – Coded Single-Dose Studies*. „Environ. Health Persp.” nr 111, s. 1550-1558.
- (35) Geisinger *et al.* (1989), *Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors*. „Cancer” nr 63, s. 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” nr 34, s. 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.” nr 28, s. 2072–2081.
- (38) J.M. Rogers i M.S. Denison (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.” nr 13, s. 67–82.



## **Dodatek 1**

### **DEFINICJE I SKRÓTY**

**Kryteria dopuszczalności:** minimalne normy dotyczące przeprowadzania kontroli doświadczalnych i wzorców referencyjnych. Aby doświadczenie zostało uznane za ważne, należy spełnić wszystkie kryteria dopuszczalności.

**Dokładność (zgodność):** stopień zgodności wyników testu z przyjętymi wartościami odniesienia. Jest to miara efektywności testu i jeden z aspektów jego istotności. Pojęcia tego często używa się zamiennie z pojęciem „zgodność” na określenie odsetka prawidłowych wyników testu (1).

**Agonista:** substancja, która powoduje reakcję, np. transkrypcję, gdy wiąże się z określonym receptorem.

**Antagonista:** rodzaj receptora liganda lub substancji chemicznej, która nie wywołuje reakcji biologicznej po związaniu z receptorem, ale blokuje lub tłumi reakcje agonistów.

**Działanie antyestrogenne** oznacza zdolność substancji chemicznej do hamowania działania 17 $\beta$ -estradiolu przekazywanego przez receptory estrogenowe.

**Morfologia komórki:** kształt i wygląd komórek wyhodowanych w jednowarstwowej hodowli w pojedynczym dołku płytki do hodowli tkankowych. Umierające komórki często wykazują nieprawidłową morfologię komórkową.

**CF:** ramy koncepcyjne OECD dotyczące testowania i oceny substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego.

**Poddanie działaniu węgla drzewnego/dekstranu:** oczyszczanie surowicy stosowanej w hodowli komórkowej. Poddanie działaniu węgla drzewnego/dekstranu (często nazywane „odpędzaniem”) powoduje usunięcie endogennych hormonów i białek wiążących hormony.

**Substancja chemiczna:** substancja lub mieszanina.

**Cytotoksyczność:** szkodliwe skutki dla struktury lub funkcji komórki, które mogą ostatecznie spowodować śmierć komórki i mogą być odzwierciedlone przez zmniejszenie liczby komórek w dołku pod koniec okresu narażenia lub zmniejszenie zdolności do pomiaru funkcji komórkowej w porównaniu z równoczesną grupą kontrolną nośnika.

**CV:** współczynnik zmienności

**DCC-FBS:** pokryta dekstranem bydlęca surowica płodowa poddana działaniu węgla drzewnego.

**DMEM:** Dulbecco's Modification of Eagle's Medium

**DMSO:** sulfotlenek dimetylu

**E2:** 17 $\beta$ -estradiol

**EC<sub>50</sub>:** połowa maksymalnego stężenia efektywnego badanej substancji chemicznej.

**ED:** zaburzenia endokrynologiczne

**hER $\alpha$ :** ludzki receptor estrogenowy alfa

**hER $\beta$ :** ludzki receptor estrogenowy beta

**EFM:** podłoże bez estrogenu. Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM) uzupełniony 4,5 % bydlęcą surowicą płodową poddaną działaniu węgla drzewnego / dekstranu, 1,9 % L-glutaminą i 0,9 % Pen-Strep.

**ER:** receptor estrogenowy

**ERE:** element reakcji estrogenowej

**Aktywność estrogenna:** zdolność substancji chemicznej do naśladowania 17 $\beta$ -estradiolu w jego zdolności do wiązania się z receptorami estrogenowymi i aktywowania ich receptorów. Za pomocą niniejszej metody badawczej można wykryć aktywność estrogeną za pośrednictwem hER $\alpha$ .

**ERTA:** transaktywacja receptora estrogenowego

**FBS:** bydlęca surowica płodowa

**HeLa:** nieśmiertelna ludzka linia komórek szyjki macicy

**HeLa9903:** subklon komórkowy HeLa, do którego dokonano stabilnej transfekcji ludzkiego receptora estrogenowego $\alpha$  i genu reporterowego lucyferazy

**IC<sub>50</sub>:** połowa maksymalnego stężenia efektywnego badanej hamującej substancji chemicznej.

**ICCVAM:** Międzyagencyjny Komitet Koordynacyjny ds. Uznawania Metod Alternatywnych.

**Odtwarzalność międzylaboratoryjna:** miara zakresu, w jakim różne wykwalifikowane laboratoria, przy użyciu tego samego protokołu i testując tę samą badaną substancję, mogą uzyskać jakościowo i ilościowo podobne wyniki. Odtwarzalność międzylaboratoryjna jest ustalana w ramach procesów poprzedzających walidację i obejmujących walidację i wskazuje, w jakim stopniu test można z powodzeniem przekazywać między laboratoriami: nazywana jest również odtwarzalnością międzylaboratoryjną (1).

**Odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna:** ustalenie stopnia, w jakim wykwalifikowani pracownicy w tym samym laboratorium mogą z powodzeniem odtworzyć wyniki, stosując szczegółowy protokół w różnych momentach. Nazywana również „odtworzalnością

laboratoryjną” (1).

**LEC:** najniższe stężenie efektywne to najniższe stężenie badanej substancji chemicznej, które powoduje reakcję (tj. najniższe stężenie badanej substancji chemicznej, przy którym krotność indukcji jest statystycznie różna niż równoległa grupa kontrolna nośnika).

**Badanie me-too:** potoczne określenie testu, które jest strukturalnie i funkcjonalnie podobne do zwalidowanej i zaakceptowanej referencyjnej metody badania. Stosowane zamiennie z podobną metodą badań.

**MT:** metalotioneina

**MMTV:** wirus mysiego nowotworu gruczołu piersiowego

**OHT:** 4-hydroksy-tamoksyfen

**PBTG:** wytyczne dotyczące badań w oparciu o wyniki

**PC** (kontrola dodatnia): silnie aktywna substancja, najlepiej 17 $\beta$ -estradiol, która jest włączona do wszystkich badań w celu zapewnienia prawidłowego funkcjonowania testu.

**PC<sub>10</sub>:** stężenie badanej substancji chemicznej, przy którym mierzona aktywność w ramach testu agonisty wynosi 10 % maksymalnej aktywności wywołanej przez PC (E2 dla 1nM w odniesieniu do analizy STTA) na każdej płytce.

**PC<sub>50</sub>:** stężenie badanej substancji chemicznej, przy którym mierzona aktywność w ramach testu agonisty wynosi 50 % maksymalnej aktywności wywołanej przez PC (E2 przy referencyjnym stężeniu określonym w metodzie badawczej) na każdej płytce.

**PC<sub>Max</sub>:** stężenie badanej substancji chemicznej wywołujące RPC<sub>Max</sub>

**Standardy wykonywania badań:** normy oparte na zwalidowanym teście, zapewniające podstawę do oceny porównywalności proponowanego testu, który jest podobny do metody referencyjnej pod względem mechanistycznym i funkcjonalnym. Uwzględnia się: 1) istotne elementy testu; 2) podstawowy wykaz chemicznych substancji odniesienia, wybranych spośród substancji chemicznych wykorzystywanych w celu wykazania akceptowalnej efektywności zwalidowanej metody badania; oraz 3) podobny poziom dokładności i wiarygodności, na podstawie wyników uzyskanych dla zwalidowanej metody badania, który proponowany test powinien osiągnąć przy ocenie z wykorzystaniem podstawowego wykazu chemicznych substancji odniesienia (1).

**Substancje służące do wykazania biegłości:** podzbiór substancji odniesienia zawartych w standardach wykonywania badań, które mogą być stosowane przez laboratoria w celu wykazania kompetencji technicznych za pomocą znormalizowanej metody badawczej. Kryteria kwalifikacji w przypadku tych substancji obejmują zazwyczaj takie czynniki, jak to, że reprezentują one zakres reakcji, są dostępne na rynku i że dostępne są wysokiej jakości dane porównawcze.

**Biegłość:** wykazana zdolność do prawidłowego wykonania testu przed badaniem nieznaną substancji.

**Estrogen odniesienia (kontrola dodatnia, PC):** 17 $\beta$ -estradiol (E2, CAS 50-28-2).

**Wzorzec referencyjny:** substancja odniesienia wykorzystana do wykazania prawidłowości testu. 17 $\beta$ -estradiol jest wzorcem referencyjnym na potrzeby testów STTA i VM7Luc ER TA.

**Referencyjne metody badawcze:** testy oparte na PBTG 455.

**Istotność:** opis powiązania testu z oczekiwanym skutkiem oraz czy jest on znaczący i użyteczny z punktu widzenia określonego celu. Jest to zakres, w jakim test pozwala prawidłowo zmierzyć lub przewidzieć biologiczny skutek będący przedmiotem zainteresowania. Istotność obejmuje uwzględnienie dokładności (zgodności) testu (1).

**Wiarygodność:** miara zakresu, w jakim test może zostać wykonany w sposób odtwarzalny w jednym laboratorium i pomiędzy laboratoriami na przestrzeni czasu w przypadku jego przeprowadzania przy użyciu tego samego protokołu. Ocenia się ją w drodze obliczenia odtwarzalności wewnątrz- i międzylaboratoryjnej.

**RLU:** względne jednostki światła.

**RNA:** kwas rybonukleinowy.

**RPC<sub>Max</sub>:** maksymalny poziom reakcji wywołanej przez badaną substancję chemiczną, wyrażony jako procent reakcji wywołanej przez 1 nM E2 na tej samej płytce.

**RPMI:** pożywka RPMI 1640 zawierająca 0,9 % Pen-Strep i 8 % bydlęcej surowicy.

**Seria badawcza:** pojedyncze doświadczenie oceniające działanie substancji chemicznej na wynik biologiczny testu. Każda seria badawcza stanowi kompletne doświadczenie wykonane w dołkach z kontrolą komórek pobranych ze wspólnej puli komórek w tym samym czasie.

**Niezależna seria badawcza:** oddzielne, niezależne doświadczenie oceniające działanie substancji chemicznej na wynik biologiczny testu, przy użyciu komórek z innej puli, świeżo rozcieńczonych substancji chemicznych, przeprowadzane w różne dni lub w tym samym dniu przez różnych pracowników.

**SD:** odchylenie standardowe.

**Czułość:** odsetek wszystkich obecnych/aktywnych substancji prawidłowo sklasyfikowanych w ramach testu. Jest to miara dokładności testu, która daje wyniki kataryczne i stanowi parametr istotny do celów oceny przydatności testu (1).

**Swoistość:** odsetek wszystkich nieobecnych/nieaktywnych substancji prawidłowo sklasyfikowanych w badaniu. Jest to miara dokładności testu, która daje wyniki kataryczne i stanowi parametr istotny do celów oceny przydatności testu (1).

**Stabilna transfekcja:** kiedy DNA jest przenoszone do hodowanych komórek w taki sposób, że jest stabilnie zintegrowane z genomem komórek, co skutkuje stabilną ekspresją genów, których transfekcji się dokonuje. Klony komórek, w odniesieniu do których dokonano stabilnej transfekcji, są wybierane przez stabilne markery (np. odporność na G418).

**Test STTA:** test stabilnie transfekowanej transaktywacji, badanie aktywacji transkrypcji ER $\alpha$  z wykorzystaniem linii komórkowej HeLa 9903.

**Badanie:** pełen zakres prac doświadczalnych wykonanych w celu oceny pojedynczej, specyficznej substancji przy użyciu konkretnego testu. Badanie obejmuje wszystkie etapy, w tym badania rozcieńczenia badanej substancji w pożywce użytej do badań, wstępne serie badawcze zakresu dawkowania, wszystkie niezbędne kompleksowe serie badawcze, analizy danych, zapewnienia jakości, oceny cytotoksyczności itd. Zakończenie badania pozwala na klasyfikację aktywności badanej substancji chemicznej na docelowej toksyczności (tj. aktywna, nieaktywna lub niejednoznaczna), która jest oceniana za pomocą zastosowanej analizy oraz oszacowanie siły działania w stosunku do dodatniej referencyjnej substancji chemicznej.

**Substancja:** w rozporządzeniu REACH<sup>12</sup> substancję zdefiniowano jako „pierwiastek chemiczny lub jego związki w stanie, w jakim występują w przyrodzie lub zostają uzyskane za pomocą procesu produkcyjnego, z wszelkimi dodatkami wymaganymi do zachowania ich trwałości oraz wszelkimi zanieczyszczeniami powstałymi w wyniku zastosowanego procesu, wyłączając rozpuszczalniki, które można oddzielić bez wpływu na stabilność i skład substancji”. Bardzo podobna definicja jest stosowana w kontekście Globalnie Zharmonizowanego Systemu Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów (1).

**TA (transaktywacja):** rozpoczęcie syntezy mRNA w reakcji na specyficzny sygnał chemiczny, taki jak wiązanie estrogenu z receptorem estrogenowym.

**Test:** w kontekście niniejszej metody badawczej, test jest jedną z metod przyjętych jako ważne dla spełnienia określonych kryteriów efektywności. Elementy testu obejmują na przykład określoną linię komórkową wraz z powiązanymi warunkami wzrostu, specyficzną pożywkę, w której przeprowadzane jest badanie, warunki ustawienia płytki, rozmieszczenie i rozcieńczenia badanych substancji chemicznych wraz z innymi wymaganymi środkami kontroli jakości oraz związane z nimi etapy oceny danych.

**Badana substancja chemiczna:** dowolna substancja lub mieszanina badana za pomocą

---

<sup>12</sup> Rozporządzenie (WE) nr 1907/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 18 grudnia 2006 r. w sprawie rejestracji, oceny, udzielania zezwoleń i stosowanych ograniczeń w zakresie chemikaliów (REACH) i utworzenia Europejskiej Agencji Chemikaliów, zmieniające dyrektywę 1999/45/WE oraz uchylające rozporządzenie Rady (EWG) nr 793/93 i rozporządzenie Komisji (WE) nr 1488/94, jak również dyrektywę Rady 76/769/EWG i dyrektywy Komisji 91/155/EWG, 93/67/EWG, 93/105/WE i 2000/21/WE. Dz.U. L 304 z 22.11.2007, s. 1.

niniejszej metody badawczej.

**Transkrypcja:** synteza mRNA.

**UVCB:** substancje o nieznanym lub zmiennym składzie, złożone produkty reakcji lub materiały biologiczne.

**Zweryfikowana metoda badawcza:** test, w odniesieniu do którego zakończono badania walidacyjne w celu określenia jej istotności (w tym dokładności) i wiarygodności w odniesieniu do konkretnego celu. Należy zauważyć, że zweryfikowana metoda badawcza może nie wykazywać dostatecznej efektywności z punktu widzenia dokładności i wiarygodności, aby można było ją uznać za dopuszczalną w odniesieniu do danego celu (1).

**Walidacja:** proces, za pomocą którego ustalana jest wiarygodność i adekwatność danego podejścia, metody, testu, procesu lub oceny w określonym celu (1).

**VC (grupa kontrolna nośnika):** rozpuszczalnik używany do rozpuszczania badanych i kontrolnych substancji chemicznych jest badany wyłącznie jako nośnik bez rozpuszczonych substancji chemicznych.

**VM7:** unieśmiertniona komórka gruczolakoraka, która endogennie wyraża receptor estrogenowy.

**VM7Luc4E2:** linia komórkowa VM7Luc4E2 została wyprowadzona z unieśmiertnionych komórek gruczolakoraka VM7, które endogennie wyrażają obie formy receptora estrogenowego (ER $\alpha$  i ER $\beta$ ) i dokonano ich stabilnej transfekcji przy użyciu plazmidu pGudLuc7.ERE. Plazmid zawiera cztery kopie syntetycznego oligonukleotydu zawierającego element reakcji estrogenowej w obszarze promotora powyżej sekwencji kodującej genu wirusa mysiego nowotworu gruczołu piersiowego (MMTV) oraz gen lucyferazy robaczka świętojańskiego.

**Słaba kontrola dodatnia:** słabo aktywna substancja wybrana z wykazu referencyjnych substancji chemicznych, która jest włączona do wszystkich badań w celu zapewnienia prawidłowego funkcjonowania testu.

## **Dodatek 2**

### **TEST TRANSAKTYWACJI STABILNIE TRANSFEKOWANEGO LUDZKIEGO RECEPTORA ESTROGENOWEGO W CELU WYKRYCIA ESTROGENOWEJ DZIAŁANIA AGONISTYCZNEGO I ANTAGONISTYCZNEGO SUBSTANCJI CHEMICZNYCH Z WYKORZYSTANIEM LINII KOMÓRKOWEJ HERA-HELA-9903**

#### **ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA (ZOB. RÓWNIEŻ WPROWADZENIE OGÓLNE)**

1. W niniejszym teście transaktywacji (TA) wykorzystuje się linię komórkową hER $\alpha$ -HeLa-9903 do wykrywania estrogenowej aktywności agonistycznej przekazywanej przez ludzki receptor estrogenowy alfa (hER $\alpha$ ). Badanie walidacyjne testu stabilnie transfektowanej transaktywacji (STTA) przeprowadzone przez japoński Instytut Oceny i Badań Substancji Chemicznych (CERI), wykorzystujące linię komórkową hER $\alpha$ -HeLa-9903 do wykrywania estrogenowego działania agonistycznego i antagonistycznego przekazywanego przez ludzki receptor estrogenowy alfa (hER $\alpha$ ), dowiodło adekwatności i wiarygodności testu w odniesieniu do jego zamierzonego celu (1).
2. Szczególnym przeznaczeniem tego testu jest wykrywanie transaktywacji za pośrednictwem hER $\alpha$  poprzez pomiar chemiluminescencji jako punktu końcowego. Z powodu nadaktywacji lucyferazowego genu reporterowego zgłoszono jednak sygnały niezwiązane z receptorami pośredniczącymi w luminescencji przy stężeniach fitoestrogenu przekraczających 1  $\mu$ M (2)(3). Chociaż krzywa dawka-efekt wskazuje, że rzeczywista aktywacja systemu receptora estrogenowego występuje przy niższych stężeniach, w stabilnej transfekcji systemów badania aktywacji transkrypcji receptora estrogenowego należy ostrożnie badać ekspresję lucyferazy uzyskaną przy wysokich stężeniach fitoestrogenów lub podobnych związków chemicznych, co do których przypuszcza się, że wywołują one – podobnie jak fitoestrogeny – nadaktywację lucyferazowego genu reporterowego (dodatek 1).
3. Przed rozpoczęciem stosowania tego testu do celów regulacyjnych należy zapoznać się z sekcjami „WPROWADZENIE OGÓLNE” oraz „ELEMENTY BADANIA AKTYWACJI TRANSKRYPCJI RECEPTORA ESTROGENOWEGO”. Definicje i skróty stosowane w niniejszej wytycznej dotyczącej badań opisano w dodatku 2.1.

#### **ZASADA WYKONANIA TESTU (ZOB. RÓWNIEŻ WPROWADZENIE OGÓLNE)**

4. Test ten służy do wiązania sygnału receptora estrogenowego z ligandem. Po wiązaniu ligandu kompleks receptor-ligand przenosi się do jądra komórkowego, gdzie wiąże określone elementy odpowiedzi DNA i transaktywuje gen reporterowy lucyferazy robaczka świętojańskiego, powodując zwiększoną ekspresję komórkową enzymu lucyferazy. Lucyferyna jest substratem przekształcanym przez enzym lucyferaza przekształca w produkt

bioluminescencyjny, który można zmierzyć ilościowo przy użyciu luminometru. Aktywność lucyferazy można ocenić w szybki i niedrogi sposób, wykorzystując szereg dostępnych na rynku zestawów badawczych.

5. Układ badawczy wykorzystuje linię komórkową hER $\alpha$ -HeLa-9903, pochodzącą z ludzkiego guza szyjki macicy, z dwoma stabilnie wstawionymi konstruktami: (i) konstrukt ekspresji hER $\alpha$  (kodujący ludzki receptor o pełnej długości), oraz (ii) konstrukt reportera lucyferazy ogniotrwałej, zawierający pięć tandemowych powtórzeń elementu reakcji estrogenowej (ERE) witellogeniny napędzanego przez element promotora TATA metalotioneiny (MT) myszy. Wykazano, że konstrukt genu TATA MT myszy ma najlepszą wydajność i dlatego jest powszechnie stosowany. W konsekwencji linia komórkowa hER $\alpha$ -HeLa-9903 może mierzyć zdolność badanej substancji chemicznej do wywoływania transaktywacji za pośrednictwem hER $\alpha$  ekspresji genu lucyferazy.
6. W przypadku testu agonisty receptora estrogenowego interpretacji danych dokonuje się na podstawie tego, czy maksymalny poziom reakcji wywołany przez badaną substancję chemiczną jest równy lub przekracza reakcję agonisty równą 10 % reakcji wywołanej przez maksymalne indukujące (1 nM) stężenie kontroli dodatniej (PC) 17 $\beta$ -estradiolu (E2) (tj. PC<sub>10</sub>). W przypadku testu antagonisty receptora estrogenowego interpretacji danych dokonuje się na podstawie tego, czy reakcja wykazuje co najmniej 30-procentowa redukcja działania w wyniku reakcji wywołanej przez wzbogacenie kontroli (25 pM E2) bez cytotoksyczności. Analiza danych i interpretacja zostały szczegółowo omówione w pkt 34–48.

## PROCEDURA

### Linie komórkowe

7. W teście należy wykorzystać stabilnie transfekowaną linię komórkową hER $\alpha$ -HeLa-9903. Przedmiotową linię komórkową można uzyskać od banku komórek Japońskiego Zbioru Zasobów Biologicznych do Celów Badawczych (JCRB)<sup>13</sup>, po podpisaniu porozumienia o transferze materiału.
8. Do badań należy używać wyłącznie komórek charakteryzujących się tym, że nie zawierają mykoplazmy. RT-PCR (reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym) jest metodą do wyboru w odniesieniu do czułego wykrywania zakażenia mykoplazmą (4)(5)(6).

---

<sup>13</sup> Bank komórek JCRB: National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Asagi Saito, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, japoński nr fax: +81-72-641-9812



### **Stabilność linii komórkowej**

9. W celu monitorowania stabilności linii komórkowej należy stosować E2, 17 $\alpha$ -estradiol, 17 $\alpha$ -metylotestosteron i kortykosteron jako wzorce referencyjne na potrzeby testu agonisty, a pełna krzywa zależności stężenie-odpowiedź w zakresie badanego stężenia podanym w tabeli 1 powinna być mierzona co najmniej raz za każdym razem, gdy wykonuje się test, a wyniki powinny być zgodne z wynikami podanymi w tabeli 1.
10. W przypadku testu antagonisty, pełne krzywe stężeń dla dwóch wzorców referencyjnych, tamoksyfenu i flutamidu, powinny być mierzone jednocześnie z każdą serią badawczą. Należy monitorować prawidłową klasyfikację jakościową jako dodatnie lub ujemne w odniesieniu do tych dwóch substancji chemicznych.

### **Kultura komórkowa i warunki posiewu**

11. Komórki powinny być utrzymywane w podłożu Eagle'a bez czerwieni fenolowej, uzupełnionym 60 mg/l antybiotyku kanamycyny i 10 % pokrytej dekstranem, poddanej działaniu węgla drzewnego bydlęcej surowicy płodowej (DCC-FBS), w inkubatorze CO<sub>2</sub> (5 % CO<sub>2</sub>) w temperaturze 37 $\pm$ 1 °C. Po osiągnięciu 75 % – 90 % konfluencji, komórki mogą być hodowane wtórnie w 10 ml 0,4 x 10<sup>5</sup> – 1 x 10<sup>5</sup> komórek/ml w odniesieniu do 100 mm naczynia do kultury komórkowej. Komórki powinny być zawieszone z 10 % FBS-EMEM (który jest taki sam jak EMEM z DCC-FBS), a następnie umieszczone w dołkach mikropłytki z gęstością 1 x 10<sup>4</sup> komórek/(100  $\mu$ l na dołek). Następnie należy dokonać wstępnej inkubacji komórek w 5 % inkubatorze CO<sub>2</sub> w temperaturze 37 $\pm$ 1 °C przez 3 godziny przed narażeniem na działanie substancji chemicznej. Wyroby z tworzyw sztucznych powinny być wolne od aktywności estrogenowej.
12. Aby zachować integralność reakcji, komórki powinny wyrastać z zamrożonego zapasu w kondycjonowanych pożywkach przez więcej niż jeden pasaż i nie powinny być hodowane dłużej niż przez 40 pasaży. W odniesieniu do linii komórkowej hER $\alpha$ -HeLa-9903 będzie to mniej niż trzy miesiące. Efektywność komórek może jednak zostać zmniejszona, jeżeli są one hodowane w nieodpowiednich warunkach hodowli kultur.
13. DCC-FBS można przygotować w sposób opisany w dodatku 2.2 lub uzyskać ze źródeł komercyjnych.

### **Kryteria dopuszczalności**

#### *Dodatnie i ujemne wzorce referencyjne w odniesieniu do testu agonisty receptora estrogenowego*

14. Przed badaniem i w jego trakcie należy zweryfikować reaktywność układu badawczego, stosując odpowiednie stężenia silnego estrogenu: E2, słabego estrogenu (17 $\alpha$ -estradiol), bardzo słabego agonisty (17 $\alpha$ -metylotestosteron) i substancji ujemnej (kortykosteron). Dopuszczalne wartości zakresu uzyskane z badania walidacyjnego (1) podano w tabeli 1. Te 4

równoległe wzorce referencyjne powinny być włączone do każdego doświadczenia, a wyniki powinny mieścić się w podanych dopuszczalnych granicach. Jeżeli tak nie jest, należy określić przyczynę niespełnienia kryteriów dopuszczalności (np. obsługa komórek oraz surowica i antybiotyki w odniesieniu do jakości i stężenia) i powtórzyć test. Po spełnieniu kryteriów dopuszczalności, w celu zapewnienia minimalnej zmienności wartości  $EC_{50}$ ,  $PC_{50}$  i  $PC_{10}$ , niezbędne jest konsekwentne stosowanie materiałów do hodowli komórkowej. Cztery jednocześnie wzorce referencyjne, które powinny być włączone do każdego doświadczenia (przeprowadzanego w tych samych warunkach, w tym w odniesieniu do materiałów, poziomu pasażowania komórek i techników), mogą zapewnić czułość testu, ponieważ  $PC_{10}$  trzech dodatknych wzorców referencyjnych powinny mieścić się w dopuszczalnym zakresie, podobnie jak  $PC_{50}$  i  $EC_{50}$ , w przypadkach gdy można je obliczyć (zob. tabela 1).

**Tabela 1:** Dopuszczalne wartości zakresu czterech wzorców referencyjnych w odniesieniu do testu agonisty receptora estrogenowego

| Nazwa                                             | $\log PC_{50}$ | $\log PC_{10}$ | $\log EC_{50}$ | Krzywa Hilla | Zakres badania           |
|---------------------------------------------------|----------------|----------------|----------------|--------------|--------------------------|
| 17 $\beta$ -estradiol (E2)<br>Nr CAS: 50-28-2     | -11,4~-10,1    | < -11          | -11,3~-10,1    | 0,7~1,5      | $10^{-14}$ ~ $10^{-8}$ M |
| 17 $\alpha$ -estradiol<br>Nr CAS: 57-91-0         | -9,6~-8,1      | -10,7~-9,3     | -9,6~-8,4      | 0,9~2,0      | $10^{-12}$ ~ $10^{-6}$ M |
| Kortykosteron<br>Nr CAS: 50-22-6                  | —              | —              | —              | —            | $10^{-10}$ ~ $10^{-4}$ M |
| 17 $\alpha$ -metylotestosteron<br>Nr CAS: 58-18-4 | -6,0~-5,1      | -8,0~-6,2      | —              | —            | $10^{-11}$ ~ $10^{-5}$ M |

*Dodatknie i ujemne wzorce referencyjne w odniesieniu do testu antagonisty receptora estrogenowego*

15. Przed badaniem i w jego trakcie należy zweryfikować reaktywność układu badawczego, stosując odpowiednie stężenia substancji dodatniej (tamoksyfen) oraz substancji ujemnej (flutamid). Dopuszczalne wartości zakresu uzyskane z badania walidacyjnego (1) podano w tabeli 2. Te dwa równoległe wzorce referencyjne powinny być włączone do każdego doświadczenia, a wyniki powinny być oceniane prawidłowo, jak pokazano w kryteriach. Jeżeli tak nie jest, należy określić przyczynę niespełnienia kryteriów (np. obsługa komórek oraz surowica i antybiotyki w odniesieniu do jakości i stężenia) i powtórzyć test. Ponadto należy obliczyć wartości  $IC_{50}$  dla substancji dodatniej (tamoksyfen), a wyniki powinny mieścić się w podanych dopuszczalnych granicach. Po spełnieniu kryteriów dopuszczalności, w celu zapewnienia minimalnej zmienności wartości  $IC_{50}$ , niezbędne jest konsekwentne stosowanie materiałów do hodowli komórkowej. Dwa jednocześnie wzorce referencyjne, które powinny być włączone do każdego doświadczenia (przeprowadzanego w tych samych warunkach, jeśli chodzi o materiały, poziom pasażowania komórek i techników), mogą zapewnić czułość testu (zob. tabela 2).

**Tabela 2:** Kryteria i dopuszczalne wartości zakresu dwóch wzorców referencyjnych w odniesieniu do testu

antagonisty receptora estrogenowego

| Nazwa                            | Kryteria                                        | LogIC <sub>50</sub> | Zakres badania                        |
|----------------------------------|-------------------------------------------------|---------------------|---------------------------------------|
| Tamoksyfen<br>Nr CAS: 10540-29-1 | dodatnie:<br>należy wyliczyć IC <sub>50</sub>   | -5942~-7596         | 10 <sup>-10</sup> ~10 <sup>-5</sup> M |
| Flutamid<br>Nr CAS: 13311-84-7   | ujemne:<br>nie należy obliczać IC <sub>30</sub> | -                   | 10 <sup>-10</sup> ~10 <sup>-5</sup> M |

*Kontrole dodatnie i grupy kontrolne nośnika*

16. Kontrolę dodatnią (PC) w odniesieniu do testu agonistycznego receptora estrogenowego (1 nM E2) oraz w odniesieniu do testu antagonistycznego receptora estrogenowego (10 µM TAM) należy przeprowadzić co najmniej trzykrotnie na każdej płytce. Nośnik stosowany do rozpuszczenia badanej substancji chemicznej należy zbadać jako grupę kontrolną nośnika (VC) co najmniej trzykrotnie na każdej płytce. Oprócz tej VC, jeżeli w ramach PC używany jest inny nośnik niż badana substancja chemiczna, należy przeprowadzić inną VC co najmniej trzykrotnie na tej samej płytce z PC.

*Kryteria jakości w odniesieniu do testu agonisty receptora estrogenowego*

17. Średnia aktywność lucyferazy w kontroli dodatniej (1 nM E2) powinna być co najmniej czterokrotnie większa od średniej VC na każdej płytce. Kryterium to ustalono na podstawie wiarygodności wartości punktów końcowych z badania walidacyjnego (historycznie od czterech do trzydziestu razy).
18. W odniesieniu do kontroli jakości testu krotność indukcji odpowiadająca wartości PC<sub>10</sub> jednoczesnej PC (1 nM E2) powinna być większa niż 1+2SD wartości krotności indukcji (= 1) jednoczesnej VC. Dla celów ustalania priorytetów, wartość PC<sub>10</sub> może być przydatna do uproszczenia analizy danych wymaganej w porównaniu z analizą statystyczną. Mimo że analiza statystyczna dostarcza informacji na temat istotności, analiza taka nie jest parametrem ilościowym w odniesieniu do potencjału na podstawie stężeń, a zatem jest mniej przydatna do celów ustalania priorytetów.

*Kryteria jakości w odniesieniu do testu antagonisty receptora estrogenowego*

19. Średnia aktywność lucyferazy we wzbogaceniu kontroli (25 nM E2) powinna być co najmniej czterokrotnie większa od średniej VC na każdej płytce. Kryterium to ustalono na podstawie wiarygodności wartości punktów końcowych z badania walidacyjnego.
20. W odniesieniu do kontroli jakości testu względna aktywacja transkrypcyjna (RTA) 1 nM E2 powinna być większa niż 100 %, RTA 1 µM 4-kydroksytamoksyfenu (OHT) powinna być mniejsza niż 40,6 %, a RTA 100 µM digitoniny (Dig) powinna być mniejsza niż 0 %.

Wykazanie biegłości laboratorium (zob. pkt 14 oraz tabela 3 i 4 w „ELEMENTY BADANIA AKTYWACJI TRANSKRYPCJI RECEPTORA ESTROGENOWEGO” niniejszej metody

badawczej).

### **Nośnik**

21. Sulfotlenek dimetylowy (DMSO), lub odpowiedni rozpuszczalnik, o tym samym stężeniu, co w przypadku różnych kontroli dodatnich i ujemnych, a badane substancje chemiczne powinny być stosowane jako jednoczesna kontrola z nośnikiem. Badaną substancję chemiczną należy rozpuścić w nośniku, który rozpuszcza tę badaną substancję chemiczną i jest mieszalny z podłożem komórkowym. Odpowiednie nośniki stanowią woda, etanol (95–100 % czystości) i sulfotlenek dimetylowy. Jeżeli stosuje się sulfotlenek dimetylowy, poziom nie powinien przekroczyć 0,1 % (obj./obj.). Dla każdego nośnika należy wykazać, że maksymalna zastosowana objętość nie wykazuje właściwości cytotoksycznych i nie ma wpływu na skuteczność testu.

### **Przygotowanie badanych substancji chemicznych**

22. Ogólnie rzecz biorąc, badane substancje chemiczne powinny być rozpuszczone w sulfotlenku dimetylowym lub innym odpowiednim rozpuszczalniku i seryjnie rozcieńczane tym samym rozpuszczalnikiem w stosunku 1:10 w celu przygotowania roztworów do rozcieńczenia z podłożem.

### **Rozpuszczalność i cytotoksyczność: Uwagi dotyczące ustalania zakresu dawkowania**

23. Należy przeprowadzić badanie wstępne w celu określenia właściwego zakresu stężeń substancji chemicznych, które mają być badane, oraz w celu upewnienia się, czy badana substancja chemiczna może mieć problemy z rozpuszczalnością i cytotoksycznością. Początkowo substancje chemiczne są badane do maksymalnego stężenia 1 µl/ml, 1 mg/ml lub 1 mM, w zależności od tego, które jest najniższe. Na podstawie zakresu cytotoksyczności lub braku rozpuszczalności zaobserwowanego w badaniu wstępnym, pierwsza określona seria badawcza powinna obejmować badanie substancji chemicznej w ciągach stężeń wzrastających w postępie logarytmicznym, począwszy od maksymalnego dopuszczalnego stężenia (np. 1 mM, 100 µM, 10 µM itd.) oraz odnotowanej obecności zmętnienia, osadu lub cytotoksyczności. Stężenia w drugiej, a w razie potrzeby w trzeciej serii badawczej należy odpowiednio dostosować, aby lepiej scharakteryzować krzywą zależności stężenie-odpowiedź oraz aby uniknąć stężeń, które okazały się nierozpuszczalne lub wywołują nadmierną cytotoksyczność.
24. W odniesieniu do agonistów i antagonistów receptora estrogenowego obecność rosnących poziomów cytotoksyczności może znacząco zmienić lub wyeliminować typową reakcję sigmoidalną i powinna być brana pod uwagę przy interpretacji danych. Należy stosować metody badania cytotoksyczności, które mogą dostarczyć informacji dotyczących 80 % żywotności komórek, wykorzystując odpowiednie testy oparte na doświadczeniu laboratoryjnym.

25. Jeżeli wyniki badania cytotoksyczności wykażą, że stężenie badanej substancji chemicznej zmniejszyło liczbę komórek o przynajmniej 20 %, stężenie to należy uznać za cytotoksyczne, a stężenia na poziomie co najmniej stężenia cytotoksycznego powinny być wyłączone z oceny.

#### Narażenie na działanie badanej substancji chemicznej oraz struktura płytki testowej

26. Procedurę rozcieńczeń substancji chemicznych (etapy 1 i 2) oraz narażenia komórek (etap 3) można przeprowadzić w następujący sposób:

Etap 1: Każda badana substancja chemiczna powinna być seryjnie rozcieńczona w sulfotlenku dimetylowym lub odpowiednim rozpuszczalniku i dodana do dołków mikropłytki w celu uzyskania końcowych stężeń seryjnych, jak określono we wstępnym badaniu zakresu dawkowania (zazwyczaj w seriach np. 1 mM, 100 µM, 10 µM, 1 µM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM i 10 pM ( $10^{-3}$ - $10^{-11}$  M)) potrójnego badania.

Etap 2: Rozcieńczenie substancji chemicznej: Najpierw rozcieńczyć 1,5 µl badanej substancji chemicznej w rozpuszczalniku do stężenia 500 µl podłoża.

Etap 3: Narażenie komórek na działanie substancji chemicznej: Dodać 50 µl rozcieńczenia z podłożem (przygotowanym w etapie 2) do dołka testowego zawierającego  $10^4$  komórek/100 µl/dołek.

Zalecana ostateczna objętość podłoża wymagana dla każdego dołka wynosi 150 µl. Próbkę do badań i wzorce referencyjne mogą być przyporządkowane w sposób przedstawiony w tabeli 3 i tabeli 4.

**Tabela 3:** Przykładowe przyporządkowanie stężenia na płytkach do wzorców referencyjnych na płytce testowej w teście agonisty receptora estrogenowego

| Wiersz | 17α-metylotestosteron |   |   | Kortykosteron |   |   | 17α-estradiol |   |   | E2      |    |    |
|--------|-----------------------|---|---|---------------|---|---|---------------|---|---|---------|----|----|
|        | 1                     | 2 | 3 | 4             | 5 | 6 | 7             | 8 | 9 | 10      | 11 | 12 |
| A      | stężenie 1 (10        | → | → | 100 µM        | → | → | 1 µM          | → | → | 10 nM   | →  | →  |
| B      | stężenie 2 (1 µM)     | → | → | 10 µM         | → | → | 100 nM        | → | → | 1 nM    | →  | →  |
| C      | stężenie 3 (100       | → | → | 1 µM          | → | → | 10 nM         | → | → | 100 pM  | →  | →  |
| D      | stężenie 4 (10        | → | → | 100 nM        | → | → | 1 nM          | → | → | 10 pM   | →  | →  |
| E      | stężenie 5 (1 nM)     | → | → | 10 nM         | → | → | 100 pM        | → | → | 1 pM    | →  | →  |
| F      | stężenie 6 (100       | → | → | 1 nM          | → | → | 10 pM         | → | → | 0,1 pM  | →  | →  |
| G      | stężenie 7 (10        | → | → | 100 pM        | → | → | 1 pM          | → | → | 0,01 pM | →  | →  |
| H      | VC                    | → | → | →             | → | → | PC            | → | → | →       | →  | →  |

VC: Grupa kontrolna nośnika (0,1 % sulfotlenek dimetylowy); PC: Kontrola dodatnia (1 nM E2)

27. Wzorce referencyjne (E2, 17α-estradiol, 17-μετψλοτεστοστερον i kortψκοστερον) ναλεψ βαδαί ω καψδεφ σειρι βαδαωχζεφ (τα βελα 3). Dołki kontroli dodatniej poddane działaniu 1 nM E2, w których może nastąpić maksymalna indukcja E2 i dołki kontroli z nośnikiem poddane działaniu sulfotlenku dimetylowego (lub odpowiedniego rozpuszczalnika) należy uwzględnić na każdej płytce

testowej (tabela 4). Jeżeli w tym samym doświadczeniu wykorzystywane są komórki z różnych źródeł (np. inna liczba pasaży, różne partie itd.), wzorce referencyjne powinny być badane w odniesieniu do każdego źródła komórek.

**Tabela 4:** Przykładowe przyporządkowanie stężeń na płytkach do badanych i pochodzących z płytki kontrolnych substancji chemicznych na płytce testowej w teście agonisty receptora estrogenowego

| Wiersz | Badana substancja chemiczna nr 1 |   |   | Badana substancja chemiczna nr 2 |   |   | Badana substancja |   |   | Badana substancja chemiczna nr 4 |    |    |
|--------|----------------------------------|---|---|----------------------------------|---|---|-------------------|---|---|----------------------------------|----|----|
|        | 1                                | 2 | 3 | 4                                | 5 | 6 | 7                 | 8 | 9 | 10                               | 11 | 12 |
| A      | stężenie 1 (10 µM)               | → | → | 1 mM                             | → | → | 1 µM              | → | → | 10 nM                            | →  | →  |
| B      | stężenie 2 (1 µM)                | → | → | 100 µM                           | → | → | 100 nM            | → | → | 1 nM                             | →  | →  |
| C      | stężenie 3 (100 nM)              | → | → | 10 µM                            | → | → | 10 nM             | → | → | 100 pM                           | →  | →  |
| D      | stężenie 4 (10 nM)               | → | → | 1 µM                             | → | → | 1 nM              | → | → | 10 pM                            | →  | →  |
| E      | stężenie 5 (1 nM)                | → | → | 100 nM                           | → | → | 100 pM            | → | → | 1 pM                             | →  | →  |
| F      | stężenie 6 (100 pM)              | → | → | 10 nM                            | → | → | 10 pM             | → | → | 0,1 pM                           | →  | →  |
| G      | stężenie 7 (10 pM)               | → | → | 1 nM                             | → | → | 1 pM              | → | → | 0,01 pM                          | →  | →  |
| H      | VC                               | → | → | →                                | → | → | PC                | → | → | →                                | →  | →  |

VC: Grupa kontrolna nośnika (0,1 % sulfotlenek dimetylowy); PC: Kontrola dodatnia (1 nM E2)

**Tabela 5:** Przykładowe przyporządkowanie stężeń na płytkach do wzorców referencyjnych na płytce testowej w teście antagonisty receptora estrogenowego

| Wiersz | Tamoksyfen                   |   |   | Flutamid |   |   | Badana substancja chemiczna nr 1 |   |   | Badana substancja chemiczna nr 2 |    |    |
|--------|------------------------------|---|---|----------|---|---|----------------------------------|---|---|----------------------------------|----|----|
|        | 1                            | 2 | 3 | 4        | 5 | 6 | 7                                | 8 | 9 | 10                               | 11 | 12 |
| A      | stężenie 1 (10 µM)           | → | → | 10 µM    | → | → | 10 µM                            | → | → | 10 µM                            | →  | →  |
| B      | stężenie 2 (1 µM)            | → | → | 1 µM     | → | → | 1 µM                             | → | → | 1 µM                             | →  | →  |
| C      | stężenie 3 (100 nM)          | → | → | 100 nM   | → | → | 100 nM                           | → | → | 100 nM                           | →  | →  |
| D      | stężenie 4 (10 nM)           | → | → | 10 nM    | → | → | 10 nM                            | → | → | 10 nM                            | →  | →  |
| E      | stężenie 5 (1 nM)            | → | → | 1 nM     | → | → | 1 nM                             | → | → | 1 nM                             | →  | →  |
| F      | stężenie 6 (100 pM)          | → | → | 100 pM   | → | → | 100 pM                           | → | → | 100 pM                           | →  | →  |
| G      | 0,1 % sulfotlenek dimetylowy | → | → | →        | → | → | 1 µM OHT                         | → | → | 100 µM Dig                       | →  | →  |
| H      | VC                           | → | → | →        | → | → | PC                               | → | → | →                                | →  | →  |

VC: Grupa kontrolna nośnika (0,1 % sulfotlenek dimetylowy); PC: Kontrola dodatnia (1 nM E2); OHT: 4-hydroksytamoksyfen; Dig: Digitonina.

 = wzbogacone o 25pM E2

28. Aby ocenić aktywność antagonistyczną substancji chemicznych, dołki testowe znajdujące się w rzędach od A do G powinny być wzbogacone 25 pM E2. Wzorce referencyjne (tamoksyfen i flutamid) należy badać w każdej serii badawczej. Dołki kontroli dodatniej poddane działaniu 1 nM E2, które mogą stanowić kontrolę jakości linii komórkowej hERα-HeLa-9903, dołki kontroli z nośnikiem poddane działaniu sulfotlenku dimetylowego (lub odpowiedniego rozpuszczalnika), dołki 0,1 % sulfotlenku dimetylowego poddane działaniu dodatku sulfotlenku dimetylowego do wzbogaconego E2 odpowiadającego „wzbogaceniu kontroli”.

dołki poddane działaniu końcowego stężenia 1  $\mu\text{M}$  OHT oraz dołki poddane działaniu 100  $\mu\text{M}$  Dig należy uwzględnić na każdej płytce testowej (tabela 5). Kolejna płytka testowa powinna być wykonana według tego samego układu płytki bez dołków z wzorcami porównawczymi (tabela 6). Jeżeli w tym samym doświadczeniu wykorzystywane są komórki z różnych źródeł (np. inna liczba pasaży, różne partie itd.), wzorce referencyjne powinny być badane w odniesieniu do każdego źródła komórek.

**Tabela 6:** Przykładowe przyporządkowanie stężenia na płytkach do badanych i pochodzących z płytki kontrolnych substancji chemicznych na płytce testowej w teście antagonisty receptora estrogenowego

| Wiersz | Badana substancja chemiczna nr 1 |   |   | Badana substancja chemiczna nr 2 |   |   | Badana substancja chemiczna nr 3 |   |   | Badana substancja chemiczna nr 4 |    |    |
|--------|----------------------------------|---|---|----------------------------------|---|---|----------------------------------|---|---|----------------------------------|----|----|
|        | 1                                | 2 | 3 | 4                                | 5 | 6 | 7                                | 8 | 9 | 10                               | 11 | 12 |
| A      | stężenie 1 (10 $\mu\text{M}$ )   | → | → | 10 $\mu\text{M}$                 | → | → | 10 $\mu\text{M}$                 | → | → | 10 $\mu\text{M}$                 | →  | →  |
| B      | stężenie 2 (1 $\mu\text{M}$ )    | → | → | 1 $\mu\text{M}$                  | → | → | 1 $\mu\text{M}$                  | → | → | 1 $\mu\text{M}$                  | →  | →  |
| C      | stężenie 3 (100 nM)              | → | → | 100 nM                           | → | → | 100 nM                           | → | → | 100 nM                           | →  | →  |
| D      | stężenie 4 (10 nM)               | → | → | 10 nM                            | → | → | 10 nM                            | → | → | 10 nM                            | →  | →  |
| E      | stężenie 5 (1 nM)                | → | → | 1 nM                             | → | → | 1 nM                             | → | → | 1 nM                             | →  | →  |
| F      | stężenie 6 (100 pM)              | → | → | 100 pM                           | → | → | 100 pM                           | → | → | 100 pM                           | →  | →  |
| G      | 0,1 % sulfotlenek dimetylowy     | → | → | →                                | → | → | 1 $\mu\text{M}$ OHT              | → | → | 100 $\mu\text{M}$ Dig            | →  | →  |
| H      | VC                               | → | → | →                                | → | → | PC                               | → | → | →                                | →  | →  |

VC: Grupa kontrolna nośnika (0,1 % sulfotlenek dimetylowy); PC: Kontrola dodatnia (1 nM E2); OHT: 4-hydroksytamoksyfen; Dig: Digitonina.

 : Wzbogacone o 25pM E2

29. Brak efektów styku powinien zostać potwierdzony, w stosownych przypadkach, a jeśli podejrzewa się efekty styku, należy zmienić układ płytki, aby uniknąć takich efektów. Można na przykład zastosować układ płytek z wyłączeniem dołków skrajnych.
30. Po dodaniu substancji chemicznych należy dokonać inkubacji płytek testowych w 5 % inkubatorze  $\text{CO}_2$  w temperaturze  $37 \pm 1$  °C przez 20–24 godzin w celu wywołania produktów genu reporterowego.
31. Należy zwrócić szczególną uwagę na związki charakteryzujące się wysoką lotnością. W takich przypadkach położone obok dołki kontrolne mogą generować fałszywie dodatnie wyniki, co należy uwzględnić w świetle oczekiwanych i historycznych wartości kontroli. W nielicznych przypadkach, w których zmienność może budzić obawy, zaleca się zastosowanie „uszczelnaczy płytek”, które podczas badania mogą pomóc w skutecznym odizolowaniu poszczególnych dołków.
32. Aby zapewnić niezależność badań ostatecznych dotyczących tej samej substancji chemicznej, ich powtórki należy przeprowadzać w różne dni.

### Test lucyferazy

33. W teście można stosować komercyjny odczynnik do testów lucyferazy [np. System Steady-Glo® Luciferase Assay (Promega, E2510 lub równoważny)] lub standardowy system testów na lucyferazę (np. Promega, E1500 lub równoważny), pod warunkiem spełnienia kryteriów dopuszczalności. Odczynniki testowe należy dobierać na podstawie czułości luminometru, który ma być użyty. W przypadku stosowania standardowego systemu testu lucyferazy przed dodaniem substratu należy użyć odczynnika do lizy kultury komórkowej (np. Promega, E1531 lub równoważnego). Odczynnik lucyferazy należy stosować zgodnie z instrukcjami producenta.

### ANALIZA DANYCH

#### Test agonisty receptora estrogenowego

34. W przypadku testu agonisty receptora estrogenowego w celu uzyskania względnej aktywności transkrypcyjnej do kontroli dodatniej (1 nM E2), sygnały luminescencyjne z tej samej płytki mogą być analizowane według następujących kroków (dopuszczalne są również inne równoważne procesy matematyczne):

Krok 1. Obliczyć średnią wartość VC.

Krok 2. Odjąć średnią wartość VC od wartości każdego dołka, aby znormalizować dane.

Krok 3. Obliczyć średnią wartość znormalizowanej PC.

Krok 4. Podzielić znormalizowaną wartość każdego dołka w danej płytce przez średnią wartość znormalizowanej PC (PC = 100 %).

Ostateczną wartością każdego dołka jest względna aktywność transkrypcyjna dla tego dołka w stosunku do reakcji PC.

Krok 5. Obliczyć średnią wartość względnej aktywności transkrypcyjnej dla każdej grupy stężeń badanej substancji chemicznej. Reakcja ma dwa wymiary: uśrednioną aktywność transkrypcyjną (reakcja) i stężenie, przy którym występuje reakcja (zob. następna sekcja).

#### Kwestie indukcji EC<sub>50</sub>, PC<sub>50</sub> i PC<sub>10</sub>

35. Pełna krzywa zależności stężenie-odpowiedź jest wymagana do obliczenia EC<sub>50</sub>, ale nie zawsze może być to osiągalne lub praktyczne ze względu na ograniczenia zakresu stężeń w badaniu (na przykład z powodu cytotoksyczności lub problemów z rozpuszczalnością). Ponieważ jednak EC<sub>50</sub> i maksymalny poziom indukcji (odpowiadający górnej wartości równania Hilla) są parametrami informacyjnymi, parametry te powinny być w miarę możliwości zgłaszane. Aby obliczyć wartość EC<sub>50</sub> i maksymalny poziom indukcji, należy skorzystać z odpowiedniego oprogramowania do obliczeń statystycznych (np. oprogramowanie



statystyczne Graphpad Prism). Jeśli równanie logistyczne Hilla ma zastosowanie do danych związanych z zależnością stężenie-odpowiedź,  $EC_{50}$  należy obliczyć za pomocą następującego równania (7):

$Y = \text{najniższa wartość} + (\text{najwyższa wartość} - \text{najniższa wartość} / (1 + 10^{\text{wykl. } ((\log EC_{50} - X) \times \text{krzywa Hilla})))$  gdzie:

X oznacza logarytm stężenia; oraz

Y oznacza reakcję i Y przebiega od najniższej wartości do najwyższej w postaci krzywej sigmoidalnej. Najniższa wartość jest ustalona na zero w równaniu logistycznym Hilla.

36. W odniesieniu do każdej badanej substancji chemicznej należy podać następujące informacje:

$RPC_{Max}$ , które oznacza maksymalny poziom reakcji wywołanej przez badaną substancję chemiczną, wyrażony jako procent reakcji wywołanej przez 1 nM E2 na tej samej płytce, a także  $PC_{Max}$  (stężenie związane z  $PC_{Max}$ ); oraz

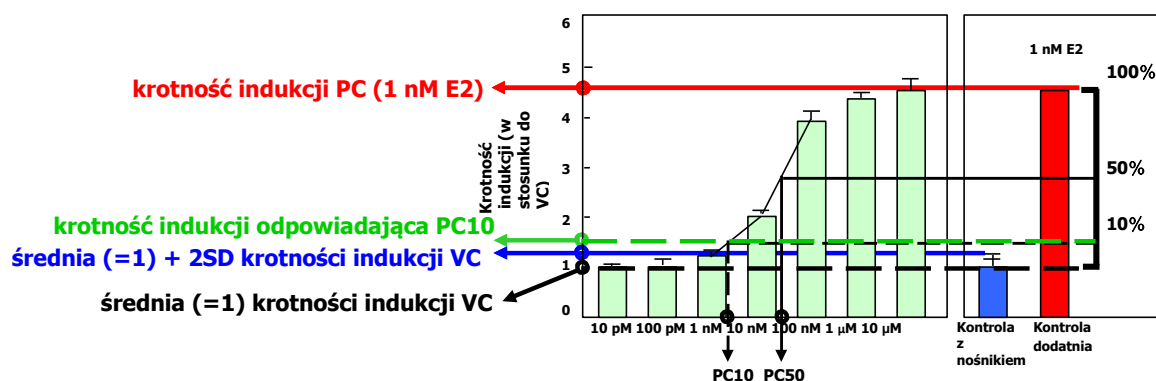
w przypadku dodatnich substancji chemicznych – stężenia, które indukują  $PC_{10}$  oraz, w stosownych przypadkach,  $PC_{50}$ .

37. Wartość PCx można obliczyć poprzez interpolację między 2 punktami na współrzędnej X-Y, jednym bezpośrednio powyżej i jednym bezpośrednio poniżej wartości PCx. Jeżeli punkty danych leżące bezpośrednio powyżej i poniżej wartości PCx mają odpowiednio współrzędne (a,b) i (c,d), wówczas wartość PCx można obliczyć przy użyciu następującego równania:

$$\log[PCx] = \log[c] + (x-d)/(d-b)$$

38. Opisy wartości PC podano na rysunku 1 poniżej.

**Rysunek 1: Przykład wyprowadzania wartości PC. PC (1 nM E2) jest uwzględniony na każdej płytce testowej**





### Test antagonisty receptora estrogenowego

39. W przypadku testu antagonisty receptora estrogenowego w celu uzyskania względnej aktywności transkrypcyjnej do wzbogacenia kontroli (25 pM E2), sygnały luminescencyjne z tej samej płytki mogą być analizowane według następujących kroków (dopuszczalne są również inne równoważne procesy matematyczne):

Krok 1. Obliczyć średnią wartość VC.

Krok 2. Odjąć średnią wartość VC od wartości każdego dołka, aby znormalizować dane. Krok 3. Obliczyć średnią wartość znormalizowanego wzbogacenia kontroli.

Krok 4. Podzielić znormalizowaną wartość każdego dołka danej płytki przez średnią wartość znormalizowanego wzmocnienia w kontroli (wzbogacenie kontroli = 100 %).

Ostateczną wartością każdego dołka jest względna aktywność transkrypcyjna dla tego dołka w stosunku do wzmocnienia reakcji kontroli.

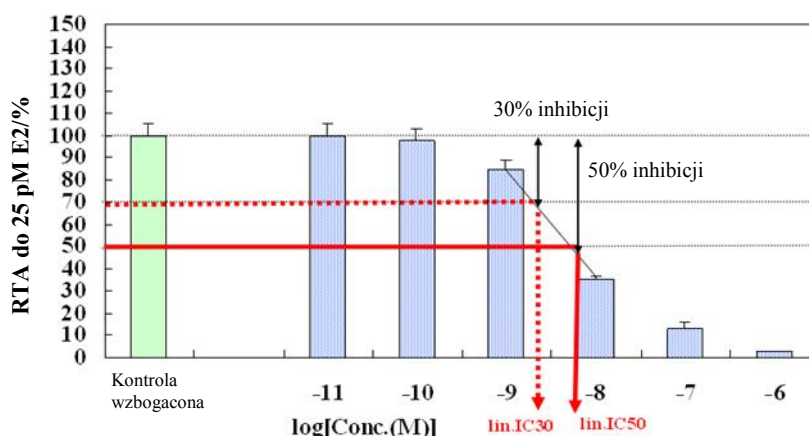
Krok 5. Obliczyć średnią wartość względnej aktywności transkrypcyjnej dla każdego poddania działaniu substancji.

### Parametry indukcji IC<sub>30</sub> i IC<sub>50</sub>

40. W przypadku dodatnich substancji chemicznych należy podać stężenia, które indukują IC<sub>30</sub> oraz, w stosownych przypadkach, IC<sub>50</sub>.
41. Wartość IC<sub>x</sub> można obliczyć poprzez interpolację między 2 punktami na współrzędnej X-Y, jednym bezpośrednio powyżej i jednym bezpośrednio poniżej wartości IC<sub>x</sub>. Jeżeli punkty danych leżące bezpośrednio powyżej i poniżej wartości IC<sub>x</sub> mają odpowiednio współrzędne (c,d) i (a,b), wówczas wartość IC<sub>x</sub> można obliczyć przy użyciu następującego równania:

$$\ln IC_x = a - (b - (100 - x)) (a - c) / (b - d)$$

**Rysunek 2: Przykład wyprowadzania wartości VC. Wzbogacenie kontroli (25 pM E2) jest uwzględnione na każdej płytce testowej**



RTA: względna aktywność transkrypcyjna

42. Wyniki powinny opierać się na dwóch (lub trzech) niezależnych seriach badawczych. Jeżeli dwie serie badawcze dają porównywalne i tym samym odtwarzalne wyniki, nie jest konieczne wykonywanie trzeciej serii. Aby wyniki zostały dopuszczone, powinny:

- spełniać kryteria dopuszczalności (zob. kryteria dopuszczalności pkt 14–20),
- być powtarzalne.

### Kryteria interpretacji danych

**Tabela 7:** Dodatnie i ujemne kryteria podejmowania decyzji w odniesieniu do testu agonisty receptora estrogenowego

|                 |                                                                                                                                                                  |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Dodatnia</b> | Jeżeli osiągnięto $RPC_{Max}$ , które jest równe lub przekracza 10 % reakcji kontroli dodatniej w co najmniej dwóch z dwóch lub dwóch z trzech serii badawczych. |
| <b>Ujemna</b>   | Jeżeli $RPC_{Max}$ nie osiągnie co najmniej 10 % reakcji kontroli dodatniej w dwóch z dwóch lub dwóch z trzech serii badawczych.                                 |

**Tabela 8:** Dodatnie i ujemne kryteria podejmowania decyzji w odniesieniu do testu antagonisty receptora estrogenowego

|                 |                                                                                               |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Dodatnia</b> | Jeżeli $IC_{30}$ oblicza się w co najmniej dwóch z dwóch lub dwóch z trzech serii badawczych. |
| <b>Ujemna</b>   | Jeżeli $IC_{30}$ nie da się obliczyć w dwóch z dwóch lub dwóch z trzech serii badawczych.     |

43. Kryteria interpretacji danych przedstawiono w tabelach 7 i 8. Wyniki dodatnie będą charakteryzować się zarówno wielkością skutku, jak i stężeniem, przy którym występuje skutek. Wyrażanie wyników jako stężenia, przy którym 50 % ( $PC_{50}$ ) lub 10 % ( $PC_{10}$ ) wartości kontroli dodatniej jest osiągane w odniesieniu do testu agonisty, a 50 % ( $IC_{50}$ ) lub 30 % ( $IC_{30}$ ) wzbogaconej wartości kontrolnej jest hamowane w odniesieniu do testu

antagonistycznego, osiąga oba te cele. Badana substancja chemiczna jest jednak uważana za dodatnią, jeżeli maksymalna reakcja wywołana przez badaną substancję chemiczną ( $RPC_{Max}$ ) jest równa lub przekracza 10 % reakcji kontroli dodatniej w co najmniej dwóch z dwóch lub dwóch z trzech serii badawczych, natomiast badana substancja chemiczna jest uważana za ujemną, jeżeli  $RPC_{Max}$  nie osiągnie co najmniej 10 % reakcji kontroli dodatniej w dwóch z dwóch lub dwóch z trzech serii badawczych.

44. Obliczeń  $PC_{10}$ ,  $PC_{50}$  i  $PC_{Maks}$  w teście agonisty receptora estrogenowego oraz  $IC_{30}$  i  $IC_{50}$  w teście antagonisty receptora estrogenowego można dokonać, wykorzystując arkusz kalkulacyjny, który jest dostępny na publicznej stronie internetowej OECD poświęconej wytycznym dotyczącym badań<sup>1</sup>.
45. Co najmniej podwójne uzyskanie wartości  $PC_{10}$  lub  $PC_{50}$  i  $IC_{30}$  lub  $IC_{50}$  powinno wystarczyć. Jeżeli jednak wynikająca z tego linia podstawowa dotycząca danych będących w tym samym zakresie stężeń wykaże zmienność z niedopuszczalnie wysokim współczynnikiem zmienności (CV; %), dane te mogą zostać uznane za niewiarygodne i w takim wypadku należy określić źródło wysokiej zmienności. CV potrójnych danych surowych (tj. danych dotyczących intensywności luminescencji) punktów danych wykorzystywanych do obliczenia  $PC_{10}$  powinno wynosić mniej niż 20 %.
46. Spełnienie kryteriów dopuszczalności wskazuje, że system testów funkcjonuje prawidłowo, ale nie gwarantuje, że którakolwiek konkretna seria badawcza dostarczy dokładnych danych. Powielenie wyników pierwszej serii badawczej gwarantuje największe prawdopodobieństwo uzyskania dokładnych danych.
47. W przypadku testu agonisty receptora estrogenowego tam, gdzie istnieje potrzeba uzyskania dodatkowych informacji w celach rozpoznania i ustalenia priorytetów niniejszej wytycznej dotyczącej badań w odniesieniu do badanych substancji chemicznych, a zwłaszcza substancji chemicznych PC10–PC49, jak również substancji chemicznych podejrzewanych o nadmierną stymulację lucyferazy, można potwierdzić, że jej obserwowana aktywność jest wyłącznie reakcją szczególną dla receptora estrogenowego **alfa**, przy wykorzystaniu antagonisty receptora estrogenowego **alfa** (zob. dodatek 2.1).

## SPRAWOZDANIE Z BADANIA

---

<sup>1</sup> <http://www.oecd.org/env/testguidelines>

48. Zob. pkt 20 dotyczący „ELEMENTÓW BADANIA AKTYWACJI TRANSKRYPCJI RECEPTORA ESTROGENOWEGO”.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) OECD (2015). *Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity*. [W:] Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 225. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.
- (2) Escande A., et al. (2006). *Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta*. „Biochem. Pharmacol.” nr 71, s. 1459–1469.
- (3) Kuiper G.G., et al. (1998). *Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta*. „Endocrinol.” nr 139, s. 4252–4263.
- (4) Spaepen M., et al. (1992). *Detection of Bacterial and Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Polymerase Chain Reaction*. „FEMS Microbiol. Lett.” nr 78(1), s. 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.” nr 57(4), s. 769–771.
- (6) Dussurget O. i Roulland-Dussoix D. (1994). *Rapid, Sensitive PCR-Based Detection of Mycoplasmas in Simulated Samples of Animal Sera*. „Appl. Environ. Microbiol.” nr 60(3), s. 953–959.
- (7) De Lean A., Munson P.J. i Rodbard D. (1978). *Simultaneous Analysis of Families of Sigmoidal Curves: Application to Bioassay, Radioligand Assay, and Physiological Dose-Response Curves*. „Am. J. of Physiol.” nr 235, E97–E102.

## **Dodatek 2.1**

### **WYNIKI FAŁSZYWIE DODATNIE: OCENA SYGNAŁÓW LUMINESCENCJI NIEPRZEKAZYWANYCH ZA POMOCĄ RECEPTORA**

1. Wyniki fałszywie dodatnie w badaniu antagonisty receptora estrogenowego mogą pojawiać się na skutek aktywacji genu lucyferazy niezależnej od receptora estrogenowego lub na skutek bezpośredniej aktywacji produktu genu lub niepowiązanej fluorescencji. Wyniki takie wskazuje niekompletna lub nietypowa krzywa dawka-efekt. Jeżeli podejrzewa się wystąpienie takich wyników, należy zbadać wpływ wyników antagonisty receptora estrogenowego (np. 4-hydroksytamoksyfen (OHT) w stężeniu nietoksycznym) na reakcję. Czysty antagonist ICI 182780 może być niewłaściwy do tego celu, ponieważ wystarczające stężenie ICI 182780 może obniżyć wartość VC, a to w rezultacie wpłynie na analizę danych.
2. Aby zapewnić zasadność tego podejścia, na tej samej płytce należy przeprowadzić badanie następujących elementów:
  - aktywności agonistycznej nieznanej substancji chemicznej zawierającej/niezawierającej 10  $\mu$ M OHT,
  - VC (trzykrotnie),
  - OHT (trzykrotnie),
  - 1 nM E2 (trzykrotnie) jako agonisty PC,
  - 1 nM E2 + OHT (trzykrotnie).

### **Kryteria interpretacji danych**

Uwaga: Wszystkie dołki powinny otrzymać jednakowe stężenie nośnika.

- Jeżeli aktywność agonistyczna nieznanej substancji chemicznej NIE zostanie naruszona w wyniku stosowania antagonisty receptora estrogenowego, klasyfikuje się ją jako „ujemną”.
- Jeżeli aktywność agonistyczna nieznanej substancji chemicznej jest całkowicie zablokowana, zastosowanie mają kryteria podejmowania decyzji.
- Jeżeli aktywność agonistyczna w najniższym stężeniu jest równa bądź przekracza reakcję  $PC_{10}$ , nieznana substancja chemiczna jest blokowana w stopniu równym bądź przekraczającym reakcję  $PC_{10}$ . Różnicę w reakcjach między dołkami poddanymi działaniu antagonisty receptora estrogenowego i dołkami niepoddanymi takiemu działaniu oblicza się i należy uznać ją za rzeczywistą reakcję oraz wykorzystać do obliczania odpowiednich parametrów umożliwiających podjęcie decyzji o klasyfikacji.



## Analiza danych

Skontrolować standardy wykonywania badań.

Skontrolować CV między dołkami poddanymi działaniu substancji w takich samych warunkach.

1. Obliczyć średnią VC.
2. Odjąć średnią VC od wartości każdego dołka **niepoddanego** działaniu OHT.
3. Obliczyć średnią OHT.
4. Odjąć średnią VC od wartości każdego dołka poddanego działaniu OHT.
5. Obliczyć średnią PC.
6. Obliczyć względną aktywność transkrypcyjną wszystkich innych dołków w stosunku do PC.

## **Dodatek 2.2**

### **PRZYGOTOWANIE SUROWICY PODDANEJ DZIAŁANIU WĘGLA DRZEWNEGO POKRYTEGO DEKSTRANEM**

1. Poddawanie surowicy działaniu węgla drzewnego pokrytego dekstranem stanowi ogólną metodę usuwania związków estrogenowych z surowicy, którą dodaje się do podłoża komórkowego w celu wykluczenia subiektywnej reakcji związanej z pozostałościami estrogenów w surowicy. W trakcie tej procedury działaniu można poddać 500 ml bydlęcej surowicy płodowej.

#### **Komponenty**

2. Wymagane będą następujące materiały i sprzęt:

##### *Materiały*

aktywowany węgiel drzewny;

dekstran;

sześciowodny chlorek magnezu ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ );

sacharoza;

1 M roztworu buforowego KEPES (pH 7,4);

woda ultraczysta uzyskana za pomocą systemu filtracyjnego.

##### *Sprzęt*

Wysterylizowany w autoklawie szklany pojemnik (rozmiar należy odpowiednio dostosować)  
Standardowa wirówka laboratoryjna (której temperaturę można ustawić na 4 °C).

#### **Procedura**

3. Niniejszą procedurę dostosowano do wykorzystania probówek wirówkowych o pojemności 50 ml:

[Dzień 1] Należy przygotować zawiesinę węgla drzewnego pokrytego dekstranem z 1 l wody ultraczystej zawierającej 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,25 M sacharozy, 2,5 g węgla drzewnego, 0,25 g dekstranu i 5 mM HEPES i mieszać nocą w temperaturze 4 °C.

[Dzień 2] Rozmieścić zawiesinę w probówkach wirówki o pojemności 50 ml i wirować przez 10 min z prędkością 10 000 obr./min w temperaturze 4 °C. Usunąć supernatant, a połowę osadu z węgla drzewnego przechowywać w temperaturze 4 °C do wykorzystania w 3. dniu. Pozostałą część węgla drzewnego zawiesić za pomocą bydlęcej surowicy płodowej, którą

należy uprzednio ostrożnie rozmrozić, by uniknąć strącenia i przez 30 min inaktywować ciepłem w temperaturze 56 °C, a następnie umieścić w wysterylizowanym w autoklawie szklanym pojemniku (np. w kolbie Erlenmeyera). Zawiesinę mieszać ostrożnie nocą w temperaturze 4 °C.

[Dzień 3] Rozmieścić zawiesinę zawierającą bydlęcą surowicę płodową w probówkach wirówki do wirowania przez 10 min z prędkością 10 000 obr./min w temperaturze 4 °C. Zebrać bydlęcą surowicę płodową i przenieść ją do nowego osadu z węgla drzewnego przygotowanego i przechowywanego od 2. dnia. Zawiesić osad z węgla drzewnego i nocą ostrożnie mieszać tę zawiesinę w wysterylizowanym w autoklawie szklanym pojemniku w temperaturze 4 °C.

[Dzień 4] Rozmieścić zawiesinę w probówkach wirówki do wirowania przez 10 min z prędkością 10 000 obr./min w temperaturze 4 °C oraz sterylizować supernatant poprzez filtrację sterylnym filtrem 0,2 µm. Ten węgiel drzewny pokryty dekstranem poddany działaniu bydlęcej surowicy płodowej należy przechowywać w temperaturze -20 °C i można go wykorzystywać przez rok.

### **DODATEK 3**

#### **TEST TRANSAKTYWACJI RECEPTORA ESTROGENOWEGO VM7LUC DOTYCZĄCE IDENTYFIKACJI AGONISTÓW I ANTAGONISTÓW RECEPTORA ESTROGENOWEGO**

#### **ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA (ZOB. RÓWNIEŻ WPROWADZENIE OGÓLNE)**

1. W tym teście stosuje się linię komórkową VM7Luc4E2<sup>1</sup>. Badanie to zostało zatwierdzone przez Amerykański Krajowy Program Toksykologiczny Międzyagencyjnego Centrum Oceny Alternatywnych Metod Toksykologicznych oraz Międzyagencyjny Komitet Koordynacyjny ds. Uznawania Metod Alternatywnych (1). Linie komórkowe VM7Luc ulegają ekspresji głównie endogennego receptora estrogenowego alfa i niewielkiej ilości endogennego receptora estrogenowego beta (2)(3)(4).
2. Test ten ma zastosowanie w odniesieniu do szerokiego zakresu substancji pod warunkiem, że można je rozpuścić w sulfotlenku dimetylu (nr CAS 67-68-5), nie wchodzi w reakcję z nim lub podłożem do hodowli komórkowej, a także nie są cytotoksyczne w badanych stężeniach. Jeżeli zastosowanie sulfotlenku dimetylowego nie jest możliwe, można zastosować inny nośnik, np. etanol lub wodę (zob. pkt 12). Wykazana efektywność badania (ant)agonisty transaktywacji receptora estrogenowego VM7Luc wskazuje, że dane wygenerowane za pomocą tego testu mogą być źródłem informacji o mechanizmach działania pośredniczących w funkcjonowaniu receptorów estrogenowych i mogą być brane pod uwagę w momencie ustalania priorytetów dla substancji w celu przeprowadzenia dalszych badań.
3. Szczególnym przeznaczeniem tego testu jest wykrywanie transaktywacji zależnej od ludzkiego receptora estrogenowego alfa i ludzkiego receptora estrogenowego beta poprzez pomiar chemiluminescencji jako punktu końcowego. α Wykorzystanie chemiluminescencji w testach biologicznych jest powszechne, ponieważ luminescencję cechuje wysoki stosunek

---

<sup>1</sup> Do czerwca 2016 r. linia ta była oznaczona jako linia komórkowa BG1Luc. Jako pierwszy komórki BG-1 opisał Geisinger *et al.* (1998) (12), po czym ich charakterystykę opracowali badacze z Narodowego Instytutu Nauk o Zdrowiu Środowiskowym (13). Stosunkowo niedawno odkryto, że istnieją dwie różne odmiany komórek BG-1 stosowanych przez badaczy – BG-1 Fr i BG-1 NIEHS. Wnikliwa analiza, w tym badanie DNA tych dwóch odmiennych linii komórkowych BG-1 przeprowadzona przez Li *et al.* (2014) (14) wykazały, że BG-1 Fr była niepowtarzalna, i że BG-1 NIEHS, tj. pierwotna linia komórkowa stosowana do opracowania badania, nie była linią komórkową ludzkiego raka jajnika BG1, lecz odmianą linii komórkowej ludzkiego raka piersi MCF7. Linia komórkowa stosowana w badaniu znana pod nazwą BG1Luc4E2 (15) będzie obecnie nosiła nazwę VM7Luc4E2 („V” = odmiana; „M7” = komórki MCF7). Analogiczny test będzie obecnie określany jako „badanie aktywacji transkrypcji receptora estrogenowego VM7Luc” („test VM7Luc ER TA”). Chociaż powoduje to zmianę pochodzenia linii komórkowej, na której opiera się test, to nie ma wpływu ani na opublikowane badania walidacyjne, ani na użyteczność i stosowanie tego testu do celów rozpoznawania estrogenowych/antyestrogenowych substancji chemicznych.

sygnału do tła (10). Aktywność lucyferazy robaczka świętojańskiego w testach prowadzonych na komórkach może być jednak zakłócona przez substancje, które hamują wytwarzanie enzymu lucyferazy, powodując zarówno widoczną inhibicję, jak i zwiększoną luminescencję spowodowaną stabilizacją białka (10). Ponadto w przypadku pewnych testów genu reporterowego receptora estrogenowego opartych na lucyferazie, z powodu nadaktywacji lucyferazowego genu reporterowego zgłoszono sygnały niezwiązane z receptorami pośredniczącymi w luminescencji przy stężeniach fitoestrogenu przekraczających 1  $\mu$ M (9) (11). Chociaż krzywa dawka-efekt wskazuje, że rzeczywista aktywacja systemu receptora estrogenowego występuje przy niższych stężeniach, w stabilnej transfekcji systemów badania aktywacji transkrypcji receptora estrogenowego należy ostrożnie badać ekspresję lucyferazy uzyskaną przy wysokich stężeniach fitoestrogenów lub podobnych związków chemicznych, co do których przypuszcza się, że wywołują one – podobnie jak fitoestrogeny – nadaktywację lucyferazowego genu reporterowego (see Appendix 2).

4. Przed rozpoczęciem stosowania tego testu do celów regulacyjnych należy zapoznać się z sekcjami „WPROWADZENIE OGÓLNE” oraz „ELEMENTY BADANIA AKTYWACJI TRANSKRYPCJI RECEPTORA ESTROGENOWEGO”. Definicje i skróty stosowane w niniejszej metodzie badawczej są opisane w dodatku 1.

## **ZASADA WYKONANIA TESTU (ZOB. RÓWNIEŻ WPROWADZENIE OGÓLNE)**

5. Celem testu jest wskazanie wiązania ligandów, a następnie przeniesienie kompleksu receptor-ligand do jądra komórkowego. W jądrze komórkowym kompleks receptor-ligand wiąże się z określonymi elementami reakcji DNA oraz transaktywuje gen reporterowy (*luc*), co skutkuje wydobywaniem się lucyferazy, a w związku z tym powstaniem emisji światła, którą można określić ilościowo za pomocą luminometru. Aktywność lucyferazy można ocenić w szybki i niedrogi sposób, wykorzystując szereg dostępnych na rynku zestawów pomiarowych. Mechanizm transaktywacji receptora estrogenowego VM7Luc wykorzystuje reagującą na receptor estrogenowy ludzką linię komórkową gruczolaka piersi VM7, którą stabilnie transfekuje się za pomocą reportera *luc* robaczka świętojańskiego pod kontrolą czterech elementów reakcji estrogenowej umieszczonych powyżej promotora wirusa mysiego nowotworu gruczołu piersiowego, aby wykryć substancje wykazujące aktywność agonistów lub antagonistów receptora estrogenowego *in vitro*. Ten promotor mysiego nowotworu gruczołu piersiowego okazuje jedynie niewielką reakcję krzyżową z innymi hormonami sterydowymi i niesterydowymi (8). Kryteria dotyczące interpretacji danych szczegółowo opisano w pkt 41. Krótko mówiąc, reakcję dodatnią stwierdza się na podstawie krzywej zależności stężenie-odpowiedź, składającej się z co najmniej trzech punktów z nienakładającymi się na siebie słupkami błędów (średnim  $\pm$ SD), jak również na podstawie zmiany amplitudy (ujednoliconych względnych jednostek światła) o co najmniej 20 % maksymalnej wartości dla wzorca referencyjnego (17 $\beta$ -estradiol [E2; nr CAS 50-28-2]

w odniesieniu do testu agonisty, raloksyfen HCl [Ral; nr CAS 84449-90-1]/E2 w odniesieniu do testu antagonisty).

## **PROCEDURA**

### **Linia komórkowa**

6. W teście należy stosować stabilnie transfekowaną linię komórkową VM7Luc4E2. Dana linia komórkowa jest dostępna jedynie na podstawie technicznej umowy licencyjnej pochodzącej z Uniwersytetu Kalifornijskiego, Davis, Kalifornia, Stany Zjednoczone<sup>1</sup> oraz z Xenobiotic Detection Systems Inc., Durnham, Północna Karolina, Stany Zjednoczone<sup>2</sup>.

### **Stabilność linii komórkowej**

7. Aby zachować stabilność i integralność linii komórkowej, komórki powinny wyrastać z zamrożonego zapasu w pożywkach utrzymujących przez więcej niż jeden pasaż (zob. pkt 9). Komórek nie powinno się hodować przez więcej niż 30 pasażów. W przypadku linii komórkowej VM7Luc4E2, 30 pasażów może trwać około trzy miesiące.

### **Kultura komórkowa i warunki posiewu**

8. Należy przestrzegać procedur określonych w wytycznej dotyczącej dobrych praktyk w zakresie kultury komórkowej (5) (6), aby zagwarantować wysoką jakość wszystkich materiałów i metod, co pozwoli zachować integralność, zasadność i odtwarzalność wszelkich prowadzonych prac.
9. Komórki VM7Luc4E2 zachowuje się w pożywce RPMI 1640 zawierającej 0,9 % Pen-Strep i 8,0 % bydlęcej surowicy płodowej w dedykowanym inkubatorze do hodowli tkankowej w temperaturze 37 °C ±1 °C, wilgotności 90 % ±5 % i atmosferze zawierającej 5,0 % ±1 % CO<sub>2</sub>.
10. Do chwili osiągnięcia konfluencji na poziomie około 80 %, komórki VM7Luc4E2 wysiewa się na hodowlę wtórne i kondycjonuje do środowiska wolnego od estrogenów przez 48 godzin przed posianiem komórek w 96-dołkowych płytkach w celu poddania ich działaniu badanych substancji chemicznych i analizy zależnej od estrogenów indukcji aktywności

---

<sup>1</sup>Dr Michael S. Denison. Profesor, Wydział Toksykologii Środowiskowej, 4241 Meyer Hall, One Shields Ave, Uniwersytet Kalifornijski, Davis, Karolina, 95616, e-mail: [msenison@ucdavis.edu](mailto:msenison@ucdavis.edu), +1 5307548649

<sup>2</sup> Xenobiotic Detection Systems Inc., 1601 East Geer Street, Suite S, Durham, Karolina Północna, 27704 Stany Zjednoczone, e-mail: [info@dioxins.com](mailto:info@dioxins.com), Telefon: +1 9196884804, Faks: +1 9196884404

lucyferazy. Pożywka wolna od estrogenów zawiera Dulbecco's Modification of Eagle's Medium uzupełniony 4,5 % bydlęcą surowicą płodową pozbawioną czerwieni fenolowej i poddaną działaniu węgla drzewnego / dekstranu, 1,9 % L-glutaminą i 0,9 % Pen-Strep. Wszystkie wyroby z tworzyw sztucznych powinny być wolne od aktywności estrogenowej [zob. protokół szczegółowy (7)].

### **Kryteria dopuszczalności**

11. Akceptacji lub odrzucenia badania dokonuje się na podstawie oceny wyników kontroli i wzorca referencyjnego uzyskanych z każdego doświadczenia przeprowadzonego na 96-dółkowej płytce. Każdy wzorzec referencyjny bada się w wielu stężeniach i istnieje wiele próbek każdego stężenia referencyjnego i stężenia kontroli. Wyniki porównuje się do wyników kontroli jakości pod względem tych parametrów, które pochodzą z bazy danych historycznych agonistów i antagonistów wygenerowanych przez każde laboratorium podczas wykazywania efektywności. Bazy danych historycznych ciągle aktualizuje się o wartości wzorców referencyjnych i kontroli. Zmiany w sprzęcie lub warunkach laboratoryjnych mogą wymagać wygenerowania zaktualizowanych baz danych historycznych.

#### *Badanie agonisty*

##### Badanie ustalające zakres dawkowania

- indukcja: Indukcję płytki należy mierzyć, dzieląc najwyższą średnią wartość względnej jednostki światła wzorca referencyjnego E2 przez średnią wartość względnej jednostki światła kontroli z sulfotlenkiem dimetylowym. Zazwyczaj osiąga się pięciokrotność indukcji, jednak dla celów dopuszczalności krotność indukcji powinna być większa bądź równa 4;
- wyniki kontroli z sulfotlenkiem dimetylowym: Wartości względnej jednostki światła kontroli z rozpuszczalnikami powinny mieścić się w granicach 2,5-krotności odchylenia standardowego historycznej średniej wartości względnej jednostki światła kontroli z rozpuszczalnikami;
- doświadczenie, które nie spełni któregośkolwiek z kryteriów dopuszczalności należy odrzucić i powtórzyć.

##### Badanie kompleksowe

W jego skład wchodzi kryteria dopuszczalności pochodzące z badania ustalającego zakres dawkowania oraz następujące elementy:

- wyniki wzorca referencyjnego: krzywa zależności stężenie-odpowiedź wzorca referencyjnego E2 powinna mieć kształt sigmoidalny, a w liniowej części zawierać co najmniej trzy wartości;
- wyniki kontroli dodatniej: wartości względnej jednostki światła kontroli z metoksychlorem powinny być wyższe niż średnia sulfotlenku dimetylowego

powiększona o trzykrotność odchylenia standardowego ze średniej sulfotlenku dimetylowego;

- doświadczenie, które nie spełni któregokolwiek z kryteriów dopuszczalności należy odrzucić i powtórzyć.

### *Badanie antagonisty*

#### Badanie ustalające zakres dawkowania

- redukcja: redukcję płytki mierzy się, dzieląc najwyższą średnią wartość względnej jednostki światła wzorca referencyjnego Ral/E2 przez średnią wartość względnej jednostki światła kontroli z sulfotlenkiem dimetylowym. Zazwyczaj osiąga się pięciokrotność redukcji, jednak dla celów dopuszczalności krotność redukcji powinna być większa bądź równa 3;
- wyniki kontroli z E2: wartości względnej jednostki światła kontroli z E2 powinny mieścić się w granicach 2,5-krotności odchylenia standardowego historycznej średniej wartości względnej jednostki światła kontroli z E2;
- wyniki kontroli z sulfotlenkiem dimetylowym: wartości względnej jednostki światła kontroli z sulfotlenkiem dimetylowym powinny mieścić się w granicach 2,5-krotności odchylenia standardowego historycznej średniej wartości względnej jednostki światła kontroli z rozpuszczalnikiem;
- doświadczenie, które nie spełni któregokolwiek z kryteriów dopuszczalności, zostanie odrzucone i powtórzone.

#### Badanie kompleksowe

W jego skład wchodzi kryteria dopuszczalności pochodzące z badania ustalającego zakres dawkowania oraz następujące elementy:

- wyniki wzorca referencyjnego: Krzywa zależności stężenie-odpowiedź wzorca referencyjnego Ral/E2 powinna mieć kształt sigmoidalny i zawierać co najmniej trzy wartości w swojej liniowej części;
- wyniki kontroli dodatniej: Wartości względnej jednostki światła kontroli z tamoksyfenem/E2 powinny być niższe niż średnia kontroli z E2 pomniejszona o trzykrotność odchylenia standardowego ze średniej kontroli z E2;
- doświadczenie, które nie spełni któregokolwiek z kryteriów dopuszczalności, zostanie odrzucone i powtórzone.

### **Wzorce referencyjne, kontrole dodatnie i grupy kontrolne nośnika**

#### *Grupa kontrolna nośnika (testy agonistów i antagonistów)*

12. Nośnik stosowany do rozpuszczenia badanej substancji chemicznej należy zbadać jako grupę kontrolną nośnika. Nośnikiem stosowanym w trakcie walidacji badania aktywacji transkrypcji receptora estrogenowego VM7Luc był sulfotlenek dimetylowy 1 % (obj./obj.) (nr CAS 67-68-5) (zob. pkt 24). Jeśli stosuje się nośnik inny niż sulfotlenek dimetylowy,



wszystkie wzorce referencyjne, grupy kontrolne i badane substancje chemiczne należy, jeżeli jest to stosowne, zbadać w tym samym nośniku.

*Wzorzec referencyjny (agonista ustalający zakres dawkowania)*

13. Wzorcem referencyjnym jest E2 (nr CAS 50-28-2). W przypadku badań ustalających zakres dawkowania, wzorzec referencyjny składa się z serii stężeń wzrastających w postępie geometrycznym, zawierającej cztery stężenia E2 ( $1,84 \times 10^{-10}$ ,  $4,59 \times 10^{-11}$ ,  $1,15 \times 10^{-11}$  i  $2,87 \times 10^{-12}$  M), przy czym każde z nich badane jest w zduplikowanych dołkach.

*Wzorzec referencyjny (kompleksowy agonista)*

14. W przypadku badań kompleksowych, E2 składa się z serii stężeń wzrastających w postępie geometrycznym w stosunku 1:2, zawierającej w zduplikowanych dołkach 11 stężeń E2 (w zakresie od  $3,67 \times 10^{-10}$  do  $3,59 \times 10^{-13}$  M).

*Wzorzec referencyjny (antagonista ustalający zakres dawkowania)*

15. Wzorcem referencyjnym jest połączenie Ral (nr CAS 84449-90-1) i E2 (nr CAS 50-28-2). W przypadku badań ustalających zakres dawkowania, Ral/E2 składa się z serii stężeń wzrastających w postępie geometrycznym zawierającej w zduplikowanych dołkach trzy stężenia Ral ( $3,06 \times 10^{-9}$ ,  $7,67 \times 10^{-10}$  i  $1,92 \times 10^{-10}$  M) plus stałe stężenie ( $9,18 \times 10^{-11}$  M) E2.

*Wzorzec referencyjny (kompleksowy antagonist)*

16. W przypadku badań kompleksowych, Ral/E2 składa się z serii stężeń wzrastających w postępie geometrycznym w stosunku 1:2 Ral (w zakresie od  $2,45 \times 10^{-8}$  do  $9,57 \times 10^{-11}$  M) plus stałego stężenia ( $9,18 \times 10^{-11}$  M) E2 zawierającego w zduplikowanych dołkach dziewięć stężeń Ral/E2.

*Słaba kontrola dodatnia (agonista)*

17. Słabą kontrolą dodatnią jest  $9,06 \times 10^{-6}$  M p,p'-metoksychlor (metoksychlor; nr CAS 72-43-5) w podłożu bez estrogeny.

*Słaba kontrola dodatnia (antagonista)*

18. Słaba kontrola dodatnia składa się z tamoksyfenu (nr CAS 10540-29-1)  $3,36 \times 10^{-6}$  M zawierającego  $9,18 \times 10^{-11}$  M E2 w podłożu bez estrogeny.

*Kontrola z E2 (wyłącznie test antagonisty)*

19. Kontrolą z E2 jest  $9,18 \times 10^{-11}$  M E2 w podłożu bez estrogeny oraz kontrola ujemna stosowana jako punkt odniesienia.

*Krotność indukcji (agonista)*

20. Indukcję aktywności lucyferazy wzorca referencyjnego (E2) mierzy się, dzieląc najwyższą średnią wartość względnej jednostki światła wzorca porównawczego E2 przez średnią

wartość względnej jednostki światła kontroli z sulfotlenkiem dimetylowym, a otrzymana krotność indukcji powinna być wyższa niż 4.

#### *Krotność redukcji (antagonista)*

21. Średnią aktywność lucyferazy wzorca referencyjnego (Ral/E2) mierzy się, dzieląc najwyższą średnią wartość względnej jednostki światła wzorca porównawczego E2 przez średnią wartość względnej jednostki światła kontroli z sulfotlenkiem dimetylowym, a jej krotność powinna być wyższa niż 3.

Wykazanie biegłości laboratorium (zob. pkt 14 oraz tabela 3 i 4 w „ELEMENTACH BADANIA AKTYWACJI TRANSKRYPCJI RECEPTORA ESTROGENOWEGO” niniejszej metody badawczej).

#### **Nośnik**

22. Badaną substancję chemiczną należy rozpuścić w nośniku, który rozpuszcza badaną substancję chemiczną i jest mieszalny z podłożem komórkowym. Odpowiednie nośniki stanowią woda, etanol (95–100 % czystości) i sulfotlenek dimetylowy. Jeżeli stosuje się sulfotlenek dimetylowy, poziom nie powinien przekroczyć 1 % (obj./obj.). Dla każdego nośnika należy wykazać, że maksymalna zastosowana objętość nie wykazuje właściwości cytotoksycznych i nie ma wpływu na efektywność testu. Wzorce referencyjne i kontrole rozpuszcza się w rozpuszczalniku 100 %, a następnie rozcieńcza do właściwych stężeń w podłożu bez estrogenu.

#### **Przygotowanie badanych substancji chemicznych**

23. Badane substancje chemiczne rozpuszcza się w sulfotlenku dimetylowym 100 % (lub stosownym rozpuszczalniku), a następnie rozcieńcza do właściwych stężeń w podłożu bez estrogenu. Badane substancje chemiczne, przed rozpuszczeniem i rozcieńczeniem, należy pozostawić w spokoju aż do momentu osiągnięcia temperatury pokojowej. Do każdego doświadczenia należy przygotować świeże roztwory badanych substancji chemicznych. Roztwory nie powinny zawierać zauważalnego osadu ani nie powinny być mętne. Wzorzec referencyjny i roztwory kontrolne można przygotować w dużej ilości; ostateczny wzorzec referencyjny, rozcieńczenia kontrolne oraz badane substancje chemiczne należy jednak przygotować świeżo do każdego doświadczenia i wykorzystać w ciągu 24 godzin od przygotowania.

#### **Rozpuszczalność i cytotoksyczność: Uwagi dotyczące ustalania zakresu dawkowania**

24. Badanie ustalające zakres składa się z siedmiopunktowej podwójonej serii badawczej stężeń wzrastających w postępie geometrycznym w stosunku 1:10. Badane substancje chemiczne wstępnie bada się do maksymalnego stężenia wynoszącego 1 mg/ml (~1 mM) w przypadku badania agonisty oraz do 20 µg/ml (~10 µM) w przypadku badania antagonisty. Doświadczenia ustalające zakres dawkowania wykorzystuje się do określenia:

- początkowych stężeń badanych substancji chemicznych wykorzystywanych podczas badań kompleksowych,
- rozcieńczeń badanych substancji chemicznych (w stosunkach 1:2 lub 1:5) wykorzystywanych podczas badań kompleksowych.

25. Ocena żywotności komórek / cytotoksyczności wchodzi w zakres protokołów dotyczących badania agonisty i antagonisty (7) oraz obejmuje badanie ustalające zakres dawkowania i badanie kompleksowe. Metoda dotycząca cytotoksyczności, którą stosowano do oceny żywotności komórek podczas walidacji transaktywacji receptora estrogenowy VM7Luc (1), była skalowaną jakościowo metodą obserwacji wzrokowej; do określenia cytotoksyczności można wykorzystać jednak metodę ilościową (zob. protokół (7)). Nie można wykorzystywać danych dotyczące stężeń badanych substancji chemicznych powodujących redukcję żywotności o ponad 20 %.

#### **Narażenie na działanie badanej substancji chemicznej oraz organizacja płytki testowej**

26. Komórki zlicza się i posiewa na 96-dółkowych płytkach z kulturą tkankową ( $2 \times 10^5$  komórek na dółek) w podłożu bez estrogeny, a następnie inkubuje przez 24 godziny, by umożliwić komórkom osadzenie się na płytce. Podłoże bez estrogeny usuwa się i zastępuje badanymi i porównawczymi substancjami chemicznymi w podłożu bez estrogeny, a następnie inkubuje przez 19–24 godzin. Należy zwrócić szczególną uwagę na substancje charakteryzujące się wysoką lotnością, ponieważ pobliskie dołki kontrolne mogą generować wyniki fałszywie dodatnie. W takich przypadkach zaleca się zastosowanie „uszczelnaczy płytek”, które podczas badania mogą pomóc w skutecznym odizolowaniu poszczególnych dołków.

#### *Badania ustalające zakres dawkowania*

27. W badaniu ustalającym zakres dawkowania wykorzystuje się wszystkie dołki 96-dółkowej płytki, aby prowadzić badanie maksymalnie sześciu substancji chemicznych w postaci siedmiopunktowej podwojonej próby serii stężeń wzrastających w postępie geometrycznym w stosunku 1:10 (zob. rysunki 1 i 2).

- W badaniu ustalającym zakres dawkowania agonisty jako wzorzec referencyjny wykorzystuje się cztery podwojone stężenia E2 i cztery dołki stanowiące kontrpróbę kontroli z sulfotlenkiem dimetylowym.
- W badaniu ustalającym zakres dawkowania antagonisty jako wzorzec referencyjny wykorzystuje się trzy podwojone stężenia Ral/E2 z zawartością  $9,18 \times 10^{-11}$  M E2, z trzema dołkami stanowiącymi kontrpróbę kontroli z E2 i kontroli z sulfotlenkiem dimetylowym.

**Rysunek 1: Badanie ustalające zakres dawkowania agonisty – rozkład na 96-dółkowej płytce**

|   | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    | 12    |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| A | TC1-1 | TC1-1 | TC2-1 | TC2-1 | TC3-1 | TC3-1 | TC4-1 | TC4-1 | TC5-1 | TC5-1 | TC6-1 | TC6-1 |
| B | TC1-2 | TC1-2 | TC2-2 | TC2-2 | TC3-2 | TC3-2 | TC4-2 | TC4-2 | TC5-2 | TC5-2 | TC6-2 | TC6-2 |
| C | TC1-3 | TC1-3 | TC2-3 | TC2-3 | TC3-3 | TC3-3 | TC4-3 | TC4-3 | TC5-3 | TC5-3 | TC6-3 | TC6-3 |
| D | TC1-4 | TC1-4 | TC2-4 | TC2-4 | TC3-4 | TC3-4 | TC4-4 | TC4-4 | TC5-4 | TC5-4 | TC6-4 | TC6-4 |
| E | TC1-5 | TC1-5 | TC2-5 | TC2-5 | TC3-5 | TC3-5 | TC4-5 | TC4-5 | TC5-5 | TC5-5 | TC6-5 | TC6-5 |
| F | TC1-6 | TC1-6 | TC2-6 | TC2-6 | TC3-6 | TC3-6 | TC4-6 | TC4-6 | TC5-6 | TC5-6 | TC6-6 | TC6-6 |
| G | TC1-7 | TC1-7 | TC2-7 | TC2-7 | TC3-7 | TC3-7 | TC4-7 | TC4-7 | TC5-7 | TC5-7 | TC6-7 | TC6-7 |
| H | E2-1  | E2-2  | E2-3  | E2-4  | VC    | VC    | VC    | VC    | E2-1  | E2-2  | E2-3  | E2-4  |

Skróty: E2-1 do E2-4 = stężenia wzorca referencyjnego E2 (od wysokiego do niskiego); TC1-1 do TC1-7 = stężenia (od wysokiego do niskiego) badanej substancji chemicznej 1 (TC1); TC2-1 do TC2-7 = stężenia (od wysokiego do niskiego) badanej substancji chemicznej 2 (TC2); TC3-1 do TC3-7 = stężenia (od wysokiego do niskiego) badanej substancji chemicznej 3 (TC3); TC4-1 do TC4-7 = stężenia (od wysokiego do niskiego) badanej substancji chemicznej 4 (TC4); TC5-1 do TC5-7 = stężenia (od wysokiego do niskiego) badanej substancji chemicznej 5 (TC5); TC6-1 do TC6-7 = stężenia (od wysokiego do niskiego) badanej substancji chemicznej 6 (TC6); VC = grupa kontrolna nośnika (sulfotlenek dimetylowy [1 % obj./obj. w podłożu bez estrogenu]).

**Rysunek 2: Badanie ustalające zakres dawkowania antagonisty – rozkład na 96-dółkowej płytce**

|   | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    | 12    |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| A | TC1-1 | TC1-1 | TC2-1 | TC2-1 | TC3-1 | TC3-1 | TC4-1 | TC4-1 | TC5-1 | TC5-1 | TC6-1 | TC6-1 |
| B | TC1-2 | TC1-2 | TC2-2 | TC2-2 | TC3-2 | TC3-2 | TC4-2 | TC4-2 | TC5-2 | TC5-2 | TC6-2 | TC6-2 |
| C | TC1-3 | TC1-3 | TC2-3 | TC2-3 | TC3-3 | TC3-3 | TC4-3 | TC4-3 | TC5-3 | TC5-3 | TC6-3 | TC6-3 |
| D | TC1-4 | TC1-4 | TC2-4 | TC2-4 | TC3-4 | TC3-4 | TC4-4 | TC4-4 | TC5-4 | TC5-4 | TC6-4 | TC6-4 |
| E | TC1-5 | TC1-5 | TC2-5 | TC2-5 | TC3-5 | TC3-5 | TC4-5 | TC4-5 | TC5-5 | TC5-5 | TC6-5 | TC6-5 |
| F | TC1-6 | TC1-6 | TC2-6 | TC2-6 | TC3-6 | TC3-6 | TC4-6 | TC4-6 | TC5-6 | TC5-6 | TC6-6 | TC6-6 |
| G | TC1-7 | TC1-7 | TC2-7 | TC2-7 | TC3-7 | TC3-7 | TC4-7 | TC4-7 | TC5-7 | TC5-7 | TC6-7 | TC6-7 |
| H | Ral-1 | Ral-2 | Ral-3 | VC    | VC    | VC    | E2    | E2    | E2    | Ral-1 | Ral-2 | Ral-3 |

Skróty: E2 = kontrola z E2; Ral-1 do Ral-3 = stężenia wzorca referencyjnego raloksyfenu/E2 (od wysokiego do niskiego); TC1-1 do TC1-7 = stężenia (od wysokiego do niskiego) badanej substancji chemicznej 1 (TC1); TC2-1 do TC2-7 = stężenia (od wysokiego do niskiego) badanej substancji chemicznej 2 (TC2); TC3-1 do TC3-7 = stężenia (od wysokiego do niskiego) badanej substancji chemicznej 3 (TC3); TC4-1 do TC4-7 = stężenia (od wysokiego do niskiego) badanej substancji chemicznej 4 (TC4); TC5-1 do TC5-7 = stężenia (od wysokiego do niskiego) badanej substancji chemicznej 5 (TC5); TC6-1 do TC6-7 = stężenia (od wysokiego do niskiego) badanej substancji chemicznej 6 (TC6); VC = grupa kontrolna nośnika (sulfotlenek dimetylowy [1 % obj./obj. w podłożu bez estrogenu]).

Uwaga: Wszystkie badane substancje chemiczne bada się w obecności E2  $9,18 \times 10^{-11}$  M.

28. Zalecana ostateczna objętość podłoża wymagana dla każdego dołka wynosi 200  $\mu$ l. Należy stosować jedynie płytki testowe, na których komórki we wszystkich dołkach wykazują żywotność na poziomie co najmniej 80 %.
29. Określanie początkowych stężeń w odniesieniu do kompleksowego badania **agonisty** szczegółowo opisano w protokole dotyczącym agonisty (7). Krótko mówiąc, zastosowano następujące kryteria:
- Jeżeli na krzywej przedstawiającej stężenia badanej substancji chemicznej nie istnieją punkty znajdujące się powyżej średniej powiększonej o trzykrotność odchylenia standardowego kontroli z sulfotlenkiem dimetylowym, kompleksowe badanie zostanie przeprowadzone z zastosowaniem 11-punktowej serii stężeń wzrastających w postępie geometrycznym w stosunku 1:2, począwszy od maksymalnego stężenia rozpuszczalnego.
  - Jeżeli na krzywej przedstawiającej stężenia badanej substancji chemicznej istnieją punkty znajdujące się powyżej średniej powiększonej o trzykrotność odchylenia standardowego kontroli z sulfotlenkiem dimetylowym, początkowe stężenie, które należy zastosować w kompleksowym badaniu w odniesieniu do 11-punktowego schematu rozcieńczeń powinno być o jedną jednostkę logarytmiczną wyższe niż stężenie dające najwyższą dostosowaną wartość względnej jednostki światła w badaniu ustalającym zakres dawkowania. 11-punktowy schemat rozcieńczeń będzie, w związku z poniższymi kryteriami oparty na rozcieńczeniach w stosunkach 1:2 albo 1:5:  
  
11-punktową serię stężeń wzrastających w postępie geometrycznym w stosunku 1:2 należy zastosować, gdy wynikły zakres stężeń obejmie pełen zakres reakcji opartych na krzywej stężenie-odpowiedź generowanych w badaniu ustalającym zakres dawkowania. W innym przypadku należy zastosować rozcieńczenie w stosunku 1:5.
  - Jeżeli badana substancja chemiczna podczas badania ustalającego zakres dawkowania wykazuje dwufazową krzywą stężenie-odpowiedź, obie fazy należy również wyjaśnić w badaniu kompleksowym.
30. Określanie początkowych stężeń w odniesieniu do kompleksowego badania **antagonisty** szczegółowo opisano w protokole dotyczącym antagonisty (7). Krótko mówiąc, zastosowano następujące kryteria:
- Jeżeli na krzywej dotyczącej stężenia badanej substancji chemicznej nie istnieją punkty znajdujące się poniżej średniej pomniejszonej o trzykrotność odchylenia standardowego kontroli z E2, kompleksowe badanie zostanie przeprowadzone z zastosowaniem 11-punktowej serii stężeń wzrastających w postępie geometrycznym w stosunku 1:2, począwszy od maksymalnego stężenia rozpuszczalnego.
  - Jeżeli na krzywej dotyczącej stężenia badanej substancji chemicznej istnieją punkty znajdujące się poniżej średniej pomniejszonej o trzykrotność odchylenia standardowego

kontroli z E2, początkowe stężenie, które należy zastosować w kompleksowym badaniu w odniesieniu do 11-punktowego schematu rozcieńczeń powinno być:

- stężeniem dającym najniższą dostosowaną wartość względnej jednostki światła w badaniu ustalającym zakres dawkowania,
  - najwyższym rozpuszczalnym stężeniem (zob. protokół dotyczący antagonisty (7), rysunek 14-2),
  - najniższym cytotoksycznym stężeniem (dla przykładu pokrewnego zob. protokół dotyczący antagonisty (7), rysunek 14-3).
- 11-punktowy schemat rozcieńczeń będzie, w związku z poniższymi kryteriami, oparty na serii albo rozcieńczeniu w stosunku 1:2 lub 1:5:

11-punktową serię stężeń wzrastających w postępie geometrycznym w stosunku 1:2 należy zastosować, gdy wynikły zakres stężeń obejmie pełen zakres reakcji opartych na krzywej stężenie-odpowiedź generowanych w badaniu ustalającym zakres dawkowania. W innym przypadku należy zastosować rozcieńczenie w stosunku 1:5.

#### *Badania kompleksowe*

31. Badanie kompleksowe składa się z 11-punktowych serii stężeń wzrastających w postępie geometrycznym (seriach stężeń wzrastających w postępie geometrycznym w stosunku 1:2 albo 1:5, opartych na początkowym stężeniu na podstawie kryteriów badań kompleksowych), przy czym każde stężenie bada się w trzech dołkach na 96-dołkowej płytce (zob. rysunki 3 i 4).

- W badaniu kompleksowym agonisty jako wzorzec referencyjny stosuje się 11 podwójnych stężeń E2. Na każdej płytce znajdują się cztery dołki stanowiące kontrpróbę kontroli z sulfotlenkiem dimetylowym i cztery dołki stanowiące kontrpróbę kontroli z metoksychlorem ( $9,06 \times 10^{-6}$  M).
- W badaniu kompleksowym antagonisty jako wzorzec referencyjny wykorzystuje się dziewięć podwójnych stężeń Ral/E2 z zawartością  $9,18 \times 10^{-11}$  M E2, przy czterech dołkach stanowiących kontrpróbę kontroli z E2  $9,18 \times 10^{-11}$  M, czterech dołkach stanowiących kontrpróbę kontroli z sulfotlenkiem dimetylowym oraz czterech dołkach stanowiących kontrpróbę tamoksyfenu  $3,36 \times 10^{-6}$  M.

**Rysunek 3: Badanie kompleksowe agonisty – rozkład na 96-dółkowej płytce**

|   | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10     | 11     | 12   |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|------|
| A | TC1-1 | TC1-2 | TC1-3 | TC1-4 | TC1-5 | TC1-6 | TC1-7 | TC1-8 | TC1-9 | TC1-10 | TC1-11 | VC   |
| B | TC1-1 | TC1-2 | TC1-3 | TC1-4 | TC1-5 | TC1-6 | TC1-7 | TC1-8 | TC1-9 | TC1-10 | TC1-11 | VC   |
| C | TC1-1 | TC1-2 | TC1-3 | TC1-4 | TC1-5 | TC1-6 | TC1-7 | TC1-8 | TC1-9 | TC1-10 | TC1-11 | VC   |
| D | TC2-1 | TC2-2 | TC2-3 | TC2-4 | TC2-5 | TC2-6 | TC2-7 | TC2-8 | TC2-9 | TC2-10 | TC2-11 | VC   |
| E | TC2-1 | TC2-2 | TC2-3 | TC2-4 | TC2-5 | TC2-6 | TC2-7 | TC2-8 | TC2-9 | TC2-10 | TC2-11 | Meth |
| F | TC2-1 | TC2-2 | TC2-3 | TC2-4 | TC2-5 | TC2-6 | TC2-7 | TC2-8 | TC2-9 | TC2-10 | TC2-11 | Meth |
| G | E2-1  | E2-2  | E2-3  | E2-4  | E2-5  | E2-6  | E2-7  | E2-8  | E2-9  | E2-10  | E2-11  | Meth |
| H | E2-1  | E2-2  | E2-3  | E2-4  | E2-5  | E2-6  | E2-7  | E2-8  | E2-9  | E2-10  | E2-11  | Meth |

Skróty: TC11-1 do TC1-11 = stężenia (od wysokiego do niskiego) badanej substancji chemicznej 1; TC2-1 do TC2-11 = stężenia (od wysokiego do niskiego) badanej substancji chemicznej 2; E2-1 do E2-11 = stężenia wzorca referencyjnego E2 (od wysokiego do niskiego); Meth = p,p' methoksychlor, słaba kontrola dodania; VC = grupa kontrolna nośnika z sulfotlenkiem dimetylowym (1 % obj./obj.) z podłożem bez estrogenu

**Rysunek 4: Badanie kompleksowe antagonisty – rozkład na 96-dółkowej płytce**

|   | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10     | 11     | 12  |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|-----|
| A | TC1-1 | TC1-2 | TC1-3 | TC1-4 | TC1-5 | TC1-6 | TC1-7 | TC1-8 | TC1-9 | TC1-10 | TC1-11 | VC  |
| B | TC1-1 | TC1-2 | TC1-3 | TC1-4 | TC1-5 | TC1-6 | TC1-7 | TC1-8 | TC1-9 | TC1-10 | TC1-11 | VC  |
| C | TC1-1 | TC1-2 | TC1-3 | TC1-4 | TC1-5 | TC1-6 | TC1-7 | TC1-8 | TC1-9 | TC1-10 | TC1-11 | VC  |
| D | TC2-1 | TC2-2 | TC2-3 | TC2-4 | TC2-5 | TC2-6 | TC2-7 | TC2-8 | TC2-9 | TC2-10 | TC2-11 | VC  |
| E | TC2-1 | TC2-2 | TC2-3 | TC2-4 | TC2-5 | TC2-6 | TC2-7 | TC2-8 | TC2-9 | TC2-10 | TC2-11 | Tam |
| F | TC2-1 | TC2-2 | TC2-3 | TC2-4 | TC2-5 | TC2-6 | TC2-7 | TC2-8 | TC2-9 | TC2-10 | TC2-11 | Tam |
| G | Ral-1 | Ral-2 | Ral-3 | Ral-4 | Ral-5 | Ral-6 | Ral-7 | Ral-8 | Ral-9 | E2     | E2     | Tam |
| H | Ral-1 | Ral-2 | Ral-3 | Ral-4 | Ral-5 | Ral-6 | Ral-7 | Ral-8 | Ral-9 | E2     | E2     | Tam |

Skróty: E2 = kontrola z E2; Ral-1 do Ral-9 = stężenia wzorca referencyjnego raloksyfenu/E2 (od wysokiego do niskiego); Tam = tamoksyfen/E2 słaba kontrola dodatnia TC1-1 do TC1-11 = stężenia (od wysokiego do niskiego) badanej substancji chemicznej 1 (TC1); TC2-1 do TC2-11 = stężenia (od wysokiego do niskiego) badanej substancji chemicznej 2 (TC2); VC = grupa kontrolna nośnika (sulfotlenek dimetylowy [1 % obj./obj. w podłożu bez estrogenu]).

Uwaga: Jak wspomniano, wszystkie dołki referencyjne i badawcze zawierają stałe stężenie E2 (9,18 x 10<sup>-11</sup>M).

32. Aby zapewnić niezależność badań kompleksowych dotyczących tej samej substancji chemicznej, ich powtórki należy przeprowadzać w różne dni. Należy przeprowadzić co najmniej dwa badania kompleksowe. Jeżeli wyniki badań są sprzeczne (np. jedno badanie jest dodatnie, a drugie ujemne), lub gdy jedno z badań jest nieodpowiednie, należy przeprowadzić trzecie, dodatkowe badanie.

## Pomiar luminescencji

33. Luminescencję mierzy się w zakresie od 300 do 650 nm, wykorzystując do tego luminometr iniekcyjny i oprogramowanie kontrolujące objętość iniekcji i interwał pomiaru (7). Emisję światła z każdego dołka wyraża się jako względną jednostkę światła/dołek.

## ANALIZA DANYCH

### Określenie EC<sub>50</sub> /IC<sub>50</sub>

34. Wartość EC<sub>50</sub> (połowę maksymalnego stężenia efektywnego badanej substancji chemicznej [agonistów]) oraz wartość IC<sub>50</sub> (połowę maksymalnego stężenia hamującego badanej substancji chemicznej [antagonistów]) określa się za pomocą danych dotyczących zależności stężenie-odpowiedź. W przypadku badanych substancji chemicznych, które są dodatnie w co najmniej jednym stężeniu, stężenie badanej substancji chemicznej, które wywołuje reakcję połowicznie maksymalną (IC<sub>50</sub> lub EC<sub>50</sub>) oblicza się, przeprowadzając analizę funkcji Hill lub jej odpowiednią alternatywy. Funkcja Hill stanowi czteroparametrowy logistyczny model matematyczny, przedstawiający stosunek stężenia badanej substancji chemicznej do reakcji (zazwyczaj w postaci krzywej sigmoidalnej), który oblicza się za pomocą następującego równania:

$$Y = Dół + \frac{(Góra - Dół)}{1 + 10^{(lgEC_{50} - X)Nachylenie}}$$

gdzie:

Y = reakcja (tj. względne jednostki światła);

X = logarytm stężenia;

Dół = minimalna reakcja;

Góra = najwyższa reakcja;

lg EC<sub>50</sub> (or lg IC<sub>50</sub>) = logarytm z X jako pośrednia reakcja między najwyższą wartością a najniższą;

Nachylenie = stromość krzywej.

W tym modelu oblicza się najlepszą możliwość dostosowania parametrów najwyższej wartości reakcji, najniższej wartości reakcji, nachylenia oraz IC<sub>50</sub> i EC<sub>50</sub>. Aby obliczyć wartości EC<sub>50</sub> i IC<sub>50</sub>, należy skorzystać z odpowiedniego oprogramowania do obliczeń statystycznych (np. z oprogramowania do obliczeń statystycznych Graphpad Prism<sup>R</sup>).

### Określenie wyników odstających

35. Właściwy osąd statystyczny można by uprościć, stosując między innymi test Q (zob. protokoły dotyczące agonisty i antagonisty (7)), by określić dołki „nienadające się do wykorzystania”, które zostaną wykluczone z analizy danych).



36. W przypadku kontrprób wzorca referencyjnego E2 (przy wielkości próby wynoszącej dwie kontrpróby), każdą dostosowaną wartość względną jednostki światła w odniesieniu do kontrpróby w danym stężeniu E2 uznaje się za odstającą, jeżeli jej wartość w bazie danych historycznych jest o 20 % wyższa lub niższa od wartości względnej jednostka światła dla tego stężenia.

#### **Gromadzenie i dostosowywanie danych z luminometru na potrzeby badań ustalających zakres**

37. Dane surowe z luminometra należy przenieść na szablon arkusza kalkulacyjnego zaprojektowanego na potrzeby danego testu. Należy ustalić, czy istnieją punkty danych odstających, które należy usunąć. (W odniesieniu do parametrów określonych w analizie zob. kryteria dopuszczalności badania.) Należy dokonać następujących obliczeń:

##### *Agonista*

- Krok 1 Obliczyć średnią wartość dla grupy kontrolnej nośnika (VC) z sulfotlenkiem dimetylowym.
- Krok 2 Odjąć średnią wartość sulfotlenku dimetylowego od wartości każdego dołka, aby znormalizować dane.
- Krok 3 Obliczyć średnią krotność indukcji w odniesieniu do wzorca referencyjnego (E2).
- Krok 4 Obliczyć średnią wartość  $EC_{50}$  w odniesieniu do badanych substancji chemicznych.

##### *Antagonista*

- Krok 1 Obliczyć średnią wartość dla VC sulfotlenku dimetylowego.
- Krok 2 Odjąć średnią wartość sulfotlenku dimetylowego od wartości każdego dołka, aby znormalizować dane.
- Krok 3 Obliczyć średnią krotność redukcji w odniesieniu do wzorca referencyjnego (Ral/E2).
- Krok 4 Obliczyć średnią wartość wzorca referencyjnego E2.
- Krok 5 Obliczyć średnią wartość  $IC_{50}$  w odniesieniu do badanych substancji chemicznych.

#### **Gromadzenie i dostosowywanie danych z luminometru na potrzeby badań kompleksowych**

38. Dane surowe z luminometra należy przenieść na szablon arkusza kalkulacyjnego zaprojektowanego na potrzeby danego testu. Należy ustalić, czy istnieją punkty danych odstających, które należy usunąć. (W odniesieniu do parametrów określonych w analizie zob. kryteria dopuszczalności badania.) Dokonuje się następujących obliczeń:

##### *Agonista*

- Krok 1 Obliczyć średnią wartość dla VC sulfotlenku dimetylowego.
- Krok 2 Odjąć średnią wartość sulfotlenku dimetylowego od wartości każdego dołka, aby znormalizować dane.

- Krok 3 Obliczyć średnią krotność indukcji w odniesieniu do wzorca referencyjnego (E2).
- Krok 4 Obliczyć średnią wartość  $EC_{50}$  w odniesieniu do E2 i badanych substancji chemicznych.
- Krok 5 Obliczyć średnią dostosowaną wartość względnej jednostki światła dla metoksychloru.

#### *Antagonista*

- Krok 1 Obliczyć średnią wartość dla VC sulfotlenku dimetylowego.
- Krok 2 Odjąć średnią wartość sulfotlenku dimetylowego od wartości każdego dołka, aby znormalizować dane.
- Krok 3 Obliczyć średnią krotność indukcji w odniesieniu do wzorca referencyjnego (Ral/E2).
- Krok 4 Obliczyć średnią wartość  $IC_{50}$  w odniesieniu do Ral/E2 i badanych substancji chemicznych.
- Krok 5 Obliczyć średnią dostosowaną wartość względnej jednostki światła dla tamoksyfenu.
- Krok 6 Obliczyć średnią wartość wzorca referencyjnego E2.

#### **Kryteria interpretacji danych**

39. Transaktywacja receptora estrogenowego VM7Luc ma stanowić część wagi dowodów, aby pomóc w ustaleniu priorytetów substancji do badań *in vivo* na obecność ED. Część niniejszej procedury ustalania priorytetów będzie stanowić klasyfikowanie badanej substancji chemicznej jako dodatniej lub ujemnej w odniesieniu do aktywności agonisty albo antagonisty receptora estrogenowego. W tabeli 1 przedstawiono dodatnie i ujemne kryteria podejmowania decyzji stosowane w badaniu walidacyjnym transaktywacji receptora estrogenowego VM7Luc.

**Tabela 1:** Dodatnie i ujemne kryteria podejmowania decyzji

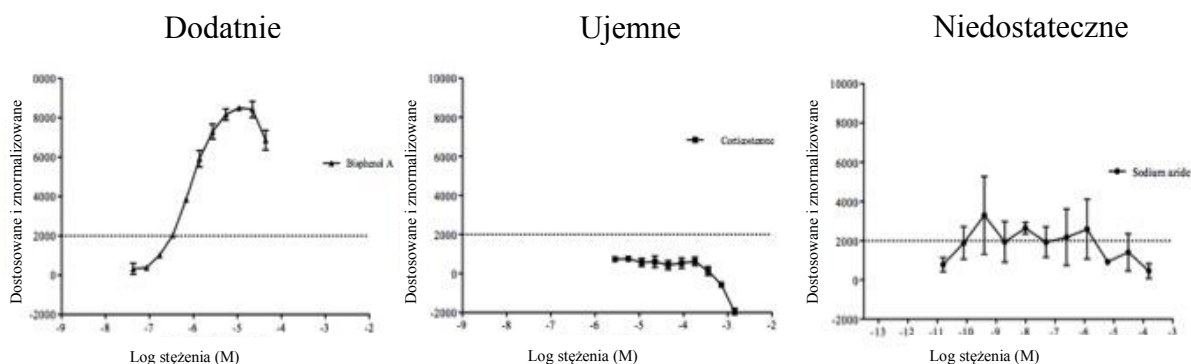
| AKTYWNOŚĆ AGONISTY |
|--------------------|
|--------------------|

|                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Dodatnia</b>              | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Wszystkie badane substancje chemiczne sklasyfikowane jako <i>dodatnie</i> pod względem aktywności agonisty receptora estrogenowego powinny zawierać krzywą zależności stężenie-odpowiedź, składającą się z linii podstawowej, po której następuje nachylenie dodatnie, a następnie plateau lub wierzchołek. W niektórych przypadkach można określić jedynie dwie z tych cech charakterystycznych (linia podstawowa-nachylenie lub nachylenie-wierzchołek).</li> <li>- Linia określająca nachylenie dodatnie powinna składać się z co najmniej trzech punktów zawierających nienakładające się na siebie słupki błędów (średnia <math>\pm</math>SD). Nie uwzględnia się punktów formujących linię podstawową, jednak liniowa część krzywej może zawierać wierzchołek lub pierwszy punkt plateau.</li> <li>- W przypadku dodatniej klasyfikacji wymaga się wskazania amplitudy reakcji – różnicy między linią podstawową a wierzchołkiem przy maksymalnej wartości wzorca referencyjnego (E2) wynoszącej co najmniej 20 % (tj. co najmniej 2 000 względnych jednostek światła, podczas gdy maksymalną wartość reakcji wzorców referencyjnych [E2] dostosowano do wartości 10 000 względnych jednostek światła).</li> <li>- Jeżeli jest to możliwe, wartość EC<sub>50</sub> należy obliczyć w odniesieniu do każdej dodatniej substancji chemicznej.</li> </ul> |
| <b>Ujemna</b>                | Średnia dostosowana wartość względnej jednostki światła w odniesieniu do danego stężenia jest równa lub niższa od średniej wartości względnej jednostki światła kontroli z sulfotlenkiem dimetylowym plus trzykrotności odchylenia standardowego względnej jednostki światła sulfotlenku dimetylowego.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| <b>Niedostateczna</b>        | Dane, których nie można interpretować jako prawidłowe pod kątem obecności albo nieobecności aktywności substancji z uwagi na znaczne ograniczenia jakościowe lub ilościowe uznaje się za niedostateczne oraz niezdadne do wykorzystania przy określaniu, czy badana substancja chemiczna jest dodatnia czy ujemna. Badanie substancji chemicznych należy przeprowadzić ponownie.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| <b>AKTYWNOŚĆ ANTAGONISTY</b> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |

|                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Dodatnia</b>       | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Dane dotyczące badanej substancji chemicznej kreślą krzywą zależności stężenie-odpowiedź, składającą się z linii podstawowej, po której następuje nachylenie ujemne.</li> <li>- Linia określająca nachylenie ujemne powinna składać się z co najmniej trzech punktów zawierających nienakładające się na siebie słupki błęd; nie wyklucza się punktów formujących linię podstawową, jednak liniowa część krzywej może zawierać pierwszy punkt plateau.</li> <li>- W przypadku wzorca referencyjnego (Ral/E2) powinno zaistnieć zmniejszenie aktywności o co najmniej 20 % w stosunku do wartości maksymalnej (tj. co najwyżej 8 000 względnych jednostek światła, podczas gdy maksymalną wartość reakcji wzorca referencyjnego [Ral/E2] dostosowano do wartości 10 000 względnych jednostek światła).</li> <li>- Najwyższe niecytotoksyczne stężenia badanej substancji chemicznej powinny być mniejsze bądź równe <math>1 \times 10^{-5}</math> M.</li> <li>- Jeżeli jest to możliwe, wartość <math>IC_{50}</math> należy obliczyć w odniesieniu do każdej dodatniej badanej substancji chemicznej.</li> </ul> |
| <b>Ujemna</b>         | Wszystkie punkty danych znajdują się powyżej wartości $ED_{80}$ (80 % reakcji E2 lub 8000 względnych jednostek światła), w stężeniach poniżej $1,0 \times 10^{-5}$ M.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| <b>Niedostateczna</b> | Dane, których nie można interpretować jako prawidłowe pod kątem obecności albo nieobecności aktywności substancji z uwagi na znaczne ograniczenia jakościowe lub ilościowe uznaje się za niedostateczne oraz niezdatne do wykorzystania przy określaniu, czy badana substancja chemiczna jest dodatnia czy ujemna. Badanie substancji chemicznej należy przeprowadzić ponownie.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |

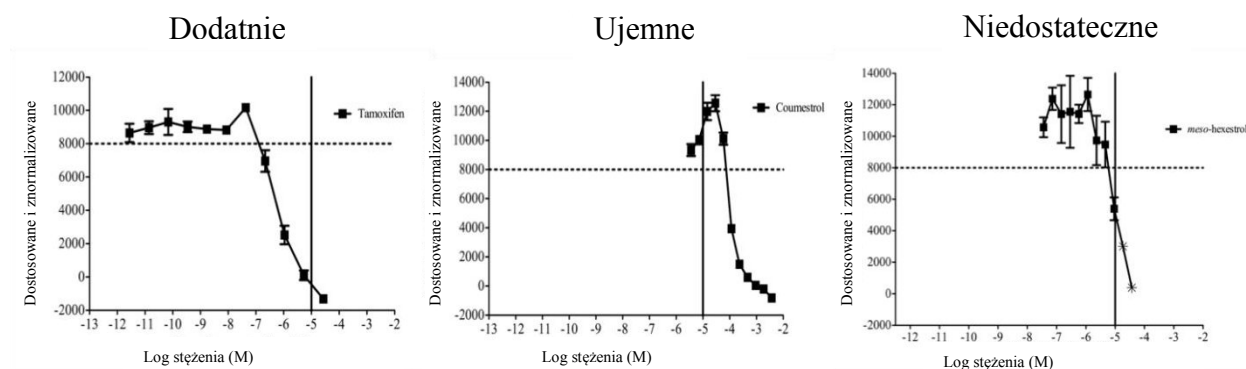
40. Wyniki dodatnie będą charakteryzować się zarówno wielkością skutku, oraz ilekroć to możliwe – stężeniem, przy którym występuje skutek. Przykłady dodatnich, ujemnych oraz niedostatecznych danych przedstawiono na rysunkach 5 i 6.

**Rysunek 5: Przykłady agonistów: dane dodatnie, ujemne lub niedostateczne**



Linia przerywaną oznaczono poziom 20 % reakcji E2, czyli 2 000 dostosowanych i znormalizowanych względnych jednostek światła.

**Rysunek 6: Przykłady antagonistów: dane dodatnie, ujemne lub niedostateczne**



Linia przerywaną oznaczono poziom 80 % reakcji Ral/E2, czyli 8 000 dostosowanych i znormalizowanych względnych jednostek światła.

Linia ciągłą oznaczono  $1,00 \times 10^{-5}$  M. W przypadku reakcji, którą zamierza się uznać za dodatnią, liczba względnych jednostek światła nie powinna przekraczać poziomu 8 000, a jej stężenia —  $1,00 \times 10^{-5}$  M.

Stężenia oznaczone gwiazdką na wykresie mezoheksestrołu wskazują na wyniki żywotności „2” lub większe.

Wyniki badania mezoheksestrołu uważa się za dane nieodpowiednie, ponieważ jedyna reakcja, która jest niższa niż 8 000 RLU zachodzi przy  $1,00 \times 10^{-5}$  M.

41. Obliczeń  $EC_{50}$  i  $IC_{50}$  można dokonać, wykorzystując czteroparametrową funkcję Hill (w celu uzyskania bardziej szczegółowych informacji zob. protokoły dotyczące agonistów i antagonistów (7)). Spełnienie kryteriów dopuszczalności wskazuje, że system działa prawidłowo, ale nie gwarantuje, że którakolwiek konkretna seria badawcza dostarczy dokładnych danych. Powielenie wyników pierwszej serii badawczej gwarantuje największe prawdopodobieństwo uzyskania dokładnych danych (zob. pkt 19 dotyczący „ELEMENTÓW BADANIA AKTYWACJI TRANSKRYPCJI RECEPTORA ESTROGENOWEGO”).

## **SPRAWOZDANIE Z BADANIA**

42. Zob. pkt 20 dotyczący „ELEMENTÓW BADANIA AKTYWACJI TRANSKRYPCJI RECEPTORA ESTROGENOWEGO”.

## BIBLIOGRAFIA

- (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” nr 23 (wyd. uzupełniona), s. 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” nr 33, s. 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” nr 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.*” nr 13(1) s. 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.*” nr 71(10), s. 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*” nr 17(6), s. 646–57.

- (11) (11) Kuiper G.G, *et al.* (1998). *Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta.* „Endocrinology” nr 139(10), s. 4252–63.
- (12) Geisinger, *et al.* (1989). *Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors,* „Cancer” nr 63, s. 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” nr 34, s. 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.” nr 28, s. 2072–2081.
- (15) Rogers, J.M. i 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.” nr 13, s. 67–82.



## **DODATEK 4**

### **TEST TRANSAKTYWACJI STABILNIE TRANSFEKOWANEGO LUDZKIEGO RECEPTORA ESTROGENOWEGO W CELU WYKRYCIA ESTROGENOWEGO DZIAŁANIA AGONISTYCZNEGO I ANTAGONISTYCZNEGO SUBSTANCJI CHEMICZNYCH Z WYKORZYSTANIEM LINII KOMÓRKOWEJ Z EKSPRESJĄ AKTYWOWANYCH CHEMICZNIE GENÓW LUCYFERAZY RECEPTORA ESTROGENOWEGO ALFA**

#### **ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA (ZOB. RÓWNIEŻ WPROWADZENIE OGÓLNE)**

1. Do celów wykrywania estrogenowej aktywności agonistycznej i antagonistycznej przekazywanej przez ludzki receptor estrogenowy alfa (hER $\alpha$ ), w teście transaktywacji ekspresji aktywowanych chemicznie genów lucyferazy receptora estrogenowego alfa wykorzystuje się ludzką linię komórkową U2OS. Badanie walidacyjne stabilnie transfekowanego testu biologicznego z ekspresją aktywowanych chemicznie genów lucyferazy wrażliwych na działanie receptora estrogenowego alfa przeprowadzone przez BioDetection Systems BV (Amsterdam, Niderlandy) wykazało stosowność i wiarygodność badania w odniesieniu do jego zamierzonego celu (1). W linii komórkowej z ekspresją aktywowanych chemicznie genów lucyferazy receptora estrogenowego alfa zachodzi ekspresja jedynie stabilnie transfekowanego ludzkiego receptora estrogenowego alfa (2)(3).
2. Szczególnym przeznaczeniem tego testu jest wykrywanie transaktywacji zależnej od ludzkiego receptora estrogenowego alfa poprzez pomiar bioluminescencji jako punktu końcowego. Bioluminescencja, ze względu na wysoki stosunek sygnału do szumu (4), jest powszechnie stosowana w testach biologicznych.
3. Stwierdzono, że stężenia fitoestrogenu wyższe niż 1  $\mu$ M powodują nadmierną aktywację genu reporterowego lucyferazy, w wyniku czego powstaje luminescencja niezależna od receptora (5)(6)(7). W związku z tym wyższe stężenia fitoestrogenów lub podobnych związków mogących powodować nadmierną aktywację ekspresji lucyferazy należy dokładnie zbadać w trakcie stabilnie transfekowanych testów transaktywacji receptora estrogenowego (zob. dodatek 2).
4. Przed rozpoczęciem stosowania tego testu do celów regulacyjnych należy zapoznać się z sekcjami „WPROWADZENIE OGÓLNE” oraz „ELEMENTY BADANIA AKTYWACJI TRANSKRYPCJI RECEPTORA ESTROGENOWEGO”. Definicje i skróty stosowane w niniejszej metodzie badawczej opisano w dodatku 1.

#### **ZASADA WYKONANIA TESTU (ZOB. RÓWNIEŻ WPROWADZENIE OGÓLNE)**

5. Celem testu biologicznego jest ocena wiązania ligandów receptora estrogenowego, a następnie przeniesienie kompleksu receptor-ligand do jądra komórkowego. W jądrze komórkowym kompleks receptor-ligand wiąże określone elementy odpowiedzi DNA i transaktywuje gen reporterowy lucyferazy robaczka świętojańskiego, powodując zwiększoną ekspresję komórkową enzymu lucyferazy. Po dodaniu lucyferazy jako substratu lucyferyny, lucyferyna przekształca się w produkt bioluminescencyjny. Wytworzone światło można w łatwy sposób wykryć i za pomocą luminometru określić ilościowo.
6. W układzie badawczym wykorzystuje się stabilnie transfekowane komórki ekspresji aktywowanych chemicznie genów lucyferazy receptora estrogenowego alfa. Komórki ekspresji aktywowanych chemicznie genów lucyferazy pochodzą z ludzkiej osteoblastycznej linii komórkowej kostniakomięsaka o nazwie U2OS. Ludzkie komórki U2OS stabilnie transfekowano z 3xHRE-TATA-Luc i pSG5-neo-hER $\alpha$  metodą współstrącania fosforanu wapnia. Linie komórkową U2OS wybrano ze względu na najwyższą odpowiedniość do pełnienia roli wskaźnikowej linii komórkowej reagującej na estrogeny (oraz inne hormony steroidowe), opierając się na obserwacji, że linia komórkowa U2OS wykazywała niewielką lub zerową aktywność receptora endogennego. Nieobecność receptorów endogennych oceniono, korzystając jedynie z plazmidów reporterowych lucyferazy, nie wykazujących aktywności po dodaniu ligandów receptorowych. Ponadto ta linia komórkowa, w momencie przejściowego wprowadzenia receptorów poznawczych stanowiła wsparcie dla reakcji zależnych od silnych hormonów (2)(3)(8).
7. Badanie substancji chemicznych pod kątem aktywności estrogenowej lub antyestrogenowej przy zastosowaniu linii komórkowej z ekspresją aktywowanych chemicznie genów lucyferazy receptora estrogenowego alfa obejmuje wstępną serię badawczą i kompleksowe serie badawcze. We wstępnej serii badawczej określa się rozpuszczalność, cytotoksyczność oraz zawężony zakres stężeń badanych substancji chemicznych, które służą do wykonania kompleksowych serii badawczych. W kompleksowych seriach badawczych w ramach testu biologicznego z ekspresją aktywowanych chemicznie genów lucyferazy wrażliwych na działanie receptora estrogenowego alfa przeprowadza się badanie zawężonych zakresów stężeń badanych substancji chemicznych, a następnie badane substancje chemiczne klasyfikuje się pod kątem agonizmu lub antagonizmu.
8. Kryteria dotyczące interpretacji danych opisano szczegółowo w pkt 59. Krótko mówiąc, badaną substancję chemiczną uznaje się za dodatnią pod kątem agonizmu w przypadku, gdy co najmniej dwa następujące po sobie stężenia badanej substancji chemicznej wykazują reakcję, która jest wyższa bądź równa 10 % maksymalnej reakcji wzorca referencyjnego 17 $\beta$ -estradiolu (PC<sub>10</sub>). Badaną substancję chemiczną uznaje się za dodatnią pod kątem antagonizmu, w przypadku gdy co najmniej dwa następujące po sobie stężenia badanej substancji chemicznej wykazują reakcję, która jest niższa bądź równa 80 % maksymalnej reakcji wzorca referencyjnego tamoksyfenu (PC<sub>80</sub>).

## **PROCEDURA**

### **Linie komórkowe**

9. W teście należy stosować stabilnie transfekowaną linię komórkową U2OS z ekspresją aktywowanych chemicznie genów lucyferazy receptora estrogenowego alfa. Linię komórkową można pozyskać z BioDetection Systems BV (Amsterdam, Niderlandy) na podstawie technicznej umowy licencyjnej.
10. Należy stosować jedynie komórki wolne od mykoplazmy. Partie komórkowe wykorzystane do badań powinny albo dawać wyniki ujemne pod względem zanieczyszczenia mykoplazmą, albo przed ich zastosowaniem powinno się wykonać badanie na obecność mykoplazmy. RT-PCR (reakcję łańcuchową polimerazy w czasie rzeczywistym) należy zastosować w odniesieniu do czułego wykrywania zakażenia mykoplazmą (9).

### **Stabilność linii komórkowej**

11. Aby zachować stabilność i integralność komórek ekspresji aktywowanych chemicznie genów lucyferazy, należy przechowywać je w ciekłym azocie (w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$ ). Po rozmrożeniu komórek w celu rozpoczęcia nowej hodowli, komórki, zanim rozpocznie się ich stosowanie do oceny agonistycznej i antagonistycznej aktywności substancji chemicznych, należy co najmniej dwukrotnie wysiać na hodowlę wtórne. Komórki nie powinny wydzielać kultury pochodnej przez więcej niż 30 pasażów.
12. Aby monitorować stabilność linii komórkowej w czasie, należy zweryfikować antagonistyczną i agonistyczną responsywność układu badawczego, czego można dokonać, przeprowadzając ocenę wartości  $\text{EC}_{50}$  lub  $\text{IC}_{50}$  wzorca referencyjnego. Ponadto należy monitorować indukcję względną próbki kontroli dodatniej (PC) i próbki kontroli ujemnej (NC). Wyniki powinny być zgodne z kryteriami dopuszczalności dotyczącymi agonistycznego (tabela 3C) lub antagonistycznego (tabela 4C) testu biologicznego z ekspresją aktywowanych chemicznie genów lucyferazy wrażliwych na działanie receptora estrogenowego alfa. W tabeli 1 (dla trybu agonistycznego) i 2 (dla trybu antagonistycznego) przedstawiono wzorce referencyjne, kontrole dodatnie i ujemne.

### **Kultura komórkowa i warunki posiewu**

13. Komórki U2OS należy hodować w substancji biogennej (pożywce DMEM/F12 (1:1) zawierającej czerwony fenol pełniący rolę wskaźnika pH, uzupełnionej bydlęcą surowicą płodową (7,5 %), nieegzogennymi aminokwasami (1 %), 10 jednostkami/ml penicyliny oraz markerem selekcyjnym w postaci streptomycyny i genotycyny (G418)). Komórki należy umieścić w inkubatorze  $\text{CO}_2$  (w atmosferze zawierającej 5 %  $\text{CO}_2$ ) w temperaturze  $37^{\circ}\text{C}$ , przy 100 % wilgotności. Kiedy komórki osiągną 85–95 % konfluencji, należy wysiać je na hodowlę wtórne albo przygotować do posiania w płytkach 96-dołkowych. W drugim przypadku komórki należy zawiesić ponownie w  $1 \times 10^5$  komórek/ml w pożywce testowej

wolnej od estrogenu (pożywce DMEM/F12 (1:1) niezawierającej czerwonego fenolu, uzupełnionej pokrytą dekstranem bydlęcą surowicą płodową poddaną działaniu węgla drzewnego (5 % obj./obj.), nieegzogennymi aminokwasami (1 % obj./obj.), 10 jednostkami/ml penicyliny i streptomycyny) oraz rozmieścić je w dołkach płytek 96-dołkowych (100  $\mu$ l homogenizowanej zawiesiny komórki). 24 godziny przed rozpoczęciem narażania komórki należy poddać wstępnej inkubacji w inkubatorze CO<sub>2</sub> (w atmosferze zawierającej 5 % CO<sub>2</sub>, w 37 °C, przy 100 % wilgotności). Wyroby wykonane z tworzywa sztucznego powinny być wolne od estrogenu.

### Kryteria dopuszczalności

14. Działania agonistyczne i antagonistyczne badanej substancji chemicznej lub badanych substancji chemicznych bada się w serii badań. Badanie składa się z maksymalnie sześciu mikropłytek. W skład każdej serii badań wchodzi co najmniej jedna seria rozcieńczeń wzorca referencyjnego, próbka kontroli dodatniej, próbka kontroli ujemnej oraz kontrole z rozpuszczalnikiem. Na rysunkach 1 i 2 przedstawiono układ płytek na potrzeby serii badań agonistycznych i antagonistycznych.
15. Każde rozcieńczenie wzorców referencyjnych, badanych substancji chemicznych, wszystkich kontroli z rozpuszczalnikiem oraz kontroli dodatnich i ujemnych należy trzykrotnie przeanalizować. Każda z tych analiz powinna spełniać wymagania określone w tabeli 3A i tabeli 4A.
16. Pomiar pełnej serii rozcieńczeń wzorca referencyjnego (w przypadku agonizmu – 17 $\beta$ -estradiolu; w przypadku antagonizmu – tamoksyfenu) przeprowadza się na pierwszej płytce podczas każdej serii badań. Aby umożliwić zestawienie wyników analizy pozostałych pięciu mikropłytek z pierwszą mikropłytką obejmującą pełną krzywą zależności stężenie-odpowiedź wzorca referencyjnego, wszystkie płytki powinny zawierać trzy próbki kontrolne: kontrolę z rozpuszczalnikiem, najwyższe stężenie badanego wzorca porównawczego oraz przybliżone stężenie EC<sub>50</sub> (w przypadku agonizmu) lub IC<sub>50</sub> (w przypadku antagonizmu) wzorca referencyjnego. Stosunek średnich próbek kontrolnych na pierwszej płytce do pozostałych pięciu płytek powinien spełniać warunki określone w tabeli 3C (agonizm) lub 4C (antagonizm).
17. Wskaźnik „z” oblicza się dla każdej z mikropłytek objętych serią badań (10). Wskaźnik „z” należy obliczyć, korzystając z reakcji w najwyższym i najniższym stężeniu wzorca referencyjnego. Mikropłytkę uznaje się za prawidłową, gdy spełnia wymagania określone w tabeli 3C (agonizm) lub 4C (antagonizm).
18. Wzorzec referencyjny powinien wykazać sygmoidalną krzywą zależności dawka-efekt. Wartości EC<sub>50</sub> lub IC<sub>50</sub> uzyskane z reakcji serii rozcieńczeń wzorca referencyjnego powinny spełniać wymagania określone w tabeli 3C (agonizm) lub 4C (antagonizm).

19. W skład każdej serii badań powinna wchodzić próbka kontroli dodatniej i próbka kontroli ujemnej. Obliczona względna indukcja zarówno próbki kontroli dodatniej, jak i ujemnej powinna spełniać minimalne wymagania określone w tabeli 3C (agonizm) lub 4C (antagonizm).
20. Podczas wszystkich obliczeń współczynnik sygnału najwyższego stężenia wzorca referencyjnego należy mierzyć, dzieląc średnią najwyższą reakcję względnej jednostki światła wzorca referencyjnego 17 $\beta$ -estradiolu przez średnią reakcję względnej jednostki światła kontroli z rozpuszczalnikiem referencyjnym. Ten współczynnik sygnału powinien spełniać minimalne wymagania krotności indukcji określone w tabeli 3C (agonizm) lub 4C (antagonizm).
21. Wyłącznie mikropłytki, które spełniają wszystkie wymienione powyżej kryteria dopuszczalności uznaje się za poprawne i można je wykorzystać do przeprowadzenia oceny w zakresie reakcji badanych substancji chemicznych.
22. Kryteria dopuszczalności mają zastosowanie zarówno do wstępnych serii badawczych, jak i do kompleksowych serii badawczych.

**Tabela 1:** Stężenia wzorca referencyjnego, kontroli dodatniej (PC) oraz kontroli ujemnej (NC) w odniesieniu do testu biologicznego z ekspresją aktywowanych chemicznie genów lucyferazy wrażliwych na działanie agonistyczne

|                        | Substancja                     | NR CAS  | Zakres badania (M)                            |
|------------------------|--------------------------------|---------|-----------------------------------------------|
| Wzorzec referencyjny   | 17 $\beta$ -estradiol          | 50-28-2 | 1,0*10 <sup>-13</sup> - 1,0*10 <sup>-10</sup> |
| Kontrola dodatnia (PC) | 17 $\alpha$ -metylotestosteron | 58-18-4 | 3,0*10 <sup>-06</sup>                         |
| Kontrola ujemna (NC)   | kortykosteron                  | 50-22-6 | 1,0*10 <sup>-08</sup>                         |

**Tabela 2:** Stężenia wzorca referencyjnego, kontroli dodatniej (PC) oraz kontroli ujemnej (NC) w odniesieniu do testu biologicznego z ekspresją aktywowanych chemicznie genów lucyferazy wrażliwych na działanie antagonistyczne

|                        | Substancja            | NR CAS     | Zakres badania (M)                            |
|------------------------|-----------------------|------------|-----------------------------------------------|
| Wzorzec referencyjny   | tamoksyfen            | 10540-29-1 | 3,0*10 <sup>-09</sup> - 1,0*10 <sup>-05</sup> |
| Kontrola dodatnia (PC) | 4-hydroksy-tamoksyfen | 68047-06-3 | 1,0*10 <sup>-09</sup>                         |
| Kontrola ujemna (NC)   | resweratrol           | 501-36-0   | 1,0*10 <sup>-05</sup>                         |

**Tabela 3:** Kryteria dopuszczalności agonistycznego testu biologicznego z ekspresją aktywowanych chemicznie genów lucyferazy wrażliwych na działanie receptora estrogenowego alfa

| A – poszczególne próbki na płytce                                              |                                                                                                                                                                                 | Kryterium                                   |
|--------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| 1                                                                              | Maksymalne % SD trzech dołków (w przypadku NC, PC, każdego rozcieńczenia badanej substancji chemicznej i wzorca referencyjnego,                                                 | < 15 %                                      |
| 2                                                                              | Maksymalne % SD trzech dołków (w przypadku wzorca referencyjnego oraz kontroli z rozpuszczalnikiem badanej substancji chemicznej (C0,                                           | < 30 %                                      |
| 3                                                                              | Maksymalna utrata dehydrogenazy mleczanowej jako wskaźnik autotoksyczności                                                                                                      | < 120 %                                     |
| B – w obrębie pojedynczej mikropłytki                                          |                                                                                                                                                                                 |                                             |
| 4                                                                              | Stosunek kontroli z rozpuszczalnikiem wzorca referencyjnego (C0; płytka 1) do kontroli z rozpuszczalnikiem badanej substancji chemicznej (SC;                                   | 0,5–2,0                                     |
| 5                                                                              | Stosunek przybliżonego EC50 i najwyższych stężeń wzorca referencyjnego na płytce 1 oraz przybliżonego EC50 i najwyższych stężeń wzorca referencyjnego na płytce 2 do x (C4, C8) | 0,70 do 1,30                                |
| 6                                                                              | Czynnik „Z” w przypadku każdej płytki                                                                                                                                           | > 0,6                                       |
| C – w ramach pojedynczej serii analiz (wszystkie płytki w ramach jednej serii) |                                                                                                                                                                                 |                                             |
| 7                                                                              | Krzywa sigmoidalna wzorca referencyjnego                                                                                                                                        | Tak (17β-estradiol)                         |
| 8                                                                              | Wzorzec referencyjny zakresu EC50 (17β-estradiol)                                                                                                                               | 4*10 <sup>-12</sup> – 4*10 <sup>-11</sup> M |
| 9                                                                              | Minimalna krotność indukcji najwyższego stężenia 17β-estradiolu w odniesieniu do kontroli z rozpuszczalnikiem wzorca referencyjnego.                                            | 5                                           |
| 10                                                                             | Indukcja względna (%) PC.                                                                                                                                                       | > 30 %                                      |
| 11                                                                             | Indukcja względna (%) NC                                                                                                                                                        | < 10 %                                      |

Przybliżony: w przybliżeniu; PC: kontrola dodatnia; NC: kontrola ujemna; SC: kontrola z rozpuszczalnikiem badanej substancji chemicznej; C0: kontrola z rozpuszczalnikiem wzorca referencyjnego; SD: odchylenie standardowe; LDH: dehydrogenaza mleczanowa

**Tabela 4:** Kryteria dopuszczalności antagonistycznego testu biologicznego z ekspresją aktywowanych chemicznie genów lucyferazy wrażliwych na działanie receptora estrogenowego alfa

| A – poszczególne próbki na płytce |                                                                                                                                                                    | Kryterium |
|-----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1                                 | Maksymalne % SD trzech dołków (w przypadku NC, PC, każdego rozcieńczenia badanej substancji chemicznej i wzorca referencyjnego, kontrola z rozpuszczalnikiem (C0)) | < 15 %    |
| 2                                 | Maksymalne % SD trzech dołków (w przypadku grupy kontrolnej                                                                                                        | < 30 %    |

nośnika (VC) i najwyższego stężenia wzorca referencyjnego (C8))

|   |                                                                             |         |
|---|-----------------------------------------------------------------------------|---------|
| 3 | Maksymalna utrata dehydrogenazy mleczanowej jako wskaźnik cytotoksyczności. | < 120 % |
|---|-----------------------------------------------------------------------------|---------|

#### **B – w obrębie pojedynczej mikropłytki**

|   |                                                                                                                                                                 |              |
|---|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 4 | Stosunek kontroli z rozpuszczalnikiem wzorca referencyjnego (C0; płytka 1) do kontroli z rozpuszczalnikiem badanej substancji chemicznej (SC; płytki od 2 do x) | 0,70 do 1,30 |
| 5 | Stosunek przybliżonego stężenia IC50 we wzorcu referencyjnym na płytce 1 do przybliżonego stężenia IC50 we wzorcu referencyjnym na płytkach od 2 do x (C4)      | 0,70 do 1,30 |
| 6 | Stosunek najwyższego stężenia wzorca referencyjnego na płytce 1 do najwyższego stężenia wzorca referencyjnego na płytkach od 2 do x (C8)                        | 0,50 do 2,0  |
| 7 | Czynnik „Z” w przypadku każdej płytki                                                                                                                           | > 0,6        |

#### **C – w ramach pojedynczej serii analiz (wszystkie płytki w ramach jednej serii)**

|    |                                                                                                                                   |                   |
|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| 8  | Krzywa sigmoidalna wzorca referencyjnego                                                                                          | Tak (Tamoksyfen)  |
| 9  | Wzorzec referencyjny zakresu IC50 (Tamoksyfen)                                                                                    | 1*10-8 – 1*10-7 M |
| 10 | Minimalna krotność indukcji kontroli z rozpuszczalnikiem wzorca referencyjnego w odniesieniu do najwyższego stężenia Tamoksyfenu. | 2,5               |
| 11 | Indukcja względna (%) PC.                                                                                                         | < 70 %            |
| 12 | Indukcja względna (%) NC                                                                                                          | > 85 %            |

Przybliżony: w przybliżeniu; PC: kontrola dodatnia; NC: kontrola ujemna; VC: grupa kontrolna nośnika (grupa kontrolna z rozpuszczalnikiem bez stałego stężenia wzorca referencyjnego agonisty); SC: kontrola z rozpuszczalnikiem badanej substancji chemicznej; C0: kontrola z rozpuszczalnikiem wzorca referencyjnego; SD: odchylenie standardowe; LDH: dehydrogenaza mleczanowa

### **Kontrola z rozpuszczalnikiem/nośnikiem, wzorce referencyjne, kontrole dodatnie, kontrole ujemne**

23. Zarówno w przypadku wstępnej serii badawczej, jak i kompleksowych serii badawczych należy stosować tę samą kontrolę z rozpuszczalnikiem/nośnikiem, te same wzorce referencyjne, kontrole dodatnie i kontrole ujemne. Ponadto stężenie wzorców referencyjnych, kontroli dodatnich i kontroli ujemnych powinno być takie samo.

#### *Kontrola z rozpuszczalnikiem*

24. Rozpuszczalnik stosowany do rozpuszczenia badanej substancji chemicznej należy zbadać jako kontrolę z rozpuszczalnikiem. Sufotlenek dimetylowy (DMSO, 1 % (obj./obj.); nr CAS 67-68-5) zastosowano jako nośnik podczas walidacji testu biologicznego z ekspresją aktywowanych chemicznie genów lucyferazy wrażliwych na działanie receptora estrogenowego alfa. Jeśli stosuje się rozpuszczalnik inny niż DMSO, wszystkie wzorce referencyjne, grupy kontrolne i badane substancje chemiczne należy zbadać w tym samym nośniku. Należy zauważyć, że kontrola z rozpuszczalnikiem dotycząca badań antagonistów obejmuje stałe stężenie wzorca referencyjnego agonisty – 17 $\beta$ -estradiolu (w przybliżeniu stężenie EC<sub>50</sub>). Aby zbadać rozpuszczalnik wykorzystany w badaniach antagonistów, należy przygotować i zbadać grupę kontrolną nośnika.

#### *Grupa kontrolna nośnika (antagonizm)*

25. W celu zbadania antagonizmu, pożywkę testową uzupełnia się o stałe stężenie wzorca referencyjnego agonisty – 17 $\beta$ -estradiolu (w przybliżeniu stężenie EC<sub>50</sub>). Aby zbadać rozpuszczalnik zastosowany do rozpuszczenia badanej substancji chemicznej w celu uzyskania antagonizmu, należy przygotować pożywkę testową bez stałego stężenia wzorca referencyjnego agonisty – 17 $\beta$ -estradiolu. Ta próbka kontrolna jest oznaczona jako kontrola nośnika. Sufotlenek dimetylowy (DMSO, 1 % (obj./obj.); nr CAS 67-68-5) zastosowano jako nośnik podczas walidacji testu biologicznego z ekspresją aktywowanych chemicznie genów lucyferazy wrażliwych na działanie receptora estrogenowego alfa. Jeśli stosuje się rozpuszczalnik inny niż DMSO, wszystkie wzorce referencyjne, grupy kontrolne i badane substancje chemiczne należy zbadać w tym samym nośniku.

#### *Wzorce referencyjne*

26. Wzorzec referencyjny agonisty to 17 $\beta$ -estradiol (tabela 1). Wzorce referencyjne składają się z serii rozcieńczeń ośmiu stężeń 17 $\beta$ -estradiolu ( $1,0 \cdot 10^{-13}$ ;  $3,0 \cdot 10^{-13}$ ;  $1,0 \cdot 10^{-12}$ ;  $3,0 \cdot 10^{-12}$ ;  $6,0 \cdot 10^{-12}$ ;  $1,0 \cdot 10^{-11}$ ;  $3,0 \cdot 10^{-11}$ ;  $1,0 \cdot 10^{-10}$  M).
27. Wzorzec referencyjny antagonisty to tamoksyfen (tabela 2). Wzorce referencyjne składają się z serii rozcieńczeń ośmiu stężeń tamoksyfenu ( $3,0 \cdot 10^{-9}$ ;  $1,0 \cdot 10^{-8}$ ;  $3,0 \cdot 10^{-8}$ ;  $1,0 \cdot 10^{-7}$ ;  $3,0 \cdot 10^{-7}$ ;  $1,0 \cdot 10^{-6}$ ;  $3,0 \cdot 10^{-6}$ ;  $1,0 \cdot 10^{-5}$  M). Każde stężenie wzorca referencyjnego antagonisty poddaje się inkubacji wspólnie ze stałym stężeniem wzorca referencyjnego agonisty – 17 $\beta$ -estradiolu ( $3,0 \cdot 10^{-12}$  M).



#### *Kontrola dodatnia*

28. Kontrola dodatnia w przypadku badań agonistów to 17 $\alpha$ -metylotestosteron (tabela 1).
29. Kontrola dodatnia w przypadku badań antagonistów to 4-hydroksy-tamoksyfen (tabela 2). Antagonistyczną kontrolę dodatnią poddaje się inkubacji wspólnie ze stałym stężeniem wzorca referencyjnego agonisty – 17 $\beta$ -estradiolu ( $3,0 \cdot 10^{-12}$  M).

#### *Kontrola ujemna*

30. Kontrola ujemna w przypadku badań agonistów to kortykosteron (tabela 1).
31. Kontrola ujemna w przypadku badań antagonistów to resweratrol (tabela 2). Antagonistyczną kontrolę ujemną poddaje się inkubacji wspólnie ze stałym stężeniem wzorca referencyjnego agonisty – 17 $\beta$ -estradiolu ( $3,0 \cdot 10^{-12}$  M).

Wykazanie biegłości laboratorium (zob. pkt 14 oraz tabela 3 i 4 w „ELEMENTY BADANIA AKTYWACJI TRANSKRYPCJI RECEPTORA ESTROGENOWEGO” niniejszej metody badawczej)

#### **Nośnik**

32. Rozpuszczalnik stosowany do rozpuszczenia badanej substancji chemicznej powinien całkowicie rozpuścić badaną substancję chemiczną i powinien być mieszalny z podłożem komórkowym. DMSO, woda i etanol (95–100 % czystości) to odpowiednie rozpuszczalniki. W przypadku gdy jako rozpuszczalnik stosuje się DMSO, maksymalne stężenie DMSO w trakcie inkubacji nie powinno przekroczyć 1 % (obj./obj.). Przed zastosowaniem należy zbadać rozpuszczalnik w kierunku braku cytotoksyczności i oddziaływania na efektywność testu.

#### **Przygotowanie wzorców referencyjnych, kontroli dodatnich, kontroli ujemnych i badanych substancji chemicznych**

33. Wzorce referencyjne, kontrole dodatnie, kontrole ujemne i badane substancje chemiczne rozpuszcza się w 100 % DMSO (lub właściwym rozpuszczalniku). Następnie należy przygotować właściwe stężenia (serię stężeń wzrastających w postępie geometrycznym) w tym samym rozpuszczalniku. Przed rozpuszczeniem należy pozwolić, aby temperatura wszystkich substancji wyrównała się z temperaturą pokojową. Świeżo przygotowane roztwory podstawowe wzorców referencyjnych, kontroli dodatnich, kontroli ujemnych i badanych substancji chemicznych nie powinny zawierać zauważalnego osadu ani nie powinny być mętne. Wzorzec referencyjny i roztwory kontrolne można przygotować w dużej ilości. Przed każdym doświadczeniem należy przygotowywać świeże roztwory podstawowe badanych substancji chemicznych. Do każdego doświadczenia należy przygotować świeże ostateczne rozcieńczenia wzorców referencyjnych, kontroli dodatnich, kontroli ujemnych i badanych substancji chemicznych i wykorzystać w ciągu 24 godzin od przygotowania.

### **Rozpuszczalność, cytotoksyczność i zakres dawkowania.**

34. We wstępnej serii badawczej określa się rozpuszczalność badanej substancji chemicznej w wybranym rozpuszczalniku. Przygotowuje się maksymalne stężenie roztworu wynoszące 0,1 M. W przypadku gdy to stężenie wykazuje problemy z rozpuszczalnością, należy przygotowywać roztwory podstawowe o niższym stężeniu, do czasu aż badane substancje chemiczne zostaną w pełni rozpuszczone. We wstępnej serii badawczej bada się serię stężeń badanej substancji chemicznej wzrastających w postępie geometrycznym w stosunku 1:10. Maksymalne stężenie próby w przypadku badania agonistów lub antagonistów wynosi 1 mM. Po przeprowadzeniu próby wstępnej określa się właściwy zawężony zakres czystego stężenia badanej substancji chemicznej, które należy zbadać w kompleksowych seriach badawczych. Stężenia wykorzystywane w badaniu kompleksowym powinny wynosić 1x, 3x, 10x, 30x, 100x, 300x, 1000x i 3000x.
35. Badanie cytotoksyczności zostało uwzględnione w protokole testów agonisty i antagonisty (11). Zarówno wstępna seria badawcza, jak i kompleksowe serie badawcze obejmują badanie cytotoksyczności. Metodą zastosowaną, aby ocenić cytotoksyczność podczas walidacji testu biologicznego z ekspresją aktywowanych chemicznie genów lucyferazy wrażliwych na działanie receptora estrogenowego alfa było badanie utraty dehydrogenazy mleczanowej (LDH) w połączeniu z jakościową kontrolą wzrokową komórek (zob. dodatek 4.1) po narażeniu na działanie badanych substancji chemicznych. Aby określić cytotoksyczność można zastosować jednak inne jakościowe metody (np. analizę kolometryczną opartą na MTT (test MTT) lub test biologiczny z ekspresją aktywowanych chemicznie genów lucyferazy wrażliwych na cytotoksyczność). Zasadniczo stężenia badanej substancji chemicznej wykazujące ponad 20 % zmniejszenie żywotności komórek uznaje się za cytotoksyczne i w związku z tym nie można ich wykorzystać do oceny danych. Jeżeli chodzi o badanie utraty LDH, stężenie badanej substancji chemicznej uważa się za cytotoksyczne, w przypadku gdy procentowa utrata LDH jest wyższa niż 120 %.

### **Narażenie na działanie badanej substancji chemicznej oraz organizacja płytki testowej**

36. Po przeprowadzeniu trypsynizacji kolby zlewającej się hodowli komórek, komórki ponownie zawiesza się w pożywce testowej wolnej od estrogenu w ilości  $1 \times 10^5$  komórek/ml. Sto  $\mu$ l ponownie zawieszonych komórek posiewa się na wewnętrznych dołkach płytki 96-dołkowej. Zewnętrzne dołki wypełnia się 200  $\mu$ l roztworem chlorku sodu buforowanym fosforanami (PBS) (zob. rysunek 1 i 2). Wysiane komórki poddaje się wstępnej inkubacji przez 24 godziny w inkubatorze CO<sub>2</sub> (w atmosferze zawierającej 5 % CO<sub>2</sub>, w 37°C, przy 100 % wilgotności).
37. Po wstępnej inkubacji płytki poddaje się kontroli w kierunku widocznej cytotoksyczności (zob. dodatek 4.1), skażenia i konfluencji. Do badania wykorzystuje się wyłącznie płytki wykazujące brak widocznej cytotoksyczności, skażenia i posiadające co najmniej 85 %

konfluencję. Usuwa się dokładnie podłoże z wewnętrznych dołków i zastępuje je 200  $\mu$ l pożywki testowej wolnej od estrogenu, zawierającej odpowiednie serie rozcieńczeń wzorców referencyjnych, badanych substancji chemicznych, kontroli dodatnich, kontroli ujemnych i kontroli z rozpuszczalnikiem (tabela 5: badanie agonisty; tabela 6: badanie antagonisty). Wszystkie wzorce referencyjne, badane substancje chemiczne, kontrole dodatnie, kontrole ujemne i kontrole z rozpuszczalnikiem bada się trzykrotnie. Na rysunku 1 przedstawiono rozkład na płytce służącej do badania agonisty. Na rysunku 2 przedstawiono rozkład na płytce służącej do badania antagonisty. Rozkład na płytce służącej do badania wstępnego i kompleksowego jest taki sam. W przypadku badania antagonisty wszystkie wewnętrzne dołki z wyjątkiem dołków grupy kontrolnej nośnika (VC) również zawierają stałe stężenie wzorca referencyjnego agonisty – 17 $\beta$ -estradiolu ( $3,0 \cdot 10^{-12}$  M). Należy zauważyć, że wzorce referencyjne C8 i C4 należy dodać do każdej płytki TC.

38. Po narażeniu komórek na działanie wszystkich substancji chemicznych płytki 96-dołkowe należy poddać wstępnej inkubacji przez kolejne 24 godziny w inkubatorze CO<sub>2</sub> (w atmosferze zawierającej 5 % CO<sub>2</sub>, w 37 °C, przy 100 % wilgotności).

**Rysunek 1: Rozkład na płytce w przypadku płytek 96-dołkowych służących do przeprowadzenia próby wstępnej i oceny wpływu agonistycznego.**

**Płytki 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 |   |    |       |       |       |       |       |       |       |       |    |    |

**Kolejne płytki**

|   | 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        |    |
| C |   | SC | TC2-1 | TC2-2 | TC2-3 | TC2-4 | TC2-5 | TC2-6 | TC2-7 | TC2-8 | C8        |    |
| D |   | SC | TC2-1 | TC2-2 | TC2-3 | TC2-4 | TC2-5 | TC2-6 | TC2-7 | TC2-8 | C8        |    |
| 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 = rozpuszczalnik wzorca referencyjnego.

C(1-8) = serie rozcieńczeń (1–8, od niskich do wysokich stężeń) wzorca referencyjnego.

PC = kontrola dodatnia.

NC = kontrola ujemna.

TCx-(1-8) = rozcieńczenia (1–8, od niskich do wysokich stężeń) badanej substancji chemicznej wykorzystywanej do przeprowadzenia wstępnej serii badawczej i oceny wpływu agonistycznego badanej substancji chemicznej x.

SC = kontrola z rozpuszczalnikiem badanej substancji chemicznej (optymalnie ten sam rozpuszczalnik co w przypadku C0, ale w miarę możliwości z innej partii).

Komórki oznaczone kolorem szarym: = Zewnętrzne dołki, wypełnione 200 µl PBS.

## Rysunek 2: Rozkład na płytce w przypadku płytek 96-dółkowych służących do przeprowadzenia antagonistycznej próby wstępnej i oceny wpływu antagonistycznego.

### Płytki 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 |   |    |      |       |       |    |       |      |      |      |    |    |

### Kolejne płytki

|   | 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 (maks.) |    |
| C |   | SC        | TC2-1 | TC2-2 | TC2-3 | TC2-4 | TC2-5 | TC2-6 | TC2-7 | TC2-8 | C8 (maks.) |    |
| D |   | SC        | TC2-1 | TC2-2 | TC2-3 | TC2-4 | TC2-5 | TC2-6 | TC2-7 | TC2-8 | C8 (maks.) |    |
| E |   | C4 (IC50) | TCx-1 | TCx-2 | TCx-3 | TCx-4 | TCx-5 | TCx-6 | TCx-7 | TCx-8 | C8 (maks.) |    |
| F |   | C4 (IC50) | TCx-1 | TCx-2 | TCx-3 | TCx-4 | TCx-5 | TCx-6 | TCx-7 | TCx-8 | C8 (maks.) |    |
| G |   | C4 (IC50) | TCx-1 | TCx-2 | TCx-3 | TCx-4 | TCx-5 | TCx-6 | TCx-7 | TCx-8 | C8 (maks.) |    |
| H |   |           |       |       |       |       |       |       |       |       |            |    |

C0 = rozpuszczalnik wzorca referencyjnego.

C(1-8) = serie rozcieńczeń (1–8, od niskich do wysokich stężeń) wzorca referencyjnego.

NC = kontrola ujemna.

PC = kontrola dodatnia.

TCx-(1-8) = rozcieńczenia (1–8, od niskich do wysokich stężeń) badanej substancji chemicznej wykorzystywanej do przeprowadzenia wstępnej serii badawczej i oceny wpływu agonistycznego badanej substancji chemicznej x.

SC = kontrola z rozpuszczalnikiem badanej substancji chemicznej (optymalnie ten sam rozpuszczalnik co w przypadku C0, ale w miarę możliwości z innej partii).

VC = grupa kontrolna nośnika (kontrola rozpuszczalnika bez stałego stężenia wzorca referencyjnego agonisty – 17β-estradolu).

Komórki oznaczone kolorem szarym: = Zewnętrzne dołki, wypełnione 200 µl PBS.

Uwaga: wszystkie wewnętrzne dołki z wyjątkiem dołków grupy kontrolnej nośnika (VC) również zawierają stałe stężenie wzorca referencyjnego agonisty – 17β-estradolu ( $3,0 \cdot 10^{-12}$  M)

## Pomiar luminescencji

39. Pomiar luminescencji szczegółowo opisano w protokole testu dotyczącego agonisty i antagonisty (10). Po 24 godzinach inkubacji należy usunąć podłoże z dołków i poddać

komórki procesowi lizy, aby otworzyć błonę komórkową i umożliwić dokonanie pomiaru aktywności lucyferazy.

40. Aby dokonać pomiaru luminescencji, procedura ta wymaga luminometra wyposażonego w 2 iniektory. Reakcję lucyferazy rozpoczyna się poprzez wstrzyknięcie substratu – lucyferyny. Reakcję przerywa się poprzez dodanie 0,2 M NaOH. Reakcję przerywa się, aby zapobiec przeniesieniu luminescencji z jednego dołka do drugiego.
41. Światło emitowane z każdego dołka wyraża się jako względną jednostkę światła (RLU) w przeliczeniu na dołek.

### **Wstępna seria badawcza**

42. Wyniki analizy wstępnej wykorzystuje się, aby określić zawężony zakres stężenia badanych substancji chemicznych służący do przeprowadzenia badania kompleksowego. Ocenę wyników analizy wstępnej i określenie zawężonego zakresu stężenia badanej substancji chemicznej służącej do przeprowadzenia badania kompleksowego szczegółowo opisano w protokole próby dotyczącej agonisty i antagonisty (10). Poniżej podano krótkie streszczenie procedur służących do określenia zakresu stężenia badanych substancji chemicznych służących do przeprowadzenia badania agonisty i antagonisty. Zob. tabela 5 i 6, aby zapoznać się z wytycznymi dotyczącymi planu serii stężeń wzrastających w postępie geometrycznym.

#### *Wybór stężeń do przeprowadzenia oceny wpływu agonistycznego*

43. We wstępnej serii badawczej należy zbadać badane substancje chemiczne, wykorzystując serię rozcieńczeń zgodnie z tabelą 5 (agonista) i 6 (antagonista). Wszystkie stężenia należy zbadać w trzech dołkach zgodnie z rozkładem na płytce wskazanym na rysunku 1 (agonista) lub 2 (antagonista).
44. Wyłącznie wyniki analizy, które spełniają kryteria dopuszczalności (tabela 3) uznaje się za poprawne i można je wykorzystać do przeprowadzenia oceny w zakresie reakcji badanych substancji chemicznych. W przypadku gdy jedna mikropłytkę lub większa ich liczba w serii analiz nie spełnia kryteriów dopuszczalności, odpowiednie mikropłytki należy ponownie poddać analizie. W przypadku gdy pierwsza płytka zawierająca całą serię rozcieńczeń wzorca referencyjnego nie spełni kryteriów dopuszczalności, konieczne jest ponowne poddanie analizie całej serii badań (6 płytek).
45. Należy dostosować zakresy stężenia początkowego badanych substancji chemicznych i powtórzyć wstępną serię badawczą, w przypadku gdy:
  - zaobserwowano cytotoksyczność. Należy powtórzyć wstępną procedurę przy niższych niecytotoksycznych stężeniach badanej substancji chemicznej;

- próba wstępna badanych substancji chemicznych nie wykazuje pełnej krzywej dawka-efekt, ponieważ badane stężenia generują maksymalną indukcję. Należy powtórzyć wstępną serię badawczą, stosując niższe stężenia badanej substancji chemicznej.
46. Jeśli zaobserwowano poprawną zależność dawka-odpowiedź, należy wybrać (najniższe) stężenie, w przypadku którego obserwuje się maksymalną indukcję, i które nie wykazuje cytotoksyczności. Najwyższe stężenie badanej substancji chemicznej, która ma zostać zbadana w kompleksowych seriach badawczych, powinno być 3 razy wyższe niż przedmiotowe wybrane stężenie.
47. Całą serię czystych rozcieńczeń badanej substancji chemicznej należy przygotować zgodnie z etapami rozcieńczania wskazanymi w tabeli 5, rozpoczynając od najwyższego stężenia, jak określono powyżej.
48. Badaną substancję chemiczną, która nie wykazuje wpływu agonistycznego należy zbadać w kompleksowych seriach badawczych, rozpoczynając od najwyższego, niecytotoksycznego stężenia określonego we wstępnej serii badawczej.

*Wybór stężeń do przeprowadzenia oceny wpływu antagonistycznego*

49. Wyłącznie wyniki analizy, które spełniają kryteria dopuszczalności (tabela 4) uznaje się za poprawne i można je wykorzystać do przeprowadzenia oceny w zakresie reakcji badanych substancji chemicznych. W przypadku gdy jedna mikropłytką lub większa ich liczba w serii analiz nie spełnia kryteriów dopuszczalności, odpowiednie mikropłytki należy ponownie poddać analizie. W przypadku gdy pierwsza płytka zawierająca całą serię rozcieńczeń wzorca referencyjnego nie spełni kryteriów dopuszczalności, konieczne jest ponowne poddanie analizie całej serii badań (6 płytek).
50. Należy dostosować zakresy stężenia początkowego badanych substancji chemicznych i powtórzyć wstępną serię badawczą, w przypadku gdy:
- zaobserwowano cytotoksyczność. Należy powtórzyć wstępną procedurę przy niższych niecytotoksycznych stężeniach badanej substancji chemicznej,
  - próba wstępna badanych substancji chemicznych nie wykazuje pełnej krzywej dawka-efekt, ponieważ badane stężenia generują maksymalną inhibicję. Należy powtórzyć próbę wstępną, stosując niższe stężenia badanej substancji chemicznej.
51. Jeśli stwierdzono poprawną zależność dawka-odpowiedź, należy wybrać (najniższe) stężenie, w przypadku którego obserwuje się maksymalną inhibicję, i które nie wykazuje cytotoksyczności. Najwyższe stężenie badanej substancji chemicznej, która ma zostać zbadana w kompleksowych seriach badawczych, powinno być 3 razy wyższe niż przedmiotowe wybrane stężenie.

52. Całą serię czystych rozcieńczeń badanej substancji chemicznej należy przygotować zgodnie z etapami rozcieńczania wskazanymi w tabeli 6, rozpoczynając od najwyższego stężenia, jak określono powyżej.
53. Badane substancje chemiczne, które nie wykazują wpływu antagonistycznego należy zbadać w kompleksowych seriach badawczych, rozpoczynając od najwyższego, niecytotoksycznego stężenia badanego we wstępnej serii badawczej.

### Kompleksowe serie badawcze

54. Po dokonaniu wyboru zawężonych zakresów stężenia należy kompleksowo zbadać badane substancje chemiczne, wykorzystując serię rozcieńczeń zgodnie z tabelą 5 (agonista) i 6 (antagonista). Wszystkie stężenia należy zbadać w trzech dołkach zgodnie z rozkładem na płycie wskazanym na rysunku 1 (agonista) lub 2 (antagonista).
55. Wyłącznie wyniki analizy, które spełniają kryteria dopuszczalności (tabela 3 i 4) uznaje się za poprawne i można je wykorzystać do przeprowadzenia oceny w zakresie reakcji badanych substancji chemicznych. W przypadku gdy jedna mikropłytkę lub większa ich liczba w serii analiz nie spełnia kryteriów dopuszczalności, odpowiednie mikropłytki należy ponownie poddać analizie. W przypadku gdy pierwsza płytka zawierająca całą serię rozcieńczeń wzorca referencyjnego nie spełni kryteriów dopuszczalności, konieczne jest ponowne poddanie analizie całej serii badań (6 płytek).

**Tabela 5:** Stężenie i rozcieńczenia wzorców referencyjnych, kontroli i badanych substancji chemicznych stosowanych do przeprowadzenia badania agonisty

| Wzorzec porównawczy<br>– 17β-estradiol<br>stężenie (M) |                       | TCx – wstępna seria<br>badawcza<br>rozcieńczenie |                 | TCx – kompleksowa<br>seria badawcza<br>rozcieńczenie |         | Kontrole<br>stężenie (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*10 <sup>-12</sup> | TCx-5                                            | 1 000 x         | TCx-5                                                | 30 x    |                          |                       |
| C5                                                     | 6,0*10 <sup>-12</sup> | TCx-6                                            | 100 x           | TCx-6                                                | 10 x    |                          |                       |
| C6                                                     | 1,0*10 <sup>-11</sup> | TCx-7                                            | 10 x            | TCx-7                                                | 3 x     |                          |                       |
| C7                                                     | 3,0*10 <sup>-11</sup> | TCx-8                                            | 1 x             | TCx-8                                                | 1 x     |                          |                       |
| C8                                                     | 1,0*10 <sup>-10</sup> |                                                  |                 |                                                      |         |                          |                       |

TCx – badana substancja chemiczna x

PC – kontrola dodatnia (17α-metylotestosteron)

NC – kontrola ujemna (kortykosteron)

C0 – kontrola z rozpuszczalnikiem wzorca referencyjnego

SC – kontrola z rozpuszczalnikiem badanej substancji chemicznej

**Tabela 6:** Stężenie i rozcieńczenia wzorców referencyjnych, kontroli i badanych substancji chemicznych stosowanych do przeprowadzenia badania antagonisty

| Wzorzec porównawczy<br>– tamoksyfen<br>stężenie (M) |                       | TCx – wstępna seria<br>badawcza<br>rozcieńczenie |                 | TCx – kompleksowa<br>seria badawcza<br>rozcieńczenie |         | Kontrole<br>stężenie (M)                    |                       |
|-----------------------------------------------------|-----------------------|--------------------------------------------------|-----------------|------------------------------------------------------|---------|---------------------------------------------|-----------------------|
| C0                                                  | 0                     | TCx-1                                            | 10 000 000<br>x | TCx-1                                                | 3 000 x | PC                                          | 1,0*10 <sup>-09</sup> |
| C1                                                  | 3,0*10 <sup>-09</sup> | TCx-2                                            | 1 000 000<br>x  | TCx-2                                                | 1 000 x | NC                                          | 1,0*10 <sup>-05</sup> |
| C2                                                  | 1,0*10 <sup>-08</sup> | TCx-3                                            | 100 000 x       | TCx-3                                                | 300 x   | C0                                          | 0                     |
| C3                                                  | 3,0*10 <sup>-08</sup> | TCx-4                                            | 10 000 x        | TCx-4                                                | 100 x   | SC                                          | 0                     |
| C4                                                  | 1,0*10 <sup>-07</sup> | TCx-5                                            | 1 000 x         | TCx-5                                                | 30 x    | <b>Wzbogacony agonista<br/>stężenie (M)</b> |                       |
| C5                                                  | 3,0*10 <sup>-07</sup> | TCx-6                                            | 100 x           | TCx-6                                                | 10 x    |                                             |                       |
| C6                                                  | 1,0*10 <sup>-06</sup> | TCx-7                                            | 10 x            | TCx-7                                                | 3 x     |                                             |                       |
| C7                                                  | 3,0*10 <sup>-06</sup> | TCx-8                                            | 1 x             | TCx-8                                                | 1 x     | 17β-<br>estradiol                           | 3,0*10 <sup>-12</sup> |
| C8                                                  | 1,0*10 <sup>-05</sup> |                                                  |                 |                                                      |         |                                             |                       |

TCx – badana substancja chemiczna x

PC – kontrola dodatnia (4-hidroksy-tamoksyfen)

NC – kontrola ujemna (resweratrol)

C0 – kontrola z rozpuszczalnikiem wzorca referencyjnego

SC – kontrola z rozpuszczalnikiem badanej substancji chemicznej

VC – grupa kontrolna nośnika (nie zawiera stałego stężenia wzorca referencyjnego agonisty – 17β-estradiolu (3,0\*10<sup>-12</sup> M))

## Gromadzenie i analiza danych

56. Po przeprowadzeniu wstępnej serii badawczej i kompleksowych serii badawczych należy określić EC<sub>10</sub>, EC<sub>50</sub>, PC<sub>10</sub>, PC<sub>50</sub> i maksymalną indukcję (TC<sub>max</sub>) badanej substancji chemicznej służącej do przeprowadzenia badania agonisty. Do celów przeprowadzenia badania antagonisty należy obliczyć IC<sub>20</sub>, IC<sub>50</sub>, PC<sub>80</sub>, PC<sub>50</sub> i minimalną indukcję (TC<sub>xmin</sub>). Na rysunku 3 (agonista) i 4 (antagonista) podano graficzne przedstawienie tych parametrów. Wymagane parametry oblicza się na podstawie indukcji względnej każdej badanej substancji chemicznej (od względnej do maksymalnej indukcji wzorca referencyjnego (= 100 %)). Do celów przeprowadzenia oceny danych należy zastosować regresję nieliniową (zmienne nachylenie, 4 parametry) zgodnie z poniższym równaniem:

$$Y = Dól + \frac{(Góra - Dól)}{(1 + 10^{((lgEC_{50} - X) * Nachylenie)})}$$

gdzie:

X = Logarytm dawkowania lub stężenia

Y = Reakcja (indukcja względna (%))

Góra = Maksymalna indukcja (%)

Dół = Minimalna indukcja (%)

LogEC<sub>50</sub> = Logarytm stężenia, w przypadku którego obserwuje się 50 % maksymalnej reakcji



Nachylenie = Współczynnik nachylenia krzywej Hilla

57. Dane surowe z luminometra, wyrażone jako względna jednostka światła (RLU) należy przenieść do arkusza kalkulacyjnego analizy danych opracowanego do celów wstępnej serii badawczej i kompleksowych serii badawczych. Dane surowe powinny spełniać kryteria dopuszczalności wskazane w tabeli 3A i 3B (agonista) lub 4A i 4B (antagonista). W przypadku gdy dane surowe spełniają kryteria dopuszczalności, przeprowadza się następujące etapy obliczeń, aby określić wymagane parametry:

#### Agonizm

- Odjąć średnią RLU kontroli z rozpuszczalnikiem wzorca porównawczego od wszelkich surowych danych uzyskanych w wyniku analizy wzorców referencyjnych.
- Odjąć średnią RLU kontroli z rozpuszczalnikiem badanej substancji chemicznej od wszelkich surowych danych uzyskanych w wyniku analizy badanych substancji chemicznych.
- Obliczyć indukcję względną każdego stężenia wzorca referencyjnego. Ustalić indukcję najwyższego stężenia wzorca referencyjnego na 100 %.
- Obliczyć indukcję względną każdego stężenia badanej substancji chemicznej w porównaniu z najwyższym stężeniem wzorca referencyjnego jako 100 %.
- Przeprowadzić ocenę wyników analizy zgodnie z regresją nieliniową (zmienne nachylenie, 4 parametry).
- Określić  $EC_{50}$  i  $EC_{10}$  wzorca referencyjnego.
- Określić  $EC_{50}$  i  $EC_{10}$  badanych substancji chemicznych.
- Określić maksymalną względną indukcję badanej substancji chemicznej ( $TC_{max}$ ).
- Określić  $PC_{10}$  i  $PC_{50}$  badanych substancji chemicznych.

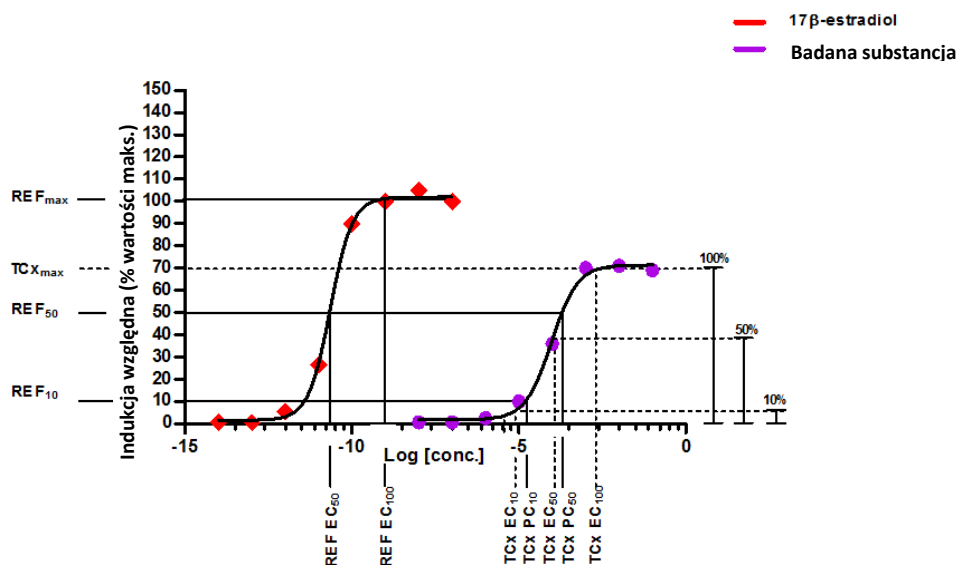
W przypadku badanej substancji chemicznej możliwe jest, że pełna krzywa dawka-efekt nie zawsze zostanie uzyskana, np. ze względu na cytotoksyczność lub problemy z rozpuszczalnością. W związku z tym nie można określić  $EC_{50}$ ,  $EC_{10}$  i  $PC_{50}$ . W takich przypadkach można określić jedynie  $PC_{10}$  i  $TC_{max}$ .

#### Antagonizm

- Odjąć średnią RLU kontroli z najwyższego stężenia wzorca referencyjnego od wszelkich surowych danych uzyskanych w wyniku analizy wzorców referencyjnych.
- Odjąć średnią RLU kontroli z najwyższego stężenia wzorca referencyjnego od wszelkich surowych danych uzyskanych w wyniku analizy badanych substancji chemicznych.

- Obliczyć indukcję względną każdego stężenia wzorca referencyjnego. Ustalić indukcję najniższego stężenia wzorca referencyjnego na 100 %.
- Obliczyć indukcję względną każdego stężenia badanej substancji chemicznej w porównaniu z najniższym stężeniem wzorca referencyjnego jako 100 %.
- Przeprowadzić ocenę wyników analizy zgodnie z regresją nieliniową (zmienne nachylenie, 4 parametry).
- Określić  $IC_{50}$  i  $IC_{20}$  wzorca referencyjnego.
- Określić  $IC_{50}$  i  $IC_{20}$  badanych substancji chemicznych.
- Określić minimalną względną indukcję badanej substancji chemicznej ( $TC_{min}$ ).
- Określić  $PC_{80}$  i  $PC_{50}$  badanych substancji chemicznych.

**Rysunek 3:** Przegląd parametrów określonych w teście agonisty



$EC_{10}$  = stężenie substancji, przy którym obserwuje się 10 % jej maksymalnej reakcji.

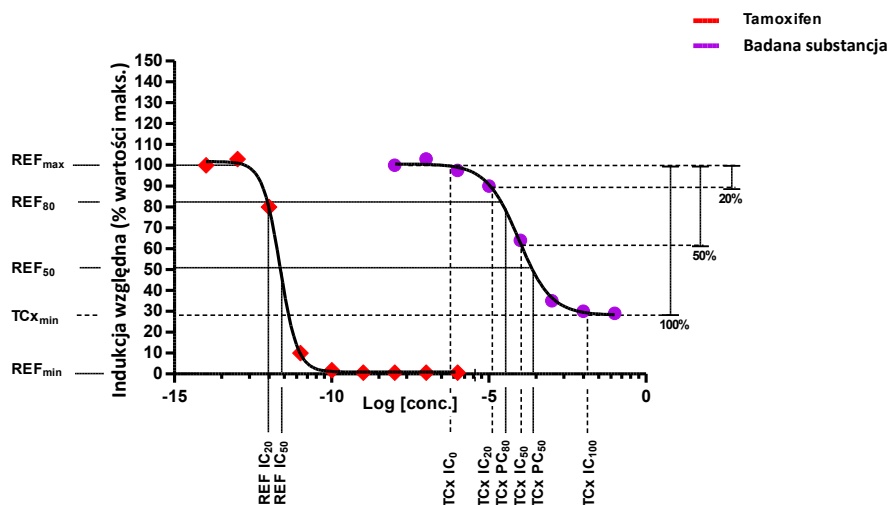
$EC_{50}$  = stężenie substancji, przy którym obserwuje się 50 % jej maksymalnej reakcji.

$PC_{10}$  = stężenie badanej substancji chemicznej, przy którym jej reakcja jest równa  $EC_{10}$  wzorca referencyjnego.

$PC_{50}$  = stężenie badanej substancji chemicznej, przy którym jej reakcja jest równa  $EC_{50}$  wzorca referencyjnego.

$TCX_{max}$  = maksymalna indukcja względna badanej substancji chemicznej.

**Rysunek 4:** Przegląd parametrów określonych w teście antagonisty



IC20 = stężenie substancji, przy którym obserwuje się 80 % jej maksymalnej reakcji (20 % inhibicji).

IC50 = stężenie substancji, przy którym obserwuje się 50 % jej maksymalnej reakcji (50 % inhibicji).

PC80 = stężenie badanej substancji chemicznej, przy którym jej reakcja jest równa IC20 wzorca referencyjnego.

PC50 = stężenie badanej substancji chemicznej, przy którym jej reakcja jest równa IC50 wzorca referencyjnego.

TCx<sub>min</sub> = minimalna indukcja względna badanej substancji chemicznej.

W przypadku badanej substancji chemicznej możliwe jest, że pełna krzywa dawka-efekt nie zawsze zostanie uzyskana, np. ze względu na cytotoksyczność lub problemy z rozpuszczalnością. W związku z tym można określić IC<sub>50</sub>, IC<sub>20</sub> i PC<sub>50</sub>. W takich przypadkach można określić jedynie PC<sub>20</sub> i TC<sub>min</sub>.

58. Wyniki powinny opierać się na dwóch (lub trzech) niezależnych seriach badawczych. Jeżeli dwie serie badawcze dają porównywalne i tym samym odtwarzalne wyniki, nie jest konieczne wykonywanie trzeciej serii. Aby wyniki zostały dopuszczone, powinny:

- spełniać kryteria dopuszczalności (zob. kryteria dopuszczalności pkt 14–22),
- być powtarzalne.

### Kryteria interpretacji danych

59. Do celów interpretacji danych i podjęcia decyzji, czy badaną substancję chemiczną uznaje się za dodatnią lub ujemną stosuje się następujące kryteria:

Agonizm

W przypadku każdej kompleksowej serii badawczej badaną substancję chemiczną uznaje się za **dodatnią**, jeśli:

- 1  $TC_{max}$  jest równe 10 % maksymalnej reakcji wzorca referencyjnego ( $REF_{10}$ ) lub je przekracza.
- 2 Co najmniej 2 kolejne stężenia badanej substancji chemicznej są równe  $REF_{10}$  lub je przekraczają.

W przypadku każdej kompleksowej serii badawczej badaną substancję chemiczną uznaje się za **ujemną**, jeśli:

- 1  $TC_{max}$  nie przekracza 10 % maksymalnej reakcji wzorca referencyjnego ( $REF_{10}$ ).
- 2 Mniej niż 2 kolejne stężenia badanej substancji chemicznej są równe  $REF_{10}$  lub je przekraczają.

#### Antagonizm

W przypadku każdej kompleksowej serii badawczej badaną substancję chemiczną uznaje się za **dodatnią**, jeśli:

- 1  $TC_{min}$  jest równe lub niższe niż 80 % maksymalnej reakcji wzorca referencyjnego ( $REF_{80} = 20$  % inhibicji).
- 2 Co najmniej 2 kolejne stężenia badanej substancji chemicznej są równe lub niższe niż  $REF_{80}$ .

W przypadku każdej kompleksowej serii badawczej badaną substancję chemiczną uznaje się za **ujemną**, jeśli:

- 1  $TC_{min}$  przekracza 80 % maksymalnej reakcji wzorca referencyjnego ( $REF_{80} = 20$  % inhibicji).
- 2 Mniej niż 2 kolejne stężenia badanej substancji chemicznej są równe lub niższe niż  $REF_{80}$ .

60. Aby scharakteryzować siłę działania reakcji dodatniej badanej substancji chemicznej należy zgłosić wielkość wpływu (agonista:  $TC_{max}$ ; antagonist:  $TC_{min}$ ) oraz stężenie, przy którym nastąpił wpływ (agonista:  $EC_{10}$ ,  $EC_{50}$ ,  $PC_{10}$ ,  $PC_{50}$ ; antagonist:  $IC_{20}$ ,  $IC_{50}$ ,  $PC_{80}$ ,  $PC_{50}$ ).

#### SPRAWOZDANIE Z BADANIA

61. Zob. pkt 20 dotyczący „ELEMENTÓW BADANIA AKTYWACJI TRANSKRYPCJI RECEPTORA ESTROGENOWEGO”.

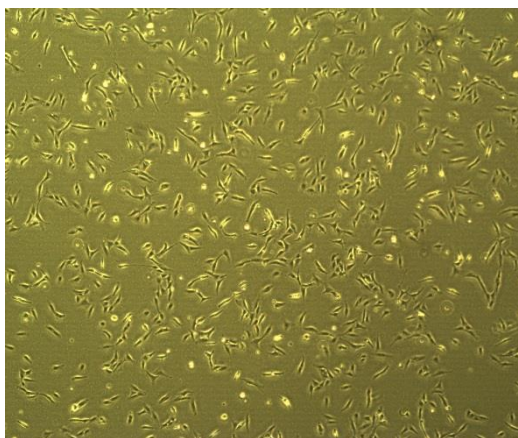
## BIBLIOGRAFIA

- (1) OECD (2016). *Draft Validation report of the (anti-) ER $\alpha$  CALUX bioassay - transactivation bioassay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential*. [W:] Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 240. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.
- (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.*” nr 83(1), s. 136–148.
- (3) Quaedackers ME, van den Brink CE, Wissink S, Schreurs RHMM, Gustafsson JA, van der Saag PT, i van der Burg B. (2001). *4-Hydroxytamoxifen trans-represses nuclear factor- $\kappa$ B Activity in human osteoblastic U2OS cells through estrogen receptor (ER) $\alpha$  and not through ER $\beta$* , „*Endocrinology*” nr 142(3), s. 1156–1166.
- (4) Thorne N, Inglese J i Auld DS. (2010). *Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology*, [W:] „*Chemistry and Biology*” nr 17(6), s. 646–57.
- (5) Escande A, Pillon A, Servant N, Cravedi JP, Larrea F, Muhn P, Nicolas JC, Cavaillès V i Balaguer P. (2006). *Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta*, „*Biochem. Pharmacol.*” nr 71, s. 1459–1469.
- (6) Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B i Gustafsson JA. (1998). *Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta*, „*Endocrinol.*” nr 139, s. 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.*” nr 122, s. 204–211.
- (8) Sonneveld E, Riteco JAC, Jansen HJ, Pieterse B, Brouwer A, Schoonen WG, i van der Burg B. (2006). *Comparison of in vitro and in vivo screening models for androgenic and estrogenic activities*, „*Toxicol. Sci.*” nr 89(1), s. 173–187.
- (9) Kobayashi H, Yamamoto K, Eguchi M, Kubo M, Nakagami S, Wakisaka S, Kaizuka M i Ishii H. (1995). *Rapid detection of mycoplasma*

*contamination in cell cultures by enzymatic detection of polymerase chain reaction (PCR) products.* „J. Vet. Med. Sci.” nr 57(4), s. 769–771.

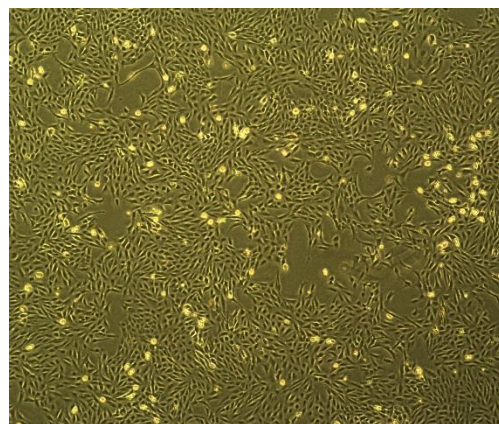
- (10) Zhang J-H, Chung TDY i Oldenburg KR. (1999). *A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throuphut screening assays*, „J. Biomol. Scr.” nr 4, s. 67–73.
- (11) Besselink H, Middelhof I, i Felzel, E. (2014). *Transactivation assay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential using ER $\alpha$  CALUX cells*, BioDetection Systems BV (BDS), Amsterdam, Niderlandy.

#### **Dodatek 4.1: Kontrola wzrokowa żywotności komórek**



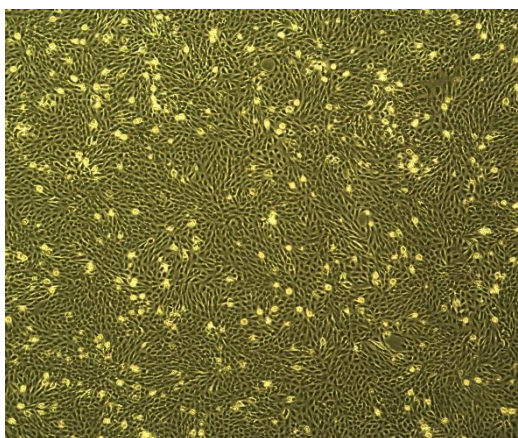
< 5 % konfluencji. Komórki zostały niedawno posiane. 100 % żywotności komórek.

Klasyfikacja: „brak cytotoksyczności”



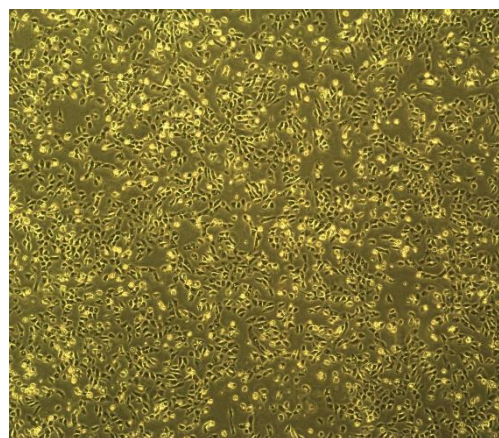
> 85 % konfluencji. Na tym etapie komórki poddaje się działaniu badanych substancji chemicznych. > 95 % żywotności komórek.

Klasyfikacja: „brak cytotoksyczności”

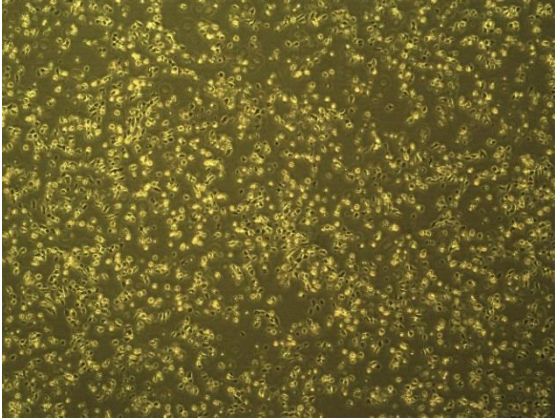


> 95 % konfluencji. Komórki są gęsto rozmieszczone i zaczynają się rozrastać. > 95 % żywotności komórek.

Klasyfikacja: „brak cytotoksyczności”



< 25 % żywotności komórek. Komórki zaczynają się oddzielać i styczność między komórkami spada. Komórki są zaokrąglone. Klasyfikacja: „cytotoksyczność”



< 5 % żywotności komórek. Komórki są w pełni rozdzielone i styczność między komórkami jest przerwana. Komórki są zaokrąglone. Klasyfikacja: „cytotoksyczność”



## **B.67 TESTY MUTACJI GENOWYCH NA KOMÓRKACH SSAKÓW *IN VITRO* Z WYKORZYSTANIEM GENU KINAZY TYMIDYNOWEJ**

### **WPROWADZENIE**

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD nr 490 (2016). Metody badawcze są okresowo poddawane przeglądowi i zmianom w związku z postępem naukowym, potrzebami regulacyjnymi i dobrostanem zwierząt. Początkowo test na mysich chłoniakach i test TK6 z wykorzystaniem locusu kinazy tymidynowej wchodziły w skład metody badawczej B.17. Następnie grupa robocza ekspertów ds. badania mysich chłoniaków międzynarodowych warsztatów z badań genotoksycznych (IWGT) opracowała zharmonizowane na szczeblu międzynarodowym zalecenia w zakresie kryteriów dopuszczalności testu oraz interpretacji danych dotyczących badania mysich chłoniaków (1)(2)(3)(4)(5) i zalecenia te włączono do niniejszej nowej metody badawczą B.67. Niniejszą metodę badawczą opisano w odniesieniu do badania mysich chłoniaków, a ponieważ wykorzystuje również locus TK, także badania TK6. Mimo że badanie mysich chłoniaków stosowano w dużym zakresie do celów regulacyjnych, TK6 stosowano znacznie rzadziej. Należy zauważyć, że pomimo podobieństwa między punktami końcowymi te dwie linie komórkowe nie są zamienne i w programach regulacyjnych można prawomocnie wyrazić preferencję w stosunku do jednej w odniesieniu do określonego zastosowania regulacyjnego. Na przykład w ramach walidacji badania mysich chłoniaków wykazano, że jest ono odpowiednie do wykrycia nie tylko mutacji genowej, ale również zdolności badanej substancji chemicznej do wywoływania strukturalnej aberracji chromosomowej. Niniejsza metoda badawcza stanowi część cyklu metod badawczych dotyczących toksykologii genetycznej. OECD opracowała dokument, który zawiera zwięzłe informacje na temat badań w zakresie toksykologii genetycznej oraz przegląd najnowszych zmian, jakie wprowadzono do wytycznych OECD dotyczących badań w zakresie toksykologii genetycznej (6).
2. Celem testów mutacji genowych na komórkach ssaków *in vitro* jest wykrycie mutacji genowych wywołanych przez substancje chemiczne. Linie komórkowe wykorzystane w tych badaniach mierzą mutacje pierwotne w genach reporterowych, w szczególności w endogennym genie kinazy tymidynowej (*TK* w odniesieniu do komórek ludzkich i *Tk* w przypadku komórek gryzoni, które w niniejszej metodzie badawczej zbiorczo nazywa się *TK*). Niniejsza metoda badawcza jest przeznaczona do stosowania dwóch linii komórkowych: linii komórkowej mysiego chłoniaka L5178Y TK<sup>+/-</sup>-3.7.2C (ogólnie nazywanej L5178Y) oraz linii komórkowej ludzkiej komórki limfoblastycznej TK6 (ogólnie nazywanej TK6). Chociaż te dwie linie komórkowe różnią się z powodu swojego pochodzenia, wzrostu komórki, statusu p-53 itp. badania

mutacji genowej *TK* można przeprowadzać w podobny sposób w obu rodzajach komórek, jak opisano w niniejszej metodzie badawczej.

3. Autosomalny i heterozygotyczny charakter genu kinazy tymidynowej umożliwia wykrycie żywotnych kolonii, których komórki wykazują niedobór enzymu kinazy tymidynowej w następstwie mutacji z  $TK^{+/-}$  do *TK*. Niedobór ten może wynikać ze zdarzeń genetycznych wpływających na gen *TK*, w tym zarówno mutacji genowych (mutacji punktowej, mutacji zmiany fazy odczytu, niewielkich delecji itp.), jak i zdarzeń chromosomowych (dużych delecji, rearanżacji chromosomów i rekombinacji mitotycznej). Zdarzenia chromosomowe wyraża się jako utratę heterozygotyczności, co stanowi powszechną zmianę genetyczną antyonkogenów w ludzkiej onkogenezie. Teoretycznie utratę całego chromosomu zawierającego gen *TK* wynikającą z uszkodzenia wrzeciona lub mitotycznej nondysjunkcji można wykryć w badaniu mysich chłoniaków. W rzeczywistości połączenie cytogenetycznej i molekularnej analizy wyraźnie wykazuje, że niektóre mutanty kinazy tymidynowej w badaniu mysich chłoniaków są wynikiem nondysjunkcji. Waga dowodów wykazuje jednak, że w ramach badania mutacji genowej *TK* nie można skutecznie wykryć aneugenów, stosując standardowe kryteria cytotoksyczności (jak opisano w niniejszej metodzie badawczej) i w związku z tym stosowanie tych badań w celu wykrycia aneugenów nie jest właściwe (7)(8)(9).
4. W ramach badań mutacji genowej *TK* generuje się dwie różne fenotypowe klasy mutacji *TK*; mutanty rozwijające się zwyczajnie, rozwijające się w tym samym tempie co heterozygotyczne komórki kinazy tymidynowej oraz mutanty rozwijające się powoli, które rozwijają się przy wydłużonym czasie podwojenia. W badaniu mysich chłoniaków mutanty rozwijające się zwyczajnie i mutanty rozwijające się powoli uznaje się za mutanty dużych i małych kolonii oraz za mutanty wcześnie i późno pojawiających się kolonii w badaniu *TK6*. Charakter cytogenetyczny oraz charakter budowy cząsteczkowej mutantów badania mysich chłoniaków, zarówno małych, jak i dużych kolonii, został szczegółowo zbadany (8)(10)(11)(12)(13). Charakter cytogenetyczny oraz charakter budowy cząsteczkowej wcześnie i późno pojawiających się mutantów *TK6* również obszernie zbadano (14)(15)(16)(17). Mutanty rozwijające się powoli w przypadku obu rodzajów komórek doznały uszkodzenia genetycznego obejmującego rzekome geny regulujące wzrost w pobliżu locusu *TK*, co skutkuje wydłużonym czasem podwojenia oraz utworzeniem się późno pojawiających się lub małych kolonii (18). Indukcję mutantów rozwijających się powoli przypisuje się substancjom chemicznym, które powodują duże zmiany strukturalne na poziomie chromosomów. Komórki, których uszkodzenie nie obejmuje rzekomych genów regulujących wzrost w pobliżu locusu *TK* rozwijają się w tempie podobnym do komórek macierzystych i stają się mutantami rozwijającymi się zwyczajnie. Indukcję mutantów głównie rozwijających się zwyczajnie przypisuje się

substancjom chemicznym działającym przede wszystkim jako mutageny powodujące mutację punktową. W związku z tym istotne jest policzenie zarówno mutantów rozwijających się powoli, jak i mutantów rozwijających się zwyczajnie, aby wykryć wszystkie mutanty i dostarczyć informacji na temat rodzajów uszkodzenia (mutagenów i klastogenów) wywołanego przez badaną substancję chemiczną (10)(12)(18)(19).

5. Metodę badawczą równoważną wytycznej dotyczącej badań zorganizowano w taki sposób, aby dostarczyć ogólnych informacji mających zastosowanie zarówno do badania mysich chłoniaków, jak i badania TK6 oraz zapewnić specjalistyczne wytyczne dotyczące poszczególnych badań.
6. Zastosowane definicje znajdują się w dodatku 1.

## **ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA**

7. Badania przeprowadzane *in vitro* wymagają zazwyczaj wykorzystania egzogennej źródła aktywacji metabolicznej. Egzogenny układ metabolizujący nie jest w stanie całkowicie naśladować warunków *in vivo*.
8. Należy zachować ostrożność, aby uniknąć wystąpienia warunków, które mogłyby doprowadzić do zniekształconych wyników dodatnich (tj. do potencjalnej interakcji z układem badawczym) niespowodowanych interakcją między badaną substancją chemiczną a materiałem genetycznym komórki; do takich warunków zalicza się zmiany pH lub osmolalność, interakcje z elementami podłoża (20)(21) bądź zbyt wysokie poziomy cytotoksyczności (22)(23)(24). Cytotoksyczność przekraczającą zalecane górne poziomy cytotoksyczności ustanowione w pkt 28 uznaje się za nadmierną dla badania mysich chłoniaków i badania TK6. Ponadto należy zauważyć, że badane substancje chemiczne będące analogami tymidyny lub zachowujące się jak analogi tymidyny mogą zwiększyć częstość występowania mutacji poprzez selektywny rozwój spontanicznych mutantów w tle w trakcie poddawania komórki działaniu substancji oraz wymagają zastosowania dodatkowych metod badawczych, aby przeprowadzić właściwą ocenę (25).
9. W przypadku wytworzonych nanomateriałów konieczne może być specjalne dostosowanie niniejszej metody badawczej, które jednak nie zostało tu opisane.
10. Przed zastosowaniem niniejszej metody badawczej służącej zbadaniu mieszaniny w celu zgromadzenia danych na potrzeby założonego celu regulacyjnego należy zastanowić się, czy zastosowanie niniejszej metody może doprowadzić do uzyskania wyników odpowiednich z punktu widzenia tego celu, a jeżeli tak – dlaczego. Przeprowadzenie takiej analizy nie jest konieczne, jeżeli ustanowiono wymóg regulacyjny dotyczący badania danej mieszaniny.

11. Zmutowane komórki charakteryzujące się niedoborem aktywności enzymów kinazy tymidynowej z powodu mutacji  $TK^{+/-}$  do  $TK^{-/-}$  są odporne na działanie cytostatyczne trifluorotymidyny będącej analogiem pirymidyny. Komórki, w przypadku których odnotowuje się prawidłowy poziom enzymów  $TK$ , są wrażliwe na trifluorotymidynę, pod wpływem której dochodzi do inhibicji metabolizmu komórkowego i wstrzymania dalszego podziału komórki. Tym samym zmutowane komórki mogą dzielić się w obecności trifluorotymidyny i tworzyć widoczne kolonie, podczas gdy komórki, które zawierają enzymy  $TK$  – nie.

## ZASADA BADANIA

12. Komórki w zawieszynie są poddawane działaniu badanej substancji chemicznej, zarówno z udziałem lub bez udziału egzogenego źródła aktywacji (zob. pkt 19), przez odpowiedni okres (zob. pkt 33), po czym wydziela się z nich kulturę pochodną, aby oznaczyć poziom cytotoksyczności oraz wywołać ekspresję fenotypową przed wybraniem zmutowanych komórek. Cytotoksyczność określa się poprzez względny wzrost całkowity (zob. pkt 25) w przypadku badania mysich chłoniaków oraz poprzez względny wskaźnik przeżyć (zob. pkt 26) w przypadku badania TK6. Hodowle poddane działaniu substancji są utrzymywane na podłożu przez okres odpowiedni dla każdego wybranego rodzaju komórki (zob. pkt 37), aby doprowadzić do zbliżonej do optymalnej ekspresji fenotypowej wywołanych mutacji. Po uzyskaniu ekspresji fenotypowej oznacza się częstość występowania mutacji, dokonując posiewu określonej liczby komórek na podłożu zawierającym czynnik selektywny w celu wykrycia kolonii zmutowanych komórek oraz na podłożu pozbawionym takiego czynnika selektywnego, aby oznaczyć skuteczność klonowania (żywołność). Kolonie liczy się po upływie odpowiedniego okresu inkubacji. Częstość występowania mutacji oblicza się na podstawie liczby kolonii zmutowanych komórek skorygowanej o wartość wskaźnika skuteczności klonowania w momencie wyboru zmutowanych komórek.

## OPIS METODY

### Czynności przygotowawcze

#### *Komórki*

13. W odniesieniu do badania mysich chłoniaków: Ponieważ badanie mysich chłoniaków opracowano i scharakteryzowano wykorzystując linię  $TK^{+/-}$  -3.7.2C należącą do linii komórkowych L5178Y, tę konkretną linię należy zastosować w odniesieniu do badania mysich chłoniaków. Linię komórkową L5178Y uzyskano z chłoniaka grasicy u myszy DBA-2 wywołanego metylocholatrenem (26). Clive i jego współpracownicy poddali komórki L5178Y (które Clive oznaczył jako  $TK^{+/+}$  -3) działaniu metanosulfonatu etylu oraz wyizolowali klon  $TK^{-/-}$  (oznaczony jako  $TK^{-/-}$  -3.7),

wykorzystując 5-bromo-2-dezoksyurydynę jako czynnik selektywny. Z kłona TK<sup>-/-</sup> wyizolowano i scharakteryzowano spontanicznego kłona TK<sup>+/-</sup> (oznaczonego jako TK<sup>+/-</sup>-3.7.2.) i subklona (oznaczonego jako TK<sup>+/-</sup>-3.7.2C) do zastosowania w badaniu mysich chłoniaków (27). Opublikowano kariotyp linii komórkowej (28)(29)(30)(31). Zmienna liczba chromosomów wynosi 40. Istnieje jeden chromosom metacentryczny (t12;13), który należy liczyć jako jeden chromosom. Locus *TK* myszy znajduje się na dystalnym końcu chromosomu 11. Linia komórkowa L5178Y TK<sup>+/-</sup>-3.7.2C zawiera mutacje w obu allelach p53 i powoduje mutację białka p53 (32)(33). Status p53 linii komórkowej TK<sup>+/-</sup>-3.7.2C prawdopodobnie odpowiada za zdolność badania do wykrycia uszkodzenia na dużą skalę (17).

14. W odniesieniu do TK6: TK6 to linia ludzkiej komórki limfoblastycznej. Macierzysta linia komórkowa to linia komórkowa zmodyfikowana przez wirus Epsteina-Barra, WI-L2, który pierwotnie uzyskano od 5-letniego samca z dziedziczną sferozytozą. Pierwszy wyizolowany klon, HH4, poddano mutacji za pośrednictwem ICR191 i wygenerowano heterozygotyczną linię komórkową *TK* – TK6(34). Komórki TK6 są niemal diploidalne, a reprezentatywny kariotyp to 47, XY, 13+, t(14; 20), t(3; 21)(35). Locus ludzkiej *TK* znajduje się na długim ramieniu chromosomu 17. TK6 to linia komórkowa zawierająca białko p53, ponieważ zawiera sekwencję p53 typu dzikiego w obu allelach i opisuje wyłącznie białko p53 typu dzikiego (36).
15. Zarówno w przypadku badania mysich chłoniaków, jak i TK6 zaleca się, aby przy pierwszym wyznaczaniu lub uzupełnianiu głównej kultury komórkowej laboratorium badawcze zapewniło brak skażenia mykoplazmą, przeprowadziło analizę chromosomów komórki lub oznaczyło kolorem chromosomy zawierające locus *TK* oraz sprawdziło czas podwojenia populacji. Należy ustalić normalny czas trwania cyklu komórkowego w przypadku komórek wykorzystywanych w laboratorium badawczym, który powinien być zgodny z opublikowanymi właściwościami komórek (16)(19)(37). Główną strukturę komórkową należy przechowywać w temperaturze -150 °C lub niższej i wykorzystywać do przygotowywania wszystkich roboczych kultur komórkowych.
16. Przed ustaleniem dużej liczby kultur roboczych poddanych krioprezerwacji, albo tuż przed wykorzystaniem w doświadczeniu konieczne może być oczyszczenie kultury z wcześniej istniejących zmutowanych komórek [o ile częstość występowania mutacji w kontroli z rozpuszczalnikami nie osiągnęła już dopuszczalnego zakresu – zob. tabela 2 dotycząca badania mysich chłoniaków]. Osiąga się to, stosując metotreksat (aminopterynę), aby dokonać selekcji względem komórek, w których występuje niedobór TK oraz dodając tymidynę, hipoksantynę i glicynę (L5178Y) lub 2-deoksycytydynę (TK6) do kultury w celu zapewnienia optymalnego wzrostu komórek zawierających TK (19)(38)(39) oraz (40) w odniesieniu do TK6. Ogólne porady dotyczące dobrych praktyk w zakresie utrzymania kultury komórkowej, jak również

szczegółowe porady w zakresie komórek L5178Y i TK6 znajdują się w pkt (19)(31)(37)(39)(41). Dla laboratoriów wymagających głównych kultur komórkowych do zapoczątkowania badania mysich chłoniaków lub TK6, albo pozyskania nowych głównych kultur komórkowych dostępne jest repozytorium dobrze scharakteryzowanych komórek (37).

### **Podłoża i warunki hodowli kultur**

17. W przypadku obu badań w celu utrzymania kultur należy zastosować odpowiednie podłoże oraz warunki inkubacji (np. naczynia do hodowli komórkowych, wilgotne środowisko o zawartości CO<sub>2</sub> wynoszącej 5 %, temperatura inkubacji w wysokości 37 °C). Kultury komórkowe powinny być zawsze utrzymywane w warunkach zapewniających fazę logarytmicznego wzrostu. W tym kontekście szczególne znaczenie ma dobranie podłoża i warunków hodowli kultur w taki sposób, aby zapewnić optymalny wzrost komórek w okresie ekspresji oraz klonowanie zarówno dla komórek zmutowanych, jak i dla komórek niezmutowanych. W przypadku badania mysich chłoniaków i TK6 istotne jest również, aby warunki hodowli kultur zapewniały optymalny wzrost zarówno dużych kolonii / wcześnie pojawiających się mutantów TK, jak i małych kolonii / późno pojawiających się mutantów TK. Więcej szczegółów dotyczących kultury, w tym konieczność właściwego podgrzania surowicy końskiej, jeśli podczas wyboru zmutowanych komórek stosuje się podłoże RPMI znajduje się w pkt (19)(31)(38)(39)(40)(42).

### **Przygotowanie kultur**

18. Komórki są rozmnażane z kultur wyjściowych i wysiewane na podłoże w takiej gęstości, by hodowle komórek w zawieszynie mogły nadal rosnąć wykładniczo przez okres poddawania działaniu substancji i okres ekspresji.

### **Aktywacja metaboliczna**

19. Egzogenne układy metabolizujące powinny być wykorzystywane w przypadku, gdy stosuje się komórki L5178Y i TK6, ponieważ mają one nieodpowiednią endogenną wydolność metaboliczną. Najpowszechniej stosowanym układem, który jest domyślnie zalecany, jeżeli w danym przypadku nie występują czynniki uzasadniające zastosowanie innego układu, jest frakcja postmitochondrialna suplementowanego kofaktora (S9) przygotowywana z wątrób gryzoni (najczęściej szczurów) poddawanych działaniu substancji indukujących enzymy takich jak Aroclor 1254 (43)(44)(45) lub połączenie fenobarbitalu i  $\beta$ -naftoflawonu (46)(47)(48)(49)(50)(51). Stosowanie tego ostatniego połączenia substancji nie narusza postanowień Konwencji sztokholmskiej w sprawie trwałych zanieczyszczeń organicznych (52), przy czym połączenie to okazało się równie skuteczne jak Aroclor 1254 w indukowaniu oksydaz wieloczynnościowych (45)(46)(47)(48)(49). Frakcja S9 jest zazwyczaj wykorzystywana w stężeniach mieszczących się w przedziale 1–2 %, ale stężenie to

może zostać zwiększone do 10 % (objętościowo) w końcowym podłożu badawczym. Klasa badanych substancji chemicznych może wywierać wpływ na rodzaj i stężenie stosowanego egzogenego układu metabolizującego lub czynnika pobudzającego metabolizm.

### **Przygotowanie badanej substancji chemicznej**

20. Badane substancje chemiczne w stanie stałym należy rozpuścić w odpowiednich rozpuszczalnikach oraz – w stosownych przypadkach – rozcieńczyć przed poddaniem komórek ich działaniu (zob. pkt 21). Badane substancje chemiczne w stanie ciekłym można dodać do układu badawczego bezpośrednio lub rozcieńczyć je przed poddaniem układu badawczego ich działaniu. Badane substancje chemiczne w stanie gazowym lub lotnym należy badać, wprowadzając stosowne modyfikacje w standardowych protokołach, np. poddając układ działania substancji w uszczelnionych naczyniach do hodowli komórkowych (53)(54)(55). Preparaty badanej substancji chemicznej należy przygotowywać tuż przed poddaniem komórek jej działaniu, chyba że dane dotyczące stabilności wskazują, że dopuszczalne jest składowanie substancji.

## **WARUNKI BADANIA**

### **Rozpuszczalniki**

21. Rozpuszczalnik powinien zostać dobrany w taki sposób, aby zapewnić optymalną rozpuszczalność badanej substancji chemicznej bez wywierania niepożądanego wpływu na przebieg badania, który może przejawiać się np. zmianą tempa wzrostu komórek, wpływem na integralność badanej substancji chemicznej, wejściem w reakcję z naczyniami do hodowli komórkowych lub zakłóceniem funkcjonowania układu metabolizującego. Zaleca się, aby w miarę możliwości w pierwszej kolejności rozważyć możliwość zastosowania wodnego rozpuszczalnika (lub podłoża). Do sprawdzonych rozpuszczalników zalicza się wodę lub sulfotlenek dimetylu. Zasadniczo zawartość rozpuszczalników organicznych nie powinna przekraczać 1 % (obj.) a zawartość rozpuszczalników wodnych (soli fizjologicznej lub wody) w końcowym podłożu użytym do badania nie powinna przekroczyć 10 % (obj.). W przypadku korzystania z rozpuszczalników innych niż sprawdzone (np. etanolu lub acetonu), decyzja o ich zastosowaniu powinna być uzasadniona danymi potwierdzającymi zgodność tych rozpuszczalników z badanymi substancjami chemicznymi, układem badawczym, a także brak właściwości świadczących o toksyczności genetycznej w zastosowanym stężeniu. W przypadku braku takich danych potwierdzających, należy przeprowadzić dodatkowe kontrole (zob. dodatek 1, definicje), aby wykazać, że wybrany rozpuszczalnik nie wywołuje żadnych szkodliwych ani mutagennych skutków.

## **DOKONYWANIE POMIARU CYTOTOKSYCZNOŚCI I WYBÓR BADANEGO STĘŻENIA**

22. Przy ustalaniu najwyższego stężenia badanej substancji chemicznej należy unikać stężeń, które mogą doprowadzić do uzyskania zniekształconych wyników dodatnich, np. stężeń wywołujących nadmierną cytotoksyczność (zob. pkt 28), wytrącanie substancji w podłożu (zob. pkt 29) lub znaczne zmiany w pH lub osmolalności (zob. pkt 8). Jeżeli badana substancja chemiczna wywołuje znaczną zmianę pH podłoża w momencie jej dodania, poziom pH można skorygować, buforując końcowe podłoże użyte do badania, aby uniknąć zniekształconych wyników dodatnich i utrzymać odpowiednie warunki hodowli kultur.
23. Wyboru stężenia dokonuje się na podstawie poziomu cytotoksyczności oraz innych parametrów (zob. pkt 27–30). Choć dokonanie oceny cytotoksyczności na etapie badania wstępnego może przyczynić się do precyzyjniejszego określenia stężeń, które mają zostać zastosowane w ramach głównego doświadczenia, wykonanie takiego badania wstępnego nie jest wymagane. Nawet w przypadku dokonania wstępnej oceny cytotoksyczności, w ramach głównego doświadczenia należy wykonać ponownie pomiar cytotoksyczności w odniesieniu do każdej kultury. Jeśli przeprowadza się doświadczenie dotyczące zakresu dawkowania, powinno ono obejmować szeroki zakres stężeń i może zostać przerwane 1. dnia po poddaniu działaniu substancji, albo przeprowadzone za pośrednictwem ekspresji trwającej 2 dni i do momentu wybrania zmutowanych komórek (jeżeli okaże się, że zastosowane stężenia są właściwe).
24. Cytotoksyczność należy określić dla każdej pojedynczej badanej kultury i kultury kontrolnej: metody dotyczące badania mysich chłoniaków (2) oraz TK6 (15) określa praktyka uzgodniona na szczeblu międzynarodowym.
25. Zarówno w przypadku wersji badania mysich chłoniaków wykorzystującej agar, jak i wersji badania mysich chłoniaków wykorzystującej mikropłytki: Ocenę cytotoksyczności należy przeprowadzić, wykorzystując względny wzrost całkowity (RTG), który opracował Clive i Spector w 1975 r. (2) Miernik ten obejmuje względny wzrost zawieszania (RSG: badana kultura w stosunku do kontroli z rozpuszczalnikiem) podczas poddawania komórki działaniu substancji, czas ekspresji i względna skuteczność klonowania (RCE: badana kultura w stosunku do kontroli z rozpuszczalnikiem) w momencie wyboru mutantów (2). Należy zauważyć, że względny wzrost zawieszania obejmuje wszelką utratę komórek mającą miejsce w badanej kulturze podczas poddawania działaniu substancji (zob. dodatek 2 dotyczący wzorów).
26. W odniesieniu do TK6: Ocenę cytotoksyczności należy przeprowadzić w oparciu o względny wskaźnik przeżyć (RS), tj. wskaźnik skuteczności klonowania komórek



posianych natychmiast po poddaniu działaniu substancji skorygowany o wszelkie komórki utracone w trakcie działania substancji, na podstawie liczby komórek w stosunku do kontroli ujemnych (którym przypisano wskaźnik przeżycia wynoszący 100 %) (odpowiedni wzór zawarto w dodatku 2).

27. Należy ocenić co najmniej cztery badane stężenia (poza kontrolami z rozpuszczalnikami i kontrolami dodatnimi), które spełniają kryteria dopuszczalności (odpowiednia cytotoksyczność, liczba komórek itp.). Choć zaleca się korzystanie ze zduplikowanych kultur, w odniesieniu do każdego badanego stężenia dopuszcza się możliwość stosowania kontrprób albo pojedynczych kultur poddawanych działaniu substancji. Wyniki uzyskane na podstawie zduplikowanych kultur przy danym stężeniu należy zgłaszać odrębnie, ale dopuszcza się możliwość ich łączenia na potrzeby analizy danych (55). W przypadku badanych substancji chemicznych wykazujących niewielką cytotoksyczność lub niewykazujących cytotoksyczności na ogół odpowiednie będzie zastosowanie 2–3-krotnych przedziałów stężenia. W przypadku wystąpienia cytotoksyczności należy wybrać stężenia, aby obejmowały zakres cytotoksyczności rozpoczynający się od stężenia, które wykazuje cytotoksyczność, jak opisano w pkt 28, oraz uwzględniający stężenia, w których wystąpiła umiarkowana i niewielka cytotoksyczność lub nie wystąpiła żadna cytotoksyczność. W przypadku wielu badanych substancji chemicznych można zaobserwować strome krzywe ilustrujące zależność stężenie-odpowiedź, dlatego też aby uwzględnić cały zakres cytotoksyczności lub szczegółowo zbadać zależność stężenie-odpowiedź, konieczne może okazać się zastosowanie więcej niż czterech stężeń o bardziej zbliżonych wartościach – dotyczy to zwłaszcza przypadków, w których zachodzi konieczność powtórzenia doświadczenia (zob. pkt 70). Stosowanie więcej niż 4 stężeń może mieć szczególnie istotne znaczenie w przypadku korzystania z pojedynczych kultur.
28. Jeżeli maksymalne stężenie określono na podstawie cytotoksyczności, należy dążyć do tego, by poziom takiego maksymalnego stężenia doprowadził do uzyskania względnego wzrostu całkowitego na poziomie od 20 do 10 % w przypadku badania mysich chłoniaków oraz względnego wskaźnika przeżyć na poziomie od 20 do 10 % w przypadku TK6 (pkt 67).
29. W przypadku słabo rozpuszczalnych badanych substancji chemicznych, które nie wykazują cytotoksyczności w stężeniach niższych od najniższego stężenia nierozpuszczalnego, najwyższy poziom stężenia wykorzystanego w badaniu powinien wywołać zmętnienie lub doprowadzić do wytrącenia się osadu widocznego gołym okiem lub przez mikroskop odwrócony pod koniec poddawania działaniu badanej substancji. Nawet jeżeli cytotoksyczność występuje powyżej najniższego stężenia nierozpuszczalnego, zaleca się przeprowadzenie badania przy zastosowaniu wyłącznie jednego stężenia wywołującego zmętnienie lub skutkującego wytrącaniem

się widocznego osadu, ponieważ osad może prowadzić do uzyskania zniekształconych wyników. Ponieważ w badaniu mysich chłoniaków i TK6 stosuje się hodowlę komórek w zawieszynie należy zadbać o to, aby pojawienie się osadu nie zakłóciło przebiegu badania. W tym kontekście pomocne może okazać się również oznaczenie rozpuszczalności w podłożu przed przeprowadzeniem doświadczenia.

30. Jeżeli nie zaobserwowano żadnego osadu ani ograniczenia cytotoksyczności, najwyższe badane stężenie powinno odpowiadać 10 mM, 2 mg/ml lub 2 µl/ml, w zależności od tego, która z tych wartości jest najniższa (57) (58). Jeżeli badana substancja chemiczna nie ma określonego składu, np. substancje o nieznanym lub zmiennym składzie, złożone produkty reakcji lub materiały biologiczne [tj. substancje chemiczne o nieznanym lub zmiennym składzie (UVCB)], wyciągi pochodzące ze środowiska itp., w przypadku braku dostatecznej cytotoksyczności zwiększenie stężenia poszczególnych składników może wiązać się z koniecznością podwyższenia najwyższego stężenia (np. 5 mg/ml). Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, że wymagania te mogą być inne w przypadku produktów leczniczych przeznaczonych dla ludzi (59).

## Kontrole

31. Dla każdego warunku doświadczalnego należy włączyć jednocześnie kontrole ujemne (zob. pkt 21) obejmujące sam rozpuszczalnik w podłożu użytym do badania, w odniesieniu do którego podjęto takie same czynności jak w odniesieniu do kultur poddanych działaniu substancji.
32. Jednoczesne kontrole dodatnie są niezbędne do wykazania zdolności danego laboratorium do zidentyfikowania mutagenów w warunkach określonych w stosowanym protokole badania oraz skuteczności egzogenego układu metabolizującego (w stosownych przypadkach), oraz do wykazania właściwego wykrycia zarówno małych / późno pojawiających się mutantów *TK*, jak i dużych / wcześnie pojawiających się mutantów *TK*. Przykładowe substancje służące do kontroli dodatniej przedstawiono w tabeli 1 poniżej. W uzasadnionych przypadkach dopuszcza się możliwość stosowania alternatywnych substancji służących do kontroli dodatniej. Ponieważ testy na komórkach ssaków *in vitro* pod kątem toksyczności genetycznej są w dostatecznym stopniu ustandaryzowane, jeżeli chodzi o krótkoterminowe (3–4 godzinny) poddanie działaniu substancji chemicznej przeprowadzane jednocześnie z udziałem lub bez udziału aktywacji metabolicznej, zastosowanie kontroli dodatniej można ograniczyć do mutagenu wymagającego aktywacji metabolicznej. W takim przypadku wspomniana pojedyncza reakcja kontroli dodatniej potwierdzi zarówno aktywność układu metabolizującego, jak i reaktywność układu badawczego. W przypadku długoterminowego poddawania działaniu substancji chemicznej (tj. 24 godziny bez S9) należy zastosować jednak

oddzielną kontrolę dodatnią, ponieważ czas podawania badanej substancji chemicznej będzie się różnił od czasu w badaniu z wykorzystaniem aktywacji metabolicznej. Każdą kontrolę dodatnią należy zastosować przy co najmniej jednym stężeniu, od którego oczekuje się wytworzenia odtwarzalnego oraz wykrywalnego wzrostu wykraczającego poza poziom wyjściowy, w celu wykazania czułości układu badawczego, a reakcja nie powinna być zakłócona cytotoksycznością wykraczającą poza limity określone w niniejszej metodzie badawczej (zob. pkt 28).

**Tabela 1:** Substancje odniesienia, z których zaleca się korzystać przy przeprowadzaniu oceny biegłości laboratorium i przy dokonywaniu wyboru kontroli dodatnich.

| Kategoria                                              | Substancja | Numer CAS              |
|--------------------------------------------------------|------------|------------------------|
| <b>1. Mutageny aktywne bez aktywacji metabolicznej</b> |            |                        |
| Metanosulfonian metylu                                 |            | 66-27-3                |
| Mitomycyna C                                           |            | 50-07-7                |
| N-tlenek 4-nitrochinoliny                              |            | 56-57-5                |
| <b>2. Mutageny wymagające aktywacji metabolicznej</b>  |            |                        |
| Benzo[a]piren                                          |            | 50-32-8                |
| Cyklofosfamid (jednowodny)                             |            | 50-18-0<br>(6055-19-2) |
| 7,12-antracen dimetylobenzenu                          |            | 57-97-6                |
| 3-Metylocholantrén                                     |            | 56-49-5                |

## PROCEDURA

### Poddanie działaniu badanej substancji chemicznej

33. Rozmnażające się komórki są poddawane działaniu badanej substancji chemicznej z udziałem i bez udziału układu metabolizującego. Narażenie na działanie badanej substancji powinno trwać dostatecznie długo (z reguły przyjmuje się, że odpowiedni okres narażenia na działanie substancji wynosi od 3 do 4 godzin). Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, że wymagania te mogą być inne w przypadku produktów leczniczych przeznaczonych dla ludzi (59). Jeżeli chodzi o badanie mysich chłoniaków, w przypadkach, w których krótkoterminowe poddanie działaniu substancji chemicznej daje wyniki ujemne i istnieją dane wskazujące na potrzebę dłuższego poddawania działaniu substancji [np. analogów nukleozydowych, słabo rozpuszczalnych chemikaliów, (5)(59)], należy rozważyć przeprowadzenie badania obejmującego dłuższe poddawanie działaniu substancji, tj. 24 godziny bez S9.
34. Minimalną liczbę komórek wykorzystywanych w odniesieniu do każdej kultury (kontrolnej i poddawanej działaniu substancji) na poszczególnych etapach badania

należy ustalić na podstawie wskaźnika spontanicznej częstości występowania mutacji. Co do zasady, zaleca się poddawanie działaniu substancji i pasażowanie takiej liczby komórek w każdej hodowli eksperymentalnej, która będzie wystarczająca do tego, aby utrzymać poziom co najmniej 10, a najlepiej 100, spontanicznie powstałych mutantów na wszystkich etapach badania (poddanie działaniu substancji, ekspresja fenotypowa, wybór mutantu) (56).

35. W przypadku badania mysich chłoniaków zalecana dopuszczalna spontaniczna częstość występowania mutacji znajduje się w przedziale  $35-140 \times 10^{-6}$  (wersja wykorzystująca agarem) oraz  $50-170 \times 10^{-6}$  (wersja wykorzystująca mikropłytki) (zob. Tabela 2). Aby osiągnąć we wszystkich badanych kulturach poziom co najmniej 10, a najlepiej 100, spontanicznie powstałych mutantów, które przeżywają poddanie działaniu substancji, konieczne jest poddanie działaniu substancji co najmniej  $6 \times 10^6$  komórek. Poddawanie takiej liczby komórek działaniu substancji i utrzymywanie wystarczającej liczby komórek podczas ekspresji i klonowania do celów wybrania mutantu, zapewnia wystarczającą liczbę spontanicznych mutacji (przynajmniej 10) podczas wszystkich etapów eksperymentu, również w kulturach poddanych działaniu substancji w stężeniach charakteryzujących się cytotoksycznością na poziomie 90 % (określoną za pomocą względnego wzrostu całkowitego na poziomie 10 %) (19)(38)(39).
36. W przypadku badania TK6, spontaniczna częstość występowania mutacji waha się zazwyczaj w przedziale od 2 do  $10 \times 10^{-6}$ . Aby osiągnąć we wszystkich badanych kulturach poziom co najmniej 10 spontanicznie powstałych mutantów, konieczne jest poddanie działaniu substancji co najmniej  $20 \times 10^6$  komórek. Poddawanie takiej liczby komórek działaniu substancji zapewnia wystarczającą liczbę spontanicznie powstałych mutantów (przynajmniej 10) również w kulturach poddanych działaniu substancji w stężeniach charakteryzujących się cytotoksycznością na poziomie 90 % (względny wskaźnik przeżyć wynoszący 10 %). Ponadto w okresie ekspresji należy wyhodować wystarczającą liczbę komórek, a następnie posiać te komórki w celu dokonania wyboru mutantów (60).

#### **Czas ekspresji fenotypowej oraz pomiar cytotoksyczności i częstości występowania mutacji**

37. Po zakończeniu okresu poddawania działaniu substancji komórki hoduje się przez określony czas, aby umożliwić niemal optymalną ekspresję fenotypową nowo wywołanych mutacji; specyficzną dla każdej linii komórkowej. W przypadku badania mysich chłoniaków czas ekspresji fenotypowej wynosi 2 dni. Jeżeli chodzi o badanie TK6, czas ekspresji fenotypowej wynosi 3–4 dni. W przypadku zastosowania 24-godzinnego poddania działaniu substancji okres ekspresji rozpoczyna się po zakończeniu poddawania działaniu substancji.

38. W czasie ekspresji fenotypowej komórki zlicza się codziennie. W przypadku badania mysich chłoniaków do obliczania dziennego wzrostu zawieszania wykorzystuje się liczbę komórek w danym dniu. Po 2 dniach ekspresji fenotypowej komórki zawiesza się w podłożu z udziałem lub bez udziału czynnika selektywnego, aby odpowiednio ustalić liczbę mutantów (płytki wyboru) i określić skuteczność klonowania (płytki żywotności). Jeżeli chodzi o badanie mysich chłoniaków, istnieją dwie jednakowo dopuszczalne metody wybierania mutantów za pomocą klonowania; w jednej wykorzystuje się miękki agar, a w drugiej podłoże ciekłe na 96-dołkowych płytkach (19)(38)(39). Klonowanie w przypadku badania TK6 przeprowadza się z wykorzystaniem ciekłego podłoża i 96-dołkowych płytek (16).
39. W przypadku mutacji TK jedynym zalecanym czynnikiem selektywnym jest trifluorotymidyna (TFT) (61).
40. W przypadku badania mysich chłoniaków płytki agarowe i mikropłytki zlicza się po 10–12 dniach inkubacji. W przypadku badania TK6 kolonie na mikropłytkach ocenia się po 10–14 dniach pod kątem wcześniej pojawiających się mutacji. Aby uzyskać wolną rosnące (późno pojawiające się) mutacje TK6, należy po policzeniu wcześniej pojawiających się mutacji ponownie nakarmić komórki pożywką i TFT i inkubować płytki przez kolejne 7–10 dni (62). W pkt 42 i 44 przedstawiono argumenty dotyczące zliczania mutacji TK cechujących się powolnym i normalnym wzrostem.
41. Odpowiednie obliczenia dotyczące dwóch badań wykorzystujące te dwie metody (za pomocą agaru i mikropłytek) w przypadku badania mysich chłoniaków znajdują się w dodatku 2. Jeżeli chodzi o metodę wykorzystującą agar do badania mysich chłoniaków, kolonie zlicza się, a liczbę kolonii zmutowanych komórek koryguje się o skuteczność klonowania w celu obliczenia częstości występowania mutacji. W wersji badania mysich chłoniaków i badania TK6 przy wykorzystaniu mikropłytek skuteczność klonowania zarówno w przypadku płytek wyboru, jak i płytek skuteczności klonowania, określa się zgodnie z rozkładem Poissona (63). Częstość występowania mutacji oblicza się na podstawie tych dwóch wartości skuteczności klonowania.

### **Charakterystyka kolonii zmutowanych komórek**

42. W przypadku badania mysich chłoniaków, jeżeli badana substancja chemiczna daje wynik dodatni (zob. pkt 62–63), charakterystykę kolonii za pomocą sortowania według rozmiarów lub wzrostu należy przeprowadzić na przynajmniej jednej z badanych kolonii (najwyższe pozytywne stężenie) oraz na dodatnich i ujemnych kontrolach. Jeżeli wynik badanej substancji chemicznej jest ujemny (zob. pkt 64), charakterystykę kolonii zmutowanych komórek należy przeprowadzić na dodatnich i ujemnych kontrolach. W przypadku metody badania mysich chłoniaków na

mikroplówkach mutanty małych kolonii definiuje się jako pokrywające poniżej 25 % średnicy dołka, a mutanty dużych kolonii jako pokrywające powyżej 25 % średnicy dołka. W przypadku metody wykorzystującej agar do zliczania kolonii zmutowanych komórek i sortowania kolonii według rozmiarów używa się licznika kolonii. Informacje szczegółowe na temat podejść do sortowania kolonii według rozmiarów znajdują się w literaturze (19)(38)(40). Do wykazania, że badania przeprowadzono poprawnie, konieczna jest charakterystyka kolonii przeprowadzona na dodatnich i ujemnych kontrolach.

43. Jeżeli wyniku badanej substancji chemicznej nie można uznać za ujemny, jeżeli mutanty zarówno dużych, jak i małych kolonii nie zostaną odpowiednio wykryte w dodatniej kontroli. Charakterystykę kolonii można wykorzystać do przedstawienia ogólnych informacji dotyczących zdolności badanej substancji chemicznej do wywoływania mutacji punktowych lub zdarzeń chromosomowych (pkt 4).
44. TK6: Mutacje rosnące normalnie i powoli rozróżnia się za pomocą różnic w okresie inkubacji (zob. pkt 40). W przypadku badania TK6 zarówno wcześniej jak i późno pojawiające się mutacje ocenia się we wszystkich kulturach, w tym w kontrolach ujemnych i dodatnich. Do wykazania, że badania przeprowadzono poprawnie, konieczna jest charakterystyka kolonii przeprowadzona na ujemnych i dodatnich kontrolach. Wyniku badanej substancji chemicznej nie można uznać za ujemny, jeżeli zarówno wcześniej pojawiające się, jak i późno pojawiające się mutacje nie zostaną odpowiednio wykryte w dodatniej kontroli. Charakterystykę kolonii można wykorzystać do przedstawienia ogólnych informacji dotyczących zdolności badanej substancji chemicznej do wywoływania mutacji punktowych lub zdarzeń chromosomowych (pkt 4).

### **Biegłość laboratorium**

45. Aby można było wykazać, że dane laboratorium dysponuje dostatecznym doświadczeniem w zakresie przeprowadzania badań przed wykorzystaniem go do przeprowadzenia rutynowego badania, laboratorium to musiało przeprowadzić szereg doświadczeń, podczas których stosowano substancje odniesienia służące do kontroli z wykorzystaniem różnych mechanizmów (co najmniej jedna substancja aktywna i jedna substancja aktywna przy braku aktywacji metabolicznej spośród substancji wymienionych w tabeli 1) oraz różnych kontroli ujemnych (uwzględniając kultury niepoddane działaniu substancji chemicznej oraz różne rozpuszczalniki/nośniki). Reakcje otrzymane w wyniku takiej kontroli dodatniej i ujemnej powinny odpowiadać reakcjom opisanym w literaturze. Wymóg ten nie dotyczy laboratoriów, które dysponują odpowiednim doświadczeniem, tj. laboratoriów prowadzących bazę danych historycznych, o której mowa w pkt 47–50. W przypadku badania mysich chłoniaków wartości otrzymane zarówno w wyniku kontroli dodatnich i ujemnych

powinny być zgodne z zaleceniami międzynarodowych warsztatów z badań genotoksycznych (*International Workshops on Genotoxicity Testing*) (zob. Tabela 2).

46. Aby wykazać biegłość w zakresie wykrywania mutagennych substancji chemicznych, ustalania skuteczności układu metabolizującego i wykazywania odpowiedniości warunków wzrostu komórek poddawanych działaniu substancji, ekspresji fenotypowej i wyboru mutantów oraz procedur oceny punktowej należy zbadać szereg substancji chemicznych służących do kontroli dodatniej (zob. tabela 1) przy krótkoterminowym i długoterminowym poddawaniu działaniu substancji chemicznej (w przypadku stosowania długoterminowego poddawania działaniu substancji chemicznej) przy braku aktywacji metabolicznej oraz przy krótkoterminowym poddawaniu działaniu substancji chemicznej w obecności aktywacji metabolicznej. Należy dobrać zakres stężeń wybranych substancji tak, aby uzyskać powtarzalne i powiązane ze stężeniem wzrosty powyżej tła w celu wykazania czułości i zakresu oznaczania układu badawczego.

#### **Dane historyczne dotyczące kontroli**

47. Laboratorium powinno ustalić:

- zakres i rozkład historycznych wyników kontroli dodatniej,
- zakres i rozkład historycznych wyników kontroli ujemnej (bez poddania działaniu substancji chemicznej, z rozpuszczalnikiem).

48. Przy pierwszym gromadzeniu danych dotyczących rozkładu historycznych wyników kontroli ujemnej wyniki jednoczesnej kontroli ujemnej powinny być zgodne z opublikowanymi danymi dotyczącymi kontroli ujemnej. W miarę dodawania kolejnych danych doświadczalnych do rozkładu kontroli jednoczesne kontrole ujemne powinny w idealnych warunkach mieścić się w granicach kontrolnych wyznaczających przedział 95 % dla tego rozkładu (64)(65).

49. Prowadzona przez dane laboratorium baza danych historycznych dotyczących kontroli ujemnych powinna początkowo zawierać dane z co najmniej 10 doświadczeń, a najlepiej z co najmniej 20 doświadczeń przeprowadzonych w porównywalnych warunkach doświadczalnych. Laboratoria powinny stosować metody kontroli jakości, takie jak karty kontrolne (np. karty C lub karty X-średnie (65)) w celu określania stopnia zmienności gromadzonych przez nie danych dotyczących kontroli dodatniej i ujemnej oraz w celu wykazania, że stosowana przez nie metodologia jest »pod kontrolą« (66). Więcej informacji szczegółowych i zaleceń dotyczących sposobu gromadzenia i wykorzystywania danych historycznych można znaleźć w literaturze (64).

50. Dane dotyczące kontroli ujemnej powinny obejmować częstość występowania mutacji w pojedynczej kulturze lub, najlepiej, w zduplikowanych kulturach, jak opisano w pkt 27. Jednoczesne kontrole ujemne powinny w idealnych warunkach mieścić się w granicach kontrolnych wyznaczających przedział 95 % dla rozkładu danych zawartych w prowadzonej przez laboratorium bazie danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej. W przypadku gdy dane dotyczące kontroli ujemnej nie mieszczą się w granicy kontrolnej wyznaczającej przedział 95 %, włączenie ich do rozkładu kontroli historycznej może być dopuszczalne, pod warunkiem że dane te nie stanowią skrajnych obserwacji nietypowych, istnieją dowody świadczące o tym, iż dany układ badawczy znajduje się „pod kontrolą” (zob. pkt 49), a także dowody wykluczające błąd techniczny czy ludzki.
51. Wszelkie zmiany w protokole doświadczalnym należy rozpatrywać pod kątem ich spójności z dotychczas prowadzonymi przez laboratorium bazami danych historycznych dotyczących kontroli. Wszelkie poważne niespójności powinny skutkować utworzeniem nowej bazy danych historycznych dotyczących kontroli.

## **DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ**

### **Przedstawienie wyników**

52. Zarówno w przypadku badania mysich chłoniaków, jak i badania TK6, przedstawienie danych powinno zgodnie z poniższym opisem uwzględniać – zarówno w odniesieniu do kultur, które zostały poddane działaniu substancji oraz kultur kontrolnych – dane niezbędne do obliczenia cytotoksyczności (odpowiednio względny wzrost całkowity i względny wskaźnik przeżyć) oraz częstości występowania mutacji.
53. W przypadku badania mysich chłoniaków należy dostarczyć dane dotyczące poszczególnych kultur określające względny wzrost zawieszania, względny wzrost całkowity, skuteczność klonowania w momencie wybierania mutantów oraz liczbę kolonii zmutowanych komórek (w wersji wykorzystującej agar) lub liczbę pustych dołków (w wersji wykorzystującej mikropłytki). Częstość występowania mutacji powinna być wyrażona jako liczba zmutowanych komórek na milion komórek przeżywających. Jeżeli reakcja daje wynik dodatni, należy podać częstość występowania mutacji w małych i dużych koloniach (lub procent częstości występowania mutacji) w odniesieniu do przynajmniej jednego stężenia substancji badanej (zazwyczaj najwyższe pozytywne stężenie) oraz do ujemnych i dodatnich kontroli. Jeżeli reakcja daje wynik ujemny, należy podać częstość występowania mutacji w małych i dużych koloniach w odniesieniu do ujemnych i dodatnich kontroli.



54. W przypadku badania TK6 należy dostarczyć dane dotyczące poszczególnych kultur określające względny wskaźnik przeżyć, skuteczność klonowania w momencie wybierania mutantów oraz liczbę pustych dołków w odniesieniu do wcześniej i późno pojawiających się mutacji. Częstość występowania mutacji powinna być wyrażona jako liczba zmutowanych komórek na milion komórek przeżywających i powinna obejmować zarówno całkowitą częstość występowania mutacji, jak i częstość występowania wcześniej i późno pojawiających się mutacji (lub procent częstości występowania mutacji).

### **Kryteria dopuszczalności**

55. Zarówno w przypadku badania mysich chłoniaków, jak i badania TK6, przed ustaleniem ogólnych wyników dotyczących danej badanej substancji chemicznej należy spełnić następujące kryteria:

- Przeprowadzono dwa warunki doświadczalne (krótkoterminowe poddanie działaniu substancji z udziałem i bez udziału aktywacji metabolicznej – zob. pkt 33) do momentu uzyskania w jednym z nich wyników dodatnich.
- Należy poddać analizie wystarczającą liczbę komórek i stężeń (zob. pkt 27, 34–36).
- Kryteria wyboru najwyższego stężenia są spójne z kryteriami opisanymi w pkt 28–30.

### *Kryteria dopuszczalności dotyczące ujemnych i dodatnich kontroli*

56. W wyniku przeprowadzenia przez grupę roboczą ekspertów ds. badania mysich chłoniaków w ramach międzynarodowych warsztatów z badań genotoksycznych (International Workshops on Genotoxicity Testing) analizy szerokiego zakresu danych dotyczących badania mysich chłoniaków powstało uzgodnione stanowisko na temat szczegółowych kryteriów dopuszczalności dotyczących badania mysich chłoniaków (1)(2)(3)(4)(5). W związku z tym w ramach niniejszej metody badawczej przedstawiono szczegółowe zalecenia dotyczące ustalania dopuszczalności kontroli ujemnych i dodatnich oraz oceny wyników dotyczących poszczególnych substancji w ramach badania mysich chłoniaków. Baza danych dotyczących badania TK6 jest dużo mniejsza i grupa robocza nie przeprowadziła jego oceny.

57. W przypadku badania mysich chłoniaków każdy eksperyment należy poddać ocenie pod kątem sprawdzenia, czy kontrola niepoddawana działaniu substancji / z rozpuszczalnikiem spełnia kryteria dopuszczalności grupy roboczej ds. badania mysich chłoniaków międzynarodowych warsztatów z badań genotoksycznych ((4) i tabela 2 poniżej) dotyczące: (1) częstości występowania mutacji (należy zauważyć, że częstość występowania mutacji dopuszczalna przez międzynarodowe warsztaty z badań genotoksycznych jest różna w wersjach badania mysich chłoniaków

z wykorzystaniem agaru i mikropłytek), (2) skuteczności klonowania w momencie wybierania mutantów oraz (3) wzrostu zawieszania (wzory znajdują się w dodatku 2).

**Tabela 2:** Kryteria dopuszczalności dotyczące badania mysich chłoniaków

| Parametr                             | Metoda badania na miękkim agarze                                                                                                                   | Metoda badania na mikropłytkach                                                                                                                    |
|--------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Częstość występowania mutacji</b> | 35–140 x 10 <sup>-6</sup>                                                                                                                          | 50–170 x 10 <sup>-6</sup>                                                                                                                          |
| <b>Skuteczność klonowania</b>        | 65–120 %                                                                                                                                           | 65–120 %                                                                                                                                           |
| <b>Wzrost zawiesiny</b>              | 8–32 -krotne (3–4 godziny poddawania działaniu substancji)<br>32–180 -krotne (24 godziny poddawania działaniu substancji, jeżeli będzie stosowane) | 8–32 -krotne (3–4 godziny poddawania działaniu substancji)<br>32–180 -krotne (24 godziny poddawania działaniu substancji, jeżeli będzie stosowane) |

58. W przypadku badania mysich chłoniaków każde badanie należy również poddać ocenie pod kątem sprawdzenia, czy dodatnia(-e) kontrola(-e) spełniają co najmniej jedno z następujących kryteriów dopuszczalności opracowanych przez grupę roboczą międzynarodowych warsztatów z badań genotoksycznych:

- Kontrola dodatnia powinna wskazywać bezwzględny wzrost całkowitej częstości występowania mutacji, tzn. przekroczenie poziomu spontanicznej częstości występowania mutacji w tle [indukowana częstość występowania mutacji (IMF)] o co najmniej 300 x 10<sup>-6</sup>. Co najmniej 40 % indukowanej częstości występowania mutacji powinno zostać odzwierciedlone w częstości występowania mutacji w małych koloniach.
- W dodatniej kontroli odnotowano wzrost częstości występowania mutacji w małych koloniach na poziomie co najmniej 150 x 10<sup>-6</sup> powyżej wzrostu odnotowanego w jednoczesnej kontroli niepoddawanej działaniu substancji / z rozpuszczalnikiem (indukowana częstość występowania mutacji w małych koloniach na poziomie 150 x 10<sup>-6</sup>).

59. W przypadku TK6 badanie będzie dopuszczalne, jeżeli uznaje się, że dopuszczalne jest włączenie danych dotyczących jednoczesnej kontroli ujemnej do prowadzonej przez laboratorium bazy danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej, jak opisano w pkt 48–49. Jednoczesne kontrole dodatnie (zob. pkt 32) powinny ponadto wywoływać reakcje zgodne z reakcjami odnotowanymi w bazie danych historycznych dotyczących kontroli dodatniej i wykazywać statystycznie istotny wzrost w porównaniu z jednoczesną kontrolą ujemną.

60. W obu badaniach górna granica cytotoksyczności zaobserwowanej w kulturze kontroli dodatkowo powinna być taka sama, jak w kulturach eksperymentalnych. Oznacza to, że względny wzrost całkowity / względny wskaźnik przeżyć nie powinny być niższe niż 10 %. Aby wykazać spełnienie kryteriów dopuszczalności w odniesieniu do kontroli dodatkowo, wystarczy zastosować jedno stężenie (lub jedno ze stężeń kultur w ramach kontroli dodatkowo, jeżeli zastosowanie więcej niż jedno stężenie). Częstość występowania mutacji w kontroli dodatkowo musi się ponadto zmieścić w dopuszczalnym zakresie ustalonym dla danego laboratorium.

### **Ocena i interpretacja wyników**

61. W przypadku badania mysich chłoniaków grupa robocza ekspertów ds. mysich chłoniaków międzynarodowych warsztatów z badań genotoksycznych (4) wykonała ogromną pracę dotyczącą biologicznego znaczenia i kryteriów reakcji dodatkowo. W związku z tym w niniejszej metodzie badawczej przedstawiono szczegółowe zalecenia na temat interpretacji wyników dotyczących badanej substancji chemicznej uzyskanych w badaniu mysich chłoniaków (zob. pkt 62–64). Baza danych dotyczących badania TK6 jest dużo mniejsza i grupa robocza nie przeprowadziła jego oceny. W związku z tym zalecenia na temat interpretacji danych dotyczących TK6 przedstawiono w bardziej ogólnej formie (zob. pkt 65–66). Do obu badań mają zastosowanie dodatkowe zalecenia (zob. pkt 67–71).

#### *Badanie mysich chłoniaków*

62. Aby zagwarantować, że zwiększona częstość występowania mutacji ma biologiczne znaczenie, zaleca się zastosowanie metody określania reakcji dodatnich i ujemnych. Zamiast stosowanej zazwyczaj w innych badaniach analizy statystycznej, metoda ta polega na wykorzystaniu predefiniowanej indukowanej częstości występowania mutacji (tj. wzrostu częstości występowania mutacji powyżej poziomu w ramach jednoczesnej kontroli) określanej jako globalny czynnik oceny (*Global Evaluation Factor*), który opiera się na analizie rozkładu danych dotyczących częstości występowania mutacji w kontroli ujemnej otrzymanych od laboratoriów uczestniczących (4). W wersji badania mysich chłoniaków wykorzystującej agar, globalny czynnik oceny wynosi  $90 \times 10^{-6}$ , w wersji badania mysich chłoniaków wykorzystującej mikropłytki globalny czynnik oceny wynosi  $126 \times 10^{-6}$ .
63. O ile wszystkie kryteria dopuszczalności są spełnione, uznaje się, że badana substancja chemiczna daje wynik wyraźnie dodatni, jeżeli w dowolnych ze zbadanych warunków doświadczalnych (zob. pkt 33), wzrost częstości występowania mutacji powyżej jednoczesnego tła przekracza globalny czynnik oceny i jest powiązany ze stężeniem (np. z zastosowaniem testu tendencji). Badaną substancję chemiczną uznaje się następnie za zdolną do wywołania mutacji w danym układzie badawczym.

64. O ile wszystkie kryteria dopuszczalności są spełnione, uznaje się, że badana substancja chemiczna daje wynik wyraźnie ujemny, jeżeli we wszystkich zbadanych warunkach doświadczalnych (zob. pkt 33) nie zachodzi reakcja powiązana ze stężeniem lub, jeżeli ma miejsce wzrost częstości występowania mutacji – nie przekracza globalnego czynnika oceny. Badaną substancję chemiczną uznaje się następnie za niezdolną do wywołania mutacji w danym układzie badawczym.

#### TK6

65. O ile wszystkie kryteria dopuszczalności są spełnione, uznaje się, że badana substancja chemiczna daje wynik wyraźnie dodatni, jeżeli w dowolnych ze zbadanych warunków doświadczalnych (zob. pkt 33):

- co najmniej jedno z badanych stężeń wykazuje statystycznie istotny wzrost w porównaniu z jednoczesną kontrolą ujemną,
- ocena przeprowadzona z zastosowaniem odpowiedniego testu tendencji pokazuje, że wzrost jest powiązany ze stężeniem (zob. pkt 33),
- którykolwiek z wyników znajduje się poza rozkładem danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej (np. poza granicą kontrolną wyznaczającą przedział 95 % na podstawie rozkładu Poissona; zob. pkt 48).

W przypadku gdy wszystkie wspomniane kryteria są spełnione, uznaje się, że badana substancja chemiczna jest w stanie wywołać mutacje w danym układzie badawczym. Zalecenia dotyczące najodpowiedniejszych metod statystycznych można znaleźć w literaturze (66)(67).

66. O ile wszystkie kryteria dopuszczalności są spełnione, uznaje się, że badana substancja chemiczna daje wynik wyraźnie ujemny, jeżeli we wszystkich zbadanych warunkach doświadczalnych (zob. pkt 33):

- żadne z badanych stężeń nie wykazuje statystycznie istotnego wzrostu w porównaniu z równoczesną kontrolą ujemną,
- ocena przeprowadzona z zastosowaniem odpowiedniego testu tendencji pokazuje, że wzrost nie jest powiązany ze stężeniem,
- wszystkie wyniki mieszczą się w rozkładzie danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej (np. w granicach kontrolnych wyznaczających przedział 95 % na podstawie rozkładu Poissona; zob. pkt 48).

Badaną substancję chemiczną uznaje się następnie za niezdolną do wywołania mutacji w danym układzie badawczym.

*Zarówno w przypadku badania mysich chłoniaków i badania TK6:*

67. Jeżeli maksymalne stężenie określono na podstawie cytotoksyczności, należy dążyć do tego, by poziom takiego maksymalnego stężenia doprowadził do uzyskania względnego wzrostu całkowitego / względnego wskaźnika przeżyć na poziomie od 20 do 10 %. Istnieje zgoda co do tego, że należy zachować ostrożność podczas interpretowania wyników dodatnich występujących jedynie między 20 i 10 % względnego wzrostu całkowitego / względnego wskaźnika przeżyć, a wyniku nie uznaje się za dodatni, jeżeli wzrost częstości występowania mutacji nastąpił tylko na poziomie lub poniżej 10 % względnego wzrostu całkowitego / względnego wskaźnika przeżyć (jeżeli podlegał ocenie) (2)(59).
68. W niektórych okolicznościach dodatkowe informacje mogą okazać się pomocne w ustaleniu, czy badana substancja chemiczna nie jest mutagenna, kiedy w żadnej z kultur nie odnotowuje się wartości względnego wzrostu całkowitego między 10–20 % względnego wzrostu całkowitego / względnego wskaźnika przeżyć. Są to następujące sytuacje: (1) Nie ma objawów mutagenności (np. brak zależności dawka-odpowiedź, brak częstości występowania mutacji wyższych niż zaobserwowane w jednoczesnej kontroli ujemnej lub w historycznych zakresach tła itp.) w szeregu punktów danych w zakresie 100–20 % względnego wzrostu całkowitego / względnego wskaźnika przeżyć, a co najmniej jeden punkt danych znajduje się w zakresie 20–25 % względnego wzrostu całkowitego / względnego wskaźnika przeżyć. (2) Nie ma objawów mutagenności (np. brak zależności dawka-odpowiedź, brak częstości występowania mutacji wyższych niż zaobserwowane w jednoczesnej kontroli ujemnej lub w historycznych zakresach tła itp.) w szeregu punktów danych w zakresie 100–25 % względnego wzrostu całkowitego / względnego wskaźnika przeżyć, a jeden punkt danych jest ujemny i jego wartość wynosi niewiele poniżej 10 % względnego wzrostu całkowitego / względnego wskaźnika przeżyć. W obu tych sytuacjach można stwierdzić, że badana substancja chemiczna daje wynik ujemny.
69. Weryfikacja jednoznacznie dodatniej lub ujemnej reakcji nie jest wymagana.
70. Jeżeli reakcja nie jest ani wyraźnie dodatnia, ani wyraźnie ujemna, jak opisano powyżej, oraz aby ułatwić ustalenie biologicznego znaczenia wyniku, dane powinny zostać ocenione w oparciu o opinię eksperta lub wyniki dalszych badań. Przydatne może być powtórne przeprowadzenie doświadczenia, potencjalnie z zastosowaniem zmienionych warunków doświadczalnych [np. z zastosowaniem odstępów czasu między stężeniami w celu zwiększenia prawdopodobieństwa uzyskania punktów danych w zakresie 10–20 % względnego wzrostu całkowitego / względnego wskaźnika przeżyć, wykorzystując inne warunki aktywacji metabolicznej (tj. stężenie S9 lub pochodzenie S9) oraz czas poddawania działaniu substancji chemicznej].
71. W rzadkich przypadkach nawet po przeprowadzeniu dalszych badań uzyskany zbiór danych uniemożliwi uznanie wyników za dodatnie lub ujemne. W takiej sytuacji

należy uznać, że reakcja badanej substancji chemicznej jest niejednoznaczna (tj. może zostać zinterpretowana zarówno jako dodatnia, jak i jako ujemna).

## **SPRAWOZDANIE Z BADANIA**

72. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

*Badana substancja chemiczna:*

- źródło, numer partii, termin przydatności, jeżeli jest dostępny,
- stabilność badanej substancji chemicznej, jeżeli jest znana,
- rozpuszczalność i stabilność badanej substancji chemicznej w rozpuszczalniku, jeżeli są znane,
- pomiar pH, osmolalności i osadu w podłożu, do którego dodano badaną substancję chemiczną, stosownie do przypadku;

*substancja jednoskładnikowa:*

- wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne,
- dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa IUPAC lub CAS, numer CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny, czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń, stosownie do przypadku i jeśli jest to praktycznie wykonalne, itp.;

*substancja wieloskładnikowa, UVCB i mieszaniny:*

- opisane w miarę możliwości przez podanie nazwy chemicznej (zob. powyżej), określenie ilości oraz istotnych właściwości fizykochemicznych składników.

*Rozpuszczalnik:*

- uzasadnienie wyboru rozpuszczalnika,
- zawartość procentowa rozpuszczalnika w końcowym podłożu.

*Komórki:*

W przypadku głównych kultur laboratoryjnych:

- rodzaj i źródło komórek oraz historia w laboratorium badawczym,
- cechy kariotypu lub zmienna liczba chromosomów,
- metody utrzymywania kultur komórkowych,
- brak mikoplazmy,
- czasy podwojenia komórek.

*Warunki badania:*

- uzasadnienie wyboru stężeń oraz liczby kultur komórkowych; z uwzględnieniem np. danych dotyczących cytotoksyczności oraz granic rozpuszczalności,
- skład podłoża, stężenie CO<sub>2</sub>, poziom wilgotności,
- stężenie badanej substancji chemicznej wyrażone jako stężenie końcowe w podłożu (np. µg lub mg/ml lub mM podłoża),
- stężenie (lub objętość) rozpuszczalnika i badanej substancji chemicznej dodanych do podłoża,
- temperatura inkubacji,
- okres inkubacji,
- czas poddawania działaniu substancji chemicznej,
- zagęszczenie komórek w trakcie poddawania działaniu substancji,
- typ oraz skład układu metabolizującego (źródło frakcji S9, metoda przygotowania preparatu frakcji S9, stężenie lub objętość preparatu frakcji S9 i frakcji S9 w końcowym podłożu, kontrole jakości frakcji S9),
- substancje służące do kontroli dodatniej i ujemnej, stężenia końcowe w poszczególnych warunkach poddawania działaniu substancji chemicznej,
- długość okresu ekspresji (w tym liczba posianych komórek i podkultur oraz – w stosownych przypadkach – schematy żywienia),
- nazwa czynnika selektywnego i jego stężenie,
- w przypadku badania mysich chłoniaków należy wskazać zastosowaną wersję badania (agar lub mikropłytki),
- kryteria dopuszczalności badań,
- metody wykorzystywane do wyliczenia liczby żywotnych i zmutowanych komórek,
- metody wykorzystywane do pomiaru cytotoksyczności,
- wszelkie informacje uzupełniające istotne w kontekście cytotoksyczności i stosowanej metody,
- czas trwania okresów inkubacji po posiewie,
- definicja kolonii, których rozmiary oraz typy są brane pod uwagę (łącznie z kryteriami dotyczącymi „małych” oraz „dużych” kolonii, w stosownych przypadkach),
- kryteria uznawania wyników badań za dodatnie, ujemne lub niejednoznaczne,

- metody stosowane w celu ustalenia poziomu pH, osmolalności, jeżeli jest badana i strącania, w stosownych przypadkach.

#### *Wyniki:*

- liczba komórek poddanych działaniu substancji chemicznej i liczba komórek w hodowli pochodnej z każdej kultury,
- parametry toksyczności (względny wzrost całkowity w przypadku badania mysich chłoniaków i względny wskaźnik przeżyć w przypadku badania TK6),
- oznaki strącania i czas oznaczenia,
- liczba komórek posianych na podłożu selektywnym i nieselektywnym,
- liczba kolonii na podłożu nieselektywnym i liczba odpornych kolonii na podłożu selektywnym oraz powiązane częstości występowania mutacji,
- sortowanie według rozmiarów w przypadku dodatnich i ujemnych kontroli oraz jeżeli badana substancja chemiczna daje wynik dodatni, przy co najmniej jednym stężeniu, oraz powiązane częstości występowania mutacji,
- w stosownych przypadkach zależność stężenie-odpowiedź,
- dane dotyczące jednoczesnych kontroli ujemnych (z rozpuszczalnikiem) i dodatnich (stężenia i rozpuszczalniki),
- dane dotyczące historycznych kontroli ujemnych (z rozpuszczalnikiem) i dodatnich (stężenia i rozpuszczalniki) z uwzględnieniem zakresów, średnich i odchyłeń standardowych; liczba badań, na których oparto kontrole historyczne,
- analizy statystyczne (dla poszczególnych kultur oraz, w stosownych przypadkach, połączonych kontrprób) oraz p-wartości, jeżeli występują; oraz w przypadku badania mysich chłoniaków ocena globalnego czynnika oceny.

#### *Omówienie wyników*

#### *Wniosek*



## BIBLIOGRAFIA

- (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. i 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.” nr 35 (3), s. 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. i Stankowski, L.F. Jr. (2002). *Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: Follow-Up International Workshop on Genotoxicity Test Procedures, New Orleans, Louisiana* (kwiecień 2000) „Environ. Mol. Mutagen.” nr 40 (4), s. 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. i Yoshimura, I. (2003). *Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: International Workshop (Plymouth, UK) on Genotoxicity Test Procedures Workgroup Report*, „Mutation Res.” nr 540, s. 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. i 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.” nr 47 (1), s. 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. i 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.” nr 627 (1), s. 36–40.

- (6) OECD (2016). *Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015*. [W:] Publikacje na temat środowiska, seria dotycząca badań i oceny nr 234. Paryż: OECD.
- (7) M.D. Fellows, T. Luker, A. Cooper i M.R. O'Donovan (2012). *Unusual Structure-Genotoxicity Relationship in Mouse Lymphoma Cells Observed with a Series of Kinase Inhibitors*. „Mutation. Res.” nr 746 (1), s. 21–28.
- (8) Honma, M., Momose, M., Sakamoto, H., Sofuni, T. i Hayashi, M. (2001). *Spindol Poisons Induce Allelic Loss in Mouse Lymphoma Cells Through Mitotic Non-Disjunction*. „Mutation Res.” nr 493 (1–2), s. 101–114.
- (9) Wang, J., Sawyer, J.R., Chen, L., Chen, T., Honma, M., Mei, N. i Moore, M.M. (2009). *The Mouse Lymphoma Assay Detects Recombination, Deletion, and Aneuploidy*, „Toxicol. Sci.” nr 109 (1), s. 96–105.
- (10) Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A., i Hozier, J.C. (1990). *Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells*. „Proc. National. Academy. Sci. USA” nr 87 (1), s. 51–55.
- (11) Hozier, J., Sawyer, J., Moore, M., Howard, B. i Clive, D. (1981). *Cytogenetic Analysis of the L5178Y/TK<sup>+/-</sup> Leads to TK<sup>-/-</sup> Mouse Lymphoma Mutagenesis Assay System*, „Mutation Res.” nr 84 (1), s. 169–181.
- (12) Hozier, J., Sawyer, J., Clive, D. i Moore, M.M. (1985). *Chromosome 11 Aberrations in Small Colony L5178Y TK<sup>-/-</sup> Mutants Early in their Clonal History*, „Mutation Res.” nr 147 (5), s. 237–242.
- (13) Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. i Sawyer, J. (1985). *Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFTr) Mutants of L5178Y/TK<sup>+/-</sup> Mouse Lymphoma Cells*. „Mutation. Res.” nr 151 (1), s. 161–174.
- (14) Liber H.L., Call K.M. i Little J.B. (1987). *Molecular and Biochemical Analyses of Spontaneous and X-Ray-Induced Mutants in Human Lymphoblastoid Cells*. „Mutation. Res.” nr 178 (1), s. 143–153.

- (15) Li C.Y., Yandell D.W. i Little J.B. (1992). *Molecular Mechanisms of Spontaneous and Induced Loss of Heterozygosity in Human Cells In Vitro*. „Somat. Cell Mol. Genet.” nr 18 (1), s. 77–87.
- (16) Honma M., Hayashi M. i Sofuni T. (1997). *Cytotoxic and Mutagenic Responses to X-Rays and Chemical Mutagens in Normal and P53-Mutated Human Lymphoblastoid Cells*. „Mutation. Res.” nr 374 (1), s. 89–98.
- (17) Honma, M., Momose, M., Tanabe, H., Sakamoto, H., Yu, Y., Little, J.B., Sofuni, T. i Hayashi, M. (2000). *Requirement of Wild-Type P53 Protein for Maintenance of Chromosomal Integrity*. „Mol. Carcinogen.” nr 28 (4), s. 203–14.
- (18) Amundson S.A. i 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.” nr 267 (1), s. 89–95.
- (19) Schisler M.R., Moore M.M. i Gollapudi B.B. (2013). *In Vitro Mouse Lymphoma (L5178Y TK<sup>+/−</sup> -3.7.2C) Forward Mutation Assay*. [W:] *Protocols in Genotoxicity Assessment* A. Dhawan i M. Bajpayee (red.), Springer Protocols, Humana Press, s. 27–50.
- (20) Long, L.H., Kirkland, D., Whitwell, J. i 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.” nr 634 (1–2), s. 177–183.
- (21) Nesslany, F., Simar-Meintieres, S., Watzinger, M., Talahari, I. i Marzin, D. (2008). *Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid*. „Environ. Mol. Mutagen.” nr 49 (6), s. 439–452.
- (22) Brusick D. (1986). *Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion Concentrations*. „Environ. Mutagen.” nr 8 (6), s. 879–886.
- (23) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. i Okumura, K. (1992). *Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells*. „Mutation Res.” nr 268 (2), s. 297–305.
- (24) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M.Jr, Brusick, D., Ashby, J. i Myhr, B.C. (1991). *Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPENC Task Group 9*. „Mutation Res.” nr 257, s. 147–204.
- (25) Wang J., Heflich R.H. i 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.” nr 626 (1–2), s. 185–190.

- (26) Fischer, G.A. (1958). *Studies on the Culture of Leukemic Cells In Vitro.* „Ann. N.Y. Academy Sci.” nr 76: s. 673–680.
- (27) Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson, A.G. i Brown, M.M.M. (1979). *Validation and Characterization of the L5178Y/TK<sup>+/-</sup> - Mouse Lymphoma Mutagen Assay System.* „Mutation Res.” nr 59 (1), s. 61–108.
- (28) Sawyer, J., Moore, M.M., Clive, D. i Hozier, J. (1985). *Cytogenetic Characterization of the L5178Y TK<sup>+/-</sup> 3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line,* „Mutation Res.” nr 147 (5), s. 243–253.
- (29) Sawyer J.R., Moore M.M. i Hozier J.C. (1989). *High-Resolution Cytogenetic Characterization of the L5178Y TK<sup>+/-</sup> Mouse Lymphoma Cell Line,* „Mutation Res.” nr 214 (2), s. 181–193.
- (30) Sawyer, J.R., Binz, R.L., Wang, J. i Moore, M.M. (2006). *Multicolor Spectral Karyotyping of the L5178Y TK<sup>+/-</sup>-3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line,* „Environ. Mol. Mutagen.” nr 47 (2), s. 127–131.
- (31) Fellows, M.D., McDermott, A., Clare, K.R., Doherty, A. i 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.” nr 55 (1), s. 35–42.
- (32) Storer, R.D., Jraynak, A.R., McKelvey, T.W., Elia, M.C., Goodrow, T.L. i 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.” nr 373 (2), s. 157–165.
- (33) Clark L.S., Harrington-Brock, K., Wang, J., Sargent, L., Lowry, D., Reynolds, S.H. i 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.” nr 19 (4), s. 263–268.
- (34) Skopek T.R., Liber, H.L., Penman, B.W. i 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.” nr 84 (2), s. 411–416.

- (35) Honma M. (2005). *Generation of Loss of Heterozygosity and its Dependency on P53 Status in Human Lymphoblastoid Cells*. „Environ. Mol. Mutagen.” nr 45 (2–3), s. 162–176.
- (36) Xia, F., Wang, X., Wang, Y.H., Tsang, N.M., Yandell, D.W., Kelsey, K.T. i 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.” nr 55 (1), s. 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*. (Tekst w przygotowaniu).
- (38) Lloyd M. i Kidd D. (2012). *The Mouse Lymphoma Assay*. [W:] *Springer Protocols: Methods in Molecular Biology 817, Genetic Toxicology Principles and Methods*. Parry i Parry (red.), Humana Press. ISBN, 978-1-61779-420-9, s. 35–54.
- (39) Mei N., Guo X. i Moore M.M. (2014). *Methods for Using the Mouse Lymphoma Assay to Screen for Chemical Mutagenicity and Photo-Mutagenicity*. [W:] *Optimization in Drug Discover: In Vitro Methods*, Z Yan i Caldwell (red.), wydanie drugie, GW; Humana Press, Totowa, NJ.
- (40) Liber H.L. i Thilly W.G. (1982). *Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploidhuman Lymphoblasts*. „Mutation Res.” nr 94 (2), s. 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. i Stokes, W. (2005). *Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice*. ATLA nr 33 (3), s. 261–287.
- (42) Moore M.M. i Howard B.E. (1982). *Quantitation of Small Colony Trifluorothymidine-Resistant Mutants of L5178Y/TK+/- Mouse Lymphoma Cells in RPMI-1640 Medium*, „Mutation Res.” nr 104 (4–5): s. 287–294.
- (43) Ames B.N., McCann J. i Yamasaki E. (1975). *Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test*. „Mutation Res.” nr 31 (6), s. 347–364.
- (44) Maron D.M. i Ames B.N. (1983). *Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test*. „Mutation Res.” nr 113 (3–4), s. 173–215.

- (45) Natarajan, A.T., Tate, A.D., Van Buul, P.P.W., Meijers, M. i 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.” nr 37 (1), s. 83–90.
- (46) Matsuoka A., Hayashi M. i Ishidate M. Jr. (1979). *Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix In Vitro*. „Mutation Res.” nr 66 (3): s. 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.” nr 4 (1), s. 55–65
- (48) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. i Wolf, R.C. (1992). *Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in In Vitro Genotoxicity Assays*. „Mutagen.” nr 7 (3), s. 175–177.
- (49) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. i Sugimura, T. (1976). *A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, [W:] In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*. F.J. de Serres et al. (red.). North-Holland: Elsevier, s. 85–88.
- (50) Galloway S.M., et al. (1994). *Report from Working Group on In Vitro Tests for Chromosomal Aberrations*. „Mutation Res.” nr 312 (3), s. 241–261.
- (51) Johnson T.E., Umbenhauer D.R. i 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.” nr 28 (1), s. 51–59.
- (52) UNEP (2001). Konwencja sztokholmska w sprawie trwałych zanieczyszczeń organicznych, Program Narodów Zjednoczonych ds. Ochrony Środowiska (UNEP).
- (53) Krahn D.F., Barsky F.C. i McCooey K.T. (1982). *CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. [W:] Genotoxic Effects of Airborne Agents*, R.R. Tice, D.L. Costa i K.M. Schaich (red.). Nowy Jork, Plenum, s. 91–103.

- (54) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. i Brooks, A.L. (1983). *for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay*. „Environ. Mutagen.” nr 5 (6), s. 795–801.
- (55) Asakura M., Sasaki T., Sugiyama T., Arito H., Fukushima, S. i Matsushima, T. (2008). *An Improved System for Exposure of Cultured Mammalian Cells to Gaseous Compounds in the Chromosomal Aberration Assay*. „Mutation Res.” nr 652 (2), s. 122–130.
- (56) Arlett C.F., *et al.* (1989). *Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation, [W:] Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, D.J. Kirkland (red.), Cambridge University Press, s. 66–101.
- (57) Morita T., Honma M. i 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.” nr 741 (1–2), s. 32–56.
- (58) Brookmire L., Chen J.J. i Levy D.D. (2013). *Evaluation of the Highest Concentrations Used in the In Vitro Chromosome Aberrations Assay*. „Environ. Mol. Mutagen.” nr 54 (1), s. 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*. Dostępne na stronie internetowej: [<https://www.federalregister.gov/a/2012-13774>].
- (60) Honma M. i 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.”, nr 52 (5), s. 373–384.
- (61) Moore-Brown, M.M., Clive, D., Howard, B.E., Batson, A.G. i 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.” nr 85 (5), s. 363–378.
- (62) Liber H.L., Yandell D.W. i 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.” nr 216 (1), s. 9–17.
- (63) Furth E.E., Thilly, W.G., Penman, B.W., Liber, H.L. i Rand, W.M. (1981). *Quantitative Assay for Mutation in Diploid Human*

*Lymphoblasts Using Microtiter Plates.* „Anal. Biochem.” nr 110 (1), s. 1–8.

- (64) Hayashi, M, Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H. J. i Thybaud, V. (2011). *Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data.* „Mutation Res.” nr 723 (2), s. 87–90.
- (65) Ryan T.P. (2000). *Statistical Methods for Quality Improvement.* Nowy Jork: John Wiley and Sons, wydanie drugie.
- (66) OECD (2014). *Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines* [W:] Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 199. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.
- (67) Fleiss J.L., Levin B. i Paik M.C. (2003). *Statistical Methods for Rates and Proportions*, wydanie trzecie, Nowy Jork: John Wiley & Sons.



## **Dodatek 1**

### **DEFINICJE**

Aneugen: każda substancja chemiczna lub proces, który poprzez reakcję z elementami mitotycznego i mejotycznego cyklu podziału komórek prowadzi do aneuploidii w komórkach lub organizmach.

Aneuploidia: wszelkie odchylenia od zwykłej diploidalnej (lub haploidalnej) liczby chromosomów w pojedynczym chromosomie lub w większej ich liczbie, ale nie w całym zestawie lub w całych zestawach chromosomów (poliploidalność).

Mutageny powodujące substytucję: substancje chemiczne, które powodują podstawienie par zasad w DNA.

Substancja chemiczna: substancja lub mieszanina.

Skuteczność klonowania: odsetek komórek posiewanych z niską gęstością, będących w stanie przekształcić się w zdatną do zliczenia kolonię.

Klastogen: każda substancja chemiczna lub proces, które powodują strukturalne aberracje chromosomowe w populacjach komórek lub organizmów.

Cytotoksyczność: w odniesieniu do badań objętych niniejszą metodą badawczą, cytotoksyczność określa się jako obniżenie względnego wzrostu całkowitego w przypadku badania mysich chłoniaków lub względnego wskaźnika przeżyć w przypadku badania TK6.

Mutacja pierwotna: mutacja genu z rodzaju macierzystego do mutantu, który powoduje zmianę lub stratę aktywności enzymatycznej funkcji zakodowanego białka.

Mutageny typu zmiany fazy odczytu: substancje chemiczne, które powodują dodanie lub delecję pojedynczej pary zasad lub wielu par zasad w cząstce DNA.

Genotoksyczny: termin ogólny, obejmujący wszystkie rodzaje uszkodzeń DNA lub chromosomu, w tym przerwy, przegrupowania adduktów, mutacje, aberracje chromosomowe i aneuploidię. Nie wszystkie rodzaje skutków genotoksycznych powodują mutacje lub stałe uszkodzenia chromosomu.

Rekombinacja mitotyczna: zachodząca podczas mitozy rekombinacja między chromatydami homologicznymi, której możliwe skutki to indukowanie pęknięć łańcucha DNA lub utrata heterozygotyczności.

Mutageny: powoduje dziedziczne zmiany w sekwencji lub sekwencjach par zasad DNA w genach lub w strukturze chromosomów (aberracje chromosomowe).

Częstość występowania mutacji (MF): liczba zaobserwowanych zmutowanych komórek podzielona przez liczbę komórek zdolnych do życia.

Czas ekspresji fenotypowej: czas po poddaniu działaniu substancji chemicznej, w którym zmiana genetyczna utrwalana jest w genomie, a wszelkie istniejące wcześniej produkty genu są oddzielane do tego stopnia, że zmiana ulega cecha fenotypowa.

Względny wskaźnik przeżyć (RS): względny wskaźnik przeżyć wykorzystuje się do mierzenia cytotoksyczności związanej z poddawaniem działaniu substancji chemicznej w badaniu TK6. Stanowi względną skuteczność klonowania komórek posianych natychmiast po poddaniu działaniu substancji, skorygowany o wszelkie komórki utracone w trakcie działania substancji w stosunku do skuteczności klonowania w kontroli ujemnej.

Względny wzrost zawieszania (RSG): w przypadku badania mysich chłoniaków względny, całkowity, dwudniowy wzrost zawieszania badanej kultury w porównaniu z całkowitym dwudniowym całkowitym dwudniowym wzrostem zawieszania w kontroli ujemnej / kontroli z rozpuszczalnikiem (Clive i Spector, 1975). Względny wzrost zawieszania powinien obejmować względny wzrost badanej kultury w porównaniu z kontrolą ujemną / kontrolą z rozpuszczalnikiem w trakcie okresu poddawania działaniu substancji.

Względny wzrost całkowity (RTG): względny wzrost całkowity wykorzystuje się do mierzenia cytotoksyczności związanej z poddawaniem działaniu substancji chemicznej w badaniu mysich chłoniaków. Jest to miara względnego (w stosunku do grupy kontrolnej nośnika) wzrostu badanych kultur w trakcie etapów badania poddawania działaniu substancji, dwudniowej ekspresji i wybierania mutantów za pomocą klonowania. Względny wzrost zawieszania każdej badanej kultury mnoży się przez względną skuteczność klonowania badanej kultury w momencie wybierania mutantów oraz wyraża się go w odniesieniu do skuteczności klonowania w kontroli ujemnej / kontroli z rozpuszczalnikiem (Clive i Spector, 1975).

Fracje S9 uzyskane z wątroby: supernatant z homogenatu wątroby po odwirowaniu przy 9 000 g, tj. surowy ekstrakt z wątroby.

Preparat frakcji S9: preparat złożony z frakcji S9 uzyskanej z wątroby i kofaktorów niezbędnych do aktywności metabolicznej enzymów.

Wzrost zawieszania (SG): wielokrotny wzrost liczby komórek w trakcie etapów poddawania działaniu substancji i ekspresji w badaniu mysich chłoniaków. Wzrost zawieszania oblicza się poprzez pomnożenie wielokrotnego wzrostu na dzień 1 przez wielokrotny wzrost na dzień 2 w przypadku krótkoterminowego (3–4 h) poddawania działaniu substancji. W przypadku zastosowania 24-godzinnej poddawania działaniu substancji wzrost zawieszania stanowi wielokrotny wzrost podczas 24-godzinnej poddawania działaniu substancji pomnożony przez wartości wielokrotnego wzrostu w 1. i 2. dniu ekspresji.

Kontrola z rozpuszczalnikiem: ogólny termin opisujący kultury kontrolne otrzymujące wyłącznie rozpuszczalnik stosowany do rozpuszczenia badanej substancji chemicznej.

Badana substancja chemiczna: dowolna substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

Kontrole niepoddawane działaniu substancji: kontrole niepoddawane działaniu substancji są to kultury, które nie są poddawane działaniu żadnej substancji (tj. ani badanej substancji chemicznej, ani rozpuszczalnika), lecz które są przetwarzane taki sam sposób jako hodowle otrzymujące badaną substancję chemiczną.

## **Dodatek 2**

### **WZORY**

#### **Cytotoksyczność**

*W przypadku obu wersji badania mysich chłoniaków (wykorzystującej agar i wykorzystującej mikropłytki)*

Cytotoksyczność określa się jako względny wzrost całkowity (RTG), który obejmuje względny wzrost zawieszania (RSG) podczas dwudniowego okresu ekspresji oraz względną skuteczność klonowania (RCE) uzyskaną w momencie wybierania mutantów. Względny wzrost całkowity, względny wzrost zawieszania oraz względną skuteczność klonowania wyraża się jako procent.

**Obliczanie względnego wzrostu zawieszania:** Pierwsza wartość wzrostu zawieszania ( $SG_1$ ) to szybkość wzrostu między dniem 0 a dniem 1 (stężenie komórek na dzień 1 / stężenie komórek na dzień 0), a druga wartość wzrostu zawieszania ( $SG_2$ ) to szybkość wzrostu między dniem 1 a dniem 2 (stężenie komórek na dzień 2 / stężenie komórek na dzień 1). Względny wzrost zawieszania to całkowity wzrost zawieszania ( $SG_1 \times SG_2$ ) dla danej kultury poddawanej działaniu substancji w porównaniu z kontrolą niepoddawaną działaniu substancji / kontroli z rozpuszczalnikiem. Czyli:  $RSG = [SG_{1(test)} \times SG_{2(test)}] / [SG_{1(control)} \times SG_{2(control)}]$   $SG_1$  należy obliczyć na podstawie wstępnego stężenia komórek zastosowanego na początku poddawania komórek działaniu substancji. Pozwala to uwzględnić wszelką różnicową cytotoksyczność, która występuje w badanych kulturach w trakcie poddawania komórek działaniu substancji chemicznej.

Względna skuteczność klonowania to względna skuteczność klonowania badanej kultury w porównaniu ze względną skutecznością klonowania w kontroli ujemnej / kontroli z rozpuszczalnikiem uzyskaną w momencie wybierania mutantów.

**Względny wzrost całkowity (RTG):**  $RTG = RSG \times RCE$

### **TK6**

#### **Względny wskaźnik przeżyć (RS):**

Ocenę cytotoksyczności przeprowadza się w oparciu o względny wskaźnik przeżyć, tj. wskaźnik skuteczności klonowania komórek posianych natychmiast po poddaniu działaniu substancji, skorygowany o wszelkie komórki utracone w trakcie działania substancji w stosunku do skuteczności klonowania w kontrolach ujemnych (którym przypisano wskaźnik przeżycia wynoszący 100 %). Dostosowanie z tytułu utraty komórek podczas poddawania działaniu substancji można obliczyć następująco:

$$\text{Dostosowana SK} = SK \times \frac{\text{Liczba komórek pod koniec okresu narażenia}}{\text{Liczba komórek na początku okresu narażenia}}$$

Względny wskaźnik przeżyć kultury poddanej działaniu badanej substancji chemicznej oblicza się w następujący sposób:

$$RS = \frac{\text{Dostosowana SK w kulturze poddanej działaniu}}{\text{Dostosowana SK w kontroli z rozpuszczalnikiem}} \times 100$$

### **Częstość występowania mutacji zarówno w badaniu mysich chłoniaków, jak i badaniu TK6**

Częstość występowania mutacji (MF) to skuteczność klonowania kolonii zmutowanych komórek w podłożu selektywnym ( $CE_M$ ) skorygowana o skuteczność klonowania w podłożu nieselektywnym w momencie wybierania mutantów ( $CE_V$ ). Czyli,  $MF = CE_M/CE_V$ . Poniżej opisano obliczenia tych dwóch wartości skuteczności klonowania w metodzie klonowania z wykorzystaniem agaru i metodzie klonowania z wykorzystaniem mikropłytek.

*Wersja badania mysich chłoniaków z wykorzystaniem agaru:* W wersji badania mysich chłoniaków z wykorzystaniem miękkiego agaru, liczbę kultur na płytce wyboru mutantów ( $C_M$ ) oraz liczbę kultur na płytce niewybranych lub skuteczności klonowania (liczba zdolnych do życia)( $C_V$ ) uzyskuje się dzięki bezpośredniemu zliczeniu klonów. Jeżeli umieszczono 600 komórek na płytkach skuteczności klonowania ( $CE$ ), wybierania mutantów ( $CE_M$ ) i płytkach niewybranych lub skuteczności klonowania (liczba zdolnych do życia)( $C_V$ ), a  $3 \times 10^6$  komórek wykorzystano do wybierania mutantów,

$$CE_M = C_M / (3 \times 10^6) = (C_M / 3) \times 10^{-6}$$

$$CE_V = C_V / 600$$

*Wersja badania mysich chłoniaków i TK6 wykorzystująca mikropłytki:* W wersji badania mysich chłoniaków wykorzystującej mikropłytki  $C_M$  i  $C_V$  określa się jako wynik całkowitej liczby mikropłytek ( $TW$ ) i prawdopodobnej liczby kultur na płytce ( $P$ ) na mikropłytkach.

$$C_M = P_M \times TW_M$$

$$C_V = P_V \times TW_V$$

Poczynając od wyrazu zerowego rozkładu Poissona (Furth i in., 1981),  $P$  uzyskuje się z

$$P = -\ln(EW / TW)$$

Gdzie  $EW$  oznacza puste dołki, a  $TW$  wszystkie dołki. W związku z tym

$$CE_M = C_M / T_M = (P_M \times TW_M) / T_M$$

$$CE_v = C_v / T_v = (P_v \times TW_v) / T_v$$

W wersji badania mysich chłoniaków na mikroplówkach częstości występowania mutacji w małych i dużych koloniach oblicza się w ten sam sposób, wykorzystując odpowiednią liczbę pustych dołków dla małych i dużych kolonii.

W przypadku badania TK6 częstości występowania mutacji w małych i dużych koloniach są oparte na wcześnie pojawiających się i późno pojawiających się mutacjach.

**B.68 METODA BADAWCZA *IN VITRO* KRÓTKIEGO OKRESU NARAŻENIA DO CELÓW IDENTYFIKACJI i) SUBSTANCJI CHEMICZNYCH POWODUJĄCYCH POWAŻNE USZKODZENIE OCZU ORAZ ii) SUBSTANCJI CHEMICZNYCH, KTÓRE NIE WYMAGAJĄ ZAKLASYFIKOWANIA JAKO SUBSTANCJE DRAŻNIĄCE OCZY LUB POWODUJĄCE POWAŻNE USZKODZENIE OCZU.**

**WPROWADZENIE**

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD (TG) nr 491 (2017). Metoda badania krótkiego okresu narażenia (STE) jest metodą badawczą *in vitro*, którą można stosować w niektórych okolicznościach i przy określonych ograniczeniach na potrzeby klasyfikacji pod względem zagrożeń i oznakowania substancji chemicznych (substancji i mieszanin) powodujących poważne uszkodzenie oczu, jak również substancji chemicznych, które nie wymagają klasyfikacji jako powodujące poważne uszkodzenie lub podrażnienie oczu, określonych przez Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów Organizacji Narodów Zjednoczonych (GHS ONZ) (1) oraz rozporządzenie Unii Europejskiej (WE) nr 1272/2008 w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin (rozporządzenie CLP)<sup>1</sup>.
2. Potencjalne działanie substancji chemicznych szkodliwe dla oczu oceniano przez wiele lat przede wszystkim za pomocą badania na oku królika *in vivo* (metoda badawcza B.5 (8), równoważna z wytyczną OECD TG 405). Powszechnie uznaje się, że w dającej się przewidzieć przyszłości żadne pojedyncze alternatywne badanie *in vitro* nie będzie w stanie w pełni zastąpić badania na oku królika *in vivo* na potrzeby prognozowania pełnego zakresu działania drażniącego różnych klas chemicznych. Jest jednak możliwe, że strategiczne połączenia alternatywnych metod badawczych przeprowadzonych w ramach (zintegrowanej) strategii badań będą mogły w pełni zastąpić badanie na oku królika (2). Podejście odgórne opracowano na potrzeby badania substancji chemicznych, w przypadku których można oczekiwać w oparciu o istniejącą wiedzę, że posiada wysoki potencjał działania drażniącego lub spowodowania poważnego uszkodzenia oczu. Z kolei podejście oddolne opracowano na potrzeby badania substancji chemicznych, w przypadku których można oczekiwać w oparciu o istniejącą wiedzę, że nie spowoduje podrażnienia oczu w stopniu

---

<sup>1</sup> Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniające i uchylające dyrektywy 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1907/2006, Dz.U. L 353 z 31.12.2008, s. 1.

wymagającym zaklasyfikowania. Chociaż uważa się, że metoda badawcza krótkiego okresu narażenia nie może całkowicie zastąpić badania na oku królika *in vivo*, jest odpowiednia do stosowania w ramach zintegrowanej strategii badań do celów regulacyjnej klasyfikacji i oznakowania, np. w podejściu odgórnym/oddolnym, do identyfikacji bez dalszych badań (i) substancji chemicznych powodujących poważne uszkodzenie oczu (kategoria 1 wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP) oraz (ii) substancji chemicznych (z wyjątkiem wysoce lotnych substancji i wszystkich substancji chemicznych w stanie stałym, które nie są środkami powierzchniowo czynnymi), które nie wymagają klasyfikacji jako powodujące poważne uszkodzenie lub podrażnienie oczu (brak kategorii wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP) (1)(2). Konieczne będzie jednak przeprowadzenie dodatkowego badania w odniesieniu do substancji chemicznej, w przypadku której nie przewidziano, że spowoduje poważne uszkodzenie oczu (kategoria 1 wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP) lub której nie zaklasyfikowano do grupy substancji oznaczonej jako „brak kategorii” wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP (nie powoduje poważnego uszkodzenia lub podrażnienia oczu) w ramach metody badawczej krótkiego okresu narażenia, w celu ustanowienia ostatecznej klasyfikacji. Ponadto przed zastosowaniem metody badawczej krótkiego okresu narażenia w ramach podejścia oddolnego zgodnie z systemami klasyfikacji innymi niż GHS ONZ / rozporządzeniem CLP należy skonsultować się z odpowiednimi organami regulacyjnymi. Na wybór najbardziej odpowiedniej metody badawczej i zastosowanie niniejszej metody badawczej należy patrzeć w kontekście wytycznych OECD w sprawie zintegrowanych podejść do badań i oceny dotyczących poważnych uszkodzeń i podrażnień oczu (14).

3. Niniejsza metoda badawcza ma na celu opisanie procedur stosowanych do oceny potencjalnego działania szkodliwego dla oczu badanej substancji chemicznej na podstawie jej potencjału wywoływania cytotoksyczności w metodzie badawczej krótkiego okresu narażenia. Cytotoksyczny wpływ substancji chemicznych na komórki nabłonka rogówki stanowi istotny sposób działania wywołujący uszkodzenie nabłonka rogówki i podrażnienie oka. Żywotność komórek ocenia się w ramach metody badawczej krótkiego okresu narażenia za pomocą pomiaru ilościowego – po ekstrakcji z komórek – niebieskiej soli formazanu, wytworzonej w żywych komórkach metodą enzymatycznej konwersji barwnika przyżyciowego MTT (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylotetrazoliowy) (3). Uzyskaną w ten sposób żywotność komórek porównuje się do kontroli z rozpuszczalnikiem (względna żywotność) i wykorzystuje do oszacowania potencjalnego działania szkodliwego dla oczu badanej substancji chemicznej. Badaną substancję chemiczną klasyfikuje się jako substancję kategorii 1 wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP, jeżeli zarówno stężenia 5 % i 0,05 % prowadzą do żywotności komórek niższej niż lub równej ( $\leq$ ) 70 %. Z drugiej strony przewiduje się, że substancja chemiczna zalicza się do grupy



substancji „brak kategorii” wg GHZ ONZ / rozporządzenia CLP, jeżeli zarówno stężenia 5 % i 0,05 % prowadzą do żywotności komórek wyższej niż (>) 70 %.

4. Termin „badana substancja chemiczna” jest używany w niniejszej metodzie badawczej w odniesieniu do badanej substancji, i nie jest powiązany z zastosowaniem metody badawczej krótkiego okresu narażenia do badania substancji lub mieszanin. Definicje znajdują się w dodatku.

## **ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA**

5. Niniejsza metoda badawcza bazuje na protokole opracowanym przez Kao Corporation (4), który został poddany dwóm różnym badaniom walidacyjnym: jednemu, które zostało przeprowadzone przez Komitet Walidacyjny Japońskiego Towarzystwa ds. Rozwiązań Alternatywnych Wobec Eksperymentów na Zwierzętach (JSAAE) (5) i drugiemu, które zostało przeprowadzone przez Japońskie Centrum ds. Uznawania Metod Alternatywnych (JaCVAM) (6). Wzajemna ocena została przeprowadzona przez NICEATM/ICCVAM na podstawie treści sprawozdań z zastosowania metody badawczej oraz dokumentów przeglądowych poświęconych metodzie badawczej (7).
6. W przypadku wykorzystania metody badawczej krótkiego okresu narażenia do identyfikacji substancji chemicznych (substancji i mieszanin) na 125 substancjach chemicznych (zarówno substancjach, jak i mieszaninach) powodujących poważne uszkodzenie oczu (kategoria 1 wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP) metoda ta wykazuje ogólną dokładność na poziomie 83 % (104/125), odsetek wyników fałszywie dodatnich na poziomie 1 % (1/86) oraz odsetek wyników fałszywie ujemnych na poziomie 51 % (20/39) w porównaniu do danych uzyskanych w wyniku metody badań na oku królika *in vivo* (7). Uzyskany odsetek wyników fałszywie ujemnych nie ma decydującego znaczenia w tym kontekście, ponieważ wszystkie badane substancje chemiczne, które charakteryzują się żywotnością komórek  $\leq 70$  % przy stężeniu 5 % i  $> 70$  % przy stężeniu 0,05 %, byłyby następnie badane za pomocą innych odpowiednio zwalidowanych metod badawczych *in vitro*, lub – w ostateczności – w ramach badania na oku królika *in vivo*, w zależności od obowiązujących wymogów regulacyjnych oraz zgodnie ze strategią badań sekwencyjnych oraz aktualnie zalecanymi podejściami bazującymi na analizie wagi dowodów (1)(8). Badaniu poddano głównie substancje jednoskładnikowe, chociaż istnieje również ograniczona ilość danych dotyczących badania mieszanin. Niniejsza metoda badawcza ma jednak zastosowanie techniczne w odniesieniu do badania zarówno substancji wieloskładnikowych, jak i mieszanin. Przed zastosowaniem niniejszej metody badawczej z użyciem mieszaniny w celu zgromadzenia danych na potrzeby założonego celu regulacyjnego należy jednak zastanowić się nad tym, czy zastosowanie niniejszej metody może doprowadzić do uzyskania wyników odpowiednich z punktu widzenia tego celu, a jeżeli tak – dlaczego. Przeprowadzenie

takiej analizy nie jest konieczne, jeżeli istnieje wymóg regulacyjny dotyczący badania danej mieszaniny. Zastosowanie metody badawczej krótkiego okresu narażenia w celu zidentyfikowania badanej substancji chemicznej jako substancji kategorii 1 wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP nie ujawniło żadnych innych konkretnych niedociągnięć. Osoby przeprowadzające badanie mogą rozważyć zastosowanie niniejszej metody badawczej w odniesieniu do badanych substancji chemicznych, wskutek czego żywotność komórek  $\leq 70\%$  zarówno przy stężeniu  $5\%$ , jak i przy stężeniu  $0,05\%$ , należy zaakceptować jako wskazującą na reakcję wywołującą poważne uszkodzenie oczu, w którym to przypadku należy daną substancję zaklasyfikować do kategorii 1 wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP bez dalszych badań.

7. W przypadku wykorzystania metody badawczej krótkiego okresu narażenia do identyfikacji substancji chemicznych (substancji i mieszanin) na 130 substancjach chemicznych (zarówno substancjach, jak i mieszaninach), które nie muszą zostać sklasyfikowane jako powodujące podrażnienie i poważne uszkodzenie oczu (tj. brak kategorii wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP), metoda ta wykazuje ogólną dokładność na poziomie  $85\%$  ( $110/130$ ), odsetek wyników fałszywie ujemnych na poziomie  $12\%$  ( $9/73$ ) oraz odsetek wyników fałszywie dodatnich na poziomie  $19\%$  ( $11/57$ ) w porównaniu do danych uzyskanych w wyniku metody badań na oku królika *in vivo* (7). W przypadku wykluczenia wysoce lotnych substancji i substancji stałych innych niż środki powierzchniowo czynne ze zbioru danych, ogólna dokładność wzrasta do  $90\%$  ( $92/102$ ), odsetek wyników fałszywie ujemnych do  $2\%$  ( $1/54$ ), a odsetek wyników fałszywie dodatnich do  $19\%$  ( $9/48$ )(7). W rezultacie potencjalne niedociągnięcia związane ze stosowaniem metody badawczej krótkiego okresu narażenia w celu zidentyfikowania badanych substancji chemicznych, które nie wymagają sklasyfikowania jako substancje powodujące podrażnienie i poważne uszkodzenie oczu (brak kategorii wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP), obejmują wysoki odsetek wyników fałszywie ujemnych w przypadku (i) wysoce lotnych substancji charakteryzujących się prężnością par powyżej  $6\text{ kPa}$  i (ii) stałych substancji chemicznych (substancji i mieszanin) innych niż środki powierzchniowo czynne i mieszaniny, w których skład wchodzi wyłącznie środki powierzchniowo czynne. Takie substancje chemiczne są wykluczone z dziedziny zastosowania metody badawczej krótkiego okresu narażenia (7).
8. Poza substancjami chemicznymi, o których mowa w pkt 6 i 7, zbiór danych wygenerowany wskutek zastosowania metody badawczej krótkiego okresu narażenia zawiera również dane z badań wewnętrznych przeprowadzonych na 40 mieszaninach, które – w porównaniu z testem działania drażniącego na oko *in vivo* wg Draize'a – wykazały dokładność na poziomie  $88\%$  ( $35/40$ ), odsetek wyników fałszywie dodatnich na poziomie  $50\%$  ( $5/10$ ) oraz odsetek wyników fałszywie ujemnych na

poziomie 0 % (0/30), do celów potencjalnego zidentyfikowania mieszanin niewymagających sklasyfikowania w ramach systemów klasyfikacji GHS ONZ / rozporządzenia CLP (9). Dlatego też metodę badawczą krótkiego okresu narażenia można stosować w celu zidentyfikowania mieszanin jako mieszanin nieprzypisanych do żadnej kategorii wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP w ramach podejścia oddolnego, z wyjątkiem mieszanin w postaci stałej innych niż mieszaniny składające się wyłącznie ze środków powierzchniowo czynnych z uwagi na rozszerzenie stosowanego ograniczenia na substancje stałe. Ponadto mieszaniny, w których skład wchodzi substancje o prężności par przekraczającej 6 kPa, powinny być oceniane w taki sposób, aby zagwarantować uniknięcie potencjalnych przypadków zaniżenia prognoz, przy czym w takiej sytuacji odpowiednie uzasadnienie należy sporządzać stosownie do specyfiki danego przypadku.

9. Metody badawczej krótkiego okresu narażenia nie można stosować do identyfikacji badanych substancji chemicznych jak substancji należących do kategorii 2 wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP lub do kategorii 2A (podrażniające oczy) lub 2B (delikatnie podrażniające oczy) wg GHS ONZ z uwagi na znaczną liczbę substancji chemicznych należących do kategorii 1 wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP, które wskutek zaniżenia prognoz są klasyfikowane jako należące do kategorii 2, 2A lub 2B wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP, oraz znaczną liczbę substancji chemicznych nieprzypisanych do żadnej kategorii, które z uwagi na zawyżenie prognoz są klasyfikowane jako należące do kategorii 2, 2A lub 2B (7). W tym celu konieczne może być przeprowadzenie dodatkowego badania, z wykorzystaniem innej odpowiedniej metody.
10. Metoda badawcza krótkiego okresu narażenia jest odpowiednia dla badanych substancji chemicznych, które zostały rozpuszczone lub jednolicie zawieszone przez co najmniej 5 minut w soli fizjologicznej, 5 % roztworze sulfotlenku dimetylu w soli fizjologicznej lub oleju mineralnym. Metoda badawcza krótkiego okresu narażenia nie jest odpowiednia dla nierozpuszczalnych badanych substancji chemicznych ani dla badanych substancji chemicznych, które nie mogą zostać jednolicie zawieszone przez co najmniej 5 minut w soli fizjologicznej, 5 % roztworze sulfotlenku dimetylu w soli fizjologicznej lub oleju mineralnym. Stosowanie oleju mineralnego w ramach metody badawczej krótkiego okresu narażenia uznaje się za dopuszczalne z uwagi na krótki okres narażenia. Dlatego też metodę badawczą krótkiego okresu narażenia uznaje się za odpowiednią do przewidywania potencjalnego działania szkodliwego dla oczu nierozpuszczalnych w wodzie badanych substancji chemicznych (np. alkoholi

tłuszczowych o długich łańcuchach lub ketonów), o ile są one mieszalne z co najmniej jednym z trzech zaproponowanych powyżej rozpuszczalników (4).

11. Termin „badana substancja chemiczna” jest używany w niniejszej metodzie badawczej w odniesieniu do substancji będącej przedmiotem badania<sup>11</sup>, i nie jest powiązany z zastosowaniem metody badawczej krótkiego okresu narażenia do badania substancji lub mieszanin.

## **ZASADA BADANIA**

12. Metoda badawcza krótkiego okresu narażenia to test *in vitro* bazujący na cytotoksyczności, który przeprowadza się na zlewającej się warstwie komórek rogówki królika spreparowanej przez Statens Seruminstitut (SIRC) hodowanej na 96-dółkowej poliwęglanowej mikropłytkie (4). Po pięciominutowym okresie narażenia na działanie badanej substancji chemicznej przeprowadza się ilościowy pomiar cytotoksyczności rozumianej jako względna żywotność komórek SIRC w ramach badania MTT (4). Obniżona żywotność komórek jest wykorzystywana do przewidywania potencjalnych działań niepożądanych, które mogą doprowadzić do uszkodzenia oczu.
13. Zgromadzone informacje wskazują, że 80 % roztworu zakroplonego do oka królika jest wydalone za pośrednictwem worka spojówkowego w okresie od trzech do czterech minut, podczas gdy ponad 80 % roztworu zakroplonego do oka człowieka jest wydalone w okresie od jednej minuty do dwóch minut (10). Metoda badawcza krótkiego okresu narażenia ma na celu zbliżenie wartości tych okresów narażenia i wykorzystanie cytotoksyczności w charakterze punktu końcowego służącego ocenieniu skali uszkodzenia komórek SIRC po pięciominutowym okresie narażenia na oddziaływanie badanej substancji chemicznej.

## **WYKAZANIE BIEGŁOŚCI**

14. Przed przystąpieniem do rutynowego stosowania metody badawczej krótkiego okresu narażenia opisanej w niniejszej metodzie badawczej laboratorium powinny wykazać swoją biegłość techniczną, prawidłowo klasyfikując jedenaście substancji

---

<sup>1</sup> W czerwcu 2013 r. na posiedzeniu wspólnym uzgodniono, że – w przypadkach, w których będzie to możliwe – w nowych, zaktualizowanych metodach badawczych należy bardziej konsekwentnie stosować termin „badana substancja chemiczna” w odniesieniu do substancji będącej przedmiotem badania.

wskazanych w tabeli 1. Wspomniane substancje dobrano w taki sposób, by reprezentowały pełne spektrum reakcji na poważne uszkodzenie oczu lub podrażnienie oczu w oparciu o wyniki badań na oku królika *in vivo* (wytyczna TG 405) oraz system klasyfikacji GHS ONZ / rozporządzenia CLP (1). Przy wyborze substancji chemicznej kierowano się również następującymi kryteriami: dostępnością tych substancji na rynku, dostępnością wysokiej jakości danych referencyjnych z badań *in vivo* oraz dostępnością wysokiej jakości danych z badań *in vitro* uzyskanych dzięki zastosowaniu metody badawczej krótkiego okresu narażenia (3). Jeżeli figurująca w wykazie substancja jest niedostępna lub jeżeli będzie to uzasadnione, dopuszcza się możliwość zastosowania innej substancji, dla której dostępne są odpowiednie dane referencyjne z badań *in vivo* i *in vitro*, pod warunkiem zastosowania tych samych kryteriów co kryteria opisane w tym miejscu.

**Tabela 1:** Wykaz substancji służących do wykazania biegłości

| Substancja                                 | Numer CAS  | Klasa chemiczna <sup>1</sup>                           | Stan skupienia | Kategoria <sup>2</sup> badania <i>in vivo</i> według klasyfikacji GHS ONZ / rozporządzenia CLP | Rozpuszczalnik w badaniu przeprowadzonym zgodnie z metodą badawczą krótkiego okresu narażenia | Kategoria badania przeprowadzanego zgodnie z metodą badawczą krótkiego okresu narażenia według klasyfikacji GHS ONZ / rozporządzenia CLP |
|--------------------------------------------|------------|--------------------------------------------------------|----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Chlorek bezalkoniowy (10 %, roztwór wodny) | 8001-54-5  | Związek onionowy                                       | Ciecz          | Kategoria 1                                                                                    | Sól fizjologiczna                                                                             | Kategoria 1                                                                                                                              |
| Triton X-100 (100 %)                       | 9002-93-1  | eter                                                   | Ciecz          | Kategoria 1                                                                                    | Sól fizjologiczna                                                                             | Kategoria 1                                                                                                                              |
| Czerwień kwasowa 92                        | 18472-87-2 | Związek heterocykliczny; związek bromu; związek chloru | Stały          | Kategoria 1                                                                                    | Sól fizjologiczna                                                                             | Kategoria 1                                                                                                                              |
| Wodorotlenek sodu                          | 1310-73-2  | Zasada; nieorganiczna substancja chemiczna             | Stały          | Kategoria 1 <sup>3</sup>                                                                       | Sól fizjologiczna                                                                             | Kategoria 1                                                                                                                              |
| Butyrolakton                               | 96-48-0    | Lakton; związek heterocykliczny                        | Ciecz          | Kategoria 2A (kategoria 2 zgodnie)                                                             | Sól fizjologiczna                                                                             | Nie można przewidzieć                                                                                                                    |

|                                            |          |                                     |       |                                                                                         |                          |                          |
|--------------------------------------------|----------|-------------------------------------|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                                            |          | y                                   |       | z rozporządzeni<br>em CLP)                                                              |                          |                          |
| 1-oktanol                                  | 111-87-5 | alkohol                             | Ciecz | Kategoria<br>2A/B <sup>4</sup><br>(kategoria 2<br>zgodnie<br>z rozporządzeni<br>em CLP) | Olej<br>mineralny        | Nie można<br>przewidzieć |
| Cyklopentanol                              | 96-41-3  | Alkohol;<br>węglowodór<br>cykliczny | Ciecz | Kategoria<br>2A/B <sup>5</sup><br>(kategoria 2<br>zgodnie<br>z rozporządzeni<br>em CLP) | Sól<br>fizjologicz<br>na | Nie można<br>przewidzieć |
| Octan 2-etoksyetylu                        | 111-15-9 | Alkohol; eter                       | Ciecz | Brak kategorii                                                                          | Sól<br>fizjologicz<br>na | Brak<br>kategorii        |
| Dodekan                                    | 112-40-3 | Węglowodór<br>acykliczny            | Ciecz | Brak kategorii                                                                          | Olej<br>mineralny        | Brak<br>kategorii        |
| Keton metylowo-<br>izobutyłowy             | 108-10-1 | Keton                               | Ciecz | Brak kategorii                                                                          | Olej<br>mineralny        | Brak<br>kategorii        |
| Siarczan <i>N,N</i> -<br>dimetyloguanidyny | 598-65-2 | Amidyna;<br>związek siarki          | Stały | Brak kategorii                                                                          | Sól<br>fizjologicz<br>na | Brak<br>kategorii        |

Skróty: Nr CAS = numer w rejestrze Chemical Abstracts Service.

<sup>1</sup> Klasy chemiczne przyporządkowano na podstawie informacji zamieszczonych we wcześniejszych publikacjach NICEATM, a w przypadku braku takich publikacji – na podstawie systemu klasyfikacji Medical Subject Headings (MeSH®) opracowanego przez National Library of Medicine (za pośrednictwem ChemIDplus® [National Library of Medicine] dostępnego na stronie internetowej <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>) oraz na podstawie ustaleń dotyczących struktury poczynionych przez NICEATM.

<sup>2</sup> Na podstawie wyników badania na oku królika *in vivo* (wytyczna OECD TG 405) i z zastosowaniem GHS ONZ / rozporządzenia CLP (1).

<sup>3</sup> Przypisano do kategorii 1 z uwagi na potencjał działania żrącego na skórę 100 % roztworu wodorotlenku sodu (wymienionego jako substancja chemiczna przeznaczona do oceny biegułości w wytycznej OECD TG 435) oraz z uwagi na kryterium ustanowione dla substancji kategorii 1 wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP (1).

<sup>4</sup> Zaklasyfikowanie do kategorii 2A lub 2B zależy od interpretacji kryterium GHS ONZ dotyczącego rozróżnienia tych dwóch kategorii, tj. 2 spośród 6 zwierząt lub 4 spośród 6 zwierząt, u których w dniu 7. odnotowano skutki niezbędne do zakwalifikowania substancji chemicznej do kategorii 2A. Zbiór danych dotyczących badań *in vivo* obejmuje 2 badania – każde z nich odbyło się z udziałem 3 zwierząt. W jednym badaniu u dwóch spośród trzech zwierząt w 7. dniu odnotowano skutki niezbędne do zakwalifikowania substancji chemicznej do kategorii 2A (11), podczas gdy w drugim badaniu wszystkie punkty końcowe u wszystkich trzech zwierząt zupełnie ustały do 7. dnia, dzięki czemu można było zaklasyfikować je do kategorii 2B (12).

<sup>5</sup> Zaklasyfikowanie do kategorii 2A lub 2B zależy od interpretacji kryterium GHS ONZ dotyczącego rozróżnienia tych dwóch kategorii, tj. 1 spośród 3 zwierząt lub 2 spośród 3 zwierząt, u których w 7. dniu odnotowano skutki niezbędne do zakwalifikowania substancji chemicznej do kategorii 2A. W badaniu *in vivo* brały udział 3 zwierzęta. Wszystkie punkty końcowe poza zmętnieniem rogówki i zaczerwienieniem spojówki u jednego zwierzęcia zupełnie ustały do dnia 7. lub wcześniej. Jedno ze zwierząt, u którego skutki działania substancji nie ustały do 7. dnia, miało zmętnienie rogówki na poziomie 1 i zaczerwienienie spojówki na poziomie 1 (w dniu 7.), które ustały w pełni w dniu 14 (11).

## PROCEDURA

### Przygotowanie jednowarstwowej hodowli komórek

15. Do badania przeprowadzanego zgodnie z metodą badawczą krótkiego okresu narażenia należy wykorzystywać linię komórkową rogówki królika SIRC. Zaleca się, aby komórki SIRC były pozyskiwane z dobrze przygotowanego banku komórek, takiego jak zbiór kultur typu amerykańskiego CCL60.
16. Komórki SIRC hoduje się w kolbie z kulturami zawierającej minimalne niezbędne podłoże Eagle'a uzupełnione 10 % roztworem bydlęcej surowicy płodowej, 2 mM L-glutaminy, 50–100 jednostkami/ml penicyliny i 50–100 µg/ml streptomycyny w temperaturze 37 °C, przy stężeniu CO<sub>2</sub> poniżej 5 % i w wilgotnym środowisku. Komórki, które zwały się w kolbie z kulturami, powinny zostać odseparowane za pomocą roztworu trypsyny i kwasu wersenowego, potencjalnie przy wykorzystaniu skrobaka do komórek. Komórki rozmnaża się (np. 2–3 pasaże) w kolbie z kulturami przed ich poddaniem rutynowym badaniom, przy czym od momentu ich rozmrożenia nie powinny być one poddane więcej niż 25 pasażom.
17. Komórki gotowe do ich poddania badaniu przeprowadzanemu zgodnie z metodą badawczą krótkiego okresu narażenia są następnie przygotowywane przy zachowaniu odpowiedniego zagęszczenia i posiewane na płytkach 96-dołkowych. Zalecane zagęszczenie posiewu komórek wynosi  $6,0 \times 10^3$  komórek na dołek, jeżeli komórki mają zostać wykorzystane po upływie czterech dni od dnia ich posiania, lub  $3,0 \times 10^3$  komórek na dołek, jeżeli komórki mają zostać wykorzystane po upływie pięciu dni od dnia ich posiania, przy objętości kultur wynoszącej 200 µl. Komórki wykorzystywane w badaniu przeprowadzanym zgodnie z metodą badawczą krótkiego okresu narażenia posiane na podłożu przy zachowaniu odpowiedniego zagęszczenia posiewu osiągną poziom konfluencji przekraczający 80 % w momencie przeprowadzenia badania, tj. po upływie czterech lub pięciu dni od posiewu.

### Podawanie badanej i kontrolnej substancji chemicznej

18. Preferowanym rozpuszczalnikiem do rozcieńczania badanych substancji chemicznych lub tworzenia zawiesiny z tych substancji jest sól fizjologiczna. Jeżeli badana substancja chemiczna charakteryzuje się niską rozpuszczalnością lub nie może zostać rozpuszczona ani jednolicie zawieszona przez co najmniej pięć minut w soli fizjologicznej, jako rozpuszczalnik drugiego wyboru wykorzystuje się 5 % roztwór sulfotlenku dimetylowego (nr CAS 67-68-5) w soli fizjologicznej. Jeżeli badane substancje chemiczne nie mogą zostać rozpuszczone ani jednolicie zawieszone przez co najmniej pięć minut w soli fizjologicznej ani w 5 % roztworze sulfotlenku dimetylowego w soli fizjologicznej, jako rozpuszczalnik trzeciego wyboru wykorzystuje się olej mineralny (nr CAS 8042-47-5).

19. Badane substancje chemiczne rozpuszcza się lub zawiesza się jednolicie w wybranym rozpuszczalniku w stężeniu 5 % (w/w), po czym rozcieńcza się je w ramach seryjnego procesu 10-krotnego rozcieńczania do stężenia 0,5 % i 0,05 %. Każda badana substancja chemiczna musi zostać zbadana zarówno przy stężeniu 5 %, jak i przy stężeniu 0,05 %. Komórki hodowane na płytce 96-dołkowej są poddawane działaniu 200 µl roztworu (lub zawiesiny) badanej substancji chemicznej w stężeniu 5 % albo 0,05 % na dołek przez okres pięciu minut w temperaturze pokojowej. Badane substancje chemiczne (substancje jednoskładnikowe lub substancje wieloskładnikowe lub mieszaniny) uznaje się za czyste substancje oraz substancje rozcieńczone lub zawieszone zgodnie z tą metodą, niezależnie od ich czystości.
20. Podłoże opisane w pkt 16 wykorzystuje się w odniesieniu do każdej płytki i każdego powtórzenia jako podłoże na potrzeby badania. Ponadto w ramach każdego powtórzenia komórki we wszystkich dołkach poddaje się również działaniu próbek kontroli z rozpuszczalnikiem. W przypadku rozpuszczalników wymienionych w pkt 18 potwierdzono, że nie wywierają one żadnego szkodliwego wpływu na żywotność komórek SIRC.
21. W ramach metody badawczej krótkiego okresu narażenia należy korzystać z 0,01 % roztworu dodecylo siarczanu sodu w soli fizjologicznej jako kontroli dodatniej w odniesieniu do każdej płytki przy każdym powtórzeniu. Aby obliczyć żywotność komórek w kontroli dodatniej, każda płytka w ramach każdego powtórzenia musi również zawierać kontrolę z rozpuszczalnikiem w postaci soli fizjologicznej.
22. Przeprowadzenie próby ślepej jest konieczne w celu ustalenia poziomu korekty z tytułu gęstości optycznej; próbę taką powinno się przeprowadzić na dołkach zawierających wyłącznie sól fizjologiczną buforowaną fosforanami, bez wapni i magnezu (PBS) ani komórek.
23. Każda próbka (badana substancja chemiczna w stężeniu 5 % i 0,05 %, kontrola podłoża, kontrola z rozpuszczalnikiem i kontrola dodatnia) powinna zostać zbadana trzykrotnie w ramach każdego powtórzenia poprzez narażenie komórek na oddziaływanie 200 µl odpowiedniej badanej lub kontrolnej substancji chemicznej przez okres pięciu minut w temperaturze pokojowej.
24. Substancje wzorcowe są przydatne do oceny potencjalnego działania drażniącego dla oczu nieznanymi chemikaliów z określonej klasy chemicznej lub produktowej lub do oceny względnego potencjalnego działania drażniącego substancji drażniącej dla oczu w określonym zakresie reakcji w postaci podrażnienia.

#### **Pomiar żywotności komórek**

25. Po narażeniu na działanie substancji komórki przemywa się dwukrotnie 200 µl PBS i dodaje się do nich 200 µl roztworu MTT (0,5 mg MTT / ml podłoża). Po upływie



dwugodzinnego czasu reakcji w inkubatorze (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) roztwór MTT dekantuje się po czym ekstrahuje się z niego formazan, dodając 200 µl roztworu 0,04 N kwasu chlorowodorowego – izopropanolu przez 60 minut bez dostępu światła w temperaturze pokojowej, po czym dokonuje się pomiaru absorbancji roztworu formazanu w MTT przy 570 nm za pomocą czytnika płytek. Do interferencji badanych substancji chemicznych w teście MTT (wywołanej barwnikami lub bezpośrednimi reduktorami MTT) dochodzi wyłącznie w przypadku zatrzymania znacznej ilości badanej substancji chemicznej w układzie badawczym po zakończeniu płukania po okresie narażenia – do takiej sytuacji może dojść w przypadku tkanek ludzkiej rogówki zrekonstruowanej w trójwymiarze lub zrekonstruowanego ludzkiego naskórka, ale nie w przypadku dwuwymiarowych kultur komórkowych wykorzystywanych w metodzie badawczej krótkiego okresu narażenia.

### **Interpretacja wyników i model prognozowania**

26. Wartości gęstości optycznej (OD) otrzymane dla każdej badanej substancji chemicznej są następnie wykorzystywane do obliczenia żywotności komórek w stosunku do kontroli z rozpuszczalnikiem, dla której przyjmuje się 100 %. Względną żywotność komórek wyraża się jako odsetek stanowiący iloraz wartości OD badanej substancji chemicznej i wartości OD kontroli z rozpuszczalnikiem po odjęciu wartości OD próby ślepej od obydwu tych wartości.

$$\text{Żywotność komórek (\%)} = \frac{(OD_{570} \text{ badanej substancji chemicznej}) - (OD_{570} \text{ próby ślepej})}{(OD_{570} \text{ kontroli z rozpuszczalnikiem}) - (OD_{570} \text{ próby ślepej})} \times 100$$

Podobnie względną żywotność komórek każdej kontroli z rozpuszczalnikiem wyraża się jako odsetek stanowiący iloraz wartości OD każdej kontroli z rozpuszczalnikiem i wartości OD kontroli podłoża po odjęciu wartości OD próby ślepej od obydwu tych wartości.

27. Należy przeprowadzić trzy niezależne powtórzenia, każde na trzech dołkach stanowiących kontrpróbę (tj. n = 9). Średnią arytmetyczną obliczoną dla trzech dołków w ramach każdego niezależnego powtórzenia dla każdej badanej substancji chemicznej i kontroli z rozpuszczalnikiem wykorzystuje się do obliczenia średniej arytmetycznej względnej żywotności komórek. Ostateczną średnią arytmetyczną żywotności komórek oblicza się na podstawie wyników trzech niezależnych powtórzeń.
28. Wartości graniczne żywotności komórek służące do identyfikowania badanych substancji chemicznych jako powodujące poważne uszkodzenie oczu (kategoria 1 wg GHS ONZ/rozporządzenia CLP) oraz badanych substancji chemicznych, które nie wymagają zaklasyfikowania do substancji powodujących podrażnienie lub poważne uszkodzenie oczu (brak kategorii wg GHS ONZ/rozporządzenia CLP), podano poniżej.

**Tabela 2:** Model prognozowania dla metody badawczej krótkiego okresu narażenia

| Żywotność komórek |                | Klasyfikacja GHS<br>ONZ /<br>rozporządzenie CLP | Możliwość zastosowania                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|-------------------|----------------|-------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Przy 5 %          | Przy<br>0,05 % |                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| > 70 %            | > 70 %         | Brak kategorii                                  | Substancje i mieszaniny, z wyjątkiem:<br>(i) wysoce lotnych substancji charakteryzujących się prężnością par powyżej 6 kPa <sup>1</sup> ; oraz<br>(ii) stałych chemikaliów (substancji i mieszanin) innych niż środki powierzchniowo czynne i mieszaniny składające się wyłącznie ze środków powierzchniowo czynnych |
| ≤ 70 %            | > 70 %         | Nie można przewidzieć                           | Brak możliwości zastosowania                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| ≤ 70 %            | ≤ 70 %         | Kategoria 1                                     | Substancje i mieszaniny <sup>2</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                 |

<sup>1</sup> Mieszaniny, w których skład wchodzi substancje o prężności par przekraczającej 6 kPa, powinny być oceniane w taki sposób, aby zagwarantować uniknięcie potencjalnych przypadków zaniżenia prognoz, przy czym w takiej sytuacji odpowiednie uzasadnienie należy sporządzać stosownie do specyfiki danego przypadku.

<sup>2</sup> W oparciu o wyniki uzyskane głównie dla substancji jednoskładnikowych, chociaż istnieje również ograniczona ilość danych dotyczących badania mieszanin. Niniejsza metoda badawcza ma jednak zastosowanie techniczne w odniesieniu do badania zarówno substancji wieloskładnikowych, jak i mieszanin. Przed zastosowaniem niniejszej metody badawczej z użyciem mieszaniny w celu zgromadzenia danych na potrzeby założonego celu regulacyjnego należy zastanowić się, czy zastosowanie niniejszej metody może doprowadzić do uzyskania wyników odpowiednich z punktu widzenia tego celu, a jeżeli tak – dlaczego. Przeprowadzenie takiej analizy nie jest konieczne, jeżeli ustanowiono wymóg regulacyjny dotyczący badania danej mieszaniny.

### Kryteria dopuszczalności

29. Wyniki badania uznaje się za dopuszczalne w przypadku spełnienia wszystkich poniższych kryteriów:

- gęstość optyczna kontroli podłoża (narażonej na oddziaływanie podłoża) powinna wynosić 0,3 lub być wyższa po odjęciu gęstości optycznej próby ślepej;
- żywotność kontroli z rozpuszczalnikiem powinna odpowiadać 80 % żywotności kontroli podłoża lub być wyższa. Jeżeli w ramach każdego powtórzenia wykorzystuje się szereg kontroli z rozpuszczalnikiem, aby daną badaną substancję chemiczną poddaną badaniu z wykorzystaniem tych rozpuszczalników można było uznać za kwalifikującą się, każda z tych kontroli powinna charakteryzować się żywotnością komórek wyższą niż 80 %;
- żywotność komórek uzyskana w kontroli dodatniej (0,01 % SDS) powinna mieścić się w przedziale dwóch odchyłeń standardowych średniej historycznej. Górne i dolne limity dopuszczalności kontroli dodatniej powinny być często aktualizowane, tj. co najmniej co trzy miesiące lub za każdym razem, gdy dopuszczalne badanie

przeprowadza się w laboratoriach, w których rzadko przeprowadza się badania (tj. rzadziej niż raz na miesiąc). Jeżeli laboratorium nie przeprowadziło dostatecznie dużej liczby doświadczeń, aby ustalić istotny statystycznie rozkład danych z kontroli dodatkowo, dopuszcza się możliwość zastosowania górnych i dolnych limitów dopuszczalności ustanowionych przez podmiot, który opracował daną metodę badawczą, tj. od 21,1 % do 62,3 % zgodnie z historycznymi danymi laboratoryjnymi znajdującymi się w posiadaniu tego podmiotu, natomiast rozkład wewnętrzny można określić w trakcie pierwszych rutynowych badań.

- d) Odchylenie standardowe ostatecznej żywotności komórek wyprowadzone z trzech niezależnych powtórzeń powinno być niższe niż 15 % zarówno w przypadku 5 % stężenia badanej substancji chemicznej, jak i w przypadku 0,05 % stężenia tej substancji.

Jeżeli przynajmniej jedno z powyższych kryteriów nie zostało spełnione, wyniki należy odrzucić, po czym należy przeprowadzić kolejne trzy niezależne powtórzenia.

## **DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ**

### **Dane**

30. Należy przedstawić dane dotyczące poszczególnych dołków (np. wartości żywotności komórek) dla każdego powtórzenia, jak również średnią wszystkich wyników, wartość SD oraz informacje na temat klasyfikacji.

### **Sprawozdanie z badania**

31. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

*Badana substancja chemiczna oraz substancje kontrolne:*

- - substancja jednoskładnikowa: dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa(-y) IUPAC lub CAS, numer(y) w rejestrze CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny lub inne identyfikatory,
- substancja wieloskładnikowa, UVCB i mieszanina: opisana w miarę możliwości np. za pomocą nazwy chemicznej (zob. powyżej), czystości, występowania ilościowego oraz istotnych właściwości fizykochemicznych składników (zob. powyżej), w zakresie, w jakim są dostępne,
- - stan skupienia, lotność, pH, LogP, masa cząsteczkowa, klasa chemiczna oraz dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne mające znaczenie dla przebiegu badania w zakresie, w jakim są dostępne,
- czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń w stosownych przypadkach i jeśli jest to praktycznie wykonalne itp.,

- postępowanie z daną substancją przed rozpoczęciem badań, w stosownych przypadkach (np. podgrzewanie, mielenie),
- dane na temat warunków przechowywania i stabilności w zakresie, w jakim są dostępne.

#### *Warunki i procedury metody badawczej*

- nazwa i adres sponsora i placówki przeprowadzającej badanie oraz dane kierownika badań,
- opis zastosowanej metody badawczej,
- informacje na temat zastosowanej linii komórkowej, jej źródła, liczby pasaży oraz konfluencji komórek wykorzystanych w badaniu,
- szczegółowe dane na temat zastosowanej procedury badawczej,
- liczba zastosowanych powtórzeń i użytych kontrprób,
- zastosowane stężenia badanej substancji chemicznej (jeżeli różnią się od zalecanych),
- uzasadnienie wyboru rozpuszczalnika w odniesieniu do każdej badanej substancji chemicznej,
- czas narażenia na działanie badanej substancji chemicznej (jeżeli różni się od zalecanego),
- opis wszelkich modyfikacji procedury badawczej,
- opis zastosowanych kryteriów oceny i podejmowania decyzji,
- odniesienie do historycznych średnich wyników kontroli dodatniej i odchylenia standardowego (SD):
- wykazanie biegłości laboratorium w zakresie stosowania metody badawczej (np. poprzez badanie substancji służących do wykazania biegłości) lub wykazanie odtwarzalnego przeprowadzenia metody badawczej w miarę upływu czasu.

#### *Wyniki*

- dla każdej badanej substancji chemicznej i dla każdej substancji kontrolnej, a także dla każdego badanego stężenia, należy przedstawić tabelę zawierającą indywidualne wartości OD dla każdego dołka stanowiącego kontrpróbę, średnią arytmetyczną wartości OD dla każdego niezależnego powtórzenia, procentową wartość żywotności komórek dla każdego niezależnego powtórzenia oraz ostateczną średnią arytmetyczną procentowej żywotności komórek i SD dla trzech powtórzeń,
- wyniki kontroli podłoża, rozpuszczalnika i kontroli dodatniej potwierdzające spełnienie odpowiednich kryteriów dopuszczalności badania,

- opis innych zaobserwowanych skutków,
- ustalona na tej podstawie ogólna klasyfikacja odnosząca się do zastosowanego modelu prognozowania / zastosowanych kryteriów podejmowania decyzji.

*Omówienie wyników*

*Wnioski*

## **BIBLIOGRAFIA**

- (1) Organizacja Narodów Zjednoczonych (ONZ) (2013), Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów (GHS), wydanie piąte zmienione; Nowy Jork i Genewa: publikacje Organizacji Narodów Zjednoczonych. ISBN: 978-92-1-117006-1. Dostępne na stronie internetowej: [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” nr 24, s. 1–9.
- (3) Mosmann T. (1983). *Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to 7 Proliferation and Cytotoxicity Assays*. „J. Immunol. Methods” nr 65, s. 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” nr 22, s. 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” nr 25, s. 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” nr 27, s. 1855–1869.
- (7) ICCVAM (2013). *Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document*, NIH. Dostępne na stronie internetowej: [http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox\_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf].
- (8) Rozdział B.5 niniejszego załącznika, Działanie żrące/silnie drażniące na oczy.
- (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 i Robinson JR. (1973). *Altered Bioavailability of Drugs in the Eye Due to Drug-Protein Interaction*. „J. Pharm. Sci.”, s. 1648–1653.
- (11) ECETOC (1998). *Eye Irritation Reference Chemicals Data Bank*. Sprawozdanie techniczne (nr 48 (2)), Bruksela, Belgia.

- (12) Gautheron P, *et al.* (1992). *Bovine Corneal Opacity and Permeability Test: an In Vitro Assay of Ocular Irritancy*. „Fundam. Appl. Toxicol.” nr 18, s. 442–449.
- (13) OECD (2005). *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*. Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 34. Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.
- (14) OECD (2017). *Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation*. Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 263. Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

## Dodatek

### DEFINICJE

**Dokładność:** stopień zgodności wyników zastosowanej metody badawczej z przyjętymi wartościami odniesienia. Jest to miara efektywności metody badawczej i jeden z aspektów jej istotności. Pojęcia tego często używa się zamiennie z pojęciem „zgodność” na oznaczenie odsetka prawidłowych wyników uzyskiwanych przy użyciu metody badawczej (13).

**Substancja wzorcowa:** substancja używana jako wzorzec do porównań z badaną substancją chemiczną. Substancja wzorcowa powinna cechować się następującymi właściwościami: (i) stałe i wiarygodne źródło(-a); (ii) podobieństwo strukturalne i funkcjonalne do badanej klasy substancji; (iii) znane właściwości fizyczne i chemiczne; (iv) dane potwierdzające występowanie znanych skutków oraz (v) znany potencjał w zakresie pożądanych reakcji.

**Podejście oddolne:** stopniowe podejście stosowane w odniesieniu do badanej substancji chemicznej, w przypadku której podejrzewa się, że nie wymaga zaklasyfikowania jako substancja powodująca podrażnienie lub poważne uszkodzenie oka; takie podejście polega na odróżnieniu substancji chemicznych niewymagających zaklasyfikowania (wynik ujemny) od pozostałych substancji chemicznych (wynik dodatni).

**Substancja chemiczna:** substancja lub mieszanina.

**Podrażnienie oka:** zmiany w oku spowodowane zaaplikowaniem badanej substancji chemicznej na wierzchnią warstwę oka, które są w pełni odwracalne w ciągu 21 dni po zaaplikowaniu. Określenie używane zamiennie z określeniem „odwracalne skutki działania na oczy” oraz ze sformułowaniem „kategoria 2 wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP”.

**Odsetek wyników fałszywie ujemnych:** odsetek wszystkich substancji chemicznych dających wynik dodatni fałszywie zidentyfikowanych po zastosowaniu metody badawczej jako dające wynik ujemny. Jest to jeden ze wskaźników efektywności metody badawczej.

**Odsetek wyników fałszywie dodatnich:** odsetek wszystkich substancji chemicznych dających wynik ujemny fałszywie zidentyfikowanych po zastosowaniu metody badawczej jako dające wynik dodatni. Jest to jeden ze wskaźników efektywności metody badawczej.

**Zagrożenie:** nieodłączna właściwość czynnika lub sytuacja, która może potencjalnie doprowadzić do niekorzystnych skutków w przypadku narażenia organizmu, systemu lub (sub) populacji na taki czynnik.

**Kontrola podłoża:** kontrpróba niepoddana działaniu badanej substancji chemicznej zawierająca wszystkie składniki układu badawczego. Próbką ta jest przetwarzana



razem z próbkami poddanymi działaniu badanej substancji chemicznej oraz z innymi próbkami kontrolnymi w celu określenia, czy rozpuszczalnik wchodzi w reakcję z układem badawczym.

**Mieszanina:** mieszanina lub roztwór, które składają się z co najmniej dwóch substancji.

**Substancja jednoskładnikowa:** substancja zdefiniowana za pomocą jej składu ilościowego, w której jeden główny składnik występuje w stężeniu co najmniej 80 % (w/w).

**MTT:** bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylotetrazoliowy MTT.

**Substancja wieloskładnikowa:** substancja zdefiniowana za pomocą jej składu ilościowego, w której więcej niż jeden główny składnik występuje w stężeniu  $\geq 10\%$  (w/w) i  $< 80\%$  (w/w). Substancja wieloskładnikowa powstaje w wyniku procesu wytwarzania. Różnica między mieszaniną a substancją wieloskładnikową polega na tym, że mieszaninę uzyskuje się w wyniku zmieszania co najmniej dwóch substancji, między którymi nie zachodzi reakcja chemiczna. Substancja wieloskładnikowa powstaje w wyniku reakcji chemicznej.

**OD:** gęstość optyczna.

**Kontrola dodatnia:** kontrpróba zawierająca wszystkie składniki układu badawczego, poddana działaniu substancji chemicznej, o której wiadomo, że wywołuje reakcję dodatnią. Aby zapewnić możliwość oceny zmienności reakcji w kontroli dodatniej w czasie, siła reakcji w postaci silnego działania drażniącego nie może być zbyt duża.

**Istotność:** opis powiązania badania z oczekiwanym skutkiem oraz czy jest ono znaczące i użyteczne z punktu widzenia określonego celu. Jest to zakres, w jakim badanie prawidłowo mierzy lub przewiduje biologiczny oczekiwany skutek. Istotność obejmuje uwzględnienie dokładności (zgodności) metody badawczej (10).

**Wiarygodność:** miary zakresu, w jakim metoda badawcza może być przeprowadzana w sposób odtwarzalny w jednym laboratorium i pomiędzy laboratoriami na przestrzeni czasu w przypadku jej przeprowadzania przy użyciu tego samego protokołu. Ocenia się ją poprzez obliczenie odtwarzalności międzylaboratoryjnej i wewnątrzlaboratoryjnej (13).

**Czułość:** odsetek wszystkich substancji chemicznych dających wynik dodatni / aktywnych substancji chemicznych prawidłowo sklasyfikowanych za pomocą badania. Jest to miara dokładności metody badawczej, która daje wyniki definitywne i stanowi istotny parametr w ocenie istotności metody badawczej (10).

**Poważne uszkodzenie oczu:** uszkodzenie tkanki oka lub poważne fizyczne pogorszenie widzenia spowodowane zaaplikowaniem badanej substancji chemicznej na przednią powierzchnię oka, które nie jest w pełni odwracalne w ciągu 21 dni po zaaplikowaniu. Określenie używane zamiennie z określeniem „nieodwracalne skutki

działania na oczy” oraz ze sformułowaniem „kategoria 1 wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP”.

**Grupa kontrolna z rozpuszczalnikiem/nośnikiem:** próbka niepoddana działaniu badanej substancji, zawierająca wszystkie składniki układu badawczego, w tym rozpuszczalnik lub nośnik, która jest przetwarzana razem z próbkami poddanymi działaniu badanej substancji oraz z innymi próbkami kontrolnymi w celu określenia wyjściowej reakcji dla próbek poddanych działaniu badanej substancji chemicznej rozpuszczonej w tym samym rozpuszczalniku lub nośniku. W przypadku badania z jednoczesną kontrolą podłoża próbka ta wykazuje również, czy rozpuszczalnik lub nośnik wchodzi w reakcję z układem badawczym.

**Swoistość:** odsetek wszystkich substancji chemicznych dających wynik ujemny / nieaktywnych substancji chemicznych prawidłowo sklasyfikowanych za pomocą badania. Jest to miara dokładności metody badawczej, która daje wyniki definitywne i stanowi istotny parametr w ocenie istotności metody badawczej (13).

**Substancja:** pierwiastek chemiczny i jego związki w stanie naturalnym lub uzyskane w wyniku dowolnego procesu produkcyjnego, w tym wszelkie dodatki konieczne do zachowania trwałości produktu i wszelkie zanieczyszczenia powstałe w wyniku zastosowanego procesu, z wyłączeniem wszelkich rozpuszczalników, które można oddzielić bez wpływu na stabilność substancji i bez zmiany jej składu.

**Środek powierzchniowo czynny:** zwany także surfaktantem, jest to substancja chemiczna, np. detergent, która może zmniejszać napięcie powierzchniowe cieczy, umożliwiając tym samym jej pienienie lub przenikanie w ciała stałe; substancja ta jest także zwana środkiem zwilżającym.

**Badana substancja chemiczna:** dowolna substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

**Wielopoziomowa strategia badań:** strategia badań sekwencyjnych, w ramach której wszystkie istniejące informacje na temat badanej substancji chemicznej są analizowane na każdym poziomie w określonym porządku z zastosowaniem procesu uwzględniającego wagę dowodów w celu określenia, czy dostępna jest wystarczająca ilość informacji do podjęcia decyzji o klasyfikacji zagrożenia, przed przejściem do następnego poziomu. Jeżeli na podstawie dostępnych informacji można przypisać badanej substancji chemicznej potencjał w zakresie wywołania podrażnienia, dodatkowe badania nie są wymagane. Jeżeli na podstawie dostępnych informacji nie można przypisać badanej substancji chemicznej potencjału w zakresie wywołania podrażnień, przeprowadza się procedurę badań sekwencyjnych na zwierzętach do momentu, w którym będzie można dokonać jednoznacznej klasyfikacji.

**Podejście odgórne:** stopniowe podejście stosowane w odniesieniu do badanej substancji chemicznej, w przypadku której podejrzewa się, że powoduje poważne uszkodzenie oczu; takie podejście polega na odróżnieniu substancji chemicznych powodujących poważne uszkodzenie oczu (wynik dodatni) od pozostałych substancji chemicznych (wynik ujemny).

**Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów Organizacji Narodów Zjednoczonych (GHS ONZ):** system, w ramach którego proponuje się klasyfikację substancji chemicznych (substancji i mieszanin) według znormalizowanych rodzajów i poziomów zagrożeń fizycznych, zdrowotnych i środowiskowych oraz omawia się odpowiednie elementy komunikacyjne, takie jak: piktogramy, hasła ostrzegawcze, zwroty wskazujące rodzaj zagrożenia, zwroty wskazujące środki ostrożności i karty charakterystyki substancji i produktów niebezpiecznych, aby przekazać informacje na temat ich szkodliwego działania w celu zapewnienia ochrony ludzi (w tym pracowników, robotników, przewoźników, konsumentów i ratowników) i środowiska (1).

**Kategoria 1 wg GHS ONZ/rozporządzenia CLP:** zob. „Poważne uszkodzenie oczu”.

**Kategoria 2 wg GHS ONZ/rozporządzenia CLP:** zob. „Działanie drażniące na oczy”.

**Brak kategorii wg GHS ONZ/rozporządzenia CLP:** Substancje chemiczne, które nie zostały zaklasyfikowane jako należące do kategorii 1 ani 2 wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP (lub do kategorii 2A ani 2B wg GHS ONZ).

**UVCB:** substancje o nieznanym lub zmiennym składzie, złożone produkty reakcji lub materiały biologiczne.

## **B.69 METODA BADAWCZA WYKORZYSTYWANA W RAMACH BADANIA NA MODELU ZREKONSTRUOWANEGO LUDZKIEGO NABŁONKA PRZYPOMINAJĄCEGO ROGÓWKĘ (RhCE) STOSOWANA DO IDENTYFIKACJI SUBSTANCJI CHEMICZNYCH NIEWYMAGAJĄCYCH KLASYFIKACJI I OZNAKOWANIA POD WZGLĘDEM DZIAŁANIA DRAŻNIĄCEGO NA OCZY LUB POWAŻNYCH USZKODZEŃ OCZU**

### **WPROWADZENIE**

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w wytycznej OECD dotyczącej badań (TG) nr 492 (2017). *Poważne uszkodzenie oczu* oznacza uszkodzenie tkanki oka lub poważne fizyczne pogorszenie widzenia spowodowane zaaplikowaniem badanej substancji chemicznej na przednią powierzchnię oka, które nie jest w pełni odwracalne w ciągu 21 dni po zaaplikowaniu, zgodnie z definicją zawartą w Globalnie Zharmonizowanym Systemie Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów Organizacji Narodów Zjednoczonych (GHS ONZ) (1) oraz w rozporządzeniu Unii Europejskiej (WE) nr 1272/2008 w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin (rozporządzenie CLP)<sup>1</sup>. Ponadto zgodnie z GHS ONZ i rozporządzeniem CLP *podrażnienie oka* oznacza zmiany w oku spowodowane zaaplikowaniem badanej substancji chemicznej na wierzchnią warstwę oka, które są w pełni odwracalne w ciągu 21 dni po zaaplikowaniu. Badane substancje chemiczne powodujące poważne uszkodzenie oczu klasyfikuje się jako substancje należące do kategorii 1 wg GHS ONZ i rozporządzenia CLP, natomiast substancje chemiczne powodujące podrażnienie oczu klasyfikuje się jako substancje należące do kategorii 2 wg GHS ONZ i rozporządzenia CLP. Badane substancje chemiczne niesklasyfikowane jako powodujące podrażnienie lub poważne uszkodzenie oczu, definiuje się jako te substancje, które nie spełniają wymogów zaklasyfikowania jako należące do kategorii 1 lub 2 (2A lub 2B) wg GHS ONZ i rozporządzenia CLP, tj. określa się je jako nienależące do żadnej kategorii – brak kategorii wg GHS ONZ i rozporządzenia CLP.
2. Ocenę służącą ustaleniu, czy doszło do poważnego uszkodzenia oczu / podrażnienia oczu, przeprowadza się zazwyczaj na zwierzętach laboratoryjnych (metoda badawcza B.5 (2)). Na wybór najbardziej odpowiedniej metody badawczej i zastosowanie niniejszej metody badawczej należy patrzeć w kontekście wytycznych OECD

---

<sup>1</sup> Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniające i uchylające dyrektywy 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1907/2006, Dz.U. L 353 z 31.12.2008, s. 1.

w sprawie zintegrowanych podejść do badań i oceny dotyczących poważnych uszkodzeń i podrażnień oczu (39).

3. Niniejsza metoda badawcza opisuje procedurę badania *in vitro* zapewniającą możliwość zidentyfikowania chemikaliów (substancji i mieszanin) niewymagających sklasyfikowania i oznakowania jako chemikalia powodujące podrażnienie oczu lub poważne uszkodzenie oczu zgodnie z GHS ONZ i rozporządzeniem CLP. Wykorzystuje się w niej zrekonstruowany ludzki nabłonek przypominający rogówkę (RhCE), który wiernie imituje właściwości histologiczne, morfologiczne, biochemiczne i fizjologiczne właściwości nabłonka rogówki ludzkiej. Zweryfikowano również cztery inne metody badawcze *in vitro* uznawane za potwierdzone naukowo, przyjmując je jako metody badawcze B.47 (3), B.48 (4), B.61 (5) i B.68 (6) odnoszące się do punktu końcowego polegającego na poważnym uszkodzeniu oczu / podrażnieniu oczu człowieka.
4. W niniejszej metodzie badawczej uwzględniono dwa zweryfikowane badania przeprowadzone przy wykorzystaniu dostępnych na rynku modeli RhCE. Przeprowadzono badania walidacyjne służące do ocenienia stopnia podrażnienia oczu / poważnego uszkodzenia oczu przy wykorzystaniu badania działania drażniącego na oczy EpiOcular™ oraz badania działania drażniącego na oczy na ludzkim nabłonku rogówki SkinEthic™ (7)(8)(9)(10)(11)(12)(13). W ramach każdego z tych badań w charakterze układu badawczego wykorzystywano dostępne na rynku wytwory tkankowe RhCE, które określa się poniżej jako zwalidowane metody referencyjne – odpowiednio VRM 1 i VRM 2. Na podstawie wyników wspomnianych badań walidacyjnych oraz ich niezależnej wzajemnej oceny (9)(12) stwierdzono, że badanie działania drażniącego na oczy EpiOcular™ i badanie działania drażniącego na oczy na ludzkim nabłonku rogówki SkinEthic™ umożliwiają prawidłowe zidentyfikowanie chemikaliów (substancji i mieszanin) niewymagających klasyfikacji i oznakowania pod względem działania drażniącego na oczy lub poważnego uszkodzenia oczu zgodnie z GHS ONZ, oraz zarekomendowano uznanie tych badań za potwierdzone naukowo w tym celu (13).
5. Obecnie powszechnie uznaje się, że w dającej się przewidzieć przyszłości żadna pojedyncza metoda badawcza *in vitro* nie będzie w stanie w pełni zastąpić testu działania drażniącego na oko *in vivo* wg Draize'a (2)(14) na potrzeby prognozowania pełnego zakresu działania drażniącego różnych klas chemicznych. Strategiczne połączenia szeregu alternatywnych metod badawczy w ramach (wielopoziomowych) strategii badań takich jak podejście oddolne/odgórne mogą jednak być w stanie w pełni zastąpić test działania drażniącego na oko wg Draize'a (15). Podejście oddolne (15) ma w założeniu być stosowane wówczas, gdy na podstawie istniejących informacji oczekuje się, że substancja chemiczna nie będzie wywoływała podrażnienia oczu w stopniu wymagających jej sklasyfikowania, podczas gdy

podejście odgórne (15) ma być stosowane wówczas, gdy na podstawie istniejących informacji oczekuje się, że substancja chemiczna doprowadzi do poważnego uszkodzenia oczu. W celu zidentyfikowania substancji chemicznych niewymagających sklasyfikowania jako substancje wywołujące podrażnienie oczu lub poważne uszkodzenie oczu wg klasyfikacji GHS ONZ / rozporządzenia CLP (brak kategorii) bez konieczności przeprowadzenia dalszych badań zaleca się stosowanie badania działania drażniącego na oczy EpiOcular™ i badania działania drażniącego na oczy na ludzkim nabłonku rogówki SkinEthic™ w ramach strategii badania zakładającej stosowanie podejścia oddolnego/odgórnego zaproponowanej przez Scotta *et al.*, np. strategii, w której podejście oddolne stanowi pierwszy etap, lub strategii, w której podejście odgórne stanowi jeden z ostatnich etapów (15). Badanie działania drażniącego na oczy EpiOcular™ oraz badanie działania drażniącego na oczy na ludzkim nabłonku rogówki nie zapewniają jednak możliwości rozróżnienia między kategorią 1 wg GHS ONZ / rozporządzeniem CLP (poważne uszkodzenie oczu) a kategorią 2 wg GHS ONZ / rozporządzeniem CLP (działanie drażniące na oczy). Takie rozróżnienie będzie musiało zostać dokonane na innym poziomie strategii badania (15). Badana substancja chemiczna uznana za wymagającą sklasyfikowania jako powodująca podrażnienie oczu / poważne uszkodzenie oczu w ramach badania działania drażniącego na oczy EpiOcular™ lub w ramach badania działania drażniącego na oczy na ludzkim nabłonku rogówki SkinEthic™ będzie zatem musiała zostać poddana dodatkowym badaniom (*in vitro* lub *in vivo*), aby można było sformułować ostateczny wniosek (brak kategorii, kategoria 2 lub kategoria 1 wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP), na przykład przy wykorzystaniu metody badawczej B.47, B.48, B.61 lub B.68.

6. Niniejsza metoda badawcza ma na celu opisanie procedur stosowanych do oceny potencjalnego działania szkodliwego dla oczu badanej substancji chemicznej na podstawie jej potencjału wywoływania cytotoksyczności w wytworze tkankowym RhCE zgodnie z pomiarem w ramach testu MTT (16) (zob. pkt 21). Żywotność wytworu tkankowego RhCE po narażeniu na działanie badanej substancji chemicznej ustala się w porównaniu z tkankami poddanymi działaniu substancji wykorzystywanej w ramach kontroli ujemnej (procentowa wartość żywotności), po czym wartość tą stosuje się przy przewidywaniu potencjalnego działania szkodliwego dla oczu badanej substancji chemicznej.
7. Aby usprawnić proces walidacji nowych lub zmienionych metod przeprowadzania badań *in vitro* bazujących na RHCE podobnych do badania działania drażniącego na oczy EpiOcular™ i badania działania drażniącego na oczy na ludzkim nabłonku rogówki SkinEthic™ i aby umożliwić terminowe modyfikowanie wytycznych OECD dotyczących badań nr 492 w celu uwzględnienia tych metod badawczych, można skorzystać z dostępnych standardów wykonywania badań (17) opracowanych zgodnie

z zasadami ustanowionymi w wytycznych OECD nr 34 (18). Wzajemne uznawanie danych (MAD) zgodnie z porozumieniem OECD będzie możliwe wyłącznie w przypadku badań zweryfikowanych zgodnie ze standardami wykonywania badań, jeżeli te badania zostały poddane przeglądowi i włączone do odpowiednich wytycznych OECD dotyczących badań.

## DEFINICJE

8. Definicje znajdują się w dodatku 1.

## ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA

9. Niniejszą metodę badawczą przeprowadza się na dostępnych na rynku trójwymiarowych wytworach tkankowych RhCE wytwarzanych przy wykorzystaniu pierwotnych keratynocytów naskórka ludzkiego (tj. EpiOcular™ OCL-200) albo unieśmiertelnionych komórek nabłonkowych ludzkiej rogówki (tj. SkinEthic™ HCE/s). Struktura wytworów tkankowych RhCE EpiOcular™ OCL-200 i SkinEthic™ HCE/S jest podobna do trójwymiarowej struktury komórek nabłonkowych rogówki *in vivo*, a wytwory te wytwarza się przy wykorzystaniu komórek gatunków będących przedmiotem zainteresowania (19)(20). Badania zapewniają ponadto możliwość bezpośredniego pomiaru poziomu cytotoksyczności wywołanej przeniknięciem substancji chemicznej przez rogówkę, co skutkuje uszkodzeniem komórek i tkanek; ogólny wynik badania *in vivo* przejawiający się poważnym uszkodzeniem oczu / podrażnieniem oczu zależy od efektu cytotoksycznego, do którego dochodzi w następstwie przeniknięcia substancji chemicznej przez rogówkę. Choć do uszkodzenia komórek może dojść w następstwie szeregu działań (zob. pkt 20), cytotoksyczność odgrywa istotną – o ile nie najistotniejszą – mechanistyczną rolę w procesie ustalania, czy działanie substancji chemicznej wywołuje ogólną reakcję w postaci poważnego uszkodzenia oczu / podrażnienia oczu, która w badaniu *in vivo* przejawia się głównie zmętnieniem rogówki, zapaleniem tęczówki, zaczerwienieniem błony spojówkowej lub obrzękiem spojówki, niezależnie od procesów fizykochemicznych leżących u podstaw uszkodzenia tkanek.
10. W ramach badania walidacyjnego leżącego u podstaw niniejszej metody badawczej zbadano szerokie spektrum substancji chemicznych obejmujące wiele różnych rodzajów chemikaliów, klas chemicznych, mas cząsteczkowych, LogP, struktur chemicznych itp. Baza danych służących do walidacji badania działania drażniącego na oczy EpiOcular™ zawierała łącznie 113 substancji chemicznych i obejmowała 95 różnych organicznych grup funkcyjnych zgodnie z wynikami analizy zestawu narzędzi OECD QSAR (8). Choć substancje jednoskładnikowe stanowiły większość tych substancji chemicznych, w badaniu uwzględniono również szereg substancji

wieloskładnikowych (w tym 3 homopolimery, 5 kopolimerów i 10 quasi-polimerów). Jeżeli chodzi o stan skupienia i kategorie wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP, 113 zbadanych substancji chemicznych sklasyfikowano w następujący sposób: 13 substancji jako ciecze należące do kategorii 1, 15 substancji jako substancje stałe należące do kategorii 1, 6 substancji jako ciecze należące do kategorii 2A, 10 substancji jako substancje stałe należące do kategorii 2A, 7 substancji jako ciecze należące do kategorii 2B, 7 substancji jako ciała stałe należące do kategorii 2B, 27 substancji jako ciecze nieprzypisane do żadnej kategorii i 28 substancji jako ciała stałe nienależące do żadnej kategorii (8). Baza danych służących do walidacji badania działania drażniącego na oczy na ludzkim nabłonku rogówki SkinEthic™ zawierała łącznie 200 substancji chemicznych i obejmowała 165 różnych organicznych grup funkcyjnych (8)(10)(11). Choć substancje jednoskładnikowe stanowiły większość tych substancji chemicznych, w badaniu uwzględniono również szereg substancji wieloskładnikowych (w tym 10 polimerów). Jeżeli chodzi o stan skupienia i kategorie wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP, 200 zbadanych substancji chemicznych sklasyfikowano w następujący sposób: 27 substancji jako ciecze należące do kategorii 1, 24 substancji jako substancje stałe należące do kategorii 1, 19 substancji jako ciecze należące do kategorii 2A, 10 substancji jako substancje stałe należące do kategorii 2A, 9 substancji jako ciecze należące do kategorii 2B, 8 substancji jako ciała stałe należące do kategorii 2B, 50 substancji jako ciecze nieprzypisane do żadnej kategorii i 53 substancje jako ciała stałe nienależące do żadnej kategorii (10)(11).

11. Niniejsza metoda badawcza ma zastosowanie do substancji i mieszanin, a także do ciał stałych, cieczy, ciał półstałych i wosków. Ciecze mogą być wodne lub niewodne; substancje stałe mogą być rozpuszczalne lub nierozpuszczalne w wodzie. W miarę możliwości substancje stałe należy przed zastosowaniem zmielić na drobnoziarnisty proszek; żadna inna wstępna obróbka próbki nie jest wymagana. W ramach badania walidacyjnego nie oceniano gazów ani aerozoli. Chociaż nie można wykluczyć, że da się je badać z wykorzystaniem technologii RhCE, niniejsza metoda badawcza nie pozwala na badanie gazów i aerozoli.
12. Badane substancje chemiczne pochłaniające światło w takim samym spektrum co formazan MTT (w warunkach naturalnych lub po poddaniu działaniu substancji) oraz badane substancje chemiczne zdolne do bezpośredniego obniżenia zawartości barwnika przyżyciowego MTT (do formazanu MTT) mogą zakłócać pomiary żywotności tkanek, co może wiązać się z koniecznością zastosowania przystosowanych kontroli w celu dokonania korekty. Rodzaj przystosowanych kontroli, których przeprowadzenie może okazać się konieczne, będzie różnił się w zależności od rodzaju zakłócenia wywoływanego przez badaną substancję chemiczną i od rodzaju procedury zastosowanej w celu określenia ilości formazanu MTT (zob. pkt 36–42).



13. Wyniki badań przedwalidacyjnych (21)(22) i pełnych badań walidacyjnych (8)(10)(11) potwierdziły, że zarówno badanie działania drażniącego na oczy EpiOcular™, jak i badanie działania drażniącego na oczy na ludzkim nabłonku rogówki SkinEthic™ mogą być przeprowadzane również w laboratoriach uznawanych za niedoświadczone w dziedzinie przeprowadzania tego rodzaju testów, a ich wyniki mogą zostać odtworzone w laboratoriach i między laboratoriami. Na podstawie wyników tych badań, poziom odtwarzalności zgodności prognoz, którego można oczekiwać w przypadku badania działania drażniącego na oczy EpiOcular™ w oparciu o dane dotyczące 113 substancji chemicznych mieści się w granicach 95 % wewnątrz laboratoriów i 93 % pomiędzy laboratoriami. Poziom odtwarzalności zgodności prognoz, którego można oczekiwać w przypadku badania działania drażniącego na oczy na ludzkim nabłonku rogówki SkinEthic™ w oparciu o dane dotyczące 120 substancji chemicznych mieści się w granicach 92 % wewnątrz laboratoriów i 95 % pomiędzy laboratoriami.
14. Badanie działania drażniącego na oczy EpiOcular™ można przeprowadzać w celu zidentyfikowania substancji chemicznych niewymagających sklasyfikowania jako wywołujące podrażnienie oczu lub poważne uszkodzenie oczu zgodnie z systemem klasyfikacji GHS ONZ / systemem klasyfikacji ustanowionym w rozporządzeniu CLP. Biorąc pod uwagę dane pozyskane w ramach badania walidacyjnego (8), badanie działania drażniącego na oczy EpiOcular™ charakteryzowało się ogólną dokładnością na poziomie 80 % (na podstawie wyników badania przeprowadzonego na 112 substancjach chemicznych), czułością na poziomie 96 % (na podstawie wyników badania przeprowadzonego na 57 substancjach chemicznych), odsetkiem wyników fałszywie ujemnych na poziomie 4 % (na podstawie wyników badania przeprowadzonego na 57 substancjach chemicznych), swoistością na poziomie 63 % (na podstawie wyników badania przeprowadzonego na 55 substancjach chemicznych) oraz odsetkiem wyników fałszywie dodatnich na poziomie 37 % (na podstawie wyników badania przeprowadzonego na 55 substancjach chemicznych) w zestawieniu z danymi z referencyjnego badania *in vivo* na oku królika (metoda badawcza B.5) (2)(14) sklasyfikowanego zgodnie z systemem klasyfikacji GHS ONZ / systemem klasyfikacji ustanowionym w rozporządzeniu CLP. W badaniu, w ramach którego zbadano 97 ciekłych preparatów agrochemicznych w formie użytkowej za pomocą badania działania drażniącego na oczy EpiOcular™, wyniki zastosowania tej metody badawczej w odniesieniu do tego rodzaju mieszanin były zbliżone do wyników badania walidacyjnego (23). 97 postaci użytkowych sklasyfikowano w następujący sposób: 21 postaci użytkowych do kategorii 1, 19 postaci użytkowych do kategorii 2A i 14 postaci użytkowych do kategorii 2B, przy czym 43 postacie użytkowe nie zostały sklasyfikowane do żadnej kategorii zgodnie z systemem klasyfikacji GHS ONZ w zestawieniu z danymi z badania *in vivo* na oku królika (metoda badawcza B.5) (2)(14). Badanie charakteryzowało się ogólną dokładnością na poziomie 82 % (na

podstawie wyników badania przeprowadzonego na 97 postaciach użytkowych), czułością na poziomie 91 % (na podstawie wyników badania przeprowadzonego na 54 postaciach użytkowych), odsetkiem wyników fałszywie ujemnych na poziomie 9 % (na podstawie wyników badania przeprowadzonego na 54 postaciach użytkowych), swoistością na poziomie 72 % (na podstawie wyników badania przeprowadzonego na 43 postaciach użytkowych) oraz odsetkiem wyników fałszywie dodatnich na poziomie 28 % (na podstawie wyników badania przeprowadzonego na 43 postaciach użytkowych) (23).

15. Badanie działania drażniącego na oczy na ludzkim nabłonku rogówki SkinEthic™ można przeprowadzać w celu zidentyfikowania substancji chemicznych niewymagających sklasyfikowania jako wywołujące podrażnienie oczu lub poważne uszkodzenie oczu zgodnie z systemem klasyfikacji GHS ONZ / systemem klasyfikacji ustanowionym w rozporządzeniu CLP. Biorąc pod uwagę dane pozyskane w ramach badania walidacyjnego (10)(11), badanie działania drażniącego na oczy na ludzkim nabłonku rogówki SkinEthic™ charakteryzowało się ogólną dokładnością na poziomie 84 % (na podstawie wyników badania przeprowadzonego na 200 substancjach chemicznych), czułością na poziomie 95 % (na podstawie wyników badania przeprowadzonego na 97 substancjach chemicznych), odsetkiem wyników fałszywie ujemnych na poziomie 5 % (na podstawie wyników badania przeprowadzonego na 97 substancjach chemicznych), swoistością na poziomie 72 % (na podstawie wyników badania przeprowadzonego na 103 substancjach chemicznych) oraz odsetkiem wyników fałszywie dodatnich na poziomie 28 % (na podstawie wyników badania przeprowadzonego na 103 substancjach chemicznych) w zestawieniu z danymi z referencyjnego badania *in vivo* na oku królika (metoda badawcza B.5) (2)(14) sklasyfikowanego zgodnie z systemem klasyfikacji GHS ONZ / systemem klasyfikacji ustanowionym w rozporządzeniu CLP.
16. Odsetki wyników fałszywie ujemnych uzyskane w obydwu badaniach RhCE przeprowadzonych na substancjach albo mieszaninach mieszczą się w wynoszącym 12 % przedziale prawdopodobieństwa, że substancje chemiczne zostaną zidentyfikowane jako należące do kategorii 2 wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP albo jako nienależące do żadnej kategorii wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP w przypadku przeprowadzenia testu Draize'a na oku *in vivo* w ramach powtórzonych badań; jest to spowodowane zmiennością wewnętrzną badania nieodłącznie związaną ze stosowaniem tej metody (24). Odsetek wyników fałszywie dodatnich uzyskanych po zastosowaniu obydwu metod badawczych RhCE w odniesieniu do substancji albo mieszanin nie ma decydującego znaczenia w przypadku niniejszej metody badawczej, ponieważ wszystkie badane substancje chemiczne, których oddziaływanie prowadzi do osiągnięcia żywotności tkanek równej ustanowionym wartościom progowym lub niższej od tych wartości (zob. pkt 44), będą wymagały zastosowania dodatkowych

metod badawczych *in vitro* lub – w ostateczności w przypadku królików, w zależności od obowiązujących wymogów regulacyjnych – zastosowania strategii badań sekwencyjnych w ramach podejścia bazującego na wadze dowodów. Wspomniane metody badawcze można zastosować w odniesieniu do wszystkich rodzajów substancji chemicznych, w przypadku których wynik ujemny powinien zostać uznany za niedający podstaw do sklasyfikowania substancji chemicznej za powodującą podrażnienie i poważne uszkodzenie oczu (brak kategorii wg GHS ONZ i rozporządzenia CLP). Przed przeprowadzeniem badania działania drażniącego na oczy EpiOcular™ i badania działania drażniącego na oczy na ludzkim nabłonku rogówki SkinEthic™ zgodnie z systemami klasyfikacji innymi niż GHS ONZ / system klasyfikacji ustanowiony w rozporządzeniu CLP należy skonsultować się z odpowiednimi organami regulacyjnymi.

17. Ograniczenie niniejszej metody badawczej jest związane z faktem, że nie zapewnia ona możliwości dokonania rozróżnienia między podrażnieniem oczu / wywarciem odwracalnego wpływu na oczy (kategoria 2) a poważnym uszkodzeniem oczu / wywarciem nieodwracalnego wpływu na oczy (kategoria 1) wg klasyfikacji GHS ONZ / klasyfikacji ustanowionej w rozporządzeniu CLP ani między substancjami wywołującymi podrażnienie oczu (fakultatywna kategoria 2A) a substancjami wywołującymi lekkie podrażnienie oczu (fakultatywna kategoria 2B) zgodnie z klasyfikacją GHS ONZ (1). Aby dokonać takiego rozróżnienia, konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań przy wykorzystaniu innych metod badawczych *in vitro*.
18. Termin „badana substancja chemiczna” jest używany w niniejszej metodzie badawczej w odniesieniu do tego, co jest przedmiotem badania<sup>1</sup>, i nie jest powiązany z zastosowaniem metody badawczej RhCE do badania substancji lub mieszanin.

## **ZASADA BADANIA**

19. Badaną substancję chemiczną nanosi się miejscowo na co najmniej dwa trójwymiarowe wytwory tkankowe RhCE, po czym dokonuje się pomiaru żywotności tkanek po okresie narażenia i okresie inkubacji tkanek przemitych. Tkanki RhCE rekonstruuje się przy wykorzystaniu pierwotnych keratynocytów naskórka ludzkiego lub unieśmiertnionych komórek nabłonkowych ludzkiej rogówki, które były

---

<sup>1</sup> W czerwcu 2013 r. na posiedzeniu wspólnym OECD uzgodniono, że – w przypadkach, w których będzie to możliwe – w nowych, zaktualizowanych wytycznych dotyczących badań należy obecnie bardziej konsekwentnie stosować termin „badana substancja chemiczna” w odniesieniu do substancji będącej przedmiotem badania.

hodowane przez kilka dni w celu wytworzenia warstwowego, wysoce zróżnicowanego nabłonka płaskiego podobnego do nabłonka występującego w ludzkiej rogówce pod względem morfologicznym. Wytwór tkankowy RhCE EpiOcular™ składa się z co najmniej 3 warstw zdolnych do życia komórek oraz niezrogowaciałej powierzchni o strukturze zbliżonej do struktury rogówki, na której przeprowadza się badanie *in vivo*. Wytwór tkankowy RhCE imitujący ludzki nabłonek rogówki SkinEthic™ składa się z co najmniej 4 warstw zdolnych do życia komórek, uwzględniając kolumnowe komórki bazowe, przejściowe komórki boczne i sztuczne komórki płaskie zbliżone do komórek występujących w prawdziwym nabłonku rogówki (20)(26).

20. Poważne uszkodzenie oczu / podrażnienie oczu wywołane oddziaływaniem substancji chemicznych, które przejawia się *in vivo* głównie zmętnieniem rogówki, zapaleniem tęczówki, zaczerwienieniem błony spojówkowej lub obrzękiem spojówki, stanowi rezultat szeregu zdarzeń, począwszy od przeniknięcia substancji chemicznej przez rogówkę lub błonę spojówkową, a skończywszy na uszkodzeniu komórek. Do uszkodzenia komórek może dojść w wyniku szeregu działań, m.in.: lizy błony komórkowej (np. wskutek oddziaływania środków powierzchniowo czynnych, rozpuszczalników organicznych); koagulacji makrocząsteczek (głównie białek) (np. wskutek oddziaływania środków powierzchniowo czynnych, rozpuszczalników organicznych, zasad i kwasów); zmydlenia lipidów (np. wskutek oddziaływania zasad); alkilowania makrocząsteczek lub innych interakcji kowalencyjnych z makrocząsteczkami (np. wskutek oddziaływania wybielaczy, nadtlenków i alkilatorów) (15)(27)(28). Wykazano jednak, że cytotoksyczność odgrywa istotną – o ile nie najistotniejszą – mechanistyczną rolę w procesie ustalania, czy działanie substancji chemicznej wywołuje ogólną reakcję w postaci poważnego uszkodzenia oczu / podrażnienia oczu niezależnie od procesów fizykochemicznych leżących u podstaw uszkodzenia tkanek (29)(30). Ponadto potencjał wywołania poważnego uszkodzenia oczu / podrażnienia oczu przez daną substancję chemiczną ustala się przede wszystkim na podstawie skali początkowych obrażeń (31), która odpowiada skali uśmiercenia komórek (29) oraz skali późniejszych reakcji i ewentualnych rezultatów (32). Dlatego też substancje wywołujące lekkie podrażnienie zasadniczo wpływają wyłącznie na nabłonek rogówki, substancje wywołujące łagodne i umiarkowane podrażnienie wpływają głównie na nabłonek i sztuczną tkankę podskórną, natomiast substancje silnie drażniące uszkadzają nabłonek, głęboko położoną tkankę podskórną i niekiedy śródbłonek rogówki (30)(33). Pomiar żywotności wytworu tkankowego RhCE po miejscowym narażeniu na działanie badanej substancji chemicznej przeprowadzany w celu zidentyfikowania substancji chemicznych niewymagających sklasyfikowania jako wywołujące poważne uszkodzenie oczu / podrażnienie oczu (brak kategorii wg klasyfikacji GHS ONZ / rozporządzenia CLP) opiera się na założeniu, że wszystkie substancje chemiczne

wywołujące poważne uszkodzenie oczu lub podrażnienie oczu będą wywierały cytotoksyczny wpływ na nabłonek lub błonę spojówkową.

21. Żywotność tkanek RhCE klasycznie mierzy się metodą enzymatycznej konwersji barwnika przyżyciowego MTT [bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylo-tetrazoliowy; MTT; numer CAS 298-93-1] przez komórki żywotne tkanki w niebieską sól formazanu MTT, którą oznacza się ilościowo po ekstrakcji z tkanek (16). Substancje chemiczne, które zgodnie z GHS ONZ / rozporządzeniem CLP nie wymagają sklasyfikowania i oznakowania (brak kategorii), identyfikuje się jako substancje nieobniżające żywotności tkanek poniżej ustalonego progu (tj. żywotność tkanek > 60 % w przypadku badania działania drażniącego na oczy EpiOcular™ i badania działania drażniącego na oczy EITL SkinEthic™<sup>1</sup> lub > 50 % w przypadku badania działania drażniącego na oczy EITS SkinEthic™<sup>2</sup>) (zob. pkt 44).

## WYKAZANIE BIEGŁOŚCI

22. Przed przystąpieniem do rutynowego przeprowadzania badań RhCE do celów regulacyjnych laboratoria powinny wykazać swoją biegłość techniczną, prawidłowo przewidując działanie piętnastu substancji chemicznych przeznaczonych do oceny biegłości wymienionych w tabeli 1. Wspomniane substancje chemiczne zostały wybrane spośród substancji chemicznych wykorzystywanych w badaniach walidacyjnych dotyczących VRM (8)(10)(11). Wybrane substancje chemiczne obejmują – w zakresie, w jakim jest to możliwe – substancje, które: (i) występują w różnych stanach skupienia; (ii) obejmują pełne spektrum reakcji *in vivo* w postaci poważnego uszkodzenia oczu / podrażnienia oczu stwierdzonych w oparciu o wysokiej jakości wyniki uzyskane po przeprowadzeniu porównania z wynikami badania na oku królika *in vivo* (metoda badawcza B.5) (2)(14) oraz poprzez odniesienie do systemu klasyfikacji GHS ONZ (tj. kategorie 1, 2A, 2B lub brak kategorii) (1) i systemem klasyfikacji ustanowionym w rozporządzeniu CLP (tj. kategorie 1, 2 lub brak kategorii); (iii) obejmują różne kryteria klasyfikacji *in vivo* (24)(25); (iv) są reprezentatywne dla klas chemicznych wykorzystywanych w badaniu walidacyjnym (8)(10)(11); (v) reprezentują odpowiednią i szeroką grupę organicznych grup funkcyjnych (8)(10)(11); (vi) mają dobrze określone struktury chemiczne (8)(10)(11); (vii) są zabarwione lub stanowią bezpośrednie reduktory

---

<sup>1</sup> EITL: badanie działania drażniącego cieczy na oczy na ludzkim nabłonku rogówki SkinEthic™

<sup>2</sup> EITS: badanie działania drażniącego substancji stałych na oczy na ludzkim nabłonku rogówki SkinEthic™

MTT; (viii) doprowadziły do uzyskania odtwarzalnych wyników w ramach metod badawczych RhCE podczas ich walidacji; (ix) zostały prawidłowo zidentyfikowane w ramach metod badawczych RhCE w trakcie poświęconych im badań walidacyjnych; (x) obejmują pełne spektrum reakcji *in vitro* w oparciu o wysokiej jakości dane uzyskane w ramach metod badawczych RhCE (0–100 % żywotności); (xi) są dostępne na rynku; oraz (xii) ich pozyskiwanie lub utylizacja nie wiąże się z koniecznością ponoszenia nadmiernie wysokich kosztów. W sytuacjach, w których substancja chemiczna figurująca w wykazie jest niedostępna lub nie może zostać wykorzystana z innych uzasadnionych względów, dopuszcza się możliwość zastosowania innej substancji chemicznej spełniającej opisane powyżej kryteria, np. substancji wybranej spośród substancji chemicznych wykorzystywanych do walidacji VRM. Takie odstępstwa powinny jednak być uzasadnione.

**Tabela 1:** Wykaz substancji chemicznych przeznaczonych do oceny biegłości

| Nazwa systematyczna                                                                                                                                      | Numer CAS   | Organiczna grupa funkcyjna <sup>1</sup>                                                                                                 | Stan skupienia | Żywność VRM1 (%) <sup>2</sup> | Żywność VRM2 (%) <sup>3</sup> | Prognoza dotycząca VRM | Reduktor MTT | Zakłócenie barwy |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------|--------------|------------------|
| <b>Kategoria 1 <i>in vivo</i><sup>4</sup></b>                                                                                                            |             |                                                                                                                                         |                |                               |                               |                        |              |                  |
| Tioglikolan metylu                                                                                                                                       | 2365-48-2   | Ester kwasu karboksylowego; tioalkohol                                                                                                  | L              | 10,9±6,4                      | 5,5±7,4                       | Nie można przewidzieć  | T (silny)    | N                |
| Akrylan hydroksyetylu                                                                                                                                    | 818-61-1    | Akrylan; alkohol                                                                                                                        | L              | 7,5±4,7 <sup>5</sup>          | 1,6±1,0                       | Nie można przewidzieć  | N            | N                |
| 2,5-dimetylo-2,5-heksanodiol                                                                                                                             | 110-03-2    | alkohol                                                                                                                                 | S              | 2,3±0,2                       | 0,2±0,1                       | Nie można przewidzieć  | N            | N                |
| Szczawian sodu                                                                                                                                           | 62-76-0     | Kwas oksokarboksylowy                                                                                                                   | S              | 29,0±1,2                      | 5,3±4,1                       | Nie można przewidzieć  | N            | N                |
| <b>Kategoria 2A <i>in vivo</i><sup>4</sup></b>                                                                                                           |             |                                                                                                                                         |                |                               |                               |                        |              |                  |
| <i>N,N</i> "-bis(4-chlorofenilo)-3,12-diimino- <i>di-D</i> -glukonian diimidu amidowego 2,4,11,13-tetraazatetradekanu (20 %, roztwór wodny) <sup>6</sup> | 18472-51-0  | Heterocykliczny halogenek aromatyczny; halogenek arylu; grupa dihydroksylowa; guanidyna                                                 | L              | 4,0±1,1                       | 1,3±0,6                       | Nie można przewidzieć  | N            | T (słaba)        |
| Benzoesan sodu                                                                                                                                           | 532-32-1    | Aryl; Kwas karboksylowy                                                                                                                 | S              | 3,5±2,6                       | 0,6±0,1                       | Nie można przewidzieć  | N            | N                |
| <b>Kategoria 2B <i>in vivo</i><sup>4</sup></b>                                                                                                           |             |                                                                                                                                         |                |                               |                               |                        |              |                  |
| <i>N,N</i> -dietylo- <i>m</i> -toluamid                                                                                                                  | 134-62-3    | Benzamid                                                                                                                                | L              | 15,6±6,3                      | 2,8±0,9                       | Nie można przewidzieć  | N            | N                |
| 2,2-dmetylo-3-metylenobicyclo[2.2.1]heptan                                                                                                               | 79-92-5     | Alkan rozgałęziony o trzeciorzędowy węgiel; Alken; Bicykloheptan; Związki karbocykliczne z pierścieniem połączonym mostkiem; Cykloalkan | S              | 4,7±1,5                       | 15,8±1,1                      | Nie można przewidzieć  | N            | N                |
| <b>Substancje chemiczne określane mianem „brak kategorii” wykorzystywane do badań <i>in vivo</i><sup>4</sup></b>                                         |             |                                                                                                                                         |                |                               |                               |                        |              |                  |
| 1-etylo-3-metyloimidazoliowy siarczan etylu                                                                                                              | 342573-75-5 | Alkoksy; Sól amonowa; Aryl; Imidazol; Siarczan                                                                                          | L              | 79,9±6,4                      | 79,4±6,2                      | Brak kategorii         | N            | N                |

| Nazwa systematyczna                                                             | Numer CAS   | Organiczna grupa funkcyjna <sup>1</sup>                                                                                                                                                                      | Stan skupienia     | Żywołność VRM1 (%) <sup>2</sup> | Żywołność VRM2 (%) <sup>3</sup> | Prognoza dotycząca VRM | Reduktor MTT | Zakłócenie barwy |
|---------------------------------------------------------------------------------|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|---------------------------------|---------------------------------|------------------------|--------------|------------------|
| Eter (di)oktylu                                                                 | 629-82-3    | Alkoksy; eter                                                                                                                                                                                                | L                  | 97,8±4,3                        | 95,2±3,0                        | Brak kategorii         | N            | N                |
| Butotlenek piperonylu                                                           | 51-03-6     | Alkoksy; Benzodioksol; Benzyl; eter                                                                                                                                                                          | L                  | 104,2±4,2                       | 96,5±3,5                        | Brak kategorii         | N            | N                |
| Olej rycynowy uwodorniony glikolem polietylenowym (PEG-40)                      | 61788-85-0  | Acylal; Alkohol; Allil; eter                                                                                                                                                                                 | Lepka konsystencja | 77,6±5,4                        | 89,1±2,9                        | Brak kategorii         | N            | N                |
| 1-(4-chlorofenylo)-3-(3,4-dichlorofenylo)mocznik                                | 101-20-2    | Heterocykliczny halogenek aromatyczny; Halogenek arylu; Pochodne mocznika                                                                                                                                    | S                  | 106,7±5,3                       | 101,9±6,6                       | Brak kategorii         | N            | N                |
| 2,2'-metyleno-bis-(6-(2H-benzotriazol-2-yl)-4-(1,1,3,3-tetrametylobutyl)-fenoł) | 103597-45-1 | Alkan rozgałęziony o czwartorzędowy węgiel; Skondensowany karbocykliczny związek aromatyczny; Skondensowane nasycone związki heterocykliczne; Związki będące prekursorami chinonowymi; związki tert-butyłowe | S                  | 102,7±13,4                      | 97,7±5,6                        | Brak kategorii         | N            | N                |
| Tetrofluoroboran potasu                                                         | 14075-53-7  | Sól nieorganiczna                                                                                                                                                                                            | S                  | 88,6±3,3                        | 92,9±5,1                        | Brak kategorii         | N            | N                |

Skróty: Numer CAS = numer w rejestrze Chemical Abstracts Service; GHS ONZ = Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów Organizacji Narodów Zjednoczonych (1); VRM1 = zwalidowana metoda referencyjna, badanie działania drażniącego na oczy EpiOcular™; VRM2 = zwalidowana metoda referencyjna, badanie działania drażniącego na oczy z wykorzystaniem ludzkiego nabłonka rogówki SkinEthic™; Zakłócenie barwy = pomiar zakłócenia barwy za pomocą absorbancji wzorca (gęstość optyczna (OD)) formazanu MTT.

<sup>1</sup>Organiczna grupa funkcyjna przydzielona zgodnie z zagnieżdżoną analizą w ramach OECD Toolbox 3.1 (8).

<sup>2</sup> Na podstawie wyników badania działania drażniącego na oczy EpiOcular™ w laboratorium referencyjnym Unii Europejskiej ds. metod alternatywnych wobec testów na zwierzętach / w ramach badania walidacyjnego drażniącego działania na oczy Cosmetics Europe (EIVS) (8).

<sup>3</sup> Na podstawie wyników uzyskanych za pomocą badania działania drażniącego na oczy z wykorzystaniem ludzkiego nabłonka rogówki SkinEthic™ w badaniu walidacyjnym (10)(11).

<sup>4</sup>Na podstawie wyników badania na oku królika *in vivo* (metoda badawcza B.5 / wytyczna OECD TG 405) (2)(14) i z zastosowaniem GHS ONZ.



<sup>5</sup>Na podstawie wyników badania CEFIC „CONsortium for *in vitro* Eye Irritation testing strategy (CON4EI)”.

<sup>6</sup>Zaklasyfikowanie do kategorii 2A lub 2B zależy od interpretacji kryterium GHS ONZ dotyczącego rozróżnienia tych dwóch kategorii, tj. 1 spośród 3 zwierząt lub 2 spośród 3 zwierząt, u których w dniu 7. odnotowano skutki niezbędne do zakwalifikowania substancji chemicznej do kategorii 2A. W badaniu *in vivo* brały udział 3 zwierzęta. Wszystkie punkty końcowe poza zmętnieniem rogówki u jednego zwierzęcia zupełnie ustały do dnia 7. lub wcześniej. Jedno ze zwierząt, u którego skutki działania substancji nie ustały do 7. dnia, miało zmętnienie rogówki na poziomie 1 (w 7. dniu), które ustało w pełni w 9. dniu.

23. W ramach wykazywania efektywności zaleca się, aby użytkownicy sprawdzili właściwości bariery cechujące tkanki po ich otrzymaniu, zgodnie ze wskazaniem producenta wytworu tkankowego RhCE (zob. pkt 25, 27 i 30). Jest to szczególnie istotne, jeżeli tkanki są wysłane na duże odległości lub w długich okresach czasu. Gdy badanie zostało z powodzeniem wprowadzone oraz nabyto biegłość w jego przeprowadzaniu i zostało to wykazane, weryfikacja taka nie będzie konieczna w ramach rutynowej procedury. W przypadku rutynowego zastosowania badania zaleca się jednak, aby w dalszym ciągu oceniać właściwości bariery w regularnych odstępach czasu.

## **PROCEDURA**

24. Niniejsza metoda badawcza obejmuje obecnie potwierdzone naukowo badanie działania drażniącego na oczy EpiOcular™ oraz badanie działania drażniącego na oczy z wykorzystaniem ludzkiego nabłonka rogówki SkinEthic™ (9)(12)(13) (odpowiednio VRM1 i VRM2). Standardowe procedury operacyjne dotyczące metod badawczych RhCE są dostępne i należy z nich korzystać przy wdrażaniu i stosowaniu metod badawczych w warunkach laboratoryjnych (34)(35). W poniższych punktach oraz w dodatku 2 opisano najistotniejsze elementy i procedury badań RhCE.

## **SKŁADOWE METODY BADANIA RHCE**

### **Warunki ogólne**

25. W celu odtworzenia trójwymiarowej tkanki nabłonka przypominającej rogówkę, która powinna się składać ze stopniowo nawarstwionych ale nie zrogowaciałych komórek, należy użyć odpowiednich komórek pochodzących od człowieka. Wytwór tkankowy RhCE przygotowuje się w insertach z porowatą membraną syntetyczną, przez którą składniki odżywcze mogą się przedostać do komórek. W zrekonstruowanym nabłonku przypominającym rogówkę powinno się znajdować wiele warstw żywotnych, niezrogowaciałych komórek nabłonka. Powierzchnia nabłonkowa wytworu tkankowego RhCE powinna mieć bezpośredni kontakt z powietrzem w celu umożliwienia bezpośredniego miejscowego narażenia na działanie badanej substancji w podobny sposób, jak w przypadku narażenia nabłonka rogówki w badaniu *in vivo*. Wytwór tkankowy RhCE powinien uformować funkcjonalną barierę, która jest na tyle wytrzymała, aby uniemożliwiała szybkie przenikanie cytotoksycznych wzorcowych substancji, np. Triton X-100 lub soli sodowej siarczanu dodecyłu (SDS). Funkcję bariery należy wykazać i można ocenić poprzez ustalenie czasu narażenia na działanie potrzebnego do zmniejszenia żywotności komórek o 50 % (ET<sub>50</sub>) po zastosowaniu substancji wzorcowej w określonym, stałym stężeniu (np., 100 µl 0,3 % (obj./obj.) Triton X-100) lub stężenia, w którym substancja wzorcowa zmniejsza żywotność

tkanek o 50 % ( $IC_{50}$ ) po ustalonym czasie narażenia na działanie (np. 30-minutowym poddaniu działaniu substancji z wykorzystaniem 50  $\mu$ l SDS) (zob. pkt 30). Właściwości izolacyjne wytworu tkankowego RhCE powinny zapobiegać przedostawaniu się badanej substancji chemicznej przez krawędź żywej tkanki, gdyż w innym razie modelowanie narażenia rogówki mogłoby być niewłaściwe. Pochodzące od człowieka komórki, które wykorzystuje się do stworzenia wytworu tkankowego RhCE, nie powinny być skażone bakteriami, wirusami, mykoplazmą ani grzybami. Dostawca powinien sprawdzić sterylność wytworu tkankowego pod kątem braku skażenia grzybami i bakteriami.

## Warunki funkcjonalne

### Żywotność

26. Testem stosowanym do określenia ilościowego żywotności tkanki jest test MTT (16). Komórki żywotne wytworu tkankowego RhCE redukują barwnik przyżyciowy MTT do wytrąconego niebieskiego formazanu MTT, który jest później ekstrahowany z komórki przy użyciu izopropanolu (lub podobnego rozpuszczalnika). Ekstrahowany formazan MTT można określić ilościowo, stosując pomiar absorbancji wzorca (gęstość optyczna – OD) lub procedurę spektrofotometrii HPLC/UPLC (36). OD samego rozpuszczalnika do ekstrakcji powinna być wystarczająco niska, tj.  $OD < 0,1$ . Użytkownicy wytworu tkankowego RhCE powinni zapewnić zgodność każdej partii zastosowanego wytworu tkankowego RhCE z określonymi kryteriami kontroli ujemnej. Zakresy dopuszczalności kontroli ujemnej wartości OD dotyczące VRM przedstawiono w tabeli 2. Użytkownik spektrofotometrii HPLC/UPLC powinien stosować kontrolę ujemną zakresów OD określonych w tabeli 2 jako warunku dopuszczenia kontroli ujemnej. W sprawozdaniu z badania należy udokumentować stabilność w hodowli (uzyskiwanie podobnych wyników pomiarów żywotności tkanki) tkanki poddanej działaniu substancji kontroli ujemnej w badanym okresie narażenia. Podobną procedurę powinien stosować producent tkanek w ramach zwolnienia serii na podstawie kontroli jakości, ale w tym przypadku mogą mieć zastosowanie inne kryteria dopuszczalności niż kryteria określone w tabeli 2. Zakres dopuszczalności (górna i dolna granica) kontroli ujemnej wartości OD (w warunkach metody badania kontroli jakości) powinni określić producenci/dostawcy wytworu tkankowego RhCE.

**Tabela 2:** Zakresy dopuszczalności dla kontroli ujemnej wartości OD (dla użytkowników badania).

| Badanie                                                                                           | Dolna granica dopuszczalności | Górna granica dopuszczalności |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Badanie działania drażniącego na oczy EpiOcular™ (OCL-200) – VRM1 (zarówno w przypadku protokołów | $> 0,8^1$                     | $< 2,5$                       |

|                                                                                                                                                                                           |       |       |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------|
| dotyczących cieczy, jak i substancji stałych)                                                                                                                                             |       |       |
| badanie działania drażniącego na oczy z wykorzystaniem ludzkiego nabłonka rogówki SkinEthic™ (HCE/S) – VRM2 (zarówno w przypadku protokołów dotyczących cieczy, jak i substancji stałych) | > 1,0 | ≤ 2,5 |

<sup>1</sup>Ta granica dopuszczalności uwzględnia ewentualne wydłużenie czasu transportu/przechowywania (np. > 4 dni), co do którego wykazano, że nie ma wpływu na przeprowadzenie metody badawczej (37).

### *Funkcja bariery*

27. Wytwór tkankowy RhCE powinien być na tyle gruby i szczelny, aby powstrzymać szybkie przenikanie cytotoksycznych substancji wzorcowych, zgodnie z oszacowaniem np. za pomocą ET<sub>50</sub> (Triton X-100) lub IC<sub>50</sub> (SDS) (tabela 3). Producent/dostawca wytworu tkankowego RhCE powinien w momencie dostarczenia tkanek użytkownikowi końcowemu wykazać funkcję bariery każdej partii zastosowanego wytworu tkankowego RhCE (zob. pkt 30).

### *Morfologia*

28. Badanie histologiczne wytworu tkankowego RhCE powinno wykazać istnienie struktury nabłonka przypominającego rogówkę (w tym co najmniej trzech warstw żywotnych komórek nabłonkowych i niezrogowaciałej powierzchni). W przypadku VRM odpowiednią morfologię ustala producent/dostawca, a więc użytkownik metody badawczej nie musi jej ponownie wykazywać dla każdej partii tkanek.

### *Odtwarzalność*

29. Wyniki dodatniej kontroli oraz ujemnych w ramach metody badawczej powinny wykazywać odtwarzalność w czasie.

### *Kontrola jakości (QC)*

30. Wytwór tkankowy RhCE należy stosować jedynie w przypadku, gdy producent lub dostawca wykaże, że każda partia wykorzystywanego wytworu tkankowego RhCE spełnia określone kryteria zwolnienia do produkcji, spośród których najbardziej istotne są te dotyczące żywotności (pkt 26) i funkcji bariery (pkt 27). Zakres dopuszczalności (górną i dolną granicą) dotyczący funkcji bariery zmierzonej za pomocą ET<sub>50</sub> lub IC<sub>50</sub> (zob. pkt 25 i 26) powinien określić producent/dostawca wytworu tkankowego RhCE. Zakres dopuszczalności ET<sub>50</sub> and IC<sub>50</sub> zastosowany przez producenta/dostawcę wytworów tkankowych RhCE (wykorzystywanych w VRM) jako kryterium zwolnienia serii na podstawie kontroli jakości przedstawiono w tabeli 3. Producent/dostawca wytworu tkankowego RhCE powinien dostarczyć dane potwierdzające zgodność ze wszystkimi kryteriami zwolnienia do produkcji użytkownikom metody badawczej, tak aby mogli oni uwzględnić te informacje w sprawozdaniu z badania. Do wiarygodnego przewidzenia, że dane substancje

chemiczne nie wymagają zaklasyfikowania jako substancje drażniące oczy lub powodujące poważne uszkodzenie oczu zgodnie z GHS ONZ / rozporządzeniem CLP, można przyjąć wyłącznie wyniki uzyskane z użyciem tkanek spełniających wszystkie kryteria zwolnienia do produkcji.

**Tabela 3:** Kryterium zwolnienia serii na podstawie kontroli jakości

| <b>Badanie</b>                                                                                                                                                                     | <b>Dolna granica dopuszczalności</b> | <b>Górna granica dopuszczalności</b> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Badanie działania drażniącego na oczy EpiOcular™ (OCL-200) – VRM1 (100 µl 0,3 % (obj./obj.) Triton X-100)                                                                          | ET <sub>50</sub> = 12,2 min          | ET <sub>50</sub> = 37,5 min          |
| badanie działania drażniącego na oczy z wykorzystaniem ludzkiego nabłonka rogówki SkinEthic™ (HCE/S) – VRM2 (30-minutowe poddanie działaniu substancji z wykorzystaniem 50 µl SDS) | IC <sub>50</sub> = 1 mg/ml           | IC <sub>50</sub> = 3,2 mg/ml         |

#### **Podawanie badanej i kontrolnej substancji chemicznej**

31. W każdej serii badawczej należy użyć co najmniej dwóch kontrprób tkanek w przypadku każdej badanej i kontrolnej substancji chemicznej. Stosuje się dwa różne protokoły poddawania działaniu substancji – jeden dla badanych substancji chemicznych w stanie ciekłym, a drugi dla badanych substancji chemicznych w stanie stałym (34)(35). W przypadku obu metod i protokołów powierzchnię wytworu tkankowego należy przed podaniem badanych substancji chemicznych zwilżyć roztworem chlorku sodu buforowanym fosforanami Dulbecco wolnym od wapnia i magnezu (DPBS wolny od Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>), aby odwzorować mokre warunki w ludzkim oku. Poddawanie tkanek działaniu substancji rozpoczyna się od narażenia ich na działanie badanych i kontrolnych substancji chemicznych. W przypadku obu protokołów podawania działaniu substancji w obu VRM należy nałożyć na skórę dostateczną ilość badanej lub kontrolnej substancji chemicznej, tak aby równomiernie pokrywała powierzchnię nabłonka, unikając jednak nakładania dawki nieskończonej (zob. pkt 32 i 33) (dodatek 2).
32. Badane substancje chemiczne, które można podawać pipetą w temperaturach na poziomie 37 °C lub niższych (w stosownych przypadkach wykorzystując pipetę typu D), traktuje się w VRM jako ciecze, a w innym przypadku należy je traktować jako substancje stałe (zob. pkt 33). W VRM badaną substancję chemiczną równomiernie rozprowadza się na powierzchni tkanki (tj. stosuje się co najmniej 60 µl/cm<sup>2</sup>) (zob. dodatek 2, (33)(34)). Aby zagwarantować właściwe dawkowanie tkanek, należy w jak największym stopniu uniknąć wystąpienia efektów kapilarnych (efektów napięcia powierzchniowego), które mogą wynikać z nałożenia na insert (na powierzchnię tkanki) niewielkiej ilości substancji. Tkanki podawane działaniu badanych substancji chemicznych w stanie ciekłym inkubuje się przez 30 minut w normalnych warunkach

hodowli kultur ( $37 \pm 2$  °C,  $5 \pm 1$  % CO<sub>2</sub>,  $\geq 95$  % RH). Pod koniec okresu narażenia badaną należy ostrożnie usunąć substancję chemiczną w stanie ciekłym i substancje kontrolne z powierzchni tkanki stosując intensywne płukanie za pomocą DPBS wolnego od Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> w temperaturze pokojowej. Po etapie płukania następuje zanurzenie po zakończeniu narażenia w świeżym podłożu w temperaturze pokojowej (w celu usunięcia badanej substancji chemicznej wchłoniętej przez tkankę) na wcześniej określony czas, zależny od zastosowanej VRM. Jedynie w przypadku VRM1 przed przeprowadzeniem testu MTT należy zastosować inkubację po zakończeniu narażenia w świeżym podłożu w normalnych warunkach hodowli kultur (zob. dodatek 2, (34) (35)).

33. Badane substancje chemiczne, których nie można podawać pipetą w temperaturach na poziomie 37 °C lub niższych traktuje się w VRM jako substancje stałe. Ilość podawanej badanej substancji chemicznej powinna być wystarczająca do pokrycia całej powierzchni tkanki, tj. należy nałożyć co najmniej 60 mg/cm<sup>2</sup> (dodatek 2). W miarę możliwości substancje stałe powinny być badane w postaci drobnoziarnistego proszku. Tkanki poddane działaniu badanych substancji chemicznych w stanie stałym inkubuje się przez wcześniej określony czas (w zależności od zastosowanej VRM) w normalnych warunkach hodowli kultur (zob. dodatek 2, (34) (35)). Pod koniec okresu narażenia badaną należy ostrożnie usunąć substancję chemiczną w stanie stałym i substancje kontrolne z powierzchni tkanki stosując intensywne płukanie za pomocą DPBS wolnego od Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> w temperaturze pokojowej. Po etapie płukania następuje zanurzenie po zakończeniu narażenia w świeżym podłożu w temperaturze pokojowej (w celu usunięcia badanej substancji chemicznej wchłoniętej przez tkankę) na wcześniej określony czas, zależny od zastosowanej VRM, oraz zanurzenie po narażeniu w świeżym podłożu w normalnych warunkach hodowli kultur przed przeprowadzeniem testu MTT (zob. dodatek 2, (34)(35)).
34. W każdej serii badawczej należy uwzględnić równoczesną kontrolę ujemną i kontrolę dodatnią, aby wykazać, że żywotność (określona w kontroli ujemnej) oraz czułość (określona w kontroli dodatniej) tkanek mieszczą się w zakresach dopuszczalności ustalonych na podstawie danych historycznych. Jednoczesna kontrola ujemna dostarcza również wartość bazową (100 % żywotności tkanek) na potrzeby obliczenia względnej procentowej żywotności tkanek poddanych działaniu badanej substancji chemicznej (%Viability<sub>test</sub>). Substancją służącą do kontroli dodatniej zalecaną do stosowania w VRM jest czysty octan metylu (nr CAS 79-20-9, dostępny na rynku od np. Sigma-Aldrich, nr katalogowy 45997; ciecz). Substancjami służącymi do kontroli ujemnej zalecanymi do stosowania w VRM1 i VRM2 są odpowiednio ultraczyste H<sub>2</sub>O oraz DPBS wolny od Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>. Były to substancje kontrolne wykorzystane w badaniach walidacyjnych dotyczących VRM i istnieje na ich temat najwięcej

danych historycznych. W przypadku zastosowania odpowiednich alternatywnych substancji służących do kontroli ujemnej lub dodatniej należy to odpowiednio naukowo uzasadnić. Kontrole dodatnie i ujemne należy badać za pomocą tych samych protokołów, które wykorzystano do badania substancji chemicznych w danej serii badawczej (tj. cieczy lub substancji stałych). Po takim zastosowaniu należy przeprowadzić, w stosownych przypadkach, poddanie narażeniu na działanie substancji, płukanie, zanurzenie po zakończeniu narażenia oraz inkubację po zakończeniu narażenia, jak opisano w przypadku prób kontrolnych poddawanych badaniu równolegle z badanymi substancjami chemicznymi w stanie ciekłym (zob. pkt 32) lub w przypadku kontroli poddawanych badaniu równolegle z badanymi substancjami chemicznymi w stanie stałym (zob. pkt 33) przed przeprowadzeniem testu MTT (zob. pkt 35) (34)(35). W przypadku wszystkich badanych substancji chemicznych o tym samym stanie skupienia (ciecze lub substancje stałe), będących częścią jednej serii badawczej, wystarczy jeden zestaw kontroli ujemnych i dodatnich.

#### **Pomiary żywotności tkanek**

35. Test MTT stanowi uznaną metodą ilościową (16), którą należy wykorzystywać do pomiarów żywotności tkanek w ramach niniejszej metody badawczej. Można ją stosować do badań z użyciem trójwymiarowego wytworu tkankowego. Test MTT przeprowadza się natychmiast po okresie inkubacji po zakończeniu narażenia. W ramach VRM wytwór tkankowy RhCE umieszcza się w 0,3 ml roztworu MTT przy 1 mg/ml na  $180 \pm 15$  min w normalnych warunkach hodowli kultur. Komórki żywotne wytworu tkankowego RhCE redukują barwnik przyżyciowy MTT do wytrąconego niebieskiego formazanu MTT. Produkt wytrącania niebieskiego formazanu MTT ekstrahuje się następnie z tkanki przy użyciu odpowiedniej ilości izopropanolu (lub podobnego rozpuszczalnika) (34)(35). Tkanki zbadane za pomocą badanych substancji chemicznych w stanie ciekłym należy ekstrahować zarówno z góry, jak i z dołu tkanki, podczas gdy tkanki zbadane za pomocą badanych substancji chemicznych w stanie stałym oraz cieczy zabarwionych należy ekstrahować jedynie z dołu tkanki (w celu zminimalizowania ewentualnego skażenia roztworu ekstrakcyjnego izopropanolu jakąkolwiek badaną substancją chemiczną, która mogła pozostać na tkance). Tkanki zbadane za pomocą badanych substancji chemicznych w stanie ciekłym, które nie są łatwe do zmycia, również można ekstrahować jedynie z dołu tkanki. Badane równolegle substancje służące do kontroli ujemnej i dodatniej należy potraktować podobnie do badanej substancji chemicznej. Ekstrahowany formazan MTT można określić ilościowo albo przy pomocy pomiaru absorbancji wzorca (OD) przy 570 nm, wykorzystując filtr w paśmie maksimum  $\pm 30$  nm, albo przy pomocy procedury spektrofotometrii HPLC/UPLC (zob. pkt 42) (11)(36).
36. Właściwości optyczne badanej substancji chemicznej lub jej oddziaływanie chemiczne na MTT mogą zakłócać pomiar formazanu MTT, prowadząc do błędnego

oszacowania żywotności tkanki. Badane substancje chemiczne mogą zakłócać pomiar formazanu MTT poprzez bezpośrednią redukcję MTT do niebieskiego formazanu MTT lub na skutek zakłócenia barwy, jeżeli badana substancja chemiczna jest chłonna, w sposób naturalny lub w wyniku procedur poddania działaniu badanej substancji w tym samym zakresie gęstości optycznej co formazan MTT (tj. ok 570 nm). Przed badaniem należy wykonać wstępne kontrole, aby umożliwić identyfikację potencjalnych bezpośrednich reduktorów MTT lub substancji chemicznych zakłócających barwę oraz należy wykorzystać dodatkowe próby kontrolne do wykrycia i skorygowania potencjalnej interferencji takich badanych substancji chemicznych (zob. pkt 37–41). Jest to istotne zwłaszcza w przypadku niepełnego usunięcia określonej substancji badanej z wytworu tkankowego RhCE za pomocą płukania lub gdy substancja ta przeniknie przez nabłonek przypominający rogówkę, przez co pozostaje obecna w wytworach tkankowych RhCE podczas przeprowadzania testu MTT. W przypadku badanych substancji chemicznych pochłaniających światło w takim samym zakresie, jak formazan MTT (naturalnie lub po poddaniu działaniu substancji), które nie są zgodne z pomiarem absorbancji wzorca (OD) formazanu MTT ze względu na zbyt silną interferencję, tj. silną absorbcję przy  $570 \pm 30$  nm, można zastosować procedurę spektrofotometrii HPLC/UPLC do pomiaru formazanu MTT (zob. pkt 41 i 42) (11)(36). Szczegółowy opis sposobu wykrywania i skorygowania redukcji MTT i zakłóceń przez barwniki jest dostępny w standardowych procedurach operacyjnych dotyczących VRM (34)(35). Przykładowe schematy zawierające wytyczne dotyczące sposobu identyfikacji i obchodzenia się z bezpośrednimi reduktorami MTT lub substancjami chemicznymi zakłócającymi barwę w VRM1 i VRM2 przedstawiono również odpowiednio w dodatkach III i IV.

37. W celu identyfikacji potencjalnej interferencji wynikającej z tego, że badane substancje chemiczne pochłaniają światło w tym samym zakresie co formazan MTT (naturalnie lub po poddaniu działaniu substancji), i podjęcia decyzji o konieczności zastosowania dodatkowych kontroli badaną substancję chemiczną dodaje się do wody lub izopropanolu i inkubuje się odpowiednio długo w temperaturze pokojowej (zob. dodatek 2, (34)(35)). Jeżeli w wodzie lub izopropanolu badana substancja chemiczna pochłania wystarczającą ilość światła w zakresie  $570 \pm 20$  nm, w przypadku VRM1 (zob. dodatek 3), lub jeżeli w wyniku zmieszania badanej substancji chemicznej z wodą uzyskuje się barwiony roztwór, w przypadku VRM2 (zob. dodatek 4), zakłada się, że badana substancja chemiczna zakłóca pomiar absorbancji wzorca (OD) formazanu MTT i należy przeprowadzić kolejne pogłębione kontrole z barwnikiem lub, alternatywnie, należy zastosować procedurę spektrofotometrii HPLC/UPLC i wtedy te kontrole nie są konieczne (zob. pkt 41 i 42 oraz dodatki III i IV)(34)(35). Podczas dokonywania pomiaru absorbancji wzorca (OD) należy nałożyć każdą zakłócającą badaną substancję chemiczną na co najmniej dwie kontrpróby żywych



tkanek, które w celu uzyskania barwy nieswoistej w kontroli żywych tkanek (NSC<sub>living</sub>) podlegają pełnej procedurze badawczej, ale podczas etapu inkubacji z MTT są inkubowane z pożywką zamiast z roztworem MTT (34)(35). Kontrolę NSC<sub>living</sub> należy przeprowadzać równolegle z badaniem barwionej substancji chemicznej, a w przypadku wielokrotnego badania, niezależną kontrolę NSC<sub>living</sub> należy przeprowadzić podczas każdego wykonanego badania (w każdej serii badawczej) z powodu naturalnej różnorodności biologicznej żywych tkanek. Rzeczywistą żywotność tkanek oblicza się jako: odsetek żywotności tkanek uzyskanej w wyniku narażenia żywych tkanek na zakłócanie badaną substancją chemiczną i inkubowanych w roztworze MTT (%Viability<sub>test</sub>), pomniejszony o odsetek tkanek o barwie nieswoistej uzyskany w wyniku narażenia żywych tkanek na zakłócenie badaną substancją chemiczną i inkubowanych na podłożu bez MTT, w badaniu przeprowadzonym jednocześnie z korygowanym badaniem (%NSC<sub>living</sub>), tj. rzeczywista żywotność tkanek = [%Viability<sub>test</sub>] - [%NSC<sub>living</sub>].

38. W celu identyfikacji bezpośrednich reduktorów MTT, każdą badaną substancję chemiczną należy dodać do świeżo przygotowanego roztworu MTT. Do roztworu MTT dodaje się odpowiednią ilość badanej substancji chemicznej i inkubuje się tę mieszaninę przez około 3 godziny w normalnych warunkach hodowli kultur (zob. dodatki III i IV)(34)(35). Jeżeli mieszanina MTT zawierająca badaną substancję chemiczną (lub zawiesina w przypadku nierozpuszczalnej badanej substancji chemicznej) zmieni barwę na niebieską/fioletową, zakłada się, że badana substancja chemiczna bezpośrednio redukuje MTT i należy przeprowadzić pogłębioną kontrolę funkcjonalną nieżywotnych wytworów tkankowych RhCE, stosując niezależnie pomiar absorbancji wzorca (OD) lub procedurę spektrofotometrii HPLC/UPLC. Do tej dodatkowej kontroli funkcjonalnej używa się martwych tkanek, które wykazują jedynie resztkową aktywność metaboliczną, ale wchłaniają i zatrzymują badaną substancję chemiczną w podobny sposób, co tkanki żywotne. Martwe tkanki w VRM1 przygotowuje się, narażając je na działanie niskiej temperatury („uśmiercenie przez zamrożenie”). Martwe tkanki w VRM2 przygotowuje się za pomocą przedłużonej inkubacji (np. co najmniej 24±1 h) w wodzie, po czym następuje przechowywanie w niskiej temperaturze („uśmiercenie wodą”). Każda substancja chemiczna redukująca MTT nanoszona jest na co najmniej dwie kontrpróby martwych tkanek, które przechodzą przez pełną procedurę badawczą, by wygenerować kontrolę nieswoistej redukcji MTT (NSMTT) (34)(35). Pojedyncza kontrola NSMTT jest wystarczająca w odniesieniu do każdej badanej substancji chemicznej, niezależnie od liczby przeprowadzonych niezależnych badań/serii badawczych. Rzeczywistą żywotność tkanek oblicza się jako: odsetek żywotności tkanek uzyskaną przy pomocy żywych tkanek narażonych na działanie reduktora MTT (%Viability<sub>test</sub>) pomniejszony o odsetek nieswoistej redukcji MTT uzyskany w wyniku narażenia martwych tkanek na działanie tego samego reduktora MTT, obliczony relatywnie względem kontroli

ujemnej przeprowadzonej jednocześnie z korygowanym badaniem (%NSMTT), tj. rzeczywista żywotność tkanek = [%Viability<sub>test</sub>] - [%NSMTT].

39. Badane substancje chemiczne, które zidentyfikowano jako powodujące zarówno zakłócenie barwy (zob. pkt 37), jak bezpośrednią redukcję MTT (zob. pkt 38), będą podczas wykonywania pomiaru absorbancji wzorca (OD) wymagały również trzeciego zestawu kontroli, oprócz kontroli NSMTT i NSC<sub>living</sub> opisanych w poprzednich punktach. Dzieje się tak zazwyczaj w przypadku badanych substancji chemicznych o ciemnym zabarwieniu, które pochłaniają światło w zakresie 570±30 nm (np. niebieska, fioletowa, czarna), ponieważ ich barwa swoista utrudnia ocenę zdolności do bezpośredniej redukcji MTT, jak opisano w pkt 38. Stwarza to konieczność domyślnego stosowania kontroli NSMTT wraz z kontrolami NSC<sub>living</sub>. Badane substancje chemiczne, w odniesieniu do których przeprowadza się kontrole NSMTT i NSC<sub>living</sub>, mogą zostać wchłonięte i zatrzymane zarówno przez żywe, jak i martwe tkanki. Zatem w tym przypadku kontrola NSMTT może nie tylko korygować potencjalną bezpośrednią redukcję MTT wywołaną przez badaną substancję chemiczną, ale również zakłócenie barwy wynikającą z wchłaniania i zatrzymywania badanej substancji chemicznej przez martwe tkanki. Mogłoby to doprowadzić do podwójnej korekty zakłócenia barwy, ponieważ kontrola NSC<sub>living</sub> koryguje już zakłócenie barwy wynikające z wchłaniania i zatrzymywania badanej substancji chemicznej przez żywe tkanki. Aby uniknąć podwójnej korekty możliwej w przypadku zakłócenia barwy, należy przeprowadzić trzecią kontrolę nieswoistego zabarwienia martwych tkanek (NSC<sub>killed</sub>) (zob. dodatki III i IV)(34)(35). W trakcie tej dodatkowej kontroli badana substancja chemiczna nakładana jest na co najmniej dwie kontrpróby martwych kontrprób tkanek na czas narażenia, które podlegają pełnemu badaniu, ale są inkubowane z pożywką zamiast z roztworem MTT w trakcie etapu inkubacji z MTT. Pojedyncza kontrola NSC<sub>killed</sub> jest wystarczająca dla każdej badanej substancji chemicznej, niezależnie od liczby przeprowadzonych niezależnych badań/serii badawczych, lecz powinna być przeprowadzana jednocześnie z kontrolą NSMTT z wykorzystaniem tej samej partii tkanek. Rzeczywistą żywotność tkanek oblicza się jako: odsetek żywotności tkanek uzyskanych za pomocą żywych tkanek narażonych na działanie badanej substancji chemicznej (%Viability<sub>test</sub>) pomniejszony o %NSMTT, pomniejszony o %NSC<sub>living</sub>, zwiększony o odsetek tkanek o nieswoistej barwie uzyskany z martwych tkanek narażonych na zakłócenie badaną substancją chemiczną i inkubowanych na podłożu bez MTT, obliczony w stosunku do kontroli ujemnej przeprowadzonej jednocześnie z korygowanym badaniem (%NSC<sub>killed</sub>), tj. rzeczywista żywotność tkanek = [%Viability<sub>test</sub>] - [%NSMTT] - [%NSC<sub>living</sub>] + [%NSC<sub>killed</sub>].
40. Należy zauważyć, że nieswoista redukcja MTT i nieswoiste zakłócenia barwy mogą zwiększyć OD (podczas przeprowadzania pomiarów absorbancji wzorca) ekstraktu

tkankowego powyżej zakresu liniowości spektrofotometru i że niespecyficzna redukcja MTT może również zwiększyć powierzchnię pików formazanu MTT (podczas przeprowadzania pomiaru spektrofotometrii HPLC/UPLC) ekstraktu tkankowego powyżej zakresu liniowości spektrofotometru. W związku z tym istotne jest, aby każde laboratorium przed rozpoczęciem badania badanych substancji chemicznych do celów regulacyjnych określiło liniowość zakresu OD / powierzchni pików swojego spektrofotometru za pomocą np. formazanu MTT (CAS # 57360-69-7) dostępnego na rynku np. od Sigma-Aldrich (nr katalogowy M2003).

41. Pomiar absorbancji wzorca (OD) z wykorzystaniem spektrofotometru jest odpowiedni do oceny bezpośrednich reduktorów MTT oraz zakłócających barwę badanych substancji chemicznych, gdy odnotowane zakłócenie pomiaru formazanu MTT nie jest zbyt silne (np. gdy OD ekstraktów tkankowych uzyskanych za pomocą badanej substancji chemicznej bez skorygowania bezpośredniej redukcji MTT lub interferencji koloru mieszczą się w liniowym zakresie spektrofotometru). Niemniej jednak wyniki badanych substancji chemicznych wytwarzających %NSMTT lub %NSC<sub>living</sub>  $\geq 60\%$  (VRM1 oraz VRM2 w przypadku protokołu dotyczącego cieczy) lub 50 % (VRM2 w przypadku protokołu dotyczącego substancji stałych) kontroli ujemnej powinny być przyjmowane z ostrożnością, ponieważ stanowi to ustaloną granicę odcięcia stosowaną w VRM do odróżniania substancji chemicznych sklasyfikowanych od niesklasyfikowanych (zob. pkt 44). Nie można jednak przeprowadzić pomiaru absorbancji wzorca (OD) jeżeli zakłócenia pomiaru formazanu MTT są zbyt silne (np. jeżeli prowadzą do sytuacji, w której nieskorygowane wartości OD badanych ekstraktów tkankowych znajdują się poza liniowym zakresem spektrofotometru). Barwne badane substancje chemiczne lub badane substancje chemiczne barwiące się przy kontakcie z wodą lub izopropanolem, które zbyt silnie zakłócają pomiar absorbancji wzorca (OD) formazanu MTT, można wciąż poddać ocenie, wykorzystując spektrofotometrię HPLC/UPLC (zob. dodatki III i IV). Wynika to z tego, że system HPLC/UPLC umożliwia oddzielenie formazanu MTT od badanej substancji chemicznej przed jej oznaczeniem ilościowym (36). Z tego powodu kontrole NSC<sub>living</sub> lub NSC<sub>killed</sub> nie są nigdy wymagane, gdy wykorzystuje się spektrofotometrię HPLC/UPLC, niezależnie od badanej substancji chemicznej. Kontrole NSMTT należy jednak stosować, jeżeli istnieje podejrzenie, że badana substancja chemiczna bezpośrednio redukuje MTT (zgodnie z procedurą opisaną w pkt 38). Kontrole NSMTT należy również stosować w przypadku badania substancji chemicznych mających zabarwienie (swoiste lub pojawiające się, kiedy substancja znajduje się w wodzie), który utrudnia ocenę zdolności substancji do bezpośredniej redukcji MTT, jak opisano w pkt 38. W przypadku stosowania spektrofotometrii HPLC/UPLC do pomiaru formazanu MTT procent żywotności tkanek oblicza się jako procent MTT powierzchni pików formazanu uzyskanej z żywych tkanek poddanych działaniu badanej substancji chemicznej w stosunku do

piku formazanu MTT uzyskanego przy równoczesnej kontroli ujemnej. W przypadku badanych substancji chemicznych zdolnych do bezpośredniej redukcji MTT, rzeczywistą żywotność tkanek oblicza się jako:  $\%Viability_{test} \text{ minus } \%NSMTT$ , jak opisano w ostatnim zdaniu pkt 38. Na koniec należy zauważyć, że bezpośrednich reduktorów MTT lub bezpośrednich reduktorów MTT powodujących również zakłócenie barwy, które są zatrzymywane w tkankach po poddaniu działaniu substancji i redukują MTT tak bardzo, że prowadzą do sytuacji, w której wartości OD (przy użyciu standardowego pomiaru OD) lub powierzchnie piku (przy użyciu spektrofotometrii UPLC/HPLC) badanych ekstraktów tkankowych wykraczają poza zakres liniowości spektrofotometru – nie można ocenić za pomocą metod badawczych RhCE, chociaż przewiduje się, że wystąpią tylko w bardzo rzadkich sytuacjach.

42. Spektrofotometria HPLC/UPLC może być stosowana ze wszystkimi rodzajami badanych substancji chemicznych (barwnych, bezbarwnych, reduktorów MTT i substancji nieredukujących MTT) do pomiaru formazanu MTT (11)(36). Ponieważ systemy spektrofotometrii HPLC/UPLC są zróżnicowane, ustalanie przez wszystkich użytkowników dokładnie tych samych warunków dotyczących systemu jest niepraktyczne. W związku z tym należy wykazać kwalifikację systemu spektrofotometrii HPLC/UPLC przed jego zastosowaniem, aby określić ilościowo formazan MTT z ekstraktów tkankowych poprzez spełnienie kryteriów dopuszczalności zestawu standardowych parametrów kwalifikacyjnych w oparciu na kryteriach opisanych w wytycznych Agencji Żywności i Leków Stanów Zjednoczonych dotyczących przemysłu walidacji metodą bioanalityczną (36)(38). Te kluczowe parametry i kryteria ich dopuszczalności przedstawiono w dodatku 5. Po spełnieniu kryteriów dopuszczalności określonych w dodatku 5, system spektrofotometrii HPLC/UPLC uznaje się za kwalifikowany i gotowy do pomiaru formazanu MTT w warunkach doświadczalnych opisanych w niniejszej metodzie badawczej.

### **Kryteria dopuszczalności**

43. W przypadku każdej serii badawczej z wykorzystaniem partii tkanek RhCE, które przeszły kontrolę jakości (zob. pkt 30), tkanki poddane działaniu substancji przeznaczonej do celów kontroli ujemnej powinny wykazywać wartość OD odzwierciedlającą jakość tkanek, które przeszły wszystkie etapy wysyłki i odbioru oraz wszystkie procesy protokołu badania, i nie powinny mieścić się poza ustalonymi na podstawie danych historycznych granicami opisanymi w tabeli 2 (zob. pkt 26). Podobnie, tkanki poddane działaniu substancji służącej do kontroli dodatniej, tj. octan metylu, powinny wykazywać średnią żywotność tkanki  $< 50\%$  w odniesieniu do kontroli ujemnej w ramach VRM1 przy zastosowaniu albo protokołu dotyczącego cieczy, albo dotyczącego substancji stałych; oraz  $\leq 30\%$  (protokół dotyczący cieczy) lub  $\leq 20\%$  (protokół dotyczący substancji stałych) w odniesieniu do kontroli

negatywnej w VRM2, tym samym odzwierciedlając zdolność tkanek do reakcji na drażniącą badaną substancję chemiczną w warunkach danej metody badawczej (34)(35). Zmienność między kontrpróbami tkanek w przypadku badanych substancji chemicznych i substancji kontrolnych powinna mieścić się w dopuszczalnych granicach (tj. różnica w żywotności między dwoma kontrpróbami tkanek powinna wynosić mniej niż 20 % lub odchylenie standardowe między trzema kontrpróbami tkanek nie powinno przekraczać 18 %). Jeżeli uwzględniona w serii badawczej kontrola ujemna lub dodatnia nie mieści się w dopuszczalnych zakresach, seria badawcza zostaje uznana za „niekwalifikującą się” i należy ją powtórzyć. Jeżeli zmienność między kontrpróbami tkanek w przypadku danej badanej substancji chemicznej wykracza poza dopuszczalne zakresy, badanie trzeba uznać za „niekwalifikujące się” i należy ponownie przebadать daną badaną substancję chemiczną.

### **Interpretacja wyników i model prognozowania**

44. Wartości / powierzchnie piku OD uzyskane przy wykorzystaniu kontrprób ekstraktów tkankowych dla każdej badanej substancji chemicznej należy wykorzystać do obliczenia średniej procentowej żywotności tkanek (średniej między kontrpróbami tkanek) znormalizowanej w odniesieniu do kontroli ujemnej, której żywotność ustala się na 100 %. Wartość graniczną procentowej żywotności tkanek służącą do identyfikowania badanych substancji chemicznych, które nie wymagają zaklasyfikowania do substancji powodujących podrażnienie lub poważne uszkodzenie oczu (brak kategorii wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP), podano w tabeli 4. Wynik należy zatem interpretować w następujący sposób:

- Badaną substancję chemiczną określa się jako niewymagającą klasyfikacji i oznakowania wg GHS ONZ i rozporządzenia CLP (brak kategorii), jeżeli średnia procentowa żywotności tkanek po narażeniu i inkubacji po narażeniu jest wyższa (>) niż ustalona wartość graniczna procentowej żywotności tkanek, jak przedstawiono w tabeli 4. W takim przypadku nie ma konieczności przeprowadzenia dalszych badań w ramach innych metod badawczych.
- Jeżeli średnia procentowa żywotności tkanek po narażeniu i inkubacji po narażeniu jest niższa lub równa ( $\leq$ ) niż ustalona wartość graniczna procentowej żywotności tkanek, nie można przewidzieć działania, jak przedstawiono w tabeli 4. W takim przypadku niezbędne będzie przeprowadzenie dalszych badań w ramach innych metod badawczych, ponieważ metody badawcze RhCE dają szereg wyników fałszywie dodatnich (zob. pkt 14–15) i nie mogą rozróżnić między kategoriami 1 i 2 wg GHS ONZ i rozporządzenia CLP (zob. pkt 17).

**Tabela 4:** Modele prognozowania wg klasyfikacji GHS ONZ / rozporządzenia CLP

| Kategoria VRM                                                                                                                                                 | Brak kategorii                  | Nie można przewidzieć działania |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| VRM1 - badanie działania drażniącego na oczy<br>EpiOcular™<br>(w przypadku obu protokołów)                                                                    | Średnia żywotność tkanek > 60 % | Średnia żywotność tkanek ≤ 60 % |
| VRM2 – badanie działania drażniącego na oczy z wykorzystaniem ludzkiego nabłonka rogówki SkinEthic™<br>(w przypadku protokołu dotyczącego cieczy)             | Średnia żywotność tkanek > 60 % | Średnia żywotność tkanek ≤ 60 % |
| VRM2 – badanie działania drażniącego na oczy z wykorzystaniem ludzkiego nabłonka rogówki SkinEthic™<br>(w przypadku protokołu dotyczącego substancji stałych) | Średnia żywotność tkanek > 50 % | Średnia żywotność tkanek ≤ 50 % |

45. Jeśli wynik jest jednoznaczny, w przypadku badanej substancji chemicznej wystarczy pojedyncze badanie składające się z co najmniej dwóch kontrprób tkanek. W przypadku wyników granicznych, np. niezgodności powtarzalnych pomiarów lub średniej procentowej żywotności tkanek równej  $60 \pm 5\%$  (VRM1 i VRM2 w przypadku protokołu dotyczącego cieczy) lub  $50 \pm 5\%$  (VRM2 w przypadku protokołu dotyczącego substancji stałych), należy jednak rozważyć przeprowadzenie drugiego badania, jak również trzeciego w przypadku niezgodności między wynikami dwóch pierwszych badań.
46. W stosownych i uzasadnionych przypadkach w odniesieniu do określonych rodzajów mieszanin można rozważyć zastosowanie innych wartości granicznych procentowej żywotności tkanek służących do odróżnienia badanych substancji chemicznych sklasyfikowanych i niesklasyfikowanych, aby zwiększyć ogólną skuteczność metody badawczej dla tych rodzajów mieszanin (zob. pkt 14). Wzorcowe substancje chemiczne mogą się okazać przydatne do oceny potencjału poważnego uszkodzenia oczu/podrażnienia oczu nieznanymi badanymi substancjami chemicznymi lub klasy produktowej lub do oceny względnego potencjału toksyczności sklasyfikowanej substancji chemicznej dla oczu w określonym zakresie reakcji dodatnich.

## DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

### Dane

47. Dane z poszczególnych kontrprób tkanek w serii badawczej (np. dane dotyczące wartości OD / powierzchni piku formazanu MTT i obliczonej procentowej żywotności tkanek dla każdej badanej substancji chemicznej i kontroli, łącznie

z końcową prognozą dotyczącą metody badawczej RhCE) należy przedstawić w formie tabelarycznej w odniesieniu do każdej badanej substancji chemicznej, w stosownych przypadkach uwzględniając dane z powtórzonych badań. Należy również przedstawić średnią procentową żywotność tkanek i różnicę w żywotności między dwoma kontrpróbami tkanek (jeżeli  $n = 2$  kontrpróby tkanek) lub SD (jeżeli  $n \geq 3$  kontrprób tkanek) w odniesieniu do poszczególnych badanych substancji chemicznych i kontroli. Należy zgłosić, w odniesieniu do każdej badanej substancji chemicznej, wszelkie odnotowane zakłócenia w pomiarze formazanu MTT wynikające ze spowodowanej przez badaną substancję chemiczną bezpośredniej redukcji MTT lub zakłócenia barwy.

### **Sprawozdanie z badania**

48. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

#### *Badana substancja chemiczna*

substancja jednoskładnikowa:

- dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa(-y) IUPAC lub CAS, numer(y) w rejestrze CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny lub inne identyfikatory,
- stan skupienia, lotność, pH, LogP, masa cząsteczkowa, klasa chemiczna oraz dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne mające znaczenie dla przebiegu badania w zakresie, w jakim są dostępne,
- czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń w stosownych przypadkach i jeśli jest to praktycznie wykonalne itp.,
- postępowanie z daną substancją przed rozpoczęciem badań, w stosownych przypadkach (np. podgrzewanie, mielenie),
- dane na temat warunków przechowywania i stabilności w zakresie, w jakim są dostępne;

substancja wieloskładnikowa, UVCB i mieszanina

- maksymalnie szczegółowa charakterystyka wykonana np. za pomocą nazwy chemicznej (zob. powyżej), czystości, występowania ilościowego oraz istotnych właściwości fizykochemicznych składników (zob. powyżej), w zakresie, w jakim są dostępne,
- stan skupienia oraz dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne mające znaczenie dla przebiegu badania w zakresie, w jakim są dostępne,

- czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń w stosownych przypadkach i jeśli jest to praktycznie wykonalne itp.,
- postępowanie z daną substancją przed rozpoczęciem badań, w stosownych przypadkach (np. podgrzewanie, mielenie),
- dane na temat warunków przechowywania i stabilności w zakresie, w jakim są dostępne.

*Substancje służące do kontroli dodatniej i ujemnej*

- dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa(-y) IUPAC lub CAS, numer(y) w rejestrze CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny lub inne identyfikatory,
- stan skupienia, lotność, masa cząsteczkowa, klasa chemiczna oraz dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne mające znaczenie dla przebiegu badania w zakresie, w jakim są dostępne,
- czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń w stosownych przypadkach i jeśli jest to praktycznie wykonalne itp.,
- postępowanie z daną substancją przed rozpoczęciem badań, w stosownych przypadkach (np. podgrzewanie, mielenie),
- warunki przechowywania i stabilności w dostępnym zakresie,
- uzasadnienie zastosowania innej kontroli ujemnej niż ultraczysta H<sub>2</sub>O lub DPBS wolne od Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>, w stosownych przypadkach;
- uzasadnienie zastosowania innej kontroli dodatniej niż czysty octan metylu, w stosownych przypadkach,
- odniesienie do wyników historycznych kontroli dodatnich i ujemnych, w których zastosowano odpowiednie kryteria dopuszczalności serii badawczej.

*Informacje dotyczące sponsora i placówki przeprowadzającej badanie*

- nazwa i adres sponsora i placówki przeprowadzającej badanie oraz dane kierownika badań.

*Zastosowany wytwór tkankowy RhCE i protokół (oraz uzasadnienie wyboru w stosownych przypadkach)*

*Warunki metody badawczej*

- zastosowany wytwór tkankowy RhCE, w tym numer partii,



- długość fali i filtr środkowoprzepustowy (w stosownych przypadkach) stosowany do określenia ilościowego formazanu MTT oraz zakres liniowości urządzenia pomiarowego (np. spektrofotometru),
- opis metody wykorzystanej do oceny ilościowej formazanu MTT,
- opis stosowanego systemu spektrofotometrycznego HPLC/UPLC, w stosownych przypadkach,
- pełne informacje podstawowe na temat stosowanego wytworu tkankowego RhCE, z uwzględnieniem jego efektywności. Powinno to między innymi obejmować:
  - i) kontrolę jakości dotyczącą żywotności (dostawca);
  - ii) żywotność w warunkach metody badawczej (użytkownik);
  - iii) kontrolę jakości dotyczącą funkcji bariery;
  - iv) morfologię, jeżeli jest dostępna;
  - v) odtwarzalność i zdolność predykcyjną;
  - vi) inne kontrole jakości (QC) dotyczące wytworu tkankowego RhCE, jeżeli są dostępne,
- odwołanie do danych historycznych wytworu tkankowego RhCE. Powinno to między innymi obejmować: dopuszczalność danych QC z odwołaniem do danych dotyczących serii historycznych,
- oświadczenie, że placówka badawcza wykazała się biegłością w stosowaniu metody badawczej przed przystąpieniem do jej rutynowego stosowania za pomocą badania substancji chemicznych przeznaczonych do oceny biegłości.

#### *Kryteria dopuszczalności badania i serii badawczej*

- średnie wartości oraz zakresy dopuszczalności dodatniej i ujemnej kontroli na podstawie danych historycznych,
- dopuszczalna zmienność wśród kontrprób tkanek w przypadku dodatniej i ujemnej kontroli,
- dopuszczalna zmienność między kontrpróbami tkanek w przypadku badanej substancji chemicznej.

#### *Procedura badania*

- informacje szczegółowe dotyczące zastosowanej procedury badawczej,
- dawki podawanych badanych substancji chemicznych i substancji kontrolnych,
- czas trwania i temperatura podczas okresów narażenia, zanurzenia po zakończeniu narażenia oraz inkubacji po zakończeniu narażenia (w stosownych przypadkach),
- opis wszelkich modyfikacji w procedurze badawczej,

- wskazanie prób kontroli używanych w odniesieniu do bezpośrednich reduktorów MTT lub badanych substancji chemicznych, które w wyniku reakcji przechodzą w barwny produkt, w stosownych przypadkach,
- liczba kontrprób tkanek wykorzystanych na badaną substancję chemiczną i kontrolę (kontrola dodatnia, kontrola ujemna oraz NSMTT, NSC<sub>living</sub> i NSC<sub>killed</sub>, w stosownych przypadkach).

### *Wyniki*

- tabelaryczne zestawienie danych uzyskanych w badaniu poszczególnych badanych substancji chemicznych i substancji kontrolnych dla każdej serii badawczej (uwzględniając, w stosownych przypadkach, powtórzone doświadczenia) i każdego pomiaru kontrpróby, w tym wartości OD lub powierzchnia piku formazanu MTT, procentowa żywotność tkanek, średnia procentowa żywotność tkanek, różnica między kontrpróbami lub SD oraz prognoza końcowa,
- w stosownych przypadkach wyniki kontroli używanych w odniesieniu do bezpośrednich reduktorów MTT lub barwnych substancji chemicznych, w tym wartości OD lub powierzchnia piku formazanu MTT, %NSMTT, %NSC<sub>living</sub>, %NSC<sub>killed</sub>, różnica pomiędzy kontrpróbami tkanki lub SD, ostateczna prawidłowa procentowa żywotność tkanek oraz prognoza końcowa,
- wyniki uzyskane z zastosowaniem badanych substancji chemicznych i substancji kontrolnych w odniesieniu do określonych kryteriów dopuszczalności serii badawczej i badania,
- opis innych zaobserwowanych skutków, np. zabarwienie tkanek przez barwioną substancję chemiczną.

### *Omówienie wyników*

#### *Wniosek*

## BIBLIOGRAFIA

- (1) ONZ (2015). Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów (GHS), ST/SG/AC.10/30/Rev.6, wydanie szóste zmienione, Nowy Jork i Genewa: Organizacja Narodów Zjednoczonych. Dostępne na stronie internetowej: [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) Rozdział B.5 niniejszego załącznika, Działanie żrące/silnie drażniące na oczy.
- (3) Rozdział B.47 niniejszego załącznika, *Metoda badania zmętnienia i przepuszczalności rogówki u bydła do celów identyfikacji i) substancji chemicznych powodujących poważne uszkodzenie oczu oraz ii) substancji chemicznych, które nie wymagają zaklasyfikowania jako substancje drażniące oczu lub powodujące poważne uszkodzenie oczu.*
- (4) Rozdział B.48 niniejszego załącznika, *Metoda badania na izolowanym oku kurzym do celów identyfikacji i) substancji chemicznych powodujących poważne uszkodzenie oczu oraz ii) substancji chemicznych, które nie wymagają zaklasyfikowania.*
- (5) Rozdział B.61 niniejszego załącznika, *Metoda badania utraty fluoresceiny do celów identyfikacji substancji żrących i silnie drażniących dla oczu.*
- (6) Rozdział B.68 niniejszego załącznika, *Metoda badawcza in vitro krótkiego okresu narażenia do celów identyfikacji i) substancji chemicznych powodujących poważne uszkodzenie oczu oraz ii) substancji chemicznych, które nie wymagają zaklasyfikowania jako substancje drażniące oczu lub powodujące poważne uszkodzenie oczu.*
- (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 nr 27, Specjalne wydanie 2010, s. 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. Dostępne na stronie internetowej: <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC100280>.

- (9) Naukowy komitet doradczy EURL ECVAM (2014). *ESAC Opinion on the EURL ECVAM Eye Irritation Validation Study (EIVS) on EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE and a related Cosmetics Europe study on HPLC/UPLC-spectrophotometry as an alternative endpoint detection system for MTT-formazan*. Opinia ESAC nr 2014-03 z dnia 17 listopada 2014 r.; EUR 28173 EN; doi: 10.2787/043697. Dostępne na stronie internetowej: <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” nr 31, s. 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” nr 34, s. 55–70.
- (12) Naukowy komitet doradczy EURL ECVAM (2016). *ESAC Opinion on the SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT)*. Opinia ESAC nr 2016-02 z dnia 24 czerwca 2016 r.; EUR 28175 EN; doi: 10.2787/390390. Dostępne na stronie internetowej: <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*. (Tekst w przygotowaniu).
- (14) J.H. Draize, G. Woodard i H.O. Calvery (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” nr 82, s. 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” nr 24, s. 1–9.

- (16) Mosmann, T. (1983). *Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays*. „J. Immunol.Methods” nr 65, s. 55–63.
- (17) OECD (2016). *Seria dotycząca badań i oceny nr 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*. Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.
- (18) OECD (2005). *Seria dotycząca badań i oceny nr 34: Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*. Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.
- (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.” nr 39, s. 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*. [W:] *Alternative Toxicological Methods*, H. Salemi S.A. Katz (red.), CRC Press, s. 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” nr 27, s. 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” nr 27, s. 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.” nr 43, s. 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. nr 88, s. 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. nr 91, s. 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” nr 17, s. 113–126.
- (27) Hackett, R.B., McDonald, T.O. (1991). *Eye Irritation*. [W:] *Advances in Modern Toxicology: Dermatoxicology* F.N Marzulli i H.I. Maibach (red.), wydanie czwarte, s. 749–815. Waszyngton, USA: Hemisphere Publishing Corporation.
- (28) Fox, D.A., Boyes, W.K. (2008). *Toxic Responses of the Ocular and Visual System*. [W:] *Cassaret and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons* C.D. Klaassen (red.), wydanie siódme, s. 665–697. Withby, ON, Kanada: 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.” nr 39, s. 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.” nr 36, s. 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” nr 15, s. 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.” nr 39, s. 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.” nr 25, s. 41–54.
- (34) *EpiOcular™ EIT SOP*, wersja 8 (z dnia 5 marca 2013 r.). *EpiOcular™ EIT for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals*. Dostępne na stronie internetowej: [\[https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index\]](https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index).
- (35) *SkinEthic™ HCE EIT SOP*, wersja 1. (z dnia 20 lipca 2015 r.). *SkinEthic™ HCE Eye Irritation Test (EITL for Liquids, EITS for Solids) for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals*. Dostępne na stronie internetowej: <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” nr 29, s. 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.” nr 43, s. 101–127.
- (38) US FDA (2001). *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, maj 2001. Dostępne na stronie internetowej: <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*. [W:] Seria dotycząca badań i oceny nr 263, publikacje na temat środowiska. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

## **Dodatek 1**

### **DEFINICJE**

**Dokładność:** stopień zgodności wyników zastosowanej metody badawczej z przyjętymi wartościami odniesienia. Jest to miara efektywności metody badawczej i jeden z aspektów jej istotności. Pojęcia tego często używa się zamiennie z pojęciem „zgodność” na oznaczenie odsetka prawidłowych wyników uzyskiwanych przy użyciu metody badawczej (18).

**Wzorcowa substancja chemiczna:** substancja chemiczna używana jako wzorzec do porównań z badaną substancją chemiczną. Wzorcowa substancja chemiczna powinna mieć następujące cechy: (i) stałe i wiarygodne źródło(-a) na potrzeby jej identyfikacji i charakterystyki; (ii) podobieństwo strukturalne, funkcjonalne, chemiczne lub związane z klasą produktową do badanych substancji chemicznych; (iii) znane właściwości fizyczne i chemiczne; (iv) dane potwierdzające znane skutki; oraz (v) znaną siłę działania w zakresie pożądanых reakcji.

**Podejście oddolne:** stopniowe podejście stosowane w odniesieniu do badanej substancji chemicznej, w przypadku której podejrzewa się, że nie wymaga zaklasyfikowania i oznakowania jako substancja powodująca podrażnienie lub poważne uszkodzenie oka; takie podejście polega na odróżnieniu substancji chemicznych niewymagających zaklasyfikowania i oznakowania (wynik ujemny) od pozostałych substancji chemicznych (wynik dodatni).

**Substancja chemiczna:** substancja lub mieszanina.

**Zgodność:** zob. „dokładność”.

**Rogówka:** przezroczysta warstwa w przedniej części gałki ocznej, która okrywa tęczówkę i źrenicę oraz wpuszcza światło do wnętrza oka.

**CV:** współczynnik zmienności.

**Dev:** odchylenie.

**EIT:** badanie działania drażniącego na oczy.

**EURL ECVAM:** laboratorium referencyjne Unii Europejskiej ds. metod alternatywnych wobec testów na zwierzętach.

**Podrażnienie oka:** zmiany w oku spowodowane zaaplikowaniem badanej substancji chemicznej na wierzchnią warstwę oka, które są w pełni odwracalne w ciągu 21 dni po zaaplikowaniu. Określenie używane zamiennie z określeniem „odwracalne skutki działania na oczy” oraz ze sformułowaniem „kategoria 2 wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP”.

**ET<sub>50</sub>:** czas narażenia na działanie potrzebny do zmniejszenia żywotności tkanek o 50 % po zastosowaniu wzorcowej substancji chemicznej w określonym, stałym stężeniu.



**Odsetek wyników fałszywie ujemnych:** odsetek wszystkich substancji dających wynik dodatni fałszywie zidentyfikowanych po zastosowaniu metody badawczej jako dające wynik ujemny. Jest to jeden ze wskaźników efektywności metody badawczej.

**Odsetek wyników fałszywie dodatnich:** odsetek wszystkich substancji dających wynik ujemny fałszywie zidentyfikowanych po zastosowaniu metody badawczej jako dające wynik dodatni. Jest to jeden ze wskaźników efektywności metody badawczej.

**Zagrożenie:** nieodłączna właściwość czynnika lub sytuacja, która może potencjalnie doprowadzić do niekorzystnych skutków w przypadku narażenia organizmu, systemu lub (sub) populacji na taki czynnik.

**HCE:** ludzki nabłonek rogówki SkinEthic™.

**HPLC:** wysokosprawna chromatografia cieczowa.

**IC<sub>50</sub>:** stężenie, w którym wzorcowa substancja chemiczna powoduje zmniejszenie żywotności tkanek o 50 % po stałym czasie narażenia na działanie (np. 30-minutowe poddanie działaniu substancji z wykorzystaniem SDS).

**Dawka nieskończona:** ilość badanej substancji chemicznej nakładana na wytwór tkankowy RhCE przekraczająca ilość konieczną do całkowitego, jednolitego pokrycia powierzchni nabłonka.

**Nieodwracalne skutki działania na oczy:** zob. „Poważne uszkodzenie oczu”.

**LLOQ:** dolna granica oznaczalności.

**LogP:** logarytm współczynnika podziału oktanol-woda

**Mieszanina:** mieszanina lub roztwór, które składają się z co najmniej dwóch substancji.

**Substancja jednoskładnikowa:** substancja zdefiniowana za pomocą jej składu ilościowego, w której jeden główny składnik występuje w stężeniu co najmniej 80 % (w/w).

**Substancja wieloskładnikowa:** substancja zdefiniowana za pomocą jej składu ilościowego, w której więcej niż jeden główny składnik występuje w stężeniu  $\geq 10\%$  (w/w) i  $< 80\%$  (w/w). Substancja wieloskładnikowa powstaje w wyniku procesu wytwarzania. Różnica między mieszaniną a substancją wieloskładnikową polega na tym, że mieszaninę uzyskuje się w wyniku zmieszania co najmniej dwóch substancji, między którymi nie zachodzi reakcja chemiczna. Substancja wieloskładnikowa powstaje w wyniku reakcji chemicznej.

**MTT:** bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylotetrazoliowy MTT.

**Kontrola ujemna:** próbka zawierająca wszystkie składniki układu badawczego, poddana działaniu substancji chemicznej, o której wiadomo, że nie wywołuje reakcji dodatniej w układzie badawczym. Próbkę tę przetwarza się razem z próbkami poddanymi działaniu badanej substancji chemicznej i z innymi próbkami kontrolnymi oraz wykorzystuje się ją do określenia 100 % żywotności komórek.

**Niesklasyfikowane:** substancje chemiczne, które nie zostały zaklasyfikowane jako substancje podrażniające oczy (kategoria 2 wg GHS/CLP ONZ, kategoria 2A lub 2B wg GHS ONZ) ani substancje powodujące poważne uszkodzenie oczu (kategoria 1 wg GHS/CLP ONZ). Określenie używane zamiennie ze sformułowaniem „brak kategorii wg GHS/CLP ONZ”.

**NSC<sub>killed</sub>:** barwa nieswoista martwych tkanek.

**NSC<sub>living</sub>:** barwa nieswoista żywych tkanek.

**NSMTT:** nieswoista redukcja MTT.

**OD:** gęstość optyczna.

**Standardy wykonywania badań (PS):** standardy oparte na zwalidowanej metodzie badawczej, którą uznano za naukowo uzasadnioną, zapewniające podstawę do oceny porównywalności proponowanej metody badania, która jest podobna do metody referencyjnej pod względem mechanistycznym i funkcjonalnym. Uwzględnia się: (i) zasadnicze elementy metody badawczej; (ii) podstawowy wykaz chemicznych substancji odniesienia wybranych spośród substancji chemicznych wykorzystywanych w celu wykazania dopuszczalnej efektywności zwalidowanej metody badania; oraz (iii) podobny poziom dokładności i wiarygodności, na podstawie wyników uzyskanych dla zwalidowanej metody badania, który proponowana metoda badania powinna osiągnąć przy ocenie z wykorzystaniem podstawowego wykazu chemicznych substancji odniesienia (18).

**Kontrola dodatnia:** próbka zawierająca wszystkie składniki układu badawczego, poddana działaniu substancji chemicznej, o której wiadomo, że wywołuje reakcję dodatnią w układzie badawczym. Próbkę tę przetwarza się razem z próbkami poddanymi działaniu badanej substancji chemicznej i z innymi próbkami kontrolnymi. Aby zapewnić możliwość oceny zmienności reakcji w kontroli dodatniej w czasie, siła reakcji w postaci silnego działania drażniącego nie może być zbyt duża.

**Istotność:** opis powiązania badania z oczekiwanym skutkiem oraz czy jest ono znaczące i użyteczne z punktu widzenia określonego celu. Jest to zakres, w jakim badanie prawidłowo mierzy lub przewiduje biologiczny oczekiwany skutek. Istotność obejmuje uwzględnienie dokładności (zgodności) metody badania (18).

**Wiarygodność:** miary zakresu, w jakim metoda badawcza może być przeprowadzana w sposób odtwarzalny w jednym laboratorium i pomiędzy laboratoriami na przestrzeni czasu w przypadku jej przeprowadzania przy użyciu tego samego protokołu. Ocenia się ją poprzez obliczenie odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej i międzylaboratoryjnej (18).

**Badanie zastępcze:** badanie, które ma na celu zastąpienie badania stosowanego rutynowo i zaakceptowanego do identyfikacji zagrożeń lub oceny ryzyka i w odniesieniu do którego ustalono, że w porównaniu do zaakceptowanego badania zapewnia odpowiednio równoważną lub lepszą ochronę zdrowia ludzi lub zwierząt lub środowiska we wszystkich możliwych warunkach badania i w odniesieniu do wszystkich możliwych substancji chemicznych (18).

**Odtwarzalność:** zgodność wyników uzyskanych w wyniku powtarzanego badania tej samej badanej substancji chemicznej przy użyciu tego samego protokołu badania (zob. „Wiarygodność”) (18).

**Odwracalne skutki działania na oczy:** zob. „Działanie drażniące na oczy”.

**RhCE:** zrekonstruowany ludzki nabłonek przypominający rogówkę.

**Seria badawcza:** seria badawcza obejmuje przynajmniej jedną badaną substancję chemiczną, badaną równocześnie z kontrolą ujemną i kontrolą dodatnią.

**SD:** odchylenie standardowe.

**Czułość:** odsetek wszystkich dodatnich/aktywnych substancji chemicznych prawidłowo sklasyfikowanych w badaniu. Jest to miara dokładności metody badania, która daje wyniki katagoryczne, stanowiąca parametr istotny dla oceny istotności metody badania (18).

**Poważne uszkodzenie oczu:** uszkodzenie tkanki oka lub poważne fizyczne pogorszenie widzenia spowodowane zaaplikowaniem badanej substancji chemicznej na przednią powierzchnię oka, które nie są w pełni odwracalne w ciągu 21 dni po zaaplikowaniu. Określenie jest używane zamiennie z określeniem „nieodwracalne skutki działania na oczy” oraz ze sformułowaniem „kategoria 1 wg GHS i CLP ONZ”.

**Standardowe procedury operacyjne (SPO):** formalne, sporządzone w formie pisemnej procedury szczegółowo opisujące sposób, w jaki należy przeprowadzać właściwe rutynowe operacje laboratoryjne oraz operacje laboratoryjne właściwe dla danego badania. Procedur tych wymaga się w ramach dobrej praktyki laboratoryjnej.

**Swoistość:** odsetek wszystkich negatywnych/nieczynnych badanych chemikaliów prawidłowo sklasyfikowanych w badaniu. Jest to miara dokładności metody badania, która daje wyniki katagoryczne, stanowiąca parametr istotny dla oceny istotności metody badania (18).

**Substancja:** pierwiastek chemiczny i jego związki w stanie naturalnym lub uzyskane w wyniku dowolnego procesu produkcyjnego, w tym wszelkie dodatki konieczne do zachowania trwałości produktu i wszelkie zanieczyszczenia powstałe w wyniku zastosowanego procesu, z wyłączeniem wszelkich rozpuszczalników, które można oddzielić bez wpływu na stabilność substancji i bez zmiany jej składu.

**Badanie:** pojedyncza badana substancja chemiczna badana jednocześnie na co najmniej dwóch kontrpróbach tkanek, co określono w odpowiadającej standardowej procedurze operacyjnej.

**Żywotność tkanek:** parametr określający całkowitą aktywność populacji komórek w zrekonstruowanych tkankach jako ich zdolność do obniżenia zawartości barwnika przyżyciowego MTT, który, w zależności od pomiaru końcowego i zastosowanego schematu badania odpowiada całkowitej liczbie lub żywotności komórek.

**Podejście odgórne:** stopniowe podejście stosowane w odniesieniu do substancji chemicznej, w przypadku której podejrzewa się, że powoduje poważne uszkodzenie oczu; takie podejście polega na odróżnieniu substancji chemicznych powodujących poważne uszkodzenie oczu (wynik dodatni) od pozostałych substancji chemicznych (wynik ujemny).

**Badana substancja chemiczna:** dowolna substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

**Zintegrowana strategia badań:** strategia badań sekwencyjnych, w ramach której metody badawcze stosuje się w sposób sekwencyjny. Wszystkie istniejące informacje na temat badanej substancji chemicznej są analizowane na każdym poziomie z zastosowaniem procesu uwzględniającego wagę dowodów w celu określenia, czy dostępna jest wystarczająca ilość informacji do podjęcia decyzji o klasyfikacji zagrożenia, przed przejściem do następnego poziomu w obrębie strategii. Jeżeli na podstawie dostępnych informacji można przypisać badanej substancji chemicznej potencjał / siłę działania w zakresie zagrożenia, dodatkowe badania nie są wymagane (18).

**ULOQ:** górna granica oznaczalności.

**Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów Organizacji Narodów Zjednoczonych (GHS ONZ):** system obejmujący klasyfikację substancji chemicznych (substancji i mieszanin) według znormalizowanych rodzajów i poziomów zagrożeń fizycznych, zdrowotnych i środowiskowych oraz odpowiednie elementy komunikacyjne, takie jak: piktogramy, hasła ostrzegawcze, zwroty wskazujące rodzaj zagrożenia, zwroty wskazujące środki ostrożności i karty charakterystyki, mające informować na temat szkodliwego działania tych substancji chemicznych w celu zapewnienia ochrony ludzi (w tym pracowników, robotników, przewoźników, konsumentów i ratowników) oraz środowiska (1).

**Kategoria 1 wg GHS/CLP ONZ:** zob. „Poważne uszkodzenie oczu”.

**Kategoria 2 wg GHS/CLP ONZ:** zob. „Działanie drażniące na oczy”.

**Brak kategorii wg GHS/CLP ONZ:** substancje chemiczne, które nie spełniają wymogów w zakresie zaklasyfikowania jako należące do kategorii 1 lub 2 (lub kategorii 2A lub 2B wg GHS) wg GHS/CLP ONZ. Określenie używane zamiennie ze sformułowaniem „Niesklasyfikowane”.

**UPLC:** ultrawysokosprawna chromatografia cieczowa.

**UVCB:** substancje o nieznanym lub zmiennym składzie, złożone produkty reakcji lub materiały biologiczne.

**Właściwa metoda badawcza:** metoda badawcza, którą uznano za wystarczająco istotną i wiarygodną dla danego celu i która opiera się na uzasadnionych naukowo podstawach. Metoda badawcza nie może zostać uznana za właściwą w sensie absolutnym, ale tylko w odniesieniu do określonego celu (18).

**Zweryfikowana metoda badawcza:** metoda badawcza, w odniesieniu do której zakończono badania walidacyjne w celu określenia jej istotności (w tym dokładności) i wiarygodności w odniesieniu do konkretnego celu. Należy zauważyć, że zweryfikowana metoda badawcza może nie wykazywać dostatecznej efektywności z punktu widzenia dokładności i wiarygodności, aby można było ją uznać za dopuszczalną w odniesieniu do danego celu (18).

**VRM:** zwalidowana metoda referencyjna.

**VRM1:** badanie działania drażniącego na oczy EpiOcular™ jest określone jako zwalidowana metoda referencyjna 1.

**VRM2:** badanie działania drażniącego na oczy ludzkiego nabłonka rogówki SkinEthic™ jest określone jako zwalidowana metoda referencyjna 2.

**Waga dowodów:** proces analizowania mocnych i słabych stron różnych informacji podczas formułowania wniosku dotyczącego potencjalnego zagrożenia stwarzanego przez badaną substancję oraz uzasadnienia takiego wniosku.

## **Dodatek 2**

### **GLÓWNE ELEMENTY BADAWCZE BADAŃ RHCE ZWERYFIKOWANYCH DO IDENTYFIKACJI SUBSTANCJI CHEMICZNYCH NIEWYMAGAJĄCYCH KLASYFIKACJI I OZNAKOWANIA POD WZGLĘDEM DZIAŁANIA DRAŻNIĄCEGO NA OCZY LUB POWODOWANIA POWAŻNYCH USZKODZEŃ OCZU**

| Elementy badawcze       | badanie działania drażniącego na oczy EpiOcular™<br>(VRM 1)                |                                             | badanie działania drażniącego na oczy ludzkiego<br>nabłonka rogówki SkinEthic™<br>(VRM 2) |                                             |
|-------------------------|----------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| Protokoły               | Ciecze<br>(pipetowane w temperaturze 37<br>±1 °C lub niższej przez 15 min) | Ciała stałe<br>(nie można odmierzać pipetą) | Ciecze i substancje lepkie<br>(pipetowane)                                                | Ciała stałe<br>(nie można odmierzać pipetą) |
| Powierzchnia modelu     | 0,6 cm²                                                                    | 0,6 cm²                                     | 0,5 cm²                                                                                   | 0,5 cm²                                     |
| Liczba kontrprób tkanki | Co najmniej 2                                                              | Co najmniej 2                               | Co najmniej 2                                                                             | Co najmniej 2                               |

| Elementy badawcze                | badanie działania drażniącego na oczy EpiOcular™ (VRM 1)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | badanie działania drażniącego na oczy ludzkiego nabłonka rogówki SkinEthic™ (VRM 2)                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                |
|----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Wstępna kontrola zakłócenia barw | <p>50 µl + 1 ml H<sub>2</sub>O przez 60 min w temperaturze 37 ±2 °C, atmosferze zawierającej 5 ±1 % CO<sub>2</sub> i w warunkach względnej wilgotności wynoszącej ≥ 95 % (niebarwne badane substancje chemiczne) lub</p> <p>50 µl + 2 ml izopropanolu mieszanego przez 2–3 godz. w temperaturze pokojowej (barwne badane substancje chemiczne)</p> <p>→ jeżeli gęstość optyczna badanej substancji chemicznej przy 570 ±20 nm po odjęciu gęstości optycznej izopropanolu lub wody wynosi &gt; 0,08 (co odpowiada około 5 % średniej gęstości optycznej kontroli ujemnej), należy przeprowadzić kontrole dostosowane do warunków bytowania.</p> | <p>50 mg + 1 ml H<sub>2</sub>O przez 60 min w temperaturze 37 ±2 °C, atmosferze zawierającej 5 ±1 % CO<sub>2</sub> i w warunkach względnej wilgotności wynoszącej ≥ 95 % (niebarwne badane substancje chemiczne) lub</p> <p>50 mg + 2 ml izopropanolu mieszanego przez 2–3 godz. w temperaturze pokojowej (barwione i niebarwione badane substancje chemiczne)</p> <p>→ jeżeli gęstość optyczna badanej substancji chemicznej przy 570 ±20 nm po odjęciu gęstości optycznej izopropanolu lub wody wynosi &gt; 0,08 (co odpowiada około 5 % średniej gęstości optycznej kontroli ujemnej), należy przeprowadzić kontrole dostosowane do warunków bytowania.</p> | <p>10 µl + 90 µl H<sub>2</sub>O mieszane przez 30 ±2 min w temperaturze pokojowej (tj. 18–28 °C)</p> <p>→ jeżeli badana substancja chemiczna uległa zabarwieniu, należy wykonać żywe dostosowane kontrole</p> | <p>10 mg + 90 µl H<sub>2</sub>O mieszane przez 30 ±2 min w temperaturze pokojowej</p> <p>→ jeżeli badana substancja chemiczna uległa zabarwieniu, należy wykonać żywe dostosowane kontrole</p> |

| Elementy badawcze                                       | badanie działania drażniącego na oczy EpiOcular™ (VRM 1)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | badanie działania drażniącego na oczy ludzkiego nabłonka rogówki SkinEthic™ (VRM 2)                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|---------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Wstępna kontrola przed bezpośrednią redukcją MTT</b> | 50 µl + 1 ml roztworu MTT 1 mg/ml przez 180 ±15 min w temperaturze 37 ±2 °C, atmosferze zawierającej 5 ±1 % CO <sub>2</sub> i w warunkach względnej wilgotności wynoszącej ≥ 95 %<br>→ jeżeli roztwór zmienia barwę na niebieską lub fioletową, należy wykonać kontrole dostosowane do uśmiercenia poprzez zamrożenie (jako kontrolę ujemną stosuje się 50 µl sterylnej wody dejonizowanej w roztworze MTT) | 50 mg + 1 ml roztworu MTT 1 mg/ml przez 180 ±15 min w temperaturze 37 ±2 °C, atmosferze zawierającej 5 ±1 % CO <sub>2</sub> i w warunkach względnej wilgotności wynoszącej ≥ 95 %<br>→ jeżeli roztwór zmienia barwę na niebieską lub fioletową, należy wykonać dostosowane kontrole uśmiercane przez zamrożenie (jako kontrolę ujemną stosuje się 50 µl sterylnej wody dejonizowanej w roztworze MTT) | 30 µl + 300 µl roztworu MTT 1 mg/ml przez 180 ±15 min w temperaturze 37 ±2 °C, atmosferze zawierającej 5 ±1 % CO <sub>2</sub> i w warunkach względnej wilgotności wynoszącej ≥ 95 %<br>→ jeżeli roztwór zmienia barwę na niebieską lub fioletową, należy wykonać kontrole martwych tkanek uśmiercanych wodą (jako kontrolę ujemną stosuje się 30 µl sterylnej dejonizowanej wody w roztworze MTT) | 30 mg + 300 µl roztworu MTT 1 mg/ml przez 180 ±15 min w temperaturze 37 ±2 °C, atmosferze zawierającej 5 ±1 % CO <sub>2</sub> i w warunkach względnej wilgotności wynoszącej ≥ 95 %<br>→ jeżeli roztwór zmienia barwę na niebieską lub fioletową, należy wykonać kontrole martwych tkanek uśmiercanych wodą (jako kontrolę ujemną stosuje się 30 µl sterylnej dejonizowanej wody w roztworze MTT) |
| <b>Obróbka wstępna</b>                                  | 20 µl DPBS wolnego od Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> przez 30 ±2 min w temperaturze 37 ±2 °C, atmosferze zawierającej 5 ±1 % CO <sub>2</sub> i w warunkach względnej wilgotności wynoszącej ≥ 95 %, chronić przed światłem.                                                                                                                                                                             | 20 µl DPBS wolnego od Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> przez 30 ±2 min w temperaturze 37 ±2 °C, atmosferze zawierającej 5 ±1 % CO <sub>2</sub> i w warunkach względnej wilgotności wynoszącej ≥ 95 %, chronić przed światłem.                                                                                                                                                                       | -                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | -                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| <b>Dawkowanie i stosowanie</b>                          | 50 µl (83,3 µl/cm <sup>2</sup> )                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 50 mg (83,3 mg/cm <sup>2</sup> ), wykorzystując skalibrowane narzędzie (np. wypoziomowanej łyżki skalibrowanej do pomieszczenia 50 mg chlorku sodu).                                                                                                                                                                                                                                                  | 10 µl DPBS wolnego od Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> + 30 ±2 µl (60 µl/cm <sup>2</sup> )<br><br>W przypadku substancji lepkich, należy zastosować siatkę nylonową                                                                                                                                                                                                                             | 30 µl DPBS wolnego od Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> + 30 ±2 mg (60 mg/cm <sup>2</sup> )                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |



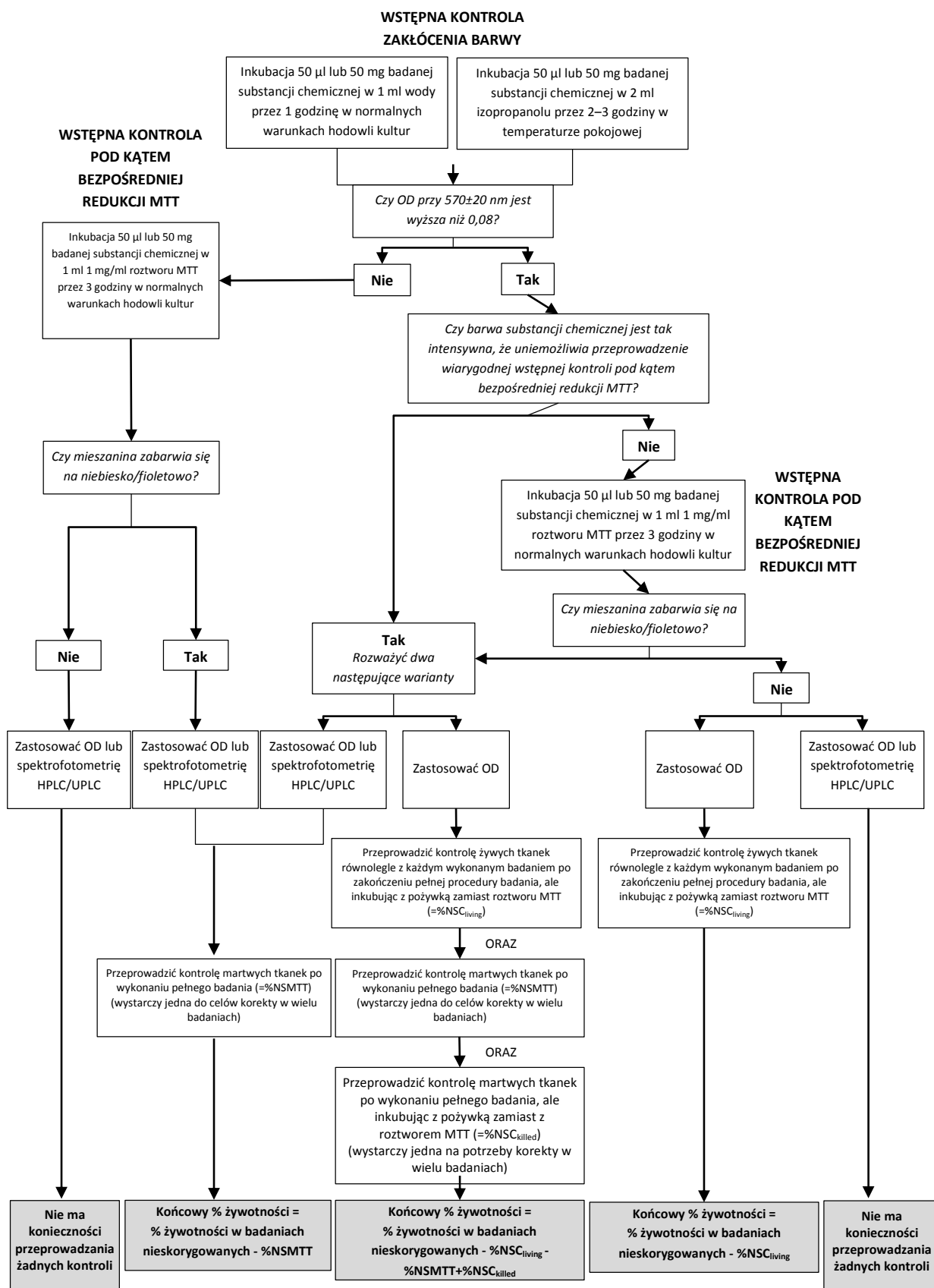
| Elementy badawcze                          | badanie działania drażniącego na oczy EpiOcular™<br>(VRM 1)                                                                                                            |                                                                                                                                                                               | badanie działania drażniącego na oczy ludzkiego<br>nabłonka rogówki SkinEthic™<br>(VRM 2)                                                                              |                                                                                                                                                                               |
|--------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Czas i temperatura narażenia</b>        | 30 min (±2 min)<br>w podłożu<br>w temperaturze 37 ±2 °C,<br>atmosferze zawierającej 5 ±1 %<br>CO <sub>2</sub> i w warunkach względnej<br>wilgotności wynoszącej ≥ 95 % | 6 godzin (±0,25 godz.)<br>w podłożu<br>w temperaturze 37 ±2 °C,<br>atmosferze zawierającej 5 ±1 %<br>CO <sub>2</sub> i w warunkach względnej<br>wilgotności wynoszącej ≥ 95 % | 30 min (±2 min)<br>w podłożu<br>w temperaturze 37 ±2 °C,<br>atmosferze zawierającej 5 ±1 %<br>CO <sub>2</sub> i w warunkach względnej<br>wilgotności wynoszącej ≥ 95 % | 4 godziny (±0,1 godz.)<br>w podłożu<br>w temperaturze 37 ±2 °C,<br>atmosferze zawierającej 5 ±1 %<br>CO <sub>2</sub> i w warunkach względnej<br>wilgotności wynoszącej ≥ 95 % |
| <b>Plukanie w temperaturze pokojowej</b>   | 3 razy w 100 ml<br>DPBS wolnego od Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>                                                                                                  | 3 razy w 100 ml<br>DPBS wolnego od Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>                                                                                                         | 20 ml DPBS wolnego od<br>Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>                                                                                                            | 25 ml DPBS wolnego od<br>Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>                                                                                                                   |
| <b>Zanurzenie po zakończeniu narażenia</b> | przez 12 min (±2 min) w podłożu<br>w temperaturze pokojowej                                                                                                            | przez 25 min (±2 min) w podłożu<br>w temperaturze pokojowej                                                                                                                   | przez 30 min (±2 min)<br>w temperaturze 37 °C,<br>atmosferze zawierającej 5 %<br>CO <sub>2</sub> i w warunkach względnej<br>wilgotności w podłożu<br>wynoszącej ≥ 95 % | przez 30 min (±2 min)<br>w podłożu w temperaturze<br>pokojowej                                                                                                                |
| <b>Inkubacja po zakończeniu narażenia</b>  | 120 min (±15 min) w podłożu<br>w temperaturze 37 ±2 °C,<br>atmosferze zawierającej 5 ±1 %<br>CO <sub>2</sub> i w warunkach względnej<br>wilgotności wynoszącej ≥ 95 %  | 18 godz. (±0,25 godz.)<br>w podłożu w temperaturze 37 ±2<br>°C, atmosferze zawierającej 5<br>±1 % CO <sub>2</sub> i w warunkach<br>względnej wilgotności<br>wynoszącej ≥ 95 % | brak                                                                                                                                                                   | 18 godz. (±0,5 godz.)<br>w podłożu w temperaturze 37<br>±2 °C, atmosferze zawierającej<br>5 ±1 % CO <sub>2</sub> i w warunkach<br>względnej wilgotności<br>wynoszącej ≥ 95 %  |
| <b>Kontrola ujemna</b>                     | 50 µl H <sub>2</sub> O<br>Badana równolegle                                                                                                                            | 50 µl H <sub>2</sub> O<br>Badana równolegle                                                                                                                                   | 30 ±2 µl DPBS wolnego od<br>Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup><br>Badana równolegle                                                                                    | 30 ±2 µl DPBS wolnego od<br>Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup><br>Badana równolegle                                                                                           |
| <b>Kontrola dodatnia</b>                   | 50 µl octanu metylu<br>Badana równolegle                                                                                                                               | 50 µl octanu metylu<br>Badana równolegle                                                                                                                                      | 30 ±2 µl octanu metylu<br>Badana równolegle                                                                                                                            | 30 ±2 µl octanu metylu<br>Badana równolegle                                                                                                                                   |
| <b>Roztwór MTT</b>                         | 300 µl 1 mg/ml                                                                                                                                                         | 300 µl 1 mg/ml                                                                                                                                                                | 300 µl 1 mg/ml                                                                                                                                                         | 300 µl 1 mg/ml                                                                                                                                                                |

| Elementy badawcze                            | badanie działania drażniącego na oczy EpiOcular™ (VRM 1)                                                                                                                   |                                                                                                                                                                            | badanie działania drażniącego na oczy ludzkiego nabłonka rogówki SkinEthic™ (VRM 2)                                                                                        |                                                                                                                                                                            |
|----------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                              |                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                            |
| <b>Czas i temperatura narażenia MTT</b>      | przez 180 min ( $\pm 15$ min) w temperaturze $37 \pm 2$ °C, atmosferze zawierającej $5 \pm 1$ % CO <sub>2</sub> i w warunkach względnej wilgotności wynoszącej $\geq 95$ % | przez 180 min ( $\pm 15$ min) w temperaturze $37 \pm 2$ °C, atmosferze zawierającej $5 \pm 1$ % CO <sub>2</sub> i w warunkach względnej wilgotności wynoszącej $\geq 95$ % | przez 180 min ( $\pm 15$ min) w temperaturze $37 \pm 2$ °C, atmosferze zawierającej $5 \pm 1$ % CO <sub>2</sub> i w warunkach względnej wilgotności wynoszącej $\geq 95$ % | przez 180 min ( $\pm 15$ min) w temperaturze $37 \pm 2$ °C, atmosferze zawierającej $5 \pm 1$ % CO <sub>2</sub> i w warunkach względnej wilgotności wynoszącej $\geq 95$ % |
| <b>Ekstrahent</b>                            | 2 ml izopropanolu (ekstrakcja z dołu i góry nasadki poprzez przekłucie tkanki)                                                                                             | 2 ml izopropanolu (ekstrakcja z dołu nasadki poprzez przekłucie tkanki)                                                                                                    | 1,5 ml izopropanolu (ekstrakcja z dolnej i górnej części wkładki)                                                                                                          | 1,5 ml izopropanolu (ekstrakcja z dołu nasadki)                                                                                                                            |
| <b>Czas trwania i temperatura ekstrakcji</b> | 2–3 godz. ze wstrząsaniem (~120 obr/min) w temperaturze pokojowej lub przez noc w temperaturze 4–10 °C                                                                     | 2–3 godz. ze wstrząsaniem (~120 obr/min) w temperaturze pokojowej lub przez noc w temperaturze 4–10 °C                                                                     | 4 godz. ze wstrząsaniem (~120 obr/min) w temperaturze pokojowej lub bez wstrząsania co najmniej przez noc w temperaturze 4–10 °C                                           | Co najmniej 2 godz. ze wstrząsaniem (~120 obr/min) w temperaturze pokojowej                                                                                                |
| <b>Odczyt OD</b>                             | 570 nm (550–590 nm) bez filtra referencyjnego                                                                                                                              | 570 nm (550–590 nm) bez filtra referencyjnego                                                                                                                              | 570 nm (540–600 nm) bez filtra referencyjnego                                                                                                                              | 570 nm (540–600 nm) bez filtra referencyjnego                                                                                                                              |
| <b>Kontrola jakości tkanki</b>               | Poddawanie działaniu 100 $\mu$ l Triton X-100 0,3 % (obj./obj.)<br>$12,2 \text{ min} \leq \text{ET}_{50} \leq 37,5 \text{ min}$                                            | Poddawanie działaniu 100 $\mu$ l Triton X-100 0,3 % (obj./obj.)<br>$12,2 \text{ min} \leq \text{ET}_{50} \leq 37,5 \text{ min}$                                            | Poddawanie działaniu SDS przez 30 min (50 $\mu$ l)<br>$1,0 \text{ mg/ml} \leq \text{IC}_{50} \leq 3,5 \text{ mg/ml}$                                                       | Poddawanie działaniu SDS przez 30 min (50 $\mu$ l)<br>$1,0 \text{ mg/ml} \leq \text{IC}_{50} \leq 3,2 \text{ mg/ml}$                                                       |

| Elementy badawcze               | badanie działania drażniącego na oczy EpiOcular™ (VRM 1)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | badanie działania drażniącego na oczy ludzkiego nabłonka rogówki SkinEthic™ (VRM 2)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|---------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Kryteria dopuszczalności</b> | <p>1. Średnia wartość OD kontrprób tkanek poddanych działaniu kontroli ujemnej powinna wynosić <math>&gt; 0,8</math> i <math>&lt; 2,5</math></p> <p>2. Średnia żywotność kontrprób tkanek poddawanych narażeniu przez 30 min za pomocą kontroli dodatniej, wyrażona jako odsetek kontroli dodatnich, powinna wynosić <math>&lt; 50\%</math></p> <p>3. Różnica w żywotności między dwoma kontrpróbami tkanek powinna wynosić mniej niż 20 %.</p> | <p>1. Średnia wartość OD kontrprób tkanek poddanych działaniu kontroli ujemnej powinna wynosić <math>&gt; 0,8</math> i <math>&lt; 2,5</math></p> <p>2. Średnia żywotność kontrprób tkanek poddawanych narażeniu przez 6 godzin za pomocą kontroli dodatniej wyrażona jako odsetek kontroli ujemnych powinna wynosić <math>&lt; 50\%</math></p> <p>3. Różnica w żywotności między dwoma kontrpróbami tkanek powinna wynosić mniej niż 20 %.</p> | <p>1. Średnia wartość OD kontrprób tkanek poddanych działaniu kontroli ujemnej powinna wynosić <math>&gt; 1,0</math> i <math>\leq 2,5</math></p> <p>2. Średnia żywotność kontrprób tkanek poddawanych narażeniu przez 30 min za pomocą kontroli dodatniej wyrażona jako odsetek kontroli dodatnich powinna wynosić <math>\leq 30\%</math></p> <p>3. Różnica w żywotności między dwoma kontrpróbami tkanek powinna wynosić mniej niż 20 %.</p> | <p>1. Średnia wartość OD kontrprób tkanek poddanych działaniu kontroli ujemnej powinna wynosić <math>&gt; 1,0</math> i <math>\leq 2,5</math></p> <p>2. Średnia żywotność kontrprób tkanek poddawanych narażeniu przez 4 godziny za pomocą kontroli dodatniej wyrażona jako odsetek kontroli ujemnych powinna wynosić <math>\leq 20\%</math></p> <p>3. Różnica w żywotności między dwoma kontrpróbami tkanek powinna wynosić mniej niż 20 %.</p> |

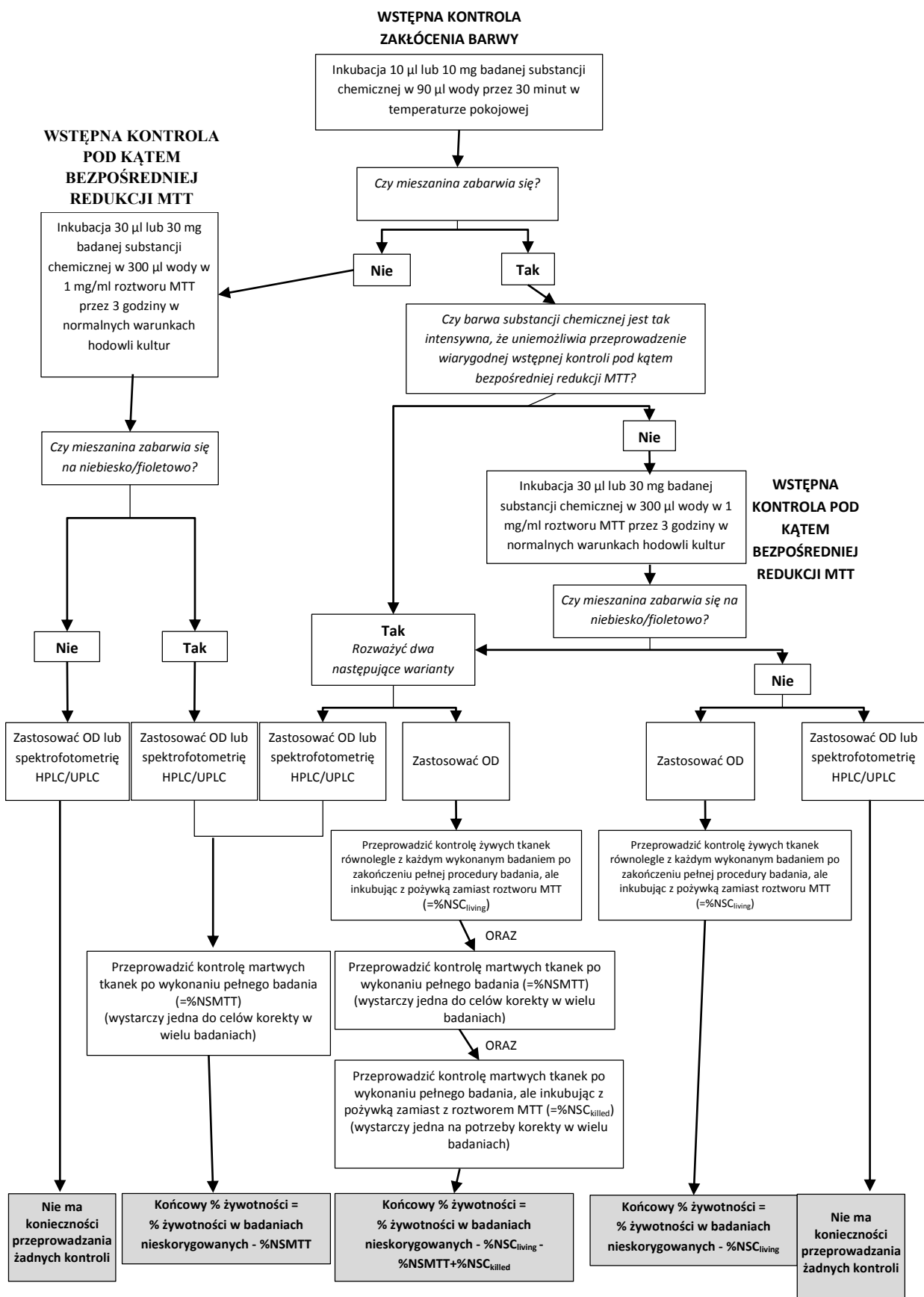
### **Dodatek 3**

**ILUSTRACYJNY SCHEMAT POSTĘPOWANIA, OPIERAJĄC SIĘ NA STANDARDOWEJ PROCEDURZE OPERACYJNEJ ZWALIDOWANEJ METODY WALIDACYJNEJ 1, PRZEDSTAWIA WYTYCZNE ODNOŚNIE DO IDENTYFIKACJI I RADZENIA SOBIE Z BEZPOŚREDNIMI REDUKTORAMI MTT LUB SUBSTANCJAMI CHEMICZNYMI ZAKŁÓCAJĄCYMI BARWĘ**



#### **Dodatek 4**

**ILUSTRACYJNY SCHEMAT POSTĘPOWANIA, OPIERAJĄC SIĘ NA STANDARDOWEJ PROCEDURZE OPERACYJNEJ ZWALIDOWANEJ METODY WALIDACYJNEJ 2, PRZEDSTAWIA WYTYCZNE ODNOŚNIE DO IDENTYFIKACJI I RADZENIA SOBIE Z BEZPOŚREDNIMI REDUKTORAMI MTT LUB SUBSTANCJAMI CHEMICZNYMI ZAKŁÓCAJĄCYMI BARWĘ**



## Dodatek 5

### KLUCZOWE PARAMETRY I KRYTERIA DOPUSZCZALNOŚCI SYSTEMU SPEKTROFOTOMETRYCZNEGO HPLC/UPLC DO POMIARU FORMAZANU MTT POBRANEGO Z WYTWORÓW TKANKOWYCH RHCE

| Parametr                                                                              | Protokół wyprowadzony z Wytycznej FDA (36) (38)                                                                                                                                                                                                                                                                                | Kryteria dopuszczalności                                                                                                         |
|---------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Selektywność                                                                          | Analiza izopropanolu, żywej ślepej próby (izopropanolu pobranego z żyjącego wytworu tkankowego RhCE niepoddanego działaniu jakichkolwiek substancji), martwej ślepej próby (izopropanolu pobranego z martwego wytworu tkankowego RhCE niepoddanego działaniu jakichkolwiek substancji) oraz barwika (np. błękitu metylenowego) | Obszar <sub>interferencja</sub> ≤ 20 %<br>Obszar <sub>LLOQ</sub> <sup>1</sup>                                                    |
| Precyzja                                                                              | Kontrole jakości (tj. formazan MTT w stężeniu 1,6 µg/ml, 16 µg/ml oraz 160 µg/ml) w izopropanolu (n = 5)                                                                                                                                                                                                                       | CV ≤ 15 % lub ≤ 20 %<br>w odniesieniu do LLOQ                                                                                    |
| Dokładność                                                                            | Kontrole jakości w izopropanolu (n = 5)                                                                                                                                                                                                                                                                                        | % Dev ≤ 15 % lub ≤ 20 %<br>w odniesieniu do LLOQ                                                                                 |
| Efekt matrycy                                                                         | Kontrole jakości na żywej ślepej próbce (n = 5)                                                                                                                                                                                                                                                                                | 85 % ≤ % efektu<br>macierzystego ≤ 115 %                                                                                         |
| Środek przeniesiony                                                                   | Analiza izopropanolu według normy ULOQ <sup>2</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                            | Obszar <sub>interferencja</sub> ≤ 20 %<br>Obszar <sub>LLOQ</sub>                                                                 |
| Odtwarzalność (śróddzienna)                                                           | 3 niezależne krzywe wzorcowe (na podstawie 6 kolejnych roztworów 1/3 formazanu MTT w izopropanolu, poczynając od ULOQ, np. 200 µg/ml);<br>Kontrole jakości w izopropanolu (n = 5)                                                                                                                                              | Krzywe kalibracyjne: %<br>Dev ≤ 15 % lub ≤ 20 %<br>w odniesieniu do LLOQ<br><br>Kontrole jakości: % Dev<br>≤ 15 % oraz CV ≤ 15 % |
| Odtwarzalność (między kolejnymi dniami)                                               | Dzień 1: 1 krzywa wzorcowa oraz kontrole jakości w izopropanolu (n = 3)<br>Dzień 2: 1 krzywa wzorcowa oraz kontrole jakości w izopropanolu (n = 3)<br>Dzień 3: 1 krzywa wzorcowa oraz kontrole jakości w izopropanolu (n = 3)                                                                                                  |                                                                                                                                  |
| Krótkookresowa stabilność formazanu MTT w ekstrakcie tkankowym RhCE                   | Kontrole jakości na żywej ślepej próbce (n = 3) analizowane w dniu przygotowania oraz po 24 godzinach składowania w temperaturze pokojowej                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                  |
| W razie potrzeby – długookresowa stabilność formazanu MTT w ekstrakcie tkankowym RhCE | Kontrole jakości w żywej ślepej próbce (n=3) analizowane w dniu przygotowania oraz po kilku dniach przechowywania w temperaturze -20 °C                                                                                                                                                                                        | % Dev ≤ 15 %                                                                                                                     |

<sup>1</sup> LLOQ: dolna granica oznaczalności określona tak, by obejmowała 1-2 % żywotności tkanek, tj. 0,8 µg/ml.

<sup>2</sup> ULOQ: górna granica oznaczalności określona tak, by była co najmniej dwukrotnie wyższa niż najwyższe oczekiwane stężenie formazanu MTT w ekstraktach izopropanolu z kontroli ujemnych (~70 µg/ml w zwalidowanej metodzie referencyjnej), tj. 200 µg/ml.



## **B.70 TESTY *IN VITRO* LUDZKIEGO REKOMBINOWANEGO RECEPTORA ESTROGENOWEGO (hrER) MAJĄCE NA CELU WYKRYCIE SUBSTANCJI CHEMICZNYCH WYKAZUJĄCYCH POWINOWACTWO WIĄZANIA RECEPTORA ESTROGENOWEGO**

### **WPROWADZENIE OGÓLNE**

#### **Wytyczna OECD dotycząca badań w oparciu o wyniki**

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej dotyczącej badań OECD nr 493 (2015). TG 493 jest wytyczną dotyczącą badań w oparciu o wyniki, która opisuje metodykę ludzkich rekombinowanych testów *in vitro* przeznaczonych do wykrywania substancji wykazujących powinowactwo wiązania receptora estrogenowego (testy wiązania hrER). Zawiera ona dwa testy podobne pod względem mechanistycznym i funkcjonalnym mające na celu określenie substancji wiążących receptora estrogenowego (tj. receptora estrogenowego alfa), które powinny ułatwiać opracowanie nowych – podobnych lub zmienionych – testów zgodnie z zasadami walidacji określonymi w wytycznych OECD pod tytułem *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment* (1). W pełni zwalidowane referencyjne metody badań (dodatek 2 i dodatek 3), które stanowią podstawę tej metody badawczej opartej na wynikach, to:

- test *in vitro* Freybergera–Wilsona dotyczący wiązania receptora estrogenowego i wykorzystujący pełnowymiarowy ludzki rekombinowany receptor estrogenowy alfa (2), oraz
- test *in vitro* Instytutu Oceny Chemicznej i Badań (ang. Chemical Evaluation and Research Institute, CERI) dotyczący wiązania receptora estrogenowego i wykorzystujący rekombinowane ludzkie białko domeny wiążącej ligand (2).

Dostępność standardów wykonywania badań (3) umożliwia łatwiejszy rozwój i walidację podobnych metod badawczych dotyczących tego samego zagrożenia punktu końcowego, a także pozwalają one na terminową zmianę wytycznej dotyczącej badań w oparciu o wyniki nr 493, aby do zaktualizowanej wytycznej dotyczącej badań w oparciu o wyniki można było dodać nowe podobne testy. Podobne testy badawcze zostaną jednak dodane wyłącznie po przeglądzie przeprowadzonym przez OECD i po uzgodnieniu przez tę organizację, że standardy wykonywania badań zostały spełnione. Testy zawarte w wytycznej dotyczącej badań nr 493 można stosować w sposób nieograniczony w celu spełnienia wymogów państw członkowskich OECD w zakresie wyników badań dotyczących wiązania receptora estrogenowego przy jednoczesnym korzystaniu z wzajemnego uznawania danych OECD.

#### **Kontekst i zasady dotyczące testów zawartych w niniejszej metodzie badawczej**

2. W 1998 r. OECD podjęła działania o wysokim priorytecie, mające na celu zmianę istniejących wytycznych i opracowanie nowych wytycznych dotyczących badań na potrzeby badań klasyfikacyjnych i badań substancji potencjalnie zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego. W 2012 r. zmieniono ramy koncepcyjne OECD dotyczące badania i oceny substancji potencjalnie zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego. Pierwotne i zmienione ramy koncepcyjne uwzględniono jako załączniki do wytycznych o nazwie *Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption* (4). Ramy koncepcyjne składają się z pięciu poziomów, a każdy z nich odpowiada innemu poziomowi złożoności biologicznej. Testy wiązania receptora estrogenowego opisane w niniejszej metodzie badawczej należą do poziomu 2, który obejmuje „testy *in vitro* dostarczające danych na temat mechanizmów/ścieżek układu hormonalnego”. Niniejsza metoda badawcza dotyczy testów wiązania receptora *in vitro* stworzonych, aby określić ligandy ludzkiego receptora estrogenowego alfa.  $\alpha$ .
3. Wyrażnie wykazano istotność testu wiązania receptora estrogenowego *in vitro* w kontekście funkcji biologicznych. Testy wiązania receptora estrogenowego zaprojektowano w sposób umożliwiający identyfikację substancji chemicznych, które potencjalnie mogą powodować zaburzenia ścieżek hormonu estrogenu, a także w ciągu ostatnich dwóch dekad były w znacznym stopniu stosowane do charakteryzacji rozkładu tkanek receptora estrogenowego oraz do identyfikacji agonistów/antagonistów. Testy te odzwierciedlają interakcję ligand-receptor, która stanowi początkowy etap estrogenowej ścieżki sygnalizacyjnej i jest niezbędna wszystkim kręgowcom przy pełnieniu funkcji reprodukcyjnej.
4. Interakcja estrogenów z receptorami estrogenowymi może wpłynąć na transkrypcję genów regulowanych przez estrogen oraz wywoływać skutki pozagenomowe, które mogą doprowadzić do indukcji lub inhibicji procesów komórkowych, w tym tych koniecznych do proliferacji komórek, prawidłowego rozwoju płodu i funkcji reprodukcyjnej (5)(6)(7). Zakłócenie prawidłowego układu estrogenowego może potencjalnie wywołać niekorzystny wpływ na prawidłowy rozwój (ontogenezę), zdrowie reprodukcyjne i integralność układu rozrodczego. Niewłaściwe sygnalizowanie receptora estrogenowego może doprowadzić do skutków takich jak: zwiększone ryzyko hormonozależnego nowotworu, ograniczona płodność oraz zmiany podczas wzrostu i rozwoju płodowego (8).
5. Testy wiązania *in vitro* opierają się na bezpośredniej interakcji substancji posiadającej określony obszar wiązania ligand receptora regulującego transkrypcję genu. Główny element testu wiązania ludzkiego receptora estrogenowego alfa mierzy zdolność liganda znakowanego izotopem ( $[^3\text{H}]17\beta$ -estradiolu) do wiązania się z receptorem estrogenowym w obecności zwiększających się stężeń badanej substancji chemicznej (tj. konkurenta). Badane substancje chemiczne o wysokim powinowactwie z receptorem estrogenowym konkurują ze znakowanym izotopem ligandem w niższym stężeniu w porównaniu

z substancjami chemicznymi o niższym powinowactwie z receptorem. Niniejszy test składa się z dwóch głównych elementów: doświadczenie dotyczące wiązania nasycenia mające na celu scharakteryzowanie parametrów interakcji receptor-ligand oraz dokumentację swoistości receptora estrogenowego, po którym następuje doświadczenie dotyczące wiązania konkurencyjnego charakteryzujące konkurencję między badaną substancją chemiczną a ligandem znakowanym izotopem w zakresie wiązania z receptorem estrogenowym.

6. Badania walidacyjne dotyczące testów wiązania CERI oraz Freybergera–Wilsona wykazały istotność i wiarygodność tych metod w odniesieniu do ich przeznaczenia (2).
7. Definicje i skróty stosowane w niniejszej metodzie badawczej opisano w dodatku 1.

### **Zakres i ograniczenia związane z testami wiązania receptora**

8. Testy te proponuje się do celów badań przesiewowych i ustalania substancji priorytetowych, ale mogą one dostarczać również informacji na temat zdarzenia inicjacji molekularnej, które można wykorzystać w ramach podejścia opartego na wadze dowodów. Testy te dotyczą wiązania substancji chemicznej do domeny wiążącej ligand receptora estrogenowego alfa w układzie *in vitro*. W związku z tym wyników nie należy ekstrapolować bezpośrednio do złożonej sygnalizacji i regulacji nieuszkodzonego układu hormonalnego *in vivo*.
9. Wiązanie naturalnego liganda – 17 $\beta$ -estradiolu – stanowi wstęp do serii zdarzeń molekularnych, które aktywują transkrypcję genów docelowych i docelowo kończy się ono fizjologiczną zmianą (9). W związku z tym wiązanie do domeny wiążącej ligand receptora estrogenowego alfa uznaje się za jeden z kluczowych mechanizmów pośredniczących w zaburzeniach funkcjonowania receptora estrogenowego układu hormonalnego, chociaż istnieją także inne mechanizmy, które mogą wywołać zaburzenia funkcjonowania układu hormonalnego, między innymi (i) interakcje z obszarami receptora estrogenowego alfa innymi niż kieszeń wiązania ligand, (ii) interakcje z innymi receptorami stosownymi do sygnalizacji estrogenów, receptorami estrogenowymi beta i białkami G połączonymi z receptorem estrogenowym, inne receptory i układy enzymatyczne będące w zakresie układu hormonalnego, (iii) synteza hormonów, (iv) aktywacja metaboliczna lub dezaktywacja hormonów, (v) dystrybucja hormonów do tkanek docelowych i (vi) usunięcie hormonów z ciała.  $\alpha\beta$  Żaden z testów wchodzących w skład niniejszej metody badawczej nie dotyczy tych sposobów działania.
10. Niniejsza metoda badawcza dotyczy zdolności substancji do wiązania się z ludzkim receptorem estrogenowym alfa i nie zachodzi w niej podział na agonistów lub antagonistów receptora estrogenowego alfa. Testy te nie dotyczą ani dalszych zdarzeń niższego stopnia, takich jak transkrypcja genu, ani też zmian psychologicznych. Biorąc pod uwagę, że podczas walidacji wykorzystano jedynie pojedyncze substancja jednoskładnikowe, nie zbadano zastosowania do mieszanin stosowanych w badaniu.

Z teoretycznego punktu widzenia testy mogą jednak mieć zastosowanie przy badaniu zarówno substancji wieloskładnikowych, jak i mieszanin. Przed zastosowaniem przedmiotowej metody badawczej z użyciem mieszaniny w celu zgromadzenia danych na potrzeby założonego celu regulacyjnego należy zastanowić się, czy zastosowanie tej metody może doprowadzić do uzyskania wyników odpowiednich z punktu widzenia tego celu, a jeżeli tak, to dlaczego. Przeprowadzenie takiej analizy nie jest konieczne, jeżeli ustanowiono wymóg regulacyjny dotyczący badania danej mieszaniny.

11. Układy receptorów wolne od komórek nie posiadają wrodzonej zdolności metabolicznej i nie zweryfikowano ich razem z układami enzymów metabolicznych. Możliwe może być jednak włączenie aktywności metabolicznej do projektu badania, aczkolwiek wymagałoby to dołożenia dalszych starań pod względem walidacji.
12. Substancji chemicznych, które mogą spowodować denaturację białka (tj. białka receptorowe) – takich jak środki powierzchniowo czynne lub substancje chemiczne, których pH bufora testowego może ulec zmianie – nie można badać lub można badać je jedynie w stężeniach, w których takie interakcje nie zachodzą. W innym wypadku zakres stężeń, których badania można przeprowadzić w formie testów dotyczących badanej substancji chemicznej jest ograniczany przez jej rozpuszczalność w buforze testowym.
13. Do celów informacyjnych w tabeli 1 przedstawiono wyniki badania 24 substancji, które zbadano stosując dwa w pełni zwalidowane testy opisane w niniejszej metodzie badawczej. 17 z tych substancji sklasyfikowano jako substancje wiążące receptor estrogenowy, a 6 substancji innych niż substancje wiążące na podstawie opublikowanych sprawozdań, w tym testów *in vitro* dotyczących aktywacji transkrypcji lub w teście biologicznego wzrostu macicy (9)(10)(11)(12)(13)(14)(15). Jeżeli chodzi o dane podsumowane w tabeli 1, wyniki obu testów dotyczących klasyfikacji wszystkich substancji do  $10^{-4}$ M były niemal stuprocentowo zgodne, a wszystkie substancje sklasyfikowano prawidłowo jako substancje wiążące lub jako substancje inne niż substancje wiążące receptor estrogenowy. Dodatkowe informacje dotyczące tej grupy substancji, a także dodatkowe substancje zbadane za pomocą testów wiązania receptora estrogenowego podczas badań walidacyjnych zawarto w dodatku 2 (tabele 1, 2 i 3) do standardów wykonywania badań dotyczących testów wiązania hrER (3).

**Tabela 1:** Klasyfikacja substancji jako „substancji wiążących” lub „substancji innych niż substancji wiążących” receptora estrogenowego w testach wiązania Freybergera–Wilsona oraz CERI dotyczących ludzkiego rekombinowanego receptora estrogenowego w porównaniu z przewidywaną reakcją

|    | Nazwa substancji                          | NR CAS      | Przewidywana reakcja                    | Test Freybergera–Wilsona                 |                                          | Test CERI                                |                                          | Substancja chemiczna MESH Klasa         | Klasa produktowa                        |
|----|-------------------------------------------|-------------|-----------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|
|    |                                           |             |                                         | Stężenie Zakres (M)                      | Klasyfikacja                             | Stężenie Zakres (M)                      | Klasyfikacja                             |                                         |                                         |
| 1  | 17β-estradiol                             | 50-28-2     | Substancja wiążąca                      | 1x10 <sup>-11</sup> – 1x10 <sup>-6</sup> | Substancja wiążąca                       | 1x10 <sup>-11</sup> – 1x10 <sup>-6</sup> | Substancja wiążąca                       | Steryd                                  | Produkt leczniczy, środek weterynaryjny |
| 2  | Noretynodrel                              | 68-23-5     | Substancja wiążąca                      | 3x10 <sup>-9</sup> – 30x10 <sup>-4</sup> | Substancja wiążąca                       | 3x10 <sup>-9</sup> – 30x10 <sup>-4</sup> | Substancja wiążąca                       | Steryd                                  | Produkt leczniczy, środek weterynaryjny |
| 3  | Noretynodron                              | 68-22-4     | Substancja wiążąca                      | 3x10 <sup>-9</sup> – 30x10 <sup>-4</sup> | Substancja wiążąca                       | 3x10 <sup>-9</sup> – 30x10 <sup>-4</sup> | Substancja wiążąca                       | Steryd                                  | Produkt leczniczy, środek weterynaryjny |
| 4  | Ftalan di-n-butylu                        | 84-74-2     | Substancja inna niż substancja wiążąca* | 1x10 <sup>-10</sup> – 1x10 <sup>-4</sup> | Substancja inna niż substancja wiążąca** | 1x10 <sup>-10</sup> – 1x10 <sup>-4</sup> | Substancja inna niż substancja wiążąca** | Węglowodór (cykliczny), ester           | Plastyfikator, półprodukt               |
| 5  | DES                                       | 56-53-1     | Substancja wiążąca                      | 1x10 <sup>-10</sup> – 1x10 <sup>-3</sup> | Substancja wiążąca                       | 1x10 <sup>-10</sup> – 1x10 <sup>-3</sup> | Substancja wiążąca                       | Węglowodór (cykliczny), fenol           | Produkt leczniczy, środek weterynaryjny |
| 6  | 17α-etynyloestradiol                      | 57-63-6     | Substancja wiążąca                      | 1x10 <sup>-10</sup> – 1x10 <sup>-3</sup> | Substancja wiążąca                       | 1x10 <sup>-10</sup> – 1x10 <sup>-3</sup> | Substancja wiążąca                       | Steryd                                  | Produkt leczniczy, środek weterynaryjny |
| 7  | mezoheksestranol                          | 84-16-2     | Substancja wiążąca                      | 1x10 <sup>-10</sup> – 1x10 <sup>-3</sup> | Substancja wiążąca                       | 1x10 <sup>-10</sup> – 1x10 <sup>-3</sup> | Substancja wiążąca                       | Węglowodór (cykliczny), fenol           | Produkt leczniczy, środek weterynaryjny |
| 8  | Genisteina                                | 446-72-0    | Substancja wiążąca                      | 1x10 <sup>-10</sup> – 1x10 <sup>-3</sup> | Substancja wiążąca                       | 1x10 <sup>-10</sup> – 1x10 <sup>-3</sup> | Substancja wiążąca                       | Węglowodór (heterocykliczny), flawonoid | Produkt naturalny                       |
| 9  | Equol                                     | 531-95-3    | Substancja wiążąca                      | 1x10 <sup>-10</sup> – 1x10 <sup>-3</sup> | Substancja wiążąca                       | 1x10 <sup>-10</sup> – 1x10 <sup>-3</sup> | Substancja wiążąca                       | Metabolit fitoestrogenu                 | Produkt naturalny                       |
| 10 | Butyloparaben (n butyl-4-hydroxybenzoate) | 94-26-8     | Substancja wiążąca                      | 1x10 <sup>-10</sup> – 1x10 <sup>-3</sup> | Substancja wiążąca                       | 1x10 <sup>-10</sup> – 1x10 <sup>-3</sup> | Substancja wiążąca                       | Paraben                                 | Konserwant                              |
| 11 | Nonylofenol (mieszanina)                  | 848-52-15-3 | Substancja wiążąca                      | 1x10 <sup>-10</sup> – 1x10 <sup>-3</sup> | Substancja wiążąca                       | 1x10 <sup>-10</sup> – 1x10 <sup>-3</sup> | Substancja wiążąca                       | Alkilofenol                             | Związek pośredni                        |
| 12 | o,p'-DDT                                  | 789-02-6    | Substancja wiążąca                      | 1x10 <sup>-10</sup> – 1x10 <sup>-3</sup> | Substancja wiążąca                       | 1x10 <sup>-10</sup> – 1x10 <sup>-3</sup> | Substancja wiążąca                       | Chloroorganiczny                        | Środek owadobójczy                      |
| 13 | Kortykosteron                             | 50-22-6     | Substancja inna niż substancja wiążąca  | 1x10 <sup>-10</sup> – 1x10 <sup>-4</sup> | Substancja inna niż substancja wiążąca   | 1x10 <sup>-10</sup> – 1x10 <sup>-4</sup> | Substancja inna niż substancja wiążąca   | Steryd                                  | Produkt naturalny                       |
| 14 | Zearalenon                                | 179-24-92-4 | Substancja wiążąca                      | 1x10 <sup>-10</sup> – 1x10 <sup>-3</sup> | Substancja wiążąca                       | 1x10 <sup>-10</sup> – 1x10 <sup>-3</sup> | Substancja wiążąca                       | Węglowodór (heterocykliczny), lakton    | Produkt naturalny                       |

|    |                                |             |                                         |                                        |                                                     |                                        |                                                     |                           |                                         |
|----|--------------------------------|-------------|-----------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------------------|---------------------------|-----------------------------------------|
| 15 | Tamoksyfen                     | 105-40-29-1 | Substancja wiążąca                      | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | Substancja wiążąca                                  | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | Substancja wiążąca                                  | Węglowodór (cykliczny)    | Produkt leczniczy, środek weterynaryjny |
| 16 | 5 $\alpha$ -dihydrotestosteron | 521-18-6    | Substancja wiążąca                      | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | Substancja wiążąca                                  | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | Substancja wiążąca                                  | Steryd, niefenolowy       | Produkt naturalny                       |
| 17 | Bisfenol A                     | 80-05-7     | Substancja wiążąca                      | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | Substancja wiążąca                                  | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | Substancja wiążąca                                  | Fenol                     | Półprodukt                              |
| 18 | 4- <i>n</i> -heptylphenol      | 1987-50-4   | Substancja wiążąca                      | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | Niejednoznaczny <sup>a</sup>                        | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | Substancja wiążąca                                  | Alkilofenol               | Półprodukt                              |
| 19 | Kepon (chlordekony)            | 143-50-0    | Substancja wiążąca                      | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | Substancja wiążąca                                  | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | Substancja wiążąca                                  | Węglowodór (halogenowany) | Pestycyd                                |
| 20 | Benz(a)antracen                | 56-55-3     | Substancja inna niż substancja wiążąca  | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | Substancja inna niż substancja wiążąca <sup>b</sup> | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | Substancja inna niż substancja wiążąca <sup>b</sup> | Węglowodór aromatyczny    | Półprodukt                              |
| 21 | Enterolakton                   | 784-73-     | Substancja wiążąca                      | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | Substancja wiążąca                                  | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | Substancja wiążąca                                  | Fitoestrogen              | Produkt naturalny                       |
| 22 | Progesteron                    | 57-83-0     | Substancja inna niż                     | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$ | Substancja inna niż substancja wiążąca              | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$ | Substancja inna niż substancja wiążąca              | Steryd                    | Produkt naturalny                       |
| 23 | Oktylotrietoksysilan           | 2943-75-1   | Substancja inna niż substancja          | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | Substancja inna niż substancja wiążąca              | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | Substancja inna niż substancja wiążąca              | Silan                     | Modyfikator powierzchni                 |
| 24 | Atrazyna                       | 1912-24-9   | Substancja inna niż substancja wiążąca* | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$ | Substancja inna niż substancja wiążąca              | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$ | Substancja inna niż substancja wiążąca              | Związek heterocykliczny   | Herbicyd                                |

\*Granica rozpuszczalności  $< 1 \times 10^{-4}$  M.

<sup>†</sup>Zastosowanie i klasyfikację ftalanu dibutyłu (DBP) jako substancji innej niż substancja wiążąca oparto na badaniu do momentu osiągnięcia  $10^{-4}$  M, ponieważ w niektórych laboratoriach podczas badań poprzedzających walidację zaobserwowano, że substancja jest nierozpuszczalna przy  $10^{-3}$  M (np. wykazuje mętność).

<sup>†</sup> W trakcie badania walidacyjnego ftalanu dibutyłu zbadano pod postacią oznakowanej badanej substancji w stężeniu do  $10^{-3}$  M. W takich warunkach w przypadku części laboratoriów zaobserwowano spadek wiązań radioligandów w najwyższym stężeniu ( $10^{-3}$  M) albo niejednoznaczne dopasowanie krzywej. W przypadku tych serii badawczych ftalanu dibutyłu sklasyfikowano jako substancję „niejednoznacznie” lub „substancję wiążącą” w 3/5 laboratoriów stosujących test CERi oraz w 5/6 laboratoriów stosujących test Freybergera–Wilsona (zob. 2 pozycja bibliografii, sekcje IV.B.3a,b oraz VI.A).

<sup>a</sup> Klasyfikacja nie była zgodna z klasyfikacją, której się spodziewano. Klasyfikacja 4-*n*-heptylphenolu jako substancji „niejednoznacznie” lub „substancji innej niż substancja wiążąca” przez 3/5 laboratoriów poskutkowało średnią klasyfikacją niejednoznacznie. W toku bardziej szczegółowej inspekcji ujawniono, że było to spowodowane ograniczeniami rozpuszczalności substancji chemicznej, które uniemożliwiały utworzenie kompletnej krzywej wiązania.

<sup>b</sup> W trakcie badania walidacyjnego benz(a)antracen przeklasyfikowano jako substancję inną niż substancja wiążąca (tj. ujemną), bazując na opublikowanej bibliografii wykazującej, że aktywność estrogenowa *in vitro* przedstawiona w odniesieniu do tej substancji (16) zależy głównie od jej aktywacji metabolicznej (17)(18). Enzymatyczna aktywacja metaboliczna substancji nie byłaby przewidziana w wolnych od komórek testach wiązania hrER, tak jak ma to miejsce w tym badaniu międzywalidacyjnym. Klasyfikacja tej substancji jako „substancji innej niż substancja wiążąca” w przypadkach, gdy stosuje się warunki doświadczalne właściwe dla testów Freybergera–Wilsona i CERi, jest zatem prawidłowa.

## ELEMENTY TESTU WIĄZANIA hrER

### Istotne elementy testu

- Niniejsza metoda badawcza ma zastosowanie do testów, w których do receptora mogącego pełnić funkcję markera/znacznika testu oraz posiadającego zdolność przemieszczania się wraz ze wzrostem stężenia badanej substancji chemicznej, stosuje się receptor estrogenowy

oraz odpowiednio silny ligand. Testy wiązania obejmują dwa główne elementy: 1) wiązanie nasycenia oraz 2) wiązanie konkurencyjne. Test wiązania nasycenia przeprowadza się, aby potwierdzić swoistość i aktywność preparatów receptora, natomiast doświadczenie dotyczące wiązania konkurencyjnego przeprowadza się, aby ocenić zdolność badanej substancji chemicznej do wiązania się z hrER.

### **Kontrole**

15. Należy opisać podstawę proponowanych jednocześnie estrogenów odniesienia i kontroli. Jednoczesne kontrole (z rozpuszczalnikiem (nośnikiem), dodatnie (substancje wiążące się z receptorem estrogenowym; o mocnym i słabym powinowactwie wiązania), ujemne (substancje inne niż substancje wiążące)) w stosownych przypadkach służą jako wskazówka, że test działa w warunkach badania, a kontrole te stanowią podstawę porównań między doświadczeniami; kontrole te wchodziły zwykle w skład kryteriów dopuszczalności danego doświadczenia (1). Pełne krzywe stężeń dla estrogenów odniesienia i kontroli (tj. substancji słabo wiążącej i substancji innej niż substancja wiążąca) w każdej serii badawczej należy stosować na jednej płytce. Wszystkie pozostałe płytki powinny zawierać: 1) wysokie (w przybliżeniu pełne przemieszczenie liganda znakowanego izotopem) i średnie (w przybliżeniu  $IC_{50}$ ) stężenie każdego z E2 oraz substancji słabo wiążącej w trzech powtórzeniach; 2) kontrolę z rozpuszczalnikiem i wiązanie nieswoiste, każde w trzech powtórzeniach.

### **Standardowe procedury kontroli jakości**

16. Standardowe procedury kontroli jakości należy przeprowadzać tak, jak opisano dla każdego testu w celu zapewnienia czynnych receptorów, właściwych stężeń substancji chemicznych, pułapu tolerancji utrzymującego stabilność przez wiele pasażów oraz zachowania zdolności do uzyskania reakcji wiążących receptor estrogenowy na przestrzeni czasu.

### **Wykazanie biegłości laboratorium**

17. Przed przeprowadzeniem badania nieznanych substancji chemicznych z wykorzystaniem któregoś z testów przeprowadzanych w ramach niniejszej metody badawczej, każde laboratorium powinno wykazać biegłość w stosowaniu testu, przeprowadzając testy nasycenia pozwalające potwierdzić swoistość i aktywność preparatu z receptorem estrogenowym oraz konkurencyjne testy wiązania zawierające estrogen odniesienia i kontrole (substancję słabo wiążącą i substancję inną niż substancja wiążąca). Laboratorium powinno stworzyć bazę danych historycznych, zawierającą wyniki estrogenu odniesienia i kontroli wygenerowanych w ciągu 3–5 niezależnych, przeprowadzonych w różne dni doświadczeń. Doświadczenia te będą stanowiły podstawę w przypadku estrogenu odniesienia i kontroli historycznych w przypadku laboratorium, a w przyszłych seriach badawczych będą stosowane jako częściowa ocena dopuszczalności testu.
18. Reaktywność układu badawczego zostanie także potwierdzona za pomocą substancji służących do wykazania biegłości, których wykaz znajduje się w tabeli 2. Wykaz substancji

służących do wykazania biegłości stanowi podzbiór substancji odniesienia przedstawionych w standardach wykonywania badań dotyczących badań wiązania receptora estrogenowego (3). Substancje te są dostępne na rynku, należą do klas substancji chemicznych łączących się często z aktywnością wiązania receptora estrogenowego, wykazują odpowiedni zakres siły działania oczekiwanej w przypadku wiązania receptora estrogenowego (tj. wysoki do słabego) oraz substancji innych niż substancje wiążące (tj. substancji ujemnych). Zbadane stężenia, w przypadku każdej substancji służącej do wykazania biegłości, powinny wchodzić w zakres określony w tabeli 2. W odniesieniu do każdej substancji należy przeprowadzić co najmniej trzy doświadczenia, a ich wyniki powinny być zgodne z przewidywaną aktywnością substancji chemicznej. Każde doświadczenie należy przeprowadzić niezależnie (tj. w świeżych roztworach receptora, badanych substancji chemicznych i odczynnika), stosując trzy kontrpróby na każde stężenie. Biegłość wykazuje się w drodze poprawnej klasyfikacji (dodatnia/ujemna) każdej substancji służącej do wykazania biegłości. Podczas nauki przeprowadzania testów każdy technik powinien wykonać badanie biegłości.



**Tabela 2:** Wykaz kontroli i substancji służących do wykazania biegłości w odniesieniu do konkurencyjnych testów wiązania hrER<sup>1</sup>

| Nie                                                                                                      | Nazwa substancji                | NR CAS <sup>2</sup>   | Przewidywana reakcja <sup>3,4</sup> | Zakres badanych stężeń (M)             | Klasa chemiczna MeSH <sup>5</sup>  | Klasa produktowa <sup>6</sup>           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|-----------------------|-------------------------------------|----------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------------|
| <b>Kontrole (estrogen odniesienia, substancja słabo wiążąca, substancja inna niż substancja wiążąca)</b> |                                 |                       |                                     |                                        |                                    |                                         |
| 1                                                                                                        | 17-εστραδιολ                    | 50-28-2               | Substancja wiążąca                  | $1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$ | Steryd                             | Produkt leczniczy, środek weterynaryjny |
| 2                                                                                                        | Norethynodrel (lub) Noretyndron | 68-23-5 (lub) 68-22-4 | Substancja wiążąca                  | $3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-6}$ | Steryd                             | Produkt leczniczy, środek weterynaryjny |
| 3                                                                                                        | Oktylotrietoksylan              | 2943-75-1             | Substancja inna niż substancja      | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | Silan                              | Modyfikator powierzchni                 |
| <b>Substancje służące do wykazania biegłości<sup>6</sup></b>                                             |                                 |                       |                                     |                                        |                                    |                                         |
| 4                                                                                                        | Dietylostylbestrol              | 56-53-1               | Substancja wiążąca                  | $1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$ | Węglowodór (cykliczny), fenol      | Produkt leczniczy, środek weterynaryjny |
| 5                                                                                                        | 17α-etynyloestradiol            | 57-63-6               | Substancja wiążąca                  | $1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$ | Steryd                             | Produkt leczniczy, środek weterynaryjny |
| 6                                                                                                        | mezoheksestrol                  | 84-16-2               | Substancja wiążąca                  | $1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$ | Węglowodór (cykliczny), fenol      | Produkt leczniczy, środek weterynaryjny |
| 7                                                                                                        | Tamoksyfen                      | 10540-29-1            | Substancja wiążąca                  | $1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$ | Węglowodór (cykliczny)             | Produkt leczniczy, środek weterynaryjny |
| 8                                                                                                        | Genisteina                      | 446-72-0              | Substancja wiążąca                  | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | Związek heterocykliczny, flawonoid | Produkt naturalny                       |
| 9                                                                                                        | Bisfenol A                      | 80-05-7               | Substancja wiążąca                  | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | Fenol                              | Półprodukt                              |
| 10                                                                                                       | Zearalenon                      | 17924-92-4            | Substancja wiążąca                  | $1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-3}$ | Związek heterocykliczny, lakton    | Produkt naturalny                       |

|    |                                    |           |                                |                                        |                               |                           |
|----|------------------------------------|-----------|--------------------------------|----------------------------------------|-------------------------------|---------------------------|
| 11 | Butyloparaben                      | 94-26-8   | Substancja wiążąca             | $1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-3}$ | Kwas karboksylowy, fenol      | Konserwant                |
| 12 | Atrazyna                           | 1912-24-9 | Substancja inna niż substancja | $1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$ | Związek heterocykliczny       | Herbicyd                  |
| 13 | Ftalan dibutyłu (DBP) <sup>7</sup> | 84-74-2   | Substancja inna niż substancja | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$ | Węglowodór (cykliczny), ester | Plastyfikator, półprodukt |
| 14 | Kortykosteron                      | 50-22-6   | Substancja inna niż substancja | $1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-4}$ | Steryd                        | Produkt naturalny         |

<sup>1</sup> Jeżeli substancja służąca do wykazania biegłości nie jest już dostępna na rynku, można wykorzystać substancję o takiej samej kwalifikacji dotyczącej wiązania receptora estrogenowego i porównywalnej sile działania oraz klasie chemicznej.

<sup>2</sup> Skrót: CAS RN = numer w rejestrze Chemical Abstracts Service

<sup>3</sup> Klasyfikacja jako substancji wiążącej ER $\alpha$  lub substancji innej niż substancja wiążąca podczas badania walidacyjnego dla CERi oraz testu wiązania hrER Freybergera-Wilsona (2).

<sup>4</sup> Działanie wiążące ER oparto na dokumentach przeglądowych ICCVAM (BRD) w odniesieniu do testów ER Binding i TA (9) oraz na danych empirycznych i innych informacjach uzyskanych z opublikowanych i poddanych przeglądowi badań referencyjnych (10)(11)(12)(13)(14)(15).

<sup>5</sup> Substancje przypisano do co najmniej jednej klasy chemicznej przy użyciu Medical Subject Headings (MeSH) amerykańskiej National Library of Medicine, międzynarodowo uznanego znormalizowanego systemu klasyfikacji (dostępnego na stronie: <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

<sup>6</sup> Substancje przypisano do co najmniej jednej klasy produktowej przy użyciu bazy danych substancji niebezpiecznych amerykańskiej National Library of Medicine (dostępnej na stronie: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).

<sup>7</sup> DPB można stosować jako alternatywną kontrolną substancję inną niż substancja wiążąca zbadaną przy maksymalnym stężeniu wynoszącym  $10^{-4}$  M.

<sup>8</sup> Granica rozpuszczalności w przypadku tej substancji wynosi  $10^{-4}$  M. Zastosowanie i klasyfikację ftalanu dibutyłu (DBP) jako substancji innej niż substancja wiążąca oparto na badaniu do momentu osiągnięcia  $10^{-4}$  M, ponieważ w niektórych laboratoriach podczas badań poprzedzających walidację zaobserwowano, że substancja jest nierozpuszczalna przy  $10^{-3}$  M (np. wykazuje mętność).

## **Badanie rozpuszczalności oraz ustalanie zakresu stężeń badanych substancji chemicznych**

19. Należy przeprowadzić badanie wstępne, aby ustalić granicę rozpuszczalności każdej badanej substancji chemicznej oraz określić właściwy zakres stężeń, który zostanie zastosowany przy przeprowadzaniu badania. Granicę rozpuszczalności każdej badanej substancji chemicznej należy początkowo oznaczyć w rozpuszczalniku, a następnie potwierdzić w warunkach testowych. Końcowe stężenie badane w teście nie powinno przekraczać 1 mM. Badanie ustalające zakres dawkowania obejmuje kontrolę z rozpuszczalnikiem wraz z ośmioma seriami stężeń wzrastających w postępie logarytmicznym, począwszy od maksymalnego dopuszczalnego stężenia (np. 1 mM lub niższego, na podstawie granicy rozpuszczalności) oraz odnotowaną obecność zmętnienia lub osadu. Stężenia w drugim i trzecim doświadczeniu należy odpowiednio dostosować, aby lepiej scharakteryzować krzywą zależności stężenie-odpowiedź.

## **Kryteria dopuszczalności serii badawczej**

20. Akceptacji lub odrzucenia serii badawczej dokonuje się na podstawie oceny wyników dotyczących estrogenu i kontroli odniesienia stosowanych w przypadku każdego doświadczenia. Po pierwsze, w przypadku płytki 1 pełne krzywe stężenia dotyczące kontroli odniesienia z każdego doświadczenia powinny odpowiadać miarom efektywności o parametrach dopasowanych do krzywej (np.  $IC_{50}$  i krzywej Hilla) opartych na wynikach zgłoszonych w odniesieniu do właściwych protokołów dotyczących testów CERI i Freybergera-Wilsona (dodatek 2 i 3) oraz danym historycznym dotyczącym kontroli otrzymanym od laboratorium przeprowadzającego badanie. Wszystkie kontrole (estrogen odniesienia, substancję słabo wiążącą oraz substancję inną niż substancja wiążąca) należy odpowiednio zaklasyfikować w przypadku każdego doświadczenia. Po drugie, kontrole na wszystkich kolejnych płytkach należy ocenić pod względem zgodności z płytką 1. Należy zastosować wystarczający zakres stężeń badanej substancji chemicznej, aby wyraźnie określić najwyższy punkt konkurencyjnej krzywej wiązania. Zmienność wśród kontrprób przy każdym stężeniu badanej substancji chemicznej, jak również wśród trzech niezależnych serii badawczych powinna być uzasadniona i poparta naukowo. Zdolność do spójnego przeprowadzania testu należy wykazać poprzez opracowanie i utrzymywanie bazy danych historycznych w odniesieniu do estrogenu odniesienia i kontroli. Odchylenia standardowe (SD) lub współczynniki zmienności (CV) dla środków parametrów dopasowania krzywych estrogenu odniesienia i kontrolnej substancji słabo wiążącej z wielu doświadczeń mogą być stosowane jako miara odtwarzalności wewnątrz laboratorium. Dokonując przeglądu wyników dotyczących płytek kontrolnych z każdej serii badawczej, jak również w przypadku każdej badanej substancji chemicznej, należy przyjąć profesjonalny osąd.

Ponadto powinny być spełnione następujące zasady dotyczące kryteriów dopuszczalności:

- Dane powinny być wystarczające do przeprowadzenia ilościowej oceny wiązania receptora estrogenowego.

- Badane stężenia powinny pozostać w zakresie rozpuszczalności badanej substancji chemicznej.

### **Analiza danych**

21. Określona procedura analizy danych dotyczących wiązania nasycenia oraz wiązania konkurencyjnego powinny być zgodne z kluczowymi zasadami charakteryzowania interakcji receptor-ligand. Zazwyczaj dane dotyczące wiązania nasycenia analizuje się, stosując model regresji nieliniowej, który uwzględnia całkowite i nieswoiste wiązanie. Określając  $B_{max}$  i  $K_d$  konieczna może być korekta obniżenia stężenia ligandu (np. Swillens, 1995 r. (19)). Dane uzyskane w wyniku testów wiązania konkurencyjnego zazwyczaj się przekształca (np. odsetek specyficznego wiązania i stężenie badanej substancji chemicznej (logarytm  $M$ )). Szacunki logarytmu ( $IC_{50}$ ) dla każdej badanej substancji chemicznej należy określić wykorzystując właściwe oprogramowanie dopasowane do krzywej nieliniowej, aby pasowały do równania Hilla o czterech parametrach. Po początkowej analizie należy zastosować parametry dopasowane do krzywej oraz dokonać wizualnego przeglądu stopnia, w jakim dane dotyczące wiązania odpowiadają wygenerowanej krzywej konkurencyjnego wiązania. W niektórych przypadkach konieczne może być przeprowadzenie dodatkowej analizy, aby uzyskać najlepsze dopasowanie do krzywej (np. ograniczenie najwyższego lub najniższego punktu krzywej, zastosowanie zasady 10 %, zob. dodatek 4 i 2 pozycja bibliografii (sekcja III.A.2)).
22. Spełnienie kryteriów dopuszczalności (pkt 20) wskazuje, że system testów funkcjonuje prawidłowo, ale nie gwarantuje, że jakiegokolwiek konkretne badanie dostarczy dokładnych danych. Powtarzanie się prawidłowych wyników pierwszego badania stanowi najlepszą wskazówkę, że dostarczono dokładnych danych.

### **Ogólne kryteria interpretacji danych**

23. Obecnie nie istnieje powszechnie uzgodniona metoda interpretacji danych dotyczących wiązania receptora estrogenowego. Zarówno jakościowe (np. substancja wiążąca / substancja inna niż substancja wiążąca) jak i ilościowe (np. logarytm  $IC_{50}$ , względne powinowactwo wiązania (RBA) itp.) oceny aktywności przekazywanej przez ludzki receptor estrogenowy alfa powinny jednak być oparte na danych empirycznych i rzetelnej ocenie naukowej.

### **Sprawozdanie z badania**

24. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

#### *Test:*

- zastosowany test.

#### *Kontrola / wzorzec porównawczy / badana substancja chemiczna*

- źródło, numer partii, termin przydatności, jeżeli są znane,

- stabilność badanej substancji chemicznej, jeżeli jest znana,
- rozpuszczalność i stabilność badanej substancji chemicznej w rozpuszczalniku, jeżeli są znane,
- pomiar pH, osmolalności i osadu w podłożu, do którego dodano badaną substancję chemiczną, w stosownych przypadkach;

substancja jednoskładnikowa:

- wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne,
- dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa IUPAC lub CAS, numer CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny, czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń w stosownych przypadkach i jeśli jest to praktycznie wykonalne itp.;

substancja wieloskładnikowa, UVCB i mieszaniny:

- opisane w miarę możliwości przez podanie nazwy chemicznej (zob. powyżej), określenie ilości oraz istotnych właściwości fizykochemicznych składników.

*Rozpuszczalnik/nośnik:*

- charakterystyka (charakter, dostawca i partia),
- uzasadnienie wyboru rozpuszczalnika/nośnika,
- rozpuszczalność i stabilność badanej substancji chemicznej w rozpuszczalniku/nośniku, jeżeli są znane.

*Receptory:*

- źródło receptorów (dostawca, nr katalogowy, partia, gatunek receptora, stężenie aktywnego receptora dostarczone przez dostawcę, certyfikat od dostawcy),
- charakterystyka receptorów (w tym wyniki dotyczące wiązania nasycenia):  $K_d$ ,  $B_{max}$ ,
- przechowywanie receptorów,
- ligand znakowany izotopem promieniotwórczym,
- dostawca, nr katalogowy, partia, określone działanie.

*Warunki badania:*

- granica rozpuszczalności w warunkach testowych,
- skład bufora wiązania,
- stężenie receptora,
- stężenie znacznika (tj. ligandu znakowanego izotopem promieniotwórczym),
- stężenia badanej substancji chemicznej,

- odsetek nośnika w teście końcowym,
- temperatura i czas inkubacji,
- metoda rozdzielania związanych/wolnych ligandów,
- dodatnie i ujemne kontrole / substancje odniesienia,
- kryteria uznania badania za dodatnie, ujemne lub niejednoznaczne.

*Kontrola dopuszczalności:*

- rzeczywiste wartości  $IC_{50}$  i krzywej Hilla w odniesieniu do jednoczesnych kontroli dodatnich / substancji odniesienia.

*Wyniki:*

- surowe dane dotyczące związanych i wolnych ligandów,
- w stosownych przypadkach kontrola potwierdzająca denaturację,
- jeżeli istnieje, najniższe stężenie efektywne (LEC),
- wartości względnego powinowactwa wiązania lub  $IC_{50}$ , w stosownych przypadkach,
- w stosownych przypadkach zależność stężenie-odpowiedź,
- analizy statystyczne, jeśli takie istnieją, wraz z miarą błędu i wiarygodności (np. SEM, SD, CV lub 95 % CI) oraz opisem sposobu uzyskania tych wartości.

*Omówienie wyników:*

- zastosowanie zasady 10 %.

*Wniosek*

## BIBLIOGRAFIA

- (1) OECD (2005). *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*. [W:] Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 34. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.
- (2) OECD (2015). *Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα)* [W:] Publikacje na temat zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 226. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.
- (3) OECD (2015). *Performance Standards for Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα)* [W:] Publikacje na temat zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 222. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.
- (4) OECD (2012). *Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption*. [W:] Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 150. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.
- (5) Cavailles V. (2002). *Estrogens and Receptors: an Evolving Concept*, „Climacteric” nr 5, suplement 2, s. 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” nr 16(4), s. 1073–1089.
- (7) Younes M. i Honma N. (2011). *Estrogen Receptor Beta*. „Arch. Pathol. Lab. Med.” nr 135(1), s. 63–66.
- (8) Diamanti-Kandarakis et al. (2009). *Endocrine-Disrupting Chemicals: an Endocrine Society Sci. Statement*, „Endo Rev” nr 30(4), s. 293–342.
- (9) ICCVAM (2002). *Background Review Document. Current Status of Test Methods for Detecting Endocrine Disruptors: In Vitro Estrogen Receptor Binding Assays*. (Publikacja NIH nr 03-4504). National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, Karolina Północna.
- (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” nr 22(1), s. 225–231.
- (13) OECD (2007). *Additional Data Supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in Rodents* [W:] Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 67. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.
- (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): Japonia, s. 1–188.
- (15) Yamasaki, K; Noda, S; Imatanaka, N; Yakabe, Y. (2004). *Comparative Study of the Uterotrophic Potency of 14 Chemicals in a Uterotrophic Assay and their Receptor-Binding Affinity*, „Toxicol. Letters” nr 146, s. 111–120.
- (16) Kummer V; Maskova, J; Zraly, Z; Neca, J; Simeckova, P; Vondracek, J; Machala, M. (2008). *Estrogenic Activity of Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Uterus of Immature Wistar Rats*. „Toxicol. Letters” nr 180, s. 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.” nr 196, s. 58–67.
- (18) Santodonato, J. (1997). *Review of the Estrogenic and Antiestrogenic Activity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Relationship to Carcinogenicity*. [W:] „Chemosphere” nr 34, s. 835–848.
- (19) Swillens S (1995). *Interpretation of Binding Curves Obtained with High Receptor Concentrations: Practical Aid for Computer Analysis*. „Mol Pharmacol” nr 47(6), s. 1197–1203.



## **Dodatek 1**

### **DEFINICJE I SKRÓTY**

**Zasada 10 %:** możliwość wykluczenia z analiz punktów danych, w przypadku których średnia kontrprób w odniesieniu do odsetka określonego wiązania [ $^3\text{H}$ ]17 $\beta$ -estradiolu wynosi 10 % lub więcej niż zaobserwowano w przypadku średniej wartości przy niższym stężeniu (zob. dodatek 4).

**Kryteria dopuszczalności:** minimalne normy dotyczące przeprowadzania kontroli doświadczalnych i wzorców referencyjnych. Aby doświadczenie zostało uznane za ważne, należy spełnić wszystkie kryteria dopuszczalności.

**Dokładność (zgodność):** stopień zgodności wyników testu z przyjętymi wartościami odniesienia. Jest to miara efektywności testu i jeden z aspektów jego istotności. Pojęcia tego często używa się zamiennie z pojęciem „zgodność” na określenie odsetka prawidłowych wyników testu (1).

**CF:** ramy koncepcyjne OECD dotyczące testowania i oceny substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego.

**Substancja chemiczna:** substancja lub mieszanina.

**CV:** współczynnik zmienności

**E2: 17 $\beta$ -estradiol**

**ED:** zaburzenie funkcjonowania układu hormonalnego

**hER $\alpha$ :** ludzki receptor estrogenowy alfa

**ER:** receptor estrogenowy

**Aktywność estrogenna:** zdolność substancji chemicznej do naśladowania 17 $\beta$ -estradiolu w jego zdolności do wiązania się z receptorami estrogenowymi. Wiązanie z ludzkim receptorem estrogenowym alfa można wykryć za pomocą niniejszej metody badawczej.

**IC<sub>50</sub>:** połowa maksymalnego stężenia efektywnego badanej hamującej substancji chemicznej.

**ICCVAM:** Międzyagencyjny Komitet Koordynacyjny ds. Uznawania Metod Alternatywnych.

**Odtwarzalność międzylaboratoryjna:** miara zakresu, w jakim różne wykwalifikowane laboratoria, przy użyciu tego samego protokołu i testując tę samą badaną substancję, mogą uzyskać jakościowo i ilościowo podobne wyniki. Odtwarzalność międzylaboratoryjna jest ustalana w ramach procesów poprzedzających walidację i obejmujących walidację i wskazuje, w jakim stopniu test można z powodzeniem przekazywać między laboratoriami: nazywana jest również odtwarzalnością międzylaboratoryjną (1).

**Odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna:** ustalenie stopnia, w jakim wykwalifikowani pracownicy w tym samym laboratorium mogą z powodzeniem odtworzyć wyniki, stosując szczegółowy protokół w różnych momentach. Nazywana również „odtwarzalnością laboratoryjną” (1).

**LEC:** najniższe stężenie efektywne to najniższe stężenie badanej substancji chemicznej, które powoduje reakcję (tj. najniższe stężenie badanej substancji chemicznej, przy którym krotność indukcji statystycznie różni się od równoległej grupy kontrolnej nośnika).

**Badanie me-too:** potoczne określenie testu, które jest strukturalnie i funkcjonalnie podobne do zwalidowanej i zaakceptowanej referencyjnej metody badania. Stosowane zamiennie z podobną metodą badań.

**PBTG:** wytyczne dotyczące badań w oparciu o wyniki

**Standardy wykonywania badań:** normy oparte na zwalidowanej metodzie badawczej, zapewniające podstawę do oceny porównywalności proponowanego testu, który jest podobny do metody referencyjnej pod względem mechanistycznym i funkcjonalnym. Uwzględnia się: 1) istotne elementy testu; 2) podstawowy wykaz chemicznych substancji odniesienia, wybranych spośród substancji chemicznych wykorzystywanych w celu wykazania akceptowalnej efektywności zwalidowanej metody badania; oraz 3) podobny poziom dokładności i wiarygodności, na podstawie wyników uzyskanych dla zwalidowanej metody badania, który proponowany test powinien osiągnąć przy ocenie z wykorzystaniem podstawowego wykazu chemicznych substancji odniesienia (1).

**Substancje służące do wykazania biegłości:** podzbiór substancji odniesienia zawartych w standardach wykonywania badań, które mogą być stosowane przez laboratoria w celu wykazania kompetencji technicznych za pomocą znormalizowanego testu. Kryteria kwalifikacji w przypadku tych substancji obejmują zazwyczaj takie czynniki, jak to, że reprezentują one zakres reakcji, są dostępne na rynku i że dostępne są wysokiej jakości dane porównawcze.

**Biegłość:** wykazana zdolność do prawidłowego wykonania testu przed badaniem nieznanymi substancjami.

**Estrogen odniesienia:** 17 $\beta$ -estradiol (E2, CAS 50-28-2).

**Referencyjne metody badawcze:** testy oparte na PBTG 493.

**RBA:** względne powinowactwo wiązania. Względne powinowactwo wiązania oblicza się jako odsetek logarytmu (IC<sub>50</sub>) substancji w stosunku do logarytmu (IC<sub>50</sub>) 17 $\beta$ -estradiolu

**Istotność:** opis powiązania testu z oczekiwanym skutkiem oraz czy jest on znaczący i użyteczny z punktu widzenia określonego celu. Jest to zakres, w jakim test pozwala prawidłowo zmierzyć lub przewidzieć biologiczny skutek będący przedmiotem zainteresowania. Istotność obejmuje uwzględnienie dokładności (zgodności) testu (1).

**Wiarygodność:** miara zakresu, w jakim test może zostać wykonany w sposób odtwarzalny w jednym laboratorium i pomiędzy laboratoriami na przestrzeni czasu w przypadku jego przeprowadzania przy użyciu tego samego protokołu. Ocenia się ją w drodze obliczenia odtwarzalności wewnątrz- i międzylaboratoryjnej.

**SD:** odchylenie standardowe.

**Badana substancja chemiczna:** dowolna substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

**Zweryfikowana metoda badawcza:** test, w odniesieniu do którego zakończono badania walidacyjne w celu określenia jej istotności (w tym dokładności) i wiarygodności w odniesieniu do konkretnego celu. Należy zauważyć, że zweryfikowana metoda badawcza może nie wykazywać dostatecznej efektywności z punktu widzenia dokładności i wiarygodności, aby można było ją uznać za dopuszczalną w odniesieniu do danego celu (1).

**Walidacja:** proces, za pomocą którego ustalana jest wiarygodność i adekwatność danego podejścia, metody, testu, procesu lub oceny w określonym celu (1).

## Dodatek 2

### **TEST *IN VITRO* NASYCENIA I WIĄZANIA KONKURENCYJNEGO RECEPTORA ESTROGENOWEGO ( $ER\alpha$ ) FREYBERGERA–WILSONA WYKORZYSTUJĄCY PEŁNOWYMIAROWY REKOMBINOWANY $ER\alpha$**

#### **ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA (ZOB. RÓWNIEŻ WPROWADZENIE OGÓLNE)**

1. Niniejszy test nasycenia i wiązania konkurencyjnego receptora estrogenowego ( $ER\alpha$ ) *in vitro* wykorzystuje pełnowymiarowy ludzki receptor  $ER\alpha$  (hr $ER\alpha$ ), który jest wytwarzany w komórkach owadów zakażonych bakulowirusem i z nich izolowany. Protokół, opracowany przez Freybergera i Wilsona, został poddany międzynarodowemu wielolaboratoryjnemu badaniu walidacyjnemu (2), które wykazało jego adekwatność i wiarygodność dla zamierzonego celu testu.
2. Test ten jest procedurą klasyfikacyjną służącą do identyfikacji substancji, które mogą wiązać się z pełnowymiarowym hr $ER\alpha$ . Służy on do określenia zdolności badanej substancji chemicznej do konkurencyjnego wiązania z  $17\beta$ -estradiolem w zakresie wiązania z hr $ER\alpha$ . Ilościowe wyniki testu mogą obejmować  $IC_{50}$  (miara stężenia badanej substancji chemicznej potrzebnego do wyparcia połowy [ $^3H$ ]- $17\beta$ -estradiolu z hr $ER\alpha$ ) i względne powinowactwa wiązania badanych substancji chemicznych w odniesieniu do hr $ER\alpha$  w porównaniu z  $17\beta$ -estradiolem. Do celów klasyfikacji substancji chemicznych akceptowalne wyniki testów jakościowych mogą obejmować klasyfikację badanych substancji chemicznych jako substancji wiążących hr $ER\alpha$ , substancji innych niż substancja wiążąca lub niejednoznacznych w oparciu o kryteria opisane dla krzywych wiązania.
3. W teście wykorzystuje się ligand promieniotwórczy, który wymaga zezwolenia na stosowanie materiałów promieniotwórczych przez laboratorium. Wszystkie procedury dotyczące radioizotopów i niebezpiecznych substancji chemicznych powinny być zgodne z przepisami i procedurami opisanymi w prawodawstwie krajowym.
4. Przed rozpoczęciem stosowania tego badania do celów regulacyjnych należy zapoznać się z sekcjami „**WPROWADZENIE OGÓLNE**” oraz „**ELEMENTY TESTU WIĄZANIA hrER**”. Definicje i skróty stosowane w niniejszej wytycznej dotyczącej badań opisano w dodatku 1.

#### **ZASADY WYKONANIA TESTU (ZOB. RÓWNIEŻ WPROWADZENIE OGÓLNE)**

5. W teście wiązania hr $ER\alpha$  mierzy się zdolność znakowanego izotopem liganda ([ $^3H$ ]- $17\beta$ -estradiolu) do wiązania się z receptorem estrogenowym w obecności zwiększających się stężeń badanej substancji chemicznej (tj. konkurenta). Badane substancje chemiczne o wysokim powinowactwie z receptorem estrogenowym konkurują ze znakowanym

izotopem ligandem w niższym stężeniu w porównaniu z substancjami chemicznymi o niższym powinowactwie z receptorem.

6. Niniejszy test składa się z dwóch głównych elementów: doświadczenie dotyczące wiązania nasycenia mające na celu scharakteryzowanie parametrów interakcji receptor-ligand, po którym następuje doświadczenie dotyczące wiązania konkurencyjnego, charakteryzujący konkurencję pomiędzy badaną substancją chemiczną a znakowanym izotopem ligandem w zakresie wiązania z receptorem estrogenowym.
7. Celem doświadczenia dotyczącego wiązania nasycenia jest scharakteryzowanie konkretnej partii receptorów pod kątem powinowactwa wiązania i ich liczby w ramach przygotowania do doświadczenia dotyczącego wiązania konkurencyjnego. W doświadczeniu dotyczącym wiązania nasycenia mierzy się, w warunkach równowagi, powinowactwo stałego stężenia receptora estrogenowego w odniesieniu do jego naturalnego ligandu (reprezentowanego przez stałą dysocjacji,  $K_d$ ) oraz stężenie obszarów czynnego receptora ( $B_{max}$ ).
8. W doświadczeniu dotyczącym konkurencyjnego wiązania mierzy się powinowactwo substancji do konkurowania z [ $^3H$ ]17 $\beta$ -estradiolem o wiązanie z receptorem estrogenowym. Powinowactwo jest określa się ilościowo za pomocą stężenia badanej substancji chemicznej, która w stanie równowagi hamuje 50 % specyficznego wiązania [ $^3H$ ]17 $\beta$ -estradiolu (nazywanego „stężeniem hamującym 50 %” lub  $IC_{50}$ ). Można je również ocenić za pomocą względnego powinowactwa wiązania (RBA, w stosunku do  $IC_{50}$  estradiolu mierzonego oddzielnie w tej samej serii badawczej). W doświadczeniu dotyczącym konkurencyjnego wiązania mierzy się wiązanie [ $^3H$ ]17 $\beta$ -estradiolu przy stałym stężeniu w obecności szerokiego zakresu (ośmiu rzędów wielkości) stężeń badanych substancji chemicznych. Dane są następnie dopasowywane, na ile to możliwe, do postaci równania Hilla (Hill 1910), które opisuje przemieszczenie radioligandu przez jednoobszarową konkurencyjną substancję wiążącą. Zakres przemieszczenia estradiolu znakowanego izotopem w stanie równowagi jest wykorzystywany do scharakteryzowania badanej substancji chemicznej jako substancji wiążącej, substancji innej niż substancja wiążąca lub generującej reakcję niejednoznaczną.

## PROCEDURA

### Wykazanie dopuszczalnej efektywności białka hrER $\alpha$

9. Przed rutynowym wykonaniem testów nasycenia i wiązania konkurencyjnego należy wykazać, że efektywność każdej nowej partii hrER $\alpha$  w laboratorium, w którym będzie używana, jest prawidłowa. W celu zademonstrowania efektywności należy zastosować dwuetapowy proces. Etapy te są następujące:
  - Przeprowadzenie testu wiązania nasycenia [ $^3H$ ]-17 $\beta$ -estradiolu w celu wykazania swoistości i nasycenia hrER $\alpha$ . Analiza regresji nieliniowej tych danych (np. BioSoft; McPherson 1985; Motulsky 1995), a następnie wykres Scatcharda powinien

dokumentować powinowactwo wiązania hrER $\alpha$  [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -estradiolu ( $K_d$ ) i liczbę receptorów ( $B_{\text{max}}$ ) w odniesieniu do każdej partii hrER $\alpha$ .

- Wykonanie testu wiązania konkurencyjnego przy użyciu substancji kontrolnych (estrogen odniesienia (17 $\beta$ -estradiol), substancji słabo wiążącej (np. noretynodrel lub noretyndron) oraz substancji innej niż substancja wiążąca (oktylotrietoksylan, OTES). Każde laboratorium powinno stworzyć bazę danych historycznych w celu udokumentowania spójności  $\text{IC}_{50}$  i innych istotnych wartości dla estrogenów odniesienia i substancji słabo wiążących między doświadczeniami i różnymi partiami hrER $\alpha$ . Parametry krzywych konkurencyjnego wiązania dla substancji kontrolnych powinny mieścić się w granicach 95 % przedziału ufności (zob. tabela 1), które zostały opracowane przy wykorzystaniu danych z laboratoriów uczestniczących w badaniu walidacyjnym w odniesieniu do niniejszego testu (2).

**Tabela 1:** Kryteria efektywności opracowane dla estrogenów odniesienia i substancji słabo wiążących, test wiązania FW hrER.

| Substancja                     | Parametr                | Wartość średnia <sup>a</sup> | Odchylenie standardowe (n) | Przedziały ufności <sup>b</sup> 95 % |                         |
|--------------------------------|-------------------------|------------------------------|----------------------------|--------------------------------------|-------------------------|
|                                |                         |                              |                            | Dolna wartość graniczna              | Górna wartość graniczna |
| <b>17β-estradiol</b>           | Najwyższa wartość (%)   | 100,44                       | 10,84 (67)                 | 97,8                                 | 103,1                   |
|                                | Najniższa wartość (%)   | 0,29                         | 1,25 (67)                  | -0,01                                | 0,60                    |
|                                | Krzywa Hilla            | -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>Noretynodrel</b>            | Najwyższa wartość (%)   | 99,42                        | 8,90 (68)                  | 97,27                                | 101,60                  |
|                                | Najniższa wartość (%)   | 2,02                         | 3,42 (68)                  | 1,19                                 | 2,84                    |
|                                | Krzywa Hilla            | -1,01                        | 0,38 (68)                  | -1,10                                | -0,92                   |
|                                | LogIC <sub>50</sub> (M) | -6,39                        | 0,27 (68)                  | -6,46                                | -6,33                   |
| <b>Noretyndron<sup>c</sup></b> | Najwyższa wartość (%)   | 96,14                        | 8,44 (27)                  | 92,80                                | 99,48                   |
|                                | Najniższa wartość (%)   | 2,38                         | 5,02 (27)                  | 0,40                                 | 4,37                    |
|                                | Krzywa Hilla            | -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>Średnia (n) ± odchylenie standardowe (SD) zostały obliczone przy użyciu szacunków parametrów dopasowania krzywej (4-parametrowe równanie Hilla) dla kontrolnych serii badawczych wykonanych w czterech laboratoriach podczas badania walidacyjnego (zob. załącznik N do 2. pozycji bibliografii).

<sup>b</sup> 95 % przedziały ufności są podane jako wskazówka w odniesieniu do kryteriów dopuszczalności.

<sup>c</sup>Testowanie noretyndronu było opcjonalne w przypadku podzadania 4 przeprowadzonego podczas badania walidacyjnego (zob. 2. pozycja bibliografii, zob. podzadanie 4). W związku z tym średnia ±SD (n) została obliczona przy użyciu szacunków dopasowania krzywej (4-parametrowe równanie Hilla) dla kontrolnych serii badawczych przeprowadzonych w dwóch laboratoriach.

Zakres IC<sub>50</sub> będzie zależał od Kd preparatu receptora i stężenia znakowanego izotopem ligandu używanego w każdym laboratorium. Dopuszczalna będzie odpowiednia korekta zakresu IC<sub>50</sub> na podstawie warunków stosowanych do przeprowadzenia testu.

## Wykazanie biegłości laboratorium

- Zob. pkt 17 i 18 oraz tabela 2 w rozdziale „ELEMENTY TESTU WIĄZANIA hrER” w niniejszej metodzie badawczej. Każdy test (nasycenia i wiązania konkurencyjnego) powinien składać się z trzech niezależnych serii badawczych (tj. ze świeżymi rozcieńczeniami receptora, substancji chemicznych i odczynników) w różnych dniach, a każda seria badawcza powinna obejmować trzy kontrpróby.

## Określanie stężenia receptora (hrERα)

11. Stężenie czynnego receptora różni się nieznacznie w zależności od partii i warunków składowania. Z tego powodu należy określić stężenie czynnego receptora otrzymanego od dostawcy. Pozwoli to uzyskać odpowiednie stężenie aktywnego receptora w serii badawczej.
12. W warunkach odpowiadających konkurencyjnym wiązaniom (tj. 1 nM [ $^3\text{H}$ ]-estradiolu), nominalne stężenia 0,25, 0,5, 0,75 i 1 nM receptora powinny być inkubowane przy braku (wiązanie całkowite) i obecności (wiązanie nieswoiste) 1  $\mu\text{M}$  nieoznakowanego estradiolu. Określone wiązanie, obliczone jako różnica wiązania całkowitego i nieswoistego, jest wykreślane w funkcji nominalnego stężenia receptora. Stężenie receptora, które daje określone wartości wiązania odpowiadające 20 % dodanego oznaczenia izotopem, jest związane z odpowiadającym mu nominalnym stężeniem receptora, a stężenie receptora powinno być wykorzystywane w doświadczeniach dotyczących nasycenia i konkurencyjnego wiązania. Często końcowe stężenie hrER wynoszące 0,5 nM jest zgodne z tym warunkiem.
13. Jeżeli kryterium 20 % nie może być wielokrotnie spełnione, należy sprawdzić, czy w zestawie doświadczenia nie ma potencjalnych błędów. Nieosiągnięcie kryterium 20 % może wskazywać, że w partii rekombinowanej jest bardzo mało czynnego receptora, w związku z czym należy rozważyć zastosowanie innej partii receptora.

### Test nasycenia

14. Osiem wzrastających stężeń [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -estradiolu należy oceniać trzykrotnie, w następujących trzech warunkach (zob. tabela 2):
  - przy braku nieoznakowanego 17 $\beta$ -estradiolu i w obecności receptora estrogenowego. Jest to wyznaczenie wiązania całkowitego przez pomiar radioaktywności w dołkach, w których znajduje się tylko [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -estradiol,
  - w obecności 1000-krotnego przekroczenia stężenia nieoznakowanego 17 $\beta$ -estradiolu nad oznakowanym 17 $\beta$ -estradiolem i obecności receptora estrogenowego. Zamierzeniem tego warunku jest nasycenie aktywnych obszarów wiązania nieoznakowanym 17 $\beta$ -estradiolem, a w wyniku pomiaru radioaktywności w dołkach, określenie wiązania nieswoistego. Każdy pozostały gorący estradiol, który może wiązać się z receptorem uznaje się za wiążący w nieswoistym obszarze, ponieważ zimny estradiol powinien być w tak wysokim stężeniu, aby wiązał się ze wszystkimi dostępnymi swoistymi obszarami na receptorze,
  - przy braku nieoznakowanego 17 $\beta$ -estradiolu i braku receptora estrogenowego (określenie całkowitej radioaktywności).

### *Przygotowanie roztworów [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -estradiolu i nieoznakowanego 17 $\beta$ -estradiolu*

15. Należy przygotować rozcieńczenia [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -estradiolu przez dodanie buforu testowego do roztworu podstawowego 12 nM [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -estradiolu, aby uzyskać stężenia początkowo w zakresie od 0,12 nM do 12 nM. Dodają 40  $\mu\text{l}$  tych roztworów do odpowiednich dołków



testowych płytki 96-dołkowej (w ostatecznej objętości 160  $\mu\text{l}$ ), uzyskuje się końcowe stężenia testowe w zakresie od 0,03 do 3,0 nM. Przygotowanie buforu testowego, roztworu podstawowego [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -estradiolu oraz rozcieńczeń i określenie stężeń są szczegółowo opisane w protokole Freybergera–Wilsona (2).

16. Należy przygotować rozcieńczenia etanolowych roztworów 17 $\beta$ -estradiolu przez dodanie buforu testowego, aby uzyskać osiem wzrastających stężeń, początkowo w zakresie od 0,06  $\mu\text{M}$  do 6  $\mu\text{M}$ . Poprzez dodanie 80  $\mu\text{l}$  tych roztworów do odpowiednich dołków testowych płytki 96-dołkowej (w ostatecznej objętości 160  $\mu\text{l}$ ), uzyskuje się końcowe stężenia testowe w zakresie od 0,03  $\mu\text{M}$  do 3,0  $\mu\text{M}$ . Ostateczne stężenie nieoznakowanego 17 $\beta$ -estradiolu w poszczególnych dołkach testowych z nieswoistymi wiązaniami powinno być 1000-krotnie większe od oznakowanego stężenia [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -estradiolu. Przygotowanie rozcieńczeń nieoznakowanego 17 $\beta$ -estradiolu jest szczegółowo opisane w protokole Freybergera–Wilsona (2).
17. Należy stosować nominalne stężenie receptora, które daje specyficzne wiązanie  $20 \pm 5\%$  (zob. pkt 12–13). Roztwór hrER $\alpha$  należy przygotować bezpośrednio przed użyciem.
18. Płytki 96-dołkowe są przygotowywane w sposób przedstawiony w tabeli 2, z 3 kontrpróbami na stężenie. Przykład stężenia płytek i przypisania objętości [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -estradiolu, nieoznakowanego 17 $\beta$ -estradiolu, buforu i receptora przedstawiono w dodatku 2.2.

**Tabela 2:** Rozkład na mikropłytkce do testu wiązania nasycenia

|          | <i>1</i>                                                               | <i>2</i> | <i>3</i> | <i>4</i>                                                               | <i>5</i> | <i>6</i> | <i>7</i>                                                               | <i>8</i> | <i>9</i> | <i>10</i>                                                              | <i>11</i> | <i>12</i> |                                     |
|----------|------------------------------------------------------------------------|----------|----------|------------------------------------------------------------------------|----------|----------|------------------------------------------------------------------------|----------|----------|------------------------------------------------------------------------|-----------|-----------|-------------------------------------|
| <i>A</i> | 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                          |           |           | Wiązanie całkowite (rozpuszczalnik) |
| <i>B</i> | 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                           |           |           |                                     |
| <i>C</i> |                                                                        |          |          |                                                                        |          |          |                                                                        |          |          |                                                                        |           |           |                                     |
| <i>D</i> | 0,03 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER + 0,03 μM E <sub>2</sub> |          |          | 0,06 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER + 0,06 μM E <sub>2</sub> |          |          | 0,08 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER + 0,08 μM E <sub>2</sub> |          |          | 0,10 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER + 0,10 μM E <sub>2</sub> |           |           | Wiązanie nieswoiste                 |
| <i>E</i> | 0,30 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER + 0,30 μM E <sub>2</sub> |          |          | 0,60 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER + 0,60 μM E <sub>2</sub> |          |          | 1,0 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER + 1,0 μM E <sub>2</sub>   |          |          | 3,0 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER + 3,0 μM E <sub>2</sub>   |           |           |                                     |
| <i>F</i> |                                                                        |          |          |                                                                        |          |          |                                                                        |          |          |                                                                        |           |           |                                     |
| <i>G</i> |                                                                        |          |          |                                                                        |          |          |                                                                        |          |          |                                                                        |           |           |                                     |
| <i>H</i> |                                                                        |          |          |                                                                        |          |          |                                                                        |          |          |                                                                        |           |           |                                     |

[ $^3\text{H}$ ] E $_2$ : [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -estradiol

ER: receptor estrogenowy

E $_2$ : nieoznakowany 17 $\beta$ -estradiol

19. Mikropłytki testowe należy inkubować w temperaturze 2–8 °C przez 16–20 godzin i umieszczane na rotatorze podczas okresu inkubacji.

*Pomiar [<sup>3</sup>H]-17β-estradiolu związanego z hrERα*

20. [<sup>3</sup>H]-17β-estradiał związany z hrERα należy oddzielić od wolnego [<sup>3</sup>H]-17β-estradiolu poprzez dodanie 80 µl zimnej zawiesiny DCC do każdego dołka, potrząsanie mikropłytkami przez 10 minut i odwirowywanie przez 10 minut z prędkością około 2500 obr./min. Aby zminimalizować dysocjację związanego [<sup>3</sup>H]-17β-estradiolu z hrERα podczas tego procesu, jest niezwykle ważne, aby bufony i dołki testowe były utrzymywane w temperaturze 2–8 °C i aby każdy etap był przeprowadzany szybko. Wytrząsarka do mikropłytek jest niezbędna do wydajnej i szybkiej obróbki płytek.
21. 50 µl supernatantu zawierającego [<sup>3</sup>H]-17β-estradiał związany z hrERα należy wówczas podnieść z najwyższą ostrożnością, aby uniknąć zanieczyszczenia dołków na skutek dotknięcia DCC, i umieścić na drugiej mikropłytkce.
22. 200 µl płynu scyntylacyjnego, zdolnego do przekształcenia energii kinetycznej emisji jądrowej w energię świetlną, należy następnie dodać do każdego dołka (A1–B12 i D1 do E12). Dołki G1–H12 (zidentyfikowane jako całkowita liczba rozpadów na minutę) reprezentują serie stężeń wzrastających w postępie geometrycznym [<sup>3</sup>H]-17β-estradiolu (40 µl), które powinny być dostarczane bezpośrednio do płynu scyntylacyjnego w dołkach płytki pomiarowej, jak wskazano w tabeli 3, tj. dołki te zawierają tylko 200 µl płynu scyntylacyjnego i odpowiednie rozcieńczenie [<sup>3</sup>H]-17β-estradiolu. Pomiaru te pokazują, ile [<sup>3</sup>H]-17β-estradiolu wyrażonych za pomocą liczby rozpadów na minutę dodano do każdego zestawu dołków w celu uzyskania wiązania całkowitego i wiązania nieswoistego.

**Tabela 3:** Rozkład na mikropłytkce do testu wiązania nasycenia, pomiar radioaktywności

|          | 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                          |    |    | Wiązanie całkowite (rozpuszczalnik) |
| <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 + 0,03 μM E <sub>2</sub> |   |   | 0,06 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER + 0,06 μM E <sub>2</sub> |   |   | 0,08 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER + 0,08 μM E <sub>2</sub> |   |   | 0,10 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER + 0,10 μM E <sub>2</sub> |    |    | Wiązanie nieswoiste                 |
| <b>E</b> | 0,30 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER + 0,30 μM E <sub>2</sub> |   |   | 0,60 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER + 0,60 μM E <sub>2</sub> |   |   | 1,0 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER + 1,0 μM E <sub>2</sub>   |   |   | 3,0 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER + 3,0 μM E <sub>2</sub>   |    |    |                                     |
| <b>F</b> |                                                                        |   |   |                                                                        |   |   |                                                                        |   |   |                                                                        |    |    |                                     |
| <b>G</b> | 0,03 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> (DPM ogółem)                  |   |   | 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>                               |    |    | DPM* ogółem                         |
| <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-estradiał

ER: receptor estrogenowy

E2: nieoznakowany  $17\beta$ -estradiol

DPM: liczba rozpadów na minutę

\*Gorące serie stężeń wzrastających w postępie geometrycznym estradiolu oznakowanego [ $^3\text{H}$ ] należy dodać bezpośrednio do 200  $\mu\text{l}$  płynu scyntylicyjnego w dołkach G1–H12.

23. Pomiar powinien rozpocząć się z opóźnieniem co najmniej 2 godzin, a czas liczenia powinien wynosić 40 minut na dołek. Do określenia liczby rozpadów na minutę na dołek z korekcją tłumienia należy zastosować licznik scyntylicyjny do mikropłytek. Alternatywnie, jeżeli licznik scyntylicyjny dla mikropłytki nie jest dostępny, próbki mogą być mierzone w konwencjonalnym liczniku. W tych warunkach można rozważyć skrócenie czasu liczenia.

### **Test wiązania konkurencyjnego**

24. W teście wiązania konkurencyjnego mierzy się wiązanie pojedynczego stężenia [ $^3\text{H}$ ] $17\beta$ -estradiolu w obecności zwiększających się stężeń badanej substancji chemicznej. Przy każdym stężeniu w ramach jednej serii badawczej należy zastosować trzy równoległe kontrpróby. Ponadto dla każdej badanej substancji chemicznej należy wykonać trzy niejednoczesne serie badawcze. Test powinien zostać przeprowadzony na jednej płytce 96-dołkowej lub na większej ich liczbie.

### *Kontrole*

25. Podczas przeprowadzania testu w każdym doświadczeniu należy uwzględnić równoczesny rozpuszczalnik i kontrole (tj. estrogen odniesienia, substancję słabo wiążącą oraz substancję inną niż substancja wiążąca). Pełne krzywe stężeń dla estrogenów odniesienia i kontroli (tj. substancji słabo wiążącej i substancji innej niż substancja wiążąca) w każdej serii badawczej należy stosować na jednej płytce. Wszystkie pozostałe płytki powinny zawierać (i) wysokie (maksymalne przemieszczenie) i średnie (około  $\text{IC}_{50}$ ) stężenie każdego z E2 oraz substancji słabo wiążącej w trzech powtórzeniach; (ii) kontrolę z rozpuszczalnikiem i wiązanie nieswoiste, każde co najmniej w trzech powtórzeniach. Procedury przygotowania buforu testowego, kontroli, [ $^3\text{H}$ ]- $17\beta$ -estradiolu, hrER $\alpha$  i roztworów badanych substancji chemicznych opisano w 2 pozycji bibliografii (załącznik K, zob. Protokół testu Freybergera–Wilsona).

### *Kontrola z rozpuszczalnikiem:*

26. Kontrola z rozpuszczalnikiem wskazuje, że rozpuszczalnik nie wchodzi w interakcję z układem badawczym, a także umożliwia zmierzenie wiązania całkowitego (TB). Preferowanym rozpuszczalnikiem jest etanol. W przypadku gdy najwyższe stężenie badanej substancji chemicznej nie jest rozpuszczalne w etanolu, alternatywnie można zastosować sulfotlenek dimetylowy. Stężenie etanolu lub sulfotlenku dimetylowego, jeżeli go zastosowano, w dołkach testu końcowego wynosi 1,5 % i nie może przekraczać 2 %.

#### *Kontrola z buforem:*

27. Kontrola z buforem (BC) nie powinna zawierać rozpuszczalnika ani badanej substancji chemicznej, ale wszystkie inne elementy testu. Wyniki kontroli z buforem porównuje się z wynikami kontroli z rozpuszczalnikiem w celu sprawdzenia, czy zastosowany rozpuszczalnik nie ma wpływu na system testu.

#### *Substancja silnie wiążąca (estrogen odniesienia)*

28.  $17\beta$ -estradiol (CAS 50-28-2) jest endogennym ligandem i tworzy wiązanie o wysokim powinowactwie z receptorem estrogenowym, podtyp alfa. Dla każdego testu wiązania konkurencyjnego hrER $\alpha$  należy przygotować krzywą wzorcową z użyciem nieoznakowanego  $17\beta$ -estradiolu, aby w tym samym laboratorium umożliwić ocenę zmienności podczas wykonywania testu na przestrzeni czasu. W etanolu należy przygotować osiem roztworów nieoznakowanego  $17\beta$ -estradiolu o stężeniach w dołkach testowych w zakresie od 100 nM do 10 pM (-7[logM] do -11[logM]), w następujących odstępach: (-7[logM], -8[logM], -8,5[logM], -9[logM], -9,5[logM], -10[logM], -11[logM]). Najwyższe stężenie nieoznakowanego  $17\beta$ -estradiolu (1  $\mu$ M) służy również jako wskaźnik nieswoistego wiązania. Stężenie to wyróżnia się etykietą „NSB” w tabeli 4, mimo że jest ono również częścią krzywej wzorcowej.

#### *Substancja słabo wiążąca*

29. Należy uwzględnić substancję słabo wiążącą (noretynodrel (CAS 68-23-5) lub noretyndron (CAS 68-22-4)) w celu wykazania czułości każdego doświadczenia i umożliwienia oceny zmienności przy przeprowadzaniu testu z upływem czasu. W etanolu należy przygotować osiem roztworów substancji słabo wiążącej o stężeniach w dołkach testowych w zakresie od 3 nM do 30  $\mu$ M (-8,5[logM] do -4,5[logM]), w następujących odstępach: -4,5[logM], -5[logM], -5,5[logM], -6[logM], -6,5[logM], -7[logM], -7,5[logM], -8,5[logM].

#### *Substancja inna niż substancja wiążąca*

30. Oktylotrietoksylan (OTES, CAS 2943-75-1) powinien być stosowany jako kontrola ujemna (substancja inna niż substancja wiążąca). Daje to pewność, że test w takiej formie umożliwi wykrycie, że badane substancje chemiczne nie wiążą się z hrER $\alpha$ . W etanolu należy przygotować osiem roztworów substancji innej niż substancja wiążąca o stężeniach w dołkach testowych w zakresie 0,1 nM–1000  $\mu$ M (-10[logM] do -3[logM]) w skali logarytmicznej. Ftalan dibutyłu (DBP) można stosować jako alternatywną kontrolną substancję inną niż substancja wiążąca. Wykazano, że jego maksymalna rozpuszczalność wynosi -4[logM].

#### *Stężenie hrER $\alpha$*

31. Należy stosować ilość receptora, które daje specyficzne wiązanie  $20 \pm 5\%$  1 nM radioligandu (zob. pkt 12–13 w dodatku 2). Roztwór hrER $\alpha$  należy przygotować bezpośrednio przed użyciem.

#### *[ $^3$ H]- $17\beta$ -estradiol*

32. Stężenie [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -estradiolu w dołkach testowych powinno wynosić 1,0 nM.

#### *Badane substancje chemiczne*

33. W pierwszej kolejności konieczne jest przeprowadzenie badania rozpuszczalności, aby ustalić granicę rozpuszczalności każdej badanej substancji chemicznej oraz określić właściwy zakres stężeń, który zostanie zastosowany przy realizacji protokołu badania. Granicę rozpuszczalności każdej badanej substancji chemicznej należy początkowo oznaczyć w rozpuszczalniku, a następnie potwierdzić w warunkach testowych. Końcowe stężenie badane w teście nie powinno przekraczać 1 mM. Badanie ustalające zakres dawkowania obejmuje kontrolę z rozpuszczalnikiem wraz z 8 seriami stężeń wzrastających w postępie logarytmicznym, począwszy od maksymalnego dopuszczalnego stężenia (np. 1 mM lub niższego, na podstawie granicy rozpuszczalności) oraz odnotowaną obecność zmętnienia lub osadu (zob. również pkt 35). Badaną substancję chemiczną należy badać przy użyciu 8 krzywych stężeń logarytmicznych, jak określono w poprzednim badaniu zakresu dawkowania. Stężenia w drugim i trzecim doświadczeniu należy odpowiednio dostosować, aby lepiej scharakteryzować krzywą zależności stężenie-odpowiedź.

34. Rozcieńczenia badanych substancji chemicznych należy przygotować w odpowiednim rozpuszczalniku (zob. pkt 26 dodatku 2). Jeżeli najwyższe stężenie badanej substancji chemicznej nie jest rozpuszczalne ani w etanolu, ani w sulfotlenku dimetylowym, a dodanie większej ilości rozpuszczalnika spowodowałoby, że stężenie rozpuszczalnika w końcowej próbówce byłoby wyższe niż dopuszczalna wartość graniczna, najwyższe stężenie można obniżyć do następnego niższego stężenia. W takim przypadku można dodać dodatkowe stężenie na dolnym końcu serii stężeń. Pozostałe stężenia w serii powinny pozostać niezmiennione.

35. Roztwory badanej substancji chemicznej powinny być ściśle monitorowane po dodaniu ich do dołka testowego, ponieważ badana substancja chemiczna może wytrącać się po dodaniu do dołka testowego. Dane dotyczące wszystkich dołków, które zawierają osady, należy wyłączyć z dopasowywania krzywej, a także odnotować powód wyłączenia tych danych.

36. Jeżeli istnieją wcześniejsze informacje z innych źródeł, które dostarczają logarytm ( $\text{IC}_{50}$ ) badanej substancji chemicznej, właściwe może być geometryczne oddzielenie rozcieńczeń (tj. 0,5 jednostki logarytmicznej wokół oczekiwanego logarytmu ( $\text{IC}_{50}$ )). Wynik końcowy powinien odzwierciedlać wystarczającą rozpiętość stężeń po obu stronach logarytmu ( $\text{IC}_{50}$ ), włączając „najwyższą wartość” i „najniższą wartość”, tak aby krzywą wiązania można było odpowiednio scharakteryzować.

#### *Organizacja płytki testowej*

37. Oznakowane mikropłytki powinny być przygotowane z uwzględnieniem sześciokrotnej inkubacji z kodami kontroli z rozpuszczalnikiem, najwyższego stężenia estrogenu odniesienia, który służy również jako wskaźnik wiązania nieswoistego (NSB), oraz kontroli z buforem, a także biorąc pod uwagę potrójne inkubacje z kodami dla każdego z ośmiu

stężeń kontroli bez wiązań (oktylotrietoksylan), siedem niższych stężeń estrogenu odniesienia, osiem poziomów dawek stężeń substancji słabo wiążącej oraz osiem stężeń każdej badanej substancji chemicznej (TC). Przykładowy wykres rozkładu płytki dla pełnych krzywych stężeń dla estrogenu odniesienia i kontroli podano w tabeli 4 poniżej. Dodatkowe mikropłytki wykorzystuje się dla badanych substancji chemicznych i powinny one zawierać kontrole płytek, tj. 1) wysokie (maksymalne przemieszczenie) i średnie (około  $IC_{50}$ ) stężenie każdego z E2 oraz substancji słabo wiążącej w trzech powtórzeniach; 2) kontrolę z rozpuszczalnikiem i wiązanie nieswoiste, każde w sześciu powtórzeniach (tabela 5). Przykład arkusza roboczego rozkładu mikropłytki testowej, wykorzystującego trzy nieznane badane substancje chemiczne, znajduje się w dodatku 2.3. Stężenia wskazane w tabelach 4 i 5 są stężeniami końcowymi testu. Maksymalne stężenie dla E2 powinno wynosić  $1 \times 10^{-7}$  M, a dla substancji słabo wiążącej należy stosować najwyższe stężenie dla substancji słabo wiążącej na płytce 1. Stężenie  $IC_{50}$  musi być określone przez laboratorium na podstawie jego bazy danych historycznych dotyczących kontroli. Oczekuje się, że wartość ta będzie podobna do wartości zaobserwowanej w badaniach walidacyjnych (zob. tabela 1).

**Tabela 4:** Rozkład na mikropłytkce testowej wiązania konkurencyjnego, pełne krzywe stężeń dla estrogenu odniesienia i próby kontrolne (płytki 1).

|          | 1                            | 2 | 3 | 4                            | 5 | 6 | 7                           | 8 | 9 | 10                           | 11 | 12 |
|----------|------------------------------|---|---|------------------------------|---|---|-----------------------------|---|---|------------------------------|----|----|
| <b>A</b> | TB (tylko rozpuszczalnik)    |   |   | TB (tylko rozpuszczalnik)    |   |   | 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 ( $1 \times 10^{-11}$ )  |   |   | Próba ślepa*                 |    |    |
| <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> | Próba ślepa (dla gorących)** |   |   | Próba ślepa (dla gorących)** |   |   | Kontrola z buforem          |   |   | Kontrola z buforem           |    |    |

W tym przykładzie substancją słabo wiążącą jest noretynodrel (NE)

\* prawdziwa próba ślepa, bez wykorzystania dołka;

\*\* próba ślepa niestosowana podczas inkubacji, ale stosowana w celu potwierdzenia całkowitej dodanej radioaktywności.

**Tabela 5:** Rozkład na mikropłytkce testowej wiązania konkurencyjnego, pełne krzywe stężeń dla badanych substancji chemicznych i kontrole na płytce.

|          | 1                          | 2 | 3 | 4                          | 5 | 6 | 7                          | 8 | 9 | 10                         | 11 | 12 |
|----------|----------------------------|---|---|----------------------------|---|---|----------------------------|---|---|----------------------------|----|----|
| <b>A</b> | TB (tylko rozpuszczalnik)  |   |   | TB (tylko rozpuszczalnik)  |   |   | NSB                        |   |   | NSB                        |    |    |
| <b>B</b> | TC1 ( $1 \times 10^{-3}$ ) |   |   | TC1 ( $1 \times 10^{-4}$ ) |   |   | TC1 ( $1 \times 10^{-5}$ ) |   |   | TC1 ( $1 \times 10^{-6}$ ) |    |    |

|          |                            |                             |                            |                             |
|----------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| <b>C</b> | TC1 ( $1 \times 10^{-7}$ ) | TC1 ( $1 \times 10^{-8}$ )  | TC1 ( $1 \times 10^{-9}$ ) | TC1 ( $1 \times 10^{-10}$ ) |
| <b>D</b> | TC2 ( $1 \times 10^{-3}$ ) | TC2 ( $1 \times 10^{-4}$ )  | TC2 ( $1 \times 10^{-5}$ ) | TC2 ( $1 \times 10^{-6}$ )  |
| <b>E</b> | TC2 ( $1 \times 10^{-7}$ ) | TC2 ( $1 \times 10^{-8}$ )  | TC2 ( $1 \times 10^{-9}$ ) | TC2 ( $1 \times 10^{-10}$ ) |
| <b>F</b> | TC3 ( $1 \times 10^{-3}$ ) | TC3 ( $1 \times 10^{-4}$ )  | TC3 ( $1 \times 10^{-5}$ ) | TC3 ( $1 \times 10^{-6}$ )  |
| <b>G</b> | TC3 ( $1 \times 10^{-7}$ ) | TC3 ( $1 \times 10^{-8}$ )  | TC3 ( $1 \times 10^{-9}$ ) | TC3 ( $1 \times 10^{-10}$ ) |
| <b>H</b> | NE (IC <sub>50</sub> )     | NE ( $1 \times 10^{-4,5}$ ) | E2 (IC <sub>50</sub> )     | E2 ( $1 \times 10^{-7}$ )   |

W tym przykładzie substancją słabo wiążącą jest noretynodrel (NE)

### *Zakończenie testu wiązania konkurencyjnego*

38. Jak pokazano w tabeli 6, do dołków należy dodać 80  $\mu$ l kontroli z rozpuszczalnikami, kontroli z buforem, estrogenu odniesienia, substancji słabo wiążącej, substancji innej niż substancja wiążąca i badanych substancji chemicznych przygotowanych w buforze testowym. Następnie do każdego dołka należy dodać 40  $\mu$ l roztworu 4 nM [ $^3$ H]-17 $\beta$ -estradiolu. Po łagodnej rotacji przez 10–15 minut w temperaturze od 2–8 °C należy dodać 40  $\mu$ l roztworu hrER $\alpha$ . Mikropłytki testowe należy inkubować w temperaturze 2–8 °C przez 16–20 godzin i umieścić na rotatorze podczas okresu inkubacji.

**Tabela 6:** Objętość elementów testu w odniesieniu do testu wiązania konkurencyjnego hrER, mikropłytki

| Objętość ( $\mu$ l) | Składnik                                                                                                       |
|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 80                  | Nieoznakowany 17 $\beta$ -estradiol, noretynodrel, OTES, badane substancje chemiczne, rozpuszczalnik lub bufor |
| 40                  | Roztwór 4 nM [ $^3$ H]-17 $\beta$ -estradiolu                                                                  |
| 40                  | Roztwór hrER $\alpha$ , stężenie takie, jak określono                                                          |
| <b>160</b>          | <b><i>Całkowita objętość w każdym dołku testowym</i></b>                                                       |

39. Oznaczenie ilościowe [ $^3$ H]-17 $\beta$ -estradiolu związanego z hrER $\alpha$  po oddzieleniu [ $^3$ H]-17 $\beta$ -estradiolu związanego z hrER $\alpha$  od wolnego [ $^3$ H]-17 $\beta$ -estradiolu poprzez dodanie 80  $\mu$ l zimnej zawiesiny DCC do każdego dołka należy następnie przeprowadzić jak opisano w pkt 20–23 w odniesieniu do testu wiązania nasycenia.
40. Dołki H1-6 (oznaczone w tabeli 4 jako próby ślepe (dla gorących)) reprezentują DPM estradiolu oznakowanego [ $^3$ H] w 40  $\mu$ l. Podwielokrotność 40  $\mu$ l należy wprowadzić bezpośrednio do płynu scyntylicyjnego w dołkach H1–H6.

### **Kryteria dopuszczalności**

#### *Test wiązania nasycenia*

41. Krzywa wiązania specyficznego powinna osiągnąć stan równowagi, ponieważ zastosowano zwiększające się stężenia [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -estradiolu, wskazujące na nasycenie hrER $\alpha$  ligandem.
42. Wiązanie specyficzne przy 1 nM [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -estradiolu powinno mieścić się w dopuszczalnym zakresie od 15 % do 25 % średniej zmierzonej całkowitej radioaktywności dodanej we wszystkich seriach badawczych. Sporadyczne niewielkie odchylenia poza ten zakres są dopuszczalne, ale jeśli wyniki serii badawczych systematycznie nie mieszczą się w tym zakresie lub wynik danej serii badawczej wychodzi znacznie poza ten zakres, należy dostosować stężenie białka i powtórzyć test nasycenia.
43. Dane powinny tworzyć liniowy wykres Scatcharda.
44. Wiązania nieswoiste nie powinny być nadmierne. Wartość dla wiązań nieswoistych powinna zazwyczaj wynosić < 35 % wiązań całkowitych. Stosunek ten może jednak sporadycznie przekraczać tę granicę przy pomiarze bardzo niskich DPM dla najniższego stężenia badanego 17 $\beta$ -estradiolu znakowanego izotopem.

*Test wiązania konkurencyjnego*

45. Zwiększające się stężenia nieoznakowanego 17 $\beta$ -estradiolu powinny wyprzeć [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -estradiol z receptora w sposób zgodny z jednoobszarowym wiązaniem konkurencyjnym.
46. Wartość IC<sub>50</sub> dla estrogenu odniesienia (tj. 17 $\beta$ -estradiolu) powinna być w przybliżeniu równa stężeniu molowemu [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -estradiolu powiększonemu o K<sub>d</sub> oznaczony w teście wiązania nasycenia.
47. Całkowite wiązanie specyficzne powinno być spójne w dopuszczalnym zakresie 20  $\pm$  5 %, gdy średnie zmierzone stężenie całkowitej radioaktywności dodanej do każdego dołka wynosi 1 nM we wszystkich seriach badawczych. Sporadyczne niewielkie odchylenia poza ten zakres są dopuszczalne, ale jeśli wyniki serii badawczych systematycznie nie mieszczą się w tym zakresie lub wynik danej serii badawczej wychodzi znacznie poza ten zakres, należy dostosować stężenie białka.
48. Rozpuszczalnik nie powinien powodować zmiany czułości ani odtwarzalności testu. Wyniki kontroli z rozpuszczalnikiem (dołki z wiązaniem całkowitym) porównuje się z wynikami kontroli z buforem w celu sprawdzenia, czy zastosowany rozpuszczalnik nie ma wpływu na system testu. Wyniki kontroli wiązania całkowitego i kontroli z buforem powinny być porównywalne, jeżeli rozpuszczalnik nie wpływa na test.
49. Substancja inna niż substancja wiążąca nie powinna wypierać więcej niż 25 % [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -estradiolu z hrER $\alpha$  podczas badania do 10<sup>-3</sup> M (OTES) lub 10<sup>-4</sup> M (DBP).
50. Opracowano kryteria efektywności dla estrogenu odniesienia i dwóch substancji słabo wiążących (np. noretynodrel, noretyndron) z wykorzystaniem danych z badania walidacyjnego testu wiązania hrER Freybergera–Wilsona (załącznik N do 2 pozycji bibliografii). 95 % przedziały ufności podano w odniesieniu do średniej (n)  $\pm$  SD dla



wszystkich serii badawczych kontroli wykonanych w laboratoriach uczestniczących w badaniu walidacyjnym. 95 % przedziały ufności obliczono dla parametrów dopasowania krzywej (tj. najwyższa wartość, najniższa wartość, krzywa Hilla, logarytm  $IC_{50}$ ) dla estrogenu odniesienia i substancji słabo wiążących oraz dla  $\log_{10}RBA$  substancji słabo wiążących w stosunku do estrogena odniesienia i są one dostarczane jako kryteria efektywności dla kontroli dodatknych. W tabeli 1 przedstawiono oczekiwane zakresy parametrów dopasowania krzywej, które mogą być wykorzystane jako kryteria efektywności. W praktyce zakres  $IC_{50}$  może się nieznacznie różnić w zależności od  $K_d$  preparatu receptora i stężenia ligandu.

51. Nie opracowano kryteriów efektywności w odniesieniu do parametrów dopasowania krzywej dla badanych substancji chemicznych ze względu na szeroki wachlarz istniejących potencjalnych badanych substancji chemicznych i zmienność potencjalnych powinowactw i wyników (np. pełna krzywa, krzywa częściowa, brak dopasowania krzywej). Dokonując przeglądu wyników z każdej serii badawczej badanej substancji chemicznej, należy jednak przyjąć profesjonalny osąd. Należy zastosować wystarczający zakres stężeń badanej substancji chemicznej, aby wyraźnie określić najwyższą wartość (np. 90–100 % wiązania) konkurencyjnej krzywej. Zmienność wśród kontrprób przy każdym stężeniu badanej substancji chemicznej, jak również wśród 3 niejednoczesnych serii badawczych powinna być uzasadniona i poparta naukowo. Kontrole z każdej serii badawczej badanej substancji chemicznej powinny zbliżać się do miar efektywności zgłoszonych dla tego testu Freybergera–Wilsona i powinny być spójne z danymi historycznymi dotyczącymi kontroli z każdego odpowiedniego laboratorium.

## ANALIZA DANYCH

### Test wiązania nasycenia

52. Dokonuje się pomiaru zarówno wiązania całkowitego, jak i nieswoistego. W przypadku tych wartości wiązanie swoiste wzrastających stężeń  $[^3H]$ -17 $\beta$ -estradiolu w warunkach równowagi jest obliczane przez odjęcie wiązania nieswoistego od całkowitego. Wykres stężenia wiązań specyficznych w porównaniu ze stężeniem  $[^3H]$ -17 $\beta$ -estradiolu powinien osiągnąć plateau dla maksymalnego wiązania specyficznego wskazującego na nasycenie hrER $\alpha$   $[^3H]$ -17 $\beta$ -estradiolem. Ponadto analiza danych powinna dokumentować wiązanie estradiolu  $[^3H]$ -17 $\beta$ -estradiolu z pojedynczym obszarem wiązania o wysokim powinowactwie. Wiązanie nieswoiste, całkowite i swoiste powinno być prezentowane na krzywej wiązania nasycenia. W dalszej analizie tych danych należy wykorzystać analizę regresji nieliniowej (np. BioSoft; McPherson 1985; Motulsky 1995) z końcowym prezentowaniem danych w formie wykresu Scatcharda.
53. W analizie danych należy określić  $B_{max}$  i  $K_d$  wyłącznie na podstawie danych dotyczących wiązania całkowitego, przy założeniu, że wiązanie niespecyficzne jest liniowe, chyba że podano uzasadnienie dla zastosowania innej metody. Ponadto przy określaniu najlepszego

dopasowania należy stosować regresję odpornościową, chyba że zostanie podane uzasadnienie. Należy podać metodę wybraną dla regresji odpornościowej. Korektę obniżenia stężenia ligandu (np. przy użyciu metody na podstawie Swillens 1995) należy zawsze stosować przy określaniu Bmax i Kd na podstawie danych dotyczących wiązania nasycenia.

### **Test wiązania konkurencyjnego**

54. Krzywa wiązania konkurencyjnego jest wykreślona jako krzywa wiązania specyficznego [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -estradiolu w stosunku do stężenia (log10 jednostek) konkurenta. Stężenie badanej substancji chemicznej, która hamuje 50 % maksymalnego wiązania specyficznego [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -estradiolu, jest wartością IC<sub>50</sub>.
55. Szacunki wartości logarytmu (IC<sub>50</sub>) dla kontroli dodatnich (np. estrogen odniesienia i substancja słabo wiążąca) należy określić, wykorzystując właściwe oprogramowanie dopasowane do krzywej nieliniowej, aby pasowały do równania Hilla o czterech parametrach (np. BioSoft; McPherson 1985; Motulsky 1995). Najwyższą wartość, najniższą wartość, krzywą Hilla i logarytm IC<sub>50</sub> należy zasadniczo pozostawić bez ograniczeń przy dopasowywaniu tych krzywych. Regresję odpornościową należy stosować przy określaniu najlepszego dopasowania, chyba że podane zostanie uzasadnienie. Nie należy stosować korekty obniżenia stężenia ligandu. Po przeprowadzeniu analizy wstępnej każda krzywa wiązania powinna zostać poddana przeglądowi w celu zapewnienia odpowiedniego dopasowania do modelu. Względne powinowactwo wiązania (RBA) w odniesieniu do substancji słabo wiążącej należy obliczać jako procent logarytmu (IC<sub>50</sub>) dla substancji słabo wiążącej względem logarytmu (IC<sub>50</sub>) dla 17 $\beta$ -estradiolu. Wyniki kontroli dodatnich i kontroli substancji innych niż substancja wiążąca powinny być oceniane przy użyciu pomiarów efektywności testu określonych w pkt 45–50 niniejszego dodatku 2.
56. Dane dotyczące wszystkich badanych substancji chemicznych należy analizować na zasadzie stopniowego podejścia, aby zapewnić odpowiednią analizę danych i właściwą klasyfikację każdej krzywej wiązania konkurencyjnego. Zaleca się, aby każda seria badawcza w odniesieniu do badanej substancji chemicznej została wstępnie poddana znormalizowanej analizie danych, która jest identyczna z analizą stosowaną w przypadku kontroli estrogenu odniesienia i substancji słabo wiążącej (zob. pkt 55 powyżej). Po zakończeniu należy przeprowadzić przegląd techniczny parametrów dopasowania krzywej, jak również wizualny przegląd stopnia, w jakim dane pasują do wygenerowanej krzywej wiązania konkurencyjnego dla każdej serii badawczej. W trakcie tego przeglądu technicznego obserwacje zależnego od stężenia spadku w procentach związanego specyficznego [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -estradiolu, małej zmienności pomiędzy kontrpróbami technicznymi przy każdym stężeniu chemicznym oraz spójności parametrów dopasowania pomiędzy trzema seriami badawczymi stanowią dobrą wskazówkę, że test i analizy danych zostały wykonane prawidłowo.

### **Interpretacja danych**

57. O ile spełnione są wszystkie kryteria dopuszczalności, badaną substancję chemiczną uważa się za substancję wiążącą w odniesieniu do hrER $\alpha$ , jeżeli krzywa wiązania może być dopasowana, a najniższy punkt na krzywej reakcji w zakresie danych wynosi mniej niż 50 % (rysunek 1).

58. O ile spełnione są wszystkie kryteria dopuszczalności, badaną substancję chemiczną uważa się za substancję inną niż substancja wiążąca w odniesieniu do hrER $\alpha$ , jeśli:

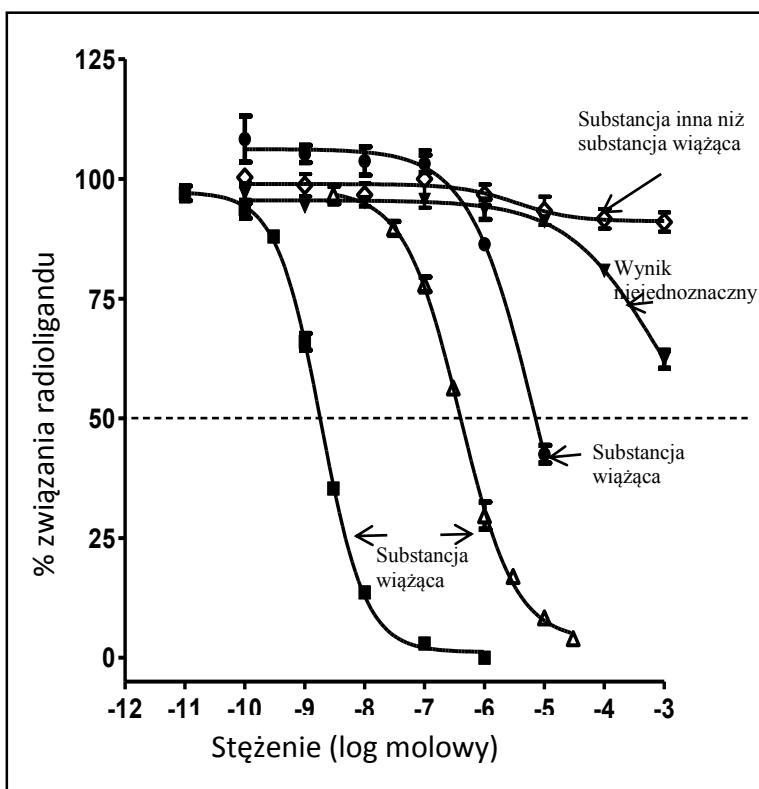
- krzywa wiązania może być dopasowana, a najniższy punkt na dopasowanej krzywej reakcji w zakresie danych wynosi powyżej 75 %, lub
- krzywa wiązania nie może być dopasowana, a najniższy niewygładzony średni procent wiązania wśród grup stężeń w danych wynosi powyżej 75 %.

59. Badane substancje chemiczne uważa się za niejednoznaczne, jeśli zostanie spełniony żaden z powyższych warunków (np. najniższy punkt na dopasowanej krzywej reakcji mieści się pomiędzy 76 a 51 %).

**Tabela 7:** Kryteria przypisywania klasyfikacji na podstawie krzywej wiązania konkurencyjnego w odniesieniu do badanej substancji chemicznej.

| Klasyfikacja                                        | Kryteria                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|-----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Substancja wiążąca <sup>a</sup>                     | Krzywa wiązania może być dopasowana.<br><b>Najniższy punkt na krzywej reakcji w zakresie danych wynosi mniej niż 50 %.</b>                                                                                                                                                                                   |
| Substancja inna niż substancja wiążąca <sup>b</sup> | Jeżeli krzywa wiązania może być dopasowana,<br><b>najniższy punkt na dopasowanej krzywej reakcji w zakresie danych wynosi powyżej 75 %.</b><br><br>Jeżeli krzywa wiązania nie może być dopasowana,<br><b>najniższy niewygładzony średni odsetek wiązania wśród grup stężeń w danych wynosi powyżej 75 %.</b> |
| Wynik niejednoznaczny <sup>c</sup>                  | Każda sprawdzalna seria badawcza, która nie dotyczy substancji wiążącej, ani substancji innej niż substancja wiążąca<br>(np. najniższy punkt na dopasowanej krzywej reakcji mieści się w granicach 76–51 %).                                                                                                 |

**Rysunek 1:** Przykłady klasyfikacji badanej substancji chemicznej z wykorzystaniem krzywej wiązania konkurencyjnego.



60. Wielokrotne serie badawcze prowadzone w laboratorium w przypadku badanej substancji chemicznej są łączone poprzez przypisanie wartości liczbowych do każdej serii badawczej i uśrednienie wszystkich serii, jak pokazano w tabeli 8. Wyniki połączonych serii badawczych w każdym laboratorium są porównywane z oczekiwaną klasyfikacją każdej badanej substancji chemicznej.

**Tabela 8:** Metoda klasyfikacji badanej substancji chemicznej z wykorzystaniem wielu serii badawczych w laboratorium

| Przypisanie wartości do każdej serii badawczej:                               |                          |
|-------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| Klasyfikacja                                                                  | Wartość liczbową         |
| Substancja wiążąca                                                            | 2                        |
| Wynik niejednoznaczny                                                         | 1                        |
| Substancja inna niż substancja wiążąca                                        | 0                        |
| Klasyfikacja średniej wartości liczbowej w poszczególnych seriach badawczych: |                          |
| Klasyfikacja                                                                  | Wartość liczbową         |
| Substancja wiążąca                                                            | $\bar{S} \geq 1,5$       |
| Wynik niejednoznaczny                                                         | $0,5 \leq \bar{S} < 1,5$ |
| Substancja inna niż substancja wiążąca                                        | $\bar{S} < 0,5$          |

## SPRAWOZDANIE Z BADANIA

61. Zob. pkt 24 „ELEMENTÓW TESTU WIĄZANIA hrER” w niniejszej metodzie badawczej.

## Dodatek 2.1

### WYKAZ POJĘĆ

**[<sup>3</sup>H]E2:** 17β-estradiol znakowany izotopem z trytem

**DCC:** węgiel drzewny pokryty dekstranem

**E2:** nieoznakowany 17β-estradiol (obojętny)

**Bufor testowy:** 10 mM Tris, 10 mg albuminy surowicy bydlęcej /ml, 2 mM DTT, 10 % glicerol, 0,2 mM leupeptyny, pH 7,5

**hrERα:** ludzki rekombinowany receptor estrogenowy alfa (domena wiążąca ligand)

**Kontrpróba:** jeden z wielu dołków, które mają tę samą zawartość z tym samym stężeniem i są poddawane testowi jednocześnie w ramach jednej serii badawczej. W niniejszym protokole każde stężenie badanej substancji chemicznej jest badane w trzech powtórzeniach; oznacza to, że istnieją trzy kontrpróby, które są testowane jednocześnie przy każdym stężeniu badanej substancji chemicznej.

**Seria badawcza:** pełen zestaw poddawanych jednocześnie serii badawczej dołków mikropłytki, który dostarcza wszelkich informacji niezbędnych do scharakteryzowania wiązania badanej substancji chemicznej z hrERα (tj. całkowity [<sup>3</sup>H]-17β-estradiol dodany do dołka testowego, maksymalne wiązanie [<sup>3</sup>H]-17β-estradiolu z hrERα, wiązanie niespecyficzne, oraz wiązanie całkowite przy różnych stężeniach badanej substancji chemicznej). W serii badawczej można wykorzystać tylko jeden dołek (tj. kontrpróbę) na każde stężenie, ale ponieważ niniejszy protokół wymaga trzykrotnego przeprowadzania testu, w jednej analizie wykorzystuje się trzy dołki na każde stężenie. Niniejszy protokół wymaga ponadto przeprowadzenia trzech niezależnych (tj. nierównoczesnych) serii badawczych w odniesieniu do każdej substancji chemicznej.

## Dodatek 2.2

### TYPOWY TEST NASYCENIA $[^3\text{H}]$ -17 $\beta$ -ESTRADIOLU Z TRZEMA DOŁKAMI STANOWIĄCYMI KONTRPRÓBĘ

| Typowy test nasycenia $[^3\text{H}]$ -17 $\beta$ -estradiolu z trzema dołkami stanowiącymi kontrpróbę |            |                   |                                      |                                        |                                   |                                     |                                       |                                  |                                   |                                      |                              |  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|-------------------|--------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|------------------------------|--|
| Pozycja                                                                                               | Kontrpróba | Kod rodzaju dolka | Stężenie początkowe gorącego E2 (nM) | Objętość gorącego E2 ( $\mu\text{l}$ ) | Stężenie końcowe gorącego E2 (nM) | Stężenie początkowe zimnego E2 (nM) | Objętość zimnego E2 ( $\mu\text{l}$ ) | Stężenie końcowe zimnego E2 (nM) | Objętość buforu ( $\mu\text{l}$ ) | Objętość receptora ( $\mu\text{l}$ ) | Całkowita objętość w dołkach |  |
| 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                          |  |

Typowy test nasycenia [<sup>3</sup>H]-17β-estradolu z trzema dolkami stanowiącymi kontrolę

| Pozycja | Kontrola | Kod rodzaju dolka | Stężenie początkowe gorącego E2 (nM) | Objętość gorącego E2 (μl) | Stężenie końcowe gorącego E2 (nM) | Stężenie początkowe zimnego E2 (μM) | Objętość zimnego E2 (μl) | Stężenie końcowe zimnego E2 (μM) | Objętość buforu (μl) | Objętość receptora (μl) | Całkowita objętość w dolkach |
|---------|----------|-------------------|--------------------------------------|---------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|--------------------------|----------------------------------|----------------------|-------------------------|------------------------------|
| 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        | Gorąca            | 0,12                                 | 40                        | 0,03                              | —                                   | —                        | —                                | —                    | —                       | 40                           |
| G2      | 2        | Gorąca            | 0,12                                 | 40                        | 0,03                              | —                                   | —                        | —                                | —                    | —                       | 40                           |
| G3      | 3        | Gorąca            | 0,12                                 | 40                        | 0,03                              | —                                   | —                        | —                                | —                    | —                       | 40                           |
| G4      | 1        | Gorąca            | 0,24                                 | 40                        | 0,06                              | —                                   | —                        | —                                | —                    | —                       | 40                           |
| G5      | 2        | Gorąca            | 0,24                                 | 40                        | 0,06                              | —                                   | —                        | —                                | —                    | —                       | 40                           |
| G6      | 3        | Gorąca            | 0,24                                 | 40                        | 0,06                              | —                                   | —                        | —                                | —                    | —                       | 40                           |
| G7      | 1        | Gorąca            | 0,32                                 | 40                        | 0,08                              | —                                   | —                        | —                                | —                    | —                       | 40                           |
| G8      | 2        | Gorąca            | 0,32                                 | 40                        | 0,08                              | —                                   | —                        | —                                | —                    | —                       | 40                           |
| G9      | 3        | Gorąca            | 0,32                                 | 40                        | 0,08                              | —                                   | —                        | —                                | —                    | —                       | 40                           |
| G10     | 1        | Gorąca            | 0,40                                 | 40                        | 0,10                              | —                                   | —                        | —                                | —                    | —                       | 40                           |
| G11     | 2        | Gorąca            | 0,40                                 | 40                        | 0,10                              | —                                   | —                        | —                                | —                    | —                       | 40                           |
| G12     | 3        | Gorąca            | 0,40                                 | 40                        | 0,10                              | —                                   | —                        | —                                | —                    | —                       | 40                           |
| H1      | 1        | Gorąca            | 1,20                                 | 40                        | 0,30                              | —                                   | —                        | —                                | —                    | —                       | 40                           |
| H2      | 2        | Gorąca            | 1,20                                 | 40                        | 0,30                              | —                                   | —                        | —                                | —                    | —                       | 40                           |
| H3      | 3        | Gorąca            | 1,20                                 | 40                        | 0,30                              | —                                   | —                        | —                                | —                    | —                       | 40                           |
| H4      | 1        | Gorąca            | 2,40                                 | 40                        | 0,60                              | —                                   | —                        | —                                | —                    | —                       | 40                           |
| H5      | 2        | Gorąca            | 2,40                                 | 40                        | 0,60                              | —                                   | —                        | —                                | —                    | —                       | 40                           |
| H6      | 3        | Gorąca            | 2,40                                 | 40                        | 0,60                              | —                                   | —                        | —                                | —                    | —                       | 40                           |
| H7      | 1        | Gorąca            | 4,00                                 | 40                        | 1,00                              | —                                   | —                        | —                                | —                    | —                       | 40                           |
| H8      | 2        | Gorąca            | 4,00                                 | 40                        | 1,00                              | —                                   | —                        | —                                | —                    | —                       | 40                           |
| H9      | 3        | Gorąca            | 4,00                                 | 40                        | 1,00                              | —                                   | —                        | —                                | —                    | —                       | 40                           |
| H10     | 1        | Gorąca            | 12,00                                | 40                        | 3,00                              | —                                   | —                        | —                                | —                    | —                       | 40                           |
| H11     | 2        | Gorąca            | 12,00                                | 40                        | 3,00                              | —                                   | —                        | —                                | —                    | —                       | 40                           |
| H12     | 3        | Gorąca            | 12,00                                | 40                        | 3,00                              | —                                   | —                        | —                                | —                    | —                       | 40                           |

Należy pamiętać, że „gorące” dolki są puste podczas inkubacji. 40 μl dodaje się tylko w celu zliczania scyntytacji.



### Dodatek 2.3 Rozkład dolków w teście wiązania konkurencyjnego

| Płytki | Pozycja | Kontrpróba | Rodzaj dolka       | Kod dolka | Kod stężenia | Stężenie początkowe konkurenta (M) | Koźtwor podstawowy hrER (μl) | Objętość buforu (μl) | Objętość znacznika (μl) | Objętość z płytki do rozcieńczeń (μl) | Ostateczna objętość (μl) | Stężenie końcowe konkurenta (M) |
|--------|---------|------------|--------------------|-----------|--------------|------------------------------------|------------------------------|----------------------|-------------------------|---------------------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| S      | A1      | 1          | wiązanie całkowite | TB        | TB1          | -                                  | 40                           |                      | 40                      | 80                                    | 160                      | -                               |
| S      | A2      | 2          | wiązanie całkowite | TB        | TB2          | -                                  | 40                           |                      | 40                      | 80                                    | 160                      | -                               |
| S      | A3      | 3          | wiązanie całkowite | TB        | TB3          | -                                  | 40                           |                      | 40                      | 80                                    | 160                      | -                               |
| S      | A4      | 1          | wiązanie całkowite | TB        | TB4          | -                                  | 40                           |                      | 40                      | 80                                    | 160                      | -                               |
| S      | A5      | 2          | wiązanie całkowite | TB        | TB5          | -                                  | 40                           |                      | 40                      | 80                                    | 160                      | -                               |
| S      | A6      | 3          | wiązanie całkowite | TB        | TB6          | -                                  | 40                           |                      | 40                      | 80                                    | 160                      | -                               |
| S      | A7      | 1          | zimne E2           | NSB       | S0           | 2,00E-06                           | 40                           | -                    | 40                      | 80                                    | 160                      | 1,0E-06                         |
| S      | A8      | 2          | zimne E2           | NSB       | S0           | 2,00E-06                           | 40                           | -                    | 40                      | 80                                    | 160                      | 1,0E-06                         |
| S      | A9      | 3          | zimne E2           | NSB       | S0           | 2,00E-06                           | 40                           | -                    | 40                      | 80                                    | 160                      | 1,0E-06                         |
| S      | A10     | 1          | zimne E2           | NSB       | S0           | 2,00E-06                           | 40                           | -                    | 40                      | 80                                    | 160                      | 1,0E-06                         |
| S      | A11     | 2          | zimne E2           | NSB       | S0           | 2,00E-06                           | 40                           | -                    | 40                      | 80                                    | 160                      | 1,0E-06                         |
| S      | A12     | 3          | zimne E2           | NSB       | S0           | 2,00E-06                           | 40                           | -                    | 40                      | 80                                    | 160                      | 1,0E-06                         |
| S      | B1      | 1          | zimne E2           | S         | S1           | 2,00E-07                           | 40                           | -                    | 40                      | 80                                    | 160                      | 1,0E-07                         |
| S      | B2      | 2          | zimne E2           | S         | S1           | 2,00E-07                           | 40                           | -                    | 40                      | 80                                    | 160                      | 1,0E-07                         |
| S      | B3      | 3          | zimne E2           | S         | S1           | 2,00E-07                           | 40                           | -                    | 40                      | 80                                    | 160                      | 1,0E-07                         |
| S      | B4      | 1          | zimne E2           | S         | S2           | 2,00E-08                           | 40                           | -                    | 40                      | 80                                    | 160                      | 1,0E-08                         |
| S      | B5      | 2          | zimne E2           | S         | S2           | 2,00E-08                           | 40                           | -                    | 40                      | 80                                    | 160                      | 1,0E-08                         |
| S      | B6      | 3          | zimne E2           | S         | S2           | 2,00E-08                           | 40                           | -                    | 40                      | 80                                    | 160                      | 1,0E-08                         |
| S      | B7      | 1          | zimne E2           | S         | S3           | 6,00E-09                           | 40                           | -                    | 40                      | 80                                    | 160                      | 3,0E-09                         |
| S      | B8      | 2          | zimne E2           | S         | S3           | 6,00E-09                           | 40                           | -                    | 40                      | 80                                    | 160                      | 3,0E-09                         |
| S      | B9      | 3          | zimne E2           | S         | S3           | 6,00E-09                           | 40                           | -                    | 40                      | 80                                    | 160                      | 3,0E-09                         |
| S      | B10     | 1          | zimne E2           | S         | S4           | 2,00E-09                           | 40                           | -                    | 40                      | 80                                    | 160                      | 1,0E-09                         |
| S      | B11     | 2          | zimne E2           | S         | S4           | 2,00E-09                           | 40                           | -                    | 40                      | 80                                    | 160                      | 1,0E-09                         |
| S      | B12     | 3          | zimne E2           | S         | S4           | 2,00E-09                           | 40                           | -                    | 40                      | 80                                    | 160                      | 1,0E-09                         |
| S      | C1      | 1          | zimne E2           | S         | S5           | 6,00E-10                           | 40                           | -                    | 40                      | 80                                    | 160                      | 3,0E-10                         |
| S      | C2      | 2          | zimne E2           | S         | S5           | 6,00E-10                           | 40                           | -                    | 40                      | 80                                    | 160                      | 3,0E-10                         |
| S      | C3      | 3          | zimne E2           | S         | S5           | 6,00E-10                           | 40                           | -                    | 40                      | 80                                    | 160                      | 3,0E-10                         |
| S      | C4      | 1          | zimne E2           | S         | S6           | 2,00E-10                           | 40                           | -                    | 40                      | 80                                    | 160                      | 1,0E-10                         |
| S      | C5      | 2          | zimne E2           | S         | S6           | 2,00E-10                           | 40                           | -                    | 40                      | 80                                    | 160                      | 1,0E-10                         |
| S      | C6      | 3          | zimne E2           | S         | S6           | 2,00E-10                           | 40                           | -                    | 40                      | 80                                    | 160                      | 1,0E-10                         |
| S      | C7      | 1          | zimne E2           | S         | S7           | 2,00E-11                           | 40                           | -                    | 40                      | 80                                    | 160                      | 1,0E-11                         |
| S      | C8      | 2          | zimne E2           | S         | S7           | 2,00E-11                           | 40                           | -                    | 40                      | 80                                    | 160                      | 1,0E-11                         |
| S      | C9      | 3          | zimne E2           | S         | S7           | 2,00E-11                           | 40                           | -                    | 40                      | 80                                    | 160                      | 1,0E-11                         |
| S      | C10     | 1          | ślepa próba        | ślepa     | B1           | -                                  | -                            | 160                  | -                       | -                                     | 160                      | -                               |
| S      | C11     | 2          | ślepa próba        | ślepa     | B2           | -                                  | -                            | 160                  | -                       | -                                     | 160                      | -                               |
| S      | C12     | 3          | ślepa próba        | ślepa     | B3           | -                                  | -                            | 160                  | -                       | -                                     | 160                      | -                               |
| S      | D1      | 1          | noretynodrel       | NE        | WP1          | 6,00E-05                           | 40                           | -                    | 40                      | 80                                    | 160                      | 3,0E-05                         |
| S      | D2      | 1          | noretynodrel       | NE        | WP1          | 6,00E-05                           | 40                           | -                    | 40                      | 80                                    | 160                      | 3,0E-05                         |
| S      | D3      | 1          | noretynodrel       | NE        | WP1          | 6,00E-05                           | 40                           | -                    | 40                      | 80                                    | 160                      | 3,0E-05                         |
| S      | D4      | 1          | noretynodrel       | NE        | WP2          | 2,00E-05                           | 40                           | -                    | 40                      | 80                                    | 160                      | 1,0E-05                         |
| S      | D5      | 1          | noretynodrel       | NE        | WP2          | 2,00E-05                           | 40                           | -                    | 40                      | 80                                    | 160                      | 1,0E-05                         |
| S      | D6      | 1          | noretynodrel       | NE        | WP2          | 2,00E-05                           | 40                           | -                    | 40                      | 80                                    | 160                      | 1,0E-05                         |
| S      | D7      | 1          | noretynodrel       | NE        | WP3          | 6,00E-06                           | 40                           | -                    | 40                      | 80                                    | 160                      | 3,0E-06                         |
| S      | D8      | 1          | noretynodrel       | NE        | WP3          | 6,00E-06                           | 40                           | -                    | 40                      | 80                                    | 160                      | 3,0E-06                         |
| S      | D9      | 1          | noretynodrel       | NE        | WP3          | 6,00E-06                           | 40                           | -                    | 40                      | 80                                    | 160                      | 3,0E-06                         |
| S      | D10     | 1          | noretynodrel       | NE        | WP4          | 2,00E-06                           | 40                           | -                    | 40                      | 80                                    | 160                      | 1,0E-06                         |
| S      | D11     | 1          | noretynodrel       | NE        | WP4          | 2,00E-06                           | 40                           | -                    | 40                      | 80                                    | 160                      | 1,0E-06                         |
| S      | D12     | 1          | noretynodrel       | NE        | WP4          | 2,00E-06                           | 40                           | -                    | 40                      | 80                                    | 160                      | 1,0E-06                         |

| Rozkład dołków w teście wiązania konkurencyjnego |         |          |                    |           |              |                                    |                  |                      |                                     |                                       |                          |                                 |
|--------------------------------------------------|---------|----------|--------------------|-----------|--------------|------------------------------------|------------------|----------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| Płytki                                           | Pozycja | Kontrole | Rodzaj dołka       | Kod dołka | Kod stężenia | Stężenie początkowe konkurenta (M) | podstawowy hr-ER | Objętość buforu (μl) | Objętość znacznika (gorąca E2) (μl) | Objętość z płytki do rozcieńczeń (μl) | Ostateczna objętość (μl) | Stężenie końcowe konkurenta (M) |
| S                                                | E1      | 1        | noretynodrel       | NE        | WP           | 6,00E-07-                          | 40               |                      | 40                                  | 80                                    | 160                      | 3,0E-07                         |
| S                                                | E2      | 2        | noretynodrel       | NE        | WP           | 6,00E-07-                          | 40               |                      | 40                                  | 80                                    | 160                      | 3,0E-07                         |
| S                                                | E3      | 3        | noretynodrel       | NE        | WP           | 6,00E-07-                          | 40               |                      | 40                                  | 80                                    | 160                      | 3,0E-07                         |
| S                                                | E4      | 1        | noretynodrel       | NE        | WP           | 2,00E-07-                          | 40               |                      | 40                                  | 80                                    | 160                      | 1,0E-07                         |
| S                                                | E5      | 2        | noretynodrel       | NE        | WP           | 2,00E-07-                          | 40               |                      | 40                                  | 80                                    | 160                      | 1,0E-07                         |
| S                                                | E6      | 3        | noretynodrel       | NE        | WP           | 2,00E-07-                          | 40               |                      | 40                                  | 80                                    | 160                      | 1,0E-07                         |
| S                                                | E7      | 1        | noretynodrel       | NE        | WP           | 6,00E-08-                          | 40               | -                    | 40                                  | 80                                    | 160                      | 3,0E-08                         |
| S                                                | E8      | 2        | noretynodrel       | NE        | WP           | 6,00E-08-                          | 40               | -                    | 40                                  | 80                                    | 160                      | 3,0E-08                         |
| S                                                | E9      | 3        | noretynodrel       | NE        | WP           | 6,00E-08-                          | 40               | -                    | 40                                  | 80                                    | 160                      | 3,0E-08                         |
| S                                                | E10     | 1        | noretynodrel       | NE        | WP           | 6,00E-09-                          | 40               | -                    | 40                                  | 80                                    | 160                      | 3,0E-09                         |
| S                                                | E11     | 2        | noretynodrel       | NE        | WP           | 6,00E-09-                          | 40               | -                    | 40                                  | 80                                    | 160                      | 3,0E-09                         |
| S                                                | E12     | 3        | noretynodrel       | NE        | WP           | 6,00E-09-                          | 40               | -                    | 40                                  | 80                                    | 160                      | 3,0E-09                         |
| S                                                | F1      | 1        | OTES               | N         | OTES         | 2,00E-03                           | 40               | -                    | 40                                  | 80                                    | 160                      | 1,0E-03                         |
| S                                                | F2      | 2        | OTES               | N         | OTES         | 2,00E-03                           | 40               | -                    | 40                                  | 80                                    | 160                      | 1,0E-03                         |
| S                                                | F3      | 3        | OTES               | N         | OTES         | 2,00E-03                           | 40               | -                    | 40                                  | 80                                    | 160                      | 1,0E-03                         |
| S                                                | F4      | 1        | OTES               | N         | OTES         | 2,00E-04                           | 40               | -                    | 40                                  | 80                                    | 160                      | 1,0E-04                         |
| S                                                | F5      | 2        | OTES               | N         | OTES         | 2,00E-04                           | 40               | -                    | 40                                  | 80                                    | 160                      | 1,0E-04                         |
| S                                                | F6      | 3        | OTES               | N         | OTES         | 2,00E-04                           | 40               | -                    | 40                                  | 80                                    | 160                      | 1,0E-04                         |
| S                                                | F7      | 1        | OTES               | N         | OTES         | 2,00E-05                           | 40               | -                    | 40                                  | 80                                    | 160                      | 3,0E-05                         |
| S                                                | F8      | 2        | OTES               | N         | OTES         | 2,00E-05                           | 40               | -                    | 40                                  | 80                                    | 160                      | 3,0E-05                         |
| S                                                | F9      | 3        | OTES               | N         | OTES         | 2,00E-05                           | 40               | -                    | 40                                  | 80                                    | 160                      | 3,0E-05                         |
| S                                                | F10     | 1        | OTES               | N         | OTES         | 2,00E-06                           | 40               | -                    | 40                                  | 80                                    | 160                      | 1,0E-06                         |
| S                                                | F11     | 2        | OTES               | N         | OTES         | 2,00E-06                           | 40               | -                    | 40                                  | 80                                    | 160                      | 1,0E-06                         |
| S                                                | F12     | 3        | OTES               | N         | OTES         | 2,00E-06                           | 40               | -                    | 40                                  | 80                                    | 160                      | 1,0E-06                         |
| S                                                | G1      | 1        | OTES               | N         | OTES         | 2,00E-07                           | 40               | -                    | 40                                  | 80                                    | 160                      | 3,0E-07                         |
| S                                                | G2      | 2        | OTES               | N         | OTES         | 2,00E-07                           | 40               | -                    | 40                                  | 80                                    | 160                      | 3,0E-07                         |
| S                                                | G3      | 3        | OTES               | N         | OTES         | 2,00E-07                           | 40               | -                    | 40                                  | 80                                    | 160                      | 3,0E-07                         |
| S                                                | G4      | 1        | OTES               | N         | OTES         | 2,00E-08                           | 40               | -                    | 40                                  | 80                                    | 160                      | 1,0E-08                         |
| S                                                | G5      | 2        | OTES               | N         | OTES         | 2,00E-08                           | 40               | -                    | 40                                  | 80                                    | 160                      | 1,0E-08                         |
| S                                                | G6      | 3        | OTES               | N         | OTES         | 2,00E-08                           | 40               | -                    | 40                                  | 80                                    | 160                      | 1,0E-08                         |
| S                                                | G7      | 1        | OTES               | N         | OTES         | 2,00E-09                           | 40               | -                    | 40                                  | 80                                    | 160                      | 1,0E-09                         |
| S                                                | G8      | 2        | OTES               | N         | OTES         | 2,00E-09                           | 40               | -                    | 40                                  | 80                                    | 160                      | 1,0E-09                         |
| S                                                | G9      | 3        | OTES               | N         | OTES         | 2,00E-09                           | 40               | -                    | 40                                  | 80                                    | 160                      | 1,0E-09                         |
| S                                                | G10     | 1        | OTES               | N         | OTES         | 2,00E-10                           | 40               | -                    | 40                                  | -                                     | 160                      | 1,0E-10                         |
| S                                                | G11     | 2        | OTES               | N         | OTES         | 2,00E-10                           | 40               | -                    | 40                                  | -                                     | 160                      | 1,0E-10                         |
| S                                                | G12     | 3        | OTES               | N         | OTES         | 2,00E-10                           | 40               | -                    | 40                                  | -                                     | 160                      | 1,0E-10                         |
| S                                                | H1      | 1        | gorąca             | H         | H            | -                                  | -                | -                    | 40                                  | -                                     | 40                       | -                               |
| S                                                | H2      | 1        | gorąca             | H         | H            | -                                  | -                | -                    | 40                                  | -                                     | 40                       | -                               |
| S                                                | H3      | 1        | gorąca             | H         | H            | -                                  | -                | -                    | 40                                  | -                                     | 40                       | -                               |
| S                                                | H4      | 1        | gorąca             | H         | H            | -                                  | -                | -                    | 40                                  | -                                     | 40                       | -                               |
| S                                                | H5      | 1        | gorąca             | H         | H            | -                                  | -                | -                    | 40                                  | -                                     | 40                       | -                               |
| S                                                | H6      | 1        | gorąca             | H         | H            | -                                  | -                | -                    | 40                                  | -                                     | 40                       | -                               |
| S                                                | H7      | 1        | kontrola z buforem | BC        | BC           | -                                  | 40               | 80                   | 40                                  | -                                     | 160                      | -                               |
| S                                                | H8      | 1        | kontrola z buforem | BC        | BC           | -                                  | 40               | 80                   | 40                                  | -                                     | 160                      | -                               |
| S                                                | H9      | 1        | kontrola z buforem | BC        | BC           | -                                  | 40               | 80                   | 40                                  | -                                     | 160                      | -                               |
| S                                                | H10     | 1        | kontrola z buforem | BC        | BC           | -                                  | 40               | 80                   | 40                                  | -                                     | 160                      | -                               |
| S                                                | H11     | 1        | kontrola z buforem | BC        | BC           | -                                  | 40               | 80                   | 40                                  | -                                     | 160                      | -                               |
| S                                                | H12     | 1        | kontrola z buforem | BC        | BC           | -                                  | 40               | 80                   | 40                                  | -                                     | 160                      | -                               |

Należy pamiętać, że „gorące” dołki są puste podczas inkubacji. 40 μl dodaje się tylko w celu zliczania scyntylacji.

| Rozkład dolków w teście wiązania konkurencyjnego |         |            |              |           |              |                                    |                 |                      |                                                              |                          |                                 |         |
|--------------------------------------------------|---------|------------|--------------|-----------|--------------|------------------------------------|-----------------|----------------------|--------------------------------------------------------------|--------------------------|---------------------------------|---------|
| Płytki                                           | Pozycja | Kontrpróba | Rodzaj dolka | Kod dolka | Kod stężenia | Stężenie początkowe konkurenta (M) | podstawowy hrER | Objętość buforu (μl) | znacznika (gorącego E2) Objętość z płytki rozcieńczenia (μl) | Ostateczna objętość (μl) | Stężenie końcowe konkurenta (M) |         |
| P1                                               | A1      | 1          | wiązanie     | TB        | TBB1B1       | -                                  | 40              | -                    | 40                                                           | 80                       | 160                             | -       |
| P1                                               | A2      | 2          | wiązanie     | TB        | TB2          | -                                  | 40              | -                    | 40                                                           | 80                       | 160                             | -       |
| P1                                               | A3      | 3          | wiązanie     | TB        | TB3          | -                                  | 40              | -                    | 40                                                           | 80                       | 160                             | -       |
| P1                                               | A4      | 1          | wiązanie     | TB        | TB4          | -                                  | 40              | -                    | 40                                                           | 80                       | 160                             | -       |
| P1                                               | A5      | 2          | wiązanie     | TB        | TB5          | -                                  | 40              | -                    | 40                                                           | 80                       | 160                             | -       |
| P1                                               | A6      | 3          | wiązanie     | TB        | TB6          | -                                  | 40              | -                    | 40                                                           | 80                       | 160                             | -       |
| P1                                               | A7      | 1          | zimne E2     | NSB       | S0           | 2,00E-06                           | 40              | -                    | 40                                                           | 80                       | 160                             | 1,0E-06 |
| P1                                               | A8      | 2          | zimne E2     | NSB       | S0           | 2,00E-06                           | 40              | -                    | 40                                                           | 80                       | 160                             | 1,0E-06 |
| P1                                               | A9      | 3          | zimne E2     | NSB       | S0           | 2,00E-06                           | 40              | -                    | 40                                                           | 80                       | 160                             | 1,0E-06 |
| P1                                               | A10     | 1          | zimne E2     | NSB       | S0           | 2,00E-06                           | 40              | -                    | 40                                                           | 80                       | 160                             | 1,0E-06 |
| P1                                               | A11     | 2          | zimne E2     | NSB       | S0           | 2,00E-06                           | 40              | -                    | 40                                                           | 80                       | 160                             | 1,0E-06 |
| P1                                               | A12     | 3          | zimne E2     | NSB       | S0           | 2,00E-06                           | 40              | -                    | 40                                                           | 80                       | 160                             | 1,0E-06 |
| P1                                               | B1      | 1          | Badana       | TC1       | 1            | 2,00E-03                           | 40              | 0                    | 40                                                           | 80                       | 160                             | 1,0E-03 |
| P1                                               | B2      | 2          | Badana       | TC1       | 1            | 2,00E-03                           | 40              | 0                    | 40                                                           | 80                       | 160                             | 1,0E-03 |
| P1                                               | B3      | 3          | Badana       | TC1       | 1            | 2,00E-03                           | 40              | 0                    | 40                                                           | 80                       | 160                             | 1,0E-03 |
| P1                                               | B4      | 1          | Badana       | TC1       | 2            | 2,00E-04                           | 40              | 0                    | 40                                                           | 80                       | 160                             | 1,0E-04 |
| P1                                               | B5      | 2          | Badana       | TC1       | 2            | 2,00E-04                           | 40              | 0                    | 40                                                           | 80                       | 160                             | 1,0E-04 |
| P1                                               | B6      | 3          | Badana       | TC1       | 2            | 2,00E-04                           | 40              | 0                    | 40                                                           | 80                       | 160                             | 1,0E-04 |
| P1                                               | B7      | 1          | Badana       | TC1       | 3            | 2,00E-05                           | 40              | 0                    | 40                                                           | 80                       | 160                             | 1,0E-05 |
| P1                                               | B8      | 2          | Badana       | TC1       | 3            | 2,00E-05                           | 40              | 0                    | 40                                                           | 80                       | 160                             | 1,0E-05 |
| P1                                               | B9      | 3          | Badana       | TC1       | 3            | 2,00E-05                           | 40              | 0                    | 40                                                           | 80                       | 160                             | 1,0E-05 |
| P1                                               | B10     | 1          | Badana       | TC1       | 4            | 2,00E-06                           | 40              | 0                    | 40                                                           | 80                       | 160                             | 1,0E-06 |
| P1                                               | B11     | 2          | Badana       | TC1       | 4            | 2,00E-06                           | 40              | 0                    | 40                                                           | 80                       | 160                             | 1,0E-06 |
| P1                                               | B12     | 3          | Badana       | TC1       | 4            | 2,00E-06                           | 40              | 0                    | 40                                                           | 80                       | 160                             | 1,0E-06 |
| P1                                               | C1      | 1          | Badana       | TC1       | 5            | 2,00E-07                           | 40              | 0                    | 40                                                           | 80                       | 160                             | 1,0E-07 |
| P1                                               | C2      | 2          | Badana       | TC1       | 5            | 2,00E-07                           | 40              | 0                    | 40                                                           | 80                       | 160                             | 1,0E-07 |
| P1                                               | C3      | 3          | Badana       | TC1       | 5            | 2,00E-07                           | 40              | 0                    | 40                                                           | 80                       | 160                             | 1,0E-07 |
| P1                                               | C4      | 1          | Badana       | TC1       | 6            | 2,00E-08                           | 40              | 0                    | 40                                                           | 80                       | 160                             | 1,0E-08 |
| P1                                               | C5      | 2          | Badana       | TC1       | 6            | 2,00E-08                           | 40              | 0                    | 40                                                           | 80                       | 160                             | 1,0E-08 |
| P1                                               | C6      | 3          | Badana       | TC1       | 6            | 2,00E-08                           | 40              | 0                    | 40                                                           | 80                       | 160                             | 1,0E-08 |
| P1                                               | C7      | 1          | Badana       | TC1       | 7            | 2,00E-09                           | 40              | 0                    | 40                                                           | 80                       | 160                             | 1,0E-09 |
| P1                                               | C8      | 2          | Badana       | TC1       | 7            | 2,00E-09                           | 40              | 0                    | 40                                                           | 80                       | 160                             | 1,0E-09 |
| P1                                               | C9      | 3          | Badana       | TC1       | 7            | 2,00E-09                           | 40              | 0                    | 40                                                           | 80                       | 160                             | 1,0E-09 |
| P1                                               | C10     | 1          | Badana       | TC1       | 8            | 2,00E-10                           | 40              | 0                    | 40                                                           | 80                       | 160                             | 1,0E-10 |
| P1                                               | C11     | 2          | Badana       | TC1       | 8            | 2,00E-10                           | 40              | 0                    | 40                                                           | 80                       | 160                             | 1,0E-10 |
| P1                                               | C12     | 3          | Badana       | TC1       | 8            | 2,00E-10                           | 40              | 0                    | 40                                                           | 80                       | 160                             | 1,0E-10 |
| P1                                               | D1      | 1          | Badana       | TC2       | 1            | 2,00E-03                           | 40              | 0                    | 40                                                           | 80                       | 160                             | 1,0E-03 |
| P1                                               | D2      | 2          | Badana       | TC2       | 1            | 2,00E-03                           | 40              | 0                    | 40                                                           | 80                       | 160                             | 1,0E-03 |
| P1                                               | D3      | 3          | Badana       | TC2       | 1            | 2,00E-03                           | 40              | 0                    | 40                                                           | 80                       | 160                             | 1,0E-03 |
| P1                                               | D4      | 1          | Badana       | TC2       | 2            | 2,00E-04                           | 40              | 0                    | 40                                                           | 80                       | 160                             | 1,0E-04 |
| P1                                               | D5      | 2          | Badana       | TC2       | 2            | 2,00E-04                           | 40              | 0                    | 40                                                           | 80                       | 160                             | 1,0E-04 |
| P1                                               | D6      | 3          | Badana       | TC2       | 2            | 2,00E-04                           | 40              | 0                    | 40                                                           | 80                       | 160                             | 1,0E-04 |
| P1                                               | D7      | 1          | Badana       | TC2       | 3            | 2,00E-05                           | 40              | 0                    | 40                                                           | 80                       | 160                             | 1,0E-05 |
| P1                                               | D8      | 2          | Badana       | TC2       | 3            | 2,00E-05                           | 40              | 0                    | 40                                                           | 80                       | 160                             | 1,0E-05 |
| P1                                               | D9      | 3          | Badana       | TC2       | 3            | 2,00E-05                           | 40              | 0                    | 40                                                           | 80                       | 160                             | 1,0E-05 |
| P1                                               | D10     | 1          | Badana       | TC2       | 4            | 2,00E-06                           | 40              | 0                    | 40                                                           | 80                       | 160                             | 1,0E-06 |
| P1                                               | D11     | 2          | Badana       | TC2       | 4            | 2,00E-06                           | 40              | 0                    | 40                                                           | 80                       | 160                             | 1,0E-06 |
| P1                                               | D12     | 3          | Badana       | TC2       | 4            | 2,00E-06                           | 40              | 0                    | 40                                                           | 80                       | 160                             | 1,0E-06 |
| P1                                               | E1      | 1          | Badana       | TC2       | 5            | 2,00E-07                           | 40              | 0                    | 40                                                           | 80                       | 160                             | 1,0E-07 |
| P1                                               | E2      | 2          | Badana       | TC2       | 5            | 2,00E-07                           | 40              | 0                    | 40                                                           | 80                       | 160                             | 1,0E-07 |
| P1                                               | E3      | 3          | Badana       | TC2       | 5            | 2,00E-07                           | 40              | 0                    | 40                                                           | 80                       | 160                             | 1,0E-07 |

| Rozkład dolków w teście wiązania konkurencyjnego |         |            |              |           |              |                                    |                 |                      |                         |                                      |                          |                                 |
|--------------------------------------------------|---------|------------|--------------|-----------|--------------|------------------------------------|-----------------|----------------------|-------------------------|--------------------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| Płytki                                           | Pozycja | Kontrpróba | Rodzaj dolka | Kod dolka | Kod stężenia | Stężenie początkowe konkurenta (M) | podstawowy hrER | Objętość buforu (μl) | znacznika (gorącego E2) | Objętość z płytki rozcieńczenia (μL) | Ostateczna objętość (μl) | Stężenie końcowe konkurenta (M) |
| P1                                               | E4      | 1          | Badana       | TC2       | 6            | -                                  | 40              | 0                    | 40                      | 80                                   | 160                      | 1,0E-08                         |
| P1                                               | E5      | 2          | Badana       | TC2       | 6            | -                                  | 40              | 0                    | 40                      | 80                                   | 160                      | 1,0E-08                         |
| P1                                               | E6      | 3          | Badana       | TC2       | 6            | -                                  | 40              | 0                    | 40                      | 80                                   | 160                      | 1,0E-08                         |
| P1                                               | E7      | 1          | Badana       | TC2       | 7            | 2,00E-06                           | 40              | 0                    | 40                      | 80                                   | 160                      | 1,0E-09                         |
| P1                                               | E8      | 2          | Badana       | TC2       | 7            | 2,00E-06                           | 40              | 0                    | 40                      | 80                                   | 160                      | 1,0E-09                         |
| P1                                               | E9      | 3          | Badana       | TC2       | 7            | 2,00E-06                           | 40              | 0                    | 40                      | 80                                   | 160                      | 1,0E-09                         |
| P1                                               | E10     | 1          | Badana       | TC2       | 8            | 2,00E-06                           | 40              | 0                    | 40                      | 80                                   | 160                      | 1,0E-10                         |
| P1                                               | E11     | 2          | Badana       | TC2       | 8            | 2,00E-06                           | 40              | 0                    | 40                      | 80                                   | 160                      | 1,0E-10                         |
| P1                                               | E12     | 3          | Badana       | TC2       | 8            | 2,00E-06                           | 40              | 0                    | 40                      | 80                                   | 160                      | 1,0E-10                         |
| P1                                               | F1      | 1          | Badana       | TC3       | 1            | 2,00E-03                           | 40              | 0                    | 40                      | 80                                   | 160                      | 1,0E-03                         |
| P1                                               | F2      | 2          | Badana       | TC3       | 1            | 2,00E-03                           | 40              | 0                    | 40                      | 80                                   | 160                      | 1,0E-03                         |
| P1                                               | F3      | 3          | Badana       | TC3       | 1            | 2,00E-03                           | 40              | 0                    | 40                      | 80                                   | 160                      | 1,0E-03                         |
| P1                                               | F4      | 1          | Badana       | TC3       | 2            | 2,00E-04                           | 40              | 0                    | 40                      | 80                                   | 160                      | 1,0E-04                         |
| P1                                               | F5      | 2          | Badana       | TC3       | 2            | 2,00E-04                           | 40              | 0                    | 40                      | 80                                   | 160                      | 1,0E-04                         |
| P1                                               | F6      | 3          | Badana       | TC3       | 2            | 2,00E-04                           | 40              | 0                    | 40                      | 80                                   | 160                      | 1,0E-04                         |
| P1                                               | F7      | 1          | Badana       | TC3       | 3            | 2,00E-05                           | 40              | 0                    | 40                      | 80                                   | 160                      | 1,0E-05                         |
| P1                                               | F8      | 2          | Badana       | TC3       | 3            | 2,00E-05                           | 40              | 0                    | 40                      | 80                                   | 160                      | 1,0E-05                         |
| P1                                               | F9      | 3          | Badana       | TC3       | 3            | 2,00E-05                           | 40              | 0                    | 40                      | 80                                   | 160                      | 1,0E-05                         |
| P1                                               | F10     | 1          | Badana       | TC3       | 4            | 2,00E-06                           | 40              | 0                    | 40                      | 80                                   | 160                      | 1,0E-06                         |
| P1                                               | F11     | 2          | Badana       | TC3       | 4            | 2,00E-06                           | 40              | 0                    | 40                      | 80                                   | 160                      | 1,0E-06                         |
| P1                                               | F12     | 3          | Badana       | TC3       | 4            | 2,00E-06                           | 40              | 0                    | 40                      | 80                                   | 160                      | 1,0E-06                         |
| P1                                               | G1      | 1          | Badana       | TC3       | 5            | 2,00E-07                           | 40              | 0                    | 40                      | 80                                   | 160                      | 1,0E-07                         |
| P1                                               | G2      | 2          | Badana       | TC3       | 5            | 2,00E-07                           | 40              | 0                    | 40                      | 80                                   | 160                      | 1,0E-07                         |
| P1                                               | G3      | 3          | Badana       | TC3       | 5            | 2,00E-07                           | 40              | 0                    | 40                      | 80                                   | 160                      | 1,0E-07                         |
| P1                                               | G4      | 1          | Badana       | TC3       | 6            | 2,00E-08                           | 40              | 0                    | 40                      | 80                                   | 160                      | 1,0E-08                         |
| P1                                               | G5      | 2          | Badana       | TC3       | 6            | 2,00E-08                           | 40              | 0                    | 40                      | 80                                   | 160                      | 1,0E-08                         |
| P1                                               | G6      | 3          | Badana       | TC3       | 6            | 2,00E-08                           | 40              | 0                    | 40                      | 80                                   | 160                      | 1,0E-08                         |
| P1                                               | G7      | 1          | Badana       | TC3       | 7            | 2,00E-09                           | 40              | 0                    | 40                      | 80                                   | 160                      | 1,0E-09                         |
| P1                                               | G8      | 2          | Badana       | TC3       | 7            | 2,00E-09                           | 40              | 0                    | 40                      | 80                                   | 160                      | 1,0E-09                         |
| P1                                               | G9      | 3          | Badana       | TC3       | 7            | 2,00E-09                           | 40              | 0                    | 40                      | 80                                   | 160                      | 1,0E-09                         |
| P1                                               | G10     | 1          | Badana       | TC3       | 8            | 2,00E-10                           | 40              | 0                    | 40                      | 80                                   | 160                      | 1,0E-10                         |
| P1                                               | G11     | 2          | Badana       | TC3       | 8            | 2,00E-10                           | 40              | 0                    | 40                      | 80                                   | 160                      | 1,0E-10                         |
| P1                                               | G12     | 3          | Badana       | TC3       | 8            | 2,00E-10                           | 40              | 0                    | 40                      | 80                                   | 160                      | 1,0E-10                         |
| P1                                               | H1      | 1          | noretynodrel | NE        |              | IC <sub>50</sub>                   | 40              | 0                    | 40                      | 80                                   | 160                      |                                 |
| P1                                               | H2      | 2          | noretynodrel | NE        |              | IC <sub>50</sub>                   | 40              | 0                    | 40                      | 80                                   | 160                      |                                 |
| P1                                               | H3      | 3          | noretynodrel | NE        |              | IC <sub>50</sub>                   | 40              | 0                    | 40                      | 80                                   | 160                      |                                 |
| P1                                               | H4      | 1          | noretynodrel | NE        |              | 1,00E-4,5                          | 40              | 0                    | 40                      | 80                                   | 160                      |                                 |
| P1                                               | H5      | 2          | noretynodrel | NE        |              | 1,00E-4,5                          | 40              | 0                    | 40                      | 80                                   | 160                      |                                 |
| P1                                               | H6      | 3          | noretynodrel | NE        |              | 1,00E-4,5                          | 40              | 0                    | 40                      | 80                                   | 160                      |                                 |
| P1                                               | H7      | 1          | zimne E2 S   |           |              | IC <sub>50</sub>                   | 40              | 0                    | 40                      | 80                                   | 160                      |                                 |
| P1                                               | H8      | 2          | zimne E2 S   |           |              | IC <sub>50</sub>                   | 40              | 0                    | 40                      | 80                                   | 160                      |                                 |
| P1                                               | H9      | 3          | zimne E2 S   |           |              | IC <sub>50</sub>                   | 40              | 0                    | 40                      | 80                                   | 160                      |                                 |
| P1                                               | H10     | 1          | zimne E2 S   |           |              | 1,00E-7                            | 40              | 0                    | 40                      | 80                                   | 160                      |                                 |
| P1                                               | H11     | 2          | zimne E2 S   |           |              | 1,00E-7                            | 40              | 0                    | 40                      | 80                                   | 160                      |                                 |
| P1                                               | H12     | 3          | zimne E2 S   |           |              | 1,00E-7                            | 40              | 0                    | 40                      | 80                                   | 160                      |                                 |

### Dodatek 3

#### TEST *IN VITRO* WIĄZANIA RECEPTORA ESTROGENOWEGO INSTYTUTU OCENY CHEMICZNEJ I BADAŃ (ANG. CHEMICAL EVALUATION AND RESEARCH INSTITUTE, CERI) WYKORZYSTUJĄCY BIAŁKO DOMENY WIĄŻĄCEJ LIGAND LUDZKIEGO REKOMBINOWANEGO RECEPTORA ESTROGENOWEGO ALFA

#### ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA (ZOB. RÓWNIEŻ WPROWADZENIE OGÓLNE)

1. Niniejszy test *in vitro* nasycenia receptora estrogenowego (ER $\alpha$ ) i wiązania konkurencyjnego wykorzystuje domenę wiążącą ligand (LBD) ludzkiego receptora estrogenowego alfa (hrER $\alpha$ ). Ten konstrukt białkowy został wyprodukowany przez Instytutu Oceny Chemicznej i Badań (CERI) w Japonii i istnieje jako białko fuzyjne S-transferazy glutationowej (GST) i jest wyrażony w komórkach *E. coli*. Protokół CERI został poddany międzynarodowemu wielolaboratoryjnemu badaniu walidacyjnemu (2), które wykazało jego adekwatność i wiarygodność w odniesieniu do zaplanowanego celu testu.
2. Test ten jest procedurą klasyfikacyjną służącą do identyfikacji substancji, które mogą wiązać się z hrER $\alpha$ . Służy on do określenia zdolności badanej substancji chemicznej do konkurencyjnego wiązania z 17 $\beta$ -estradiolem w zakresie wiązania z hrER $\alpha$ -LBD. Ilościowe wyniki testu mogą obejmować IC<sub>50</sub> (miara stężenia badanej substancji chemicznej potrzebnego do wyparcia połowy [<sup>3</sup>H]-17 $\beta$ -estradiolu z hrER $\alpha$ ) i względne powinowactwa wiązania badanych substancji chemicznych w odniesieniu do hrER $\alpha$  w porównaniu z 17 $\beta$ -estradiolem. Do celów klasyfikacji substancji chemicznych akceptowalne wyniki testów jakościowych mogą obejmować klasyfikację badanych substancji chemicznych jako substancji wiążących hrER $\alpha$ , substancji innych niż substancja wiążąca lub niejednoznacznych w oparciu o kryteria opisane dla krzywych wiązania.
3. W teście wykorzystuje się ligand promieniotwórczy, który wymaga zezwolenia na stosowanie materiałów promieniotwórczych przez laboratorium. Wszystkie procedury dotyczące radioizotopów i niebezpiecznych substancji chemicznych powinny być zgodne z przepisami i procedurami opisanymi w prawodawstwie krajowym.
4. Przed rozpoczęciem stosowania tego badania do celów regulacyjnych należy zapoznać się z sekcjami „**WPROWADZENIE OGÓLNE**” oraz „**ELEMENTY TESTU WIĄZANIA hrER**”. Definicje i skróty stosowane w niniejszej wytycznej dotyczącej badań opisano w dodatku 1.

#### ZASADY WYKONANIA TESTU (ZOB. RÓWNIEŻ WPROWADZENIE OGÓLNE)

5. W teście wiązania hrER $\alpha$  mierzy się zdolność znakowanego izotopem liganda ([<sup>3</sup>H]17 $\beta$ -estradiolu) do wiązania się z receptorem estrogenowym w obecności zwiększających się stężeń badanej substancji chemicznej (tj. konkurenta). Badane substancje chemiczne

o wysokim powinowactwie z receptorem estrogenowym konkurują ze znakowanym izotopem ligandem w niższym stężeniu w porównaniu z substancjami chemicznymi o niższym powinowactwie z receptorem.

6. Niniejszy test składa się z dwóch głównych elementów: doświadczenie dotyczące wiązania nasycenia mające na celu scharakteryzowanie parametrów interakcji receptor-ligand, po którym następuje doświadczenie dotyczące wiązania konkurencyjnego, charakteryzujący konkurencję pomiędzy badaną substancją chemiczną a znakowanym izotopem ligandem w zakresie wiązania z receptorem estrogenowym.
7. Celem doświadczenia dotyczącego wiązania nasycenia jest scharakteryzowanie konkretnej partii receptorów pod kątem powinowactwa wiązania i ich liczby w ramach przygotowania do doświadczenia dotyczącego wiązania konkurencyjnego. W doświadczeniu dotyczącym wiązania nasycenia mierzy się, w warunkach równowagi, powinowactwo stałego stężenia receptora estrogenowego w odniesieniu do jego naturalnego ligandu (reprezentowanego przez stałą dysocjacji,  $K_d$ ) oraz stężenie obszarów czynnego receptora ( $B_{max}$ ).
8. W doświadczeniu dotyczącym konkurencyjnego wiązania mierzy się powinowactwo substancji do konkurowania z [ $^3H$ ]17 $\beta$ -estradiolem o wiązanie z receptorem estrogenowym. Powinowactwo jest określa się ilościowo za pomocą stężenia badanej substancji chemicznej, która w stanie równowagi hamuje 50 % specyficznego wiązania [ $^3H$ ]17 $\beta$ -estradiolu (nazywanego „stężeniem hamującym 50 %” lub  $IC_{50}$ ). Można je również ocenić za pomocą względnego powinowactwa wiązania (RBA, w stosunku do  $IC_{50}$  estradiolu mierzonego oddzielnie w tej samej serii badawczej). W doświadczeniu dotyczącym konkurencyjnego wiązania mierzy się wiązanie [ $^3H$ ]17 $\beta$ -estradiolu przy stałym stężeniu w obecności szerokiego zakresu (ośmiu rzędów wielkości) stężeń badanych substancji chemicznych. Dane są następnie dopasowywane, na ile to możliwe, do postaci równania Hilla (Hill 1910), które opisuje przemieszczenie radioligandu przez jednoobszarową konkurencyjną substancję wiążącą. Zakres przemieszczenia estradiolu znakowanego izotopem w stanie równowagi jest wykorzystywany do scharakteryzowania badanej substancji chemicznej jako substancji wiążącej, substancji innej niż substancja wiążąca lub generującej reakcję niejednoznaczną.

## PROCEDURA

### Wykazanie dopuszczalnej efektywności białka hrER $\alpha$

9. Przed rutynowym wykonaniem testów nasycenia i wiązania konkurencyjnego należy wykazać, że efektywność każdej nowej partii hrER $\alpha$  w laboratorium, w którym będzie używana, jest prawidłowa. W celu zademonstrowania efektywności należy zastosować dwuetapowy proces. Etapy te są następujące:
  - Przeprowadzenie testu wiązania nasycenia [ $^3H$ ]-17 $\beta$ -estradiolu w celu wykazania swoistości i nasycenia hrER $\alpha$ . Analiza regresji nieliniowej tych danych (np. BioSoft; McPherson 1985; Motulsky 1995), a następnie wykres Scatcharda powinien

dokumentować powinowactwo wiązania hrER $\alpha$  [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -estradiolu ( $K_d$ ) i liczbę receptorów ( $B_{\text{max}}$ ) w odniesieniu do konkretnej partii hrER $\alpha$ .

- Wykonanie testu wiązania konkurencyjnego przy użyciu substancji kontrolnych (estrogen odniesienia (17 $\beta$ -estradiol), substancji słabo wiążącej (np. noretynodrel lub noretyndron) oraz substancji innej niż substancja wiążąca (oktylotrietoksylan, OTES). Każde laboratorium powinno stworzyć bazę danych historycznych w celu udokumentowania spójności IC<sub>50</sub> i wartości istotnych dla estrogenów odniesienia i substancji słabo wiążących między doświadczeniami i różnymi partiami hrER $\alpha$ . Ponadto parametry krzywych konkurencyjnego wiązania substancji kontrolnych powinny mieścić się w przedziale ufności 95 % (zob. tabela 1), który opracowano wykorzystując dane laboratoriów uczestniczących w badaniu walidacyjnym w odniesieniu do celów niniejszego testu (2).

**Tabela 1:** Kryteria efektywności opracowane dla estrogenów odniesienia i substancji słabo wiążących, test wiązania hrER CERi.

| Substancja                      | Parametr            | Wartość średnia <sup>a</sup> | Odchylenie standardowe (n) | Przedziały ufności <sup>b</sup> 95 % |                         |
|---------------------------------|---------------------|------------------------------|----------------------------|--------------------------------------|-------------------------|
|                                 |                     |                              |                            | Dolna wartość graniczna              | Górna wartość graniczna |
| <b>17β-estradiol</b>            | Najwyższa wartość   | 104,74                       | 13,12 (70)                 | 101,6                                | 107,9                   |
|                                 | Najniższa wartość   | 0,85                         | 2,41 (70)                  | 0,28                                 | 1,43                    |
|                                 | Krzywa Hilla        | -1,22                        | 0,20 (70)                  | -1,27                                | -1,17                   |
|                                 | LogIC <sub>50</sub> | -8,93                        | 0,23 (70)                  | -8,98                                | -8,87                   |
| <b>Noretynodrel</b>             | Najwyższa wartość   | 101,31                       | 10,55 (68)                 | 98,76                                | 103,90                  |
|                                 | Najniższa wartość   | 2,39                         | 5,01 (68)                  | 1,18                                 | 3,60                    |
|                                 | Krzywa Hilla        | -1,04                        | 0,21 (68)                  | -1,09                                | -0,99                   |
|                                 | LogIC <sub>50</sub> | -6,19                        | 0,40 (68)                  | -6,29                                | -6,10                   |
| <b>Noretynodron<sup>c</sup></b> | Najwyższa wartość   | 92,27                        | 7,79 (23)                  | 88,90                                | 95,63                   |
|                                 | Najniższa wartość   | 16,52                        | 10,59 (23)                 | 11,94                                | 21,10                   |
|                                 | Krzywa Hilla        | -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> Średnie ± odchylenie standardowe (SD) (wielkość próby (n) obliczono przy użyciu szacunków parametrów dopasowania krzywej (4-parametrowe równanie Hilla)) w odniesieniu do serii badawczej kontroli wykonanych w czterech laboratoriach w ramach badania walidacyjnego (zob. załącznik N do 2. pozycji bibliografii).

<sup>b</sup> przedziały ufności 95 % podaje się jako wskazówkę do kryteriów dopuszczalności.

<sup>c</sup> Testowanie noretynodronu było opcjonalne w przypadku podzadania 4 przeprowadzonego podczas badania walidacyjnego (zob. 2. pozycja bibliografii, zob. podzadanie 4). W związku z tym średnią ±SD (n) obliczono przy użyciu szacunków dopasowania krzywej (4-parametrowe równanie Hilla) dla kontrolnych serii badawczych wykonanych w dwóch laboratoriach.

Zakres IC<sub>50</sub> będzie zależał od Kd preparatu receptora i stężenia znakowanego izotopem ligandu używanego w każdym laboratorium. Dopuszczalna będzie odpowiednia korekta zakresu IC<sub>50</sub> na podstawie warunków stosowanych do przeprowadzenia testu.

## Wykazanie biegłości laboratorium

10. Zob. pkt 17 i 18 oraz tabela 2 w rozdziale „ELEMENTY TESTU WIĄZANIA hrER” w niniejszej metodzie badawczej. Każdy test (nasycenia i wiązania konkurencyjnego) powinien składać się z trzech niezależnych serii badawczych (tj. ze świeżymi rozcieńczeniami receptora, substancji chemicznych i odczynników) w różnych dniach, a każda seria badawcza powinna obejmować trzy kontrpróby.

## Określanie stężenia receptora (hrERα)

11. Stężenie czynnego receptora różni się nieznacznie w zależności od partii i warunków składowania. Z tego powodu należy określić stężenie czynnego receptora otrzymanego od



dostawcy. Pozwoli to uzyskać odpowiednie stężenie aktywnego receptora w serii badawczej.

12. W warunkach odpowiadających konkurencyjnym wiązaniom (tj. 0,5 nM [ $^3\text{H}$ ]-estradiolu), nominalne stężenia 0,1, 0,2, 0,4 i 0,6 nM receptora powinny być inkubowane przy braku (wiązanie całkowite) i obecności (wiązanie nieswoiste) 1  $\mu\text{M}$  nieoznakowanego estradiolu. Określone wiązanie, obliczone jako różnica wiązania całkowitego i nieswoistego, jest wykreślane w funkcji nominalnego stężenia receptora. Stężenie receptora, które daje określone wartości wiązania odpowiadające 40 % dodanego oznaczenia izotopem, jest związane z odpowiadającym mu stężeniem receptora, a to stężenie receptora należy wykorzystywać w doświadczeniach dotyczących nasycenia i konkurencyjnego wiązania. Często końcowe stężenie hrER wynoszące 0,2 nM jest zgodne z tym warunkiem.
13. Jeżeli kryterium 40 % nie może być wielokrotnie spełnione, należy sprawdzić, czy w zestawie doświadczenia nie ma potencjalnych błędów. Nieosiągnięcie kryterium 40 % może wskazywać, że w partii rekombinowanej jest bardzo mało aktywnego receptora, w związku z czym należy rozważyć zastosowanie innej partii receptora.

### Test nasycenia

14. Osiem wzrastających stężeń [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -estradiolu należy oceniać trzykrotnie, w następujących trzech warunkach (zob. tabela 2):
  - a. przy braku nieoznakowanego 17 $\beta$ -estradiolu i w obecności receptora estrogenowego. Jest to wyznaczenie wiązania całkowitego przez pomiar radioaktywności w dołkach, w których znajduje się tylko [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -estradiol.
  - b. W obecności 2000-krotnego przekroczenia stężenia nieoznakowanego 17 $\beta$ -estradiolu nad oznakowanym 17 $\beta$ -estradiolem i w obecności receptora estrogenowego. Zamierzeniem tego warunku jest nasycenie aktywnych obszarów wiązania nieoznakowanym 17 $\beta$ -estradiolem, a w wyniku pomiaru radioaktywności w dołkach, określenie wiązania nieswoistego. Każdy pozostały gorący estradiol, który może wiązać się z receptorem uznaje się za wiążący w nieswoistym obszarze, ponieważ zimny estradiol powinien być w tak wysokim stężeniu, aby wiązał się ze wszystkimi dostępnymi swoistymi obszarami na receptorze.
  - c. Przy braku nieoznakowanego 17 $\beta$ -estradiolu i braku receptora estrogenowego (określenie całkowitej radioaktywności).

### *Przygotowanie roztworów [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -estradiolu, nieoznakowanego 17 $\beta$ -estradiolu i hrERa*

15. Należy przygotować roztwór o stężeniu 40 nM [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -estradiolu z użyciem roztworu podstawowego 1  $\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -estradiolu w sulfotlenku dimetylowym, w temperaturze pokojowej dodając sulfotlenek dimetylowy (aby przygotować roztwór 200 nM) oraz bufor testowy (aby przygotować roztwór 40 nM). Stosując ten roztwór 40 nM, należy w temperaturze pokojowej przygotować serię rozcieńczeń [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -estradiolu w zakresie

od 0,313 nM do 40 nM i zawierającą roztwór buforowy (co przedstawia pozycja 12 tabeli 2). Dodając 10  $\mu$ l tych roztworów do odpowiednich dołków płytki 96-dołkowej (w ostatecznej objętości 3  $\mu$ l), uzyskuje się końcowe stężenia testowe w zakresie od 0,0313  $\mu$ M do 4,0  $\mu$ M (zob. tabele 2 i 3). Przygotowanie buforu testowego, obliczenie początkowego roztworu podstawowego [ $^3$ H]-17 $\beta$ -estradiolu w oparciu na jego właściwej aktywności, preparaty rozcieńczeń i określenie stężeń są szczegółowo opisane w protokole CERI (2).

16. Należy przygotować rozcieńczenia nieoznakowanych roztworów 17 $\beta$ -estradiolu z użyciem roztworu podstawowego 1 nM 17 $\beta$ -estradiolu dodając bufor testowy, aby uzyskać osiem stężeń wzrastających początkowo od 0,625  $\mu$ M do 80  $\mu$ M. Dodając 10  $\mu$ l tych roztworów do odpowiednich dołków testowych płytki 96-dołkowej przeznaczonej do pomiaru wiązań nieswoistych, uzyskuje się końcowe stężenia testowe w zakresie od 0,0625  $\mu$ M do 8  $\mu$ M (zob. tabele 2 i 3). Przygotowanie rozcieńczeń nieoznakowanego 17 $\beta$ -estradiolu jest szczegółowo opisane w protokole CERI (2).
17. Należy stosować nominalne stężenie receptora, które daje specyficzne wiązanie  $40 \pm 10$  % (zob. pkt 12–13). Roztwór hrER $\alpha$  należy przygotować w lodowatym buforze testowym bezpośrednio przed użyciem, tj. po przygotowaniu wszystkich dołków do wiązania całkowitego, wiązania nieswoistego oraz samodzielnego gorącego ligandu.
18. Płytki 96-dołkowe są przygotowywane w sposób przedstawiony w tabeli 2, z 3 kontrpróbami na stężenie [ $^3$ H]-17 $\beta$ -estradiolu. Objętość [ $^3$ H]-17 $\beta$ -estradiolu, nieoznakowanego 17 $\beta$ -estradiolu, buforu i receptora przedstawiono w tabeli 3.

**Tabela 2:** Rozkład na mikropłytkę do testu wiązania nasycenia

|          | 1*                                                        | 2* | 3* | 4*                                                                | 5* | 6* | 7*                                           | 8* | 9* | 10 | 11**                                                | 12**                                           |
|----------|-----------------------------------------------------------|----|----|-------------------------------------------------------------------|----|----|----------------------------------------------|----|----|----|-----------------------------------------------------|------------------------------------------------|
|          | Do pomiaru TB                                             |    |    | Do pomiaru NSB                                                    |    |    | Do określenia samodzielnego gorącego ligandu |    |    |    | Nieoznakowane rozcieńczenia E2 do kolumn płytki 4–6 | Rozcieńczenia [ $^3$ H]E2 do kolumn płytki 1–9 |
| <b>A</b> | 0,0313 nM [ $^3$ H] E <sub>2</sub> + receptor estrogenowy |    |    | 0,0313 nM [ $^3$ H] E2 + 0,0625 $\mu$ M E2 + receptor estrogenowy |    |    | 0,0313 nM                                    |    |    |    | 0,625 $\mu$ M                                       | 0,313 nM                                       |
| <b>B</b> | 0,0625 nM [ $^3$ H] E <sub>2</sub> + receptor estrogenowy |    |    | 0,0625 nM [ $^3$ H] E2 + 0,125 $\mu$ M E2 + receptor estrogenowy  |    |    | 0,0625 nM                                    |    |    |    | 1,25 $\mu$ M                                        | 0,625 nM                                       |
| <b>C</b> | 30,125 nM [ $^3$ H] E <sub>2</sub> + receptor estrogenowy |    |    | 0,125 nM [ $^3$ H] E2 + 0,25 $\mu$ M E2 + receptor estrogenowy    |    |    | 0,125 nM                                     |    |    |    | 2,5 $\mu$ M                                         | 1,25 nM                                        |
| <b>D</b> | 0,250 nM [ $^3$ H] E <sub>2</sub> + receptor estrogenowy  |    |    | 0,250 nM [ $^3$ H] E2 + 0,5 $\mu$ M E2 + receptor estrogenowy     |    |    | 0,250 nM                                     |    |    |    | 5 $\mu$ M                                           | 2,5 nM                                         |

|          |                                                                       |                                                                                                |         |  |       |       |
|----------|-----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|--|-------|-------|
| <b>E</b> | 0,50 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub><br>+ receptor<br>estrogenowy | 0,50 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub><br>+ 1 μM E <sub>2</sub><br>+ receptor<br>estrogenowy | 0,50 nM |  | 10 μM | 5 nM  |
| <b>F</b> | 1,00 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub><br>+ receptor<br>estrogenowy | 1,00 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub><br>+ 2 μM E <sub>2</sub><br>+ receptor<br>estrogenowy | 1,00 nM |  | 20 μM | 10 nM |
| <b>G</b> | 2,00 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub><br>+ receptor<br>estrogenowy | 2,00 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub><br>+ 4 μM E <sub>2</sub><br>+ receptor<br>estrogenowy | 2,00 nM |  | 40 μM | 20 nM |
| <b>H</b> | 4,00 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub><br>+ receptor<br>estrogenowy | 4,00 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub><br>+ 8 μM E <sub>2</sub><br>+ receptor<br>estrogenowy | 4,00 nM |  | 80 μM | 40 nM |

TB: wiązanie całkowite;

NSB: wiązanie nieswoiste;

[<sup>3</sup>H] E<sub>2</sub>: [<sup>3</sup>H]17β-estradiol

E<sub>2</sub>: nieoznakowany 17β-estradiol

\* Wskazane tutaj stężenia stanowią stężenia końcowe każdego dołka.

\*\*Rozcieńczenia nieoznakowanych E<sub>2</sub> i [<sup>3</sup>H]E<sub>2</sub> można przygotować na innej płytce.

**Tabela 3:** Objętości odczynnika w odniesieniu do nasycenia mikropłytki

| Nr pozycji                                                                                 |                                        | 1                                            | 2 | 3 | 4         | 5 | 6                  | 7*                                                                        | 8* | 9* |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------------|---|---|-----------|---|--------------------|---------------------------------------------------------------------------|----|----|
| Etap przygotowania                                                                         |                                        | Dołki TB                                     |   |   | Dołki NSB |   | Samodzielny gorący |                                                                           |    |    |
| Objętość elementów w odniesieniu do powyższych dołków reakcyjnych oraz kolejność dodawania | Roztwór                                | 60 µl                                        |   |   | 50 µl     |   | 90 µl              |                                                                           |    |    |
|                                                                                            | nieoznakowane E2 z pozycji 11 tabeli 2 | -                                            |   |   | 10 µl     |   | -                  |                                                                           |    |    |
|                                                                                            | [3H]E2 z pozycji 12 w tabeli 2         | 10 µl                                        |   |   | 10 µl     |   | 10 µl              |                                                                           |    |    |
|                                                                                            | hrERα                                  | 30 µl                                        |   |   | 30 µl     |   | -                  |                                                                           |    |    |
| Całkowita objętość reakcji                                                                 |                                        | 100 µl                                       |   |   | 100 µl    |   | 100 µl             |                                                                           |    |    |
| Inkubacja                                                                                  |                                        | REAKCJA NASTĘPUJĄCA PO 2 GODZINACH INKUBACJI |   |   |           |   |                    | Określenie ilościowe radioaktywności tuż po przygotowaniu. Brak inkubacji |    |    |
| Poddawanie działaniu substancji za                                                         |                                        | Tak                                          |   |   | Tak       |   | Nie                |                                                                           |    |    |
| Objętość 0,4 % DCC                                                                         |                                        | 100 µl                                       |   |   | 100 µl    |   | -                  |                                                                           |    |    |
| Filtracja                                                                                  |                                        | Tak                                          |   |   | Tak       |   | Nie                |                                                                           |    |    |
| POMIAR LICZBY ROZPADÓW NA MINUTĘ                                                           |                                        |                                              |   |   |           |   |                    |                                                                           |    |    |
| Objętość ilościowa dodawana do koktajlu scyntylacyjnego                                    |                                        | 100 µl**                                     |   |   | 100 µl**  |   | 50 µl              |                                                                           |    |    |

\* Jeżeli scyntylacyjny licznik cieczowy mikropłytek stosuje się do pomiaru liczby rozpadów na minutę, nie należy przygotowywać samego gorącego ligandu w dołkach TB i NSB na tej samej płytce testowej. Samodzielny gorący ligand należy przygotować na innej płytce.

\*\* Jeżeli DCC rozdziela się metodą wirowania, aby uniknąć zanieczyszczenia DCC należy za pomocą scyntylacyjnego licznika cieczowego zmierzyć 50 µl supernatantu.

19. Mikropłytki testowe pozwalające na określenie wiązań całkowitych i wiązań nieswoistych należy przez dwie godziny inkubować w temperaturze pokojowej (22–28 °C).

#### *Pomiar [<sup>3</sup>H]-17β-estradiolu związanego z hrERα*

20. Po dwugodzinnym okresie inkubacji [<sup>3</sup>H]-17β-estradiol związany z hrERα należy oddzielić od wolnego [<sup>3</sup>H]-17β-estradiolu, w tym celu dodając do dołków 100 µl lodowatej zawiesiny DCC 0,4 %. Płytki należy następnie na 10 min umieścić z lodem oraz poprzez przeniesienie ich do filtra mikropłytek należy przeprowadzić filtrację mieszaniny reakcyjnej i zawiesiny DCC; celem tego działania jest usunięcie DCC. Następnie do płynu scyntylacyjnego znajdującego się we fiolkach scyntylacyjnego licznika cieczowego należy dodać 100 µl filtratu, aby za pomocą tego licznika określić liczbę rozpadów na minutę/fiolkę.
21. W przypadku gdy filtr mikropłytkowy nie jest dostępny, metodą alternatywną może okazać się usunięcie DCC poprzez odwirowanie. 50 µl supernatantu zawierającego [<sup>3</sup>H]-17β-estradiol związany z hrERα należy wówczas stosować ze szczególną ostrożnością, aby uniknąć zanieczyszczenia dołków przez styczność z DCC, a następnie umieścić na drugiej mikropłytkę.
22. Stan, w jakim znajduje się samodzielny gorący ligand pozwala określić liczbę rozpadów na minutę dodawanego do dołków testowych [<sup>3</sup>H]-17β-estradiolu. Radioaktywność należy określić ilościowo tuż po przygotowaniu. Dołków tych nie powinno się inkubować, a także nie należy poddawać ich działaniu zawiesiny DCC, natomiast ich zawartość należy wprowadzić bezpośrednio do płynu scyntylacyjnego. Pomiar te pokazują, ile [<sup>3</sup>H]-17β-estradiolu wyrażonych za pomocą liczby rozpadów na minutę dodano do każdego zestawu dołków w celu uzyskania wiązania całkowitego i wiązania nieswoistego.

#### **Test wiązania konkurencyjnego**

23. W teście wiązania konkurencyjnego mierzy się wiązanie pojedynczego stężenia [<sup>3</sup>H]17β-estradiolu w obecności zwiększających się stężeń badanej substancji chemicznej. Przy każdym stężeniu w ramach jednej serii badawczej należy zastosować trzy równoległe kontrpróby. Ponadto dla każdej badanej substancji chemicznej należy wykonać trzy niejednoczesne serie badawcze. Test należy przeprowadzić z wykorzystaniem co najmniej jednej płytki 96-dołkowej.

#### *Kontrole*

24. Podczas przeprowadzania testu w każdym doświadczeniu należy uwzględnić równoczesny rozpuszczalnik i kontrole (tj. estrogen odniesienia, substancję słabo wiążącą oraz substancję inną niż substancja wiążąca). Pełne krzywe stężeń dla estrogenów odniesienia i kontroli (tj. substancji słabo wiążącej i substancji innej niż substancja wiążąca) w każdej serii badawczej należy stosować na jednej płytce. Wszystkie pozostałe płytki powinny zawierać (i) wysokie (maksymalne przemieszczenie tj. w przybliżeniu pełne przemieszczenie ligand

znakowanych izotopem) i średnie (około  $IC_{50}$ ) stężenie E2 oraz substancji słabo wiążącej w trzech powtórzeniach; (ii) kontrolę z rozpuszczalnikiem i wiązanie nieswoiste, każde w trzech powtórzeniach. Procedury przygotowania buforu testowego, [ $^3H$ ]-17 $\beta$ -estradiolu, hrER $\alpha$  i roztworów badanych substancji chemicznych szczegółowo opisano w protokole CERi (2).

#### *Kontrola z rozpuszczalnikiem:*

25. Kontrola z rozpuszczalnikiem wskazuje, że rozpuszczalnik nie wchodzi w interakcję z układem badawczym, a także umożliwia zmierzenie wiązania całkowitego (TB). Preferowanym rozpuszczalnikiem jest sulfotlenek dimetylowy. W przypadku gdy najwyższe stężenie badanej substancji chemicznej nie jest rozpuszczalne w sulfotlenku dimetylowym, alternatywnie można zastosować etanol. Stężenie sulfotlenku dimetylowego w dołkach testu końcowego powinno wynosić 2,05 %, a w przypadku braku nierozpuszczalności badanej substancji chemicznej może wzrosnąć do poziomu 2,5 %. Ze względu na interferencję wyższych stężeń rozpuszczalnika z danym testem, nie należy stosować stężeń sulfotlenku dimetylowego wyższych niż 2,5 %. W przypadku substancji chemicznych, które są nierozpuszczalne w sulfotlenku dimetylowym, lecz są rozpuszczalne w etanolu, w teście bez interferencji można zastosować maksymalnie etanol o stężeniu 2 %.

#### *Kontrola z buforem:*

26. Kontrola z buforem (BC) nie powinna zawierać rozpuszczalnika ani badanej substancji chemicznej, ale wszystkie inne elementy testu. Wyniki kontroli z buforem porównuje się z wynikami kontroli z rozpuszczalnikiem w celu sprawdzenia, czy zastosowany rozpuszczalnik nie ma wpływu na system testu.

#### *Substancja silnie wiążąca (estrogen odniesienia)*

27. 17 $\beta$ -estradiol (CAS 50-28-2) jest endogennym ligandem i tworzy wiązanie o wysokim powinowactwie z receptorem estrogenowym, podtyp alfa. Dla każdego testu wiązania konkurencyjnego hrER $\alpha$  należy przygotować krzywą wzorcową z użyciem nieoznakowanego 17 $\beta$ -estradiolu, aby w tym samym laboratorium umożliwić ocenę zmienności podczas wykonywania testu na przestrzeni czasu. W sulfotlenku dimetylowym i buforze testowym należy przygotować osiem roztworów nieoznakowanego 17 $\beta$ -estradiolu o stężeniach w dołkach testowych należy stosować na krzywej wzorcowej, w następujących odstępach:  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-8.5}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-9.5}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-11}$  M. Najwyższe stężenie nieoznakowanego 17 $\beta$ -estradiolu (1  $\mu$ M) powinno służyć również jako wskaźnik nieswoistego wiązania. Stężenie to wyróżnia się etykietą „NSB” w tabeli 4, mimo że jest ono również częścią krzywej wzorcowej.

#### *Substancja słabo wiążąca*

28. Należy uwzględnić substancję słabo wiążącą (noretynodrel (CAS 68-23-5) lub jego zastępcę – noretynodron (CAS 68-22-4)) w celu wykazania czułości każdego doświadczenia i umożliwienia oceny zmienności przy przeprowadzaniu testu z upływem czasu. W sulfotlenku dimetylowym i buforze testowym należy przygotować osiem roztworów

substancji słabo wiążącej o następujących stężeniach w dołkach testowych:  $10^{-4.5}$ ,  $10^{-5.5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-6.5}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-7.5}$ ,  $10^{-8}$  i  $10^{-9}$  M.

Substancja inna niż substancja wiążąca

29. Oktylotrietoksylan (OTES, CAS 2943-75-1) należy stosować jako kontrolę ujemną (substancję inną niż substancja wiążąca). Daje to pewność, że test w takiej formie umożliwi wykrycie, że badane substancje chemiczne nie wiążą się z hrER $\alpha$ . W sulfotlenku dimetylowym i buforze testowym należy przygotować osiem roztworów substancji innej niż substancja wiążąca o następujących stężeniach w dołkach testowych:  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$  M. Jako alternatywną substancję inną niż substancja wiążąca można zastosować ftalan dibutyłu (DBP, nr CAS 84-72-2), można go jednak badać jedynie do  $10^{-4}$  M. Wykazano, że maksymalna rozpuszczalność DBP w teście wynosi  $10^{-4}$  M.

Stężenie hrER $\alpha$

30. Należy stosować taką ilość receptora, która da specyficzne wiązanie  $40 \pm 10$  % (zob. pkt 12–13 dodatku 3). Roztwór hrER $\alpha$  należy przygotować, rozcieńczając funkcjonalne hrER $\alpha$  w lodowatym buforze testowym bezpośrednio przed zastosowaniem.

[ $^3$ H]-17 $\beta$ -estradiol

31. Stężenie końcowe [ $^3$ H]-17 $\beta$ -estradiolu w dołkach testowych powinno wynosić 0,5 nM.

Badane substancje chemiczne

32. W pierwszej kolejności konieczne jest przeprowadzenie badania rozpuszczalności, aby ustalić granicę rozpuszczalności każdej badanej substancji chemicznej oraz określić właściwy zakres stężeń, który zostanie zastosowany przy realizacji protokołu badania. Granicę rozpuszczalności każdej badanej substancji chemicznej należy początkowo ustalić w rozpuszczalniku, a następnie potwierdzić w warunkach testowych. Stężenia końcowe będące przedmiotem testu nie powinny przekraczać 1 mM. Badanie ustalające zakres dawkowania obejmuje kontrolę z rozpuszczalnikiem wraz z co najmniej ośmioma seriami stężeń wzrastających w postępie logarytmicznym, począwszy od maksymalnego dopuszczalnego stężenia (np. 1 mM lub niższego, na podstawie granicy rozpuszczalności) oraz odnotowaną obecność zmętnienia lub osadu (zob. również pkt 35 dodatku 3). Po ustaleniu zakresu stężeń do celów badań, badaną substancję chemiczną należy badać przy użyciu 8 krzywych stężeń logarytmicznych, ułożonych w odpowiednich odstępach, co określono w poprzednim badaniu dotyczącym zakresu dawkowania. Zbadane stężenia w drugim i trzecim doświadczeniu należy następnie odpowiednio dostosować, aby w razie potrzeby lepiej scharakteryzować krzywą zależności stężenie-odpowiedź.

33. Rozcieńczenia badanych substancji chemicznych należy przygotować w odpowiednim rozpuszczalniku (zob. pkt 25 dodatku 3). Badana substancja chemiczna w najwyższym stężeniu nie rozpuszcza się ani w sulfotlenku dimetylowym, ani w etanolu, a dodanie większej ilości rozpuszczalnika spowodowałoby, że stężenie rozpuszczalnika w końcowej próbówce byłoby wyższe niż dopuszczalna wartość graniczna, najwyższe stężenie można obniżyć do następnego, niższego stężenia. W takim przypadku można dodać dodatkowe

stężenie na dolnym końcu serii stężeń. Pozostałe stężenia w serii powinny pozostać niezmiennione.

34. Roztwory badanej substancji chemicznej powinny być ściśle monitorowane po dodaniu ich do dołka testowego, ponieważ badana substancja chemiczna może wytrącać się po dodaniu do dołka testowego. Dane dotyczące wszystkich dołków, które zawierają osady, należy wyłączyć z dopasowywania krzywej, a także odnotować powód wyłączenia tych danych.
35. Jeżeli istnieją już wcześniejsze informacje pochodzące z innych źródeł, na podstawie których można wyznaczyć logarytm ( $IC_{50}$ ) badanej substancji chemicznej, właściwe może być geometryczne rozmieszczenie rozcieńczeń bliżej zakładanego log ( $IC_{50}$ ) (tj. 0,5 jednostki logarytmicznej). Wyniki końcowe powinny dostatecznie wykazywać wystarczającą rozpiętość stężeń po obu stronach logarytmu ( $IC_{50}$ ), w tym „najwyższa wartość” i „najniższa wartość”, tak aby krzywą wiązania można było odpowiednio scharakteryzować.

#### *Organizacja płytki testowej*

36. Oznakowane mikropłytki powinny być przygotowane z zastosowaniem sześciokrotnej inkubacji kontroli z rozpuszczalnikiem, najwyższego stężenia estrogenu odniesienia (E2), który służy również za wskaźnik wiązania nieswoistego (NSB), kontroli z buforem, ośmiu stężeń niewiążących kontroli (oktylotrietoksylan), siedmiu niższych stężeń estrogenu odniesienia (E2), ośmiu stężeń substancji słabo wiążącej (noretynodrelu lub noretysteronu) oraz ośmiu stężeń każdej badanej substancji chemicznej (TC). W poniższej tabeli 4 przedstawiono przykładowy wykres dotyczący rozkładu na płytce pełnych krzywych stężeń estrogenu odniesienia i kontroli. Dodatkowe mikropłytki wykorzystuje się do badanych substancji chemicznych i powinny one zawierać kontrole płytek, (tj. (i) wysokie (maksymalne przemieszczenie) i średnie stężenie (około  $IC_{50}$ ) każdego E2 oraz substancji słabo wiążącej w trzech powtórzeniach; (ii) kontrolę z rozpuszczalnikiem (jako wiązanie całkowite) i wiązanie nieswoiste, każde w sześciu powtórzeniach (tabela 5). Przykład arkusza roboczego rozkładu mikropłytki testowej, wykorzystującego trzy nieznane badane substancje chemiczne, znajduje się w dodatku 3.3. Stężenia wskazane w arkuszu roboczym oraz w tabelach 4 i 5 odnoszą się do stężeń końcowych wykorzystywanych w poszczególnych dołkach testowych. Maksymalne stężenie dla E2 powinno wynosić  $1 \times 10^{-7}$  M, a dla substancji słabo wiążącej należy stosować najwyższe stężenie dla substancji słabo wiążącej na płytce 1. Stężenie  $IC_{50}$  musi być określone przez laboratorium na podstawie jego bazy danych historycznych dotyczących kontroli. Oczekuje się, że wartość ta będzie podobna do wartości zaobserwowanej w badaniach walidacyjnych (zob. tabela 1).

**Tabela 4:** Rozkład na mikropłytkce do testu wiązania konkurencyjnego<sup>1,2</sup>, pełne krzywe stężeń dla estrogenu odniesienia i próby kontrolnej (płytki 1).

|  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
|--|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
|  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|--|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|

|          | Kontrola z buforem<br>i kontrola dodatnia (E2) | Słaba dodatnia<br>(Noretynodrel) | Kontrola ujemna<br>(OTES) | TB i NSB                                              |
|----------|------------------------------------------------|----------------------------------|---------------------------|-------------------------------------------------------|
| <i>A</i> | Próba ślepa*                                   | $1 \times 10^{-9}$ M             | $1 \times 10^{-10}$ M     | TB (kontrola<br>z rozpuszczalnikiem)<br>(2,05 % DMSO) |
| <i>B</i> | E2 ( $1 \times 10^{-11}$ M)                    | $1 \times 10^{-8}$ M             | $1 \times 10^{-9}$ M      |                                                       |
| <i>C</i> | E2 ( $1 \times 10^{-10}$ M)                    | $1 \times 10^{-7,5}$ M           | $1 \times 10^{-8}$ M      | NSB ( $10^{-6}$ M E2)                                 |
| <i>D</i> | E2 ( $1 \times 10^{-9,5}$ M)                   | $1 \times 10^{-7}$ M             | $1 \times 10^{-7}$ M      |                                                       |
| <i>E</i> | E2 ( $1 \times 10^{-9}$ M)                     | $1 \times 10^{-6,5}$ M           | $1 \times 10^{-6}$ M      | Kontrola z buforem                                    |
| <i>F</i> | E2 ( $1 \times 10^{-8,5}$ M)                   | $1 \times 10^{-6}$ M             | $1 \times 10^{-5}$ M      |                                                       |
| <i>G</i> | E2 ( $1 \times 10^{-8}$ M)                     | $1 \times 10^{-5,5}$ M           | $1 \times 10^{-4}$ M      | Próba ślepa (dla<br>gorących)**                       |
| <i>H</i> | E2 ( $1 \times 10^{-7}$ M)                     | $1 \times 10^{-4,5}$ M           | $1 \times 10^{-3}$ M      |                                                       |

<sup>1</sup> Próbką przygotowaną na potrzeby standardów, w których każde doświadczenie przeprowadza się z wykorzystaniem mikropłytki.

<sup>2</sup> Należy zauważyć, że taką mikropłytkę przygotowuje się wykorzystując rozcieńczenia wytworzone na płytce rozcieńczenia opisanej w odniesieniu do standardów w poprzednich sekcjach.

W tym przykładzie substancją słabo wiążącą jest noretynodrel (NE)

\* prawdziwa próba ślepa, bez wykorzystania dołka

\*\* próba ślepa niestosowana podczas inkubacji, ale stosowana w celu potwierdzenia całkowitej dodanej radioaktywności.

**Tabela 5:** Rozkład na mikropłytkce testowej wiązania konkurencyjnego, dodatkowe płytki na użytek badanych substancji chemicznych (TC) i próby kontrolne dla płytki.

|          | 1                                    | 2 | 3 | 4                                    | 5 | 6 | 7                                    | 8 | 9 | 10                                 | 11 | 12 |
|----------|--------------------------------------|---|---|--------------------------------------|---|---|--------------------------------------|---|---|------------------------------------|----|----|
|          | Badana substancja chemiczna-1 (TC-1) |   |   | Badana substancja chemiczna-2 (TC-2) |   |   | Badana substancja chemiczna-3 (TC-3) |   |   | Kontrole                           |    |    |
| <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 (kontrola z rozpuszczalnikiem)  |    |    |
| <i>H</i> | TC-1 (1×10 <sup>-3</sup> M)          |   |   | TC-2 (1×10 <sup>-3</sup> M)          |   |   | TC-3 (1×10 <sup>-3</sup> M)          |   |   |                                    |    |    |



W tym przykładzie substancją słabo wiążącą jest noretynodrel (NE)

#### *Zakończenie testu wiązania konkurencyjnego*

37. Jak pokazano w tabeli 6, z wyjątkiem dołków dotyczących wiązania całkowitego i prób ślepych (dla gorących), w każdym dołku należy umieścić 50 µl bufora testowego oraz wymieszać z 10 µl kontroli z rozpuszczalnikiem, estrogenu odniesienia (E2), substancji słabo wiążącej, substancji innej niż substancja wiążąca i badanych substancji chemicznych, odpowiednio, 10 µl z 5 nM roztworu [3H]-17β-estradolu. Następnie do każdej płytki dodaje się 30 µl lodowatego roztworu receptora i miesza się delikatnie. Roztwór hrERα należy dodać na końcu. Mikropłytki testowe należy inkubować w temperaturze pokojowej (22–28 °C) przez dwie godziny.

**Tabela 6:** Objętość elementów testu w odniesieniu do testu wiązania konkurencyjnego hrER, mikropłytki

| <i>Etapy przygotowania nr pozycji</i>                                                      |                                                                                                                | Inne niż dołki TB | Dołki TB | Próba ślepa (dla gorących) |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|----------|----------------------------|
| Objętość elementów w odniesieniu do powyższych dołków reakcyjnych oraz kolejność dodawania | Bufor testowy w temperaturze pokojowej                                                                         | 50 µl             | 60 µl    | 90 µl                      |
|                                                                                            | Nieoznakowane E2, substancja słabo wiążąca, substancja inna niż substancja wiążąca, rozpuszczalnik oraz badane | 10 µl             | -        | -                          |
|                                                                                            | Stężenie końcowe [3H]-17β-estradolu względem przyrostu 0,5 nM (tj. 5 nM).                                      | 10 µl             | 10 µl    | 10 µl                      |
|                                                                                            | Ustalone stężenie rERα (zob. pkt 12–13)                                                                        | 30 µl             | 30 µl    | -                          |
| Całkowita objętość w każdym dołku testowym                                                 |                                                                                                                | 100 µl            | 100 µl   | 100 µl                     |

\*prawidłowo przygotowane w celu uzyskania stężenia końcowego w ramach dopuszczalnego stężenia rozpuszczalnika

38. Oznaczenie ilościowe [3H]-17β-estradolu związanego z hrERα po oddzieleniu [3H]-17β-estradolu związanego z hrERα od wolnego [3H]-17β-estradolu poprzez dodanie 100 µl lodowatej zawiesiny DCC do każdego dołka należy następnie przeprowadzić jak opisano w dodatku 3 w pkt 21–23 w odniesieniu do testu wiązania nasycenia.

39. Dołki G10–12 oraz H10–12 [oznaczone w tabeli 4 jako próby ślepe (dla gorących)] reprezentują DPM estradiolu oznakowanego [3H] w 10 µl. Podwielokrotność 10 µl należy dodać bezpośrednio do płynu scyntylacyjnego.

#### **Kryteria dopuszczalności**

##### *Test wiązania nasycenia*

40. Krzywa wiązania specyficznego powinna osiągnąć stan równowagi, ponieważ zastosowano zwiększające się stężenia [3H]-17β-estradolu, wskazujące na nasycenie hrERα ligandem.

41. Wiązanie specyficzne przy 0,5 nM [3H]-17β-estradolu powinno mieścić się w dopuszczalnym zakresie 30–50 % średniej zmierzonej całkowitej radioaktywności dodanej we wszystkich seriach badawczych. Sporadyczne niewielkie odchylenia poza ten zakres są dopuszczalne, ale jeśli wyniki serii badawczych systematycznie nie mieszczą się

w tym zakresie lub wynik danej serii badawczej wychodzi znacznie poza ten zakres, należy dostosować stężenie białka i powtórzyć test nasycenia.

42. Dane powinny tworzyć liniowy wykres Scatcharda.

43. Wiązania nieswoiste nie powinny być nadmierne. Wartość dla wiązań nieswoistych powinna zazwyczaj wynosić  $< 35\%$  wiązań całkowitych. Stosunek ten może jednak sporadycznie przekraczać tę granicę przy pomiarze bardzo niskich DPM dla najniższego stężenia badanego  $17\beta$ -estradiolu znakowanego izotopem.

#### *Test wiązania konkurencyjnego*

44. Zwiększające się stężenia nieoznakowanego  $17\beta$ -estradiolu powinny wyprzeć  $[^3\text{H}]-17\beta$ -estradiol z receptora w sposób zgodny z jednoobszarowym wiązaniem konkurencyjnym.

45. Wartość  $\text{IC}_{50}$  dla estrogeny odniesienia (tj.  $17\beta$ -estradiolu) powinna być w przybliżeniu równa stężeniu molowemu  $[^3\text{H}]-17\beta$ -estradiolu powiększonemu o  $K_d$  oznaczony w teście wiązania nasycenia.

46. Całkowite wiązanie specyficzne powinno być spójne w dopuszczalnym zakresie  $40 \pm 10\%$ , gdy średnie zmierzone stężenie całkowitej radioaktywności dodanej do każdego dołka wynosi  $0,5\text{ nM}$  we wszystkich seriach badawczych. Sporadyczne niewielkie odchylenia poza ten zakres są dopuszczalne, ale jeśli wyniki serii badawczych systematycznie nie mieszczą się w tym zakresie lub wynik danej serii badawczej wychodzi znacznie poza ten zakres, należy dostosować stężenie białka.

47. Rozpuszczalnik nie powinien powodować zmiany czułości ani odtwarzalności testu. Wyniki kontroli z rozpuszczalnikiem (dołki z wiązaniem całkowitym) porównuje się z wynikami kontroli z buforem w celu sprawdzenia, czy zastosowany rozpuszczalnik nie ma wpływu na system testu. Wyniki kontroli wiązania całkowitego i kontroli z buforem powinny być porównywalne, jeżeli rozpuszczalnik nie wpływa na test.

48. Substancja inna niż substancja wiążąca nie powinna wypierać więcej niż  $25\%$   $[^3\text{H}]-17\beta$ -estradiolu z  $\text{hrER}\alpha$  podczas badania do  $10^{-3}\text{ M}$  (OTES) lub  $10^{-4}\text{ M}$  (DBP).

49. Opracowano kryteria efektywności dla estrogeny odniesienia i dwóch substancji słabo wiążących (np. noretynodrel, noretynodron) z wykorzystaniem danych z badania walidacyjnego dotyczącego testu wiązania  $\text{hrER}$  CERI (załącznik N do 2 pozycji bibliografii).  $95\%$  przedziały ufności podano w odniesieniu do średniej  $\pm\text{SD}$  (n) wszystkich kontrolnych serii badawczych przeprowadzanych w czterech laboratoriach, które wzięły udział w badaniu walidacyjnym.  $95\%$  przedziały ufności obliczono dla parametrów dopasowania krzywej (tj. najwyższa wartość, najniższa wartość, krzywa Hilla, logarytm  $\text{IC}_{50}$ ) dla estrogeny odniesienia i substancji słabo wiążących oraz dla  $\log_{10}\text{RBA}$  substancji słabo wiążących w stosunku do estrogeny odniesienia. W tabeli 1 przedstawiono oczekiwane zakresy parametrów dopasowania krzywej, które mogą być wykorzystane jako kryteria efektywności. W praktyce zakres  $\text{IC}_{50}$  może się nieznacznie różnić w zależności od

doświadczalnie wyprowadzonego  $K_d$  preparatu receptora i stężenia ligandu wykorzystanego w teście.

50. Nie opracowano kryteriów efektywności w odniesieniu do parametrów dopasowania krzywej dla badanych substancji chemicznych ze względu na szeroki wachlarz istniejących potencjalnych badanych substancji chemicznych i zmienność potencjalnych powinowactw i wyników (np. pełna krzywa, krzywa częściowa, brak dopasowania krzywej). Dokonując przeglądu wyników z każdej serii badawczej badanej substancji chemicznej, należy jednak przyjąć profesjonalny osąd. Należy zastosować wystarczający zakres stężeń badanej substancji chemicznej, aby wyraźnie określić najwyższą wartość (np. 90–100 % wiązania) konkurencyjnej krzywej. Zmienność wśród kontrprób przy każdym stężeniu badanej substancji chemicznej, jak również wśród 3 niejednoczesnych serii badawczych powinna być uzasadniona i poparta naukowo. Kontrole z każdej serii badawczej badanej substancji chemicznej powinny zbliżać się do miar efektywności zgłoszonych dla tego testu CERI i powinny być spójne z danymi historycznymi dotyczącymi kontroli z każdego odpowiedniego laboratorium.

## **ANALIZA DANYCH**

### **Test wiązania nasycenia**

51. Dokonuje się pomiaru zarówno wiązania całkowitego, jak i nieswoistego. W przypadku tych wartości wiązanie swoiste wzrastających stężeń [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -estradiolu w warunkach równowagi jest obliczane przez odjęcie wiązania nieswoistego od całkowitego. Wykres stężenia wiązań specyficznych w porównaniu ze stężeniem [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -estradiolu powinien osiągnąć plateau dla maksymalnego wiązania specyficznego wskazującego na nasycenie hrER $\alpha$  [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -estradiolem. Ponadto analiza danych powinna dokumentować wiązanie estradiolu [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -estradiolu z pojedynczym obszarem wiązania o wysokim powinowactwie. Wiązanie nieswoiste, całkowite i swoiste powinno być prezentowane na krzywej wiązania nasycenia. W dalszej analizie tych danych należy wykorzystać analizę regresji nieliniowej (np. BioSoft; McPherson 1985; Motulsky 1995) z końcowym prezentowaniem danych w formie wykresu Scatcharda.
52. W analizie danych należy określić  $B_{\text{max}}$  i  $K_d$  wyłącznie na podstawie danych dotyczących wiązania całkowitego, przy założeniu, że wiązanie nieswoiste jest liniowe, chyba że podano uzasadnienie dla zastosowania innej metody. Ponadto przy określaniu najlepszego dopasowania należy stosować regresję odpornościową, chyba że zostanie podane uzasadnienie. Należy podać metodę wybraną dla regresji odpornościowej. Korektę obniżenia stężenia ligandu (np. przy użyciu metody na podstawie Swillens 1995) należy zawsze stosować przy określaniu  $B_{\text{max}}$  i  $K_d$  na podstawie danych dotyczących wiązania nasycenia.

### **Test wiązania konkurencyjnego**

53. Krzywa wiązania konkurencyjnego jest wykreślona jako krzywa wiązania specyficznego [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -estradiolu w stosunku do stężenia (log10 jednostek) konkurenta. Stężenie badanej substancji chemicznej, która hamuje 50 % maksymalnego wiązania specyficznego [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -estradiolu, jest wartością IC<sub>50</sub>.
54. Szacunki wartości logarytmu (IC<sub>50</sub>) dla kontroli dodatnich (np. estrogen odniesienia i substancja słabo wiążąca) należy określić, wykorzystując właściwe oprogramowanie dopasowane do krzywej nieliniowej, aby pasowały do równania Hilla o czterech parametrach (np. BioSoft; McPherson 1985; Motulsky 1995). Najwyższą wartość, najniższą wartość, krzywą Hilla i logarytm IC<sub>50</sub> należy zasadniczo pozostawić bez ograniczeń przy dopasowywaniu tych krzywych. Regresję odpornościową należy stosować przy określaniu najlepszego dopasowania, chyba że podane zostanie uzasadnienie. Nie należy stosować korekty obniżenia stężenia ligandu. Po przeprowadzeniu analizy wstępnej każda krzywa wiązania powinna zostać poddana przeglądowi w celu zapewnienia odpowiedniego dopasowania do modelu. Względne powinowactwo wiązania (RBA) w odniesieniu do substancji słabo wiążącej należy obliczać jako procent logarytmu (IC<sub>50</sub>) dla substancji słabo wiążącej względem logarytmu (IC<sub>50</sub>) dla 17 $\beta$ -estradiolu. Wyniki kontroli dodatnich i kontroli substancji innych niż substancja wiążąca powinny być oceniane przy użyciu pomiarów efektywności testu określonych w pkt 44–49 niniejszego dodatku 3.
55. Dane dotyczące wszystkich badanych substancji chemicznych należy analizować na zasadzie stopniowego podejścia, aby zapewnić odpowiednią analizę danych i właściwą klasyfikację każdej krzywej wiązania konkurencyjnego. Zaleca się, aby każda seria badawcza badanej substancji chemicznej została wstępnie poddana znormalizowanej analizie danych, która jest identyczna z analizą stosowaną w przypadku kontroli estrogenu odniesienia i substancji słabo wiążącej (zob. pkt 54 niniejszego dodatku 3). Po zakończeniu należy przeprowadzić przegląd techniczny parametrów dopasowania krzywej, jak również wizualny przegląd stopnia, w jakim dane pasują do wygenerowanej krzywej wiązania konkurencyjnego dla każdej serii badawczej. W trakcie tego przeglądu technicznego obserwacje zależnego od stężenia spadku w procentach [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -estradiolu związanego specyficzenie, małej zmienności pomiędzy kontrpróbami technicznymi przy stężeniu każdej badanej substancji chemicznej oraz spójności parametrów dopasowania pomiędzy trzema seriami badawczymi stanowią dobrą wskazówkę, że test i analizy danych zostały przeprowadzone prawidłowo.

### **Interpretacja danych**

56. O ile spełnione są wszystkie kryteria dopuszczalności, badaną substancję chemiczną uważa się za substancję wiążącą w odniesieniu do hrER $\alpha$ , jeżeli krzywa wiązania może być dopasowana, a najniższy punkt na krzywej reakcji w zakresie danych wynosi mniej niż 50 % (rysunek 1).
57. O ile spełnione są wszystkie kryteria dopuszczalności, badaną substancję chemiczną uważa się za substancję inną niż substancja wiążąca w odniesieniu do hrER $\alpha$ , jeśli:

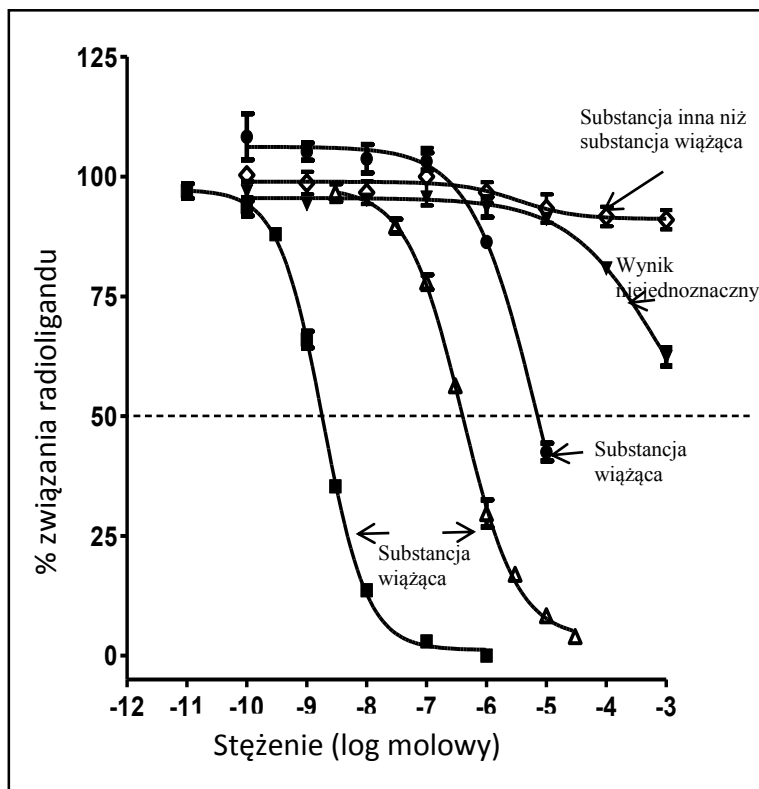
- krzywa wiązania może być dopasowana, a najniższy punkt na dopasowanej krzywej reakcji w zakresie danych wynosi powyżej 75 %, lub
- krzywa wiązania nie może być dopasowana, a najniższy niewygładzony średni procent wiązania wśród grup stężeń w danych wynosi powyżej 75 %.

58. Badane substancje chemiczne uważa się za niejednoznaczne, jeśli zostanie spełniony żaden z powyższych warunków (np. najniższy punkt na dopasowanej krzywej reakcji mieści się pomiędzy 76 a 51 %).

**Tabela 7:** Kryteria przypisywania klasyfikacji na podstawie krzywej wiązania konkurencyjnego w odniesieniu do badanej substancji chemicznej.

| Klasyfikacja                                        | Kryteria                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|-----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Substancja wiążąca <sup>a</sup>                     | Krzywa wiązania może być dopasowana.<br><ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Najniższy punkt na krzywej reakcji w zakresie danych wynosi mniej niż 50 %.</b></li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                |
| Substancja inna niż substancja wiążąca <sup>b</sup> | Jeżeli krzywa wiązania może być dopasowana,<br><ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>najniższy punkt na dopasowanej krzywej reakcji w zakresie danych wynosi powyżej 75 %.</b></li> </ul> Jeżeli krzywa wiązania nie może być dopasowana,<br><ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>najniższy niewygładzony średni odsetek wiązania wśród grup stężeń w danych wynosi powyżej 75 %.</b></li> </ul> |
| Wynik niejednoznaczny <sup>c</sup>                  | Każda sprawdzalna seria badawcza, która nie dotyczy substancji wiążącej, ani substancji innej niż substancja wiążąca (np. najniższy punkt na dopasowanej krzywej reakcji mieści się w granicach 76–51 %).                                                                                                                                                                                                     |

**Rysunek 1:** Przykłady klasyfikacji badanej substancji chemicznej z wykorzystaniem krzywej wiązania konkurencyjnego.



59. Wielokrotne serie badawcze prowadzone w laboratorium w przypadku badanej substancji chemicznej są łączone poprzez przypisanie wartości liczbowych do każdej serii badawczej i uśrednienie wszystkich serii, jak pokazano w tabeli 8. Wyniki połączonych serii badawczych w każdym laboratorium są porównywane z oczekiwaną klasyfikacją każdej badanej substancji chemicznej.

**Tabela 8:** Metoda klasyfikacji badanej substancji chemicznej z wykorzystaniem wielu serii badawczych w laboratorium

| Przypisanie wartości do każdej serii badawczej:                               |                          |
|-------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| Klasyfikacja                                                                  | Wartość liczbową         |
| Substancja wiążąca                                                            | 2                        |
| Wynik niejednoznaczny                                                         | 1                        |
| Substancja inna niż substancja wiążąca                                        | 0                        |
| Klasyfikacja średniej wartości liczbowej w poszczególnych seriach badawczych: |                          |
| Klasyfikacja                                                                  | Wartość liczbową         |
| Substancja wiążąca                                                            | $\bar{S} \geq 1,5$       |
| Wynik niejednoznaczny                                                         | $0,5 \leq \bar{S} < 1,5$ |
| Substancja inna niż substancja wiążąca                                        | $\bar{S} < 0,5$          |

60. Zob. pkt 24 „ELEMENTÓW TESTU WIĄZANIA hrER” w niniejszej metodzie badawczej.

### **Dodatek 3.1**

#### **WYKAZ POJĘĆ**

**[<sup>3</sup>H]E2:** 17β-estradiol znakowany izotopem z trytem

**DCC:** węgiel drzewny pokryty dekstranem

**E2:** nieoznakowany 17β-estradiol (obojętny)

**Bufor testowy:** 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, zawierający 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaVO<sub>3</sub>, 10 % gliceryny, 0,2 mM leupeptinu, 1 mM ditiotreitolu i 10 mg/ml albuminy surowicy bydlęcej.

**hrERα:** ludzki rekombinowany receptor estrogenowy alfa (domena wiążąca ligand)

**Kontrpróba:** jeden z wielu dołków, które mają tę samą zawartość z tym samym stężeniem i są poddawane testowi jednocześnie w ramach jednej serii badawczej. W niniejszym protokole każde stężenie badanej substancji chemicznej jest badane w trzech powtórzeniach; oznacza to, że istnieją trzy kontrpróby, które są testowane jednocześnie przy każdym stężeniu badanej substancji chemicznej.

**Seria badawcza:** pełen zestaw poddawanych jednocześnie serii badawczej dołków mikropłytki, który dostarcza wszelkich informacji niezbędnych do scharakteryzowania wiązania badanej substancji chemicznej z hrERα (tj. całkowity [<sup>3</sup>H]-17β-estradiol dodany do dołka testowego, maksymalne wiązanie [<sup>3</sup>H]-17β-estradiolu z hrERα, wiązanie niespecyficzne, oraz wiązanie całkowite przy różnych stężeniach badanej substancji chemicznej). W serii badawczej można wykorzystać tylko jeden dołek (tj. kontrpróbę) na każde stężenie, ale ponieważ niniejszy protokół wymaga trzykrotnego przeprowadzania testu, w jednej analizie wykorzystuje się trzy dołki na każde stężenie. Niniejszy protokół wymaga ponadto przeprowadzenia trzech niezależnych (tj. nierównoczesnych) serii badawczych w odniesieniu do każdej substancji chemicznej.



### Dodatek 3.2

#### ROZKŁAD DOŁKÓW W TEŚCIE WIĄZANIA KONKURENCYJNEGO

| Płytki | Pozycja | Kontrpróba | Rodzaj dolki | Kod dolki | Kod stężenia | Stężenie początkowe konkurenta (M) | Roztwór podstawowy hr-ER (μl) | Objętość buforu (μl) | Objętość znacznika (gorącego E2) (μl) | Objętość z płytki do rozcieńczeń (μl) | Ostateczna objętość (μl) | Stężenie końcowe konkurenta (M) |
|--------|---------|------------|--------------|-----------|--------------|------------------------------------|-------------------------------|----------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| S      | A1      | 1          | Ślepa próba  | BK        | BK1          | —                                  | —                             | —                    | —                                     | —                                     | —                        | —                               |
| S      | A2      | 2          | Ślepa próba  | BK        | BK2          | —                                  | —                             | —                    | —                                     | —                                     | —                        | —                               |
| S      | A3      | 3          | Ślepa próba  | BK        | BK3          | —                                  | —                             | —                    | —                                     | —                                     | —                        | —                               |
| S      | B1      | 1          | zimne E2     | S         | S1           | 1,00E-10                           | 30                            | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-11                         |
| S      | B2      | 2          | zimne E2     | S         | S1           | 1,00E-10                           | 30                            | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-11                         |
| S      | B3      | 3          | zimne E2     | S         | S1           | 1,00E-10                           | 30                            | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-11                         |
| S      | C1      | 1          | zimne E2     | S         | S2           | 1,00E-09                           | 30                            | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-10                         |
| S      | C2      | 2          | zimne E2     | S         | S2           | 1,00E-09                           | 30                            | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-10                         |
| S      | C3      | 3          | zimne E2     | S         | S2           | 1,00E-09                           | 30                            | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-10                         |
| S      | D1      | 1          | zimne E2     | S         | S3           | 3,16E-09                           | 30                            | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 3,2E-10                         |
| S      | D2      | 2          | zimne E2     | S         | S3           | 3,16E-09                           | 30                            | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 3,2E-10                         |
| S      | D3      | 3          | zimne E2     | S         | S3           | 3,16E-09                           | 30                            | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 3,2E-10                         |
| S      | E1      | 1          | zimne E2     | S         | S4           | 1,00E-08                           | 30                            | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-09                         |
| S      | E2      | 2          | zimne E2     | S         | S4           | 1,00E-08                           | 30                            | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-09                         |
| S      | E3      | 3          | zimne E2     | S         | S4           | 1,00E-08                           | 30                            | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-09                         |
| S      | F1      | 1          | zimne E2     | S         | S5           | 3,16E-08                           | 30                            | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 3,2E-09                         |
| S      | F2      | 2          | zimne E2     | S         | S5           | 3,16E-08                           | 30                            | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 3,2E-09                         |
| S      | F3      | 3          | zimne E2     | S         | S5           | 3,16E-08                           | 30                            | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 3,2E-09                         |
| S      | G1      | 1          | zimne E2     | S         | S6           | 1,00E-07                           | 30                            | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-08                         |
| S      | G2      | 2          | zimne E2     | S         | S6           | 1,00E-07                           | 30                            | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-08                         |
| S      | G3      | 3          | zimne E2     | S         | S6           | 1,00E-07                           | 30                            | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-08                         |
| S      | H1      | 1          | zimne E2     | S         | S7           | 1,00E-06                           | 30                            | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-07                         |
| S      | H2      | 2          | zimne E2     | S         | S7           | 1,00E-06                           | 30                            | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-07                         |
| S      | H3      | 3          | zimne E2     | S         | S7           | 1,00E-06                           | 30                            | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-07                         |
| S      | A4      | 1          | noretynodrel | NE        | WP1          | 1,00E-08                           | 30                            | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-09                         |
| S      | A5      | 2          | noretynodrel | NE        | WP1          | 1,00E-08                           | 30                            | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-09                         |
| S      | A6      | 3          | noretynodrel | NE        | WP1          | 1,00E-08                           | 30                            | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-09                         |
| S      | B4      | 1          | noretynodrel | NE        | WP2          | 1,00E-07                           | 30                            | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-08                         |
| S      | B5      | 2          | noretynodrel | NE        | WP2          | 1,00E-07                           | 30                            | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-08                         |
| S      | B6      | 3          | noretynodrel | NE        | WP2          | 1,00E-07                           | 30                            | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-08                         |
| S      | C4      | 1          | noretynodrel | NE        | WP3          | 3,16E-07                           | 30                            | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 3,2E-08                         |
| S      | C5      | 2          | noretynodrel | NE        | WP3          | 3,16E-07                           | 30                            | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 3,2E-08                         |
| S      | C6      | 3          | noretynodrel | NE        | WP3          | 3,16E-07                           | 30                            | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 3,2E-08                         |
| S      | D4      | 1          | noretynodrel | NE        | WP4          | 1,00E-06                           | 30                            | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-07                         |
| S      | D5      | 2          | noretynodrel | NE        | WP4          | 1,00E-06                           | 30                            | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-07                         |
| S      | D6      | 3          | noretynodrel | NE        | WP4          | 1,00E-06                           | 30                            | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-07                         |
| S      | E4      | 1          | noretynodrel | NE        | WP5          | 3,16E-06                           | 30                            | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 3,2E-07                         |
| S      | E5      | 2          | noretynodrel | NE        | WP5          | 3,16E-06                           | 30                            | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 3,2E-07                         |
| S      | E6      | 3          | noretynodrel | NE        | WP5          | 3,16E-06                           | 30                            | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 3,2E-07                         |
| S      | F4      | 1          | noretynodrel | NE        | WP6          | 1,00E-05                           | 30                            | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-06                         |
| S      | F5      | 2          | noretynodrel | NE        | WP6          | 1,00E-05                           | 30                            | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-06                         |
| S      | F6      | 3          | noretynodrel | NE        | WP6          | 1,00E-05                           | 30                            | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-06                         |
| S      | G4      | 1          | noretynodrel | NE        | WP7          | 3,16E-05                           | 30                            | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 3,2E-06                         |
| S      | G5      | 2          | noretynodrel | NE        | WP7          | 3,16E-05                           | 30                            | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 3,2E-06                         |
| S      | G6      | 3          | noretynodrel | NE        | WP7          | 3,16E-05                           | 30                            | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 3,2E-06                         |

# Rozkład dołków w teście wiązania konkurencyjnego

| Płytki | Pozycja | Kontrpróba | Rodzaj dolka     | Kod dolka | Kod stężenia | Stężenie początkowe konkurenta (M) | Roztwór podstawowy hrER (μl) | Objętość buforu (μl) | Objętość znacznika (gorącego E2) (μl) | Objętość z płytki do rozcieńczeń (μl) | Ostateczna objętość (μl) | Stężenie końcowe konkurenta (M) |
|--------|---------|------------|------------------|-----------|--------------|------------------------------------|------------------------------|----------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| S      | H4      | 1          | noretynodrel     | NE        | WP8          | 3,16E-04                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 3,2E-05                         |
| S      | H5      | 2          | noretynodrel     | NE        | WP8          | 3,16E-04                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 3,2E-05                         |
| S      | H6      | 3          | noretynodrel     | NE        | WP8          | 3,16E-04                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 3,2E-05                         |
| S      | A7      | 1          | OTES             | N         | OTES1        | 1,00E-09                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-10                         |
| S      | A8      | 2          | OTES             | N         | OTES1        | 1,00E-09                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-10                         |
| S      | A9      | 3          | OTES             | N         | OTES1        | 1,00E-09                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-10                         |
| S      | B7      | 1          | OTES             | N         | OTES2        | 1,00E-08                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-09                         |
| S      | B8      | 2          | OTES             | N         | OTES2        | 1,00E-08                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-09                         |
| S      | B9      | 3          | OTES             | N         | OTES2        | 1,00E-08                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-09                         |
| S      | C7      | 1          | OTES             | N         | OTES3        | 1,00E-07                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-08                         |
| S      | C8      | 2          | OTES             | N         | OTES3        | 1,00E-07                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-08                         |
| S      | C9      | 3          | OTES             | N         | OTES3        | 1,00E-07                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-08                         |
| S      | D7      | 1          | OTES             | N         | OTES4        | 1,00E-06                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-07                         |
| S      | D8      | 2          | OTES             | N         | OTES4        | 1,00E-06                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-07                         |
| S      | D9      | 3          | OTES             | N         | OTES4        | 1,00E-06                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-07                         |
| S      | E7      | 1          | OTES             | N         | OTES5        | 1,00E-05                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-06                         |
| S      | E8      | 2          | OTES             | N         | OTES5        | 1,00E-05                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-06                         |
| S      | E9      | 3          | OTES             | N         | OTES5        | 1,00E-05                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-06                         |
| S      | F7      | 1          | OTES             | N         | OTES6        | 1,00E-04                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-05                         |
| S      | F8      | 2          | OTES             | N         | OTES6        | 1,00E-04                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-05                         |
| S      | F9      | 3          | OTES             | N         | OTES6        | 1,00E-04                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-05                         |
| S      | G7      | 1          | OTES             | N         | OTES7        | 1,00E-03                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-04                         |
| S      | G8      | 2          | OTES             | N         | OTES7        | 1,00E-03                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-04                         |
| S      | G9      | 3          | OTES             | N         | OTES7        | 1,00E-03                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-04                         |
| S      | H7      | 1          | OTES             | N         | OTES8DBP7    | 1,00E-02                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-03                         |
| S      | H8      | 2          | OTES             | N         | OTES88       | 1,00E-02                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-03                         |
| S      | H9      | 3          | OTES             | N         | OTES8        | 1,00E-02                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-03                         |
| S      | A10     | 1          | wiązanie         | TB        | TB1          | -                                  | 30                           | 60                   | 10                                    | -                                     | 100                      | -                               |
| S      | A11     | 2          | wiązanie         | TB        | TB2          | -                                  | 30                           | 60                   | 10                                    | -                                     | 100                      | -                               |
| S      | A12     | 3          | wiązanie         | TB        | TB3          | -                                  | 30                           | 60                   | 10                                    | -                                     | 100                      | -                               |
| S      | B10     | 4          | wiązanie         | TB        | TB4          | -                                  | 30                           | 60                   | 10                                    | -                                     | 100                      | -                               |
| S      | B11     | 5          | wiązanie         | TB        | TB5          | -                                  | 30                           | 60                   | 10                                    | -                                     | 100                      | -                               |
| S      | B12     | 6          | wiązanie         | TB        | TB6          | -                                  | 30                           | 60                   | 10                                    | -                                     | 100                      | -                               |
| S      | C10     | 1          | zimne E2         | NSB       | S1           | 1,00E-05                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-06                         |
| S      | C11     | 2          | zimne E2         | NSB       | S2           | 1,00E-05                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-06                         |
| S      | C12     | 3          | zimne E2         | NSB       | S3           | 1,00E-05                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-06                         |
| S      | D10     | 4          | zimne E2         | NSB       | S4           | 1,00E-05                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-06                         |
| S      | D11     | 5          | zimne E2         | NSB       | S5           | 1,00E-05                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-06                         |
| S      | D12     | 6          | zimne E2         | NSB       | S6           | 1,00E-05                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-06                         |
| S      | E10     | 1          | Kontrola         | BC        | BC1          | -                                  | -                            | 100                  | -                                     | -                                     | 100                      | -                               |
| S      | E11     | 2          | Kontrola         | BC        | BC2          | -                                  | -                            | 100                  | -                                     | -                                     | 100                      | -                               |
| S      | E12     | 3          | Kontrola         | BC        | BC3          | -                                  | -                            | 100                  | -                                     | -                                     | 100                      | -                               |
| S      | F10     | 4          | Kontrola         | BC        | BC4          | -                                  | -                            | 100                  | -                                     | -                                     | 100                      | -                               |
| S      | F11     | 5          | Kontrola         | BC        | BC5          | -                                  | -                            | 100                  | -                                     | -                                     | 100                      | -                               |
| S      | F12     | 6          | Kontrola         | BC        | BC6          | -                                  | -                            | 100                  | -                                     | -                                     | 100                      | -                               |
| S      | G10*    | 1          | Próba ślepa (dla | Gorąca    | H1           | -                                  | 90                           | -                    | 10                                    | -                                     | 100                      | -                               |
| S      | G11*    | 2          | Próba ślepa (dla | Gorąca    | H2           | -                                  | 90                           | -                    | 10                                    | -                                     | 100                      | -                               |
| S      | G12*    | 3          | Próba ślepa (dla | Gorąca    | H3           | -                                  | 90                           | -                    | 10                                    | -                                     | 100                      | -                               |
| S      | H10*    | 4          | Próba ślepa (dla | Gorąca    | H4           | -                                  | 90                           | -                    | 10                                    | -                                     | 100                      | -                               |
| S      | H11*    | 5          | Próba ślepa (dla | Gorąca    | H5           | -                                  | 90                           | -                    | 10                                    | -                                     | 100                      | -                               |
| S      | H12     | 6          | Próba ślepa (dla | Gorąca    | H6           | -                                  | 90                           | -                    | 10                                    | -                                     | 100                      | -                               |

\*: Należy pamiętać, że „gorące” dołki są puste podczas inkubacji. 10 μl dodaje się tylko w celu zliczania scyntytacji.

# Rozkład dolków w teście wiązania konkurencyjnego

| Płytki | Pozycja | Kontrpróba | Rodzaj dolka | Kod dolka | Kod stężenia | Stężenie początkowe konkurenta (M) | Roztwór podstawowy hrER (μl) | Objętość buforu (μl) | Objętość znacznika (gorącego E2) (μl) | Objętość z płytki do rozcieńczeń (μl) | Ostateczna objętość (μl) | Stężenie końcowe konkurenta (M) |
|--------|---------|------------|--------------|-----------|--------------|------------------------------------|------------------------------|----------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| P1     | A1      | 1          | Nieznany 1   | U1        | 1            | 1,00E-09                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-10                         |
| P1     | A2      | 2          | Nieznany 1   | U1        | 1            | 1,00E-09                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-10                         |
| P1     | A3      | 3          | Nieznany 1   | U1        | 1            | 1,00E-09                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-10                         |
| P1     | B1      | 1          | Nieznany 1   | U1        | 2            | 1,00E-08                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-09                         |
| P1     | B2      | 2          | Nieznany 1   | U1        | 2            | 1,00E-08                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-09                         |
| P1     | B3      | 3          | Nieznany 1   | U1        | 2            | 1,00E-08                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-09                         |
| P1     | C1      | 1          | Nieznany 1   | U1        | 3            | 1,00E-07                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-08                         |
| P1     | C2      | 2          | Nieznany 1   | U1        | 3            | 1,00E-07                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-08                         |
| P1     | C3      | 3          | Nieznany 1   | U1        | 3            | 1,00E-07                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-08                         |
| P1     | D1      | 1          | Nieznany 1   | U1        | 4            | 1,00E-06                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-07                         |
| P1     | D2      | 2          | Nieznany 1   | U1        | 4            | 1,00E-06                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-07                         |
| P1     | D3      | 3          | Nieznany 1   | U1        | 4            | 1,00E-06                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-07                         |
| P1     | E1      | 1          | Nieznany 1   | U1        | 5            | 1,00E-05                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-06                         |
| P1     | E2      | 2          | Nieznany 1   | U1        | 5            | 1,00E-05                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-06                         |
| P1     | E3      | 3          | Nieznany 1   | U1        | 5            | 1,00E-05                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-06                         |
| P1     | F1      | 1          | Nieznany 1   | U1        | 6            | 1,00E-04                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-05                         |
| P1     | F2      | 2          | Nieznany 1   | U1        | 6            | 1,00E-04                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-05                         |
| P1     | F3      | 3          | Nieznany 1   | U1        | 6            | 1,00E-04                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-05                         |
| P1     | G1      | 1          | Nieznany 1   | U1        | 7            | 1,00E-03                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-04                         |
| P1     | G2      | 2          | Nieznany 1   | U1        | 7            | 1,00E-03                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-04                         |
| P1     | G3      | 3          | Nieznany 1   | U1        | 7            | 1,00E-03                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-04                         |
| P1     | H1      | 1          | Nieznany 1   | U1        | 8            | 1,00E-02                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-03                         |
| P1     | H2      | 2          | Nieznany 1   | U1        | 8            | 1,00E-02                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-03                         |
| P1     | H3      | 3          | Nieznany 1   | U1        | 8            | 1,00E-02                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-03                         |
| P1     | A4      | 1          | Nieznany 2   | U2        | 1            | 1,00E-09                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-10                         |
| P1     | A5      | 2          | Nieznany 2   | U2        | 1            | 1,00E-09                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-10                         |
| P1     | A6      | 3          | Nieznany 2   | U2        | 1            | 1,00E-09                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-10                         |
| P1     | B4      | 1          | Nieznany 2   | U2        | 2            | 1,00E-08                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-09                         |
| P1     | B5      | 2          | Nieznany 2   | U2        | 2            | 1,00E-08                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-09                         |
| P1     | B6      | 3          | Nieznany 2   | U2        | 2            | 1,00E-08                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-09                         |
| P1     | C4      | 1          | Nieznany 2   | U2        | 3            | 1,00E-07                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-08                         |
| P1     | C5      | 2          | Nieznany 2   | U2        | 3            | 1,00E-07                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-08                         |
| P1     | C6      | 3          | Nieznany 2   | U2        | 3            | 1,00E-07                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-08                         |
| P1     | D4      | 1          | Nieznany 2   | U2        | 4            | 1,00E-06                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-07                         |
| P1     | D5      | 2          | Nieznany 2   | U2        | 4            | 1,00E-06                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-07                         |
| P1     | D6      | 3          | Nieznany 2   | U2        | 4            | 1,00E-06                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-07                         |
| P1     | E4      | 1          | Nieznany 2   | U2        | 5            | 1,00E-05                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-06                         |
| P1     | E5      | 2          | Nieznany 2   | U2        | 5            | 1,00E-05                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-06                         |
| P1     | E6      | 3          | Nieznany 2   | U2        | 5            | 1,00E-05                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-06                         |
| P1     | F4      | 1          | Nieznany 2   | U2        | 6            | 1,00E-04                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-05                         |
| P1     | F5      | 2          | Nieznany 2   | U2        | 6            | 1,00E-04                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-05                         |
| P1     | F6      | 3          | Nieznany 2   | U2        | 6            | 1,00E-04                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-05                         |
| P1     | G4      | 1          | Nieznany 2   | U2        | 7            | 1,00E-03                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-04                         |
| P1     | G5      | 2          | Nieznany 2   | U2        | 7            | 1,00E-03                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-04                         |
| P1     | G6      | 3          | Nieznany 2   | U2        | 7            | 1,00E-03                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-04                         |
| P1     | H4      | 1          | Nieznany 2   | U2        | 8            | 1,00E-02                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-03                         |
| P1     | H5      | 2          | Nieznany 2   | U2        | 8            | 1,00E-02                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-03                         |
| P1     | H6      | 3          | Nieznany 2   | U2        | 8            | 1,00E-02                           | 30                           | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-03                         |

# Rozkład dolków w teście wiązania konkurencyjnego

| Płytki | Pozycja | Kontrpróba | Rodzaj dolka | Kod dolka | Kod stężenia | Stężenie początkowe konkurenta (M) | Kosztorys podstawowy hrER (μl) | Objętość buforu (μl) | Objętość znacznika (gorącego E2) (μl) | Objętość z płytki do rozcieńczeń (μl) | Ostateczna objętość (μl) | Stężenie końcowe konkurenta (M) |
|--------|---------|------------|--------------|-----------|--------------|------------------------------------|--------------------------------|----------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| P1     | A7      | 1          | Nieznany 3   | U3        | 1            | 1,00E-09                           | 30                             | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-10                         |
| P1     | A8      | 2          | Nieznany 3   | U3        | 1            | 1,00E-09                           | 30                             | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-10                         |
| P1     | A9      | 3          | Nieznany 3   | U3        | 1            | 1,00E-09                           | 30                             | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-10                         |
| P1     | B7      | 1          | Nieznany 3   | U3        | 2            | 1,00E-08                           | 30                             | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-09                         |
| P1     | B8      | 2          | Nieznany 3   | U3        | 2            | 1,00E-08                           | 30                             | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-09                         |
| P1     | B9      | 3          | Nieznany 3   | U3        | 2            | 1,00E-08                           | 30                             | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-09                         |
| P1     | C7      | 1          | Nieznany 3   | U3        | 3            | 1,00E-07                           | 30                             | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-08                         |
| P1     | C8      | 2          | Nieznany 3   | U3        | 3            | 1,00E-07                           | 30                             | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-08                         |
| P1     | C9      | 3          | Nieznany 3   | U3        | 3            | 1,00E-07                           | 30                             | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-08                         |
| P1     | D7      | 1          | Nieznany 3   | U3        | 4            | 1,00E-06                           | 30                             | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-07                         |
| P1     | D8      | 2          | Nieznany 3   | U3        | 4            | 1,00E-06                           | 30                             | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-07                         |
| P1     | D9      | 3          | Nieznany 3   | U3        | 4            | 1,00E-06                           | 30                             | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-07                         |
| P1     | E7      | 1          | Nieznany 3   | U3        | 5            | 1,00E-05                           | 30                             | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-06                         |
| P1     | E8      | 2          | Nieznany 3   | U3        | 5            | 1,00E-05                           | 30                             | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-06                         |
| P1     | E9      | 3          | Nieznany 3   | U3        | 5            | 1,00E-05                           | 30                             | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-06                         |
| P1     | F7      | 1          | Nieznany 3   | U3        | 6            | 1,00E-04                           | 30                             | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-05                         |
| P1     | F8      | 2          | Nieznany 3   | U3        | 6            | 1,00E-04                           | 30                             | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-05                         |
| P1     | F9      | 3          | Nieznany 3   | U3        | 6            | 1,00E-04                           | 30                             | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-05                         |
| P1     | G7      | 1          | Nieznany 3   | U3        | 7            | 1,00E-03                           | 30                             | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-04                         |
| P1     | G8      | 2          | Nieznany 3   | U3        | 7            | 1,00E-03                           | 30                             | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-04                         |
| P1     | G9      | 3          | Nieznany 3   | U3        | 7            | 1,00E-03                           | 30                             | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-04                         |
| P1     | H7      | 1          | Nieznany 3   | U3        | 8            | 1,00E-02                           | 30                             | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-03                         |
| P1     | H8      | 2          | Nieznany 3   | U3        | 8            | 1,00E-02                           | 30                             | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-03                         |
| P1     | H9      | 3          | Nieznany 3   | U3        | 8            | 1,00E-02                           | 30                             | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-03                         |
| P1     | A10     | 1          | Kontrola E2  | S         | E2max1       | 1,00E-06                           | 30                             | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,00E-07                        |
| P1     | A11     | 2          | Kontrola E2  | S         | E2max2       | 1,00E-06                           | 30                             | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,00E-07                        |
| P1     | A12     | 3          | Kontrola E2  | S         | E2max3       | 1,00E-06                           | 30                             | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,00E-07                        |
| P1     | B10     | 1          | Kontrola E2  | S         | E2IC501      | E2IC50x10                          | 30                             | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | E2IC50                          |
| P1     | B11     | 2          | Kontrola E2  | S         | E2IC502      | E2IC50x10                          | 30                             | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | E2IC50                          |
| P1     | B12     | 3          | Kontrola E2  | S         | E2IC503      | E2IC50x10                          | 30                             | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | E2IC50                          |
| P1     | C10     | 1          | Kontrola NE  | S         | Nemax1       | 1,00E-3,5                          | 30                             | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,00E-4,5                       |
| P1     | C11     | 2          | Kontrola NE  | S         | Nemax2       | 1,00E-3,5                          | 30                             | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,00E-4,5                       |
| P1     | C12     | 3          | Kontrola NE  | S         | Nemax3       | 1,00E-3,5                          | 30                             | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,00E-4,5                       |
| P1     | D10     | 1          | Kontrola NE  | S         | NEIC501      | NEIC50 x10                         | 30                             | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | NEIC50                          |
| P1     | D11     | 2          | Kontrola NE  | S         | NEIC502      | NEIC50 x10                         | 30                             | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | NEIC50                          |
| P1     | D12     | 3          | Kontrola NE  | S         | NEIC503      | NEIC50 x10                         | 30                             | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | NEIC50                          |
| P1     | E10     | 1          | zimne E2     | NSB       | S1           | 1,00E-05                           | 30                             | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-06                         |
| P1     | E11     | 2          | zimne E2     | NSB       | S2           | 1,00E-05                           | 30                             | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-06                         |
| P1     | E12     | 3          | zimne E2     | NSB       | S3           | 1,00E-05                           | 30                             | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-06                         |
| P1     | F10     | 4          | zimne E2     | NSB       | S4           | 1,00E-05                           | 30                             | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-06                         |
| P1     | F11     | 5          | zimne E2     | NSB       | S5           | 1,00E-05                           | 30                             | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-06                         |
| P1     | F12     | 6          | zimne E2     | NSB       | S6           | 1,00E-05                           | 30                             | 50                   | 10                                    | 10                                    | 100                      | 1,0E-06                         |
| P1     | G10     | 1          | wiązanie     | TB        | TB1          | -                                  | 30                             | 60                   | 10                                    | -                                     | 100                      | -                               |
| P1     | G11     | 2          | wiązanie     | TB        | TB2          | -                                  | 30                             | 60                   | 10                                    | -                                     | 100                      | -                               |
| P1     | G12     | 3          | wiązanie     | TB        | TB3          | -                                  | 30                             | 60                   | 10                                    | -                                     | 100                      | -                               |
| P1     | H10     | 4          | wiązanie     | TB        | TB4          | -                                  | 30                             | 60                   | 10                                    | -                                     | 100                      | -                               |
| P1     | H11     | 5          | wiązanie     | TB        | TB5          | -                                  | 30                             | 60                   | 10                                    | -                                     | 100                      | -                               |
| P1     | H12     | 6          | wiązanie     | TB        | TB6          | -                                  | 30                             | 60                   | 10                                    | -                                     | 100                      | -                               |

#### **Dodatek 4**

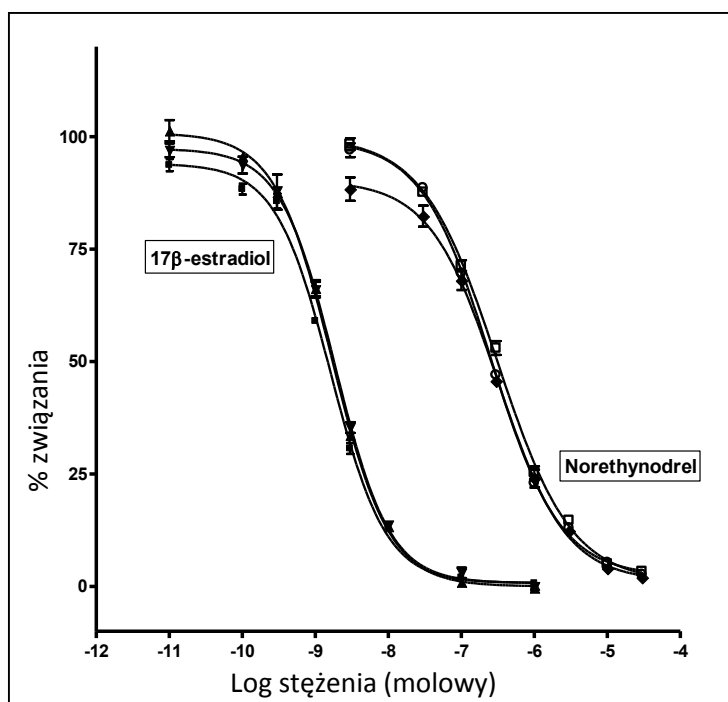
### **UWAGI DOTYCZĄCE ANALIZY DANYCH UZYSKANYCH Z TESTÓW WIĄZANIA KONKURENCYJNEGO HRER**

1. W teście wiązania konkurencyjnego hrER $\alpha$  mierzy się wiązanie pojedynczego stężenia [ $^3\text{H}$ ]17 $\beta$ -estradiolu w obecności rosnących stężeń badanej substancji chemicznej. Krzywa wiązania konkurencyjnego jest wykreślona jako krzywa wiązania specyficznego [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -estradiolu w stosunku do stężenia (log10 jednostek) konkurenta. Stężenie badanej substancji chemicznej, która hamuje 50 % maksymalnego wiązania specyficznego [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -estradiolu jest wartością IC<sub>50</sub>.

#### **Analiza danych w odniesieniu do estrogenu referencyjnego i substancji słabo wiążącej (1)**

2. Dane uzyskane z kontrolnych serii badawczych przekształca się (tj. procent specyficznego wiązania [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -estradiolu oraz logarytmu stężenia badanej substancji chemicznej) na potrzeby dalszej analizy. Szacunki wartości logarytmu (IC<sub>50</sub>) dla kontroli dodatnich (np. estrogen odniesienia i substancja słabo wiążąca) należy określić, wykorzystując właściwe oprogramowanie dopasowane do krzywej nieliniowej, aby pasowały do równania Hilla o czterech parametrach tj. (np. BioSoft; GraphPad Prism) (2). Najwyższą wartość, najniższą wartość, krzywą Hilla i log(IC<sub>50</sub>) można zasadniczo pozostawić bez ograniczeń przy dopasowywaniu tych krzywych. Regresję odpornościową należy stosować przy określaniu najlepszego dopasowania, chyba że podane zostanie uzasadnienie. Należy podać metodę wybraną dla regresji odpornościowej. Nie było potrzeby zastosowania korekty obniżenia stężenia ligandu w przypadku testów hrER Freybergera–Wilsona lub CERi, ale w stosownych przypadkach można to rozważyć. Po przeprowadzeniu analizy wstępnej każda krzywa wiązania powinna zostać poddana przeglądowi w celu zapewnienia odpowiedniego dopasowania do modelu. Względne powinowactwo wiązania (RBA) w odniesieniu do substancji słabo wiążącej można obliczać jako procent logarytmu (IC<sub>50</sub>) dla substancji słabo wiążącej względem logarytmu (IC<sub>50</sub>) dla 17 $\beta$ -estradiolu. Wyniki dotyczące kontroli dodatnich i kontroli substancji innych niż substancja wiążąca należy oceniać przy użyciu pomiarów efektywności testu i kryteriów dopuszczalności opisanych w niniejszej metodzie badawczej (pkt 20), dodatku 2 (test Freybergera–Wilsona, pkt 41–51) oraz w dodatku 3 (test CERi, pkt 41–51). Przykłady trzech prób serii badawczych dotyczących estrogenów odniesienia i substancji słabo wiążących przedstawiono na rysunku 1.

**Rysunek 1.** Przykłady krzywych wiązania konkurencyjnego dla estrogenu odniesienia kontrolnej substancji słabo wiążącej.

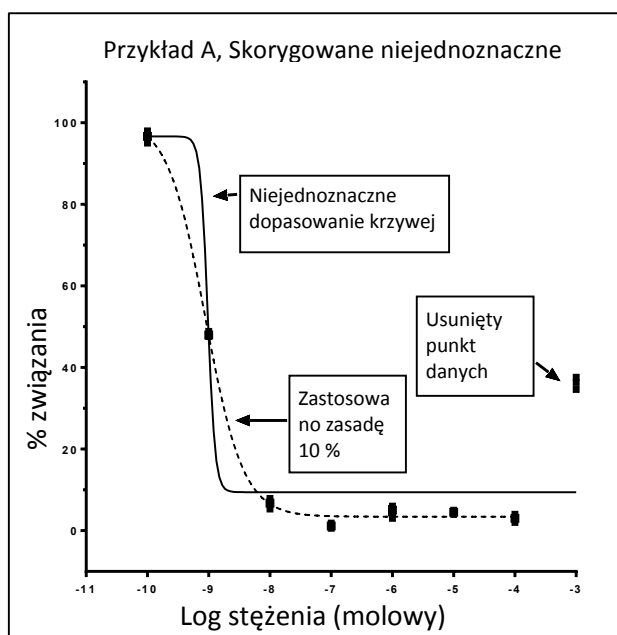


### Analiza danych dotycząca badanych substancji chemicznych

3. Dane dotyczące wszystkich badanych substancji chemicznych należy analizować na zasadzie stopniowego podejścia, aby zapewnić odpowiednią analizę danych i właściwą klasyfikację każdej krzywej wiązania konkurencyjnego. Każdą serię badawczą w odniesieniu do badanej substancji chemicznej należy wstępnie poddać znormalizowanej analizie danych, która jest identyczna z analizą stosowaną w przypadku kontroli estrogenu odniesienia i substancji słabo wiążącej. Po zakończeniu należy przeprowadzić przegląd techniczny parametrów dopasowania krzywej, jak również wizualny przegląd stopnia, w jakim dane pasują do wygenerowanej krzywej wiązania konkurencyjnego dla każdej serii badawczej. W trakcie tego przeglądu technicznego obserwacje zależnego od stężenia spadku w procentach związanego specyficznie [ $^3\text{H}$ ]-17β-estradiolu, małej zmienności pomiędzy kontrpróbami technicznymi przy każdym stężeniu chemicznym oraz spójności parametrów dopasowania pomiędzy trzema seriami badawczymi stanowią dobrą wskazówkę, że test i analizy danych zostały wykonane prawidłowo. Dokonując przeglądu wyników z każdej serii badawczej w przypadku badanej substancji chemicznej, należy przyjąć profesjonalny osąd, a dane wykorzystane do zaklasyfikowania poszczególnych badanych substancji chemicznych jako wiążące lub niewiążące powinny być uzasadnione i poparte naukowo.
4. W niektórych przypadkach, dane mogą wymagać większej uwagi w celu właściwego przeanalizowania i zinterpretowania danych dotyczących wiązań hrER. W poprzednich

badaniach odnotowano przypadki, w których analiza i interpretacja danych dotyczących konkurencyjnego wiązania receptorów może być utrudniona przez wzrost odsetka wiązania specyficznego podczas badania substancji chemicznych w najwyższym stężeniu (rysunek 2). Ten problem jest dobrze znany i spotykano się z nim podczas stosowania protokołów dotyczących szeregu testów konkurencyjnych wiązań receptorowych (3). W takich sytuacjach przy niższych stężeniach odnotowuje się reakcję zależną od stężenia, ale wraz ze zbliżaniem się stężenia badanej substancji chemicznej do granicy rozpuszczalności, przemieszczenie [ $^3\text{H}$ ]17 $\beta$ -estradiolu przestaje się zmniejszać. W takich przypadkach z danych dotyczących wysokich stężeń wynika, że osiągnięto biologiczną granicę testu. Często na przykład wiąże się to zjawisko z nierozpuszczalnością i strąceniem danej substancji chemicznej przy wysokich stężeniach, lub może ono wynikać z przekroczenia zdolności węgla drzewnego pokrytego dekstranem do zbierania niezwiązanego ligandu znakowanego izotopem w trakcie procedury oddzielania przy najwyższych stężeniach substancji chemicznych. Pozostawienie takich punktów danych podczas dopasowywania danych dotyczących wiązań konkurencyjnych do krzywej sigmoidalnej może czasem prowadzić do nieprawidłowej klasyfikacji potencjału wiązania receptora estrogenowego w odniesieniu do badanej substancji chemicznej (rysunek 2). Aby uniknąć takiej sytuacji, protokół testów wiązania hrER Freybergera–Wilsona i CERI obejmuje możliwość wykluczenia z analiz punktów danych, w przypadku których średnia kontrprób w odniesieniu do odsetka określonego wiązania [ $^3\text{H}$ ]17 $\beta$ -estradiolu wynosi 10 % lub więcej niż zaobserwowano w przypadku średniej wartości przy niższym stężeniu (tj. zazwyczaj określa się to jako zasadę 10 %). Zasadę tę można zastosować tylko raz w odniesieniu do danej krzywej i muszą pozostać dane dotyczące co najmniej 6 stężeń, aby można było poprawnie sklasyfikować krzywą.

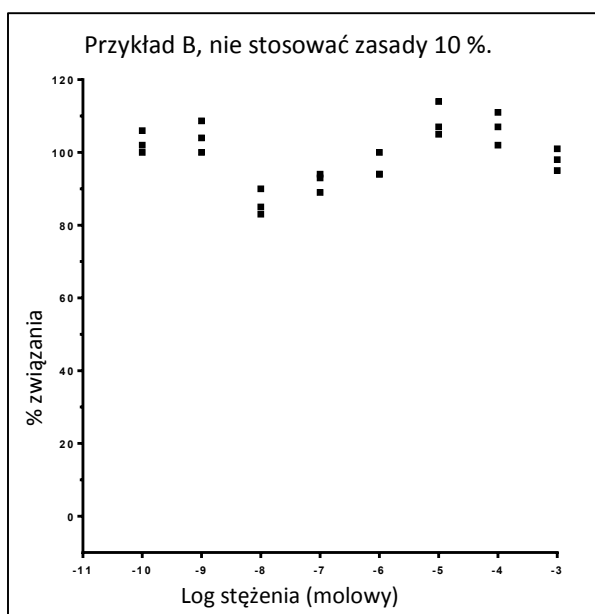
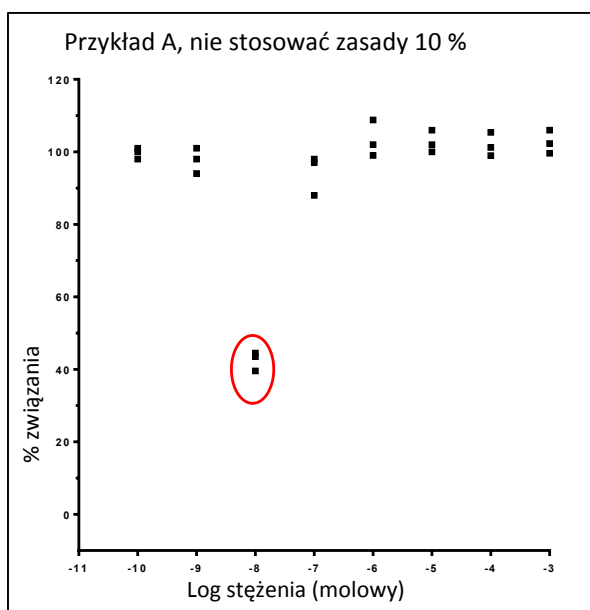
**Rysunek 2:** Przykłady, krzywe wiązania konkurencyjnego z wykorzystaniem lub bez wykorzystania zasady 10 %.



5. Należy dokładnie rozważyć zastosowanie zasady 10 % do korekty tych krzywych i stosować ją tylko w przypadkach, w których istnieją wskazujące na substancje wiążącą hrER. Podczas przeprowadzania doświadczeń na użytek badania walidacyjnego testu wiązania hrER Freybergera–Wilsona odnotowano, że zastosowanie zasady 10 % miało czasem niezamierzone i nieprzewidziane konsekwencje. Substancje chemiczne, które nie wchodziły w interakcję z receptorem (tj. rzeczywiste substancje inna niż substancje wiążąca) często odznaczały się zmiennością około 100 % wiązania radioligandu większą niż 10 % w całym zakresie badanych stężeń. Jeżeli najniższą wartość odnotowano przy niskim stężeniu, istnieje możliwość, że dane dotyczące wszystkich wyższych stężeń zostaną usunięte z analizy w wyniku zastosowania zasady 10 %, mimo że stężenia te mogłyby być przydatne do ustalenia, że dana substancja chemiczna to substancja inna niż substancja wiążąca. Na rysunku 3 przedstawiono przykłady, w których nie należy stosować zasady 10 %.

**Rysunek 3:** Przykłady, dane dotyczące wiązania konkurencyjnego, w przypadku których nie należy stosować zasady 10 %.





## Źródła

- (1) OECD (2015). *Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα)* [W:] Publikacje na temat zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 226. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.
- (2) Motulsky H. i Christopoulos A. (2003). *The law of mass action, In Fitting Models to Biological Data Using Linear and Non-linear Regression*. San Diego, Kalifornia: GraphPad Software Inc., s. 187–191. [www.graphpad.com/manuals/Prism4/RegressionBook.pdf](http://www.graphpad.com/manuals/Prism4/RegressionBook.pdf)
- (3) SC Laws, S Yavanhxay, RL Cooper i JC Eldridge (2006). *Nature of the Binding Interaction for 50 Structurally Diverse Chemicals with Rat Estrogen Receptors*. „Toxicological. Sci.”nr 94(1), s. 46–56.